



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

Integración fenotípica foliar de *Turnera velutina* en dos estadios ontogenéticos

# **TESIS**

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

PRESENTA:

**Biól. María de Jesús Xóchitl Damián Domínguez**

TUTORA PRINCIPAL:

**Dra. Karina Boege Paré, Instituto de Ecología**

COMITÉ TUTOR:

**Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Instituto de Ecología**

**Dr. José Jaime Zúñiga Vega, Facultad de Ciencias**

México, D.F., octubre de 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





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

Integración fenotípica foliar de *Turnera velutina* en dos estadios ontogenéticos

# **TESIS**

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

PRESENTA:

**Biól. María de Jesús Xóchitl Damián Domínguez**

TUTORA PRINCIPAL:

**Dra. Karina Boege Paré, Instituto de Ecología**

COMITÉ TUTOR:

**Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Instituto de Ecología**

**Dr. José Jaime Zúñiga Vega, Facultad de Ciencias**

México, D.F., octubre de 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 06 de mayo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **DAMIÁN DOMÍNGUEZ MARÍA DE JESÚS XÓCHITL** con número de cuenta 301167879 con la tesis titulada " **INTEGRACIÓN FENOTÍPICA FOLIAR DE *TURNERA VELUTINA* EN DOS ESTADIOS ONTOGENÉTICOS,**" , bajo la dirección de la **DRA. KARINA BOEGE PARÉ:**

Presidente: DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI  
Vocal: DR. MARK EARL OLSON ZUNICA  
Secretario: DR. JOSÉ JAIME ZÚÑIGA VEGA  
Suplente: DR. JORGE ARTURO MEAVE DEL CASTILLO  
Suplente: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de agosto de 2013.

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente de la interesada.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 255133 para realizar los estudios de Maestría.

A los proyectos CONABIO-132404 y PAPIIT-IN215010 que financiaron este trabajo.

A la Dra. Karina Boege Paré, la Dra. Rocío Cruz Ortega y el Dr. Jaime Zúñiga Vega; cuyos comentarios enriquecieron notablemente este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Karina Boege Paré, por darme la oportunidad de trabajar con ella. Gracias por la confianza y el apoyo recibido, por su conducción siempre amable, no exenta de rigor.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega por sus y comentarios apoyo en los ensayos químicos para la cuantificación de clorofila y por el préstamo de equipo de laboratorio.

Al Dr. Jaime Zúñiga Vega, por sus comentarios entusiastas y las sugerencias realizadas.

A los Doctores Juan Fornoni, Mark Olson Zunica y Jorge Meave, por la revisión de la versión preliminar de este escrito. Sus críticas, observaciones y sugerencias enriquecieron de manera notable este trabajo.

Al M. en C. Rubén Pérez, por su apoyo logístico durante el trabajo de campo y de laboratorio.

Al M. en C. Raúl Iván Martínez Becerril, por su amabilidad y apoyo en el uso de la microbalanza del Laboratorio de Ecología de Conducta de Artrópodos.

A la M. en C. Kumiko Shimada Miyasaka del Instituto de Geología, por su atención en la cuantificación de carbono y nitrógeno del material vegetal.

Al personal del Centro de Investigaciones Costeras La Mancha, por el apoyo recibido durante las estancias para el trabajo de campo. A mis ayudantes de campo, Yilotl, Nora, Athié, Augusto y Cynthia, quienes hicieron más llevadero el trabajo.

A todos los compañeros el laboratorio de Interacción Planta-Animal, por compartir ideas y también por estar en desacuerdo con ellas, por su disposición y ayuda. A los Turneritos por brindarme la oportunidad de aprender a su lado. A los buenos amigos del cubículo, Nora, Sofía, Blanca y Augusto, que lo convirtieron en uno de los mejores lugares para trabajar.

A mis padres, apoyo indispensable e incondicional en mi crecimiento como persona y profesionalista.

A Cynthia, compañera en aventuras y desventuras, hermana menor que siempre brinda sorpresas y consejos.

あ  
ら  
た  
ふ  
と  
青  
葉  
若  
葉  
の  
日  
の  
光

Look, so holy:  
green leaves, young leaves  
in the light of the sun.

Matsuo Bashō

# ÍNDICE

## 1. INTRODUCCIÓN

Integración fenotípica y modularidad	1
Variación y covariación entre atributos	3
Covarianza entre los atributos foliares	4
<i>Turnera velutina</i> como modelo para el estudio de la integración fenotípica foliar	6

## 2. OBJETIVOS

8

## 3. MÉTODOS

Sitio de estudio	9
Sistema de estudio	10
Obtención de individuos para el muestreo	11
Medición de atributos	12
Experimento de selección	17
Análisis estadístico	18

## 4. RESULTADOS

Comparación de atributos entre estadio	22
Patrón de la correlación entre atributos	23
Comparación de las matrices de varianza-covarianza	24
Delimitación de grupos funcionales	24
Magnitud de la integración fenotípica	29
La integración fenotípica de las hojas como blanco de la selección natural	30
Análisis de rutas	31

## 5. DISCUSIÓN

Diferencias ontogenéticas entre estadios	33
Identificación de grupos funcionales en la hoja	34
Patrón de correlación entre atributos	35
Integración fenotípica foliar	36
Selección jerárquica sobre las hojas de <i>T. velutina</i>	38

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

41

## 7. LITERATURA CITADA

42

## 8. ANEXOS

55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perspectivas de la modularidad en plantas.	2
Figura 2. Localización del CICOLMA en el estado de Veracruz y características de temperatura y precipitación.	9
Figura 3. Estructuras reproductivas de <i>Turnera velutina</i> .	10
Figura 4. Hipótesis evaluadas en el análisis de rutas.	21
Figura 5. Estructura de las correlaciones entre los atributos foliares de <i>Turnera velutina</i> .	25
Figura 6. Aporte de las cargas a los Componentes Principales de la varianza de los atributos de las hojas de <i>Turnera velutina</i> en dos estadios ontogenéticos.	28
Figura 7. Variación genética en los índices de integración fenotípica foliar total, de los atributos de defensa y de los atributos de mantenimiento en dos estadios ontogenéticos.	30
Figura 8. Hipótesis del efecto indirecto de la INT sobre la adecuación.	32

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores promedio $\pm$ error estándar (Coeficiente de Variación) de los 11 atributos cuantificados en las hojas de <i>Turnera velutina</i> y estadísticos de la prueba de U para determinar diferencias entre estadios.	23
Tabla 2. Análisis de las matrices de varianza-covarianza.	26
Tabla 3. Índices de integración fenotípica foliar de <i>Turnera velutina</i> en dos estadios ontogenéticos.	29
Tabla 4. Análisis de regresión múltiple y gradientes de selección direccional sobre los atributos foliares y sobre los submódulos funcionales de <i>Turnera velutina</i> .	32

## RESUMEN

Las plantas son organismos modulares, constituidos por unidades semi-independientes. Una forma de abordar el estudio de estas unidades es a través del análisis de la integración fenotípica, es decir, de la estructura de varianza-covarianza entre atributos, y del análisis de la magnitud y el patrón de las correlaciones entre éstos. Considerando que las plantas enfrentan presiones de selección que cambian a lo largo del desarrollo, se espera que la integración fenotípica cambie en función de la disponibilidad de recursos y las prioridades funcionales. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar los niveles de integración fenotípica de las hojas de *Turnera velutina* en plantas de dos estadios ontogenéticos: juvenil y reproductivo, además de determinar si existen grupos de atributos con una relación funcional. Por último, se evaluó si la selección natural ha actuado sobre los atributos individuales, combinaciones de atributos o directamente sobre la integración fenotípica. Se cuantificaron once atributos foliares relacionados con la fisiología, la morfología y la defensa contra herbívoros en 168 plantas de estadio juvenil y 164 plantas de estadio reproductivo, correspondientes a 24 genotipos. Los índices de integración fenotípica total fueron mayores en estadio reproductivo. En ambos estadios los grupos estuvieron formados por una combinación de atributos fisiológicos, morfológicos y de defensa. En la etapa juvenil la estructura de las correlaciones se relacionó con los atributos de mantenimiento y forma, mientras que en etapa reproductiva se relacionó con los atributos de mantenimiento y defensa. Los índices de integración fenotípica del submódulo de defensa fueron mayores en el estadio reproductivo que en el juvenil. La selección natural actuó sobre los tres niveles jerárquicos en las hojas, y de forma negativa sobre altos índices de integración en ambos estadios. Estos resultados muestran que las hojas tienen cierto grado de integración fenotípica que cambia durante la ontogenia, pero que en general las correlaciones de los atributos evaluados son desfavorecidas. Los bajos niveles de integración fenotípica foliar pueden deberse a las disyuntivas entre atributos, las numerosas funciones que una hoja desempeña en la planta, o bien, a la expresión de la plasticidad fenotípica. La capacidad de cambio y coordinación entre los atributos de las hojas posiblemente permiten el establecimiento, la supervivencia y la reproducción de los genotipos de *Turnera velutina* en ambientes heterogéneos.

Palabras clave: integración fenotípica, ontogenia, hojas, módulo funcional, *Turnera*.

## ABSTRACT

Plants are modular organisms organized in semi-independent units. The traits that form these units have high correlations allowing an efficient functional coordination. One approach to analyze these relations is the concept of phenotypic integration or the variance/covariance structure among traits, and the magnitude and pattern of correlation among them. Considering that plants face many selection pressures that change along their development, it is likely that correlation among functional traits change as well as a function of resource availability and functional priorities to optimize genotype fitness. *Turnera velutina* leaves are semi-independent vegetative modules. They have some defensive traits with changing ontogenetic trajectories. The objectives of this study were to assess phenotypic integration in plants at two ontogenetic stages: juvenile and reproductive, and to define if traits can be associated in different functional groups. At last I evaluated if natural selection acts on individual traits, subsets of traits (intrafoliar integration) or directly on phenotypic indices (total leaf integration). I measured eleven leaf traits related to physiology, morphology, and defense against herbivores on 168 plants in juvenile stage and 164 in reproductive stage, belonging to 24 genotypes. The total phenotypic integration index and defense phenotypic integration index of each genotype differed between stages and they were higher in reproductive than juvenile stage. In both ontogenetic stages I identified subsets with a combination of physiological, morphological and defensive traits. In juvenile leaves the correlation structure was related to maintenance and shape traits whereas maintenance and defense traits had a greater definition on reproductive plants. I found evidence that natural selection acts on the three levels of hierarchic organization. Selection acted against high levels of total integration in both stages. These results allow to consider leaf as unit with phenotypic integration that changes along the ontogeny of plants. Low levels of phenotypic integration in leaves can arise from tradeoffs, multiple leaf functions or phenotypic plasticity. It is possible that ability for change and coordinate leaf traits allowing establishment, survivorship and reproduction, increasing genotype fitness.

Key words: phenotypic integration, ontogeny, leaves, functional module, *Turnera*.

## 1. INTRODUCCIÓN

### **Integración fenotípica y modularidad**

El desempeño de una población depende de numerosos factores que le permiten interactuar con otras especies y adaptarse al ambiente. Sin embargo, en pocos estudios se considera a las adaptaciones como la expresión coordinada de un conjunto de varios atributos que desempeñan una función. Desde este punto de vista la adaptación adquiere una dimensión multivariada (Lande y Arnold 1983, Blows 2006). El concepto de integración fenotípica es uno de los enfoques que permite abordar el estudio de las adaptaciones desde una perspectiva multivariada, pues plantea la idea de que los atributos de un organismo, ya sean morfológicos o funcionales, no varían de manera independiente (Olson y Miller 1958, Cheverud 1996, Mitteroecker *et al.* 2012).

La integración fenotípica se define como la estructura de la correlación de numerosos atributos de un organismo (Murren 2002) y su análisis incluye tanto el patrón de las correlaciones (*i. e.*, el arreglo de las correlaciones entre atributos) como su magnitud (*i. e.*, intensidad de las correlaciones) (Herrera *et al.* 2002). La integración fenotípica podría tener un valor adaptativo si las agrupaciones de atributos están relacionadas con su adecuación. La evidencia disponible muestra que en algunas especies la integración fenotípica floral no tiene efectos sobre la atracción de polinizadores (Herrera *et al.* 2002, Armbruster *et al.* 2004, Nattero *et al.* 2010), y por el contrario, la integración fenotípica intrafloral, es decir, sólo ciertas combinaciones de atributos, interviene en la interacción con los polinizadores (Herrera 2002, Fornoni *et al.* 2008, Ordano *et al.* 2008). Hasta ahora no existe suficiente evidencia para descartar que altos valores de integración tengan un efecto positivo (Fornoni *et al.* 2009, Harder 2009) o neutro (Ordano *et al.* 2008) sobre la adecuación.

Como resultado de la agrupación de atributos se espera que puedan identificarse módulos. Éstos tienen altas correlaciones entre los atributos que los forman y pueden variar casi independientemente de otras unidades (Lewontin 1978) es decir, que a pesar de que los atributos dentro de los módulos estén altamente correlacionados, no están correlacionados en la misma magnitud con los atributos de otros módulos. Los módulos se definen como unidades repetitivas, semiautonómas y distinguibles por realizar funciones diferentes (Wagner 1996, Bolker 2000, Magwene 2001, Murren 2012).

Las plantas son organismos modulares y tradicionalmente se ha considerado que sus módulos están constituidos por el producto de un meristemo apical y se componen por diferentes metámeros (Figura 1a). Un metámero vegetativo está formado por el nodo, el internodo, la hoja y el meristemo axilar (Prévost 1978, White 1979, White 1984). Este punto de vista contrasta fuertemente con la concepción actual de modularidad, que considera los módulos como grupos de atributos que covarían entre sí. Esta última postura permite identificar módulos en estructuras como las flores, en las cuales el cáliz, la corola, el androceo y el gineceo son módulos interrelacionados que median la interacción con los polinizadores (Ordano *et al.* 2008). Desde una perspectiva funcional es posible delimitar a los módulos como grupos de atributos que desempeñan una función particular (Olson y Miller 1958, Murren 2012) (Figura 1b).

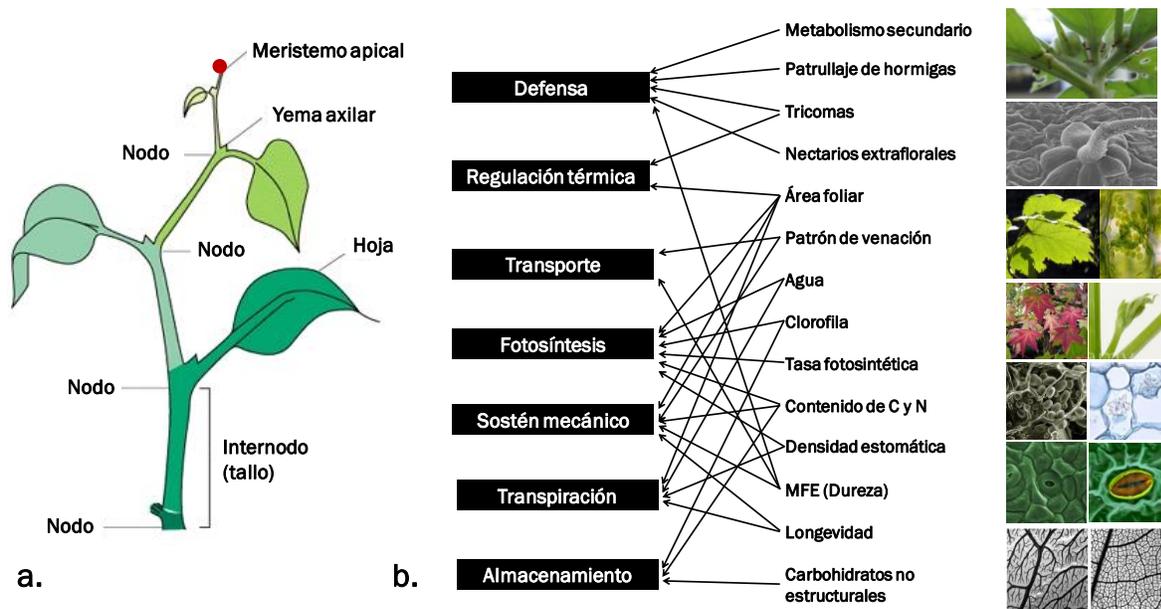


Figura 1. Perspectivas de la modularidad en plantas. a. Esquema de un módulo (rama) definido como el producto de un meristemo apical y formado por metámeros (representados por diferentes colores). b. La hoja como una colección de módulos con diferentes funciones.

La modularidad puede tener diferentes resultados en la ruta evolutiva de un organismo. Por un lado puede aumentar las respuestas potenciales a la selección, ya que los módulos pueden responder independientemente (Wagner 1996, Bissell y Diggle 2010). Por otro lado pueden representar una restricción para expresar ciertas áreas del espacio

fenotípico, si la selección actúa en direcciones opuestas sobre diferentes atributos o submódulos (Wagner y Altenberg 1996, Schlichting y Pigliucci 1998, Murren 2012).

En contraparte a las flores, las hojas pueden considerarse el módulo vegetativo de las plantas: tienen una función y una estructura distinguibles, son órganos repetitivos y poseen características autónomas como su longevidad y una zona de abscisión del tallo. Una de las consecuencias de la repetición de hojas a lo largo del tallo es la variación interindividual en atributos de forma, anatómicos y fisiológicos asociados a dicho módulo (Winn 1996, Herrera 2009). Por un lado la heteroblastia, es decir, la variación de la forma de las hojas durante el desarrollo (Kerstetter y Poethig 1998), genera órganos simples estructural y morfológicamente como los cotiledones, y también hojas distintivas de las etapas juvenil y reproductiva. Por otra parte, las hojas tienen la plasticidad necesaria para responder a las señales ambientales, característica llamada heterofilia (Kerstetter y Poethig 1998).

### **Variación y covariación entre atributos**

El concepto de integración fenotípica resume la idea de que las partes de un organismo en una población no varían de manera independientemente. La covariación entre atributos surge por diversas causas y, de igual forma, se manifiesta en diferentes etapas del desarrollo. Durante el desarrollo embriológico la acción de los factores de crecimiento, las moléculas de señalización y de diferentes procesos de inducción tienen acción sobre diferentes tejidos o estructuras. La variación en esos procesos induce patrones de varianza-covarianza entre los atributos fenotípicos, y ocasiona que ciertos atributos en una estructura estén más relacionados entre sí que con otros atributos en estructuras de diferentes partes del organismo (Mitteroecker *et al.* 2012).

El cambio de tamaño de un organismo también genera cambios coordinados entre los atributos fenotípicos y fisiológicos de un organismo (Bond y Midgley 1988, West *et al.* 1999, Westoby y Wright 2003, Niklas 2004). En diversos estudios se han reportado valores de correlación (Eisen 1975, Atchley 1984, Cheverud y Leamy 1985) y covarianza (Badyaev y Martin 2000, Dmitrew *et al.* 2010) superiores al promedio entre atributos morfológicos en las primeras etapas del crecimiento las cuales disminuyen con la edad. Una explicación para este patrón es que durante las primeras etapas de la ontogenia el desarrollo se da de forma simultánea entre los atributos, mientras que en las etapas finales de la ontogenia, las

estructuras morfológicas divergen en las rutas de desarrollo y en las tasas de crecimiento, por lo que las correlaciones entre atributos pueden disminuir (Eisen 1975). Esto ocasionaría que los valores de la integración fenotípica también disminuyeran a lo largo de la ontogenia.

La interacción entre atributos morfológicos que desempeñan una función particular es una fuente de covariación que ha sido documentada en estructuras anatómicas como las mandíbulas de roedores (Zelditch *et al.* 2008), monos (Marreroig y Cheverud 2001, Grieco *et al.* 2012) y humanos (Ackerman 2005). En el caso de las flores, se ha determinado que la estructura modular se relaciona con funciones como la eficiencia en la atracción de polinizadores y la transferencia de polen (Bisell y Diggle 2010).

Otros mecanismos que pueden originar y mantener cambios en la estructura de la covarianza son las mutaciones (Hallgrímsson *et al.* 2004, Hallgrímsson *et al.* 2006, Hallgrímsson 2007), la pleiotropía (Chen y Lübberstedt 2010) o el desequilibrio de ligamiento (Mitteroecker *et al.* 2012). Este último puede originarse por selección correlativa, es decir, selección por una combinación de atributos particulares aunque no estén ligados durante el desarrollo (Mitteroecker *et al.* 2012).

### **Covarianza entre los atributos foliares**

Las hojas desempeñan numerosas funciones de manera simultánea: interceptan luz, transportan líquidos y solutos, intercambian gases con la atmósfera, disipan el calor, lidian con las fuerzas mecánicas externas y mantienen interacciones con herbívoros y patógenos. De ahí que surjan disyuntivas fisiológicas, anatómicas o morfológicas en la expresión de ciertos atributos que están relacionados con más de una función. Estas disyuntivas dependen de factores como la filogenia, el tamaño de la hoja (Nicotra *et al.* 2011) o el estadio ontogenético del individuo (Thomas y Winner 2002, Boege y Marquis 2005, Houter y Pons 2012).

El énfasis en ciertas funciones fisiológicas cambia en la hoja a lo largo de la ontogenia de las plantas (Boege y Marquis 2005). Generalmente los cotiledones almacenan productos de reserva que se emplean durante el establecimiento de la plántula, mientras que las hojas de la etapa juvenil no poseen productos de almacenamiento, son más grandes que los cotiledones y permiten una adquisición rápida de biomasa subterránea y aérea (Lambers 2008). En esta última etapa las hojas también suelen hacer una inversión alta en defensas contra los herbívoros, tanto en estructuras físicas como en defensas químicas

(Bryant y Kuropat 1980, Boege y Marquis 2005). Durante la etapa reproductiva la planta canaliza los recursos hacia el desarrollo de flores, frutos y semillas, por lo que las tasas máximas de respiración y fotosíntesis en hojas disminuyen gradualmente hasta la senescencia (Lambers 2008).

Ya que las funciones de las hojas no se realizan de manera independiente es de esperarse que los atributos relacionados con las mismas generen correlaciones entre sí, y por tanto, expresen ciertos niveles de integración fenotípica. Estos niveles pueden estar dados por los procesos fisiológicos asociados al espectro de economía de la hoja (Reich *et al.* 1997, Reich *et al.* 1999, Wright *et al.* 2004, Onoda *et al.* 2011). Éste espectro es un continuo en el que en un extremo se encuentran las hojas que requieren una baja inversión estructural, son muy activas (con alto contenido de N y tasas fotosintéticas altas) y poco longevas, mientras que en el otro extremo están aquellas hojas que son mucho más caras y menos activas, pero más duraderas. Los descriptores clave de la fisiología foliar están fuertemente correlacionados en diferentes biomas (Onoda *et al.* 2011) y formas de vida (Reich *et al.* 1997). Las interpretaciones adaptativas sugieren que estos atributos tienen cambios evolutivos correlativos (Ackerly y Reich 1999, Ackerly *et al.* 2000) y generan disyuntivas, por ejemplo, entre la tasa fotosintética y el requerimiento de nitrógeno (Wright *et al.* 2004), la inversión estructural y la vulnerabilidad al daño por herbívoros (Shipley *et al.* 2006), la eficiencia en el uso de agua y la tasa fotosintética (Meziane y Shipley 2001) o la fijación de carbono y la longevidad de la hoja (Kikuzawa 1991).

Los atributos de defensa contra herbívoros incluyen características anatómicas como la presencia de espinas o tricomas (Woodman y Fernandes 1991, Hanley *et al.* 2007), la dureza (Cornelissen *et al.* 1999, Onoda *et al.* 2011), la producción de compuestos químicos provenientes del metabolismo secundario (Levin 1976), e incluso las asociaciones con especies mutualistas, mediadas por la presencia de recompensas (Villamil 2012). Los atributos defensivos pueden expresarse en diferentes escalas temporales, presentando respuestas inducidas en respuesta al daño (Karban y Baldwin 1997, Barton 2008) y también están asociadas con el desarrollo del individuo, en función de los recursos disponibles y costos asociados (Boege y Marquis 2005). Existen evidencias sobre la correlación entre diferentes atributos de defensa (Agrawal y Fishbein 2006, Muniz da Silva y Batalha 2011, Moles *et al.* 2012) así como la presencia de disyuntivas asociadas entre la función defensiva y la fisiología foliar.

El crecimiento de las láminas foliares, el patrón del margen de la hoja, así como la forma y el tamaño pueden estar determinados genética (Tsukaya 2006) y ambientalmente. La forma de la hoja es un atributo que está bajo presiones de selección por numerosos agentes: herbívoros (Brown *et al.* 1991), restricciones hidráulicas y mecánicas, termorregulación e intercepción de la luz (Givnish 1987, Nicotra *et al.* 2011). La morfología foliar tiene un significado adaptativo al mediar el balance entre la ganancia de carbono y la pérdida de agua, y mantener el soporte mecánico y la superficie fotosintética (Givnish 1979). De igual manera, la forma de las hojas tiene una estrecha relación con las características fisiológicas, por ejemplo, la segmentación en el margen de la hoja está relacionada con las tasas fotosintéticas y la eficiencia en el uso de agua (*Gossypium hirstum*, Malvaceae) (Stiller *et al.* 2004) y la eficiencia en el intercambio de calor con el ambiente (*Pelargonium*, Geraniaceae) (Nicotra *et al.* 2008).

### ***Turnera velutina* como modelo para el estudio de la integración fenotípica foliar**

Un sistema ideal para el estudio de la integración fenotípica es *Turnera velutina*, una especie endémica de México (Arbo 2005) que cuenta con diversos tipos de defensa contra el daño causado por herbívoros. Por un lado tiene una gran variedad de tricomas foliares (Villamil 2012) y cierto grado de dureza en las hojas (Ochoa-López 2013). También presenta defensas bióticas resultado de la atracción de hormigas defensoras y parasitoides mediante la producción de néctar extrafloral (Cuautle y Rico-Gray 2003). Estudios previos en esta especie han identificado cambios ontogenéticos en diferentes componentes de la defensa: densidad de tricomas, dureza, número de nectarios y contenido de azúcar. La mayoría de estos atributos presentan relaciones lineales y positivas con la edad de las plantas. Coincidentemente, los individuos jóvenes reciben mayor daño foliar que los individuos pre-reproductivos y reproductivos (Villamil 2012). Además, existen evidencias de que las trayectorias ontogenéticas de la defensa tienen variación genética (Ochoa-López 2013). Las flores de esta especie se encuentran sobre el pecíolo, por lo que es probable que los costos asociados a la floración generen disyuntivas en la asignación de recursos a las defensas y modifiquen los parámetros fisiológicos de la especie, y en consecuencia, la integración fenotípica.

Considerando que (i) sin importar la forma de vida o ambiente, todas las plantas están limitadas por las mismas necesidades fundamentales: el crecimiento, la defensa y la

reproducción, (ii) que los recursos son limitados y no pueden ser canalizados simultáneamente a más de una sola función, y que (iii) las presiones de selección cambian a lo largo del desarrollo de una planta, es de esperarse que la selección natural optimice las correlaciones entre atributos que permiten que la hoja responda como un módulo integrado en cada etapa del desarrollo. Hasta el momento ningún trabajo ha analizado los patrones de correlación entre atributos foliares, ni ha considerado los atributos fisiológicos y los de defensa para la expresión de un fenotipo complejo.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue determinar la integración fenotípica de las hojas de *Turnera velutina* en dos estadios ontogenéticos: el juvenil y el reproductivo. En particular: (1) se exploraron los cambios ontogenéticos en los patrones de correlación de los atributos relacionados con las funciones de mantenimiento y defensa, y se estableció si existían atributos relacionados funcionalmente, y 2) se determinó si la selección natural opera sobre los atributos individuales o sobre combinaciones de atributos de la hoja.

En este trabajo se evaluaron las siguientes hipótesis referentes a los patrones de correlación y a los niveles de integración fenotípica foliar. En ambos estadios se espera que las hojas tengan fuertes correlaciones entre los atributos de economía foliar (Reich *et al.* 1999, Wright *et al.* 2004, Onoda *et al.* 2011) pero ya que los atributos de defensa biótica están ausentes en las plantas juveniles de *T. velutina* (Villamil 2012, Ochoa-López 2013) las correlaciones entre los atributos de mantenimiento, defensa y forma deberían resultar en índices de integración más altos en las plantas de estadio reproductivo que en las de estadio juvenil.

Por otra parte se espera que los atributos formen grupos relacionados con la defensa contra herbívoros y con el mantenimiento, aunque las agrupaciones de atributos descritas no se encuentran exentas de presentar correlaciones con atributos pertenecientes a otra función (Wagner y Altenberg 1996).

Por último, si se considera a la integración fenotípica como un atributo adaptativo se espera encontrar una relación estadística significativa entre los componentes de adecuación y las combinaciones de los atributos funcionales o directamente con los índices de integración de la hoja.

### 3. MÉTODOS

**Sitio de estudio.** Este estudio se realizó en una casa de sombra dentro de los terrenos del Centro de Investigaciones Científicas La Mancha (CICOLMA, 19° 35'25" N, 96° 22'49" W), localizado en el municipio de Actopan en el estado de Veracruz (Figura 2a). El CICOLMA está ubicado en la planicie costera del Golfo de México, al margen de una sierra volcánica (Geissert y Dubroeuq 1995). El sitio tiene un clima cálido húmedo con lluvias en verano, con precipitaciones anuales totales que oscilan entre 899 a 1829 mm, con un valor promedio de 1286 mm (Travieso-Bello y Campos 2006). Las temperaturas promedio anuales se encuentran entre 21°C en enero y 27°C en junio (Travieso-Bello y Campos 2006). La lluvia se distribuye de manera diferencial, con una estación lluviosa de junio a septiembre, y otra seca, de octubre a mayo (Figura 2b).

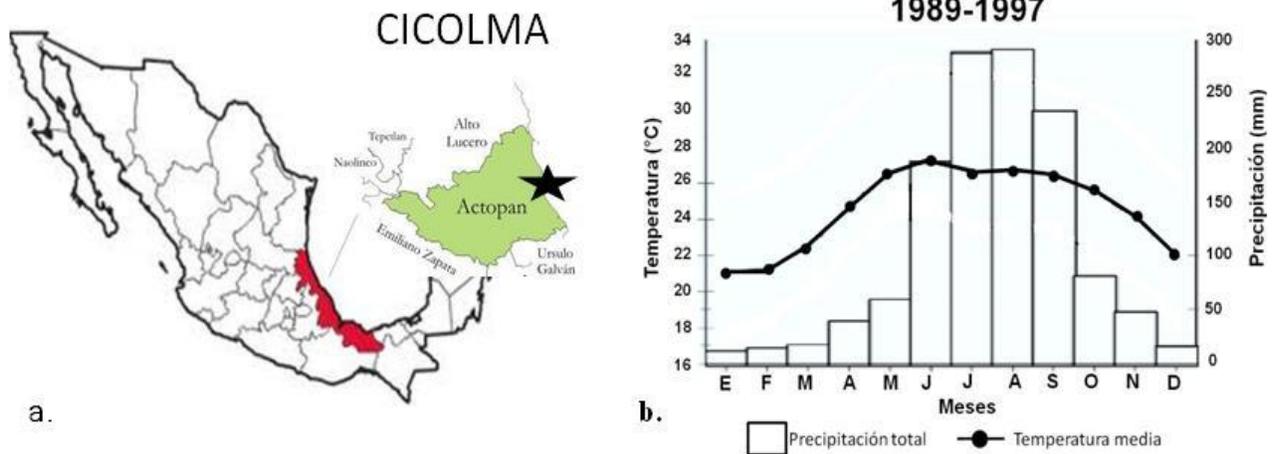


Figura 2. a. Localización del CICOLMA en el estado de Veracruz. b. Diagrama de temperatura y precipitación de la estación meteorológica del CICOLMA, para el período 1989-1997 (Modificado de Travieso-Bello y Campos 2006).

La zona presenta diversas comunidades vegetales, entre las que destacan por su extensión la selva baja caducifolia, la selva mediana subcaducifolia y el matorral de dunas costeras. El matorral de dunas costeras se caracteriza por tener un suelo afín a los arenosoles, con un contenido variable de materia orgánica y con una cubierta vegetal desarrollada en las dunas estabilizadas (Travieso-Bello y Campos 2006). La diversidad

vegetal en el matorral de las dunas incluye especies predominantemente herbáceas y arbustivas (Castillo-Campos y Travieso-Bello 2006), entre las más comunes se encuentran *Caesalpinia crista* L., *Chamaecrista chamaecristoides* Green, *Hibiscus tiliaceus* L, *Opuntia stricta* Haw., *Randia laetevirens* Standl. y *Turnera velutina* L. (Moreno-Casasola 1982).

**Sistema de estudio.** El género *Turnera* pertenece a la tribu Turneroidae, clasificada recientemente dentro de la familia Passifloraceae (Tokuoka 2012). Este género, que agrupa alrededor de 140 especies nativas de América y dos especies distribuidas en África (Arbo 2005, López et al. 2011), está dividido en nueve series botánicas de las cuales la serie *Turnera* es monofilética según las evidencias morfológicas y cromosómicas ( $x= 5$ ) (Arbo y Espert 2009). El complejo *Turnera ulmifolia* incluye más de 10 especies que en ocasiones han sido consideradas variedades de esta última (Álvarado-Cárdenas 2006). *Turnera velutina* forma parte de este complejo y actualmente está reconocida como una especie diferente de *T. ulmifolia* y no como un taxón intraespecífico (Arbo 2005), aunque en la información disponible para las poblaciones del CICOLMA se sigue citando como *T. ulmifolia*.

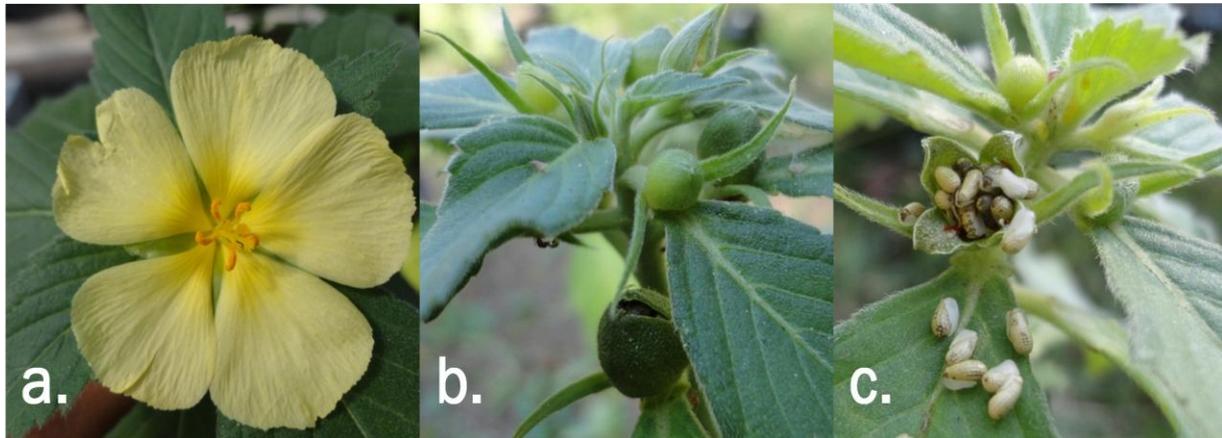


Figura 3. Estructuras reproductivas de *Turnera velutina*. a. Flores. b. Frutos en diferentes etapas de desarrollo. c. Cápsula dehiscente y con semillas expuestas mostrando el elaiosoma. Fotos: X. Damián.

*Turnera velutina* es una planta arbustiva. Tiene hojas simples y alternas, con el borde dentado y nectarios extraflorales (Gama et al. 1999). Las flores son actinomorfas, perfectas y con pétalos de color amarillo pálido (Figura 2); éstas tienen ovario súpero y los

pétalos están fusionados en la base formando un tubo en el que se encuentran los nectarios florales (Elias *et al.* 1975, Gama *et al.* 1999). Aunque hay una gran variación en las características del sistema reproductivo de las especies del género, lo cual incluye especies heterostílicas y homostílicas así como diferentes sistemas de incompatibilidad (Arbo 2005), las poblaciones presentes en el CICOLMA son monomórficas para los rasgos florales. Las flores tienen antesis diurna, permanecen abiertas menos de un día y son axilares (Cuautle y Rico-Gray 2003). Éstas son polinizadas por abejas de las familias Apidae, Halictidae y Megachilidae (Ramos-Castro 2013).

Las hojas poseen de dos a cinco nectarios extraflorales, localizados en el pecíolo y el borde de la lámina (Elias *et al.* 1975). Las hormigas (*Camponotus planatus*, *C. abdominalis*, *Conomyrma* sp., *Crematogaster brevispinosa*, *Forelius* sp., *Pseudomyrmex* sp.) y avispas (*Polistes instabilis*, *Polybia occidentalis* (Cuautle y Rico-Gray 2003) se alimentan del néctar extrafloral. El herbívoro más frecuente es *Euptoiecta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae), un defoliador con gran actividad durante junio y agosto (Villamil 2012).

El fruto es una cápsula con dehiscencia longitudinal, con semillas ovoides, curvadas, foveoladas y con una estructura nutritiva que las cubre parcialmente llamada elaiosoma (Gama *et al.* 1999). *Turnera velutina* florece y fructifica durante todo el año pero se distingue un pico de la actividad reproductiva durante la estación lluviosa (Torres-Hernández *et al.* 2000). Gama y colaboradores (1999) señalan que de las especies del género registradas para el estado de Veracruz, *Turnera velutina* (referida como *T. ulmifolia*) es la que presenta mayor plasticidad ecológica, pues se encuentra en zonas cálidas y semicálidas, y altitudes hasta de 1000 m s.n.m. Estos autores señalan que el intervalo de temperaturas donde es posible encontrarla va de 12 hasta 35°C, y entre 800 y 3800 mm de precipitación anual total.

**Obtención de individuos para el muestreo.** Durante 2010 y 2011 se realizó la propagación de clones de *T. velutina* utilizando esquejes obtenidos de plantas localizadas en las dunas costeras del CICOLMA (S. Ramos, com. pers.). Para la estimación de los niveles de integración fenotípica a nivel genotípico se obtuvieron semillas de autopolinización de las plantas clonadas. Las flores se autopolinizaron manualmente en dos periodos: del 10 al 19 de agosto y del 22 al 25 de septiembre de 2011. Las autopolinizaciones se realizaron removiendo las cinco anteras de la flor con unas pinzas y frotándolas sobre el estigma,

depositando en éste la mayor cantidad de polen posible. Posteriormente se colocaron bolsas de tul para evitar la llegada de polen de otras flores. Las flores así tratadas produjeron frutos entre dos y tres semanas después de la autopolinización. En este trabajo se considera como una familia genotípica a todos los individuos producidos por autopolinización y que pertenecen al mismo genotipo, aunque pueden provenir de diferentes clones (esquejes).

Después de recolectar los frutos y contar las semillas, a éstas se les retiró el elaiosoma de forma manual, y luego fueron colocadas en charolas de germinación. En cada espacio se colocaron de 5 a 6 semillas, aproximadamente a 0.5 cm de profundidad, utilizando como sustrato una mezcla de tierra con agrolita en proporción 1:1. Una vez que los primordios foliares fueron visibles las plántulas se cambiaron a macetas. Se obtuvieron 18 individuos de cada una de las 24 familias genotípicas. Siete plantas fueron asignadas para la estimación de la integración fenotípica en el estadio juvenil, siete para la estimación de la integración fenotípica en el estadio reproductivo y las cuatro plantas restantes de cada familia fueron destinadas al experimento de selección. Las 236 plantas se mantuvieron dentro de una casa de sombra distribuidas en siete bloques. Cada bloque estuvo formado por 48 plantas: dos plantas de cada familia genotípica, una perteneciente al estadio juvenil y otra de estadio reproductivo.

**Medición de atributos.** Para obtener las matrices de varianza-covarianza fenotípica se midieron once atributos relacionados con la fisiología, la morfología y la defensa contra herbívoros en cuatro hojas apicales totalmente expandidas. El muestreo se realizó entre el 11 de noviembre de 2011 y el 26 de febrero de 2012. En el caso de las plantas de estadio juvenil, se muestrearon las hojas del tercero, cuarto, quinto y sexto nodo del tallo. En las plantas del estadio reproductivo se seleccionaron las últimas cuatro hojas expandidas que contaran con estructuras reproductivas, siendo éstas los botones florales, la flor en anthesis, frutos o la cicatriz que dejan los frutos al caer. Todas las plantas incluidas en el muestreo tenían aproximadamente la misma edad y tamaño, dada la posición similar que las hojas ocuparon sobre el tallo al momento de ser seleccionadas.

La medición de atributos se realizó siguiendo la siguiente secuencia: por la mañana se midieron los valores del Índice de Contenido de Clorofila (ICC de aquí en adelante) y se contó el número de nectarios. Durante el pico de producción de néctar extrafloral (entre las

11:00 y las 13:00 hrs, Villamil 2012) se cuantificó el volumen y la concentración de azúcar en el néctar extrafloral. Posteriormente las hojas se retiraron del tallo, se colocaron en bolsas de plástico selladas y se trasladaron al laboratorio donde se tomaron los valores del peso fresco con una balanza analítica (ACCULAB VIC 303, Sartorius Group, MA, EUA). Las hojas se procesaron en una secuencia aleatoria para evitar errores sistemáticos debido a la evaporación. El procesamiento de tejido fresco se terminó entre dos y tres horas después de la escisión de las hojas.

Después de la determinación de los atributos de las hojas, se recolectó el tejido vegetal de las plantas, separando las fracciones subterránea y aérea; esta última se consideró a partir de la cicatriz de los cotiledones en el tallo. El tejido se colocó en bolsas de papel, donde se dejó secando a temperatura ambiente por cinco meses. Finalmente el tejido se pesó en una balanza analítica (Scientech SA 120, Colorado, EUA). De esta forma se obtuvieron los valores de biomasa para 168 plantas de estadio juvenil y 164 de estadio reproductivo. Todos los atributos que se describen a continuación fueron cuantificados en 672 hojas de plantas de estadio juvenil y 656 hojas de plantas de estadio reproductivo.

### ***Atributos fisiológicos***

*Contenido de clorofila ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).* Se considera un estimador de la capacidad fotosintética, ya que el nitrógeno del tilacoide es directamente proporcional al contenido de clorofila (Evans 1989, Jifon *et al.* 2005). En varias especies se ha reportado el Índice de Contenido de Clorofila (ICC) como un indicador aproximado y confiable del contenido de clorofila presente en las hojas (van den Berg y Perkins 2004, Ellison y Farnsworth 2005, Biber 2007).

Se empleó un aparato portátil de campo de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para obtener el ICC en las hojas de acuerdo con la absorbancia en dos longitudes de onda, a 660 y 940 nm. El uso de dos bandas de reflectancia compensa los errores de la medición, el efecto del grosor de la hoja y la presencia de otras estructuras de defensa como pelos, tricomas y la composición de la cutícula que podrían influir en los valores (Gamon y Surfus 1999). El valor de ICC por hoja fue un promedio de cinco mediciones realizadas en cada hoja: en las zonas apical, media y basal, y a ambos lados de la vena principal.

Para la curva de calibración de clorofila se seleccionaron ocho plantas de estadio juvenil, ocho de estadio pre-reproductivo y nueve de estadio reproductivo. En cada planta se

seleccionaron cuatro hojas de la misma posición sobre el tallo: de las plantas juveniles las hojas 3, 4, 5 y 6; de las plantas en estadio pre-reproductivo las hojas 8, 9, 10 y 11, y de las plantas reproductivas cuatro hojas con estructuras reproductivas ( $n= 100$  hojas). Después de tomar las cinco mediciones de ICC en cada hoja se colectó  $1 \text{ cm}^2$  de tejido de la misma zona en la que realizó la medición. La determinación del contenido de clorofila en la hoja por unidad de área se realizó siguiendo el método de Porra y colaboradores (1989); después de tomar el tejido vegetal ( $1 \text{ cm}^2$ ) éste se depositó en 5 ml de N,N-dimetilformamida. Las muestras de tejido se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que se tornaron de color blanco (cuatro días). La absorbancia de las muestras se midió a 647, 664 y 750 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 50 UV/VIS, Agilent Technologies, Nueva Jersey, EUA) y se utilizaron las ecuaciones propuestas por Porra y colaboradores (1989) para calcular las concentraciones de clorofilas *a* y *b*:

$$\text{Clorofila (a+b)} = 17.67 (A_{647} - A_{750}) + 7.12 (A_{664} - A_{750})$$

Se hizo un análisis de regresión entre la raíz cuadrada de los valores del ICC, para normalizar los datos, y los valores de clorofila obtenidos en las 100 hojas de diferentes estadios ontogenéticos de *T. velutina*, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/ cm}^2) = -0.093 + 1.36 \times \sqrt{\text{ICC}}, (r^2 = 0.79, P < 0.001)$$

Con esta ecuación se obtuvieron las concentraciones de clorofila en las que se estimó la integración foliar. El valor empleado en los análisis fue el contenido de clorofila por  $\text{cm}^2$ , con la finalidad de tener un valor independiente del área de la hoja, que se incluyó en los atributos de forma.

*Masa foliar específica (MFE)*. Se midió el área foliar con un escáner (CI-202 CID, Inc., Cama, WA, EUA) y se obtuvo el peso fresco de las hojas con una balanza analítica (ACCULAB VIC 303, Sartorius Group, MA, EUA). Posteriormente las hojas fueron almacenadas en bolsas de papel glasine hasta que se secaron a temperatura ambiente y se pesaron de nuevo en una balanza analítica (Scientech SA 120, Colorado). La masa foliar específica fue calculada como el cociente entre el peso seco en miligramos y el área en  $\text{mm}^2$ . Este atributo puede ser considerado como la inversión de tejido fotosintético por área y es uno de los atributos más

importantes en el espectro de economía foliar (Wright *et al.* 2004). También ha sido considerado como el costo de la intercepción de la luz a nivel de la hoja (Gustchick y Wiegel 1988, Poorter *et al.* 2009). Finalmente, se ha reportado que valores bajos de este atributo reflejan una asignación alta a las defensas estructurales relacionadas con la dureza (Cornelissen *et al.* 2003).

*Contenido de agua.* Se calculó como la diferencia entre el peso fresco y el peso seco de las hojas, expresada en porcentaje.

*Contenido de nitrógeno y carbono.* Cada hoja seca se molió con N<sub>2</sub> líquido, depositando el material en tubos eppendorf de 1.5 ml. Después se tomó una muestra de material de 2.0 ± 0.2 mg utilizando una balanza Thermo Electron Corporation, Orion Cahn C-33 (Beverly, MA, EUA). Las muestras se colocaron en cápsulas de estaño (Costech Analytical Technologies, Valencia CA). Los contenidos de nitrógeno y de carbono se determinaron por microcombustión (Perkin Elmer CHNS/O Elemental Analyzer). Esta técnica consiste en la combustión en un ambiente con exceso de oxígeno en el que las muestras son reducidas a O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y N en forma gaseosa. Posteriormente la mezcla de gases se homogeniza bajo temperatura y presión controlada para separar los elementos a través de cromatografía. El análisis permite obtener los porcentajes en peso de carbono y de nitrógeno en la muestra. Los valores de cada muestra se expresaron como mg de carbono y de nitrógeno por g de peso seco. Estos atributos son descriptores de la economía foliar relacionado con la actividad fotosintética (Wright *et al.* 2004).

### ***Atributos morfológicos***

*Área.* Para determinar el área foliar se deslizó un escáner (CI-202 CID Inc., Cama, WA, EUA) sobre las hojas frescas. El área en cm<sup>2</sup> se obtuvo a partir del número de pixeles que obstruyen el haz de luz del escáner sobre la placa de referencia de color blanco.

*Largo de pecíolo.* Como un atributo relacionado con la arquitectura se midió el largo del pecíolo con un vernier digital (Mitutoyo).

*Índice de disección.* El índice de disección de la hoja se obtuvo usando la siguiente fórmula:

$$d = \text{Perímetro} / [2 \sqrt{(\text{área} \cdot \pi)}]$$

Este valor es una medida estandarizada de la complejidad del margen de la lámina foliar en el que un círculo tendría el valor de 1 (Kincaid y Schneider 1983). Típicamente el índice de disección de una hoja es ligeramente  $> 1$ , y mientras mayor sea la segmentación o más aserrado sea el margen de la hoja, mayor será el valor de  $d$  (Lynn y Waldren 2001). Este atributo tiene relación con las tasas fotosintéticas (Nicotra *et al.* 2008), además de expresar el cambio de forma en las hojas de diferente edad (McLellan 1993).

### ***Atributos de defensa contra herbívoros***

*Número de nectarios extraflorales.* Se contó el número de nectarios extraflorales en cada una de las cuatro hojas del muestreo.

*Contenido de azúcar en el néctar extrafloral.* Este atributo se clasifica entre los mecanismos de defensa indirecta contra los herbívoros, debido a que las hormigas que acceden al recurso patrullan sobre la planta y disminuyen la probabilidad de que el tejido foliar sea consumido (Villamil 2012). Para determinar el contenido de azúcar en el néctar extrafloral, éste se recolectó entre las 11:00 y las 13:00 hrs durante el pico de producción (Villamil 2012), utilizando micropipetas de 1  $\mu$ l y se registró la longitud de la columna de líquido con un vernier digital (Mitutoyo). El volumen de néctar se calculó usando la relación:

$$\frac{\text{mm de néctar colectado}}{\text{Longitud de la columna (mm)}} \times \text{volumen de la pipeta } (\mu\text{l}) = \text{volumen de néctar } (\mu\text{l})$$

Para determinar la concentración del néctar se utilizó un refractómetro de campo (Leica, Buffalo, NY), el cual mide el índice refractivo de la muestra y da un valor en porcentaje de sacarosa, o equivalentes de sacarosa en la escala BRIX. Con este valor se hizo el cálculo de la cantidad total de azúcar presente en el néctar al multiplicar el volumen extraído de los nectarios extraflorales (en  $\mu$ l) por el valor dado en el refractómetro (mg de azúcar/  $\mu$ l de solución) (Pleasants y Chaplin 1983).

*Densidad de tricomas.* Como medida de defensa física se cuantificó el número de tricomas en cuatro campos de 14 mm<sup>2</sup> en cada lado de la hoja, utilizando un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss Stemi SV6) (10x). La densidad de tricomas por hoja se estimó como el promedio de las observaciones en los ocho campos.

**Experimento de selección.** Para determinar el éxito reproductivo de cada familia genotípica, se seleccionaron al azar cuatro plantas de cada una de las 24 familias genotípicas y se colocaron afuera del invernadero, en donde estuvieron expuestas a herbívoros, polinizadores y condiciones ambientales naturales. Las plantas se dispusieron en una cuadrícula de 10 × 10 plantas, separadas entre sí por 50 cm. La asignación de plantas en la cuadrícula se hizo aleatoriamente y se realizó una rotación de posiciones cada cinco días para evitar sesgos debidos al microambiente del sitio. El éxito reproductivo se estimó a través del conteo de estructuras reproductivas (flores y frutos) y del promedio del número de semillas producidas en cinco frutos por planta. Además, se determinó el porcentaje de germinación de 30 semillas provenientes de un fruto de cada planta. Las semillas se escogieron al azar y se sembraron en charolas de germinación con el mismo sustrato utilizado para la germinación de las plantas del muestreo. Las semillas se sembraron entre el 17 y el 22 de diciembre de 2011 y la proporción de semillas germinadas se obtuvo después de 30 días.

En diciembre de 2011 se llevaron a cabo dos actividades complementarias: la estimación de daño foliar y la cuantificación del patrullaje de hormigas. Para estimar el daño foliar se muestrearon 15 hojas por planta, seleccionadas de forma sistemática. En cada hoja se estimó el área dañada utilizando un acetato cuadriculado (0.5 cm<sup>2</sup>) y adicionalmente se obtuvieron los datos de largo y ancho de la hoja. Para determinar el área original de las hojas dañadas se aplicó la ecuación obtenida por Villamil (2012):

$$\text{Área Foliar} = 0.7 + (0.64 \times \text{largo} \times \text{ancho}) \quad (r^2 = 0.97, P < 0.0001)$$

El porcentaje de área foliar consumida por los herbívoros se obtuvo al restar el área medida con el medidor foliar del área foliar original estimada. El nivel promedio de daño se calculó para cada individuo y genotipo.

Del 18 al 21 de diciembre se realizó el registro del patrullaje de hormigas. Durante un minuto se observó cada planta y se contó el número total de hormigas en hojas, flores y tallos. Se registró la frecuencia de visitas de cada morfoespecie de hormigas y la actividad realizada durante la misma. El muestreo se hizo cada dos horas entre las 7:00 y las 17:00 hrs.

## **Análisis estadístico**

### ***Diferencias de atributos entre estadios ontogenéticos***

La variación de los atributos foliares entre estadios fue evaluada con un análisis de varianza multivariado. Posteriormente se realizaron pruebas para evaluar las diferencias en cada atributo con pruebas U de Mann-Whitney. En estos análisis se emplearon los valores promedio de las cuatro hojas de cada individuo.

### ***Delimitación de los grupos funcionales en las hojas***

Para identificar los atributos que constituyen grupos funcionales en ambos estadios ontogenéticos se analizó la importancia de cada atributo en las cargas del Análisis de Componentes Principales realizado con las once variables foliares descritas previamente. Se determinaron los valores estadísticamente significativos realizando pruebas de correlación entre las puntuaciones (scores) de cada uno de los Componentes Principales y los valores de cada variable.

### ***Estructura de la matriz de varianza-covarianza***

Para analizar los cambios ontogenéticos en la estructura de la matriz de varianza-covarianza de las hojas de *T. velutina*, se empleó el análisis de Flury (Phillips y Arnold 1999). Este análisis se basa en una comparación jerárquica entre los autovectores obtenidos de las matrices fenotípicas o genotípicas. La comparación prueba si las matrices son iguales, si no lo son, se prueba si las matrices difieren en dimensión pero no en forma (proporcionalidad). Si las matrices no resultan proporcionales, entonces se examina si comparten algún componente principal común (CPC). Finalmente, si las matrices no comparten ningún CPC entonces el análisis concluye que las matrices no están relacionadas (Phillips y Arnold 1999, Caruso *et al.* 2005).

Para determinar las diferencias estadísticas en las comparaciones en cada nivel de la jerarquía, se empleó el estadístico  $\chi^2$  y el criterio de Información de Akaike (AIC) (Flury 1988, Phillips y Arnold 1999). El análisis se realizó con el programa CPC de P. Phillips (<http://www.uoregon.edu/~pphil/software.html>).

Las comparaciones entre matrices se realizaron a nivel fenotípico, empleando las matrices de varianza-covarianza de 168 plantas de estadio juvenil y 164 plantas de estadio reproductivo. Para el análisis a nivel genotípico se hicieron comparaciones entre las

matrices de varianza-covarianza obtenidas por familia. Para evitar que las matrices de varianza-covarianza tuvieran celdas con ceros en los valores del número de nectarios extraflorales y el contenido de azúcar en el néctar extrafloral, éstas se sustituyeron por valores de 0.0000001, considerando que este valor no tiene un significado biológico. La familia 23 en estadio juvenil se eliminó del análisis ya que no tuvo una matriz con valores de cero para los dos atributos mencionados anteriormente, y el análisis no permite realizar comparaciones con matrices cuyos valores para los determinantes sean cero, se eliminó del análisis. De esta manera el análisis genotípico se realizó con las matrices de las otras 23 familias de estadio juvenil, y con las 24 matrices de estadio reproductivo.

### ***Magnitud y patrón de la integración***

La magnitud en los niveles de integración fenotípica de las hojas en los dos estadios ontogenéticos se calculó con el Índice de Integración Fenotípica (INT). Para ello se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) y se obtuvo la varianza de los autovalores ( $\lambda$ ) de la matriz de correlaciones (Chevreud *et al.* 1989, Herrera *et al.* 2002, Wagner 1984) para cada genotipo en ambos estadios ontogenéticos. La varianza de los autovalores del ACP se considera el INT esperado, el cual se corrigió con la fórmula (Wagner 1984):

$$\text{INT} = \text{INT esp} - [(\# \text{ de atributos usados} - 1) / n],$$

donde  $n$  es el número de hojas de cada familia incluidas en el análisis. Los valores altos de este índice significan un grado alto de integración fenotípica considerando que una alta varianza de los autovalores indica variación asociada con un grupo de atributos. Si la varianza entre los autovalores es baja, ello indica que los atributos tienen bajas correlaciones entre sí y tienen poca integración. Un valor de cero para el índice INT indica que los atributos no están relacionados. Para dar el mismo peso a cada variable independientemente de la escala, los datos fueron estandarizados restando el valor promedio del atributo por estadio y dividiéndolo entre la desviación estándar.

Se determinaron tres Índices de Integración Fenotípica en cada estadio ontogenético. Los niveles de INT foliar total se obtuvieron a partir de un ACP con los once atributos descritos previamente, mientras que la INT de los atributos de defensa se determinó a partir de un ACP con el número de nectarios extrafoliares, el contenido de azúcar en el néctar

extrafoliar, la densidad de tricomas y la dureza, estimada con la MFE. El INT para el mantenimiento se calculó con un ACP con los valores del contenido de clorofila, agua, nitrógeno, carbono y los atributos de morfología. Para determinar si los valores de los índices de integración obtenidos eran diferentes de cero se estableció un intervalo de confianza del 95% con un procedimiento *bootstrap*. Posteriormente se aplicó una prueba de *t* para determinar si los valores del INT total entre estadios fueron diferentes y se determinó el porcentaje de integración máximo para ambos estadios. En el caso de los INT de defensa y de mantenimiento se realizaron pruebas de Wilcoxon para determinar diferencias entre estadios, ya que los valores de la INT por familia no tuvieron una distribución normal. Por último, para determinar si los niveles de INT total, de defensa y de mantenimiento fueron distintos se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, y posteriormente pruebas de Wilcoxon para detectar las diferencias entre los tipos de integración fenotípica. Los análisis fueron realizados con el programa R (ver.2.15.2).

### ***Análisis de selección jerárquico***

Para determinar si la selección opera a diferentes niveles sobre la estructura modular de las hojas, se realizaron tres análisis de regresión múltiple (Lande y Arnold 1983). Como indicador de la adecuación se empleó el valor de la biomasa total relativa de las plantas ( $x_i / x_{promedio}$ ) de acuerdo con el estadio. Los gradientes direccionales de selección se determinaron en tres análisis independientes. En cada uno se empleó como variable de respuesta y componente de adecuación la biomasa relativa mientras que las variables independientes fueron: (a) los atributos individuales, (b) las puntuaciones de los componentes principales, y (c) los índices de integración (Ordano *et al.* 2008).

### ***Análisis de rutas***

Como una exploración de los mecanismos que podrían explicar el valor adaptativo de la integración foliar, se llevó a cabo un análisis de rutas bajo el supuesto de que los índices INT podrían tener un efecto sobre la adecuación si la eficiencia de las hojas aumenta. Esta optimización podría incrementar la producción de biomasa y de recursos asignados a la reproducción, permitiendo que las plantas produjeran más flores y semillas más vigorosas. En el análisis se consideró una ruta indirecta, en la cual la integración tiene un efecto sobre la interacción de las plantas con sus herbívoros, y sobre el tamaño de la planta (diámetro

basal). Estos atributos, a su vez, inciden en la producción de flores, semillas y la germinación de éstas (Figura 4a). La otra vía considera un efecto directo de la integración sobre la producción de flores (Figura 4b).

Los modelos se ajustaron empleando los valores de la integración calculados por familia en cada estadio ontogenético y los valores promedio por familia de las cuatro plantas asignadas al experimento de selección. El ajuste de los modelos fue evaluado a través del estadístico  $\chi^2$  y de los índices complementarios CFI (Comparative Fit Index) y RMSEA (Root Mean Square Error of Aproximation). El ajuste de los modelos es significativo si  $\chi^2 > 0.05$ , CFI  $> 0.95$  y de RMSEA  $\leq 0.5$ . El análisis se llevó a cabo con el programa R ver. 2.15.2 (Biblioteca Laavan). Se realizaron tres análisis de ruta independientes considerando: (a) los niveles de integración de las hojas en estadio juvenil, (b) los niveles de integración de las hojas en estadio reproductivo, y (c) la diferencia entre los índices de integración de ambos estadios. Se considera que este cambio refleja la expresión de la capacidad de reajuste de los atributos fisiológicos, morfológicos y de defensa contra herbívoros.

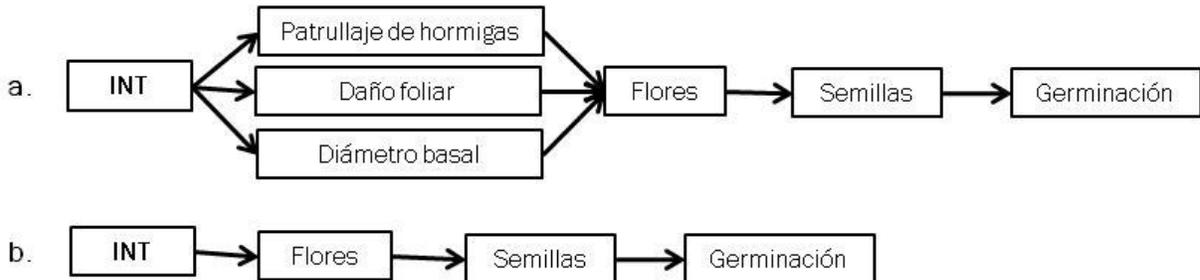


Figura 4. Hipótesis exploradas en el análisis de rutas. a. La INT con efectos indirectos sobre la adecuación. b. La INT con efectos directos sobre la adecuación.

## 4. RESULTADOS

### Comparación de atributos entre estadio

Los resultados del MANOVA no paramétrico revelaron diferencias significativas entre los atributos en ambos estadios ontogenéticos ( $\lambda$  de Wilks = 0.0441,  $\chi^2 = 3721.33$ , 11 g.l.,  $P < 0.0001$ ) (Tabla 1). La tercera y cuarta hoja de las plantas en estadio juvenil tuvieron gotas de néctar extrafloral; sin embargo, las estructuras anatómicas no están totalmente desarrolladas en este estadio (Villamil *et al.* 2013) por lo que la mayoría de las veces no fue posible cuantificar el volumen y/o la concentración del néctar. La densidad de tricomas fue seis veces mayor en las hojas de las plantas reproductivas que en las hojas de las plantas juveniles, mientras que la dureza foliar, cuantificada a través de la MFE, fue el doble en hojas de los individuos reproductivos que en las hojas de los individuos juveniles (Tabla 1).

Las hojas de las plantas en estadio juvenil tuvieron mayor contenido de agua y de nitrógeno que las hojas de las plantas en estadio reproductivo. En cambio, las hojas de las plantas con estructuras reproductivas tuvieron mayor contenido de carbono y el doble de contenido de clorofila que las hojas de las plantas en estadio juvenil (Tabla 1).

Las dimensiones de las hojas mostraron diferentes patrones durante el desarrollo. En las hojas de las plantas en estadio juvenil las dimensiones de las hojas así como la longitud del pecíolo aumentaron a lo largo del tallo, alcanzando un tamaño máximo en las hojas de las plantas en etapa pre-reproductiva, es decir, en las hojas producidas inmediatamente antes de la primera flor. El tamaño de las hojas con estructuras reproductivas disminuyó gradualmente conforme éstas se desarrollan cerca del ápice de la planta. El margen de las hojas mostró variaciones entre las plantas en estadio juvenil y reproductivo. Mientras las hojas de las primeras tienen márgenes redondeados, las hojas que portan estructuras reproductivas tienen forma lanceolada y márgenes serrados.

Tabla 1. Valores promedio  $\pm$  error estándar (Coeficiente de Variación) de los 11 atributos cuantificados en las hojas de *Turnera velutina* y estadísticos de la prueba de U para determinar diferencias entre estadios. Juvenil ( $n = 168$  individuos). Reproductivo ( $n= 164$  individuos).

Atributo	Juvenil	Reproductivo	U, P
Número de nectarios extraflorales	1.88 $\pm$ 0.03 (20.14)	2.64 $\pm$ 0.03 (22.93)	3649.5 < 0.001
Contenido de azúcar ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0.01 $\pm$ 0.02 (432.72)	4.6 $\pm$ 0.05 (139.05)	4406 < 0.001
Densidad de tricomas (número/ $\text{mm}^2$ )	2.04 $\pm$ 0.04 (25.94)	13.52 $\pm$ 0.41 (32.96)	35 < 0.001
Contenido de clorofila ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	3.28 $\pm$ 0.03 (11.90)	6.52 $\pm$ 0.03 (11.38)	129 < 0.001
Contenido de agua (%)	88.18 $\pm$ 0.16 (2.32)	78.74 $\pm$ 0.18 (2.98)	27447 < 0.001
Masa foliar específica ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ )	0.01 $\pm$ 0.0001 (21.97)	0.034 $\pm$ 0.0006 (44.28)	15 < 0.001
Contenido de carbono ( $\mu\text{g}/\text{g}$ tejido seco)	37.51 $\pm$ 0.19 (6.46)	40.57 $\pm$ 0.19 (3.86)	3651.5 < 0.005
Contenido de nitrógeno ( $\mu\text{g}/\text{g}$ tejido seco)	4.89 $\pm$ 0.05 (13.93)	3.89 $\pm$ 0.05 (16.61)	15565.5 < 0.001
Longitud de pecíolo (mm)	5.23 $\pm$ 0.09 (22.27)	7.80 $\pm$ 0.13 (21.69)	2797 < 0.001
Área ( $\text{cm}^2$ )	9.58 $\pm$ 0.18 (24.17)	25.05 $\pm$ 0.58 (29.65)	344 < 0.001
Índice de disección	5.17 $\pm$ 0.03 (6.78)	4.96 $\pm$ 0.02 (6.28)	20510.5 < 0.001

### Patrón de la correlación entre atributos

Las matrices de correlaciones fenotípicas (Figura 5, Tabla 3 Anexos), muestran arreglos esperados entre los atributos relacionados con la fisiología foliar y la morfología, por ejemplo, entre el contenido de carbono, el contenido de nitrógeno y el contenido de clorofila, o entre la longitud del pecíolo y el área de la hoja. Las únicas correlaciones que se mantuvieron constantes entre estadios fueron entre el contenido de carbono y el contenido de nitrógeno, y entre este último y el contenido de clorofila.

El signo y el patrón de las correlaciones genotípicas y fenotípicas cambiaron significativamente entre estadios. En las hojas de las plantas juveniles las correlaciones fueron en su mayoría positivas, con excepción de las que involucraron al índice de disección, la longitud del pecíolo y el agua. En contraste, en el estadio reproductivo las correlaciones sugirieron disyuntivas que involucran a los atributos de defensa y al contenido de clorofila.

Las correlaciones genéticas en estadio juvenil fueron positivas entre los atributos de defensa, morfología y fisiología, mientras que las correlaciones negativas se presentaron entre los atributos fisiológicos (contenido de agua, MFE y clorofila). En estadio reproductivo las correlaciones de mayor intensidad se debieron a dos atributos relacionados con la defensa contra herbívoros: por un lado, la densidad de tricomas mostró correlaciones negativas con los atributos de morfología y fisiología, y por el otro, la cantidad de azúcar mantuvo relaciones positivas con dichos atributos.

### **Comparación de las matrices de varianza-covarianza**

Los resultados mostraron que las matrices fenotípicas entre estadio comparten los primeros tres componentes principales, mientras que las matrices genotípicas comparten los primeros seis componentes principales (Tabla 2). En ambos casos la comparación concuerda con un modelo de componentes principales parciales (PCPC), es decir, que las matrices pueden compartir componentes principales o autovalores. La comparación de matrices fenotípicas entre familias en ambos estadios no mostró evidencias de relación en su estructura (Tabla 2).

### **Delimitación de grupos funcionales**

El 70% de la variación fenotípica en los atributos foliares en ambos estadios fue explicada por los primeros cinco Componentes Principales (CP de aquí en adelante) (Tabla 1 Anexos), mientras que el 70% de la variación genotípica fue explicada por los primeros cuatro CP (Tabla 2 Anexos). A continuación se describirán los grupos de atributos identificados a través de los atributos que aportan las mayores cargas sobre los 11 CP.

En estadio juvenil la variación fenotípica del CP 1 estuvo definida por valores altos de nitrógeno, del área foliar y del contenido de carbono, y por valores bajos de la longitud del pecíolo y del índice de disección. El CP 2 estuvo influenciado por las cargas positivas de las características de defensa física, y cargas negativas del contenido de agua. El CP 3 estuvo determinado por valores altos de clorofila y de los atributos de forma, mientras el CP 4 fue la combinación de hojas duras, valores altos de carbono y del índice de disección, pero valores bajos de área foliar. Finalmente los CP 5 y 6 estuvieron determinados por la variación en el contenido de azúcar y en el número de nectarios extraflorales, respectivamente. En resumen, mientras que los CP 2, 5 y 6 describen la función de defensa, los CP 1, 3 y 4 reflejan una combinación de atributos morfológicos y fisiológicos de la hoja (Figura 6).

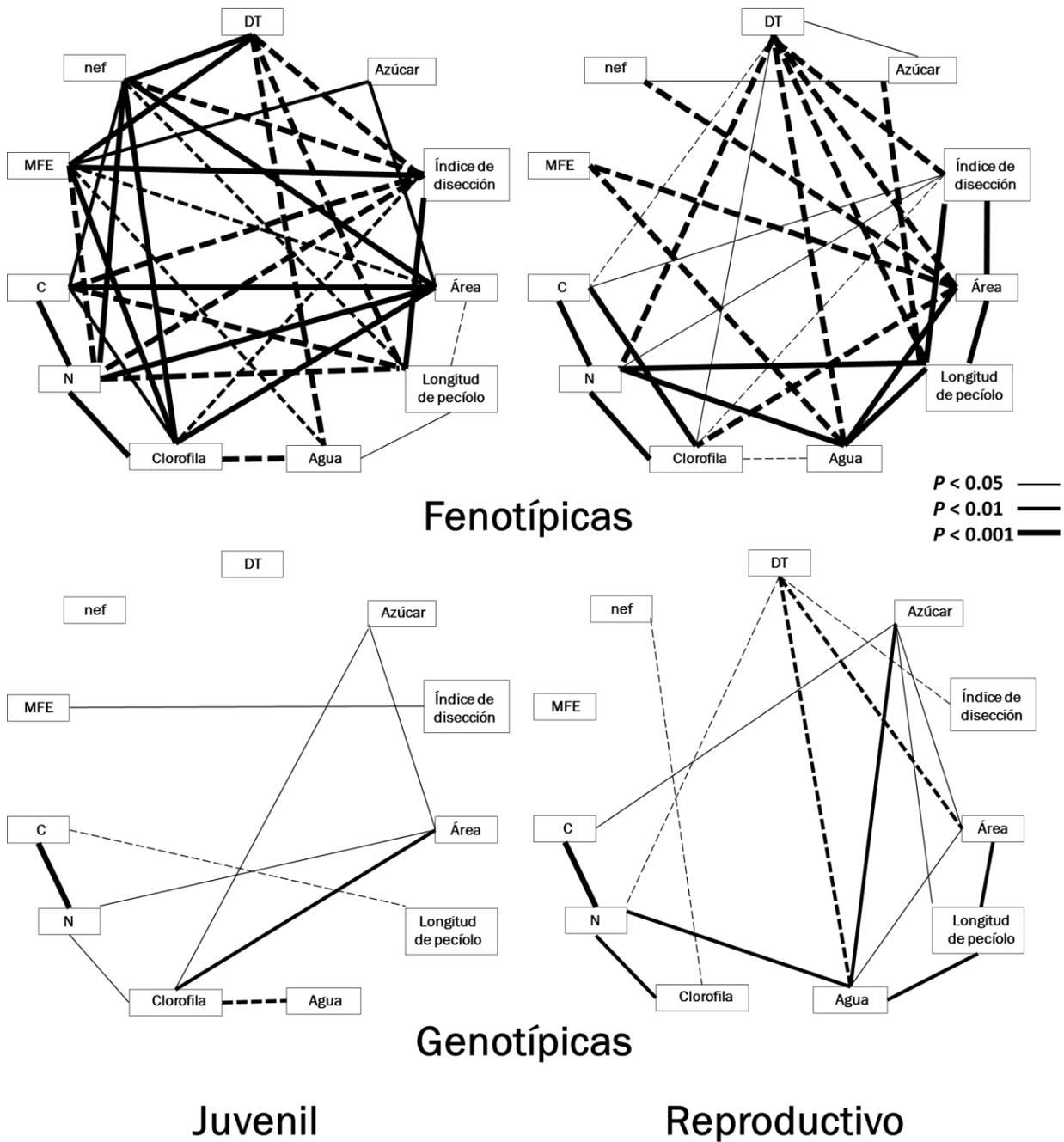


Figura 5. Estructura de las correlaciones entre los atributos foliares de *Turnera velutina*. Las líneas continuas denotan correlaciones positivas, mientras que las líneas punteadas representan correlaciones negativas. El grosor de las líneas es proporcional a la intensidad de la correlación. MFE= Masa foliar específica (Dureza), nef= número de nectarios extraflorales, DT= Densidad de tricomas, C= Contenido de carbono, N= Contenido de nitrógeno.

Tabla 2. Análisis de las matrices de varianza-covarianza con el método *Jump-up*. Arriba. Comparación entre estadios de las matrices fenotípicas y genotípicas. Abajo. Comparación las matrices fenotípicas entre familias (23 familias de estadio juvenil y 24 de estadio reproductivo). CPC= Componentes Principales Comunes.

Jerarquía	g.l.	Matrices Fenotípicas			Matrices Genotípicas		
		$\chi^2$	P	g.l.	$\chi^2$	P	
Igualdad	66	325.781	< 0.0001	66	162.568	< 0.0001	
Proporcionalidad	65	324.231	< 0.0001	65	158.287	< 0.0001	
CPC	55	190.146	< 0.0001	55	75.116	0.0371	
CPC9	54	180.450	< 0.0001	54	73.428	0.0404	
CPC8	52	172.663	< 0.0001	52	70.883	0.0419	
CPC7	49	128.970	< 0.0001	49	68.759	0.0327	
CPC6	45	126.435	< 0.0001	45	56.375	<b>0.1191</b>	
CPC5	40	93.108	< 0.0001	40	44.965	<b>0.2717</b>	
CPC4	34	52.439	0.0226	34	39.602	<b>0.2342</b>	
CPC3	27	32.047	<b>0.2303</b>	27	31.550	<b>0.2492</b>	
CPC2	19	27.395	<b>0.0958</b>	19	11.320	<b>0.9126</b>	
CPC1	10	23.897	0.0079	10	6.270	<b>0.7921</b>	
No relacionadas							
Jerarquía	g.l.	Estadio Juvenil		Estadio Reproductivo			
		$\chi^2$	P	g.l.	$\chi^2$	P	
Igualdad	1452	12257.1	< 0.0001	1518	5040.1	< 0.0001	
Proporcionalidad	1430	11961.3	< 0.0001	1495	4812.0	< 0.0001	
CPC	1210	2321.9	< 0.0001	1265	2873.1	< 0.0001	
CPC9	1188	2321.5	< 0.0001	1242	2810.8	< 0.0001	
CPC8	1144	2292.4	< 0.0001	1196	2716.6	< 0.0001	
CPC7	1078	2115.7	< 0.0001	1127	2533.3	< 0.0001	
CPC6	990	1922.5	< 0.0001	1035	2410.8	< 0.0001	
CPC5	880	1739.9	< 0.0001	920	2201.0	< 0.0001	
CPC4	748	1503.7	< 0.0001	782	1801.6	< 0.0001	
CPC3	594	1231.6	< 0.0001	621	1384.2	< 0.0001	
CPC2	418	763.6	< 0.0001	437	926.4	< 0.0001	
CPC1	220	349.2	< 0.0001	230	331.7	< 0.0001	
No relacionadas							

La variación fenotípica de las hojas de plantas en estadio reproductivo estuvo definida en primer lugar por valores altos del tamaño de la hoja, la longitud del pecíolo y el contenido de agua, y por cargas negativas de la densidad de tricomas (CP 1). El segundo CP

se asoció por completo con valores altos de los atributos relacionados con la actividad fotosintética, mientras el CP 3 lo hizo con los atributos de defensa, pero en asociación positiva con el número de nectarios extraflorales y el contenido de azúcar, y negativa con la MFE. El CP 4 estuvo relacionado con la tasa fotosintética, pues tuvo valores altos del índice de disección, la MFE y el contenido de carbono, además del número de nectarios extraflorales. Los siguientes CP sugieren disyuntivas entre los atributos: número de nectarios extraflorales vs. azúcar (CP 5), contenido de clorofila vs. contenido de carbono (CP 7), contenido de agua vs. contenido de nitrógeno (CP10), y longitud del pecíolo vs. área foliar (CP 11) (Tabla 1 Anexos). A diferencia del estadio juvenil, en las hojas de estadio reproductivo los atributos de defensa estuvieron relacionados con el CP 3, mientras que los atributos fisiológicos lo estuvieron con el CP 2 y el CP 4. El primer CP reflejó una combinación entre los atributos de morfológicos, fisiológicos y de defensa (Figura 6).

Fue posible identificar algunas coincidencias entre los datos fenotípicos y los datos genotípicos en la integración de las hojas de plantas juveniles (Tabla 2 Anexos, Figura 6). El CP 1 estuvo ligado positivamente con el área, el contenido de clorofila, de nitrógeno y de azúcar, pero negativamente con el porcentaje de agua. El CP 2 indicó que hojas con pecíolos cortos tienen contenidos bajos de carbono y de nitrógeno. El CP 3 indicó que las hojas más duras tienen menor densidad de tricomas y tasa fotosintéticas más elevadas. Finalmente, el CP 4, por el contrario, indicó que las hojas con mayor dureza tienen más tricomas, pero un contenido bajo de azúcar y pocos nectarios.

En el caso de los datos genotípicos el CP 1 mantuvo una combinación de atributos, con valores altos para los atributos fisiológicos y morfológicos y para el contenido de azúcar, y valores bajos para la densidad de tricomas y la dureza. En contraste, el CP 2 se relaciona con los atributos fisiológicos, y los CP 3, CP 4 y CP 5 mostraron asociaciones fuertes con los atributos de defensa (Figura 6, Tabla 2 Anexos).

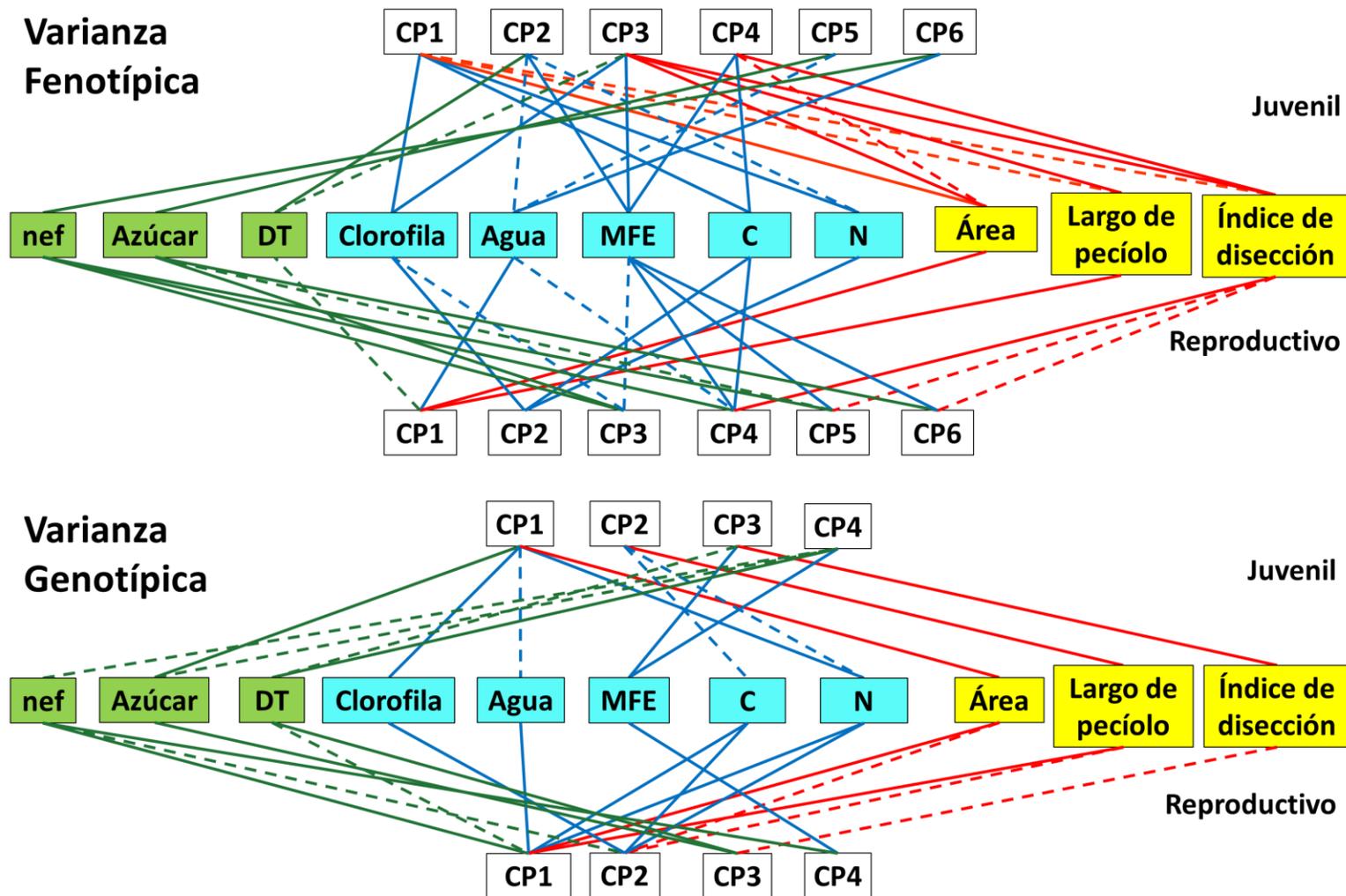


Figura 6. Aporte de las cargas a los Componentes Principales de la varianza de los atributos de las hojas de *Turnera velutina* en dos estadios ontogenéticos. Las líneas continuas denotan cargas positivas y las líneas punteadas cargas negativas. Atributos de defensa (■), fisiológicos (■) y morfológicos (■).

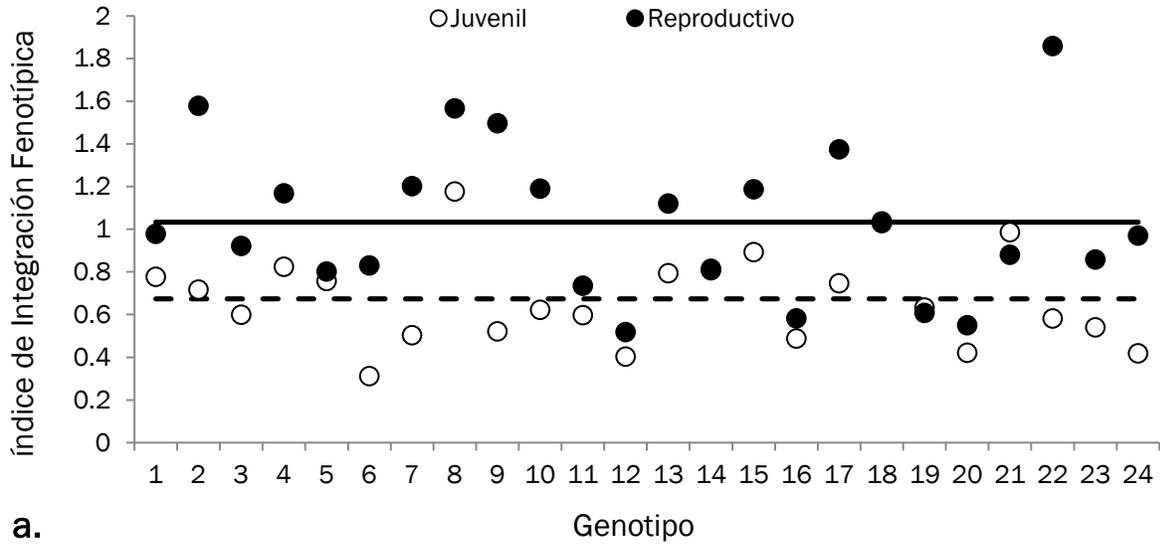
### Magnitud de la integración fenotípica

Los tres índices de integración calculados (total, de los atributos de defensa y de los atributos de mantenimiento) difirieron estadísticamente de cero, indicando que hay cierto nivel de integración fenotípica en las hojas de ambos estadios (Tabla 3). En estadio juvenil la INT total y la INT de los atributos de mantenimiento no difirieron estadísticamente ( $U = 85$ ,  $P = 0.065$ ), mientras que en estadio reproductivo los INT difirieron estadísticamente entre sí.

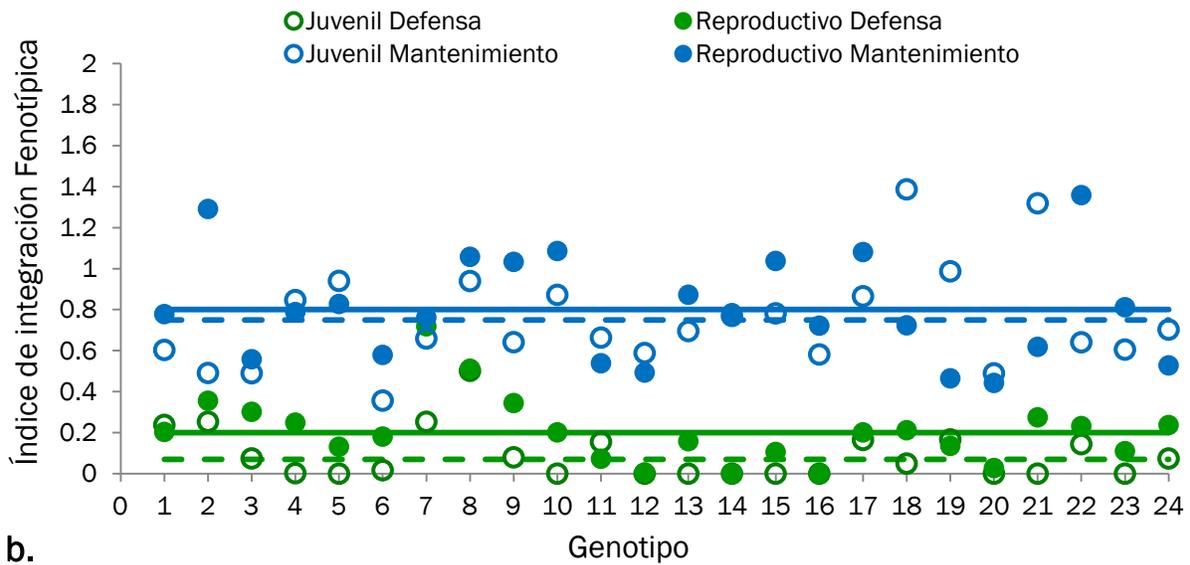
Se detectaron diferencias ontogenéticas estadísticamente significativas en los índices de integración fenotípica total ( $t = -5.09$ ,  $g.l. = 23$ ,  $P < 0.0001$ ) y en los índices de integración fenotípica de los atributos de defensa ( $U = 22$ ,  $p = 0.0002$ ) pero no en los índices de integración fenotípica de los atributos de mantenimiento ( $U = 99.5$ ,  $P = 0.1531$ ). Se detectó un patrón general en el que los valores de integración fueron mayores en estadio reproductivo que en estadio juvenil (Figura 7). La INT total en estadio reproductivo fue casi el doble que en estadio juvenil, aunque la variación observada es muy grande (Figura 7a). Aunque el contraste entre estadios fue más evidente entre unas familias que entre otras, no se detectó variación genética en los valores de la integración foliar total (Familia:  $F_{1,44} = 0.744$ ,  $P = 0.39$ , Familia  $\times$  Estadio:  $F_{1,44} = 0.179$ ,  $P = 0.67$ ) ni en la integración de los atributos de mantenimiento (Familia:  $F_{1,44} = 0.230$ ,  $P = 0.63$ , Familia  $\times$  Estadio:  $F_{1,44} = 2.30$ ,  $P = 0.13$ ). En contraste, sí se encontró variación genética para la integración de los atributos de defensa (Familia:  $F_{1,44} = 5.5119$ ,  $P = 0.02$ , Familia  $\times$  Estadio:  $F_{1,44} = 0.101$ ,  $P = 0.75$ ).

Tabla 3. Índices de integración fenotípica (INT) foliar de *Turnera velutina* en dos estadios ontogenéticos.

Estadio	Juvenil			Reproductivo		
	Promedio $\pm$ e.e. (C.V.)	IC del 95%	% de integración	INT promedio $\pm$ e.e. (C.V.)	IC del 95%	% de integración
INT total	0.67 $\pm$ 0.04 (32.23)	0.60 - 0.76	6.1	1.03 $\pm$ 0.07 (34.27)	0.90 - 1.19	9.4
INT defensa	0.07 $\pm$ 0.03 (193.31)	0.03 - 0.14	1.8	0.20 $\pm$ 0.03 (83.31)	0.15 - 0.28	5.1
INT mantenimiento	0.75 $\pm$ 0.05 (33.04)	0.66 - 0.85	10.7	0.80 $\pm$ 0.05 (32.25)	0.69 - 0.90	11.4



a.



b.

Figura 7. a. Variación genética en los índices de integración fenotípica foliar total. b. Variación genética en los índices de integración fenotípica para los atributos de defensa y de mantenimiento. Las líneas indican los valores de integración promedio para los estadios juvenil (- -) y reproductivo (—).

### La integración fenotípica de las hojas como blanco de la selección natural

Los resultados del análisis de selección sugieren que en estadio juvenil la selección direccional favorece la presencia de hojas grandes y gruesas, pero con niveles bajos de nitrógeno (Tabla 4) (Modelo lineal:  $R^2 = 0.17$ ,  $F_{11,156} = 4.12$ ,  $P < 0.0001$ ). En cambio, las plantas reproductivas con mayor biomasa tienen hojas con alta densidad de tricomas,

contenido de clorofila, y contenido de carbono, así como niveles bajos de nitrógeno y del índice de disección (Tabla 4) (Modelo lineal:  $R^2 = 0.10$ ,  $F_{11,152} = 2.71$ ,  $P < 0.0032$ ).

Para ambos estadios se detectó la acción de la selección direccional sobre algunos conjuntos de atributos (Tabla 4). En las hojas de plantas de estadio juvenil se encontró selección direccional positiva sobre el CP 1, el cual relacionó positivamente el contenido de carbono y nitrógeno con el área foliar, y negativa sobre los CP 2, 3 y 11, los cuales incluyeron cargas negativas para los atributos de defensa y forma (Modelo lineal para las puntuaciones:  $R^2 = 0.18$ ,  $F_{11,156} = 4.44$ ,  $P < 0.0001$ ). En el estadio reproductivo la selección actúa negativamente sobre los CP 1, 4 y 9, los cuales se relacionaron con cargas positivas para los atributos de la función de mantenimiento y negativas para la densidad de tricomas y contenido de nitrógeno (Modelo lineal para las puntuaciones:  $R^2 = 0.09$ ,  $F_{11,152} = 2.565$ ,  $P < 0.005$ ).

Se detectó la acción de selección direccional negativa sobre los índices de integración total en estadio juvenil ( $\beta = -0.60$ , e.e.=0.21,  $F_{1,22} = 7.772$ ,  $P = 0.01$ ;  $R^2 = 0.26$ ) y estadio reproductivo ( $\beta = -0.17$ , e.e.=0.06,  $F_{1,22} = 7.484$ ,  $P = 0.01$ ;  $R^2 = 0.25$ ).

### **Análisis de rutas**

La hipótesis que incluye los efectos indirectos de la INT total sobre la adecuación no resultó significativa con los datos obtenidos. Los análisis de regresión lineal simple realizados de manera independientes para comprobar el efecto de la INT total sobre las interacciones (patrullaje de hormigas y porcentaje de daño foliar) tampoco resultaron significativos. Por el contrario, el modelo en el que la INT total tiene un efecto directo sobre la adecuación tuvo un buen ajuste con los datos (Figura 8), tal como lo denotan los valores de  $\chi^2$  y los índices complementarios. Los modelos significativos fueron los que incluyeron los valores de INT total de estadio reproductivo ( $\chi^2 = 2.322$ , g.l.= 3,  $P < 0.0001$ ), así como el que evalúa la diferencia de INT total entre estadios ( $\chi^2 = 3.349$ , g.l.= 3,  $P < 0.0001$ ), y muestran que hubo un efecto positivo en la producción de flores con altos valores de INT. La integración no tuvo efectos indirectos significativos ni sobre la producción de semillas ni sobre el porcentaje de germinación de éstas (Anexos Tabla 4). Este resultado indica que las familias con hojas que tienen mayor integración, así como las que tienen cambios en la estructura de la covarianza entre estadios, pueden tener mayor número de flores.

Tabla 4. Análisis de regresión múltiple y gradientes de selección direccional ( $\beta$ ) sobre los atributos foliares y sobre los submódulos funcionales (Puntuaciones del Análisis de Componentes Principales) de *Turnera velutina*. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Atributos	Estadio Juvenil		Estadio Reproductivo	
	$\beta$ (e.e.)	F	$\beta$ (e.e.)	F
Número de nectarios	0.053 (0.041)	0.664	0.0156 (0.020)	0.297
Azúcar en néctar	0.127 (0.076)	2.775	-0.056 (0.036)	2.361
Densidad de tricomas	-0.083 (0.075)	1.259	<b>0.103 (0.041)</b>	6.225*
Contenido de clorofila	0.065 (0.068)	0.897	<b>0.056 (0.026)</b>	4.386*
Contenido de agua	-0.040 (0.065)	0.392	0.018 (0.034)	0.285
Dureza (MFE)	<b>0.203 (0.063)</b>	10.435**	-0.003 (0.019)	0.019
Contenido de carbono	0.047 (0.079)	0.349	<b>0.081 (0.029)</b>	7.887
Contenido de nitrógeno	<b>-0.281 (0.104)</b>	7.352**	<b>-0.090 (0.035)</b>	6.481*
Longitud de pecíolo	-0.090 (0.089)	1.040	0.057 (0.040)	1.977
Área foliar	<b>0.170 (0.076)</b>	5.064**	0.013 (0.045)	0.090
Índice de disección	0.0217 (0.074)	0.085	<b>0.066 (0.031)</b>	4.409*
Submódulos				
CP1	<b>0.080 (0.024)</b>	11.474***	<b>-0.021 (0.010)</b>	4.091*
CP2	<b>-0.110 (0.027)</b>	15.968***	-0.006 (0.014)	0.174
CP3	<b>-0.067 (0.032)</b>	4.397*	-0.006 (0.017)	0.123
CP4	0.035 (0.034)	1.052	<b>-0.040 (0.019)</b>	4.519*
CP5	0.036 (0.036)	0.978	0.032 (0.019)	2.711
CP6	-0.060 (0.038)	2.455	0.008 (0.020)	0.166
CP7	-0.055 (0.044)	1.574	0.020 (0.024)	0.704
CP8	0.068 (0.046)	2.189	-0.048 (0.025)	3.775
CP9	0.059 (0.055)	1.159	<b>-0.082 (0.027)</b>	9.026**
CP10	0.123 (0.066)	3.439	-0.026 (0.039)	0.436
CP11	<b>-0.184 (0.090)</b>	4.128*	0.0718 (0.045)	2.494

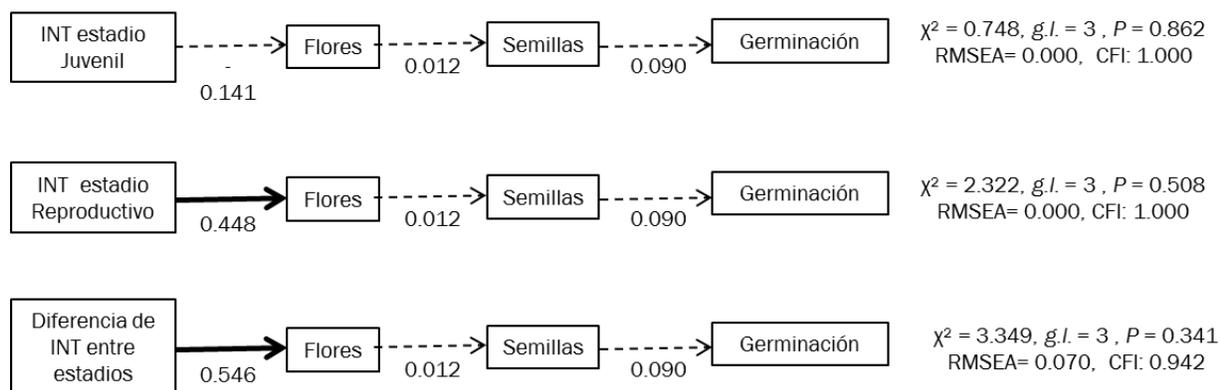


Figura 8. Hipótesis del efecto indirecto de la INT sobre la adecuación. Las líneas sólidas denotan efectos significativos y las líneas punteadas efectos no significativos.

## 5. DISCUSIÓN

En este estudio se detectaron diferencias ontogenéticas en los atributos relacionados con la fisiología, la morfología de la hoja y con la defensa contra herbívoros. La agrupación de los atributos analizados en módulos funcionales relacionados con la defensa y el mantenimiento no fue tan definida como se esperaba. Los resultados de este trabajo reflejan patrones de correlación dentro y entre grupos de atributos y, por tanto, bajos niveles de integración fenotípica total. Los niveles de integración fenotípica también se calcularon de manera independiente para los atributos relacionados con la defensa y con el mantenimiento, encontrando diferencias en la importancia relativa de acuerdo al estado ontogenético. Una hipótesis inicial supone que las diferencias entre los escenarios experimentados por las plantas de diferente estadio ontogenético originan agrupaciones de distintos atributos que evolucionan juntos y permiten la sobrevivencia de los genotipos. A continuación se discute la implicación de estos resultados respecto a la información disponible sobre la integración fenotípica.

### **Diferencias ontogenéticas entre estadios**

Los valores de los atributos en cada estadio ontogenético siguieron los mismos patrones reportados en estudios previos (Villamil 2012, Ochoa-López 2013) y reflejan el cambio de estrategia defensiva durante la ontogenia (Ochoa-López 2013), que confiere a las plantas en etapa reproductiva una resistencia mayor al daño por herbívoros (Villamil 2012).

Los atributos fisiológicos indican que plantas en estadio reproductivo pueden tener tasas fotosintéticas más altas que las plantas jóvenes debido a que tienen mayor contenido de clorofila, mayor área foliar y un margen foliar más serrado. En las plántulas las prioridades son la captura de recursos y el aumento de biomasa (Steinbauer 2001, Nahrung y Allen 2003), lo que permite a la planta competir por espacio adicional (Givnish 1987), además de maximizar las tasas netas de crecimiento. Las hojas de *T. velutina* en esta etapa tienen mayor contenido de agua y de nitrógeno a comparación de la etapa reproductiva, características que se asocian con una mayor eficiencia en el uso de agua (Wright *et al.* 2001) y una mayor tolerancia a la sequía (Pasquet-Kok *et al.* 2010). Estas características podrían darles ventajas para sobrevivir y establecerse.

Durante la etapa reproductiva las plantas de *T. velutina* experimentan presiones asociadas con la variación ambiental y con las interacciones con herbívoros y folívoros. En esta etapa hay una mayor inversión de recursos en la defensa física y biótica, lo cual reduce el daño foliar causado por los herbívoros, en comparación con las plantas en etapas juvenil o pre-reproductiva (Villamil *et al.* 2013). Durante esta etapa la canalización de recursos al desarrollo de las estructuras reproductivas puede condicionar el desempeño de las funciones fisiológicas, en particular de la fotosíntesis y el almacenamiento de reservas (Bond 2000, Kudo e Ida 2010, Sánchez y Pannell 2011).

### **Identificación de grupos funcionales en la hoja**

En la mayoría de los casos las cargas de los atributos estuvieron relacionadas con más de un CP, por lo que no fue posible delimitar grupos de atributos, o módulo funcional, formados exclusivamente con los atributos de defensa o de fisiología. En contraparte, se detectaron grupos de atributos de morfología y de fisiología que podrían influir en funciones como el mantenimiento o el almacenamiento de recursos. Esto no es sorprendente, pues los atributos incluidos en este análisis intervienen en varias funciones de la hoja (Walters y Bartholomew 1984, Gutschik 1999, Milla *et al.* 2008). Además de ser una barrera para el consumo de tejido foliar por parte de los herbívoros, los tricomas juegan un papel regulador de la temperatura al mantener el microambiente de la hoja, al reflejar la radiación solar y evitar el sobrecalentamiento (Picote *et al.* 2007). En el caso del contenido de agua, además de ser un elemento clave en numerosos aspectos fisiológicos, también se ha señalado que puede jugar un papel defensivo influyendo en la preferencia del consumo por parte de los herbívoros (Agrawal y Fishbein 2006, Loiola *et al.* 2012). Esta asociación de atributos de diferentes grupos indica que la delimitación de módulos o grupos funcionales en la hoja es compleja. Para entender esta complejidad se recomiendan análisis adicionales que incluyan atributos que reflejen funciones específicas, como la tasa fotosintética, la conductancia estomática o el contenido de almidón (Cornelissen *et al.* 2003, Reich *et al.* 2003).

Dado que la regulación de la fotosíntesis es un proceso clave para la supervivencia de las plantas en cualquiera de sus etapas del desarrollo (Sulpice *et al.* 2010), es probable que estos atributos se encuentren bajo selección correlativa, como han sugerido Ackerly y colaboradores (2000). La presencia de estos atributos altamente correlacionados puede ser

la razón de que los niveles de integración fenotípica relacionada con los atributos de mantenimiento no difieran entre estadios.

### **Patrón de correlación entre atributos**

Como se esperaba, los atributos relacionados con el espectro de economía foliar y de forma tuvieron fuertes correlaciones entre sí, estos resultados se mantienen acorde a lo reportado para las correlaciones entre atributos que tienen una relación funcional o provienen del mismo origen durante el desarrollo (Waitt y Levin 1998). En *Phlox drumondii* (Polemoniaceae) los atributos de morfología floral, tamaño y características foliares están altamente correlacionados dentro de su grupo, y muestran respuestas plásticas similares que podrían mantener el fenotipo en condiciones ambientales cambiantes (Waitt y Levin 1993). En *Piper arieianum* y *P. sancti-felicis* (Piperaceae) los grupos de atributos de crecimiento y de fotosíntesis mantienen mayor número de correlaciones significativas dentro de ellos que entre ellos (Nicotra et al. 1997). En ambas especies el signo y magnitud de las correlaciones exhibe respuestas plásticas relacionadas con las condiciones del ambiente lumínico. Gianoli (2004) ha sugerido que en *Convolvus arvensis* (Convolvulaceae) la integración fenotípica podría haber evolucionado como una respuesta al estrés ambiental. Esta respuesta proviene de los cambios entre varios atributos relacionados con el crecimiento y la adquisición de recursos. En los ejemplos disponibles los cambios en las relaciones de los atributos muestran cambios en las estrategias fisiológicas para lidiar con el ambiente.

Las correlaciones también se mantuvieron significativas e intensas entre los atributos fisiológicos y de defensa, lo que coincide con los aportes de los atributos con bajos valores de las cargas en diferentes CP. Esto sugiere que las relaciones funcionales en la hoja están altamente relacionadas el contexto ecológico en el que evolucionan las poblaciones, en particular, con la presencia de herbívoros y sus enemigos naturales.

Los cambios más notables en el patrón de correlaciones se relacionan con la expresión de atributos de forma y defensa en diferentes estadios ontogenéticos. Esta expresión del fenotipo se relaciona con las diferentes presiones de selección que las plantas experimentan durante el crecimiento. Aunque en *T. velutina* sólo se cuenta con información proveniente de los cambios ontogenéticos en relación a la defensa (Ochoa-López 2013), es posible que las presiones de selección originadas por la heterogeneidad ambiental en

condiciones como la disponibilidad de agua y la competencia inter o intraespecífica ocasionen los patrones de correlación observados. Lo anterior señala la necesidad de realizar estudios para determinar el papel de la variación ambiental en las respuesta de los fenotipos complejos, y de identificar los atributos o grupos de atributos que son blanco de diferentes agentes de selección.

### **Integración fenotípica foliar**

En esta investigación se identificaron patrones ontogenéticos consistentes de la integración fenotípica foliar. Un alto nivel de integración fenotípica implica covariación entre ciertos atributos. Dado que los atributos de mantenimiento están más integrados que los atributos de defensa se puede sugerir que las funciones fisiológicas tienen fuertes efectos en la expresión fenotípica de las hojas. Esto puede deberse a que ciertas combinaciones entre los atributos morfológicos podrían ser seleccionadas para mantener un óptimo para maximizar la captura de radiación solar y minimizar la pérdida de agua, o regular la temperatura (Wright *et al.* 2004). El hecho de que la INT del mantenimiento no difiera entre estadios indica el importante papel que guarda en ambos estadios la captura, inversión y asimilación de recursos. Los niveles de INT para los atributos de mantenimiento en las hojas de *T. velutina* son similares a los reportados por Boucher y colaboradores (2013) para *Polygonum viviparum* (Polygonaceae) empleando únicamente atributos relacionados con la economía foliar.

Los atributos de defensa guardan niveles de integración menores que los de la integración total y de los atributos de mantenimiento, lo cual indica que el grupo de atributos de defensa no se mantiene por relaciones funcionales o genéticas. Esto puede estar relacionado con el papel de los atributos de defensa en la fisiología foliar, pero también con que son mediadores de diferentes interacciones con los herbívoros y sus enemigos naturales. Los tricomas foliares y la dureza son una barrera para el daño producido por los folívoros, mientras que el número de nectarios extraflorales y el contenido de azúcar en el néctar extrafloral es parte de la recompensa para las hormigas que realizan el patrullaje. El néctar podría tener un doble papel como recompensa a la dispersión de las semillas. Además, evidencia reciente indica que estos atributos pueden ser inducidos en respuesta al daño (Ochoa-López 2013, A. Alonso-Salgado en prep.). Otras características del néctar extrafloral, como el volumen, la concentración y la tasa de secreción, están regulados por

parámetros ambientales (Petanidou y Smets 1996), razón por la cual podrían responder de manera independiente en la expresión del fenotipo de las hojas. Existen evidencias de que los atributos de defensa contra herbívoros, como la densidad de tricomas, pueden ser modificados por mecanismos epigenéticos (Scoville *et al.* 2011), lo cual también puede modificar el grado de covariación con otros atributos durante el desarrollo.

Aunque en esta investigación no se identificó un efecto de la interacción entre genotipo y estadio sobre los niveles de integración total, hay familias genotípicas que modificaron la integración foliar durante el desarrollo. Estos resultados podrían reflejar diferentes estrategias fisiológicas favorecidas por la selección natural en función de la disponibilidad de recursos (Bond 2000) o cambios en las estrategias de defensa entre genotipos (Ochoa-López 2013, Villamil *et al.* 2013). La variación de los niveles de integración podría ser favorable para los genotipos tanto en diferentes estaciones de crecimiento como durante la estación de crecimiento si están expuestos a condiciones ambientales heterogéneas (Donovan y Ehleringer 1992, Caruso *et al.* 2005). Para *Convolvus arvensis* (Convolvulaceae) (Gianoli 2004) y tres especies del género *Phlox* (Polemoniaceae) (Schlichting 1989) se han reportado niveles altos de correlación entre atributos funcionales en los fenotipos situados en ambientes estresantes. Esta variación puede ser una expresión de la plasticidad fenotípica en condiciones microambientales cambiantes y podría ser una ventaja, ya que generaría diferentes estrategias funcionales en los genotipos de la población. Ya que las semillas de *T. velutina* se producen y germinan durante todo el año (Salazar-Rojas *et al.* 2012), las plántulas enfrentan diferentes condiciones para establecerse. En estos escenarios la integración fenotípica podría favorecer el establecimiento de los genotipos en las condiciones más favorables, dada su capacidad de coordinación entre atributos fisiológicos y morfológicos. El entendimiento del papel de los niveles de integración fenotípica requiere de un análisis más detallado en las poblaciones naturales, pues existe la alternativa de que, tal como ocurre en *Polygonum viviparum* (Polygonaceae), los genotipos con mayor nivel de integración fenotípica y con mayor variación para las características funcionales se encuentren en poblaciones que estén creciendo en condiciones de estrés abiótico (Boucher *et al.* 2013).

Los niveles de integración foliar total de *T. velutina* fueron menores que los valores reportados para las flores (Ordano *et al.* 2008). Sin embargo, se encuentran dentro del intervalo de integración fenotípica floral reportado para algunas especies, como *Lythrum*

*salicaria* (Lythraceae, 0.64) o *Impatiens capensis* (Balsaminaceae, 1.015) (Ordano *et al.* 2008). La integración fenotípica floral de *T. velutina* es de 1.51 (J. Ramos-Castro, com. pers.), y es significativamente más alta que los niveles de integración foliar en ambos estadios. Los niveles de integración reportados para frutos carnosos en atributos morfológicos, de nutrientes y de atracción (Valido *et al.* 2011) tienen valores cercanos a los que se presentan en este trabajo para la integración total de las hojas.

Finalmente, otros trabajos han comparado los patrones de correlación entre distintos atributos de las plantas señalando que hay independencia entre las correlaciones de los atributos de los módulos vegetativo y reproductivo (Berg 1960, Conner y Via 1993, Conner y Sterling 1996, Hansen *et al.* 2007, Pélabon *et al.* 2011). Pigliucci y colaboradores (1991) encontraron resultados similares para las correlaciones entre hojas y frutos de *Castanea sativa* (Fagaceae). Armbruster y colaboradores (1999) han señalado que la independencia entre los tipos de atributos depende de la especie, puede reflejar competencia por la asignación de recursos entre estructuras (*Eichhornia crassipes*, Pontederiaceae; *Wedelia* sp., Asteraceae) o covarianzas entre atributos particulares (*Croton* sp., Euphorbiaceae). Estos trabajos sólo han incluido los atributos morfológicos de las hojas y las flores por lo que es de esperarse que nuevos patrones sean identificados si se incluyen atributos fisiológicos o anatómicos, como se ha demostrado en el presente trabajo. Además es posible que en un análisis de la integración fenotípica incluyendo flores, hojas, tallos y raíces sea posible determinar si los atributos son blancos de la selección natural o sobre ellos existen restricciones genéticas o fisiológicas que influyen sobre la expresión de los fenotipos.

### **Selección jerárquica sobre las hojas de *T. velutina***

En este estudio se evaluó la acción de la selección natural empleando los valores de los atributos foliares y los índices de integración de 24 genotipos mantenidos en condiciones de invernadero. Esta es una muestra relativamente pequeña para hacer una estimación confiable y probablemente no refleja los patrones de selección que pueden darse en la plantas en su hábitat natural, aunque se identificaron diferencias entre los atributos y combinaciones de atributos foliares sujetas a selección entre estadios ontogenéticos. En las plántulas la selección parece favorecer a las hojas más duras y de mayor tamaño, y con menor contenido de nitrógeno, lo cual está relacionado con la limitación de recursos en la inversión de estructuras celulares (Flood *et al.* 2011) y con la

disminución de la calidad nutricional de la hoja y el consumo por parte de los herbívoros (Berenbaum 2001). Las correlaciones fenotípica y genética entre el área foliar y la cantidad de clorofila podrían mantener el balance de tasa fotosintética en los individuos juveniles (Sulpice *et al.* 2010). Estos resultados indican que los genotipos de *T. velutina* con la capacidad para crecer suficientemente rápido y con la mayor eficiencia fisiológica podrían verse favorecidos al sobrevivir y establecerse en los ambientes extremos de las dunas costeras.

En *Turnera velutina* los atributos que están bajo selección en las plantas de estadio reproductivo están ligados por procesos relacionados con la fotosíntesis: el contenido de clorofila, el contenido de carbono y el índice de disección (Thomas e Ickes 1995, Bond 2000). Otros estudios han identificado como el agente causal de la selección sobre atributos fisiológicos y sobre el tamaño de las hojas a la variación de las condiciones ambientales (Dudley 1996, Sandquist y Ehleringer 2003, Agrawal *et al.* 2008). En este sentido se requieren análisis que determinen si atributos como los tricomas o el contenido de agua están bajo selección debido a las condiciones ambientales o a la interacción con los mutualistas de *T. velutina*. Los resultados encontrados constituyen evidencia que apoya la acción de la selección sobre atributos fisiológicos. La información disponible indica que atributos como la eficiencia en el uso de agua (Navas *et al.* 2010, Agrawal y Fishbein 2006), la tasa fotosintética o la conductancia estomática (Caruso *et al.* 2006) pueden ser blancos de la selección en diferentes condiciones ambientales. Las evidencias indican también que estos atributos muestran plasticidad fenotípica y que presentan disyuntivas importantes que condicionan el desempeño de las especies en los que se presentan. Esto indica la necesidad de determinar si los atributos funcionales en las áreas de distribución de *T. velutina* pueden variar respecto a los resultados obtenidos bajo condiciones controladas.

En este trabajo se identificaron combinaciones de atributos sobre los que opera la selección natural, característica que se puede llamar integración intrafoliar, de forma análoga a lo que se reporta para las estructuras florales (Ordano *et al.* 2008), y que se presenta en ambos estadios ontogenéticos. La selección mostró cambios en el sentido de la selección direccional cuando se analizó a los atributos de manera independiente y cuando se analizó en combinación con otros atributos. Este es el caso de la dureza, estimada por el MFE, y el área foliar que cambian de signo positivo a negativo cuando se presentan en combinación con otros atributos en el CP2 y CP3 en las plantas de estadio juvenil. El mismo

caso se presenta en las plantas de estadio reproductivo con el contenido de carbono y el índice de disección. Este resultado refleja la relación entre atributos en los procesos fisiológicos, como se ha señalado previamente

La detección de selección direccional negativa sobre los niveles de integración fenotípica total en ambas etapas de la ontogenia sugiere que la selección favorece la independencia entre los atributos en respuesta a las presiones de selección o la selección de submódulos. Las modificaciones o reajustes en *T. velutina* pueden provenir de mecanismos como la inducción en los atributos de defensa (Ochoa-López 2013) o a la variación ambiental en la temperatura (Winn 1999). La ventaja de la modularidad en las estructuras vegetativas es el potencial de modificar su fenotipo en respuesta a un cambio en el ambiente; de esta manera, el cambio heteroblástico puede representar un mecanismo alternativo o complementario para generar variación intraindividual ante los cambios ambientales a pequeña escala (Winn 1999).

Los resultados del análisis de rutas muestran que la integración fenotípica tiene un efecto directo sobre la producción de flores cuando se consideran los índices INT total y la diferencia de INT entre estadios. En contraparte, el análisis de selección mostró que los genotipos con altos valores de integración tienen menor biomasa total. Esto puede reflejar una disyuntiva en las plantas de estadio reproductivo en la cual la integración podría favorecer los mecanismos de asignación de recursos en la producción de estructuras reproductivas limitando el crecimiento y la producción de nuevas ramas u hojas. Otra alternativa es que los INT total de las plantas que se mantuvieron bajo condiciones similares al ambiente natural podrían ser distintos de los INT estimados en las plantas dentro de la casa de sombra. Esto remarca la necesidad de explorar los cambios en la INT en el ambiente natural de *T. velutina*.

En síntesis, los niveles de integración fenotípica en las hojas de *T. velutina* en los dos estadios analizados reflejan un cambio ontogenético en la asociación de atributos. Este cambio responde a las estrategias de las plantas en respuesta a las presiones de selección experimentadas durante su ciclo de vida. Al emplear el enfoque de la integración fenotípica en el análisis de los fenotipos complejos fue posible identificar atributos que covarían entre sí, y sobre los que actúa la selección natural.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE ESTUDIO

- Las hojas de *T. velutina* tienen cambios ontogenéticos en la integración fenotípica total y en los atributos de defensa.
- Los atributos fisiológicos y morfológicos mantienen la estructura de las correlaciones en la etapa juvenil, mientras que los atributos fisiológicos y de defensa contra herbívoros lo hacen en las hojas de etapa reproductiva.
- En ninguno de los dos estadios ontogenéticos se identificaron agrupaciones exclusivas relacionadas con la defensa, la fisiología, o la morfología.
- La selección natural actúa sobre tres niveles de la estructura de la hoja: los atributos individuales, los submódulos y los niveles de integración.
- Los niveles bajos de integración fenotípica en las hojas podrían relacionarse con la flexibilidad evolutiva de las correlaciones entre atributos. Esta característica puede favorecer los reajustes funciones y generar diferentes estrategias fisiológicas en respuesta a las presiones de selección experimentadas a lo largo de la ontogenia. Entre los factores que pueden influir sobre los niveles de integración fenotípica se encuentran los cambios en las trayectorias ontogenéticas de la defensa y la multifuncionalidad de los atributos en la expresión del fenotipo de las hojas.
- La integración fenotípica de las hojas tiene consecuencias en la adecuación de los individuos, influye a través de los mecanismos de reajuste fisiológicos que permiten asignar recursos para la producción de estructuras reproductivas.
- Debido a que en *T. velutina* los atributos defensivos tienen diferentes trayectorias ontogenéticas, sería posible extender el análisis de la integración fenotípica a otros estadios ontogenéticos, y determinar cómo influye la integración fenotípica en la dinámica poblacional.
- Se requieren estudios complementarios para analizar los patrones de integración en otras estructuras, como los tallos, los frutos o las raíces.
- Es necesario determinar si la selección estabilizadora y la selección correlativa actúan sobre los atributos o grupos de atributos de las hojas de *T. velutina*.

## 7. LITERATURA CITADA

- Ackerly AD y PB Reich. 1999. Convergence and correlations among leaf size and function in seed plants: a comparative test using independent contrasts. *American Journal of Botany*, 86: 1272-1281.
- Ackerly DD, SA Dudley, SE Sultan, J Schmitt, JS Coleman, C Randall, DR Sandquist, MA Geber, AS Evans, TE Dawson y MJ Lechowicz. 2000. The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. *BioScience*, 50: 979-995.
- Ackerman RR. 2005. Ontogenetic integration of the hominoid face. *Journal of Human Evolution*, 48: 175-19.
- Agrawal AA y M Fishbein. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology*, 87: S132-S149.
- Agrawal AA, AC Erwin y SC Cook. 2008. Natural selection on and predicted responses of ecophysiological traits of swamp milkweed (*Asclepias incarnata*). *Journal of Ecology*, 96: 536-542.
- Alvarado-Cárdenas LO. 2006. Fascículo 43. Turneraceae. En *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 10 pp.
- Arbo MM. 2005. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). III Series Anomaliae y *Turnera*. *Bonplandia*, 14:115-318.
- Arbo MM y SM Espert. 2009. Morphology, phylogeny and biogeography of *Turnera* L. (Turneraceae). *Taxon*, 58: 457-467.
- Armbruster WS, VS di Stilio, JD Tuxill, TC Flores y JL Velásquez-Runk. 1999 Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine Neotropical plants: a re-evaluation of Berg's correlation Pleiades concept. *American Journal of Botany*, 86: 39-55.
- Armbruster WS, C Pélabon, TF Hansen y TPH Mulder. 2004. Floral integration, modularity and accuracy: distinguish complex adaptations from genetic constraints. pp. 23-49. En Pigliucci M y K Preston (eds.) *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. Oxford University Press. Nueva York, N.Y.
- Atchley WR. 1984. Ontogeny, timing of development, and genetic variance-covariance structure. *The American Naturalist*, 123: 519-540.

- Badyaev AV y TE Martin. 2000. Individual variation in growth trajectories: phenotypic and genetic correlation in ontogeny of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 290-301.
- Barton K. 2008. Phenotypic plasticity in seedling defense strategies: compensatory growth and chemical induction. *Oikos*, 117: 917-925.
- Berenbaum M. 2001. Plant-herbivore interactions. pp. 303- 314. En Fox CW, DA Roff y DJ Fairbairn (eds.). *Evolutionary Ecology, Concepts and Case Studies*. Oxford University Press. Nueva York.
- Berg RL. 1960. The ecological significance of correlation pleiades. *Evolution*, 14: 171-180.
- Biber PD. 2007. Evaluating a chlorophyll content meter on three coastal wetland plant species. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, 1: 1-11.
- Bissell EK y PK Diggle. 2010. Modular genetic architecture of floral morphology in *Nicotiana*: quantitative genetic and comparative phenotypic approaches to floral integration. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 1744-1758.
- Blows MW. 2006. A tale of two matrices: multivariate approaches in evolutionary biology. *Journal of Evolutionary Biology*, 20: 1-8.
- Boege K y JR Marquis. 2005. Facing herbivores as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 441-448.
- Bolker JA. 2000. Modularity in development and why it matters to Evo-Devo. *American Zoologist*, 10: 770-776.
- Bond BJ. 2000. Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends in Plant Science*, 5: 349-353.
- Bond WJ y J Midgley. 1988. Allometry and sexual differences in leaf size. *The American Naturalist*, 131: 901-910.
- Boucher FC, E Thuiller, C Arnoldi, CH Albert y S Lavergne. 2013. Unravelling the architecture of functional variability in wild populations of *Polygonum viviparum* L. *Functional Ecology*, 27: 382-391.
- Brown VK, JH Lawton y PJ Grubb. 1991. Herbivory and the evolution of leaf size and shape. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 333: 265-272.
- Bryant JP y PJ Kuropat. 1980. Selection of winter forage by subarctic browsing vertebrates: the role of plant chemistry. *Annual Review of Plant Physiology*, 11: 261-285.

- Caruso CM, H Maherall, A Mikulyuk, K Carlson y RB Jackson. 2005. Genetic variance and covariance for physiological traits in *Lobelia*: are there constraints on adaptive evolution? *Evolution*, 59: 826-837.
- Castillo-Campos G y AC Travieso-Bello. 2006. *La flora*, pp. 171-204. En Moreno-Casasola P. (ed.) *Entornos Veracruzanos: La costa de La Mancha*. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa.
- Chen Y y T Lübberstedt. 2010. Molecular basis of trait correlation. *Trends in Plant Science*, 15: 454-461.
- Cheverud JM. 1996. Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *American Zoologist*, 36: 44-50.
- Cheverud JM y LJ Leamy. 1985. Quantitative genetics and the evolution of ontogeny III. Ontogenetic changes in correlation structure among live-body traits in randombred mice. *Genetics Research*, 46: 35-335.
- Chevreur JM, GP Wagner y MM Dow. 1989. Methods for the comparative analysis of variation patterns. *Systematic Zoology*, 38: 201-213.
- Conner JK y A Sterling. 1996. Selection for independence of floral and vegetative traits: evidence from correlation patterns in five species. *Canadian Journal of Botany*, 74: 642-644.
- Conner JK y S Via. 1993. Patterns of phenotypic and genetic correlations among morphological and life-history traits in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Evolution*, 47: 704-711.
- Cornelissen JHC, S Lavorel, E Garnier, S Díaz, N Buchmann, DE Gurvich, PB Reich, H ter Steege, HD Morgan, MGA van der Heijden, JG Pausas y H Poorter. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51: 335-380.
- Cornelissen JHC, N Pérez-Harguindeguy, S Díaz, JP Grime, B Marzano, M Cabido, F Vndramini y B Cerabolini. 1999. Leaf structure and defense control litter decomposition rate across species and life forms in regional floras on two continents. *New Phytologist*, 143: 191-200.
- Cuautle M y V Rico-Gray. 2003. The effect of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Functional Ecology*, 17: 417-423.

- Dmitriew C, MW Blows y L Rowe. 2010. Ontogenetic change in genetic variance in size depends on growth environment. *The American Naturalist*, 175: 640-649.
- Donovan LA y JR Ehleringer. 1992. Contrasting water-use patterns among size and life-history classes of a semi-arid shrub. *Functional Ecology*, 6: 482-488.
- Dudley SA. 1996. Differing selection on plant physiological traits in response to environmental water availability: a test of adaptive hypothesis. *Evolution*, 50: 92-102.
- Elias TS, WR Rozich y L Newcombe. 1975. The foliar and floral nectaries of *Turnera ulmifolia* L. *American Journal of Botany*, 62: 570-576.
- Ellison AM y EJ Farnsworth. 2005. The cost of carnivory for *Darlingtonia californica* (Sarraceniaceae): evidence from relationships among leaf traits. *American Journal of Botany*, 92: 1085-1093.
- Eisen EJ. 1975. Results of growth curve analysis in mice and rats. *Journal of Animal Science*, 42: 1008-1023.
- Flood PJ, J Harbison y MGM Aarts. 2011. Natural genetic variation in plant photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 16: 327-335.
- Flury BD. 1988. *Common Principal Components and Related Multivariate Models*. Wiley. Nueva York.
- Fornoni J, M Ordano, K Boege y CA Domínguez. 2009. Phenotypic integration: between zero and how much is too much. *New Phytologist*, 183: 248-250.
- Gama L, C Chiapy y M Gómez. 1999. *Turneraceae*, pp. 201-227. En *Bioclimatología de la Flora de Veracruz*. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa.
- Gamon JA y JS Surfus. 1999. Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist*, 143: 105-117.
- Geissert D y D Dubroeuq. 1995. Influencia de la geomorfología en la evolución de los suelos de dunas costeras en Veracruz, México. *Investigaciones Geográficas. Boletín*, 3: 37-51.
- Gianoli E. 2004. Plasticity of traits and correlations in two populations of *Convolvus arvensis* (Convolvulaceae) differing in environmental heterogeneity. *International Journal of Plant Sciences*, 165: 825-832.
- Givnish TJ. 1979. On the adaptive significance of leaf form. pp 375-407. En *Topics in plant population biology*. Solbrig OT, J Subodh, GB Johnson y PH Raven (eds.) Macmillan Press, London & Basongstoke, Reino Unido.

- Givnish TJ. 1987. Comparative studies of leaf form: assessing the relative roles of selective pressures and phylogenetic constraints. *New Phytologist*, 106: 131-160.
- Grieco TM, OT Rizk y LJ Hlusko. 2012. A modular framework characterizes micro- and macroevolution of old monkey dentitions. *Evolution*, 67: 241-259.
- Gutschick VP. 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist*, 143: 3-18.
- Gutschick VP y FW Wiegel. 1988. Optimizing the canopy photosynthetic rate by patterns of investment in specific leaf mass. *The American Naturalist*, 132: 67-86.
- Hallgrímsson B, CJ Dorval, ML Zelditch y RZ German. 2004 Craniofacial variability and morphological integration in mice susceptible to cleft lip and palate. *Journal of Anatomy*, 205: 501-517.
- Hallgrímsson B, JJY Brown, AF Ford-Hutchinson, HD Sheets, ML Zelditch y FR Jirik. 2006. The brachymorph mouse and the developmental-genetic basis for canalization and morphological integration. *Evolution and Development*, 8: 61-73.
- Hallgrímsson B, DE Lieberman, NM Young, T Parsons y S Wat. 2007. Evolution of covariance in the mammalian skull. pp. 164-190. En Bock G y J Goode (eds.). *Tinkering: the microevolution of development*. John Wiley. Chichester, Inglaterra.
- Hanley ME, BB Lamont, MM Fairbanks y CM Rafferty. 2007. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defense. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8: 157-178.
- Hansen TF, C Pélabon y WS Armbruster. 2007. Comparing variational properties of homologous floral and vegetative characters in *Dalechampia scandens*: testing the Berg hypothesis. *Evolutionary Biology*, 34: 86-98.
- Harder LD. 2009. Questions about floral (dis)integration. *New Phytologist*, 183: 247-248.
- Herrera CM. 2009. *Which traits vary within plants*, pp. 9-35. En Herrera CM, *Multiplicity in Unity. Plant Subindividual Variation and Interactions with Animals*. The University of Chicago Press. Chicago.
- Herrera CM, X Cerdá, MB García, J Guitián, M Medrano, PJ Rey y AM Sánchez-Lafuente. 2002. Floral integration, phenotypic covariance structure and pollinator variation in bumblebee-pollinated *Helleborus foetidus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 108-121.

- Houter NC y TL Pons. 2012. Ontogenetic changes in leaf traits of tropical rainforest trees differing in juvenile light requirement. *Oecologia*, 169: 33-45.
- Jifon JL, JP Sylversten y E Whaley. 2005. Growth environment and leaf anatomy affect nondestructive estimates of chlorophyll and nitrogen in *Citrus* sp. leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 152-158.
- Jones CS. 2001. The functional correlates of heteroblastic variation leaves: changes in form and ecophysiology with whole plant ontogeny. *Bulletin of the Botanical Society of Argentina*, 36: 171-184.
- Karban R y I. T. Baldwin. 1997. *Induced Responses to Herbivory*. Chicago University Press. Chicago. 330 pp.
- Kerstetter RA y RS Poethig. 1998. The specification of leaf identity during shoot development. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 14: 373-398.
- Kikuzawa K. 1991. A cost-benefit analysis of leaf habitat and leaf longevity of trees and their geographical pattern. *American Naturalist*, 138: 1250-1260.
- Kincaid DT y RB Schneider. 1983. Quantification of leaf shape with a microcomputer and Fourier transform. *Canadian Journal of Botany*, 61: 2333-2342.
- Kirkpatrick M y NH Barton. 1997. Evolution of a species' range. *The American Naturalist*, 150: 1-23.
- Kudo G y TY Ida. 2010. Carbon source for reproduction in a spring ephemeral herb, *Corydalis ambigua* (Papaveraceae). *Functional Ecology*, 24: 62-69.
- Lambers H 2008. Life Cycles: environmental influences and adaptations. pp. 375-402. En Lambers H, FSChapin y TJ Pons. *Plant Physiological Ecology*, Springer Verlag, Nueva York.
- Lande R y SJ Arnold. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37: 1210-1226.
- Levin DA. 1976. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7: 121-159.
- Lewontin R. 1978. Adaptation. *Scientific American*, 239: 156-169.
- Loiola PP, IA Silva, DM Silva y MA Batlha. 2012. Underdispersion of anti-herbivore defense traits and phylogenetic structure of cerrado tree species at fine spatial scale. *Journal of Vegetation Science*, 23: 1095-1104.

- López A, AF Panser, L Poggio y A Fernández. 2011. Nuclear DNA content in the polyploid complex *Turnera ulmifolia* (Turnera L., Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 296: 225-230.
- Lynn DE y S Waldren. 2001. Morphological variation in populations of *Ranunculus repens* from the Temporary Limestone Lakes (Turloughs) in the West of Ireland. *Annals of Botany*, 87: 9-17.
- Magwene PM. 2001. New tools for studying integration and modularity. *Evolution*, 55: 1734-1745.
- Marroig G y JM Cheverud. 2001. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny ecology, and ontogeny during cranial evolution of New World monkeys. *Evolution*, 55: 2576-2600.
- McLellan T. 1993. The roles of heterochrony and heteroblasty in the diversification of leaf shapes in *Begonia dregei* (Begoniaceae). *American Journal of Botany*, 80: 796-804.
- Meziane D y B Shipley. 2001. Direct and indirect relationships between specific leaf area, leaf nitrogen and leaf gas exchange. Effects of irradiance and nutrient supply. *Annals of Botany*, 85: 915-927.
- Milla R, PB Reich, Ü Niinemets y P Castro-Díez. 2008. Environmental and developmental controls on specific leaf area are little modified by leaf allometry. *Functional Ecology*, 22: 565-576.
- Mitteroecker P, P Gunz, S Neubauer y Gerd Müller. 2012. How to explore morphological integration in human evolution and development? *Evolutionary Biology*, 39: 536-553.
- Moles AT, B Peco, IR Wallis, WJ Foley, AGB Poore, EW Seabloom, PA Vesk, AJ Bisigato, L Cella-Pizarro, CJ Clark, PS Cohen, WK Cornwell, W Edwards, R Ejrnæs, T Gonzales-Ojeda, BJ Graae, G Hay, FC Lumbwe, B Magaña-Rodríguez, BD Moore, PL Peri, JR Poulsen, JC Stegen, R Veldtman, H Zeipel, NR Andrew, SL Boulter, ET Borer, JHC Cornelissen, AG Farji-Brener, JL DeGabriel, E Jurado, LA Kyhn, B Low, CPH Mulder, K Reardon-Smith, J Rodríguez-Velázquez, A De Fortier, Z Zheng, PG Blendinger, BJ Enquist, JM Facelli, T Knight, JD Majer, M Martínez-Ramos, P McQuillan y FKC Hui. 2012. Correlations between physical and chemical defences in plants: tradeoffs, syndromes, or just many different ways to skin a herbivorous cat? *New Phytologist*, 198: 252-263.

- Moreno-Casasola P. 1982. Ecología de la vegetación de dunas costeras: factores físicos. *Biotica*, 7: 577-602.
- Muniz da Silva D y MA Batalha. 2011. Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. *Plant Ecology*, 212: 181-193.
- Murren CJ. 2002. Phenotypic integration in plants. *Plant Species Biology*, 17: 89-99.
- Murren CJ. 2012. The integrated phenotype. *Integrative and Comparative Biology*, 52: 64-76.
- Nahrung HF y GR Allen. 2003. Intra-plant host selection, oviposition preference and larval survival of *Chrysophtharta agricola* (Chapuis) (Coleoptera: Chrysomelidae: Paropsini) between foliage types of a heterophyllous host. *Agricultural and Forest Entomology*, 5: 155-162.
- Nattero J, AN Sérsic y AA Cocucci. 2010. Patterns of contemporary phenotypic selection and flower integration in the hummingbird-pollinated *Nicotiana glauca* between populations with different flower-pollinator combinations. *Oikos*, 119: 852-863.
- Navas ML, C Roumet, A Bellmann, G Laurent y E Garnier. 2010. Suites of plant traits in species from different stages of a Mediterranean secondary succession. *Plant Biology*, 12: 183-196.
- Nicotra AB, RL Chazdon y CD Schlichting. 1997. Patterns of genotypic variation and phenotypic plasticity of light response in two tropical *Piper* (Piperaceae) species. *American Journal of Botany*, 84: 1542-1552.
- Nicotra AB, MJ Cosgrove, A Cowling, CD Schlichting y CS Jones. 2008. Leaf shape linked to photosynthetic rates and temperature optima in South African *Pelargonium* species. *Oecologia*, 154: 625-635.
- Nicotra AB, A Leigh, CK Boyce, CS Jones, KJ Niklas, DL Royer y H Tsukaya. 2011. The evolution and significance of leaf shape in the angiosperms. *Functional Plant Biology*, 38: 535-552.
- Niklas KJ. 2004. Plant allometry: is there a grand unifying theory? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79: 871-889.
- Ochoa-López S. 2013. Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa y la tolerancia de *Turnera velutina* y su variación genética. Tesis Profesional de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM. México. D.F. 55 p.

- Olson EC y RL Miller. 1958. Morphological integration. University of Chicago Press. Chigago, Illinois.
- Onoda Y, M Westoby, PB Adler, AMF Choong, FJ Clissold, JHC Cornelissen, S Díaz, NJ Dominy, A Elgart, L Enrico, PVA Fine, JJ Howard, A Jalili, K Kitajima, H Kurokawa, C McArthur, PW Lucas, L Markesteijn, N Pérez-Harguindeguy, L Poorter, L Richards, LS Santiago, EE Sosinski Jr, SA Van Bael, I Warton, IJ Wright, SL Wright y N Yamashita. 2011. Global patterns of leaf mechanical properties. *Ecology Letters*, 14: 301-312.
- Ordano M, J Fornoni, K Boege y CA Domínguez. 2008. The adaptive value of phenotypic floral integration. *New Phytologist*, 179: 1183-1192.
- Pasquet-Kok J, C Creese y L Sack. 2010. Turning over a new “leaf”: multiple functional significances of leaves versus phyllodes in Hawaiian *Acacia koa*. *Plant, Cell & Environment*, 33: 2084-2100.
- Pélabon C, WS Armbruster y TF Hansen. 2011. Experimental evidence for the Berg hypothesis: vegetative traits are more sensitive than pollination traits to environmental variation. *Functional Ecology*, 25: 247-257.
- Petanidou T y E Smets. 1996. Does temperatures stress induce nectar secretion in Mediterranean plants? *New Phytologist*, 133: 513-518.
- Phillips PC y SJ Arnold. 1999. Hierarchical comparison of genetic variance-covariance matrices using the Flury Hierarchy. *Evolution*, 53: 1506-1515.
- Picote JJ, DM Rosenthal, JM Rhode y MB Cruzan. 2007. Plastic responses to temporal variation in moisture availability: consequences or water use efficiency and plant performance. *Oecologia*, 153: 821-832.
- Pigliucci M, C Paoletti, S Fineschi y ME Malvolti. 1991. Phenotypic integration in chesnut *Castanea sativa* Mill.: leaves versus fruits. *Botanical Gazette*, 152: 514-521.
- Pleasants JM y SJ Chaplin. 1983. Nectar production rates of *Asclepias quadrifolia*: causes and consequences of individual variation. *Oecologia*, 59: 232-238.
- Poorter H, U Niinemets, L Poorter, IJ Wright y R Villar. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist*, 182: 565-588.
- Porra RJ, WA Thompson y PE Kriedemann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted

- with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394.
- Prévost MF. 1978. Modular construction and its distribution in tropical woody plants. pp. 223-231. En Tomlinson PB y MH Zimmermann (eds.). *Tropical Trees as Living Systems: The Proceedings of the Fourth Cabot Symposium*. Cambridge University Press, Nueva York.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [www.R-project.org](http://www.R-project.org)
- Ramos-Castro SE. 2013. Determinación del componente genético de la media y la varianza en las señales y recompensa de las plantas a sus polinizadores. Tesis Profesional de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM. México. D. F. 45 p.
- Reich PB, DS Ellsworth, MB Walters, JM Vose, C Gresham, JC Volin y WD Bowman. 1999. Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology*, 80: 1955-1969.
- Reich PB, MB Walters y DS Ellsworth. 1997. From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 94: 13730-13734.
- Reich PB, IJ Wright, J Cavender-Bares, JM Craine, J Oleksyn, M Westoby y MB Walters. 2003. The evolution of plant functional variation: traits, spectra, and strategies. *International Journal of Plant Sciences*, 164: S143-S164.
- Sánchez-Vilas J y JR Pannell. 2011. Sexual dimorphism in resource acquisition and deployment: both size and timing matter. *Annals of Botany*, 107: 119-126.
- Sandquist DR y JR Ehleringer. 2003. Population- and family-level variation of brittlebush (*Encelia farinosa*, Asteraceae) pubescence: its relation to drought and implications for selection in variable environments. *American Journal of Botany*, 90: 1481-1486.
- Salazar-Rojas B, V Rico-Gray, A Canto y M Cuautle. 2012. Seed fate in the myrmechorous Neotropical plant *Turnera ulmifolia* L., from plant to germination. *Acta Oecologica*, 40: 1-10.
- Schlichting CD. 1989. Phenotypic plasticity in *Phlox*. *Oecologia*, 78: 496-501.
- Schlichting CD y M Pigliucci. 1998. *Phenotypic integration*. pp. 191- 226. En *Phenotypic Evolution: a Reaction Norm Perspective*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.

- Scoville AG, LL Barnett, S Bodbyl-Roels, JK Kelly y LC Hileman. 2011. Differential regulation of a MYB transcription factor in correlates with transgenerational epigenetic inheritance of trichome density in *Mimulus guttatus*. *New Phytologist*, 191: 251-263.
- Shipley B, MJ Lechowicz, IJ Wright y PB Reich. 2006. Fundamental trade-offs generating the worldwide leaf economics spectrum. *Ecology*, 87: 535-541.
- Steinbauer MJ. 2001. Specific leaf weight as an indicator of juvenile leaf toughness in Tasmanian bluegum (*Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*): implications for insect defoliation. *Australian Forestry*, 64: 32-37.
- Stiller WN, PE Reid y GA Constable. 2004. Maturity and leaf shape as traits influencing cotton cultivar adaptation to dryland conditions. *Agronomy Journal*, 96: 656-664.
- Sulpice R, S Trenkamp, M Steinfaths, B Usadel, Y Gibon, H Witucka-Wall, ET Pyl, H Tschoep, MC Seinhauser, M Guenther, M Hoehne, JM Rohwer, T Altmann, AR Fernie y M Stitt. 2010. Network analysis of enzyme activities and metabolite levels and their relationship to biomass in a large panel of *Arabidopsis* accessions. *The Plant Cell*, 22: 2872-2893.
- Thomas SC y K Ickes. 1995. Ontogenetic changes in leaf size in Malaysian rain forest trees. *Biotropica*, 27: 427-434.
- Thomas SC y WE Winner. 2002. Photosynthetic differences between saplings and adult trees: an integration of field results by meta-analysis. *Tree Physiology*, 22: 117-127.
- Tokuoka T. 2012. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Journal of Plant Research*, 125: 489-497.
- Torres-Hernández L. V Rico-Gray, C Castillo-Guevara y JA Vergara. 2000. Effect of nectar-foraging ants on the reproductive fitness of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) in a coastal sand dune in Mexico. *Acta Zoológica Mexicana*, 81: 13-21.
- Travieso-Bello AC y A Campos. 2006. *Los componentes del paisaje*, pp. 139-150. En Moreno-Casasola P. (ed.) *Entornos Veracruzanos: La Costa de La Mancha*. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa.
- Tsukaya H. 2006. Mechanism of leaf-shape determination. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 477-496.
- Valido A, HM Schaefer y P Jordano. 2011. Colour, design and reward: phenotypic integration of fleshy fruit display. *Journal of Evolutionary Biology*, 24: 751-760.

- van den Berg AK y TD Perkins. 2004. Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll and nitrogen contents in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) leaves. *Forest Ecology and Management*, 200: 113-117.
- Villamil N. 2012. Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa contra herbívoros en *Turnera ulmifolia*. Tesis Profesional de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 93 pp.
- Villamil N, J Márquez.Guzmán y K Boege. 2013. Understanding ontogenetic trajectories of indirect defense: ecological and anatomical constraints in the production of extrafloral nectaries. *Annals of Botany, Special Issue on Seedling Herbivory*: 1-9.
- Wagner GP. 1984. On the eigenvalue distribution of genetic and phenotypic dispersion matrices: evidence for a nonrandom organization of quantitative character variation. *Journal of Mathematical Biology*, 21: 77-95.
- Wagner GP. 1996. Homologues, natural kinds and the evolution of modularity. *American Zoologist*, 36: 36-43.
- Wagner y Altenberg 1996. Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50: 967-976.
- Waitt DE y DA Levin. 1993. Phenotypic integration and plastic correlations in *Phlox drummondii* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany*, 80: 1224-1233.
- Waitt DE y DA Levin. 1998. Genetic and phenotypic correlations in plants: a botanical test of Cheverud's conjecture. *Heredity*, 80: 310-319.
- Walters GA y DP Bartholomew. 1984. *Acacia koa* leaves and phyllodes: gas exchange, morphological, anatomical, and biochemical characteristics. *Botanical Gazette*, 145: 351-357.
- West GB, JH Brown y BrianJ Enquist. 1999. A general model for the structure and allometry of plant vascular systems. *Nature*, 400: 664-667.
- Westoby M e- IJ Wright. 2003. The leaf size–twig size spectrum and its relationship to other important spectra of variation among species. *Oecologia*, 135:621–628.
- White J. 1979. The plant as metapopulation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10: 109-145.
- White J. 1984. *Plant metamerism*. pp. 15-47. En Dirzo R y J Sarukhán (eds.) *Perspectives on plant metapopulation ecology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Winn AA. 1996. Adaptation to fine-grained environmental variation: an analysis of within-individual leaf variation in an annual plant. *Evolution*, 50: 111-1118.
- Winn AA. 1999. The functional significance and fitness consequences of heterophylly. *International Journal of Plant Sciences*, 160: S113-S121.
- Wright IJ, PB Reich y M Westoby. 2001. Strategy shifts in leaf physiology, structure and nutrient content between species of high- and low-rainfall and high- and low-nutrient habitats. *Functional Ecology*, 15:423-434.
- Wright IJ, PB Reich, M Westoby, DD Ackerly, Z Baruch, F Bongers, J Canverder-Bares, T Chapin, JHC Cornelissen, M Diemer, J Flexas, E Garnier, PK Groom, J Gulias, K Hikosaka, BB Lamont, T Lee, W Lee, C Lusk, JJ Midgley, M-L Navas, U Niinemets, J Oleksyn, N Osada, H Poorter, P Poot, L Prior, VI Pyankov, C Roumet, SC Thomas, MG Tjoelker, EJ Veneklaas y R Villar. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428: 821-827.
- Woodman RL y GW Fernandes. 1991. Differential mechanical defense, herbivory, evapotranspiration, and leaf-hairs. *Oikos*, 60: 11-19.
- Zelditch ML, AR Wood, RM Bonnet y DL Swiderski. 2008 .Modularity of the rodent mandible: Integrating muscles, bones and teeth. *Evolution and Development*, 10: 756-768.

## ANEXOS

Tabla 1. Análisis de Componentes Principales de la varianza fenotípica de los atributos de las hojas de *Turnera velutina* (estadio Juvenil  $n = 625$  hojas, estadio Reproductivo  $n = 575$  hojas). Los números en negritas denotan valores estadísticamente significativos de las cargas ( $P < 0.05$ ).

ESTADIO JUVENIL	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11
Valor propio	2.6964	1.5318	1.3844	1.0533	0.9815	0.8955	0.7823	0.5521	0.4833	0.4504	0.1891
% varianza	24.5124	13.9252	12.5856	9.5757	8.9225	8.1411	7.1118	5.0188	4.3933	4.0945	1.7192
% acumulado	24.5124	38.4376	51.0231	60.5988	69.5213	77.6625	84.7743	89.7931	94.1864	98.2808	100
Atributos											
Número de nectarios extraforales	<b>0.2451</b>	<b>0.1519</b>	<b>0.1128</b>	<b>-0.1375</b>	<b>-0.1746</b>	<b>0.8415</b>	<b>-0.3093</b>	<b>-0.2003</b>	-0.0099	0.0890	-0.0533
Azúcar en néctar extrafloral	<b>0.0530</b>	<b>0.2051</b>	<b>0.2195</b>	-0.0423	<b>0.8854</b>	-0.0171	<b>-0.3255</b>	-0.0214	0.0540	-0.1074	0.0110
Densidad de tricomas	<b>0.2024</b>	<b>0.5369</b>	<b>-0.2841</b>	0.0737	-0.0026	<b>0.1459</b>	<b>0.1669</b>	<b>0.7089</b>	0.0434	<b>-0.1431</b>	0.1027
Contenido de clorofila	<b>0.2812</b>	<b>0.1580</b>	<b>0.5491</b>	-0.0543	<b>-0.1533</b>	-0.0727	<b>0.3549</b>	<b>-0.1721</b>	<b>0.2622</b>	<b>-0.5809</b>	-0.0322
Contenido de agua	<b>-0.0818</b>	<b>-0.4287</b>	<b>-0.0752</b>	<b>0.2129</b>	<b>0.3710</b>	<b>0.4693</b>	<b>0.6303</b>	0.0449	-0.0065	-0.0352	0.0040
Dureza (MFE)	<b>-0.0927</b>	<b>0.4835</b>	<b>0.2730</b>	<b>0.5577</b>	-0.0092	-0.0272	<b>0.2305</b>	<b>-0.2550</b>	-0.0540	<b>0.4831</b>	0.1294
Contenido de carbono	<b>0.3561</b>	<b>-0.2659</b>	-0.0113	<b>0.5872</b>	-0.0393	-0.0564	<b>-0.2716</b>	<b>0.1592</b>	<b>0.3832</b>	0.0369	<b>-0.4534</b>
Contenido de nitrógeno	<b>0.5040</b>	<b>-0.2946</b>	0.0625	<b>0.1806</b>	-0.0165	-0.0719	<b>-0.1342</b>	0.0347	<b>-0.1800</b>	0.0042	<b>0.7520</b>
Longitud de pecíolo	<b>-0.3704</b>	<b>-0.1678</b>	<b>0.4414</b>	<b>-0.1428</b>	<b>-0.0827</b>	<b>0.0966</b>	<b>-0.0953</b>	<b>0.4068</b>	<b>0.5322</b>	<b>0.2615</b>	<b>0.2777</b>
Área foliar	<b>0.3841</b>	<b>-0.1070</b>	<b>0.3901</b>	<b>-0.3164</b>	0.0455	<b>-0.1170</b>	<b>0.1920</b>	<b>0.2996</b>	<b>-0.3780</b>	<b>0.4346</b>	<b>-0.3385</b>
Índice de disección	<b>-0.3690</b>	<b>-0.0829</b>	<b>0.3546</b>	<b>0.3416</b>	<b>-0.1169</b>	<b>0.1124</b>	<b>-0.2376</b>	<b>0.2802</b>	<b>-0.5639</b>	<b>-0.3597</b>	-0.0767
ESTADIO REPRODUCTIVO	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11
Valor propio	3.0157	1.7715	1.1978	1.0080	0.8845	0.8447	0.7072	0.6108	0.4804	0.2496	0.2299
% varianza	27.4151	16.1045	10.8893	9.1634	8.0413	7.6790	6.4291	5.5524	4.3669	2.2690	2.0902
% acumulado	27.4151	43.5195	54.4089	63.5722	71.6135	79.2925	85.7216	91.2740	95.6409	97.9098	100
Atributos											
Número de nectarios extraforales	0.0117	<b>-0.0935</b>	<b>0.6191</b>	<b>0.3555</b>	<b>0.5367</b>	<b>-0.2638</b>	<b>0.3407</b>	-0.0034	0.0178	0.0579	0.0635
Azúcar en néctar extrafloral	<b>-0.0624</b>	<b>0.2180</b>	<b>0.5176</b>	<b>0.1966</b>	<b>-0.4391</b>	<b>0.6546</b>	<b>0.1157</b>	-0.0253	0.0370	0.0455	-0.0577
Densidad de tricomas	<b>-0.4548</b>	<b>0.0713</b>	0.0626	<b>-0.0883</b>	<b>-0.1198</b>	<b>-0.1727</b>	-0.0729	<b>0.2711</b>	<b>0.6821</b>	<b>0.2564</b>	<b>0.3498</b>
Contenido de clorofila	<b>-0.0846</b>	<b>0.4887</b>	<b>-0.3274</b>	<b>-0.0930</b>	<b>0.1251</b>	<b>0.0890</b>	<b>0.6886</b>	<b>-0.2644</b>	<b>0.1075</b>	<b>-0.1686</b>	<b>0.1749</b>
Contenido de agua	<b>0.4229</b>	<b>0.1116</b>	<b>0.1617</b>	<b>-0.2871</b>	0.0211	0.0404	0.0627	<b>0.6378</b>	0.0475	<b>-0.4811</b>	<b>0.2315</b>
Dureza (MFE)	<b>-0.1948</b>	<b>-0.0838</b>	<b>-0.4173</b>	<b>0.5715</b>	<b>0.2913</b>	<b>0.3870</b>	-0.0078	<b>0.4656</b>	-0.0499	-0.0084	0.0145
Contenido de carbono	<b>0.1222</b>	<b>0.5197</b>	0.0266	<b>0.3878</b>	<b>0.1004</b>	<b>-0.1196</b>	<b>-0.5433</b>	<b>-0.2720</b>	<b>0.1733</b>	<b>-0.3487</b>	0.1368
Contenido de nitrógeno	<b>0.2650</b>	<b>0.5760</b>	-0.0205	-0.0523	<b>0.0941</b>	<b>-0.1049</b>	-0.0509	<b>0.2886</b>	<b>-0.1615</b>	<b>0.6509</b>	<b>-0.1984</b>
Longitud de pecíolo	<b>0.4555</b>	<b>-0.1626</b>	<b>-0.1131</b>	0.0624	<b>0.0882</b>	<b>0.1239</b>	0.0898	-0.0846	<b>0.6769</b>	0.0265	<b>-0.5022</b>
Área foliar	<b>0.4719</b>	<b>-0.2198</b>	<b>-0.0895</b>	0.0407	0.0617	<b>0.2523</b>	-0.0496	<b>-0.2333</b>	0.0295	<b>0.3507</b>	<b>0.6864</b>
Índice de disección	<b>0.2231</b>	-0.0604	<b>-0.1249</b>	<b>0.5007</b>	<b>-0.6110</b>	<b>-0.4565</b>	<b>0.2808</b>	<b>0.1158</b>	-0.0406	-0.0050	0.0680

Tabla 2. Análisis de Componentes Principales de la varianza genotípica explicado por distintas combinaciones de los atributos de las hojas de *Turnera velutina* (Valores promedio de los atributos en 24 familias). Los números en negritas denotan valores estadísticamente significativos de las cargas ( $P < 0.05$ ).

ESTADIO JUVENIL	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11
Eigenvalor	3.0107	2.1089	1.5390	1.2373	0.9354	0.7339	0.6087	0.4100	0.2694	0.1078	0.0388
% varianza	27.3704	19.1720	13.9906	11.2478	8.5039	6.6717	5.5340	3.7275	2.4495	0.9798	0.3529
% acumulado	27.3704	46.5424	60.5330	71.7808	80.2846	86.9563	92.4903	96.2178	98.6673	99.6471	100
ATRIBUTOS											
Número de nectarios extraflorales	<b>0.2657</b>	0.2272	-0.0945	<b>-0.3380</b>	-0.3198	<b>0.6682</b>	0.3720	0.0746	-0.2106	-0.1270	0.0382
Azúcar en néctar extrafloral	<b>0.3804</b>	0.2230	0.1655	<b>-0.3807</b>	0.1847	-0.0036	-0.3091	0.3759	0.5720	-0.0831	-0.1679
Densidad de tricomas	0.0803	-0.1715	<b>-0.5342</b>	<b>0.5165</b>	0.1462	0.2936	0.0738	0.1001	0.4162	-0.3305	0.0809
Contenido de clorofila	<b>0.5097</b>	-0.0385	-0.0557	0.1458	-0.1418	0.1136	-0.1494	-0.4674	0.1980	0.6131	0.1593
Contenido de agua	<b>-0.3685</b>	-0.0487	0.0185	-0.1846	<b>0.5464</b>	<b>0.5129</b>	-0.3133	-0.0092	-0.0702	0.2341	0.3284
Dureza (MFE)	<b>0.2689</b>	0.1418	<b>0.4093</b>	<b>0.5134</b>	-0.0835	0.0858	-0.2497	0.4291	-0.3081	-0.0581	0.3425
Contenido de carbono	0.0987	<b>-0.5663</b>	0.1301	-0.0237	0.1462	0.0088	<b>0.4722</b>	0.4751	0.0354	0.4180	-0.0775
Contenido de nitrógeno	<b>0.3125</b>	<b>-0.4606</b>	0.2139	-0.2644	0.1426	-0.1277	0.0630	-0.2936	-0.0168	-0.4752	0.4708
Longitud de pecíolo	0.0967	<b>0.5094</b>	-0.2542	-0.0509	0.3379	-0.3587	0.4184	0.0935	-0.0126	0.1414	0.4660
Área foliar	<b>0.4392</b>	-0.0250	-0.2488	0.0241	<b>0.4938</b>	-0.0286	-0.1250	-0.0570	-0.5249	-0.0634	-0.4483
Índice de disección	-0.0278	0.2289	<b>0.5641</b>	0.2855	0.3418	0.1952	0.4003	-0.3413	0.1975	-0.0953	-0.2597
ESTADIO REPRODUCTIVO											
Eigenvalor	3.7146	2.2931	1.3981	1.0370	0.8479	0.5690	0.4394	0.3256	0.2797	0.0601	0.0356
% varianza	33.7688	20.8464	12.7097	9.4273	7.7081	5.1727	3.9948	2.9597	2.5429	0.5461	0.3234
% acumulado	33.7688	54.6153	67.3250	76.7523	84.4604	89.6331	93.6279	96.5876	99.1305	99.6766	100
ATRIBUTOS											
Número de nectarios extraflorales	0.0762	<b>-0.3984</b>	-0.2361	<b>0.4333</b>	<b>0.4798</b>	-0.3237	-0.2976	0.3786	-0.0291	0.1312	0.0844
Azúcar en néctar extrafloral	<b>0.3523</b>	-0.0552	<b>0.4141</b>	-0.0359	0.2441	0.1653	<b>-0.5657</b>	-0.3591	0.3834	-0.1144	-0.0630
Densidad de tricomas	<b>-0.3660</b>	-0.0148	<b>0.3549</b>	-0.2473	<b>0.4851</b>	0.1280	0.2450	0.0393	0.1503	0.5774	0.0976
Contenido de clorofila	0.0491	<b>0.5736</b>	0.1186	0.1452	-0.1370	0.0143	-0.1349	<b>0.6254</b>	0.3842	0.0986	-0.2184
Contenido de agua	<b>0.4276</b>	-0.0498	0.1595	-0.0267	-0.0814	<b>-0.6031</b>	0.3119	-0.1795	0.0475	0.3042	-0.4402
Dureza (MFE)	<b>-0.2478</b>	0.0068	0.0637	<b>0.7948</b>	-0.1130	0.1339	0.2420	-0.3568	0.2842	0.0636	-0.0375
Contenido de carbono	<b>0.3449</b>	<b>0.2830</b>	-0.0225	0.2120	<b>0.3798</b>	0.4451	0.1234	-0.0215	-0.5397	0.0565	-0.3210
Contenido de nitrógeno	<b>0.3413</b>	<b>0.4579</b>	-0.0223	0.0900	0.1255	-0.2292	0.1256	-0.1472	-0.0088	0.0588	0.7456
Longitud de pecíolo	<b>0.3631</b>	<b>-0.3239</b>	0.0225	-0.0560	0.1424	0.2598	<b>0.5578</b>	0.2790	0.3785	-0.3627	0.0902
Área foliar	<b>0.3193</b>	<b>-0.3294</b>	0.1827	0.0991	<b>-0.5055</b>	0.3226	-0.1106	0.1759	-0.1518	0.5102	0.2452
Índice de disección	0.1425	0.0563	<b>-0.7539</b>	-0.1741	0.0307	0.2178	-0.0546	-0.2111	0.3759	0.3625	-0.0962

Tabla 3. Matrices de correlación para los 11 atributos evaluados en las hojas de *Turnera velutina*. Sobre la diagonal los valores correspondientes al estadio Reproductivo y por debajo de ésta los valores para el estadio Juvenil. Los números en negrita denotan valores estadísticamente significativos en la correlación con \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

<b>CORRELACIONES FENOTÍPICAS</b>											
Atributo	Número de nectarios extraflorales	Azúcar	Tricomas	Clorofila	Agua	Dureza (MFE)	Carbono	Nitrógeno	Longitud de pecíolo	Área foliar	Índice de disección
Número de nectarios extraflorales	1	<b>0.0897*</b>	-0.0350	<b>-0.1530**</b>	0.0250	-0.0487	0.0193	-0.0597	0.0165	<b>-0.0218***</b>	-0.0157
Azúcar en néctar extrafloral	0.0350	1	<b>0.0858*</b>	0.0420	0.0085	-0.0492	<b>0.1229**</b>	0.0534	<b>-0.1444***</b>	<b>-0.1107**</b>	-0.0392
Densidad de tricomas	<b>0.1884***</b>	0.0610	1	<b>0.0944*</b>	<b>-0.4306***</b>	<b>0.1489**</b>	<b>-0.0993*</b>	<b>-0.2591***</b>	<b>-0.5224***</b>	<b>-0.6775***</b>	<b>-0.2396***</b>
Contenido de clorofila	<b>0.1966***</b>	0.0736	0.0755	1	<b>-0.0828*</b>	0.0679	<b>0.1826***</b>	<b>0.3315***</b>	<b>-0.1283**</b>	<b>-0.2256***</b>	<b>-0.0902*</b>
Contenido de agua	-0.0652	-0.0230	<b>-0.1887***</b>	<b>-0.1424***</b>	1	<b>-0.3109***</b>	0.0724	<b>0.4790***</b>	<b>0.4713***</b>	<b>0.4410***</b>	<b>0.1373**</b>
Dureza (MFE)	-0.0150	<b>0.1091**</b>	<b>0.1800***</b>	<b>0.1797***</b>	<b>-0.1153**</b>	1	-0.0294	<b>-0.1870***</b>	<b>-0.1303**</b>	<b>-0.1433***</b>	-0.0453
Contenido de carbono	<b>0.1031**</b>	-0.0209	0.0422	<b>0.1242**</b>	0.0588	-0.0280	1	<b>0.5212***</b>	0.0521	0.0160	<b>0.0823*</b>
Contenido de nitrógeno	<b>0.2188***</b>	0.0076	0.0195	<b>0.2862***</b>	0.0158	<b>-0.2176***</b>	<b>0.6527***</b>	1	<b>0.1505***</b>	<b>0.1197**</b>	<b>0.0924*</b>
Longitud de pecíolo	<b>-0.1241**</b>	-0.0173	<b>-0.3656***</b>	-0.0394	<b>0.0819*</b>	0.0250	<b>-0.2491***</b>	<b>-0.4100***</b>	1	<b>0.6991***</b>	<b>0.2676***</b>
Área foliar	<b>0.1827***</b>	<b>0.1112**</b>	0.0281	<b>0.4461***</b>	-0.0625	<b>-0.1226**</b>	<b>0.1665***</b>	<b>0.5219***</b>	<b>-0.0949*</b>	1	<b>0.2277***</b>
Índice de disección	<b>-0.1370***</b>	-0.0299	<b>-0.2791***</b>	<b>-0.1091**</b>	0.0774	<b>0.2161***</b>	<b>-0.1447***</b>	<b>-0.3060***</b>	<b>0.4636***</b>	-0.2598	1
<b>CORRELACIONES GENOTÍPICAS</b>											
Atributo	Número de nectarios extraflorales	Azúcar	Tricomas	Clorofila	Agua	Dureza (MFE)	Carbono	Nitrógeno	Longitud de pecíolo	Área foliar	Índice de disección
Número de nectarios extraflorales	1	0.0916	-0.1681	<b>-0.4507*</b>	0.1176	0.1116	-0.0007	-0.2125	0.3319	0.1526	0.1124
Azúcar en néctar extrafloral	0.3991	1	-0.2035	0.0294	<b>0.5331**</b>	-0.3169	<b>0.4294*</b>	0.3599	<b>0.4568*</b>	<b>0.4739*</b>	-0.1476
Densidad de tricomas	-0.0553	-0.2754	1	-0.1076	<b>-0.5287**</b>	0.1632	-0.3642	<b>-0.4630*</b>	-0.3123	<b>-0.5396**</b>	<b>-0.4771*</b>
Contenido de clorofila	0.3670	<b>0.4381*</b>	0.2560	1	-0.0053	0.0524	0.3561	<b>0.6143**</b>	-0.3173	-0.2414	-0.0495
Contenido de agua	-0.2255	-0.2178	-0.0489	<b>-0.5821**</b>	1	-0.3807	0.3426	<b>0.5674**</b>	<b>0.5783**</b>	<b>0.4850*</b>	-0.0023
Dureza (MFE)	0.0513	0.2863	-0.0126	0.3993	-0.3742	1	-0.1694	-0.2353	-0.3217	-0.1706	-0.2771
Contenido de carbono	-0.1272	-0.0971	0.1580	0.0583	-0.0471	-0.0283	1	<b>0.7382***</b>	0.3224	0.1448	0.2136
Contenido de nitrógeno	0.0168	0.2867	-0.1034	<b>0.4425*</b>	-0.2246	0.0122	<b>0.6501***</b>	1	0.1132	-0.0393	0.2268
Longitud de pecíolo	0.1997	0.2982	0.0022	0.0005	-0.1879	-0.0516	<b>-0.4418*</b>	-0.3861	1	<b>0.6244**</b>	0.1716
Área foliar	0.2036	<b>0.4393*</b>	0.3305	<b>0.6211**</b>	-0.2289	0.2133	0.1235	<b>0.4157*</b>	0.3192	1	-0.0722
Índice de disección	-0.0506	0.0486	-0.2533	-0.0555	0.1219	<b>0.4281*</b>	-0.0822	-0.0732	0.1378	-0.1478	1

Tabla 4. Resultados del análisis de rutas mostrando los efectos directos (ED), efectos indirectos (EI) y efectos totales (ET) de: (a) Valores de INT en estadio Juvenil, (b) Valores de INT en estadio Reproductivo y (c) Diferencia entre los INT en ambos estadios.

Variable independiente	Variable de respuesta	ED	EI	ET
a) INTJ	Flores	-0.141	--	-0.1410
	Semillas	--	-0.0017	-0.0017
	Germinación	--	-0.0002	-0.0002
Flores	Semillas	0.012	--	0.012
	Germinación	--	0.0011	0.0011
Semillas	Germinación	0.090	--	0.090
b) INTR	Flores	<b>0.448</b>	--	0.4480
	Semillas	--	0.0054	0.0054
	Germinación	--	0.0005	0.0005
Flores	Semillas	0.012	--	0.012
	Germinación	--	0.0011	0.0011
Semillas	Germinación	0.090	--	0.090
c) DINT	Flores	<b>0.546</b>	--	0.546
	Semillas	--	0.0066	0.0066
	Germinación	--	0.0006	0.0006
Flores	Semillas	0.012	--	0.0120
	Germinación	--	0.0011	0.0011
Semillas	Germinación	0.090	--	0.090