

Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas en caracteres morfológicos y fisiológicos para una población de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales)

Estimation of heritability and genetic correlations in morphological and physiological traits for a population of *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales)

Natalia Gómez-Lopera^{1, 3*}, Cristina López-Gallego^{2, 4}

Resumen

La respuesta a la selección natural en caracteres cuantitativos en una población natural depende de la magnitud de variabilidad genética y las correlaciones genéticas en los rasgos, y estos parámetros genéticos pueden diferir entre categorías de rasgos. En este estudio se caracterizaron los patrones de varianza y covarianza fenotípica y se realizaron estimaciones de heredabilidad (h^2) y correlaciones genéticas de rasgos morfológicos y fisiológicos en una población de *Zamia obliqua* (Zamiaceae: Cycadales). Se probaron las hipótesis de que la varianza y la heredabilidad de rasgos morfológicos son mayores que las de rasgos fisiológicos, y que las correlaciones fenotípicas y genéticas son mayores dentro que entre las categorías de rasgos. Los valores de varianza fenotípica fueron mayores en los rasgos fisiológicos comparados con los caracteres morfológicos. Los estimativos de heredabilidad sugieren que los caracteres morfológicos presentan mayor varianza genética que los rasgos fisiológicos. Por otro lado, no se obtuvieron correlaciones genéticas significativas entre los rasgos. Sin embargo, las correlaciones fenotípicas muestran mayor correlación dentro de los caracteres morfológicos que dentro de los fisiológicos o entre rasgos morfológicos y fisiológicos. Estas estimaciones de parámetros genéticos permiten construir hipótesis sobre la evolución de caracteres fenotípicos en poblaciones naturales, y son aportes importantes al estudio de la ecología evolutiva de especies no modelo y sus poblaciones en hábitats naturales.

Palabras claves: correlaciones fenotípicas, parentesco, similitud fenotípica, variabilidad fenotípica, Zamiaceae

Abstract

The response to natural selection of quantitative traits in a natural population depends on the magnitude of genetic variability and genetic correlations between traits, and these genetic parameters can differ between trait categories. In this study we characterized the patterns of phenotypic variance and covariance and estimated heritability and genetic correlation of morphological and physiological traits in a population of *Zamia obliqua* (Zamiaceae: Cycadales). We tested the hypothesis that variance and heritability values are higher for morphological than for physiological traits, and that phenotypic and genetic correlations are larger within than between trait categories. Phenotypic variance values were higher for physiological traits than for morphological characters. Heritability estimates suggested that morphological traits had a higher genetic variance than physiological traits. On the other hand, significant estimates of genetic correlations among traits were not obtained. Nevertheless, phenotypic correlations show a higher correlation within morphological traits than within physiological traits or among physiological and morphological traits. These kinds of estimates for genetic parameters can help generate hypotheses about the evolution of phenotypic traits in natural populations, and represent important contributions to the study of evolutionary ecology in non-model species and their populations in natural habitats.

Key words: phenotypic correlations, relatedness, phenotypic similarity, phenotypic variability, Zamiaceae

Recibido: enero 2014; aceptado: junio 2014.

¹ Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

² Docente, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

Correos electrónicos (* = autor para correspondencia): ^{3*} <natalia.gomezl@udea.edu.co>; ⁴ <mariac.lopez@udea.edu.co>.

INTRODUCCIÓN

Un debate importante sobre la evolución de caracteres cuantitativos es la cantidad de variación mantenida en poblaciones naturales para diferentes tipos de rasgos. Se ha propuesto que existe un patrón de jerarquización en los valores de heredabilidad (h^2) entre categorías de rasgos de la siguiente manera: morfología > fisiología > comportamiento > historias de vida (Roff 1997). Este patrón es consistente con la hipótesis de que para rasgos expuestos a una selección natural direccional fuerte y cercanamente relacionados a la adecuación biológica, la varianza genética aditiva es baja en las poblaciones debido a que se han fijado alelos en el tiempo, en contraste con los rasgos expuestos a una selección débil que presentan altos niveles de variación genética aditiva (Teplitsky et al. 2009). Una segunda hipótesis para explicar este patrón es la plasticidad fenotípica alta de algunos caracteres, como la de los fisiológicos. Esto se debe a que la heredabilidad es inversamente relacionada a la magnitud de los efectos ambientales sobre el rasgo, entonces, rasgos altamente plásticos como aquellos a nivel de la fisiología de la hoja presentan menor heredabilidad (Geber y Griffen 2003).

Otro aspecto importante a considerar en la evolución de caracteres cuantitativos es que pueden existir complejos de rasgos ligados por correlaciones genéticas. En los escenarios en que la integración entre caracteres es beneficiosa la selección debería aumentar la correlación genética entre rasgos funcionalmente relacionados, lo que lleva a la evolución de complejos estructurales de caracteres integrados (McGlothlin et al. 2005). Si esto se cumple, la correlación genética sería más fuerte entre rasgos funcionalmente relacionados que entre rasgos independientes. Por ejemplo, la correlación genética entre caracteres vegetativos y florales suele ser menor que dentro de la categoría de rasgos florales o dentro de los propios vegetativos (Gómez et al. 2009).

Las estimaciones de heredabilidad y correlaciones genéticas son entonces fundamentales para entender los cambios fenotípicos en las poblaciones en respuesta a la selección natural y otras fuerzas evolutivas. Estos dos parámetros clásicamente se estiman a partir del grado de semejanza fenotípica entre parientes en una población. Este estudio es relativamente sencillo en poblaciones artificiales de individuos en cautiverio con una genealogía conocida y bajo condiciones del ambiente controladas. Pero en poblaciones naturales, y más aún en especies de larga vida, la aplicación de métodos clásicos de la genética cuantitativa se vuelve impráctica, pues es difícil establecer

las relaciones de parentesco entre individuos de manera precisa (Ritland 2000). Además, muchos organismos no se reproducen regularmente y el fenotipo de interés puede tardar mucho tiempo en desarrollarse (Herrera y Bazaga 2009). Sin embargo, la mayor disponibilidad de marcadores genéticos para especies no modelo ha permitido que en los últimos años se desarrollen métodos alternativos que puedan ser aplicados al análisis de la variación genética de rasgos cuantitativos de poblaciones silvestres (Garant y Kruuk 2005).

Uno de los principales métodos propuesto para estimar parámetros de genética cuantitativa en poblaciones naturales ha sido desarrollado por Ritland (1996, 2000). Este método propone el uso de marcadores moleculares para estimar el parentesco entre individuos y correlacionarlo con la similitud fenotípica y así determinar la heredabilidad y correlaciones genéticas de los rasgos de interés. Esta aproximación depende de la eficiencia de los estimadores de parentesco y de una varianza real de la relación genética entre los individuos de una población. El método de Ritland se ha usado en varios estudios para estimar heredabilidad de rasgos cuantitativos en poblaciones naturales obteniendo resultados positivos. Por ejemplo, Andrew et al. (2005) encontraron una heredabilidad significativa para la síntesis de los compuestos sideroxynal, cineol y el contenido de nitrógeno, responsables de la defensa foliar de la planta *Eucalyptus melliodora* A.Cunn. ex R.T.Baker & H.G.Sm. Más recientemente, Castellanos et al. (2011) encuentran heredabilidades significativas para categorías de rasgos florales y vegetativos, y concluyen que el método de Ritland es una buena opción para estimar este parámetro cuantitativo en poblaciones de plantas de larga vida.

En nuestro estudio, se comparó la variabilidad genética de categorías de rasgos morfológicos y fisiológicos en una población de la especie de larga vida *Zamia obliqua* A.Br. Para estimar la heredabilidad de cada rasgo y potenciales correlaciones genéticas entre los caracteres se usó el método de Ritland (1996, 2000). La hipótesis con respecto a la heredabilidad fue que los rasgos morfológicos tienen mayor heredabilidad que los fisiológicos. Por otro lado, la hipótesis con respecto a las correlaciones genéticas fue que dentro del grupo de rasgos morfológicos y dentro del grupo de rasgos fisiológicos las correlaciones genéticas son mayores que las correlaciones entre rasgos morfológicos y fisiológicos. Para probar estas hipótesis se hizo una caracterización de la variación fenotípica de cuatro caracteres morfológicos y cuatro fisiológicos, se estimó la magnitud de la heredabilidad para los rasgos y se estableció potenciales correlaciones a nivel fenotípico y genotípico dentro y entre categorías de caracteres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de estudio. *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) es una especie de gimnosperma tropical que se encuentra en bosques húmedos tropicales primarios y secundarios del sur de Panamá y las regiones del Darién y el Chocó biogeográfico de Colombia, desde 0 hasta 500 m de altitud (figura 1). Esta es una gimnosperma arborescente con un tallo entre 0,5-5 m de alto y de 5-12 cm de diámetro que tiene de 5 a 20 hojas compuestas con 10-40 folíolos. Son plantas dioicas en las cuales los conos masculinos

producen abundante polen mientras que los femeninos producen hasta 200 semillas (Stevenson 2004). Los eventos reproductivos son anuales y sincrónicos, pero cada año solo un pequeño porcentaje de individuos de la población produce órganos reproductivos. La polinización es llevada a cabo por coleópteros curculiónidos, pero se desconoce la capacidad de dispersión del polen por estos insectos. El desarrollo de las semillas tiene una duración de varios meses y la mayoría de estas tienen una dispersión restringida al ser movidas por gravedad cuando las partes del cono empiezan a descomponerse (Norstog y Nicholls 1997).



Figura 1. Ejemplares de una población de plantas de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia. A. Ejemplares de plántulas; B. Ejemplar con hojas nuevas; C. Habito; D. Conos masculinos (fotos de Cristina López-Gallego)

En este estudio se examinaron rasgos fenotípicos y genotípicos de 181 individuos correspondientes a casi la totalidad de plantas de una población de *Z. obliqua*. La población (parche de individuos aislada por al menos un kilómetro de otros parches) está compuesta por adultos y juveniles que se encuentran distribuidos en un área de una hectárea en el sotobosque de un bosque húmedo tropical, lo cual es típico de las poblaciones de esta especie en el Chocó biogeográfico. La población está localizada en la Estación Biológica “El Amargal”, en el corregimiento de Arusí del municipio de Nuquí en la región de Cabo corrientes del departamento del Chocó (Colombia).

Caracterización fenotípica de rasgos morfológicos y fisiológicos. Se midieron fenotipos cuantitativos de categorías de rasgos morfológicos y fisiológicos. Los *caracteres morfológicos* fueron: diámetro del tallo en la base (**d t**), altura total del tallo (**a t**), número de hojas viejas (**# h v**) y longitud de la hoja más larga (**l h +**). Los *caracteres fisiológicos* fueron: densidad estomática (**d e**), área foliar (**a f**), área foliar específica (**SLA**) y cantidad de clorofila a (**cl a**). Los rasgos morfológicos y fisiológicos de interés pueden cambiar de magnitud con el tamaño/edad de la planta, por lo cual para cada individuo se registró el número de folíolos de la hoja más larga para usar esta medida como una covariable en los análisis de variabilidad de los caracteres. El número de folíolos aumenta progresivamente con el tamaño/edad de las plantas de *Zamia* y esta variable ha sido usada ampliamente en estudios de ecología de cycadales para dar cuenta de las diferencias entre individuos debidas al tamaño (Norstog y Nicholls 1997).

La caracterización de los rasgos morfológicos se realizó en el campo con la ayuda de una cinta métrica. Para la evaluación de los rasgos fisiológicos se tomaron cuatro folíolos (partes de la hoja compuesta) representativos de cada uno de los individuos para ser analizados posteriormente en el laboratorio. Del envés de cada folíolo se determinó la densidad estomática por la técnica de improntas con esmalte transparente. Por otro lado, se usaron secciones de folíolos de 0,1 g para cuantificar la cantidad de clorofila a con una medición espectrofotométrica a longitudes de onda de 652 nm. Para establecer el área foliar y el área foliar específica se midió el área de cada folíolo usando fotografías digitales que fueron analizadas en el *software* Image J (Schneider et al. 2012). Posteriormente, se secaron los folíolos en un horno a 80 °C por 72 horas y se obtuvo el peso seco en una balanza analítica. El área foliar específica de cada folíolo fue calculada como la relación entre el área y peso seco del folíolo.

Para comparar la variabilidad a nivel fenotípico en la población entre los rasgos morfológicos y fisiológicos se usó la varianza para cada rasgo, después de estandarizar los valores de los diferentes caracteres (con medias iguales a cero) para evitar sesgos por las escalas de medición. Para determinar si existían correlaciones fenotípicas entre rasgos se realizaron correlaciones lineales de Spearman con los registros originales de cada individuo. Sin embargo, varios de los rasgos morfológicos y fisiológicos presentan una relación significativa con el tamaño de la planta estimado según el número de folíolos (tabla 1). Por esto, fue necesario obtener los residuales de la regresión entre cada carácter y el tamaño de la planta para realizar los análisis de la variación fenotípica y las correlaciones fenotípicas excluyendo el efecto del tamaño de la planta y de manera estandarizada. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS versión 17 (SPSS Inc. 2008).

Caracterización genotípica de los individuos. Para realizar las estimaciones de heredabilidad y correlaciones genéticas de los caracteres cuantitativos es necesario determinar el grado de parentesco entre individuos dentro de la población, para lo cual usamos marcadores moleculares microsatélites o STRs. Primero, se extrajo el ADN de folíolos secos utilizando el método de CTAB (Doyle y Doyle 1990). Posteriormente se analizaron seis marcadores polimórficos STRs para la especie *Zamia fairchildiana* L.D. Gómez, dado que no existen marcadores moleculares desarrollados para *Z. obliqua* (López-Gallego y O’Neil 2009). De los seis STRs probados usamos los cuatro marcadores que amplificaron exitosamente en *Z. obliqua* y que fueron polimórficos en la población de estudio.

Con los marcadores seleccionados, se amplificaron 4 loci para los 181 individuos muestreados en la población. Las reacciones de amplificación se prepararon en un volumen final de 15 µl teniendo en cuenta unas concentraciones finales: *buffer* (NH₄) 1X, dNTPs 0,2 mM, primers F y R 0,16 µM (*primer* R marcados con fluoróforos), Taq polimerasa 0,5 U, DNA 30 ng, MgCl₂ entre 1,5 mM y 2,5 mM. Las diferentes soluciones se incubaron a 5 min a 94 °C, seguido por 32 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de alineamiento (la temperatura varía de acuerdo al STR genotipificado), 30 s de extensión a 72 °C y 10 minutos adicionales de extensión a 72 °C al final de los 32 ciclos. Una vez se comprobó que las muestras habían amplificado a través de electroforesis en agarosa; se realizó la tipificación de los marcadores en un analizador genético automático ABI PRISM 3130 mediante la aplicación del *software* GENEMAPPER (Applied Biosystems).

Tabla 1. Coeficientes de las correlaciones fenotípicas de Spearman para los rasgos morfológicos y fisiológicos de especímenes de una población de plantas de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia, usando los datos originales (*sin corrección por el efecto del tamaño de la planta*) (# f = número de folíolos; a t = altura del tallo; d t = diámetro del tallo; h v = hojas viejas; l h = longitud de hoja; cl a = clorofila a; a f = área foliar; d e = densidad estomática; SLA = área foliar específica; ** = $p < 0,01$)

Caracteres	# f	a t	d t	h v	l h	cl a	á f	d e
# f	1,000	0,811**	0,903**	0,889**	0,909**	-0,123	0,622**	0,321**
a t	0,811**	1,000	0,916**	0,823**	0,773**	-0,209	0,637**	0,226**
d t	0,903**	0,916**	1,000	0,878**	0,888**	-0,183	0,618**	0,239**
h v	0,889**	0,823**	0,878**	1,000	0,847**	-0,233	0,613**	0,419**
l h	0,909**	0,773**	0,888**	0,847**	1,000	-0,083	0,632**	0,287**
cl a	-0,123	-0,209	-0,183	-0,233	-0,083	1,000	0,044	-0,026
a f	0,622**	0,637**	0,618**	0,613**	0,632**	0,044	1,000	0,355**
d e	0,321**	0,226**	0,239**	0,419**	0,287**	-0,026	0,355**	1,000
SLA	-0,708**	-0,666**	-0,688**	-0,679**	-0,658**	0,287	-0,472**	-0,309**

Con los genotipos de la población se determinó el grado de parentesco entre individuos para usarse en las estimaciones de parámetros de genética cuantitativa. Antes de estimar el grado de parentesco entre los individuos, se hicieron varios análisis con los genotipos de todos los loci para determinar si eran adecuados para este tipo de estimación. Primero se analizaron los loci con el programa Micro-Checker versión 2.2.3 (Oosterhout et al. 2004) para calcular la probabilidad de alelos nulos. Se obtuvieron también las frecuencias alélicas y genotípicas observadas y se probó la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg, el desequilibrio de ligamento entre los loci y se estimó la diversidad genética en la población con el programa Arlequín v.3.01 (Excoffier y Lischer 2010).

Estimativos de parentesco entre individuos. Varios estimadores de parentesco han sido desarrollados, entre los cuales se encuentran los métodos de Queller y Goodnight (1989), Ritland (1996), Lynch y Ritland (1999) y Wang (2002); y su efectividad depende de la población de estudio. Para obtener estimativos razonables del coeficiente de parentesco (r), cuando los loci exhiben codominancia son necesarios muchos loci bialélicos o relativamente pocos loci variables (Hedrick 2005). Se usó una simulación Monte-Carlo implementada en el programa Mark versión 3.1 (Ritland 1996) para escoger el mejor estimador de parentesco para nuestra población de estudio. El análisis indicó que el mejor coeficiente de

parentesco para esta población es el de Queller y Goodnight (1989), ya que presenta mayor varianza de r y varianza real [$\text{var}(r)$, necesaria para la estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas usando el método de Ritland] comparado con los otros estimadores (tabla 2). Se estimó la relación de parentesco entre todos los posibles pares de individuos en la población y su varianza real en el programa Mark para su posterior uso en los estimados de heredabilidad y correlaciones genéticas según el método de Ritland (1996).

Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas. Se usaron los valores de relación genética o parentesco entre individuos inferidos de los marcadores microsatélites y su correlación con la similitud fenotípica para estimar heredabilidad y correlaciones genotípicas de las características morfológicas y fisiológicas en la población. Para estimar el grado de similitud fenotípica entre individuos en cada uno de los rasgos es necesario eliminar el efecto del tamaño/edad de la planta sobre la similitud, por lo cual para las estimaciones de heredabilidad y correlaciones genéticas se usaron los residuos estandarizados de la regresión entre cada rasgo y el número de folíolos del individuo.

La heredabilidad y correlaciones genéticas para los caracteres, se estimaron según el método de regresión Ritland (1996, 2000) usando el programa Mark (Ritland

Tabla 2. Promedio y variabilidad de diferentes estimadores de parentesco (r) y su varianza real [$var(r)$] de especímenes de una población de plantas de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia

	ESTIMADORES							
	Ritland		Lynch-Ritland		Queller -Goodnight		Wang	
	r	$var(r)$	r	$var(r)$	r	$var(r)$	r	$var(r)$
Promedio	0,0705	0,005	0,1455	0,024	0,2888	0,121	0,5008	0,2509
Varianza	0,0051	0,000	0,1884	0,117	0,3108	0,220	0,0000	0,0000

1996). El método de Ritland (1996) propone que la heredabilidad en sentido estrecho podría ser estimada por la regresión de una medida de similitud fenotípica sobre las relaciones de parentesco genético entre los individuos obtenidas con los marcadores moleculares. La heredabilidad para cada rasgo puede ser estimada como:

$$h^2 = \frac{\text{cov}(Z_{ij}, r_{ij})}{2 \text{var}(r_{ij})} \text{ ecuación 3.1}$$

donde $\text{cov}(Z_{ij}, r_{ij})$ es la covarianza entre la relación genética estimada y la similitud fenotípica y $\text{var}(r_{ij})$ es la varianza real de los relacionados genéticamente. La estimación de la varianza real es descrita con detalle en Ritland (2000).

La correlación genética aditiva se obtiene a partir de la expresión:

$$r_{A12} = \frac{r_{ij} Y_{12ij}}{\sqrt{r_{ij} Y_{11ij} r_{ij} Y_{22ij}}} \text{ ecuación 3.2}$$

donde r_{ij} es el coeficiente de correlación genética, Y_{12ij} es la covarianza fenotípica entre los individuos i e j . El signo de la correlación genética fue estimado a partir de la covarianza entre la similitud fenotípica y la relación genética estimada ($\text{cov}(Z_{ij}, r_{ij})$). A diferencia de los estimativos de heredabilidad, este parámetro no requiere la medida de la varianza real del parentesco entre los individuos.

La estimación de heredabilidad según el método de Ritland exige la elección de una distancia mínima entre los individuos que serán comparados en una población, para evitar comparaciones entre individuos con grados

de parentesco con valores poco precisos (Ritland 1996). Para explorar la relación entre el grado de parentesco y la distancia física entre individuos se caracterizó la estructura genética espacial fina de la población en el programa Spagedi (Hardy y Vekemans 2002), y se usó una distancia mínima de 10 m entre individuos que resultó ser la distancia en la que los estimados de heredabilidad eran más precisos. Para determinar si las estimaciones de heredabilidades y correlaciones genéticas para los caracteres son significativamente diferentes de cero se usó un análisis de *bootstrapping* (1.000 *bootstraps*) implementado en el programa Mark. En este análisis un estimado es significativamente diferente de cero si el 95% de los valores del *bootstrapping* están por debajo del valor base estimado.

RESULTADOS

Caracterización fenotípica de rasgos morfológicos y fisiológicos. En términos generales se observó un patrón en el cual los rasgos fisiológicos tienen mayor varianza fenotípica cuando se comparan con los rasgos morfológicos. La cantidad de clorofila a presenta la mayor varianza fenotípica en la población, seguido por la densidad estomática, el área foliar, y por último, el área foliar específica. Por otro lado, la varianza fenotípica en los rasgos morfológicos es similar entre estos, y es mucho menor que para cualquiera de los rasgos fisiológicos (figura 2).

Cuando se consideran correlaciones fenotípicas con los valores originales de los rasgos, la mayoría de los rasgos morfológicos y fisiológicos están correlacionados entre sí, excepto con la cantidad de clorofila a (figura 3). En general, se observa un patrón en el que los rasgos morfológicos están más altamente correlacionados entre ellos mismos que los rasgos fisiológicos. Todas las posibles correlaciones entre los rasgos morfológicos son fuertes (coeficiente de

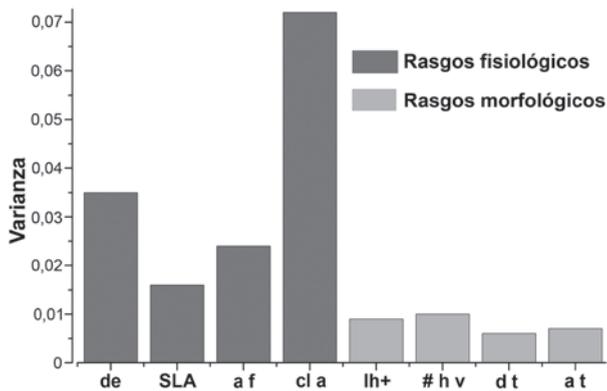


Figura 2. Varianza fenotípica para ocho caracteres fenotípicos de una población de plantas de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia (los estimativos de la varianza excluyen el efecto del tamaño/edad de la planta sobre el rasgo; d e = densidad estomática; SLA = área foliar específica; a f = área foliar; cl a = clorofila a; l h + = longitud de hoja más larga; # h v = hojas viejas; d t = diámetro del tallo; a t = altura del tallo)

correlación > 0,8) y positivas, mientras que en los rasgos fisiológicos la mitad de las posibles correlaciones son moderadas (coeficiente de correlación entre 0,3 y 0,5). Entre los rasgos fisiológicos, el área foliar y el SLA están

moderadamente correlacionados, mientras que la densidad estomática tiene una débil correlación con estos dos rasgos y adicionalmente con los rasgos morfológicos. Por otro lado, la cantidad de clorofila a no se relaciona con ningún rasgo.

Cuando el efecto del tamaño/edad de la planta es removido, se encuentra un número menor de correlaciones fenotípicas entre rasgos, sin embargo se observa el mismo patrón general que con los datos originales. En la población, los rasgos morfológicos están más altamente correlacionados entre ellos mismos que los rasgos fisiológicos, y ocasionalmente se encuentran correlacionados rasgos morfológicos con fisiológicos (figura 4). La única relación fuerte es entre la altura y el diámetro de tallo (coeficiente de correlación = 0,8). Para los otros rasgos morfológicos se observan correlaciones moderadas (coeficientes de correlación entre 0,2 y 0,4). Por otro lado, los rasgos fisiológicos presentan correlaciones débiles entre ellos mismos (coeficientes de correlación entre 0,2 y 0,3). La densidad estomática está débilmente correlacionada con el área foliar y el SLA, y estas dos últimas están mutuamente relacionadas, mientras que la cantidad de clorofila a no está correlacionado con ningún otro rasgo. Las correlaciones entre los caracteres morfológicos y fisiológicos son menos comunes y débiles, exceptuando por el área foliar y el SLA que están relacionados a los rasgos morfológicos (coeficientes de correlación entre 0,2 y 0,3).

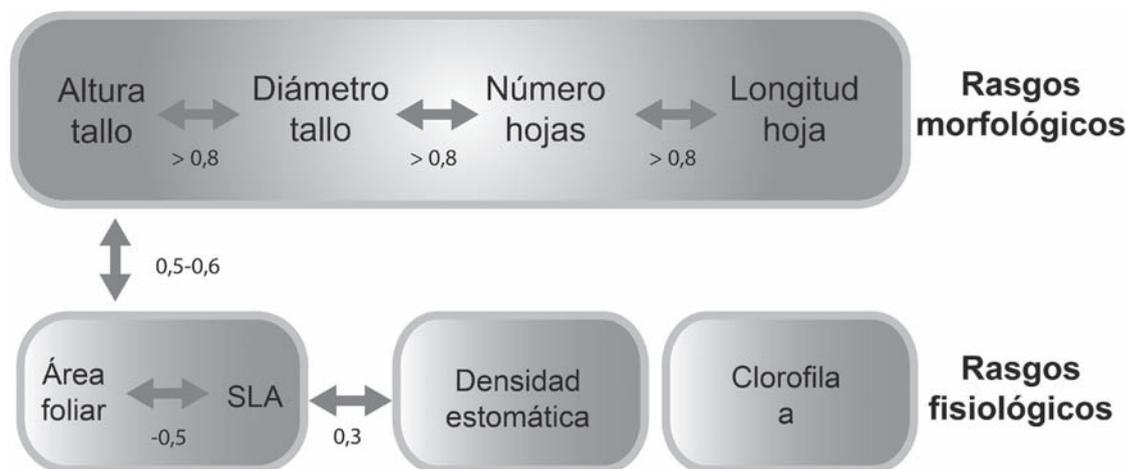


Figura 3. Esquema de las correlaciones fenotípicas para los rasgos morfológicos y fisiológicos de especímenes de una población de plantas de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia, usando los datos originales [las flechas indican la presencia de correlación y el coeficiente de correlación está indicado en el número debajo de las flechas]

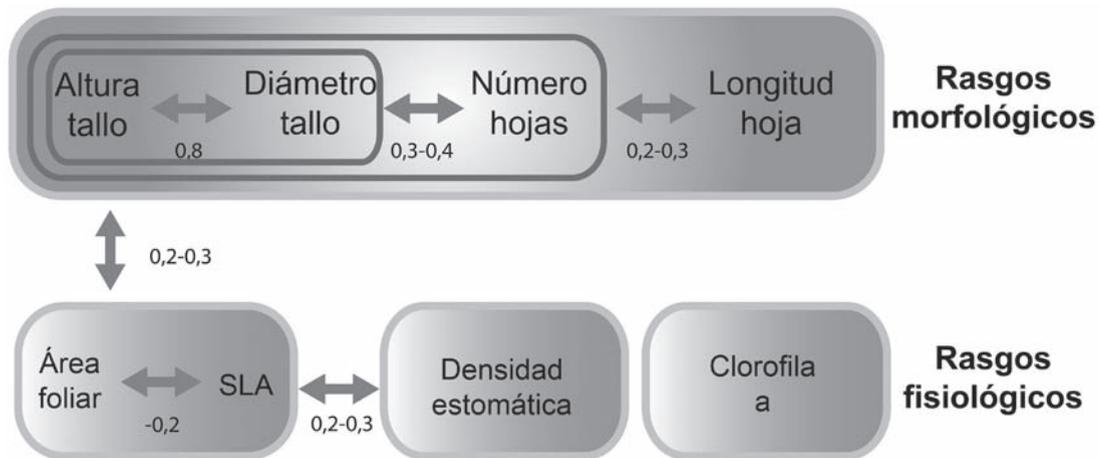


Figura 4. Esquema de las correlaciones fenotípicas corregidas por el efecto del tamaño de la planta para los rasgos morfológicos y fisiológicos de especímenes de una población de plantas de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia [las flechas indican la presencia de correlación y el coeficiente de correlación está indicado en el número debajo de las flechas]

Caracterización genotípica. Los cuatro loci microsatélites evaluados para estimar el parentesco entre los individuos fueron polimórficos con 13 alelos promedio por locus, con marcadores altamente informativos como el Zf-18 y Zf-10 con 16 y 14 alelos, respectivamente. En esta población de *Z. obliqua*, la heterocigocis observada no difirió significativamente de la esperada bajo el supuesto de equilibrio Hardy-Weinberg para los cuatro marcadores evaluados (tabla 3) y ningún loci demostró la presencia de alelos nulos. En cuanto a la prueba de desequilibrio de ligamiento, se obtuvieron valores significativos para la relación entre los loci Zf-10 y Zf-11, indicando que se encuentran en desequilibrio de ligamiento (tabla 4).

Tabla 3. Parámetros y valores P de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para cada uno de los 4 loci usados de una población de plantas en estudio de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia (# al = alelos por locus; h obs = heterocigocidad observada; h esp = heterocigocidad esperada)

Parámetros				
Locus	# al	h obs	h esp	valor P
Zf-11	12	0,77698	0,72145	0,36732
Zf-18	16	0,89888	0,89126	0,07505
Zf-5	9	0,74561	0,78712	0,12788
Zf-10	14	0,83571	0,84281	0,51392

Tabla 4. Valores P para la prueba de desequilibrio de ligamiento para uno de los cuatro loci usados de una población de plantas en estudio de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia (* = p < 0,05)

Locus 1	Locus 2	Valor p
ZF -18	ZF-5	0,357690
ZF-18	Zf-10	0,161870
ZF-5	Zf-10	0,228620
ZF-18	Zf-11	0,474360
ZF-5	Zf-11	0,390660
Zf-10	Zf-11	0,000000*

Estimaciones de heredabilidad y correlaciones genéticas. Cinco de los ocho rasgos analizados presentaron valores de heredabilidad significativamente distintos de cero, mientras que la longitud de la hoja, el SLA y la densidad estomática no parecen tener variabilidad aditiva genética en la población (figura 5). En general se observa que los rasgos morfológicos presentan heredabilidades significativas más altas que los fisiológicos. La altura y el diámetro del tallo tiene valores cercanos 0,4, y el número de hojas tienen alta heredabilidad con valor aproximado de 0,7. El área foliar tiene valor de heredabilidad bajo cercano a 0,2, y la cantidad de clorofila a tiene una heredabilidad de menos de 0,1. Los estimativos de heredabilidad fuera

del rango teórico ($0 < h^2 < 1$) son consecuencia del método del Ritland que podría representar un problema si se está interesado en valores precisos de heredabilidad, pero en este caso se desea realizar comparaciones entre categorías de rasgos.

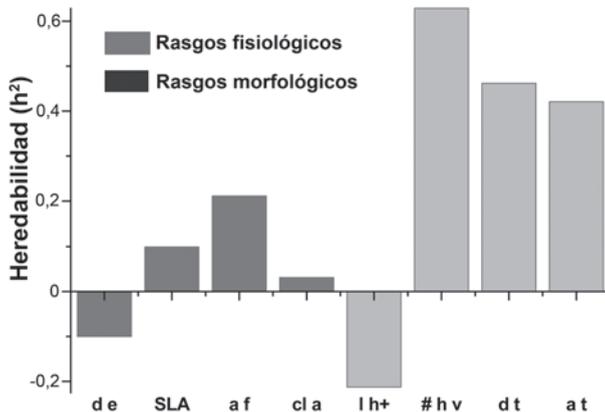


Figura 5. Estimativos de heredabilidad para ocho caracteres fenotípicos de especímenes de una población de plantas de *Zamia obliqua* A.Br. (Zamiaceae: Cycadales) del departamento del Chocó, Colombia (d e = densidad estomática; SLA = área foliar específica; a f = área foliar; cl a = clorofila a; l h+ = longitud de hoja más larga; # h v = hojas viejas; d t = diámetro del tallo; a t = altura del tallo; ns = no significativo; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

No se obtuvieron correlaciones genéticas significativamente diferentes a cero entre los rasgos, probablemente porque el error del método usado para estimar este parámetro es muy grande (Castellanos et al. 2011). Por lo tanto, se usaron las correlaciones fenotípicas como un indicativo de la potencial correlación evolutiva entre rasgos en esta población.

DISCUSIÓN

Las dificultades inherentes para estimar heredabilidad en campo han limitado su uso extensivo en estudios evolutivos en plantas (Castellanos et al. 2011). Sin embargo, en este trabajo fue posible estimar heredabilidades significativas para dos categorías de rasgos morfológicos y fisiológicos en una población natural chocona de *Z. obliqua* sin previa información de la estructura familiar de la población a través del método de Ritland (1996). En síntesis, en este estudio se encontró soporte para las dos hipótesis

planteadas: **1)** que la heredabilidad tiende a ser mayor en caracteres morfológicos que en caracteres fisiológicos (aunque algunos rasgos parecen no tener variación genética); **2)** las correlaciones fenotípicas sugieren que los rasgos morfológicos están más estrechamente relacionados entre sí que los fisiológicos entre ellos o los morfológicos con los fisiológicos.

En este trabajo fue posible obtener heredabilidades significativas en casi todos los rasgos evaluados a través del método del Ritland gracias al polimorfismo alto de los marcadores utilizados y a la estructuración genética espacial de la población (Andrew et al. 2005). Según Ritland (1996) para una adecuada estimación de parentesco son necesarios entre 2 y 10 loci, cada uno con 10 alelos promedios. En este estudio se usaron 4 marcadores con un promedio de 13 alelos por locus, cumpliendo con el requisito de alto polimorfismo. En cuanto a la estructuración genética espacial, se observa que plantas más cercanas geográficamente están más emparentadas, posiblemente como consecuencia de una dispersión de semillas restringida que generalmente se da por la gravedad. Gracias a esta estructuración espacial fina, se espera tener individuos relacionados en varios grados (e. g., hermanos completos, hermanos medios, individuos no relacionados) a distintas distancias geográficas y una varianza de parentesco entre pares de individuos significativa.

La ausencia de varianza significativa en el grado de parentesco entre individuos representa uno de los mayores obstáculos para la aplicación del método de Ritland en poblaciones naturales (Ritland 1996, Shikano 2008). Por este motivo, la exactitud de los estimativos de heredabilidad hallados con este método han sido cuestionados por varios autores (Bouvet et al. 2008, Garant y Kruuk 2005). Para varias poblaciones con conocimiento de la genealogía se estimó heredabilidad a través del método de Ritland y el método clásico, encontrando que en el primero los valores de heredabilidad son menos exactos comparados con el segundo (Coltman 2005, Frentiu et al. 2008, Thomas et al. 2002). Sin embargo, Bessega et al. (2009) encuentran una consistencia entre los estimativos de heredabilidad obtenidos por los métodos clásicos y a través del método de Ritland en la planta *Prosopis alba*, gracias a que en la población existe una varianza de parentesco significativa. En el caso hipotético que los estimativos de heredabilidad hallados no sean exactos por los errores estadísticos inherentes al método, estos pueden seguir siendo usados para la comparación de los rasgos dentro de la población como se hizo en este estudio.

Asumiendo que los estimativos de heredabilidad en este estudio son comparables entre caracteres, las heredabilidades en esta población mostraron una marcada diferencia entre categorías de rasgos. Los caracteres morfológicos presentaron una heredabilidad más alta comparados con los rasgos fisiológicos (aunque uno de los caracteres morfológicos y dos de los fisiológicos no exhibieron heredabilidades distintas de cero). Este mismo patrón de diferencias en la heredabilidad se ha observado para otras especies tanto modelo como no modelo. Por ejemplo, en un estudio realizado en 20 variedades de arroz se encontró heredabilidades más altas en rasgos relacionados con el tamaño y arquitectura de la planta que para rasgos fisiológicos (Jahn et al. 2011). De manera similar, García-Verdugo et al. (2010) detectaron heredabilidades significativas para todos los rasgos morfológicos mientras que ninguna variación genética para los caracteres fisiológicos en poblaciones naturales de *Olea europaeae* L.

En este estudio, los rasgos fisiológicos presentaron una menor heredabilidad y mayor varianza fenotípica que los caracteres morfológicos. La baja heredabilidad de los rasgos fisiológicos puede deberse a que estos están expuestos a una selección natural direccional más fuerte que los morfológicos. Roff (1997) propone un patrón de jerarquización en la heredabilidad de las categorías de rasgos, en el cual los caracteres más estrechamente conectados con la adecuación biológica presentan menor heredabilidad. Dado lo anterior, puede suponerse que los rasgos fisiológicos han fijado alelos benéficos a través del tiempo más rápidamente que los morfológicos, lo cual tiene como resultado una disminución de la varianza genética, y por ende menor heredabilidad (Teplitsky et al. 2009). Esta hipótesis es apoyada por varios estudios en poblaciones naturales que han registrado que los rasgos más cercanamente asociados a la adecuación biológica tienen menor heredabilidad que los menos asociados a esta (Coltman et al. 2005, McCleery et al. 2004, Teplitsky et al. 2009).

La plasticidad fenotípica alta de los rasgos fisiológicos puede ser otro posible factor responsable de su menor heredabilidad. Esto se debe a que la heredabilidad es inversamente relacionada a la magnitud de los efectos ambientales sobre el rasgo, entonces rasgos altamente plásticos presentan menor heredabilidad (Geber y Griffen 2003). Culley et al. (2006) sugieren que los estimativos de heredabilidad negativa o muy bajos para rasgos fisiológicos son consecuencia de la alta plasticidad que ellos presentan. En este estudio, el patrón observado

de mayor varianza fenotípica en rasgos fisiológicos podría estar asociado a mayor plasticidad fenotípica en estos caracteres. Varios estudios han informado de heredabilidades bajas en caracteres con alta plasticidad fenotípica, como el realizado por Johnson et al. (2009) que estudia la varianza genética de 24 rasgos de la planta *Oenothera biennis* y encuentra que algunos caracteres eco-fisiológicos con alta plasticidad fenotípica, como la conductancia estomática, la eficiencia en el uso del agua (WUE) y la tasa fotosintética en función del área foliar presentan una baja heredabilidad.

No se pudieron obtener estimativos significativos de correlaciones genéticas entre los rasgos. Sin embargo, analizado las correlaciones fenotípicas se encontró que los rasgos morfológicos están más altamente correlacionados entre ellos mismos que los rasgos fisiológicos y que entre las dos categorías de los rasgos, tanto con los datos originales como con los corregidos por edad/tamaño de la planta (donde las correlaciones fueron más débiles). Este patrón está de acuerdo con la hipótesis en la cual se sugiere que existe una correlación más fuerte entre rasgos funcionalmente relacionados, como los que están involucrados con el crecimiento de planta, que entre rasgos independientes (Gómez et al. 2009). Este patrón en las correlaciones podría resultar del efecto de la selección sobre combinaciones ventajosas de rasgos que pertenecen a la estructura del mismo complejo funcional (McGlothlin et al. 2005). La baja correlación entre rasgos fisiológicos podría deberse a la flexibilidad que presentan estos caracteres a las diferentes demandas ecológicas, como lo sugieren Buehler et al. (2012).

Este estudio ha mostrado la utilidad e importancia que tiene el método de Ritland para inferir parámetros cuantitativos como heredabilidad directamente en poblaciones naturales. A pesar de las potenciales limitaciones este enfoque ofrece una herramienta útil para estudios de genética cuantitativa en poblaciones naturales de plantas de largos ciclos de vida (Andrew et al. 2005).

En conclusión, usando el método de Ritland se encontró que en esta población de la especie *Z. obliqua* la heredabilidad de los rasgos morfológicos tiende a ser mayor que la de los rasgos fisiológicos, y que la varianza fenotípica de los rasgos fisiológicos es mayor que la de los morfológicos. Además, se encontró que usando las correlaciones fenotípicas se observa mayor correlación entre los rasgos morfológicos que dentro de los fisiológicos o entre rasgos morfológicos y fisiológicos. Este estudio genera información importante sobre parámetros básicos

de genética cuantitativa que describen la varianza y covarianza fenotípica y genética para caracteres de importancia ecológica dentro de una población de una especie de larga vida, y es una importante contribución al estudio de la ecología evolutiva de especies no-modelo en sus ambientes naturales.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras de este artículo agradecemos a Montgomery Botanical Center y The Cycad Society (E. U. A.) por la financiación del proyecto. El proyecto fue financiado mientras las investigadoras estaban asociadas al Grupo de Biodiversidad de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB, Medellín). Agradecemos también al personal del grupo de investigación Ecología Evolutiva y Conservación (EECO), Universidad de Antioquia por su colaboración en el trabajo de campo y al personal del grupo Genética Molecular (Genmol), Universidad de Antioquia donde realizamos los análisis genéticos y donde la investigadora principal desarrolló su trabajo de grado para el título de Bióloga.

REFERENCIAS

- Andrew RL, Peakall R, Wallis IR, Wood JT, Knight EJ, Foley WJ. 2005. Marker-based quantitative genetics in the wild?: the heritability and genetic correlation of chemical defenses in eucalyptus. *Genetics*, 171 (4): 1989-1998.
- Besega C, Saidman BO, Darquier MR, Ewens M, Sánchez L, Rozenberg P, Vilardi JC. 2009. Consistency between marker- and genealogy-based heritability estimates in an experimental stand of *Prosopis alba* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 96 (2): 458-465.
- Bouvet J-M, Kelly B, Sanou H, Allal F. 2008. Comparison of marker- and pedigree-based methods for estimating heritability in an agroforestry population of *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn. (shea tree). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 1291-1301.
- Buehler M, Vézina F, Goymann W, Schwabl I, Versteegh M, Btieleman I. 2012. Independence among physiological traits suggests flexibility in the face of ecological demands on phenotypes. *Journal of Evolutionary Biology*, 25: 1600-1613.
- Castellanos M, Alcantara J, Rey P, Bastida J. 2011. Intra-population comparison of vegetative and floral trait heritabilities estimated from molecular markers in wild Aquilegia populations. *Molecular Ecology*, 20: 3513-3524.
- Coltman D. 2005. Testing marker-based estimates of heritability in the wild. *Molecular Ecology*, 14: 2593-2599.
- Culley T, Dunbar-Wallis A, Sakai A, Weller S, Mishio S, Campbell D, Herzena M. 2006. Genetic variation of ecophysiological traits in two gynodioecious species of *Schiedea* (Caryophyllaceae). *New Phytologist*, 169: 589-601.
- Doyle J, Doyle J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Excoffier L, Lischer H. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- Frentiu F, Clegg S, Chittock J, Burke T, Blows M, Owens I. 2008. Pedigree-free animal models: the relatedness matrix reloaded. *Proceeding of Royal Society B: Biological Sciences*, 275: 639-647.
- Garant D, Kruuk L. 2005. How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. *Molecular Ecology*, 14: 1843-1859.
- García-Verdugo C, Méndez M, Velázquez-Rosas N, Balaguer L. 2010. Differential morphological and physiological responses across insular environments: phenotypic expression and heritability of light-related traits in *Olea europaea*. *Oecologia*, 164: 647-655.
- Geber M, Griffen L. 2003. Inheritance and natural selection on functional traits. *International Journal of Plant Sciences*, 164 (3 Suppl.): S21-S42.
- Gómez J, Abdelaziz M, Muñoz J, Perfectti F. 2009. Heritability and genetic correlation of corolla shape and size in *Erysimummedio hispanicum*. *Evolution*, 63 (7): 1820-1831.
- Hardy J, Vekemans X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2: 618-620.
- Hedrick PW. 2005. *Genetics of populations*. 3rd ed. Boston (U. S. A.): Jones and Bartlett. p. 274.
- Herrera C, Bazaga P. 2009. Quantifying the genetic component of phenotypic variation in unpedigreed wild plants: tailoring genomic scan for within-population use. *Molecular Ecology*, 18: 2602-2614.
- Jahn C, McKay J, Mauleon R, Stephens J, McNally K, Bush D, Leung H, Leach J. 2011. Genetic variation in biomass traits among 20 diverse rice varieties. *Plant Physiology*, 155: 157-168.
- Johnson M, Agrawal A, Maron I, Salminen J. 2009. Heritability, covariation and natural selection on 24 traits of common evening primrose (*Oenothera biennis*) from a field experiment. *Journal of Evolutionary Biology*, 22: 1295-1307.
- López-Gallego C, O'neil P. 2010. Life-history variation following habitat degradation associated with differing fine-scale spatial genetic structure in a rainforest cycad. *Population Ecology*, 52: 191-201.
- Lynch M, Ritland K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, 152: 1753-1766.
- McCleery R, Pettifor R, Armbruster P, Meyer K, Sheldon B, Perrins M. 2004. Components of variance underlying fitness in a natural population of the great tit *Parus major*. *The American Naturalist*, 164 (3): E62-E7
- McGlothlin J, Parker P, Nolan V, Ketterson E. 2005. Correlational selection leads to genetic integration of body size and an attractive plumage trait in dark-eyed juncos. *Evolution*, 59: 658-671.
- Norstog K, Nicholls T. 1997. *The biology of the cycads*. New York (U. S. A.): Cornell University Press. p. 363.
- Oosterhout C, Hutchinson W, Wills P, Shipley P. 2004. MICROCHECKER: software for indentifying and correcting

- genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Queller D, Goodnight K. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43: 258-275.
- Ritland K. 1996. A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution*, 50: 1062-1073.
- Ritland K. 2000. Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, 9: 1195-1204
- Roff D. 1997. *Evolutionary quantitative genetics*. New York (U. S. A.): Chapman & Hall. p. 493.
- Schneider C, Rasband S, Eliceiri K. 2012. NIH Image to Image J: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9: 671-675.
- Shikano T. 2008. Estimation of quantitative genetic parameters using marker-inferred relatedness in Japanese flounder: A case study of upward bias. *Journal of Heredity*, 99 (2): 94-104.
- SPSS Inc. 2008. *SPSS Statistics for Windows, Software Version 17.0*. Chicago: SPSS Inc. Released.
- Stevenson D. 2004. Cycads of Colombia. *The Botanical Review*, 70 (2): 194-234.
- Teplitsky C, Mills J, Yarrall J, Merila J. 2009. Heritability of fitness components in a wild bird population. *Evolution*, 63-3: 716-726.
- Thomas S, Hil W. 2000. Estimating quantitative genetic parameters using sibships reconstructed from marker data. *Genetics*, 155: 1961-1972.
- Wang J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160: 1203-1215.