

Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas en caracteres morfológicos y fisiológicos para una población de la cycada *Zamia obliqua*

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE BIÓLOGA

Natalia Gómez Lopera

Estudiante biología

Cristina López Gallego, PhD

Asesora

Gabriel Bedoya Berrio MSc

Co-Asesor

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biología

2012

A mi familia, especialmente a mis padres

Tabla de contenido

Lista de tablas y figuras	4.
Resumen	6
1. Introducción	8
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo general	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Materiales y Métodos	14
3.1. Sistema de estudio	14
3.2 Caracterización fenotípica de rasgos morfológicos y fisiológicos	15
3.3 Caracterización genotípica de los individuos	13
3.4 Estimativos de parentesco entre los individuos	16
3.5 Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas	21
4. Resultados	23
4.1 Caracterización fenotípica de los rasgos morfológicos y fisiológicos	23
4.2 Caracterización genotípica y estimación de parentesco entre los individuos	26
4.3 Estimaciones de heredabilidad y correlaciones genéticas	29
5. Discusión	31
6. Referencias	35
Anexos	40

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 3.1. Secuencias de los cebadores (R: cebador inverso, F cebador directo), condiciones de PCR y número de acceso en Genbank para cuatro marcadores microsatélites usados en este estudio	18
Tabla 3.2. Promedio y variabilidad de diferentes estimadores de parentesco -r- y su varianza real -Var(r)- en la población de estudio.....	20
Figura 4.1 Varianza fenotípica de los ocho rasgos evaluados en la población (la comparación excluye el efecto del tamaño/edad de la planta).....	23
Figura 4.2 Esquema de las correlaciones fenotípicas para los rasgos morfológicos y fisiológicos con los datos originales.....	24
Figura 4.3 Esquema de las correlaciones fenotípicas corregidas por el efecto del tamaño de la planta para los rasgos morfológicos y fisiológicos.....	25
Figura 4.4 Tamaño de los alelos (pares de bases) y frecuencias alélicas del locus ZF-18 en la población de estudio.....	26
Figura 4.5 Tamaño de los alelos (pares de bases) y frecuencias alélicas del locus ZF-10 en la población de estudio.....	27
Figura 4.6 Tamaño de los alelos (pares de bases) y frecuencias alélicas del locus ZF-5 en la población de estudio.....	27

Figura 4.7 Tamaño de los alelos (pares de bases) y frecuencias alélicas del locus ZF-5 en la población de estudio.....28

Figura 4.8 Coeficiente de parentesco promedio (Queller & Goodnight 1989) entre pares de individuos de una población de *Z. obliqua* en función de las clases de distancia.....29

Figura 4.9 Estimativos de heredabilidad para ocho caracteres fenotípicos para una población de *Z obliqua*.....30

Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas en caracteres morfológicos y fisiológicos para una población de la cycada *Zamia obliqua*

RESUMEN

El entendimiento de como las fuerzas evolutivas moldean la variabilidad de los rasgos fenotípicos dentro y entre poblaciones de una especie es uno de los temas centrales de biología evolutiva. Para predecir la potencial respuesta a la selección natural de los caracteres cuantitativos en una población se usan parámetros genéticos como la heredabilidad del rasgo y las correlaciones genéticas entre caracteres. La heredabilidad y las correlaciones genéticas clásicamente se estiman a partir del grado de semejanza fenotípica entre parientes en una población, pero esta estimación es impráctica en poblaciones naturales de organismos de ciclos de vida largos donde las relaciones de parentesco son desconocidas. Métodos basados en marcadores genéticos se han convertido en una alternativa para estimar parámetros de genética cuantitativa en poblaciones naturales. Uno de estos métodos es el de Ritland (1996) que se basa en la correlación entre la similitud fenotípica y el parentesco o las relaciones genéticas (estimadas con marcadores moleculares) entre los individuos en una población.

En este estudio caracterizamos los patrones de varianza y covarianza fenotípica y realizamos estimaciones de heredabilidad y correlaciones genéticas de rasgos morfológicos y fisiológicos en una población de la cycada *Zamia obliqua*. Pusimos a prueba las hipótesis de que los rasgos morfológicos tendrían mayor variabilidad genética que los rasgos fisiológicos, y que las correlaciones dentro categorías de rasgos morfológicos y fisiológicos serían más altas que las relaciones entre rasgos de distintas categorías. Para probar estas hipótesis muestreamos casi la totalidad de individuos de una población de *Z. obliqua* (181 individuos) y determinamos la varianza y covarianza para ocho rasgos fenotípicos, cuatro morfológicos (altura y diámetro del tallo, número de hojas, longitud de la hoja) y cuatro fisiológicos (área

foliar, área foliar específica, densidad estomática, cantidad de clorofila A). Usamos el método de Ritland para obtener estimados de la heredabilidad y correlaciones genéticas para los caracteres.

La varianza fenotípica no mostró un patrón claro con respecto a las categorías de caracteres morfológicos y fisiológicos. Por el contrario, los estimativos de heredabilidad mostraron una marcada diferencia entre categorías de rasgos. Los caracteres morfológicos exhibieron una heredabilidad más alta comparados con los rasgos fisiológicos (aunque algunos caracteres no tienen heredabilidad significativamente distinta de cero). La baja heredabilidad de los rasgos fisiológicos puede deberse a que estos están expuestos a una mayor selección natural direccional que los morfológicos o a que exhiben alta plasticidad fenotípica. Por otro lado, no se pudieron obtener estimativos significativos de las correlaciones genéticas entre los rasgos. Sin embargo, usando las correlaciones fenotípicas como indicador de las relaciones genéticas entre rasgos, encontramos una mayor correlación entre los caracteres morfológicos que dentro de los fisiológicos o entre rasgos morfológicos y fisiológicos. Este patrón podría ser el resultado de una mayor integración funcional entre los caracteres morfológicos en esta población. Este estudio fue importante para mejorar el entendimiento de los patrones de variabilidad en caracteres fenotípicos de distintos tipos (como morfológicos y fisiológicos) en poblaciones naturales de especies de larga vida, debido a que existen pocos trabajos en este ámbito investigativo.

1. INTRODUCCION

La evaluación de la magnitud y la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones, su relación con las diferencias presentes en el fenotipo y los factores que contribuyen a mantenerla son temas centrales en la biología evolutiva. La variabilidad genética de caracteres cuantitativos y su distribución en las poblaciones está determinada principalmente por las interacciones entre las fuerzas evolutivas de mutación, deriva, selección, y migración (Futuyma, 2009). Algunos de estos factores originan o mantienen la variación genética heredable de los rasgos, mientras que otras resultan en la pérdida de variabilidad.

La heredabilidad y las correlaciones genéticas son los principales parámetros genéticos para entender la variación de rasgos cuantitativos (Roff, 1997). La correlación genética entre los rasgos puede surgir por los mecanismos de pleiotropía, donde un locus tiene efecto sobre dos o más rasgos, por desequilibrio de ligamiento entre loci donde todos afectan un solo rasgo, o por la acción conjunta de la selección natural sobre varios rasgos (Lynch & Walsh, 1998). Por otro lado, la heredabilidad es la proporción total de varianza fenotípica atribuible al efecto aditivo de los genes ($h^2 = VA/VP$) que afectan a un rasgo fenotípico. La heredabilidad y las correlaciones genéticas determinan el potencial evolutivo de una población, al afectar la potencial respuesta a selección natural o artificial en los caracteres de los organismos (Falconer & Mackay, 1996).

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 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 con 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 una menor heredabilidad (Geber and Griffen 2003).

Además de la magnitud de la variabilidad genética en los distintos tipos de rasgos, la respuesta a la selección natural está mediada también por las correlaciones genéticas entre estos (Gómez et al, 2009). 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 (Venable & Burquez 1990; 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).

Para explorar el papel de la selección natural en los cambios fenotípicos en las poblaciones es entonces necesario estimar la heredabilidad y las correlaciones genéticas de rasgos de interés. 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 aun 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. Además, muchos organismos no se reproducen regularmente y el fenotipo de interés puede tardar mucho tiempo en desarrollarse (Ritland & Travis 2004, Andrew et al 2005, Herrera & 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 sin una genealogía conocida (Garant & Kruuk 2005).

Los estudios de heredabilidad y otros parámetros cuantitativos usando marcadores moleculares en poblaciones naturales tienen varias ventajas sobre estudios en ambientes controlados. Una de ellas es que se puede estimar la magnitud de la heredabilidad y correlaciones genéticas en ambientes naturales incorporando el efecto de la variación ambiental (Ritland & Ritland, 1996). Esto es importante ya que ocasiones los organismos modelos o poblaciones artificiales no reflejan fielmente los parámetros que afectan la evolución del rasgo en el ambiente natural, como estrés y competencia que pueden afectar el resultado de la acción de la selección natural. Por ejemplo, la heredabilidad medida en ambientes controlados, donde la varianza ambiental es reducida, puede ser más grande que la que se estima en condiciones naturales, generando predicciones pobres sobre las tasas de evolución de los rasgos (Geber & Griffen, 2003). Otra ventaja que ofrecen este tipo de estudios es que pueden ser desarrollados en grandes escalas espaciales o temporales que no podrían ser exploradas en ambientes controlados. Por ejemplo, solo en condiciones naturales se puede estudiar sí la heredabilidad de un rasgo cambia a través de los años en una población, o se pueden comparar parámetros genéticos en múltiples poblaciones para estimar divergencia de caracteres (Castellanos et al, 2011).

Para inferir los parámetros genéticos cuantitativos en poblaciones naturales se han desarrollado diferentes herramientas analíticas que pueden utilizar genealogías completas o parciales o la estimación de parentesco sin conocimiento previo de la estructura genealógica de la población (Garant & Kruuk 2005). En principio, la reconstrucción de la genealogía es la mejor manera para la estimación de los parámetros genéticos cuantitativos en poblaciones (Thomas et al. 2000). Un ejemplo de este método alternativo es el modelo mixto analizado bajo máxima verisimilitud restringida (REML) descrito por Zhang et al (2007), que permite la

reconstrucción de la genealogía en una población a través de relaciones genéticas entre individuos estimadas con marcadores genéticos. Sin embargo, los estimativos de heredabilidad a través de la reconstrucción de la genealogía requieren al menos de alguna información previa, como la discriminación de adultos y sus posibles descendientes u observaciones de comportamiento de posibles apareamientos (Garant & Kruuk 2005). Inclusive con este tipo de información, la reconstrucción de la genealogía basada en marcadores moleculares presenta dificultades, ya que los marcadores moleculares son sensibles a error de los datos y a mutaciones (Butler et al. 2004)

Uno de los principales métodos propuesto para estimar parámetros de genética cuantitativa en poblaciones naturales sin necesidad de reconstruir la genealogía 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, se ha encontrado una heredabilidad significativa en una hierba anual (*Mimulus guttatus*) para varios rasgos incluyendo caracteres altamente relacionados con la adecuación biológica (Ritland y Ritland, 1996). Klaper et al (2001) usaron aloenzimas y marcadores microsatélites para estudiar la heredabilidad de caracteres de resistencia a la herbívora en el árbol *Quercus laevis*, y encontraron que varios caracteres de defensa (como compuestos fenólicos) son heredables. El estudio que presenta los resultados más significativos aplicando este método es el realizado por Andrew et al (2005) con poblaciones naturales de *Eucalyptus melliodora*, que encontró alta heredabilidad para la síntesis de los compuestos sideroxynal, cineol y el contenido de nitrógeno responsables de la defensa foliar de la planta. Mas 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.

Estos estudios son importantes porque demuestran que los métodos basados en marcadores moleculares para estimar heredabilidad pueden ser aplicados a rasgos cuantitativos de especies de larga vida con un sistema de apareamiento mixto. Sin embargo, para tener una aplicación exitosa del método de Ritland se deben tomar en cuenta varios aspectos del sistema de estudio (como la estructuración genética de la población a estudiar) y contar con marcadores altamente informativos que puedan ser analizados en varias escalas espaciales (Andrew et al, 2005). En particular, se debe tener en consideración la variación en los coeficientes de parentesco entre los individuos para que los resultados arrojados por este método no sobreestimen la heredabilidad (Shikano, 2008). A pesar de sus potenciales limitaciones, este enfoque ofrece una herramienta útil para estudios de genética cuantitativa en poblaciones naturales (Andrew et al, 2005).

En este estudio comparamos la variabilidad genética de categorías de rasgos morfológicos y fisiológicos en una población de la especie de larga vida *Zamia obliqua*. Para estimar la heredabilidad de cada rasgo y potenciales correlaciones genéticas entre los caracteres usamos el método de Ritland (1996). Nuestra hipótesis y predicción con respecto a la heredabilidad era que los rasgos morfológicos tienen una mayor heredabilidad que los fisiológicos. Por otro lado, nuestra hipótesis y predicción con respecto a las correlaciones genéticas era 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 hicimos una caracterización de la variación fenotípica de cuatro caracteres morfológicos y cuatro fisiológicos, estimamos la magnitud de la heredabilidad para los rasgos y establecimos potenciales correlaciones a nivel fenotípico y genotípico dentro y entre categorías de caracteres.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Comparar los estimativos de heredabilidad y correlaciones genéticas entre caracteres morfológicos y fisiológicos en una población de la cycada *Zamia obliqua*

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la variación fenotípica y las correlaciones fenotípicas de caracteres morfológicos y fisiológicos en una población de *Zamia obliqua*.
- Determinar la heredabilidad de caracteres morfológicos y fisiológicos a través de marcadores genéticos para establecer cual presenta un mayor componente genético.
- Estimar correlaciones genéticas de diferentes categorías de rasgos cuantitativos (morfológicos y fisiológicos) y comparar las correlaciones entre estos grupos de caracteres.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Sistema de estudio

Zamia obliqua (Zamiaceae) es una especie de gimnospermas tropicales que se encuentra en bosques húmedos tropicales primarios y secundarios del sur de Panamá y las regiones del Darién y el Choco biogeográfico de Colombia, desde 0 hasta 500 msnm. Ésta es una cycada 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 con conos masculinos y femeninos producidos en individuos separados; 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 (géneros *Rophalotria* y *Pharaxonotha*), 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 & Nicholls, 1997).

En este estudio examinamos rasgos fenotípicos y genotípicos de 181 individuos correspondientes a casi la totalidad de plantas de una población de *Zamia 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 Choco biogeográfico. La población esta 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 Choco (Colombia).

3.2 Caracterización fenotípica de rasgos morfológicos y fisiológicos

Medimos fenotipos cuantitativos de categorías de rasgos morfológicos y fisiológicos. Los caracteres morfológicos fueron el diámetro en la base y la altura total del tallo, el número de hojas viejas, la longitud de la hojas mas larga; y los fisiológicos fueron la densidad estomática, el área foliar, el área foliar específica (SLA) y la cantidad de clorofila 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 registramos 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 en *Zamia* y esta variable ha sido usada ampliamente en estudios de ecología de cycadas para dar cuenta de las diferencias entre individuos debidas al tamaño (Norstog & Nicholls, 1997).

La caracterización de los rasgos morfológicos la realizamos en el campo con la ayuda de una cinta métrica. Para la evaluación de los rasgos fisiológicos tomamos cuatro folíolos (partes de la hoja compuesta) representativos de cada uno de los individuos para ser analizados posteriormente en el laboratorio. Los folíolos fueron conservados en alcohol para usarlos en las estimaciones de área foliar, SLA y densidad estomática, y algunos de ellos fueron protegidos con papel de aluminio para el análisis de su contenido de clorofila.

Del envés de cada folíolo determinamos la densidad estomática por la técnica de improntas con esmalte transparente. Según esta técnica, aplicamos esmalte a una región de 2 cm² que fue retirado posteriormente con una cinta adhesiva y esta sección la observamos en un microscopio óptico con aumento de 10 X 5. En el microscopio elegimos cinco campos visuales aleatorios para contar el número de estomas y luego obtener el promedio entre campos visuales. Por otro lado, usamos secciones de folíolos de 0.1 gramos 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 (SLA) medimos el área de cada folíolo usando fotografías digitales que fueron analizadas en el software Image J (National Institute of Mental Health). Posteriormente secamos los folíolos en un horno a 80°C por 72 horas y obtuvimos 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 (Garnier et al, 2001). Determinamos el promedio del área foliar y el SLA de los folíolos para cada individuo en la población.

Para comparar la variabilidad a nivel fenotípico en la población entre los rasgos morfológicos y fisiológicos usamos la varianza para cada rasgo. Para determinar si existían correlaciones fenotípicas entre rasgos (relación lineal) realizamos correlaciones de Spearman con los registros originales de cada individuo. Sin embargo, varios de los rasgos morfológicos y fisiológicos presentan una correlación significativa con el tamaño de la planta estimado según el número de folíolos (anexo 3). Por esto, fue necesario obtener los residuales de la correlación 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. Consecuentemente, la variabilidad y las correlaciones fenotípicas entre los caracteres se estimaron usando estos residuales para eliminar el efecto del tamaño de la planta. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS versión 17 (IBM, 2008).

3.3 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. En la genotipificación de los marcadores moleculares en los 181 individuos muestreados, primero extrajimos el ADN, probamos diferentes juegos de cebadores de los cuales elegimos 4 loci microsatélites, amplificamos los

loci con PCR, y tipificamos cada individuo en un analizador genético para los cuatro loci.

El ADN de cada individuo lo extrajimos de folíolos secos que se encontraban en sílica gel, utilizando el método de CTAB. Este método comprende básicamente los siguientes pasos: lisis de células, lisis de núcleos, precipitación de proteínas, precipitación de ADN y rehidratación de ADN. Inicialmente se descompone la pared celular de las muestras por medio de nitrógeno líquido que permite tener un acceso al ADN mientras enzimas celulares y químicos permanecen inactivos. Una vez que el tejido está lo suficientemente macerado, lo resuspendimos en un tampón CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Con el fin de purificar el ADN, las partículas insolubles las eliminamos a través de centrifugación, mientras que las proteínas solubles y otros minerales los separamos con cloroformo. Tomamos la fase acuosa del precipitado donde se encuentra el ADN y lo lavamos para eliminar las sales contaminantes. Finalmente obtuvimos la madeja que corresponde al ADN purificado el cual se lava con etanol al 100% y lo resuspendimos en TE 1X para su posterior almacenamiento (Doyle & Doyle 1990). Las muestras de ADN las cuantificamos en un NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. El rango de las concentraciones del ADN extraído para las muestras de hojas fue entre 30 y 250 ng/μl. Una vez el ADN fue extraído se almacenaron las muestras a -20°C hasta proceder a la amplificación de los loci microsatélites.

Dado que no existen marcadores moleculares desarrollados para *Zamia obliqua*, analizamos seis marcadores polimórficos STR's desarrollados para la especie *Zamia fairchildiana* (López-Gallego & O'Neil, 2009). De los seis STRs probados usamos los cuatro marcadores que amplificaron exitosamente en *Z. obliqua* y fueron polimórficos en la población de estudio (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Secuencias de los cebadores (R: cebador inverso, F cebador directo), condiciones de PCR y número de acceso en Genbank para cuatro marcadores microsatélites usados en este estudio

Locus	Secuencia de los cebadores	Fluorocromo	Temp. Alinea. (°C)	Conc. MgCl ₂ (mM)	N° de acceso
Zf-05*	R: AGGACGATCAGAAATGGAAG F: GTGGCAAGTGTCCCTGTTG	Hex	55	1.5	EU1798 39
Zf- 10*	R: GGTGGAAAATAATGGGTCAAA F: CCCTAAAGGTCCCTTTGCTT	Tet	59.4	2.5	EU1798 42
ZF 11*	R: CCCTAAAGGTCCCTTTGCTT F: TGGGTCAAAATATGTTATGCTTT	Fam	55	2.5	EU1798 43
Zf-18*	R: TGACCTTGGATGTGGAAAGA F: AGAGCACTTAAACCCAGGACA	Fam	58.5	1.5	EU1798 44

Con los marcadores seleccionados, amplificamos los 4 loci para los 181 individuos muestreados en la población. Las reacciones de amplificación las preparamos 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 (Sambrook, 1989). Las diferentes soluciones las incubamos 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, ver tabla 3.1), 30 s de extensión a 72°C y 10 minutos adicionales de extensión a 72°C al final de los 32 ciclos.

Una vez comprobamos que las muestras habían amplificado a través de electroforesis en agarosa; realizamos la tipificación de los marcadores (e.g. la asignación tamaño alélico) en un analizador genético automático ABI PRISM 3130 mediante la aplicación del software GENEMAPPER (Applied Biosystems, 2001). Para esto, tomamos 2 µl de los productos de amplificación de cada marcador a los cuales les adicionamos una mezcla de 0.3 µl de Rox500 (marcador de peso

molecular) y 12 μ l de formamida desionizada (la cual despliega el ADN) y los desnaturalizamos a 95°C durante 5 min.

Con los genotipos de la población determinamos 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, hicimos varios análisis con los genotipos de todos los loci para determinar si eran adecuados para este tipo de estimación (si estaban en equilibrio de Hardy-Weinber y si estaban en desequilibrio de ligamiento). Primero analizamos los loci con el programa Micro-Checker versión 2.2.3 (Oosterhout et al, 2004) para calcular la probabilidad de alelos nulos. La presencia de alelos nulos es una causa común de las desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg en loci microsatélites. Obtuvimos también las frecuencias alélicas y genotípicas observadas, el desequilibrio de ligamento entre los loci y la diversidad genética en la población con el programa Arlequín v.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). Con las frecuencias alélicas pudimos obtener las frecuencias genotípicas homocigotos y heterocigotos esperados para realizar una prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) bajo la hipótesis nula de una distribución aleatoria de genotipos en un locus. Con la prueba determinamos la probabilidad de encontrar combinaciones de kk genotipos heterocigotos u homocigotos menor o igual que los observados. La significancia de esta desviación la determinamos obteniendo estimativos de probabilidades a través de una cadena de Markov con una longitud de iteraciones de 10000. En este análisis, los genotipos que se presenten con una mayor probabilidad que la de una distribución aleatoria se encuentran en desequilibrio HW (Hedrick, 2005).

3.4 Estimativos de parentesco entre individuos

Varios estimadores de parentesco han sido desarrollados, entre los cuales se encuentran los métodos de Queller & Goodnight (1989), Ritland (1996), Lynch & Ritland (1999), y Wang (2002); y su efectividad depende de la población de estudio. Usamos 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 (r) para esta población es el de Queller Queller & Goodnight (1989), ya que presenta una mayor varianza de r y varianza real (necesaria para la estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas usando el método de Ritland) comparado con los otros estimadores (Tabla 3. 2). Estimamos 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).

Tabla 3.2 Promedio y variabilidad de diferentes estimadores de parentesco - r - y su varianza real - $Var(r)$ - en la población de estudio.

	Ritland		Lynch/ Ritland		Queller		Wang	
	r	$Var(r)$	r	$Var(r)$	r	$Var(r)$	r	$Var(r)$
media	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

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 & Vekemans, 2002). Para esta caracterización usamos el coeficiente de parentesco de Queller & Goodnight (1989) y graficamos el estimado promedio de parentesco entre categorías de individuos que se encontraban en diferentes clases de distancias (por ejemplo individuos que se encuentran separados entre 0 y 10 m o entre 10 y 20 m de distancia). Este análisis es necesario porque si la población tiene una alta estructuración a nivel geográfico fino (como es común en plantas) individuos muy distantes pueden tener valores promedios negativos para el coeficiente de parentesco (si la probabilidad de estar

emparentados es menor que la que se esperaría para individuos elegidos al azar en la población). Usamos entonces este análisis para determinar la distancia de corte mínima adecuada para elegir pares de individuos en la población que tienen estimados de similitud genética mayor que cero y que son útiles para calcular la varianza real en el grado de parentesco entre individuos en la población.

3.5 Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas

Usamos 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 genéticas 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 usamos los residuos estandarizados de la regresión entre cada rasgo y el número de folíolos del individuo

La heredabilidad y correlaciones genéticas para los caracteres los estimamos según el método de regresión Ritland (1996, 2000) usando el programa Mark (Ritland, 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 similitud fenotípica del rasgo cuantitativo Y para dos individuos i, j fue calculada como Z_{ij} :

$$Z_{ij} = \frac{(Y_i - U)(Y_j - U)}{V} \quad \text{eq. 3.1}$$

donde U y V son la media y la varianza de Y respectivamente, en la población. Entre todos los pares, el promedio Z_{ij} es igual a la correlación fenotípica. Los componentes genéticos de similitud son estimados como:

$$Z_{ij} = 2r_{ij}h^2 + e_{ij} \text{ eq. 3.2}$$

donde r_{ij} es el coeficiente de relación genética, h^2 es la heredabilidad y e_{ij} es el error aleatorio. Entonces la heredabilidad se estimó como:

$$h^2 = \frac{\text{Cov}(Z_{ij}, r_{ij})}{2\text{Var}(r_{ij})} \text{ eq. 3.3}$$

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 (1996 y 2000).

Las correlaciones genéticas entre caracteres (1 y 2) se estiman usando la covarianza fenotípica entre individuos (i e J), determinada como:

$$Y_{12ij} = (Y_{1i} - U)(Y_{2j} - U) \text{ eq 3.4}$$

y la correlación genética aditiva que se obtienen a partir de la expresión:

$$r_{A12} = \frac{r_{ij}Y_{12ij}}{\sqrt{r_{ij}Y_{11ij}r_{ij}Y_{22ij}}} \text{ eq. 3.5}$$

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.

Para determinar si las estimaciones de heredabilidades y correlaciones genéticas para los caracteres son significativamente diferentes de cero usamos un análisis de bootstrapping (1000 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.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización fenotípica de rasgos morfológicos y fisiológicos

En términos generales observamos que la altura del tallo presenta la mayor varianza fenotípica en la población, incluso dos veces más grande que el segundo rasgo con la varianza más grande (SLA). El área foliar específica (SLA), el área foliar y la longitud de la hoja tienen valores de varianza fenotípica intermedios en comparación con los otros rasgos (Figura 4.1). No se observa un patrón claro en cuanto la variación fenotípica cuando se comparan los rasgos morfológicos con los fisiológicos.

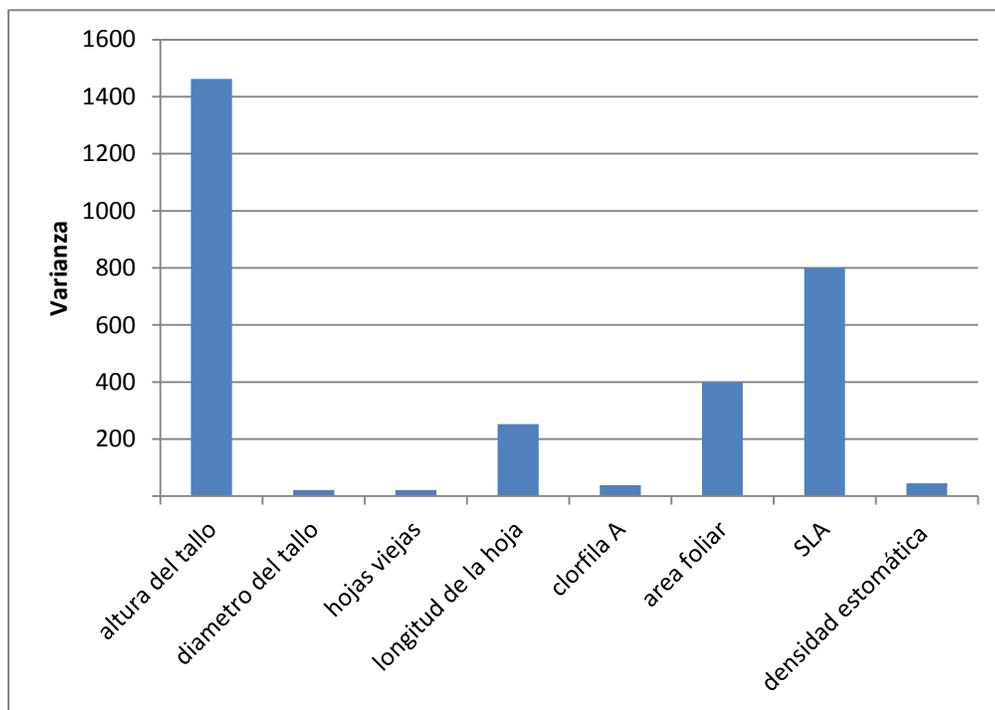


Figura 4.1 Varianza fenotípica de los ocho rasgos evaluados en la población (la comparación excluye el efecto del tamaño/edad de la planta)

Cuando se consideran correlaciones fenotípicas con los valores originales de los rasgos, la mayoría de los rasgos morfológicos y fisiológicos están correlacionados entre si, excepto con la cantidad de clorofila A (Figura 4.2). En general se observa un patrón en el que los rasgos morfológicos están mas altamente correlacionados entre ellos mismos que los rasgos fisiológicos. Todas las posibles correlaciones entre los rasgos morfológicos (6 en total) son fuertes (coeficiente de correlación >0.8) y positivas, mientras que en los rasgos fisiológicos 3 de las 6 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 no se relaciona con ningún rasgo (la matriz de correlaciones fenotípicas se encuentra en el anexo 3).

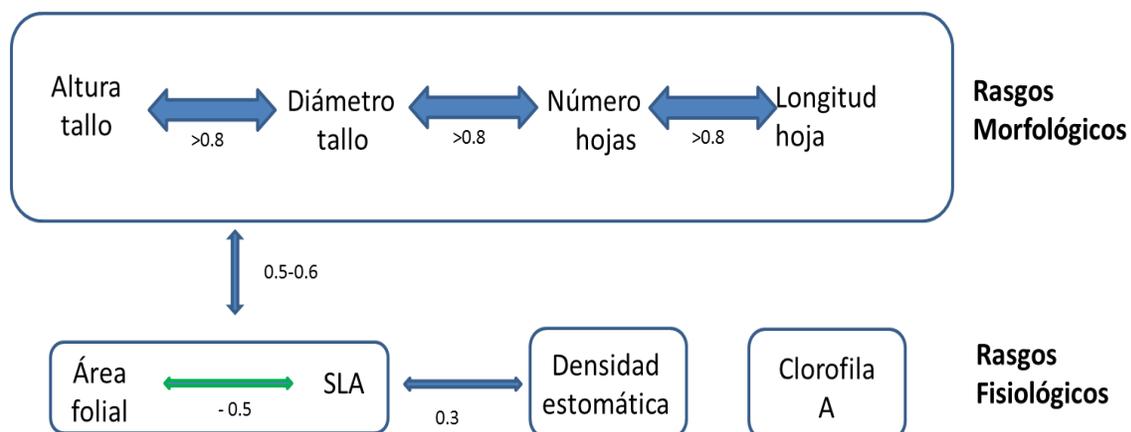


Figura 4.2 Esquema de las correlaciones fenotípicas para los rasgos morfológicos y fisiológicos con los datos originales. Las flechas y el grosor de estas indican la presencia de correlación y la magnitud del coeficiente de correlación (número debajo de las flechas).

Cuando el efecto del tamaño/edad de la planta es removido, encontramos 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 mas altamente correlacionados entre ellos mismos que los rasgos fisiológicos, y ocasionalmente se encuentran correlacionados rasgos morfológicos con fisiológicos (Figura 4.3). 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 esta débilmente correlacionada con el área foliar y el SLA mutuamente relacionadas, mientras que la cantidad de clorofila A no esta 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) (la matriz de correlaciones fenotípicas se encuentra en el anexo 4).

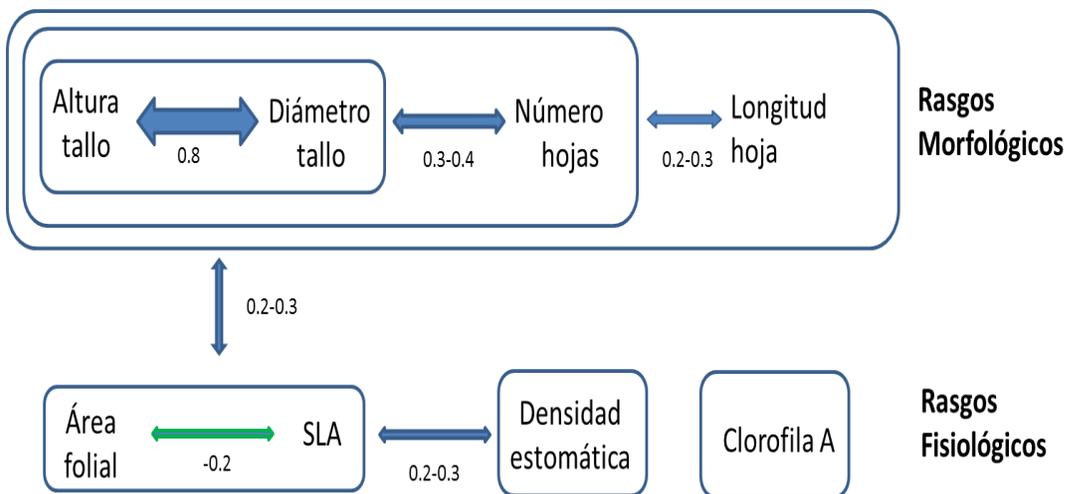


Figura 4.3 Esquema de las correlaciones fenotípicas corregidas por el efecto del tamaño de la planta para los rasgos morfológicos y fisiológicos. Las flechas y el grosor indican la presencia de correlación y la magnitud del coeficiente de correlación (número debajo de las flechas)

4.2 Caracterización genotípica y estimación de parentesco entre individuos

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. La distribución alélica de todos los loci fue multimodal (Figuras 4.4 a 4.7). En esta población de *Z. obliqua* la heterocigosis observada no difirió significativamente de la esperada bajo el supuesto de Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) para los cuatro marcadores evaluados (anexo 1), y ningún loci demostró la presencia de alelos nulos. En cuanto a la prueba de desequilibrio de ligamiento obtuvimos valores significativos para la relación entre los loci Zf-10 y Zf-11, indicando que se encuentran en desequilibrio de ligamiento (anexo 2).

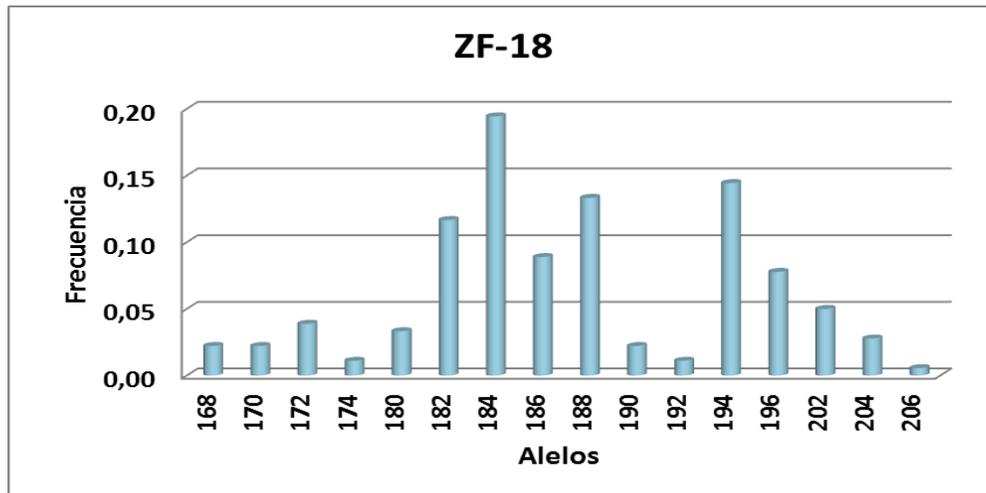


Figura 4.4 Tamaño de los alelos (pares de bases) y frecuencias alélicas del locus ZF-18 en la población de estudio.

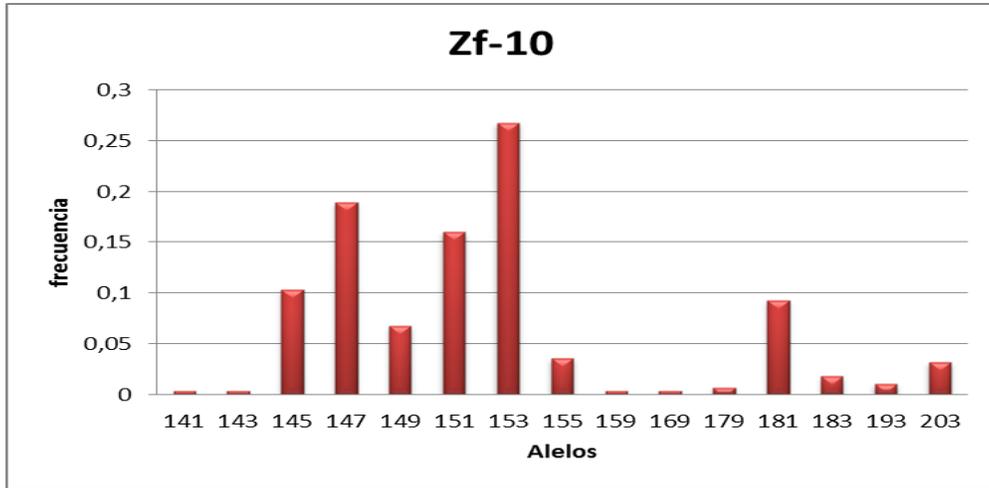


Figura 4.5 Tamaño de los alelos (pares de bases) y frecuencias alélicas del locus ZF-10 en la población de estudio.

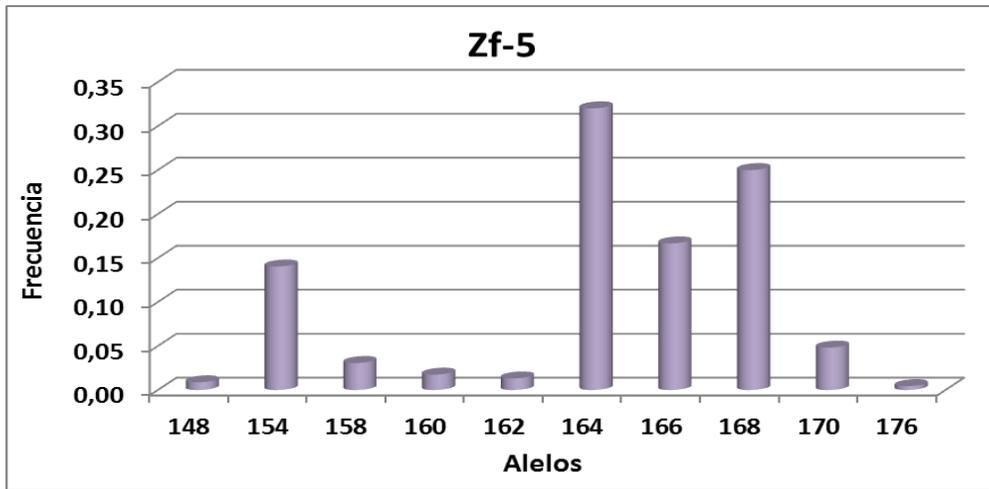


Figura 4.6 Tamaño de los alelos (pares de bases) y frecuencias alélicas del locus ZF-5 en la población de estudio.

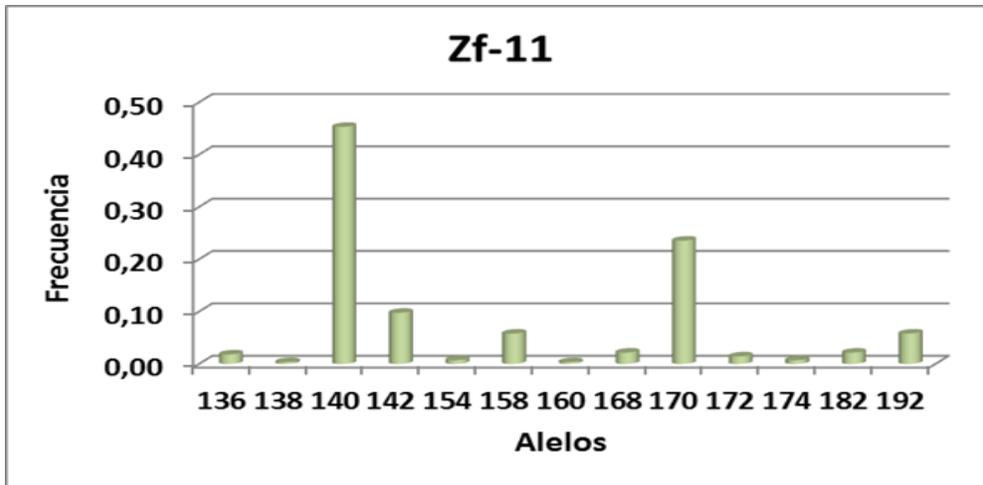


Figura 4.7 Tamaño de los alelos (pares de bases) y frecuencias alélicas del locus ZF-5 en la población de estudio.

En la población de estudio el coeficiente de parentesco fue menor a medida que aumenta la distancia geográfica entre los individuos. Los coeficientes de parentesco presentan un valor alto en pares de individuos separados por menos de 10 metros de distancia que corresponden a las plantas más vecinas (Figura 4.8). Se evidenció una reducción drástica en coeficiente de parentesco entre individuos a más de 10 metros de distancia, y a más de 40 metros se presentan valores negativos de parentesco entre plantas. Según los resultados de la estructura espacial del parentesco en la población, realizamos los estimativos de heredabilidad con una distancia de corte de 10 metros, i.e. usando solo los individuos cercanos con coeficientes de parentesco positivos. Se encontró un valor promedio de parentesco entre pares de individuos alto de 0.572 y una varianza del coeficiente de parentesco de 0.019.

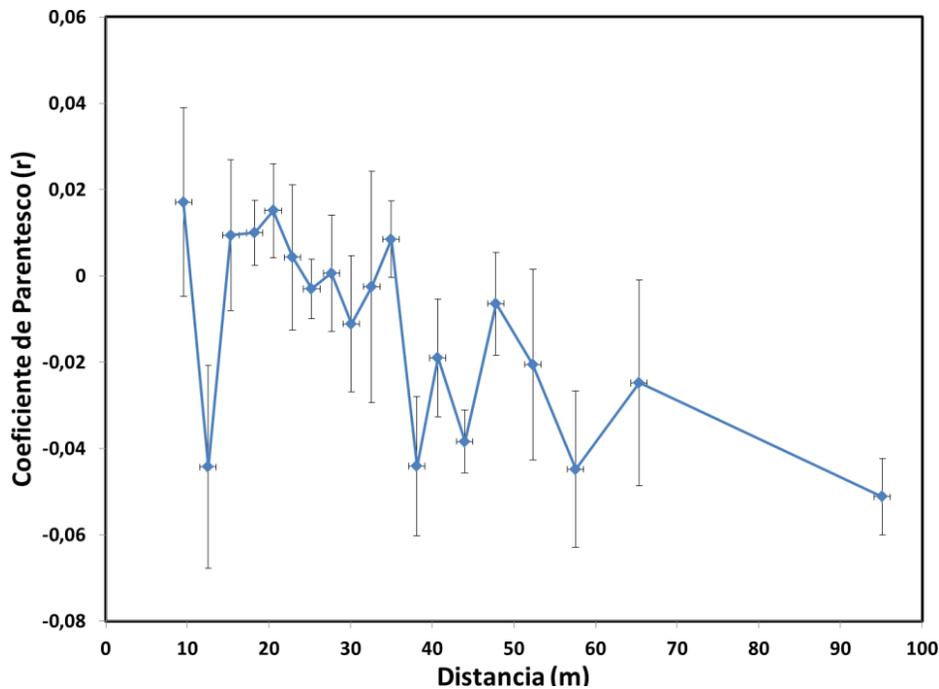


Figura 4.8 Coeficiente de parentesco promedio (Queller & Goodnight 1989) entre pares de individuos de una población de *Z. obliqua* en función de las clases de distancia. Las barras verticales indican el error estándar del estimado del coeficiente de parentesco para esa clase de distancia.

4.3 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 4.9). 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 una alta heredabilidad con un valor aproximado de 0.7. El área foliar tiene un 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 esta interesado en valores precisos de

heredabilidad, pero en este caso se desea realizar comparaciones entre categorías de rasgos.

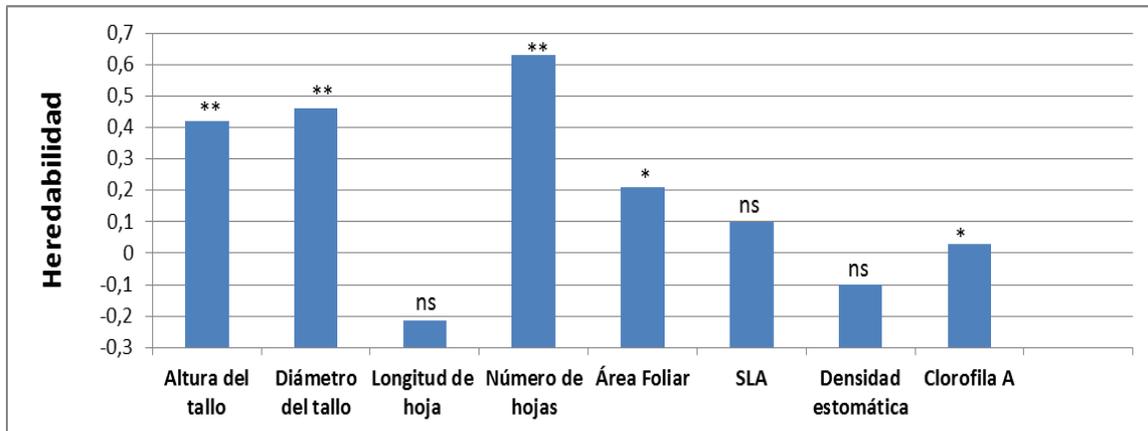


Figura 4.9 Estimativos de heredabilidad para ocho caracteres fenotípicos para una población de *Z. obliqua*. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns=no significativo.

No obtuvimos 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.

5. DISCUSION

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 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 encontramos soporte para las dos hipótesis planteadas: 1) que la heredabilidad tiende a ser mayor en caracteres morfológicos que en caracteres fisiológicos (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 usamos 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 (menos de 10 m) 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; Csilléry et al. 2006; Shikano 2008). Por este motivo, la exactitud de los estimativos de heredabilidad hallados con este

método han sido cuestionados por varios autores (Garant & Kruuk 2005; Bouvet et al. 2008). 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 (Thomas et al. 2002; Coltman 2005; Frentiu et al. 2008; Van Horn et al. 2008). 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.

Otra dificultad en la aplicación del método de Ritland resulta de que los coeficientes de parentesco entre pares de individuos tienden a tener grandes errores en su estimación (Ritland, 2000). Se puede alcanzar una mayor precisión y exactitud de los estimativos de parentesco aumentando el número de marcadores polimórficos, usando marcadores con un alto número de alelos o incrementando la cantidad de individuos genotipificados (Wang 2004; 2007). 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 mas 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 no variación genética para los caracteres fisiológicos en poblaciones naturales de *Olea europaea*.

La baja heredabilidad de los rasgos fisiológicos puede deberse a que estos están expuestos a una mayor selección natural direccional 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 una menor heredabilidad. Dado a lo anterior, puede suponerse que los rasgos fisiológicos han fijado alelos benéficos a través de tiempo más rápidamente que los morfológicos, lo cual tiene como resultado una disminución de la varianza genética y por ende una menor heredabilidad (Teplitsky, et al 2009). Esta hipótesis es apoyada por varios estudios en poblaciones naturales que han reportado que los rasgos mas cercanamente asociados a la adecuación biológica tienen menor heredabilidad que los menos asociados a esta (Gustafsson 1986; Merilä & Sheldon 2000; McCleery et al. 2004; Coltman et al. 2005, Teplitsky,et al 2009).

La plasticidad fenotípica alta de los rasgos fisiológicos puede ser otro posible factor responsable de a 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 una menor heredabilidad (Geber and Griffen 2003). Maddox and Root (1987) y 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. Varios estudios han reportado 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 una 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.

Aunque no se pudieron obtener estimativos significativos de correlaciones genéticas entre los rasgos, se pueden usar las correlaciones fenotípicas como una aproximación a la correlación genética entre rasgos, ya que estas son un buen reflejo de su contraparte genética en plantas (Waitt & Levin, 1998). En este estudio encontramos 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 sugiere Bueheler 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 encontramos 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 (aunque en algunos caracteres la heredabilidad no es significativamente distinta de cero); y que no hay un patrón claro con respecto a la variabilidad fenotípica de caracteres morfológicos y fisiológicos en la población. Además, encontramos que usando las correlaciones fenotípicas se observa una 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 genética para rasgos fenotípicos dentro de una población de una especie de larga vida, al probar algunas hipótesis que comparan la variabilidad de caracteres cuantitativos de distintas categorías en una población natural.

6. 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 defences in eucalyptus. *Genetics*. 171:1989–1998.

Applied Biosystems. 2001. ABI Prism 3130 de Applied Biosystems.

Besega C, Saidman BO, Darquier MR et al. (2009) Consistency between marker- and genealogy-based heritability estimates in an experimental stand of *Prosopis alba* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 96, 458–465

Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 503–511.

Bouvet J, 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.

Brenner E, Stevenson D and Twigg R.2003. Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. *TRENDS in Plant Science* Vol.8 No.9

Buehler M, Vézina F, Goymann W, Schwabl I, Versteegh M Btieleman I . piersma T. 2012. Independence among physiological traits suggests flexibility.in the face of ecological demands on phenotypes. . *EVOL. BIOL.* 25 1600–1613

Butler K, Field C, Herbinger CM, Smith BR (2004) Accuracy, efficiency and robustness of four algorithms allowing full sibship reconstruction from DNA marker data. *Molecular Ecology*, 13, 1589–1600.

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.

Crnokrak, P. and D, A Roff. 1995. Dominance variance: associations with selection and fitness. *Heredity* 75:530-540

Csilléry K, Johnson T, Beraldi D et al. (2006). Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics*, 173, 2091–2101.

Culley TM, Dunbar-Wallis AK, Sakai AK, Weller SG, Mishio M, Campbell DR, Herzenach M (2006) Genetic variation of ecophysiological traits in two gynodioecious species of *Schiedea* (Caryophyllaceae). *New Phytol* 169:589–601

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Falconer DS, Mackay TFC. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th ed. New York: Longman

Futuyma D. 2009. Evolution. Massachusetts : Sinauer Associates.

Garant D, Kruuk LEB ,2005. How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. *MolecularEcology*, **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 y. Griffen L..2003. Inheritance and natural selection on functional traits. *Int. J. Plant Sci.* 164(3 Suppl.):S21–S42

Gomez J, Abdelaziz M, Muñoz J and Perfectti F. 2009. Heritability and genetic correlation of corolla shape and size in *Erysimum mediohispanicum*. *Evolution* 63-7: 1820–1831

Gustafsson, L. 1986. Lifetime reproductive success and heritability: empirical support for Fisher's fundamental theorem. *Am. Nat.* 128:761–764.

Hardy OJ, 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

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

IBM SPSS Statistics versión 17 2008

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*, Vol. 155, pp. 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. *J. EVOL. BIOL.* 22: 1295–1307

López C, O’Neil P. 2009. Life-history variation following habitat degradation associated with differing fine-scale spatial genetic structure in a rainforest cycad. *The Society of Population Ecology and Springer* DOI 10.1007/s10144-009-0171-3

Lynch, M., and B. Walsh, 1998 *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer, Sunderland, MA.

Lynch M, Ritland K (1999). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, 152, 1753–1766.

Klaper, R., K. Ritland, T. A. Mousseau and M. D. Hunter, 2001. Heritability of phenolics in *Quercus laevis* inferred using molecular markers. *J. Hered.* 92: 421–426.

MARK versión 3 .Disponible en <http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>)

McCleery, R. H., R. A. Pettifor, P. Armbruster, K. Meyer, B. C. Sheldon, and

M. Perrins. 2004. Components of variance underlying fitness in a natural population of the great tit *Parus major*. *Am. Nat.* 164:E62–E72.

McGlothlin, J.W., P. G. Parker, V. Nolan Jr., and E. D. Ketterson. 2005. Correlational selection leads to genetic integration of body size and an attractive plumage trait in dark-eyed juncos. *Evolution* 59:658–671.

Merilä, J., and P. Crnokrak, 2001. Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *J. Evol. Biol.* 14: 892–903.

Merilä, J., B. C. Sheldon, and L. E. B. Kruuk. 2001. Explaining stasis: microevolutionary studies in natural populations. *Genetica* 112:199–222.

Maddox GD, Root RB (1987). Resistance to 16 diverse species of herbivorous insects within a population of goldenrod, *Solidago altissima*: genetic variation and heritability. *Oecologia* 72:8–14

Norstog KJ, Nicholls TJ. 1997. The biology of the cycads. Cornell University Press, Ithaca

Oosterhout, C.V., W. F. Hutchinson, D. P. Wills, and P. Shipley 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. 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., and C. Ritland, 1996. Inferences about quantitative inheritance based on natural population structure in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. *Evolution* 50: 1074–1082.

Ritland K (2000) Detecting inheritance with inferred relatedness in nature. In: *Adaptive Genetic Variation in the Wild* (eds Mousseau TA, Sinervo B, Endler J), pp. 187–199. Oxford University Press, Oxford, UK.

Ritland K (2005) Multilocus estimation of pairwise relatedness with dominant markers. *Molecular Ecology*, 14, 3157–3165.

Ritland K. 2011. Evolutionary potential in the wild: more than meets the eye. *Molecular Ecology* 20, 3494–3495

Ritland K, Travis S (2004) Inferences involving individual coefficients of relatedness and inbreeding in natural populations of *Abies*. *Forest Ecology and Management*, 197, 171–180

Roff D A. 1997. Evolutionary quantitative genetics. Chapman & Hall, New York.

Sambrook J, F.E.F.a.M.T.. 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York.

Sillanpää M. 2011. On statistical methods for estimating heritability in wild populations. *Molecular Ecology* 20, 1324–1332

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

Stevenson, D. 2004. Cycads of Colombia. *The Botanical Review* 70(2): 194–234

Teplitsky C, Mills J, Yarrall J, and Merila J. 2009. Heritability of fitness components in a wild bird population. *Evolution* 63-3: 716–726.

Thomas SC, Hill WG (2000) Estimating quantitative genetic parameters using sibships reconstructed from marker data. *Genetics*, 155, 1961–1972.

Van de Casteele T, Galbusera P, Matthysen E. 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, 10, 1539–1549

Van Horn RC, Altmann J, Alberts SC (2008) Can't get there from here: inferring kinship from pairwise genetic relatedness. *Animal Behaviour*, 75, 1173–1180

Venable, D. L., and A. M. Burquez. 1990. Quantitative genetics of size, shape, life-history, and fruit characteristics of the seed heteromorphic composite *Heterosperma pinnatum*. II. Correlation structure. *Evolution* 44:1748–1763.

Wang J (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160, 1203.

Zhang Z, Buckler E, Van Vleck L . 2007. Technical note: Use of marker-based relationships with multiple-trait derivative-free restricted maximal likelihood. Faculty Papers and Publications in Animal Science. Paper 124. <http://digitalcommons.unl.edu/animalscifacpub>

ANEXOS

ANEXO 1. Parámetros y valor P de la prueba para probar Equilibrio Hardy-Weinberg para cada los 4 loci usados en el estudio

Locus	# alelos por locus	Hetocigosidad Observada	Hetocigosidad Esperada	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

ANEXO 2. Valor P para la prueba de desequilibrio de ligamiento entre los cuatro loci usados en el estudio

Locus 1	Locus 2	Valor P
ZF -18	ZF-5	0.35769
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*

ANEXO 3. Coeficientes de las correlaciones fenotípicas de Spearman para los rasgos morfológicos y fisiológicos usando los datos originales (sin corrección por el efecto del tamaño de la planta.

Rasgo	Número de folíolos	Altura del tallo	Diámetro del tallo	Hojas viejas	Longitud hoja	Clorofila A	Área Foliar	SLA	Densidad estomática
Número de folíolos	1,000	.811**	.903**	.889**	.909**	-,123	.622**	-.708**	.321**
Altura del tallo	.811**	1,000	.916**	.823**	.773**	-,209	.637**	-.666**	.226**
Diámetro del tallo	.903**	.916**	1,000	.878**	.888**	-,183	.618**	-.688**	.239**
Hojas viejas	.889**	.823**	.878**	1,000	.847**	-,233	.613**	-.679**	.419**
Longitud hoja	.909**	.773**	.888**	.847**	1,000	-,083	.632**	-.658**	.287**
Clorofila A	-,123	-,209	-,183	-,233	-,083	1,000	,044	,287	-,026
Área foliar	.622**	.637**	.618**	.613**	.632**	,044	1,000	-.472**	.355**
SLA	-.708**	-.666**	-.688**	-.679**	-.658**	,287	-.472**	1,000	-.309**
Densidad Estomática	.321**	.226**	.239**	.419**	.287**	-,026	.355**	-.309**	1,000

ANEXO 4. Coeficientes de las correlaciones fenotípicas de Spearman corregidas por el efecto del tamaño de la planta para los rasgos morfológicos y fisiológicos.

Rasgo	Altura del tallo	Diámetro del tallo	Hojas viejas	Longitud hoja	Clorofila A	Área Foliar	SLA	Densidad estomática
Altura del tallo	1,000	.779**	.425**	-,053	-,095	.243**	-,133	-,084
Diámetro del tallo	.779**	1,000	.385**	.188	-,101	.191*	-,172*	-,058
Hojas viejas	.425**	.385**	1,000	.211**	-,348	,100	-,048	,047
Longitud hoja	-,053	.188	.211**	1,000	-,003	.320**	-,181*	,116
Clorofila A	-,095	-,101	-,348	-,003	1,000	,038	,247	,010
Área foliar	.243**	.191*	,100	.320**	,038	1,000	-,237**	.188
SLA	-,133	-,172*	-,048	-,181*	,247	-,237**	1,000	-,225**
Densidad Estomática	-,084	-,058	,047	,116	,010	.188	-,225**	1,000

** significativos a un nivel 0.01

*significativos a un nivel 0.05