

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**ASPECTOS GENÉTICOS Y ECOFISIOLÓGICOS
DE LA EXPRESIÓN SEXUAL EN *Simarouba glauca* L, UN
ÁRBOL DIOICO DEL BOSQUE TROPICAL SECO**

**Informe del proyecto de graduación para optar por el grado
de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

Iván Villalobos Rodríguez

Cartago, 2002

HOJA DE APROBACION

Aspectos genéticos y ecofisiológicos de la expresión sexual en *Simarouba glauca* L.,
un árbol dioico del bosque tropical seco

Proyecto de graduación sometido ante la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Iván Villalobos Rodríguez para optar por el título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

MSc. Claudia Zúñiga.

Directora del Proyecto de graduación

Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

Dr. Marco Vinicio Gutiérrez.

Miembro del Tribunal

Estación Experimental Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica.

Lic. Elizabeth Arnáez

Miembro del Tribunal

Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

Iván Villalobos.

Suscrito del proyecto, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

Dedicatoria:

*A mi querido padre Jorge Villalobos Y.,
quien me ha dado la vida y me ha dado
la oportunidad de ser cada vez mejor,
de todo corazón le dedico el esfuerzo
realizado en este trabajo.*

Agradecimientos:

Esta investigación fue desarrollada gracias al aporte financiero de la Fundación A.W. Mellon (Estados Unidos) y de la Fundación Internacional de Ciencias (Suecia).

Agradecemos la colaboración del Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica por suministrar los datos climáticos, y al personal de la Estación Experimental Horizontes y del Área de Conservación Guanacaste por su apoyo logístico.

Profundo agradecimiento al Dr. Marco Vinicio Gutiérrez por motivarme a incursionar en el campo Ecofisiológico. Gracias por el apoyo y la confianza hacia mi persona, y por ser un buen amigo y una gran persona.

A Julio Vega por la ayuda desinteresada y la calidad en su trabajo. A Gabriel y a Luis Castro en el Laboratorio de Biología por hacerme sentir parte del equipo, a Gill, Fabio y Alfredo por la ayuda brindada en el trabajo de campo.

Agradecimiento a Ms. Claudia Zúñiga por su paciencia y su ayuda. Al Dr. Oscar Rocha por darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biología. Al Dr. Kennett Madríz y Aléxis por los consejos y el apoyo brindado. A Heidy Villalobos por su experiencia y su ayuda desinteresada. A Harlyn Ordóñez por la colaboración en el proyecto y al Sr. Fabio por el apoyo esencial en el análisis estadístico.

Muchas gracias a mi tía Vilma y a mi Abuela porque han sido como mis madres; a mi padre, a mis hermanas Marcela y Rocío y a mi hermano Andrés porque han estado conmigo en los malos momentos. Gracias a Jessica Con por la motivación y el cariño que me brindó durante el proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

HOJA DE APROBACION.....	2
DEDICATORIA:	3
AGRADECIMIENTOS:	4
TABLA DE CONTENIDO	5
INDICE DE CUADROS	8
INDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
Justificación	14
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
REVISION DE LITERATURA	17
ACEITUNO (<i>Simarouba glauca</i> DC).	17
JUVENILIDAD Y MADUREZ PARA FLORECER	18
DIOICISMO Y DIMORFISMO SEXUAL	20
Conceptos generales	20
Antecedentes.....	21
Dioicismo en bosques tropicales y templados	22
Evolución de las especies dioicas	22
Significado del dimorfismo sexual	23
Dimorfismo sexual	23
Costo reproductivo	24
Proporción relativa de los sexos	25
Adaptaciones según el costo de la reproducción.....	26

Diferenciación fisiológica de los sexos	26
Diferenciación morfológica de los sexos.....	28
Preferencias por micrositos según el sexo	28
ASPECTOS GENÉTICOS DEL DIOICISMO	29
Bases genéticas del dioicismo	29
Marcadores moleculares	30
MATERIALES Y MÉTODOS	33
SITIO DE ESTUDIO.....	33
MATERIAL VEGETAL.....	34
VARIABLES MORFOLÓGICAS.....	34
VARIABLES FISIOLÓGICAS.....	36
Potencial hídrico	36
Conductividad estomática.....	37
Concentración foliar de nitrógeno y fósforo	38
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
MARCADORES MOLECULARES	39
Recolección de las muestras	39
Extracción del material genético	39
Protocolo de extracción de ADN	39
Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN	40
Selección de los marcadores moleculares	41
Optimización de la reacción de amplificación.....	41
Electroforesis	43
RESULTADOS	44
CONDICIONES AMBIENTALES	44
VARIABLES MORFOLÓGICAS.....	44
VARIABLES FISIOLÓGICAS.....	46
Potencial hídrico	46
Conductividad estomática.....	47
Contenido foliar de nitrógeno y fósforo.....	50
MARCADORES MOLECULARES	52
Extracción del ADN.....	52

Programa de amplificación	53
Electroforesis del producto de amplificación.....	54
DISCUSIÓN	58
CONDICIONES AMBIENTALES	58
VARIABLES MORFOLÓGICAS.....	58
VARIABLES FISIOLÓGICAS.....	60
Potencial hídrico	60
Conductividad estomática.....	62
EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN.....	64
MARCADORES MOLECULARES	65
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	69

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de los imprimadores examinados como marcadores del sexo en <i>simarouba glauca</i>.	41
Cuadro 2. Mezcla de reactivos para la optimización de la temperatura de hibridación.....	42
Cuadro 3. Programa de amplificación para evaluar y optimizar la temperatura de hibridación.....	42
Cuadro 4. Análisis de varianza (glm) para las diferentes características morfológicas de los troncos y las hojas de árboles hembra, macho y juveniles de <i>simarouba glauca</i>, en una plantación forestal de 10 años de edad ubicada en la hacienda horizontes, area de conservación guanacaste. (letras diferentes dentro de cada variable representan diferencias significativas).....	45
Cuadro 4. Análisis de varianza (glm) para las diferentes características morfológicas de los troncos y las hojas de árboles hembra, macho y juveniles de <i>simarouba glauca</i>, en una plantación forestal de 10 años de edad ubicada en la hacienda horizontes, area de conservación guanacaste. (letras diferentes dentro de cada variable representan diferencias significativas).....	46
Cuadro 5. Análisis de covarianza (mixed procedure) del potencial hídrico y la conductividad estomática para las diferentes interacciones en estudio.....	47
Cuadro 6. Mezcla de reactivos para la amplificación del dec1 y del dec2.	53
Cuadro 7. Programa de amplificación para los imprimadores dec 1 y dec 2.	54

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Condiciones ambientales predominantes durante el periodo de estudio en las cercanías de la estación experimental forestal horizontes, guanacaste.45**
- Figura 2. Potencial hídrico (Ψ_w) de individuos hembras, machos y juveniles de *simarouba glauca* medidos en la madrugada (am) y a medio día (pm) durante la fase vegetativa y la fase reproductiva. Cada valor representa el promedio de 10 muestras \pm Isd.48**
- Figura 3. Ciclos diurnos de conductividad estomática (g_s) de individuos hembras, machos y juveniles de *simarouba glauca* en la época vegetativa y reproductiva. Cada valor representa el promedio de 10 muestras \pm Isd.....49**
- Figura 4. Conductividad estomática (g_s) de individuos hembras, machos y juveniles de *simarouba glauca* medida a lo largo del día durante la fase vegetativa y la fase reproductiva. Cada valor representa el promedio de 15 mediciones \pm Isd51**
- Figura 5. Electroforesis del adn total de individuos hembras y machos de *simarouba glauca*. Condiciones generales: gel al 2% de agarosa, amortiguador tbe 1x, 100v.....52**
- Figura 6. Electroforesis del producto de amplificación para individuos hembras y machos de s. *Glauca*, utilizando el imprimador dec1. El pozo 1 contiene el marcador de peso molecular 100 pb, el pozo 2 (h) contiene una muestra compuesta de hembras y el pozo 3 (m) contiene una muestra compuesta de machos. Del pozo 4 al pozo 11 individuos hembras, del pozo 12 al pozo 19 individuos machos, pozo 20 control negativo. Condiciones generales: gel al 2% de agarosa, amortiguador tbe 1x, 75v.....55**
- Figura 7. Electroforesis del producto de amplificación para individuos hembras y machos de *simarouba glauca*, utilizando el imprimador dec2. El pozo 1 contiene el marcador de peso molecular 100 pb, el pozo 2 (h) contiene una muestra compuesta de hembras y el pozo 3 (m) contiene una muestra compuesta de machos. Del pozo 4 al pozo 11 individuos hembras, del pozo 12 al pozo 19 individuos machos, pozo 20 control negativo. Condiciones generales: gel al 2% de agarosa, amortiguador tbe 1x, 75v.....56**

Figura 8. Electroforesis del producto de amplificación para individuos hembras y machos de *simarouba glauca*, utilizando el imprimador dec2. Pozos 1, 2 y 3 corresponden a hembras, pozos 4, 5 y 6 corresponden a machos. Condiciones generales: gel de poliacrilamida (5%), 55 wats constantes durante 1 hora. Se tiñó con nitrato de plata (1g/ml).....57

RESUMEN

Aspectos genéticos y ecofisiológicos de la expresión sexual en *Simarouba glauca* L., un árbol dioico del bosque tropical seco.

Villalobos Rodríguez, Iván.

Se estudiaron las características morfológicas y fisiológicas de individuos adultos (hembras y machos) y juveniles de *Simarouba glauca*, un árbol dioico del bosque tropical seco de Costa Rica, y se examinaron marcadores moleculares mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con el objetivo de diferenciar el sexo de los individuos en ausencia de eventos reproductivos. Las características morfológicas evaluadas fueron la altura, el diámetro, la densidad aparente y real del tronco; y el área, el peso y el grosor de las hojas. El estudio fisiológico involucró la medición del potencial hídrico de las hojas a diferentes hora del día y en etapas fenológicas diferentes, de ciclos diurnos de conductividad estomática obtenidos durante las fases vegetativa y reproductiva, y el análisis foliar de nitrógeno y de fósforo. Los resultados se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS. No se encontraron diferencias significativas en la morfología ni en el comportamiento fisiológico de individuos hembras, machos y juveniles, con la excepción de la altura y el diámetro de los troncos y del peso y el área foliar, que fueron significativamente menores y mayores respectivamente en los árboles juveniles. Estos resultados, que abarcan aspectos morfológicos y fisiológicos analizados de manera integral, indican que el costo reproductivo de hembras y machos de *S. glauca* posiblemente no difiere. Sin embargo, es probablemente necesario extender las observaciones por periodos de tiempo mayores, debido a que la diferenciación sexual ocurre con frecuencia a lo largo del ciclo de vida de los árboles, por lo que eventuales diferencias entre los sexos pueden expresarse solo cuando éstos han alcanzado edades superiores a las consideradas en este estudio. La utilización de marcadores moleculares empleados exitosamente para diferenciar el sexo de individuos de *Silene latifolia* y aplicados al estudio de la expresión sexual de *S. glauca* no permitió diferenciar individuos hembras y machos. Esto se debió posiblemente a que las regiones de amplificación de los imprimadores en *S. glauca* no son las mismas que en *S. latifolia*, o a que las regiones de amplificación examinadas se encontraban presentes tanto en individuos hembras como machos. No se descarta que la expresión sexual en *S. glauca* puede depender de factores ambientales que controlan la activación y la represión selectiva de genes involucrados en la reproducción. Se recomienda el uso de otros marcadores moleculares para la determinación del sexo en árboles tropicales, y extender estas observaciones a árboles adultos creciendo en su ambiente natural durante periodos más largos.

Palabras clave: árboles tropicales, bosque tropical seco, conductividad estomática, dimorfismo sexual, dioicismo, expresión sexual, imprimadores, marcadores moleculares ligados al sexo, PCR, potencial hídrico, *Simarouba glauca*.

ABSTRACT

Genetic and eco-physiological aspects of sex expression in *Simarouba glauca* L., a dioecious tropical dry forest tree.

Villalobos Rodríguez, Iván¹

I studied the morphological and physiological characteristics of adult (male and female) and juvenile *Simarouba glauca* trees, a dioecious species of the dry forest of Costa Rica. I also examined the use of sex-linked molecular markers to differentiate the sex of trees in the absence of reproductive events, using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The morphological features evaluated were tree height and diameter, wood density, and leaf area, weight and thickness. Physiological observations included the measurement of leaf nitrogen and phosphorus content, leaf water potential (Ψ_w), and diurnal and seasonal courses of stomatal conductance (g_s) measured at different times of the day and during the vegetative (wet) and reproductive (dry) seasons. The results were analyzed using SAS statistical analysis systems for observations repeated in time. No statistically-significant differences were found in the morphology and in the physiological behavior of adult male, female and juvenile trees, with the exception of tree height and diameter which were significantly lower in juvenile than in adult individuals, and of leaf area and weight which were greater in juvenile than in adult trees. These results, which include morphological and physiological traits considered from a whole-plant perspective, suggest that the reproductive cost of male and female *S. glauca* trees does not differ. However, it is necessary to extend these observations for longer periods because sexual differentiation and dimorphism frequently occur throughout the life cycle of the trees, and differences between the sexes may appear only after the trees have reached older ages than those evaluated in this study. The use of sex-linked molecular markers successfully employed to identify the sex of *Silene latifolia* plants and applied to the study of sex expression in *S. glauca* did not allow the identification of male and female plants in this species. This was probably due to the amplification of different regions in *S. glauca* as compared to *S. latifolia*, or to the presence of the amplified regions in both male and female *S. glauca* trees. It is also possible that sex expression in *S. glauca* depends on environmental factors that trigger the selective activation and repression of genes involved in reproduction. It seems important to test the use of other molecular markers to differentiate the sex of dioecious tropical plants, and to extend these observations to older trees growing in their natural forest environment.

Keywords: Tropical trees, dioecy, dry forest, PCR, primers, sex expression, sex-linked molecular markers, sexual dimorphism, *Simarouba glauca*, stomatal conductance, water potential.

INTRODUCCIÓN

A pesar de su pequeño tamaño, Costa Rica posee una flora altamente diversa estimada en 10 000 especies, dentro de las cuales 1 500 son árboles (Jiménez y Poveda, 1996). Sin embargo, los bosques están siendo destruidos indiscriminadamente y han sido precisamente los árboles los que han sufrido los mayores efectos, a pesar de la gran importancia ecológica y económica que tienen estos en nuestro país (Jiménez, 1993).

El bosque tropical seco es el hábitat más dañado del que fue alguna vez el más extendido de toda Mesoamérica, ya que solamente un 0.08 % de los originales 550000 km² se conservan en la actualidad (Janzen, 1986) y parte de ese porcentaje se encuentra en el Área de Conservación Guanacaste. Por lo tanto, es de interés documentar y conservar la biodiversidad que se encuentran en dichos bosques, y comprender las complejas interacciones y comportamientos que presentan las especies dentro de ese ecosistema.

Dentro del bosque seco existe un grupo particular de especies cuyo mecanismo de reproducción es dioico; es decir, algunos de sus individuos producen flores estaminadas mientras que otros producen flores pistiladas (Sakai y Sèller, 1999). La incidencia es cercana al 22 % para un bosque tropical semideciduo, con valores más altos para bosques lluviosos y más bajos para bosques templados (Bawa y Opler, 1975). En nuestro país el estudio de plantas dioicas es aún incipiente, con algunas investigaciones en el bosque tropical lluvioso (Nicotra, 1998; Bawa *et al.*, 1983; Villalobos, 2000) y otras en el bosque tropical seco (Bawa y Opler, 1975, 1977, 1978).

Una de las especies dioicas presentes en el bosque seco de nuestro país es el aceituno (*Simarouba glauca*). Este es un árbol siempre verde (Holdridge *et al.*, 1997), por lo que mantiene su follaje a lo largo del año y en constante renovación. Su

presencia y función es de gran trascendencia en el mantenimiento del equilibrio en el bosque seco, ya sea como recurso alimenticio para herbívoros, sombra para mamíferos en la época de verano y nicho ecológico para insectos, entre otros. En este sentido, el aceituno provee un excelente modelo para estudiar aspectos fundamentales del dioicismo en plantas tropicales, específicamente de una especie perenne.

La comprensión de la naturaleza genética y fisiológica y de las consecuencias ecológicas del dioicismo requiere la integración de aspectos ecológicos, genéticos y fisiológicos a varios niveles de observación (Delph, 1999). Esto incluye la utilización de herramientas como los marcadores moleculares ligados al sexo.

La utilización de técnicas moleculares con fines ecológicos es aún incipiente en el mundo, siendo los mayores esfuerzos dirigidos al estudio de la diversidad genética de las poblaciones (Graltapaglia, 1997). La identificación de marcadores moleculares ligados al sexo es un campo casi inexplorado para árboles, con la excepción de un estudio realizado por Villalobos (2000) en *Hyeronima alchornooides* (pilón), una especie del bosque tropical lluvioso.

Justificación

Las plantas dioicas proveen una excelente oportunidad para el estudio de la evolución del sexo y del dimorfismo sexual en las plantas (Delph, 1999). De la información generada, muy poca corresponde al comportamiento del dioicismo en el trópico, y mucho menos a especies forestales siempre verdes. En este sentido, el estudio fisiológico, morfológico y genético de individuos hembras, machos y juveniles, representa la primera incursión en la investigación y la comprensión integral del comportamiento de las plantas dioicas perennes en los ecosistemas tropicales.

Los marcadores ligados al sexo examinados en *S. glauca* podrían ser utilizados en otras especies dioicas tropicales, muchas de importancia económica y otras en peligro de extinción. La identificación temprana del sexo facilitaría el estudio de individuos juveniles en el campo (Dawson y Geber, 1999). Esto es de interés porque los individuos juveniles constituyen el grupo más afectado por diferentes tipos de estrés y con la mayor mortalidad. Los marcadores moleculares también podrían utilizarse en especies de importancia agronómica en las cuales la determinación del sexo tiene valor práctico para establecer las plantaciones, como en el caso de la papaya, el mamón chino y el espárrago.

La restauración y la sucesión ecológica forestal constituyen mecanismos para la regeneración del Bosque Seco y otros ecosistemas de nuestro país (Janzen, 1986). Más aún, la determinación del sexo será una herramienta útil para establecer y distribuir adecuadamente una población de individuos dioicos con el objetivo de conservarlos y asegurar la producción de semillas.

El aceituno presenta gran potencial como árbol maderable, ya que su madera es suave y fácil de secar y de trabajar. Actualmente se utiliza en carpintería, ebanistería, y para producir tablas de plywood, instrumentos y juguetes. La corteza tiene propiedades medicinales y de la fruta se produce alcohol (Brenes *et al.*, 1996). Por ser una especie siempre verde con vistoso follaje, puede utilizarse como sombra para el ganado, en parqueos, cercas vivas y como componente de barreras rompevientos.

Objetivo general

Estudiar algunos aspectos moleculares, morfológicos y fisiológicos involucrados en la expresión sexual del dioicismo en *Simarouba glauca*.

Objetivos específicos

Evaluar algunas características morfológicas y fisiológicas de individuos hembras y machos de *S.glauca* y determinar posibles diferencias según el sexo.

Determinar si la diferenciación sexual en *S. glauca* se da antes del inicio de la etapa reproductiva mediante el estudio fisiológico y morfológico de individuos juveniles en transición al estado de madurez.

Evaluar la utilización de marcadores moleculares para determinar el sexo de individuos juveniles.

REVISION DE LITERATURA

ACEITUNO (*Simarouba glauca* DC).

Pertenece a la familia Simaroubaceae, es nativo desde México hasta Panamá y las Antillas mayores. Se puede encontrar en elevaciones bajas (de 0 m hasta 700 m), en climas secos o húmedos (Brenes *et al.*, 1996). En nuestro país, el Aceituno se distribuye en el Pacífico Central desde Quepos hasta el puerto de Puntarenas, y en el Pacífico Norte que incluye desde la Península de Nicoya hasta las faldas de la cordillera de Guanacaste (Jiménez y Poveda, 1996).

Es una especie dioica siempre verde, es decir, mantiene su follaje durante todo el año. Su tamaño es de pequeño a mediano, con una copa alta e irregular que empieza a poca altura. Sus hojas son compuestas, alternas e imparipinada, localizadas en el extremo de las ramas. El haz es verde oscuro y el envés es glauco, verde blancuzco mate con venas de color verde más oscuro y nervadura principal prominente. Las flores se presentan en panículas terminales o laterales, con color amarillo verdoso y su desarrollo se da entre enero y marzo. Los frutos son drupas, elípticas, de color claro al inicio y morados a negro al madurar, se desarrollan desde enero hasta mayo. En cada fruto se desarrolla una semilla elíptica y usualmente dispersada por pájaros (Brenes *et al.*, 1996, Holdridge *et al.*, 1997). Bawa y Opler (1978) mencionan que la polinización se lleva a cabo posiblemente por polillas o mariposas nocturnas.

Bawa y Opler (1975) han estudiado dicha especie en el bosque tropical seco de Costa Rica, encontrando una proporción semejante de individuos hembras y machos en el campo (1.08 machos/ hembras). Al considerar la cantidad de inflorescencias y de flores dentro de cada árbol encontraron diferencias según el sexo. Los machos produjeron mayor cantidad de inflorescencias (proporción machos:hembras = 3.2) y mayor cantidad de flores dentro de cada inflorescencia (proporción machos:hembras

= 3.8). Por lo tanto, por cada flor producida por los individuos hembras, los individuos machos produjeron 13.25 flores. Las flores de individuos hembras produjeron mayor cantidad de néctar que las flores de individuos machos, en una proporción de 6:1. La eficiencia reproductiva alcanzó un 18% en las hembras lo cual indica que solo 18 de 100 flores llegaron a producir frutos (Bawa y Opler, 1975)

JUVENILIDAD Y MADUREZ PARA FLORECER

La fase juvenil comprende los estados de desarrollo que ocurren desde la germinación de las semillas hasta el primer evento reproductivo, que marca el inicio de la fase adulta. El inicio de la fase adulta no coincide exactamente con el fin de la fase juvenil ya que el cambio de fase se da a lo largo de un periodo de transición, caracterizado por alteraciones permanentes en el comportamiento finalmente dan paso a la madurez para florecer (Logman, 1976; Zimmerman, 1972). Sin embargo, se considera la aparición de las primeras flores como el indicador más confiable de cambios en el estado fenológico de los árboles (Zimmerman, 1972).

La transición de la condición juvenil a la adulta normalmente ocurre a una edad y un tamaño característicos de cada especie (Robinson y Wareing, 1969; Donovan y Ehleringer, 1991). Este cambio de fase se manifiesta finalmente en los meristemas apicales del tallo, que se comportan como unidades semi- autónomas, ya que la transición a la fase adulta no está determinada únicamente por la cantidad de tejidos vegetativos diferenciados (por ejemplo, el tamaño de la planta), sino además por controles del desarrollo que registran la cantidad de divisiones celulares que los meristemas han experimentado. Por lo tanto, el tamaño de la planta está altamente correlacionado, pero no determina por sí mismo, el cambio de fase (Robinson y Wareing, 1969).

El inicio de la reproducción está determinado por la interacción de factores endógenos de las plantas con estímulos ambientales que favorecen la floración (Simpson *et al*, 1999), tales como la disponibilidad de agua y la fertilidad del suelo, el fotoperiodo y la temperatura, cuyo comportamiento estacional puede servir como una señal para la inducción y la sincronización de las actividades reproductivas (Robinson y Wareing, 1969; Bernier *et al*, 1993).

Varias teorías explican la diferenciación floral en los meristemas de los individuos reproductivos. Una de éstas es la teoría del florígeno, sustancia de naturaleza química desconocida cuya existencia ha sido demostrada a través de experimentos de injertos (Zeevart, 1958). La producción de esta sustancia depende de la expresión genética en las hojas, y es posteriormente translocada en el floema hacia los meristemas para inducir y mantener el estado reproductivo. Los estudios bioquímicos más recientes utilizando técnicas moleculares indican que el florígeno puede ser un ARN mensajero (Colasanti *et al*, 1998). Otra teoría involucra el control multifactorial, en donde algunos de los genes actúan para promover la floración, otros actúan como represores, otros perciben el ambiente o actúan en forma autónoma (Levy y Dean, 1998). En este sentido, ciertas sustancias pueden funcionar como mensajeras de la transición a la floración, como los carbohidratos, las auxinas y las citoquininas (Bernier *et al*, 1993).

El inicio de la fase reproductiva va acompañado generalmente de cambios morfológicos y fisiológicos de las estructuras vegetativas. Esto significa que muchos genes que controlan la transición a la madurez también están involucrados en las modificaciones de los órganos vegetativos (Levy y Dean, 1998). La fase adulta y la juvenil pueden diferir en la morfología de las hojas, la filotaxia, la resistencia a las enfermedades y el potencial para formar raíces adventicias, entre otras (Zimmerman, 1972).

A nivel fisiológico, Donovan y Ehleringer (1992) informan sobre diferencias en el potencial hídrico, la conductividad estomática, la tasa fotosintética y la eficiencia en el uso del agua entre individuos juveniles y adultos de 6 especies perennes. Los individuos juveniles dependieron fuertemente de la disponibilidad de agua en las capas superficiales del suelo, ya que su limitado sistema radical no permitió el acceso al agua de las capas profundas, a las que si tienen acceso los individuos adultos. El uso de gran cantidad de agua en los juveniles permite la rápida producción de biomasa y el desarrollo de raíces más profundas que les permita sobrevivir bajo situaciones de estrés hídrico y nutricional. Por su parte, los adultos mostraron mayor eficiencia en el uso del agua, los que les aseguró la disponibilidad de este recurso a lo largo del ciclo anual de crecimiento (Donovan y Ehleringer, 1992).

DIOICISMO Y DIMORFISMO SEXUAL

Conceptos generales

Una especie dioica es aquella en la que algunos de sus individuos producen flores estaminadas (machos) mientras que otros producen flores pistiladas (hembras). Las flores pistiladas presentan uno o más pistilos funcionales, pero sin estambres funcionales, mientras que las flores estaminadas presentan uno o más estambres funcionales pero sin pistilos funcionales. Las especies dioicas pueden presentar dimorfismo sexual tanto en sus caracteres sexuales primarios (estructura floral) como en sus caracteres sexuales secundarios (pubescencia, área foliar específica) (Sakai y Sèller, 1999).

Antecedentes

La mayoría de las investigaciones en plantas dioicas se han enfocado en el estudio del costo reproductivo (Doust *et al.* 1987; Agren, 1988; Delph, 1990; Cipollini y Stiles, 1991; Korpolainen, 1992; Hemborg y Karlsson, 1999; Rocheleau y Houle, 2001), la segregación espacial según el sexo (Freeman *et al.* 1976; Harrinson y Fox, 1981; Lechowicz y Zimmerman, 1982; Demo y Krischik, 1990) y en menor proporción en el estudio de las características morfológicas (Wallace y Rundel, 1979; Kohorn, 1994) y fisiológicas (Dawson y Bliss, 1989; Dawson y Ehleringer, 1993; Laporte y Delph, 1996) de los sexos.

Los limitados estudios ecofisiológicos realizados en plantas dioicas del clima templado han proveído evidencia de la existencia de dimorfismo fisiológico en especies perennes, que resultan insuficientes para hacer generalizaciones especialmente involucrando plantas tropicales. La poca disponibilidad de información morfológica y fisiológica se debe en algunos casos a las dificultades para realizar las mediciones y en otros, al poco interés en la evaluación de caracteres morfológicos simples como la altura y el tamaño de las hojas (Dawson y Geber, 1999). El significado funcional del dimorfismo sexual puede no ser evidente si se analizan separadamente las características involucradas, y si no están integradas con otros aspectos de la fisiología, la morfología, la ecología y la historia de la vida de los sexos (Dawson y Geber, 1999).

En Costa Rica, la investigación en plantas dioicas perennes en el Bosque Tropical Seco ha sido realizada en su mayoría por Bawa y Opler (1975, 1977, 1978). Estos estudios han puesto énfasis en aspectos ecológicos básicos como la fenología, la floración, la polinización y la proporción relativa de los sexos, entre otros. También destacan investigaciones realizadas en el Bosque Tropical Húmedo por Bawa *et al.* (1983), Nicotra (1998) y Villalobos (2000). Sin embargo, ninguna investigación ha

integrado los aspectos genéticos del dioicismo con el estudio de los atributos morfológicos, fenológicos, y fisiológicos de las plantas dioicas.

Dioicismo en bosques tropicales y templados

La proporción de especies dioicas en los bosques templados (10%) es generalmente menor que en los bosques tropicales (20%). Las especies monoicas se presentan más frecuentemente en las zonas templadas (Bawa y Opler, 1975). En un estudio realizado en Costa Rica, la mayoría de las especies dioicas fueron árboles, seguidos por arbustos, hierbas y finalmente por las lianas y las epifitas, en las que no se encontró dioicismo (Bawa y Opler, 1975).

La mayoría de las flores de las plantas dioicas presentan semejanzas a pesar de pertenecer a familias diferentes (Bawa y Opler, 1975). El tamaño generalmente es pequeño y con colores claros (blanco, amarillo o verde pálido). Las flores estaminadas son más pequeñas que las flores pistiladas, aunque lo contrario se observa en plantas de zonas templadas. La polinización de las especies dioicas tropicales es primordialmente entomófila, por lo que las flores pistiladas deben invertir recursos en la producción de néctar, aromas y pigmentos florales para la atracción de los insectos. En contraste, las plantas dioicas de zonas templadas muestran polinización anemófila, por lo que las flores pistiladas no realizan dicha inversión, y el costo reproductivo es mayor para las flores estaminadas, que deben producir una gran cantidad de polen (Bawa y Opler, 1975).

Evolución de las especies dioicas

Se considera que la aparición de las especies dioicas representa un mecanismo para evitar el autocruzamiento observado en las plantas hermafroditas, sobre todo en aquellas afectadas por las consecuencias de la autogamia (Bawa y Opler, 1975; Charlesworth, 1999). La evolución de los sexos requirió de al menos dos cambios

genéticos importantes: esterilidad masculina para producir plantas femeninas y esterilidad femenina para producir plantas masculinas. Esta teoría reúne los principales argumentos para explicar las ventajas evolutivas del dioicismo, aunque puede no ser el único mecanismo que conllevó a la aparición de dichas plantas (Charlesworth, 1999; Web, 1999).

Significado del dimorfismo sexual

El dimorfismo sexual puede ser el resultado de diferencias en los requerimientos de recursos entre plantas hembras y machos, que conduce a especializaciones morfológicas, fisiológicas y ecológicas (Darwin, 1877; Dawson y Ehleringer, 1993). Si el costo asociado a la diferenciación sexual difiere entre hembras y machos, el sexo con el mayor costo reproductivo podría estar bajo presión selectiva para desplegar rasgos morfológicos y fisiológicos que permitan mayor eficiencia en la captación y utilización de los recursos (Kohorn, 1994). Estas diferencias pueden resultar también en el uso preferencial de diferentes micrositios por parte de individuos hembras y machos (Dawson y Bliss, 1989).

Dimorfismo sexual

La causa última del dimorfismo sexual en las plantas dioicas es la reproducción, que resulta en diferencias en el patrón de la selección natural o sexual sobre las características secundarias (Dawson y Geber, 1999). Si esto se cumple, podemos esperar ausencia de dimorfismo sexual en aquellas especies dioicas cuyos sexos tienen igual costo reproductivo (Delph, 1999).

Dentro de las poblaciones de cada sexo existe una presión de selección para aumentar el aporte genético de sus individuos a las próximas generaciones. Esto se ve reflejado en cambios morfológicos y fisiológicos que maximizan la reproducción, y

que a su vez, pueden determinar diferencias en el costo reproductivo según el sexo (Dawson y Geber, 1999).

Costo reproductivo

En la mayoría de las especies dioicas, las hembras presentan un costo reproductivo mayor que los machos; en unos pocos casos los sexos no difieren en su costo reproductivo y en ningún caso el costo reproductivo es superior en los machos que en las hembras. Las hembras inician su fase reproductiva a mayor edad y con mayor tamaño que los machos, mientras que los machos florecen más frecuentemente que las hembras, tienen mayor crecimiento vegetativo y son más longevos (Delph, 1999)

Una gran cantidad de estudios mencionan que los individuos machos tienen mayor costo reproductivo en términos de biomasa asignada a la floración. Sin embargo, al considerar la fructificación, las hembras presentan un costo reproductivo significativamente mayor que los machos (Delph, 1990; Korpolainen, 1992; Agren, 1998; Obeso *et al.* 1998; Rocheleau y Houle, 2001). Considerando el costo de reproducción en términos de nutrientes, los requerimientos de las hembras pueden ser superiores que los de los machos en cuanto a contenido de nitrógeno y fósforo (Agren, 1998), calcio y magnesio (Rocheleau y Houle, 2001) o puede no haber diferencias (Hemborg y Karlsson, 1999).

La selección por mayor número o tamaño de las inflorescencias en machos puede significar que, durante la floración, los machos experimenten mayor costo reproductivo que las hembras (Dawson y Geber, 1999). Las hembras, sin embargo, no solo producen flores sino que también deben invertir recursos en el desarrollo del embrión, de las reservas de las semillas y de las estructuras de dispersión (Rocheleau y Houle, 2001).

Algunos investigadores consideran el costo reproductivo como el esfuerzo realizado por toda la planta, por lo que evalúan la biomasa y la composición de diferentes órganos. La teoría predice que aquel sexo que transloca más recursos a la reproducción, mostrará menor translocación para otras funciones tales como el crecimiento vegetativo y la defensa (Laporte y Delph, 1996). Hemborg y Karlsson (1999) encontraron que las raíces de individuos hembras contenían mayores reservas de nitrógeno que los machos, pero que los machos contenían mayor cantidad de fósforo que las hembras.

El crecimiento de los individuos también está correlacionado con el costo reproductivo. Los machos suelen presentar tasas de crecimiento mayores que las hembras (Obeso *et al.*, 1998; Delph, 1999; Rocheleau y Houle, 2001) aunque lo contrario puede también presentarse (Korpolainen, 1992). Por lo tanto, el efecto del costo reproductivo sobre el crecimiento dependerá de las adaptaciones morfológicas y fisiológicas de cada sexo.

Proporción relativa de los sexos

El costo reproductivo también puede determinar la proporción relativa de individuos hembras y machos en una población (Nicotra, 1998). Cuando el costo de la reproducción es igual en hembras y machos, la proporción de estos debe ser 1:1 (Cipollini y Stiles, 1991). La abundancia de los machos generalmente es superior a la de las hembras (Delph, 1999). La dominancia de machos en una población puede ser el resultado de mayor habilidad competitiva y de mayor propensión a la floración derivada de un menor costo reproductivo con respecto a las hembras (Cipollini y Stiles, 1991; Agren, 1998). También puede ser el resultado de una mayor mortalidad por parte de los individuos hembras (Demo y Krischik, 1990; Obeso *et al.*, 1998).

Adaptaciones según el costo de la reproducción

Si los individuos no han desarrollado mecanismos de adaptación según el sexo y si las hembras presentan mayor costo de reproducción, es de esperar que los machos tengan mejor desempeño en cualquier ambiente ya que sus requerimientos energéticos son menores con respecto a las hembras. En este caso, los machos son más abundantes y muestran mayor vigor que las hembras (Dawson y Ehleringer, 1993). Sin embargo, lo común es que los individuos de diferentes sexos presenten adaptaciones fisiológicas y morfológicas para llevar a cabo sus funciones reproductivas de una manera más eficiente.

Las diferencias en los requerimientos para la reproducción según el sexo pueden causar divergencias en el comportamiento fisiológico (Kohorn, 1994; Laporte y Delph, 1996). Las características que favorecen la adquisición de recursos o el uso eficiente de los mismos generalmente conllevan al decaimiento en otras características o bien pueden ser antagónicas con otros procesos, lo que impide la maximización simultánea de varias funciones. Por ejemplo, incrementos en la adquisición de carbono implican una mayor pérdida de agua y por lo tanto, una reducción en el uso eficiente del agua. En plantas dioicas esto implica que, si las hembras han sido seleccionadas para maximizar la fijación de carbono, éstas mostrarán menos eficiencia en el uso del agua que los machos (Dawson y Geber, 1999).

Diferenciación fisiológica de los sexos

Las diferencias en el costo reproductivo según el sexo pueden causar estrés fisiológico en el género que tiene mayores requerimientos para la reproducción (Dawson y Geber, 1999). En este sentido, las hembras pueden experimentar presión de selección para minimizar el efecto negativo de tener mayor costo energético y por lo tanto, pueden exhibir mayor capacidad fisiológica que los machos (Obeso *et al.*,

1998). Por su parte los individuos machos pueden ser forzados a tener mayor éxito en el apareamiento (Dawson y Geber, 1999) y por lo tanto, producir más polen y mejorar la diseminación y la sincronización con la receptividad de las flores pistiladas, entre otras.

Las hembras pueden mostrar mayores tasas fotosintéticas necesarias para satisfacer los requerimientos energéticos asociados con la producción de frutos y el desarrollo de las semillas. Los aumentos en la tasa fotosintética han sido relacionados con mayor capacidad de carboxilación, mayor cantidad de Rubisco y con mayor densidad estomática en individuos hembras con respecto a los machos (Dawson y Ehleringer, 1993).

Otros mecanismos incluyen el desarrollo de mayor área foliar en las hembras que les permita aumentar la producción de asimilados, incremento en la eficiencia de la translocación de recursos hacia las estructuras reproductivas (Wallace y Rundel, 1979), aporte fotosintético significativo de las propias estructuras reproductivas, sobre todo de frutos verdes, a su propio crecimiento (Kohorn, 1994; Obeso *et al.*, 1998), y almacenamiento de carbohidratos y nitrógeno (Cipollini y Stiles, 1991).

Por su parte los individuos machos suelen ser más eficientes en el uso del agua pero a su vez pueden presentar menor conductividad estomática, transpiración, asimilación neta de carbono, y mayor potencial hídrico que las hembras (Dawson y Ehleringer, 1993). Una mayor sensibilidad estomática a diferentes factores ambientales en los machos puede darse por diferencias en la conductividad hidráulica, en la vulnerabilidad al embolismo y la cavitación del xilema, en la comunicación de la raíz con la parte aérea y en la rapidez de las respuestas hormonales (Dawson y Ehleringer, 1993). Dawson y Bliss (1989) también mencionan bajo potencial osmótico cerca de la máxima hidratación de los tejidos y alta capacidad de ajuste osmótico a lo largo del día, lo que faculta a los machos para mantener alta turgencia en presencia de déficit hídrico.

Diferenciación morfológica de los sexos

Las adaptaciones morfológicas más que las fisiológicas pueden explicar otros patrones de comportamiento (Harrison y Fox, 1981). Por ejemplo, las hojas de las hembras pueden presentar mayor tamaño, mayor peso específico y mayor grosor foliar, lo cual les permitiría almacenar más agua disponible en la reproducción cuando esta ocurre bajo condiciones de estrés hídrico (Wallace y Rundel, 1979). Con un tamaño más grande, las hembras pueden satisfacer las altas demandas de recursos que representa la reproducción (Korpolainen 1992).

Otra estrategia consiste en desarrollar una copa más abierta, con menos ramas que reducen el autosombreo, comparado con los machos (Wallace y Rundel, 1979). Delph (1990) se refiere a la producción más temprana de hojas al inicio de la temporada por parte de las hembras, lo cual les da la ventaja de acumular más recursos que los machos.

Los machos pueden invertir más en el desarrollo de la raíz y de las hojas que las hembras, lo cual puede explicar su ventaja con respecto a las hembras bajo condiciones de estrés hídrico. Los machos con más área foliar por planta pueden fijar más carbón y con ello explorar más rápidamente con su sistema radical otras posibles fuentes de agua (Lechowicz y Zimmerman, 1982).

Preferencias por micrositios según el sexo

Una forma de incrementar la adquisición de recursos del ambiente es la selección diferencial de micrositios según el sexo (Dawson y Geber, 1999). Si el costo reproductivo es mayor en las hembras, es de esperar que la presión de selección favorezca a los individuos con mayor tasa fotosintética, a expensas de un mayor gasto de agua que obliga a las hembras a desarrollarse en ambientes húmedos. Los

machos con menor costo reproductivo pueden colonizar nichos más austeros debido a su capacidad para tolerar o evitar el déficit hídrico (Freeman *et al.*, 1976; Dawson y Bliss, 1989; Dawson y Ehleringer, 1993).

En micrositios de fertilidad limitada, las hembras pueden ser favorecidas si incrementan la asignación de biomasa a las raíces y la absorción radical. En ambientes limitados por la radiación, las hembras pueden desarrollar un dosel que minimice el autosombreo formado por hojas con características bioquímicas que maximizan la captura de luz y la adquisición de carbono (Dawson y Geber, 1999). Los machos por su parte pueden presentar mayor asignación de recursos hacia el crecimiento vegetativo particularmente del sistema radical, lo cual puede conferir tolerancia a ambientes extremos (Hoffmann y Alliende, 1984).

La producción de semillas requiere más recursos energéticos que la producción de polen. Consecuentemente, los individuos hembras en lugares húmedos y más fértiles contribuirán más en las siguientes generaciones que aquellos que se encuentren en hábitats xéricos. De esta forma, el potencial reproductivo de las especies dioicas debe incrementarse con la segregación espacial de los sexos, gracias a la cual los machos ocupan los micrositios marginales evitando la competencia con las hembras que crecen en ambientes más favorables (Freeman *et al.*, 1976).

ASPECTOS GENÉTICOS DEL DIOICISMO

Bases genéticas del dioicismo

La expresión del sexo en las especies dioicas puede ser determinado a nivel genético o bien, puede darse como una respuesta a las condiciones ambientales. Si el sexo está determinado genéticamente, los individuos manifestarán su género bajo cualquier condición ambiental. Esto no ocurre en algunas especies dioicas como las palmas aceitera y datilera y algunas especies de *Ocotea* de los bosques nubosos,

cuya expresión sexual depende de las condiciones ambientales en que se desarrollan las plantas (Demo y Krischik, 1990), las cuales pueden cambiar en diferentes años.

Este cambio de sexo puede ocurrir como respuesta a la fertilidad del suelo, a la disponibilidad de agua y de radiación y a daños en los órganos de reserva. En general, cuando las condiciones ambientales son más limitantes, las plantas se diferenciarán como machos, mientras que condiciones adecuadas para la reproducción promueven la diferenciación de hembras (Freeman *et al.* 1980). La acción hormonal puede funcionar como señal para la expresión del sexo, y en este sentido Freeman y Vitale (1985) mencionan que las citoquininas producidas en la raíz tienen un efecto feminizante, y que su translocación a la parte aérea depende de condiciones ambientalmente favorables para el transporte ascendente del agua.

A nivel genético, las plantas dioicas pueden tener diferentes mecanismos para la determinación del sexo, tales como los cromosomas sexuales, los locus simples o múltiples, y la heterocigosis femenina. Independientemente del mecanismo involucrado, la expresión sexual es mediada generalmente por la acción de varios tipos de hormonas, las cuales pueden tener efectos diferentes según la especie. Por ejemplo, el etileno y las giberelinas están correlacionadas con la expresión femenina, y las altas concentraciones de citoquininas con la expresión sexual masculina (Grant, S. 1999).

Marcadores moleculares

Las características morfológicas se han utilizado tradicionalmente como marcadores ligados a un determinado fenotipo. Posteriormente aparecieron los marcadores moleculares, los cuales se pueden definir como cualquier fenotipo molecular específico, polimorfismo genético o cualquier secuencia de ADN que está relacionado con un fenotipo determinado (Graltapaglia, 1997). Los estudios

bioquímicos se iniciaron utilizando moléculas indicadoras del fenotipo tales como las aloenzimas y las izoenzimas. Posteriormente se utilizaron los marcadores de genéticos (O'Malley y Whetten, 1997), los cuales pueden ser clasificados en tres categorías: 1) técnicas de hibridación, que incluye los RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción); 2) PCR con imprimadores arbitrarios como los RAPD (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente) y 3) PCR con secuencias blanco como los CAPS (secuencias polimórficas amplificadas partidas) (Edwards y Karp, 1997).

Los marcadores genéticos se basan en su mayoría en la utilización de la técnica del PCR ("polymerase chain reaction"). Este es un método de amplificación *in vitro*, capaz de aumentar el número de fragmentos de DNA específico. El método utiliza imprimadores que hibridizan específicamente las cadenas opuestas del ADN, flanqueando la región que será amplificada. Una serie de ciclos de temperatura provocan la desnaturalización del ADN, y la hibridación y la extensión del imprimador por medio de la actividad de polimerasas termoestables, multiplicando exponencialmente la región flanqueada (Gresshoff, 1997).

La utilización de marcadores moleculares para diferenciar los sexos ha sido un campo poco explorado. Los estudios disponibles se han realizado tanto en animales (Bello y Sánchez, 1999) como en plantas (Mulcahy et al., 1992; Hormanza *et al.*, 1994; Andersen *et al.*, 1998; Avery *et al.*, 1998; Fraser *et al.*, 1998; Villalobos, 2000; Dolezel *et al.*, 2001). Los marcadores del sexo en estos estudios se identificaron usando la técnica RAPDs, la cual consiste en utilizar gran cantidad de imprimadores seleccionados de forma arbitraria para identificar aquellos que brinden un patrón de bandas diferentes según el sexo. En general, estos marcadores suelen ser muy específicos para la especie estudiada, lo cual significa que probablemente no funcionan para especies lejanas al género en estudio (Avery *et al.*, 1998).

En árboles forestales, la utilización de marcadores moleculares ha generado valiosa información para entender la organización y la distribución de los recursos genéticos en plantaciones y en poblaciones naturales (O'Malley y Whetten, 1997). Los estudios de Hormanza *et al.* (1994) en el bosque templado y de Villalobos (2000) en el bosque tropical lluvioso de Costa Rica, son ejemplos de las pocas investigaciones que han generado marcadores moleculares útiles para la determinación del sexo de los árboles forestales dioicos en los trópicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

SITIO DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en la Estación Experimental Forestal Horizontes, la cual pertenece al Área de Conservación Guanacaste, Costa Rica, y se extendió desde junio del 2001 hasta enero del 2002. La Estación Experimental Horizontes se clasifica dentro de la Zona de Vida Bosque Tropical Seco, según el sistema de clasificación de zonas de vida de Holdridge (Tosi, 1969). La Estación Horizontes se caracteriza por tener pastizales, áreas de reforestación experimental, bosques secundarios y bosques de galería.

El sitio se ubica cartográficamente a 10°34'29" y 10°42'47", a una altura de 140 m de elevación, con una precipitación anual que varía entre 900 y 2400 mm anuales, recibidos en los meses de mayo a noviembre en su mayoría, y una marcada estación seca en los meses de diciembre a abril. La temperatura diaria oscila entre 16 y 23°C por la noche y entre 26 y 38°C durante el día (Jansen, 1986). La Estación Experimental Forestal Horizontes y sus alrededores están influenciados fuertemente por procesos volcánicos (Winters 1997). El suelo está compuesto principalmente por tobas dacíticas, pero su formación se ha visto como una sucesión compleja, resultado de erupciones volcánicas alternadas con procesos sedimentarios (Sprechmann 1984). Según Perez *et al.* (1978) el suelo es del orden Inseptisol, con características químicas y mineralógicas medias, sin predominancia de ningún material en especial.

La fertilidad de este suelo es de media a buena, posee buenos niveles de calcio, magnesio, fósforo, hierro y cobre pero con deficiencias de zinc y manganeso; la capacidad de intercambio es buena y el pH se acerca a la neutralidad. Parece no tener buenas condiciones físicas ya que posee alta compactación, evidenciado en

una baja conductividad hidráulica y una alta resistencia a la penetración. La tabla de agua parece ser alta debido a la presencia de concreciones y nódulos de Fe y Mn.¹ Las condiciones ambientales predominantes durante el periodo de observación fueron obtenidas mediante la operación de una estación meteorológica automática (Campbell Scientific, Lincoln, NE) propiedad del Instituto Meteorológico Nacional, instalada en las cercanías del sitio de estudio.

Las mediciones morfológicas se realizaron cuando los árboles se encontraban en su fase vegetativa (24 junio 2001). Las mediciones fisiológicas se realizaron tanto en la época vegetativa (4 y 5 septiembre, 3 y 4 octubre del 2001) como en la reproductiva (11, 12 y 25 enero 2002). Las muestras para la extracción de ADN se recolectaron en la época vegetativa (5 septiembre 2001).

MATERIAL VEGETAL

El estudio se realizó en una plantación mixta forestal de 10 años de edad, compuesta por las especies *Simarouba glauca* y *Dalbergia retusa*, con un distanciamiento de 4 x 4 m. El Aceituno se encontraba en la fase de transición de juvenil a adulto, con individuos que ya habían alcanzado la madurez reproductiva y otros que aún se encontraban en estado juvenil. Se establecieron 3 categorías de plantas: hembras, machos y juveniles. Se seleccionaron al azar 20 individuos hembras, 22 individuos machos y 16 individuos juveniles para llevar a cabo las mediciones correspondientes.

VARIABLES MORFOLÓGICAS

Se midieron las siguientes características morfológicas. La altura de los árboles se midió utilizando una varilla telescópica. El diámetro a la altura del pecho se midió con

¹ Ordoñez, H. 2002. comunicación personal. Universidad de Costa Rica.

una cinta diamétrica. El grosor foliar (10 hojas por árbol) se determinó con un caliper desarrollado por la industria japonesa del cuero (Tec Lock) y con una sensibilidad de 0.01 mm. El peso y el área foliar se midieron en 10 hojas completamente expandidas y expuestas al sol de cada árbol. El área foliar se midió con un medidor de áreas (Modelo Li-3100, Li-cor). El peso se determinó mediante secado de las hojas a 65 °C durante 48 horas y su posterior pesado en una balanza electrónica OHAUS®. El peso foliar específico se calculó como la razón peso/ área foliar.

Se calculó la densidad aparente y real de la madera de individuos hembras y machos. Para ello se tomaron 8 muestras de cada categoría utilizando un barrenador de troncos y extrayendo la muestra de madera a la altura del pecho. Las muestras se sumergieron en agua durante 24h para permitir hidratación completa. El volumen total de las muestras se calculó utilizando el principio de desplazamiento de Arquímedes según el cual, el peso de un objeto sumergido en agua es equivalente al volumen de dicho objeto, de manera que al obtener el peso del objeto sumergido se obtiene el volumen del mismo (Gimenez y Alves, 1994). Posteriormente las muestras se secaron a 65° C durante 48 h y se pesaron en una balanza electrónica OHAUS® para calcular el volumen ocupado por los poros ($D_a = 1\text{g/ml}$). La diferencia entre el volumen total y el volumen de los poros corresponde al volumen de la madera. La densidad real se calculó como la relación de peso seco de la madera / volumen de la madera. La densidad aparente se calculó como la relación peso seco de la madera / volumen total de la muestra.

VARIABLES FISIOLÓGICAS

Se estudiaron las relaciones hídricas de los árboles de cada categoría. Para ello se llevaron a cabo mediciones de la conductividad estomática, el potencial hídrico y la concentración foliar de nitrógeno y fósforo. Se utilizaron hojas jóvenes completamente extendidas y expuestas al sol.

Potencial hídrico

El potencial hídrico burdo del xilema (Ψ_w) es un indicador del estado hídrico de los árboles. Se mide regularmente en la madrugada (am) y a medio día (md), debido a que de esta manera se deduce el potencial hídrico del suelo y la recuperación de las plantas durante las noches, y el grado de estrés experimentado por los árboles respectivamente (Ritchie y Hinckley, 1975). El Ψ_w se midió con la cámara de presión de Scholander (Modelo PMS-100, PMS, Logan, UT, USA). Este método se basa en el hecho de que el agua del xilema se encuentra casi siempre bajo tensión, y que las propiedades de cohesión del agua originadas en la atracción entre las moléculas, permiten que la columna de agua soporte grandes tensiones (Zimmermann et al, 1994).

La técnica consiste en cortar la columna de agua bajo tensión (cortar la hoja), provocando que la columna retroceda en el interior de los vasos de manera proporcional a la tensión existente antes del corte. La hoja se coloca dentro de la cámara de presión dejando por fuera el pecíolo, y se permite la entrada gradual de gas hasta que la columna de agua dentro del xilema es forzada hacia la superficie del corte. En este punto la presión requerida para mover la columna de agua es igual en magnitud pero opuesta en signo a la tensión que existía en el xilema antes del corte (Ritchie y Hinckley, 1975).

Se realizaron dos mediciones por día: a las 5:30 am y las 12:00 md. Para ello se recolectaron las muestras en el campo, se colocaron en bolsas plásticas oscuras, se cerraron herméticamente y se transportaron en una hielera para hacer las mediciones correspondientes. El campo de estudio se encontraba a diez minutos del laboratorio donde se realizaron las mediciones. Para medir el Ψ_w no se realizaron ciclos diurnos ya que los valores máximos y mínimos se alcanzan generalmente en las horas indicadas.

Conductividad estomática

La conductividad estomática (g_s) es una medida de la apertura y la actividad estomática que está relacionada con las actividades de intercambio gaseoso (fotosíntesis y transpiración) de las plantas, y se puede usar como un indicador del estado hídrico y del vigor de las plantas. La g_s se midió utilizando un autoporómetro (Modelo LI-1600, Li-cor). El instrumento está compuesto de una consola donde se procesan y almacenan los datos, y una cubeta donde se realizan las mediciones por medio de sensores de humedad, temperatura y flujo de aire. La apertura estomática de las hojas permite el flujo de vapor de agua hacia el exterior, producto de la transpiración. El agua perdida es determinada midiendo el flujo de aire seco necesario para mantener una humedad relativa constante dentro de la cubeta. La conductividad estomática es calculada con base a las mediciones de flujo de aire seco, temperatura de la hoja y del aire, y humedad relativa (Li-cor, 1989).

Se obtuvieron ciclos diurnos de g_s para árboles hembras, machos y juveniles en tres días diferentes (dos en la fase vegetativa y una en la fase reproductiva). Para ello se seleccionaron diez hojas de cada categoría de plantas y g_s se midió siete veces a lo largo del día. Para estudiar el comportamiento según la categoría se seleccionaron tres hojas de cinco árboles de cada categoría (hembras, machos y juveniles) y se determinó la conductividad a lo largo del día (de 7-9:00 am, 9-11:00 am y 12-

2:00pm). Esto se realizó en seis días diferentes (tres en época vegetativa y tres en época reproductiva).

Concentración foliar de nitrógeno y fósforo

Se obtuvieron muestras compuestas a partir de las hojas utilizadas en las mediciones de peso y área foliar (5 por categoría), se molieron y se enviaron al Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, donde se realizó la determinación del contenido foliar de N y P utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estableció un diseño experimental completamente al azar, con un experimento factorial consistente de 3 tratamientos constituidos por las 3 categorías de plantas, y de 3 fechas de medición realizadas durante las fases vegetativa y reproductiva. Se realizaron mediciones repetidas en cada árbol a 3 horas del día.

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute), y sometidos a análisis de varianza. Las variables morfológicas fueron analizadas mediante la aplicación de los procedimientos de GLM (General Linear Models) y las variables fisiológicas mediante la aplicación de procedimientos mezclados (Mixed Procedures).

MARCADORES MOLECULARES

Se procedió a recolectar y procesar material vegetal de árboles de las 3 categorías consideradas en este estudio (hembras, machos y juveniles). Se seleccionaron imprimadores ligados al sexo y se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para examinar posibles diferencias en el patrón de bandas según el sexo.

Recolección de las muestras

Las hojas nuevas son la mejor fuente de tejido para la extracción de material genético (Villalobos, 2000). Por lo tanto se recolectaron hojas jóvenes de 10 árboles de cada categoría, se colocaron en bolsas identificadas y se transportaron a bajas temperaturas en una hielera donde fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Extracción del material genético

La extracción del ADN se realizó utilizando el método de Lodhi *et al.* (1994), el cual produjo buenos resultados en *S. amara* (Villalobos, 2000). Adicionalmente se atendieron algunas modificaciones realizadas por dicha investigadora para mejorar la eficiencia en la extracción. El tejido foliar se maceró bajo condiciones asépticas y con la ayuda de nitrógeno líquido. Las muestras maceadas se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Protocolo de extracción de ADN

Se pesó 20 mg de tejido macerado, se colocó en un tubo eppendorf con 750 ul de amortiguador de extracción (TRIS HCL 100mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2%, PVP 2%, B- mercaptoetanol 0.2%). Se mezcló y se incubó a 60°C durante 30 minutos y se dejó enfriar. Posteriormente se agregó 750 ul de cloroformo-

octanol (24:1), se mezcló y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos. Se extrajo el sobrenadante, se agregó nuevamente 750 ul de cloroformo-octanol (24:1), se mezcló y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos. Se extrajo el sobrenadante, se agregaron 2 volúmenes de etanol frío (95%) y 0.5 volúmenes de cloruro de sodio 5 M y se incubó toda la noche a 5°C. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos, luego se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol (70%) más acetato de amonio (10 mM). El precipitado se secó a temperatura ambiente durante 40 minutos y se resuspendió en 100 ul TE. Las muestras se almacenaron a 5°C.

Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN

La pureza del ADN se midió utilizando un espectrofotómetro (Beckman UV 530). Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm y se calculó la relación OD_{260}/OD_{280} . Valores por encima de 2.0 representan contaminación por fenoles o cloroformo, por debajo de 2.0 representa impurezas de proteínas u otros absorbentes de rayos UV, y valores cercanos a 2.0 significan relativa pureza del ADN.

Para la cuantificación de ADN se utilizó un fluorómetro (Hoefer[®] DyNA Quant 200 Fluorometer). La técnica consiste en incubar el ADN con la sustancia H33258, las cuales interactúan emitiendo una radiación a 485 nm después de ser expuestas a una lámpara de mercurio. La radiación se detecta con un filtro emisor, cuantificando directamente la concentración de ADN (Pharmacia Biotech, 1997). Adicionalmente, se llevó a cabo una electroforesis del material genético para evaluar la calidad e integridad del ADN.

Selección de los marcadores moleculares

Se seleccionaron 2 decámeros los cuales han sido identificados como marcadores del sexo en *S. latifolia* (Cariophyllaceae) producto de la técnica de RAPDs (Mulcahy *et al.*, 1992). *S. latifolia* es una especie perenne de clima templado, ampliamente utilizada como sistema modelo en el estudio de la determinación sexual en plantas dioicas. Los imprimadores fueron obtenidos de la empresa Operon Technologies, Inc (California) y cuya secuencia se describe a continuación:

Cuadro 1. Secuencia de los imprimadores examinados como marcadores del sexo en *Simarouba glauca*.

Primer	Secuencia
Dec1	5' GGTGACGCAG 3'
Dec 2	5' TGAGCGGACA 3'

Fuente: Operon Technologies Inc., California.

Optimización de la reacción de amplificación

Para las reacciones de amplificación se usó un termociclador Rapidcycler™ (Idaho Technology). Se utilizaron las mismas condiciones reportadas por Avery *et al.* (1998) en cuanto a concentración de reactivos y programa de amplificación. No se obtuvo resultados satisfactorios por lo que se evaluó el programa de amplificación descrito en el siguiente apartado, variando la temperatura de hibridación para los diferentes imprimadores. Para optimizar la temperatura de hibridación, se utilizó la siguiente reacción y programa de amplificación (cuadro 1 y 2).

Cuadro 2. Mezcla de reactivos para la optimización de la temperatura de hibridación.

	Concentración	Volumen (ul)
Reactivos		
Amortiguador (MgCl ₂ 20 mM) 10 X		2.0
Imprimador	5 uM	1.6
DNTP	2.5 mM	1.0
Taq polimerasa	5 U/ul	0.3
ADN	20 ng/ul	1.0
Agua		14.1
Total		20.0

Cuadro 3. Programa de amplificación para evaluar y optimizar la temperatura de hibridación.

N° ciclos	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	Desnaturalización	98	10
30	Desn. Inicial	94	10
	Hibridación		20
	Extensión	72	70
1	Extensión final	72	300

Se evaluaron diferentes concentraciones de ADN y de cloruro de magnesio para optimizar la reacción de amplificación. Se utilizaron concentraciones de ADN de 0.25 ng/ul hasta 1 ng/ul en la reacción final. En cuanto a cloruro de magnesio, se utilizó un gradiente de concentraciones de 10, 20, 30 y 40 mM en la reacción final.

Electroforesis

Los productos de la amplificación (PCR) fueron corridos en electroforesis para evaluar el patrón de bandas y detectar posibles diferencias según el sexo. Se utilizaron geles de agarosa al 2 %, sumergidos en amortiguador TBE 1X (TRIS HCl pH8 0.09M, Ácido Bórico 0.09M y EDTA pH8 0.0025M). Las muestras se corrieron durante 2 horas a un voltaje constante de 75 voltios, utilizando una cámara de electroforesis Bio-Rad DNA Sub-Cell TM, y una fuente de poder Bio-Rad Power PAC 3000. En cada pozo se cargaron 12 ul del producto de amplificación y 5 ul de amortiguador de carga (glicerina 50%, azul de bromofenol 0.25% y Xilen Cianol FF 0.25%). Posteriormente se tiñeron los geles en bromuro de etidio (1 ug/ul) y se fotografiaron con película Polaroid.

El producto de amplificación del decámero 2 se corrió también en un gel de policrilamida para una mejor resolución de las bandas. Se preparó una solución al 5% de acrilamida: bisacrilamida (19:1) más urea (7M) y se polimerizó con demet (1ul/ml) y persulfato de amonio (25 %). Se mezclaron 4 ul de ADN más 1 ul de azul de bromofenol, se calentaron a 93°C durante 3 minutos y se colocaron en hielo dos minutos para luego cargarlos en el gel. Las muestras se corrieron 1 hora a un voltaje constante de 55 wats. Para la tinción se sumergió el gel en ácido acético (10%) durante 20 minutos y se realizaron 3 lavados con agua. Luego se depositó en una solución de nitrato de plata (1g/ml) con 1.5 ml de formaldehído y se agitó 30 minutos. Se lavó en agua y se colocó en agitación en una solución de carbonato de sodio (20 g/ml) más formaldehído (1.5 ml/ L) y tiosulfito de sodio (200 ul/ L) hasta que aparecieron las bandas. Finalmente el gel se sumergió 5 minutos en ácido acético y se colocó en agitación con agua durante 5 minutos.

RESULTADOS

CONDICIONES AMBIENTALES

La Figura 1 describe el comportamiento de las variables ambientales más importantes durante el periodo de estudio. La precipitación estuvo presente en la época lluviosa de manera intermitente, con predominancia de lluvias en el mes de noviembre. En la época seca la precipitación estuvo ausente, lo cual evidencia la marcada estacionalidad climática de la región. La temperatura promedio del aire varió entre 25 y 30° C durante todo el periodo de estudio, sin diferencias entre la época lluviosa y la época seca. La humedad relativa se mantuvo en su mayoría entre 70 y 90% durante la época lluviosa, con una disminución pronunciada en la época seca. La velocidad del viento se mantuvo generalmente entre 5 y 15 km/h en la época lluviosa, aumentando progresivamente en la época seca.

VARIABLES MORFOLÓGICAS

Las características morfológicas evaluadas en este estudio tanto de los troncos como de las hojas no mostraron diferencias significativas entre machos y hembras (Cuadro 4). Estas características incluyeron la altura, el diámetro y la densidad de los troncos, y el grosor, el área y el peso específico de las hojas.

Estos resultados contrastan con lo observado en individuos juveniles de *S. glauca*, que difirieron significativamente en la altura y el grosor del tronco ($p < 0.001$) y en el área y grosor de las hojas ($p < 0.01$) comparados con individuos reproductivos.

Las diferencias en el área y el peso foliar observadas entre individuos juveniles y reproductivos desaparecieron cuando dichas variables fueron integradas en el peso foliar específico, que no mostró diferencias significativas entre las categorías evaluadas, e indica que los aspectos funcionales de las hojas no difirieron en las tres categorías de plantas evaluadas.

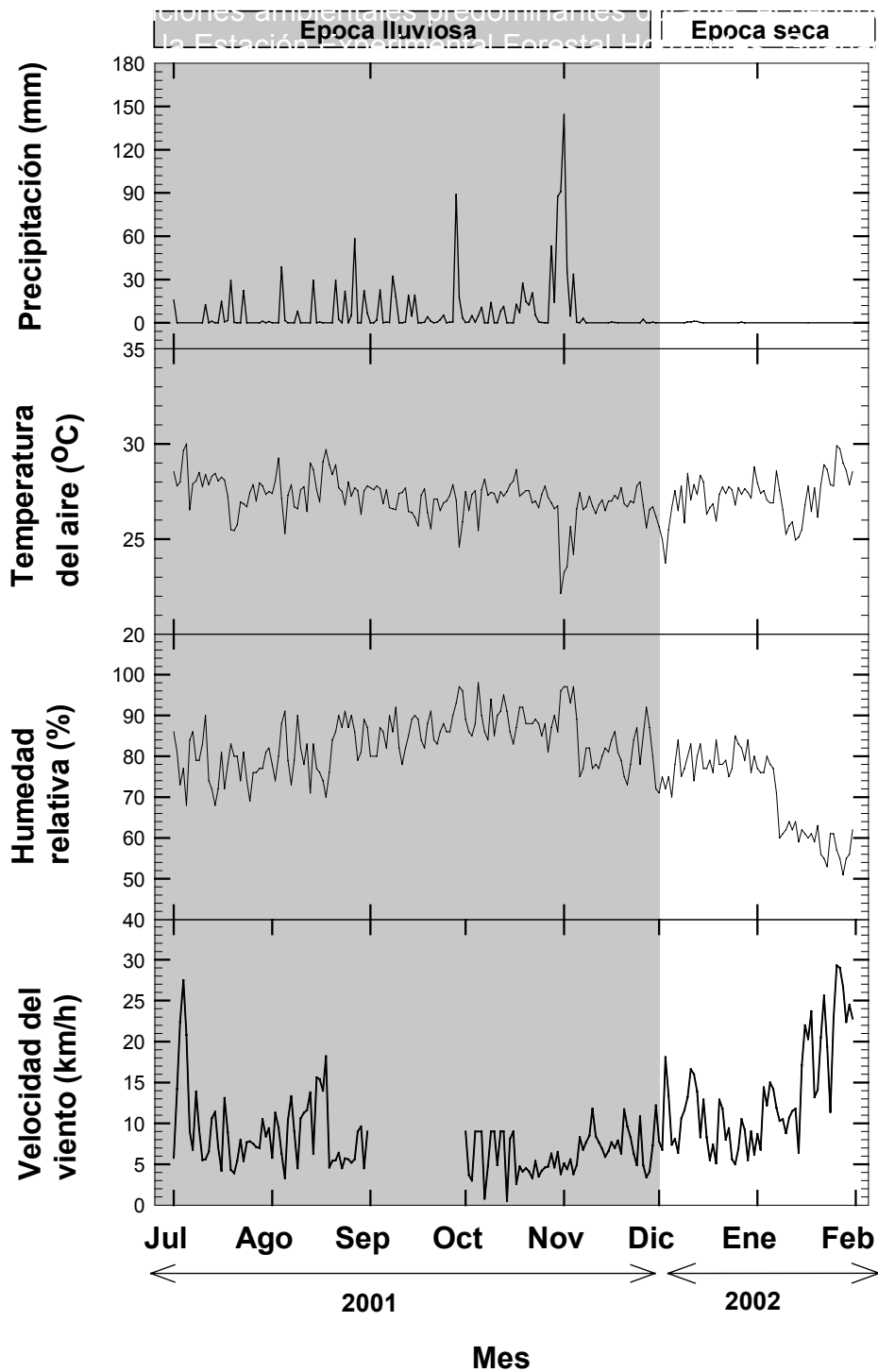


Figura 1. Condiciones ambientales predominantes durante el periodo de estudio en las cercanías de la Estación Experimental Forestal Horizontes, Guanacaste.

Cuadro 4. Análisis de varianza (GLM) para las diferentes características morfológicas de los troncos y las hojas de árboles hembra, macho y juveniles de *Simarouba glauca*, en una plantación forestal de 10 años de edad ubicada en la Hacienda Horizontes, Area de Conservación Guanacaste. (letras diferentes dentro de cada variable representan diferencias significativas).

Variable	hembras	machos	juveniles	<i>p</i>
Tronco				
<i>Altura (m)</i>	7.77 ^a	7.51 ^a	6.60 ^b	< 0.001
<i>Diámetro (cm)</i>	16.26 ^a	15.48 ^a	12.25 ^b	< 0.001
<i>Densidad real (g/ml)</i>	1.04 ^a	1.09 ^a	-	N.S
<i>Densidad aparente (g/ml)</i>	0.39 ^a	0.40 ^a	-	N.S
Hojas				
<i>Grosor (mm)</i>	0.351 ^a	0.365 ^a	0.359 ^a	N.S
<i>Area (cm²)</i>	174.77 ^a	166.94 ^a	202.69 ^b	<0.01
<i>Peso (g)</i>	1.727 ^a	1.707 ^a	2.010 ^b	<0.01
<i>Peso específico (g/cm²)</i>	100.26 ^a	102.02 ^a	101.49 ^a	N.S
<i>[Nitrógeno] (%)</i>	1.46 ^a	1.64 ^a	1.63 ^a	N.S
<i>[Fósforo] (%)</i>	0.10 ^a	0.08 ^a	0.09 ^a	N.S

N.S = No significativo.

VARIABLES FISIOLÓGICAS

Potencial hídrico

Los valores de Ψ_w medidos en la madrugada (ca. -0.3 a -0.4 MPa) fueron consistente y estadísticamente superiores a los medidos al medio día (menores que -1.0 MPa) con un valor de $p < 0.0001$, pero el Ψ_w no difirió entre las fases vegetativa y reproductiva (Cuadro5). Los valores de Ψ_w medidos en hojas de individuos hembras, machos y juveniles no difirieron significativamente ($p = 0.5459$). Dicha variación no significativa se mantuvo tanto en la fase vegetativa como en la fase reproductiva ($p =$

0.3527). La variación en el Ψ_w fue mayor a medio día que en la madrugada ($p=0.0518$), excepto para los valores obtenidos el 11 enero al inicio de la fase reproductiva, cuando se observó alta variación en la madrugada (Figura 2).

Cuadro 5. Análisis de covarianza (Mixed Procedure) del potencial hídrico y la conductividad estomática para las diferentes interacciones en estudio.

Efecto	Potencial Hídrico		Conductividad estomática	
	Valor F	Pr > F	Valor F	Pr > F
<i>Época</i>	0.54	0.4940	1.51	0.2740
<i>Categoría</i>	0.64	0.5459	0.69	0.5217
<i>Hora</i>	1.16	<.0001	49.93	<.0001
<i>Categoría x Época</i>	127.62	0.3527	0.51	0.6172
<i>Época x Hora</i>	1.45	0.2820	18.08	0.0005
<i>Categoría x Hora</i>	4.04	0.0518	0.64	0.6391
<i>Categoría x Época x Hora</i>	0.09	0.9134	0.32	0.8625

Conductividad estomática

La conductividad estomática de individuos hembras, machos y juveniles no difirió a lo largo del día (Figura 3). Estos cursos diurnos se realizaron para evaluar de manera intensiva el comportamiento estomático de individuos de las tres categorías a lo largo del día, en dos oportunidades durante la estación lluviosa que coincidieron con la fase de crecimiento vegetativo, y en una oportunidad durante la estación seca que coincidió con la fase reproductiva de los individuos adultos.

Se observó un marcado patrón diurno en el comportamiento de g_s . Los valores más altos se alcanzaron típicamente durante las primeras horas de la mañana, especialmente durante la estación lluviosa en la que se observaron valores superiores a $500 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Luego g_s declinó progresivamente a lo largo del día en todas las categorías evaluadas.

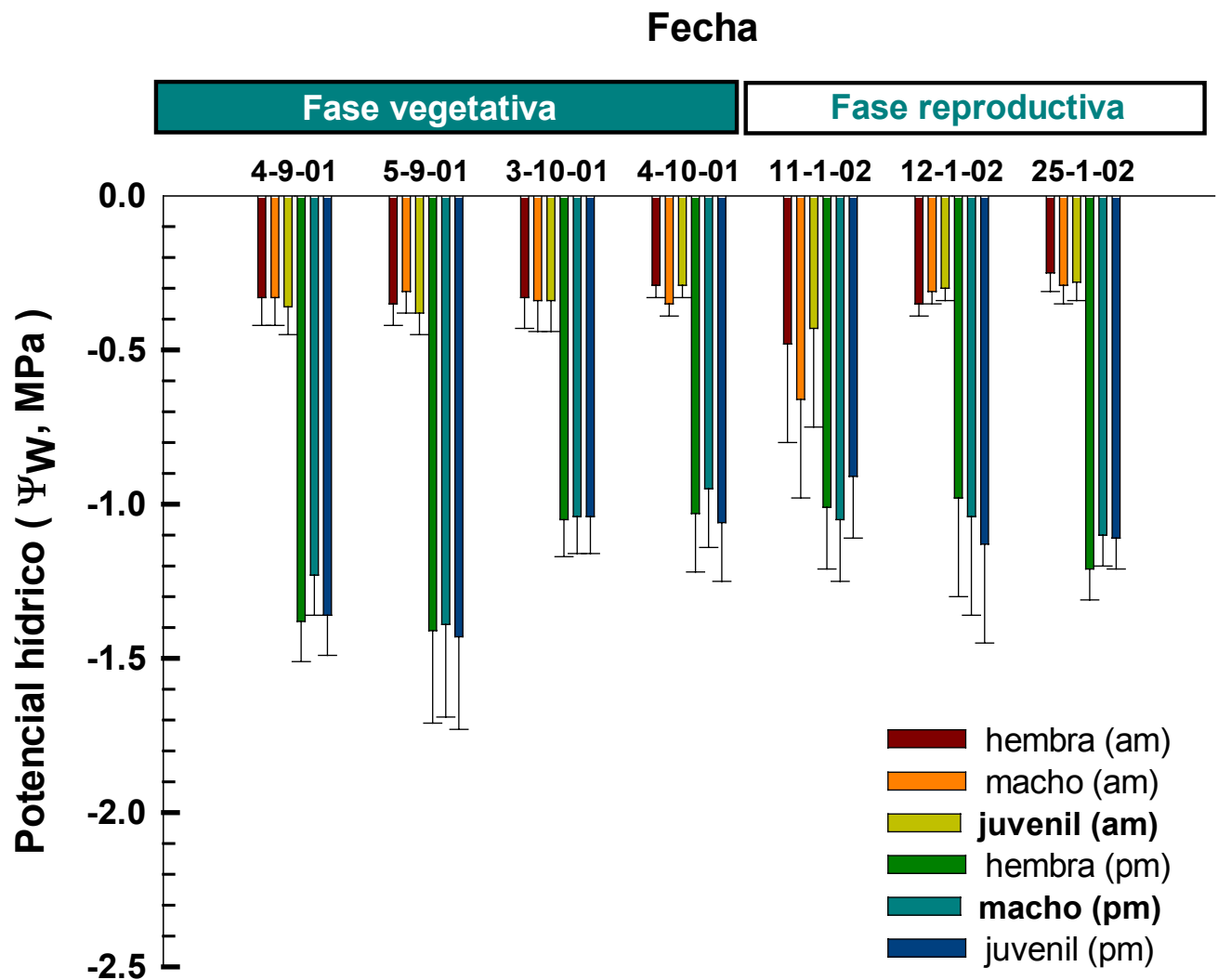


Figura 2. Potencial hídrico (Ψ_w) de individuos hembras, machos y juveniles de *Simarouba glauca* medidos en la madrugada (am) y a medio día (pm) durante la fase vegetativa y la fase reproductiva. Cada valor representa el promedio de 10 muestras \pm LSD.

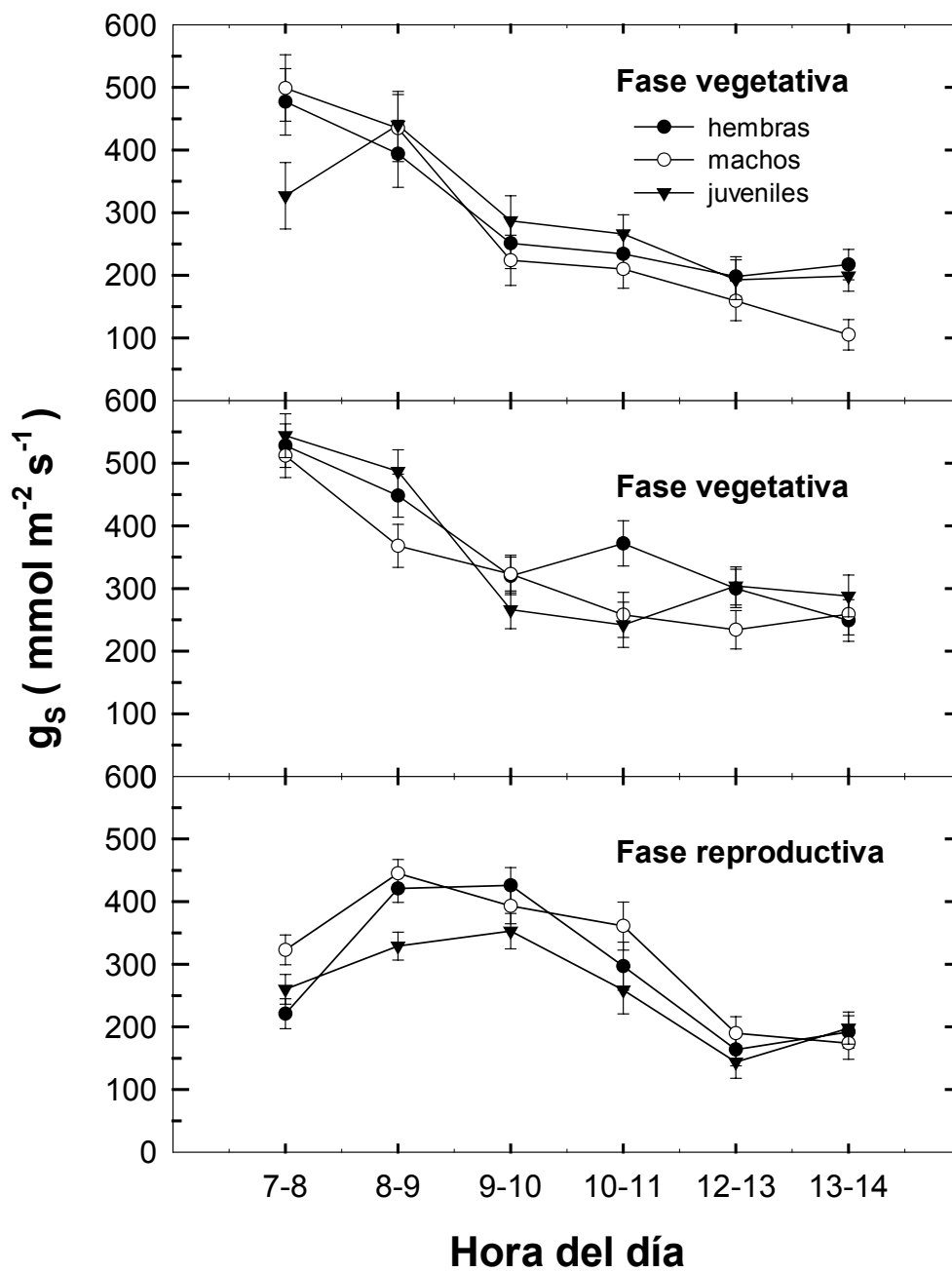


Figura 3. Ciclos diurnos de conductividad estomática (g_s) de individuos hembras, machos y juveniles de *Simarouba glauca* en la época vegetativa y reproductiva. Cada valor representa el promedio de 10 muestras \pm LSD.

En contraste, el patrón diurno de g_s medido durante la estación seca mostró una tendencia parabólica, encontrándose los valores más altos a mediados de la mañana, que difícilmente alcanzaron los $450 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 3).

Los resultados anteriores fueron ampliados con observaciones frecuentes durante las estaciones seca y lluviosa, pero menos intensivas, lo que permitió un análisis estadístico completo. En estos casos se observó que efectivamente no existen diferencias significativas (Cuadro 4.3.1) en g_s medido en individuos hembras, machos y juveniles, y que los valores máximos de g_s (ca. $500 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se alcanzaron durante las primeras horas del día en la estación lluviosa, y a mediados de la mañana (ca. $400 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante la estación seca (Figura 3).

Las pruebas estadísticas indicaron que no hubo diferencias significativas en los valores promedio de g_s medida la estación seca y la estación lluviosa. Sin embargo esto enmascara las diferencias significativas observadas a diferentes horas en un mismo día ($p < 0.0001$), tal como se indicó anteriormente. El comportamiento estomático de machos, hembras y juveniles no difirió significativamente entre la época seca y la época lluviosa. Las diferencias en el patrón diurno observadas entre la fase vegetativa y reproductiva fueron significativas ($p = 0.0005$), siendo g_s mayor en las primeras horas del día durante la fase vegetativa y a mediados de la mañana en la época reproductiva. No se observaron diferencias entre las categorías evaluadas a lo largo del día ($p = 0.6391$), tanto en la fase vegetativa como en la fase reproductiva ($p = 0.8625$) (Figura 4).

Contenido foliar de nitrógeno y fósforo

No hubo diferencias significativas en la concentración de nitrógeno foliar entre hembras, machos y juveniles. Tampoco se observaron diferencias en cuanto a la concentración de fósforo foliar (Cuadro 4).

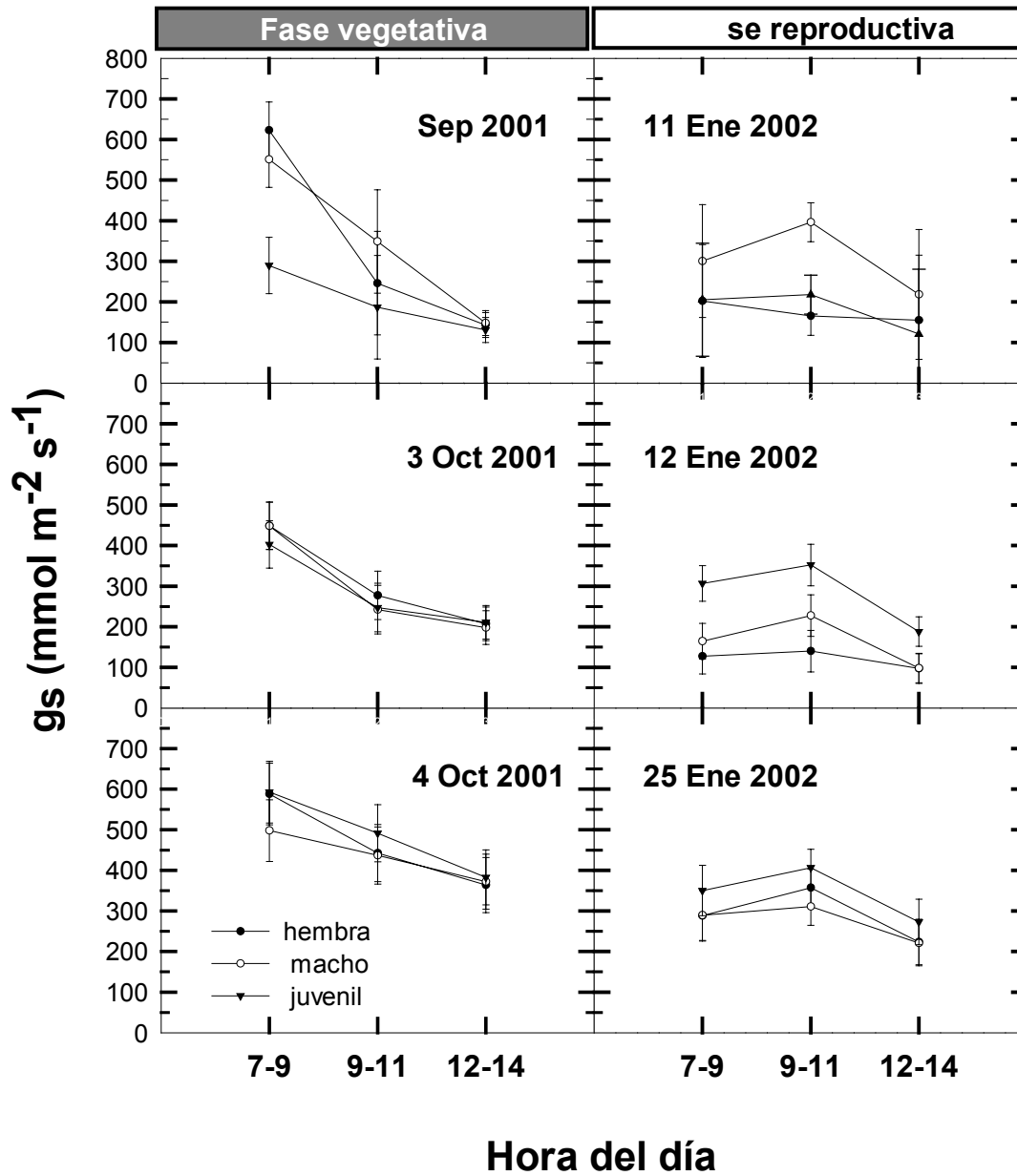


Figura 4. Conductividad estomática (g_s) de individuos hembras, machos y juveniles de *Simarouba glauca* medida a lo largo del día durante la fase vegetativa y la fase reproductiva. Cada valor representa el promedio de 15 mediciones \pm LSD.

MARCADORES MOLECULARES

Extracción del ADN

El método utilizado brindó resultados satisfactorios para la obtención del material genético. Al inicio no se utilizó nitrógeno líquido para la maceración lo cual dificultó el aislamiento del ADN, por lo que su uso fue indispensable. Durante la precipitación del ADN con etanol frío (70 %) se formó un precipitado lechoso que dificultó la resuspensión del material genético. Cuando este precipitado se extraía y eliminaba, la extracción resultaba infructuosa.

El aislamiento del ADN no fue homogéneo para todas las muestras, por lo que fue necesario realizar varias veces la extracción. La cuantificación en el fluorómetro brindó concentraciones desde los 5 ng/ul hasta 25 ng/ul, por lo que fue necesario estandarizar las concentraciones a 20 ng/ul. La electroforesis confirmó la presencia de ADN total y la calidad fue buena ya que no se observaron signos de degradación (Figura 5).

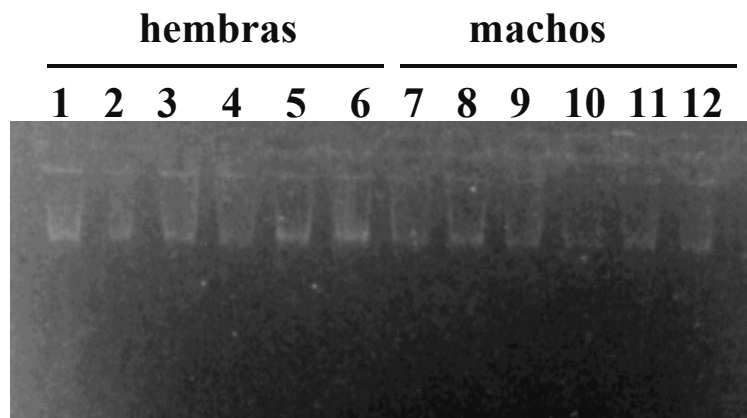


Figura 5. Electroforesis del ADN total de individuos hembras y machos de *Simarouba glauca*. Condiciones generales: gel al 2% de agarosa, amortiguador TBE 1X, 100v.

La mayoría de las muestras presentaron relaciones de OD₂₆₀/OD₂₈₀ por debajo de 2.0 lo cual indica presencia de proteínas u otros absorbentes de luz ultravioleta.

Programa de amplificación

No se logró la amplificación del ADN con el programa de amplificación utilizado por Mulcahy *et al.* (1992) para los imprimadores en estudio. Se procedió a utilizar el programa descrito en la sección de materiales y métodos, variando la temperatura de hibridación. La amplificación se logró con una temperatura de hibridación de 34 °C para los imprimadores Dec1 y Dec2. Luego se evaluaron diferentes concentraciones de ADN y de cloruro de magnesio para maximizar la amplificación. La concentración de ADN óptima en la reacción final fue de 1 ng/ul, y para el cloruro de magnesio se obtuvieron los mejores resultados con una concentración de 20 mM en la reacción final. Por lo tanto, para los imprimadores Dec1 y Dec2 se utilizó el siguiente programa de amplificación:

Cuadro 6. Mezcla de reactivos para la amplificación del Dec1 y del Dec2.

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
Amortiguador (MgCl ₂ 20 mM) 10 X		2.0
Imprimador	5 uM	1.6
DNTP	2.5 mM	1.0
Taq polimerasa	5 U/ul	0.3
ADN	20 ng/ul	1.0
Agua		14.1
Total		20.0

Cuadro 7. Programa de amplificación para los imprimadores Dec 1 y Dec 2.

N° ciclos	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	Desnaturalización	98	10
30	Desn. Inicial	94	10
	Hibridación	34	20
	Extensión	72	70
1	Extensión final	72	300

Electroforesis del producto de amplificación

A pesar de que se uniformizaron las concentraciones de ADN de las muestras, no se logró que todas amplificaran tal y como se observa en la Figuras 6 y 7. Utilizando el imprimador Dec 1, se amplificó una banda ligeramente por encima de las 1000 pb tanto para hembras como para machos (Figura 6). En el caso del Dec 2, la amplificación fue menos específica obteniéndose un patrón de bandas (Figura 7). Comparando hembras y machos no se observó diferencias en el patrón de bandas.

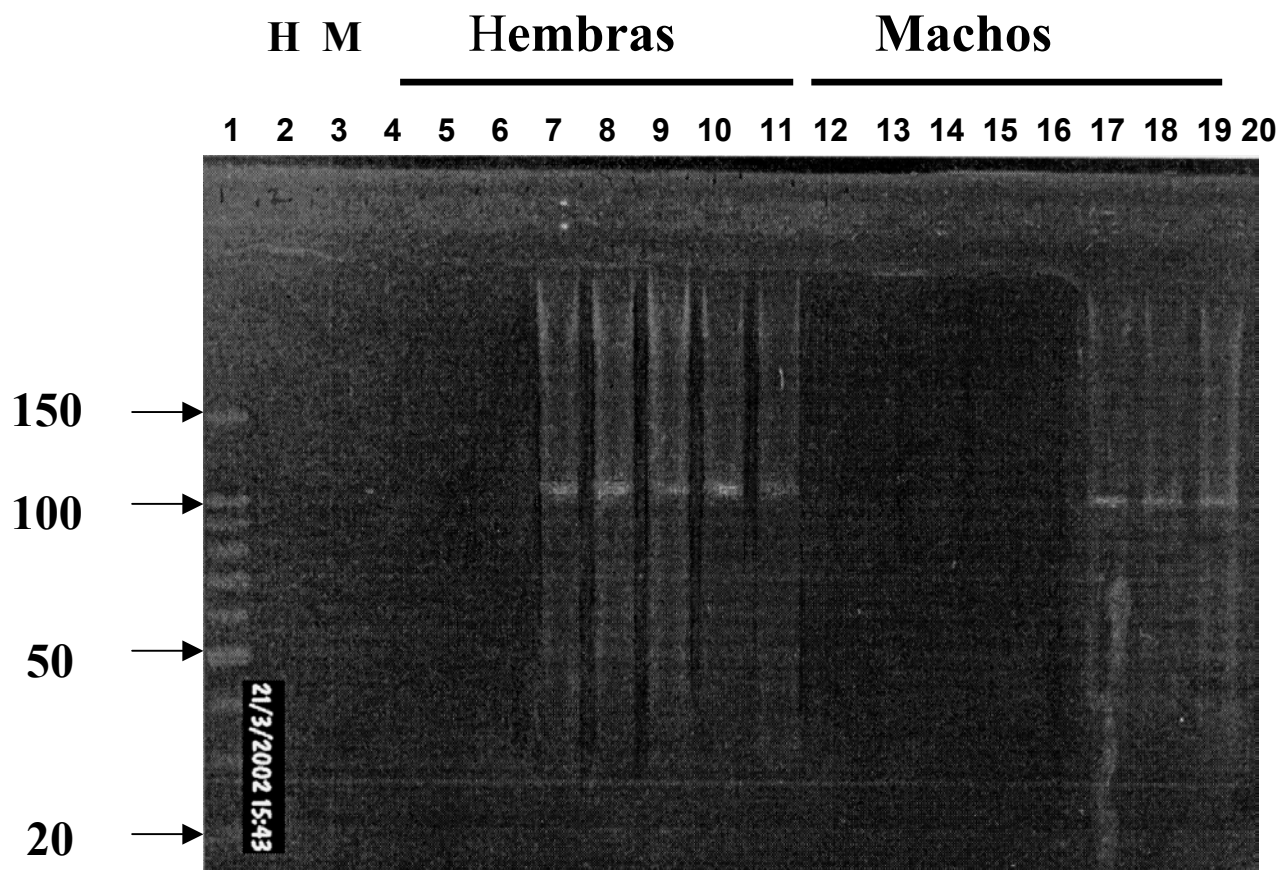


Figura 6. Electroforesis del producto de amplificación para individuos hembras y machos de *S. glauca*, utilizando el imprimador Dec1. El pozo 1 contiene el marcador de peso molecular 100 pb, el pozo 2 (H) contiene una muestra compuesta de hembras y el pozo 3 (M) contiene una muestra compuesta de machos. Del pozo 4 al pozo 11 individuos hembras, del pozo 12 al pozo 19 individuos machos, pozo 20 control negativo. Condiciones generales: gel al 2% de agarosa, amortiguador TBE 1X, 75v.

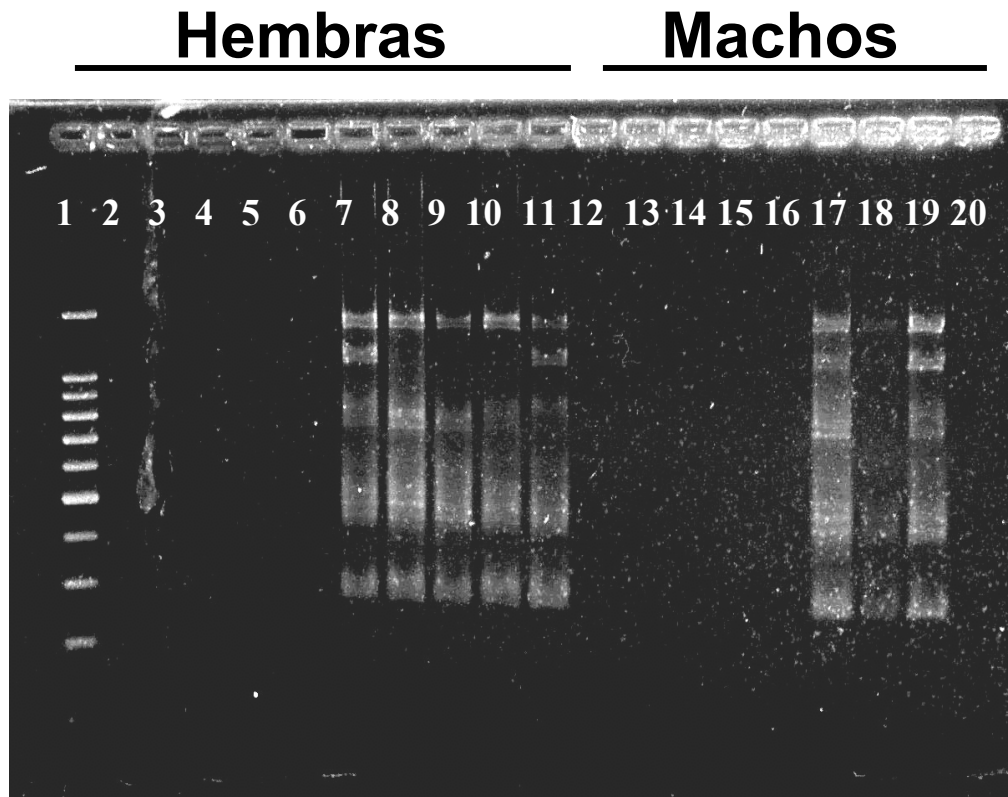


Figura 7. Electroforesis del producto de amplificación para individuos hembras y machos de *Simarouba glauca*, utilizando el imprimador Dec2. El pozo 1 contiene el marcador de peso molecular 100 pb, el pozo 2 (H) contiene una muestra compuesta de hembras y el pozo 3 (M) contiene una muestra compuesta de machos. Del pozo 4 al pozo 11 individuos hembras, del pozo 12 al pozo 19 individuos machos, pozo 20 control negativo. Condiciones generales: gel al 2% de agarosa, amortiguador TBE 1X, 75v.

El producto de amplificación del Dec 2 se corrió también en un gel de policrilamida para observar con detalle el patrón de bandas, cuyo resultado se aprecia en la Figura 8. Se corroboró la ausencia de diferencias en el patrón de bandas entre hembras y machos.

Hembras Machos

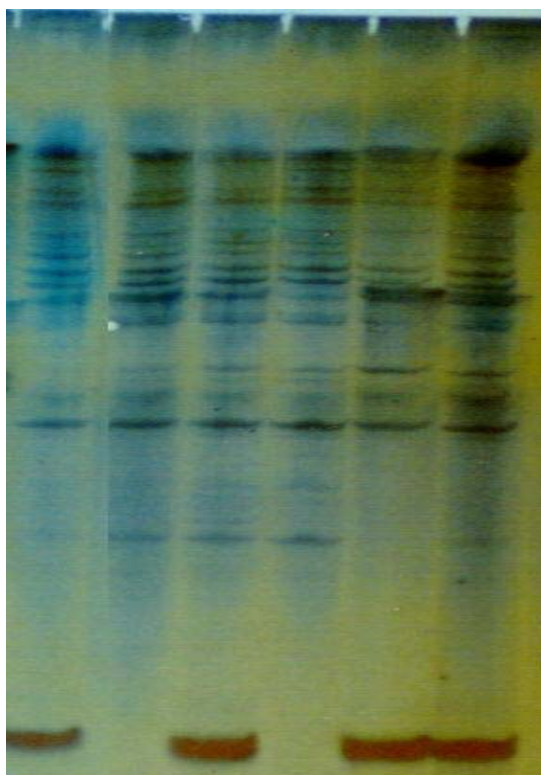


Figura 8. Electroforesis del producto de amplificación para individuos hembras y machos de *Simarouba glauca*, utilizando el imprimador Dec2. Pozos 1, 2 y 3 corresponden a hembras, pozos 4, 5 y 6 corresponden a machos. Condiciones generales: gel de poliacrilamida (5%), 55 wats constantes durante 1 hora. Se tiñó con nitrato de plata (1g/ml)

DISCUSIÓN

CONDICIONES AMBIENTALES

El comportamiento estacional del clima experimentado durante la realización de este estudio es característico del Bosque Tropical seco, con una marcada época lluviosa que se extiende desde mediados de abril hasta mediados de diciembre y una época seca que se presenta desde mediados de diciembre hasta mediados de abril (Instituto Meteorológico Nacional). Dicho comportamiento se expresó en mayor precipitación y humedad relativa en la época lluviosa y mayor velocidad del viento durante la época seca. Estas condiciones fueron importantes porque permitieron comparar el comportamiento de individuos hembras, machos y juveniles bajo condiciones ambientales contrastantes, es vista de que se han observado diferencias en la respuesta al estrés hídrico y a la humedad atmosférica según el sexo (Obeso, *et al.*, 1998).

VARIABLES MORFOLÓGICAS

La diferenciación morfológica entre los sexos de algunas especies dioicas constituye un mecanismo que permite el desarrollo efectivo de las funciones específicas de cada sexo (Harrison y Fox, 1981). El desarrollo de árboles más vigorosos, con troncos más gruesos y hojas más grandes y con mayor peso específico parecen ser características morfológicas de las hembras que les permiten producir mayor cantidad de fotoasimilados y transportar y almacenar mayor cantidad de agua, con el propósito de satisfacer la mayor demanda de recursos que representa la reproducción en comparación con los machos (Wallace y Rundel, 1979; Korpolainen 1992). Sin embargo, en otras especies los machos también pueden presentar mayor vigor vegetativo que las hembras, como una consecuencia de tener menor costo reproductivo (Dawson y Ehleringer, 1993). En el caso de *S. glauca*, la ausencia de

diferencias morfológicas entre hembras y machos puede ser interpretada desde distintos puntos de vista.

La ausencia de diferencias en el costo reproductivo entre hembras y machos puede ser uno de estos argumentos. Bawa y Opler (1975, 1978) encontraron que los árboles machos del Aceituno producían 13 veces mayor cantidad de flores que los árboles hembras. El mayor costo energético involucrado en la producción de flores en los árboles machos, puede compensar la posible ventaja con respecto a las hembras, las cuales deben destinar muchos recursos a la fructificación (Dawson y Geber, 1999). Si el costo reproductivo es semejante para hembras y para machos, ninguno de los sexos experimentará una presión de selección diferente en términos de requerimientos energéticos, lo cual conduce a la ausencia de dimorfismo morfológico entre los sexos (Delph, 1999).

En caso de que existieran diferencias en el costo reproductivo, con mayores requerimientos por parte de las hembras, éstas pueden desplegar mecanismos para compensar y aumentar su eficiencia reproductiva. Por ejemplo, los frutos del Aceituno son verdes al inicio de su desarrollo, tornándose morados al alcanzar su madurez. En este sentido, la contribución fotosintética de los frutos podría ser significativa mediante el aporte de fotoasimilados a los árboles hembras (Kohorn, 1994). Otra de las estrategias de las hembras podría ser la de disminuir su frecuencia de reproducción, compensando de esta forma el mayor costo reproductivo con respecto a los machos (Cipollini y Stiles, 1991). En los árboles de *Simarouba glauca* utilizados en este estudio, la reproducción se presentó durante dos años consecutivos, pero es necesario evaluar el comportamiento fenológico durante varios años ya que el comportamiento reproductivo de hembras y machos de especies perennes puede ser muy cambiante y sujeto por ejemplo a eventos de bianualidad (Hemberlorg y Karlsson, 1999).

Aún considerando que existen diferencias en el costo reproductivo según el sexo, la edad de los árboles del Aceituno es otro factor a considerar. En un estudio realizado por Obeso *et al.*, (1998) a lo largo de 30 años, se concluyó que la aparición del dimorfismo sexual ocurre conforme aumenta la edad de los árboles. En el caso de *S. glauca*, los individuos estudiados tenían 10 años de edad y se encontraban en transición a la fase adulta (cambio de fase). Por lo tanto, es posible que las diferencias en el costo reproductivo no hayan ejercido aún efectos significativos sobre el patrón de crecimiento y la morfología de los individuos hembras y machos.

Se observaron diferencias significativas entre individuos juveniles y adultos en la altura y el diámetro del tronco, y el área y el peso foliar. Los juveniles presentaron menor altura y menor diámetro del tronco que los adultos, lo cual sugiere que los árboles juveniles del Aceituno requieren alcanzar un tamaño mínimo a partir del cual se puede iniciar la etapa reproductiva (Robinson y Wareing, 1969; Donovan y Ehleringer, 1991), tal y como sucede en muchas plantas anuales. Una mayor área y peso foliares puede conferir a los árboles juveniles mayor capacidad fotosintética para satisfacer las altas tasas de crecimiento características de la juvenilidad (Donovan y Ehleringer, 1991).

VARIABLES FISIOLÓGICAS

Potencial hídrico

El potencial hídrico (Ψ_w) es un indicador del estado hídrico de las plantas. Valores bajos indican que las plantas experimentan estrés hídrico creciente o que deben desarrollar mayores gradientes de Ψ_w para mantener flujos adecuados de savia hacia las copas y satisfacer la demanda evaporativa de la atmósfera. Por el contrario, valores relativamente altos de Ψ_w significan que los tejidos están bien hidratados y que los estomas pueden mantenerse abiertos durante mayor tiempo. Individuos hembras y machos del Aceituno no presentaron diferencias significativas en Ψ_w ,

medido en la madrugada y al medio día (Cuadro 5). Esto indica que el estado hídrico, la respuesta a la estacionalidad climática y a las diferencias en la demanda evaporativa de la atmósfera a lo largo del día no difirió entre hembras y machos, lo cual reafirma la posible ausencia de diferencias en el costo reproductivo argumentado en la sección anterior. Esto es además respaldado por la proporción de machos a hembras observada en el campo, 1:1.

El comportamiento fisiológico en la fase vegetativa y en la fase reproductiva podría ser muy diferente, como una consecuencia de demandas diferentes de asimilados por parte de individuos hembras y machos. Esto se vería expresado en tasas de fotosíntesis superiores en hembras que en machos, lo cual implicaría mayor demanda de agua en la fase reproductiva en dicho sexo. Sin embargo, el Ψ_w se mantuvo igual en la fase vegetativa y reproductiva tanto en hembras como en machos (Figura 2 Cuadro 5). Esto indica que la reproducción no causó ningún cambio en el estado hídrico de los individuos evaluados que no mostraron ningún síntoma de estrés hídrico. *S. glauca* posee hojas suculentas (Brenes *et al.*, 1996, Holdridge *et al.*, 1997) que pueden servir para el almacenamiento del agua. Al ser una especie siempre verde es posible que las raíces tengan acceso a la tabla de agua durante todo el año lo que les permite satisfacer la demanda de agua durante la reproducción sin necesidad de experimentar estrés que resulte en un bajo Ψ_w de las plantas.

El potencial hídrico de los juveniles puede ser muy distinto al de los adultos (Donovan y Ehleringer, 1992), sin embargo no ocurrió en el Aceituno. El acceso al agua podría ser restringido para los juveniles con raíces menos profundas, aunque observaciones detalladas del perfil del suelo en el sitio de estudio sugieren que la tabla de agua se encuentra cerca de la superficie ² lo que hace posible que los juveniles tuvieran el mismo acceso a la tabla de agua que los adultos. Esto disminuye la posibilidad de que los árboles juveniles experimenten mayor estrés

hídrico por necesitar mayor cantidad de agua para el crecimiento vegetativo con respecto a los adultos (Donovan y Ehleringer, 1992).

El análisis estadístico (Cuadro 5) evidenció diferencias significativas en el Ψ_w medido en la madrugada y al medio día. El Ψ_w de la planta se iguala al Ψ_w del suelo durante la noche (Ritchie y Hinckley, 1975), permitiendo la recuperación hídrica de la planta en la medida que la disponibilidad de agua del suelo lo permita. Conforme la radiación aumenta y la apertura de los estomas se inicia, la transpiración conduce gradualmente al desarrollo de tensiones en el xilema que se manifestaron en reducciones en el Ψ_w de las hojas. A medio día las plantas experimentan el máximo estrés (Ritchie y Hinckley, 1975) debido a que hay mayor radiación y la humedad atmosférica es mínima. La ausencia de diferencias en el Ψ_w medidos en esta hora indica que hembras, machos y juveniles no responden de manera diferente a la disponibilidad de agua en el suelo ni a la humedad atmosférica, ésta última inicialmente percibida por los estomas y discutida en la sección siguiente.

La variación entre las categorías de plantas evaluadas (hembras, machos y juveniles) fue significativamente mayor al medio día que en la madrugada (Cuadro 5). El Ψ_w medido a medio día dependió más de las condiciones fisiológicas y microambientales de cada individuo, las cuales variaron considerablemente a lo largo del día. Por el contrario, el Ψ_w medido en la madrugada depende del Ψ_w del suelo, el cual es homogéneo a través del sitio de estudio.

Conductividad estomática

La apertura estomática responde, entre otras cosas, a las diferencias entre la humedad dentro de la hoja (100%) y la humedad ambiental (Meinzer 1993). La apertura de los estomas está además correlacionada con la fotosíntesis (Wong *et al.*

² Ordoñez, H. 2002. Comunicación personal. Universidad de Costa Rica.

1979) ya que permite la entrada de dióxido de carbono y la salida del oxígeno. Los ciclos diurnos de g_s (Figura 3) revelarían diferencias en el comportamiento de las hembras, machos y juveniles a lo largo del día, en la medida en que estas categorías difieran en su sensibilidad a las variables atmosféricas o en su tasa fotosintética, tanto en la etapa vegetativa como en la reproductiva.

La mayor apertura estomática y el máximo potencial hídrico de las hojas permitieron un mayor intercambio gaseoso y de fotosíntesis. Conforme avanza el día los estomas se cierran progresivamente hasta alcanzar los valores más bajos de g_s en la tarde (Figura 3). En contraste, los valores más altos de g_s se observaron a mediados de la mañana durante la fase reproductiva (Figura 3 y Figura 4), comportamiento que pareció estar más relacionado con el clima que con la fenología de las plantas. Las capas superficiales del suelo, donde se concentra la población de raíces finas de *S. glauca*³, responsables de la absorción del agua y los nutrimentos minerales contenían menos agua durante la época seca que durante la época lluviosa (Figura 1). La recuperación del estado hídrico de las plantas durante la noche puede hacerse por lo tanto más difícil bajo condiciones de reducido contenido de agua en la superficie del suelo, obligando a las plantas a transportar el agua absorbida por las raíces más profundas en capas inferiores del perfil del suelo. Esto puede ocasionar un retraso en la disponibilidad máxima de agua (máxima g_s) en la época seca en relación a la época lluviosa. Estas diferencias en el comportamiento estomático a lo largo del día y según la fase fenológica, o más bien según la estacionalidad climática, se evidenciaron en el análisis estadístico (Cuadro 5).

Una mayor g_s puede ser una característica de los árboles hembras para satisfacer un mayor costo reproductivo, financiado a través de altas tasas fotosintéticas. De manera semejante, mayor g_s en los árboles machos puede ser el resultado de menores demandas de recursos hídricos y orgánicos que las hembras, lo que permite a los individuos de este sexo realizar más intercambio gaseoso (Dawson y

Ehleringer, 1993). En el caso de *Simarouba glauca*, no hubo diferencias significativas entre hembras y machos (Cuadro 5), lo que respalda la sugerencia de que el costo reproductivo es semejante en hembras y machos de esta especie, o que los árboles aún no se han desarrollado lo suficiente como para expresar el dimorfismo. Tampoco se observaron diferencias en g_s de individuos juveniles e individuos adultos, en concordancia con los resultados obtenidos en las mediciones de potencial hídrico.

Estos resultados, que indican ausencia de diferencias en intercambio gaseoso entre individuos hembras y machos, son consistentes con una asignación similar de los recursos minerales esenciales para la fotosíntesis, nitrógeno y fósforo, ambos involucrados directamente en el control de la tasa de asimilación. Lo anterior fue también cierto para individuos juveniles comparados con los adultos y reproductivos.

EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La separación del material genético se dificultó por la presencia de un precipitado que se formó cuando se agregó el etanol (70%). Esta sustancia es posiblemente un polisacárido que se disuelve en agua pero que precipita en una solución de alcohol⁴. Las moléculas de ADN pueden precipitar con este polisacárido obteniéndose eficiencias muy bajas de extracción si este se elimina. La presencia de la sustancia dificulta la resuspensión y dilución del ADN lo que repercute también en la eficiencia de extracción. La presencia de esta sustancia y otros contaminantes se evidenció en las relaciones de OD_{260}/OD_{280} obtenidas, típicamente menores de 2.0. Esto es común en especies de la familia Simaroubaceae, las cuales presentan gran cantidad de metabolitos secundarios, dificultando la extracción y limpieza del material genético.

³ Hordóñez, 2002; Comunicación personal. Universidad de Costa Rica.

⁴ Villalobos, 2002. Comunicación personal. Centro de Investigación en Biología celular y Molecular.

La temperatura de hibridación óptima fue de 34°C para los imprimadores Dec1 y el Dec2. Es común tener temperaturas de hibridación bajas cuando se utilizan decámeros (Gresshoff, 1997) ya que la unión es menos específica y el tamaño pequeño facilita la hibridación. La temperatura óptima fue igual para ambos imprimadores ya que su cantidad relativa de pares de bases fueron similares en ambas secuencias.

MARCADORES MOLECULARES

El fragmento amplificado por el imprimador Dec1 en *Simaoruba glauca* presentó un tamaño diferente al fragmento amplificado en *Silene latifolia* (Mulcahy *et al.*, 1992). En *S. latifolia* , el decámero amplificó una banda de 750 pb en los individuos machos únicamente, mientras que en el Aceituno amplificó una banda superior a las 1000 pb tanto en machos como en hembras (Figura 6). Esto significa que el fragmento amplificado fue diferente en ambas especies o que la cadena amplificada en *S. glauca* contenía otras regiones de ADN ausentes en *S. latifolia*.

La determinación del sexo de los árboles de *S. glauca* no fue posible con este imprimador. Es posible que hayan regiones de ADN diferentes entre hembras y machos del Aceituno, pero que el imprimador haya amplificado una región no ligada al sexo, a diferencia de la región amplificada en *Silene latifolia*. Otra posibilidad es que el imprimador haya amplificado una región similar a la amplificada en *S. latifolia*, pero que en *S. glauca* esta región se presente tanto en hembras como en machos, y que su expresión esté controlada más bien por factores ambientales.

El imprimador Dec 2 presentó una respuesta menos específica que el Dec 1, ya que amplificó varias regiones del ADN (Figura 7). Tampoco fue posible diferenciar entre hembras y machos del Aceituno utilizando el Dec2, lo cual sugiere los mismos argumentos explicados para el Dec1. La región amplificada en *S. latifolia*

corresponde a una banda de 1350 pb, la cual podría estar presente en *S. glauca* tal y como se observa en el patrón de bandas de la Figura 7.

El producto de amplificación del Dec2 se corrió en un gel de poliacrilamida para observar con más detalle el patrón de bandas encontrado en hembras y machos (Figura 8). Se comprobó que no existían diferencias en las regiones amplificadas según el sexo y por lo tanto, este imprimador no diferenció individuos hembras y machos de *Simarouba glauca*, al menos en las condiciones y con el programa de amplificación utilizado en este estudio.

Los marcadores moleculares generados por la técnica de RAPD para diferenciar el sexo de los individuos de las especies dioicas, suelen ser muy específicos y funcionan generalmente solo para la especie en estudio o especies muy cercanas del mismo género (Avery *et al.*, 1998). Esto se evidenció en el presente estudio ya que los imprimadores utilizados que sirvieron para diferenciar el sexo en *S. dioica*, no funcionaron en *S. glauca*. Otra posible explicación para la ausencia de diferencias entre hembras y machos en las regiones amplificadas, es que el Aceituno no posea diferencias genéticas según el sexo, lo que podría sugerir que la determinación y expresión del sexo en esta especie puede depender más de las condiciones ambientales bajo las que crecen las plantas.

CONCLUSIONES

Los individuos hembras y machos de *Simarouba glauca* no difirieron en las características morfológicas y fisiológicas evaluadas en este estudio probablemente porque el costo reproductivo es igual para ambos sexos. Es necesario por lo tanto evaluar el costo de la reproducción en términos de biomasa y concentración de nutrientes, y hacerlo a lo largo del tiempo para determinar si el costo es constante o existe diferencias en la frecuencia de reproducción.

Si los individuos hembras y machos de *S. glauca* difieren en el costo reproductivo, la manifestación del dimorfismo sexual no se observó posiblemente debido a la corta edad de los árboles, que apenas se encontraban en su primer o segundo año de actividad reproductiva. El estudio de individuos más adultos o bien, la continuación del estudio de los mismos árboles podría evidenciar si el dimorfismo sexual se presenta después de repetidas reproducciones de los individuos.

Los árboles juveniles presentaron menor altura y diámetro del tronco con respecto a los adultos debido a que los juveniles requieren aparentemente alcanzar un tamaño mínimo a partir del cual se puede iniciar la etapa reproductiva. Los juveniles presentaron mayor área y peso foliar que los adultos, posiblemente porque muestran mayor tasas de crecimiento que los adultos. Se requiere continuar con la investigación de individuos juveniles sobre todo en hábitats naturales donde exhiben la mayor mortalidad y estudiar los mecanismos que desarrollan para sobrevivir en el estacional clima de bosque tropical seco.

Las relaciones hídricas de los individuos juveniles no difirieron de los adultos debido posiblemente a que los juveniles tienen acceso a la tabla de agua en la misma medida que los árboles adultos reproductivos. Muy pocos estudios involucran el sistema radical y con esta investigación se observó la necesidad de estudiar los acontecimientos que se desarrolla debajo de la superficie, incluyendo las condiciones edáficas y el comportamiento morfológico y fisiológico de las raíces.

Los imprimadores Dec1 y Dec2 no funcionaron como marcadores moleculares del sexo en *S. glauca*. Los marcadores moleculares del sexo son muy específicos para la especie en estudio, y su utilización en otras especies puede no producir resultados satisfactorios. La búsqueda de imprimadores del sexo que se puedan utilizar en otras especies debe continuar y para ello se deben probar nuevos imprimadores en *S. glauca*. Se recomienda utilizar imprimadores que han sido exitosos en árboles tropicales tales como los obtenidos por Villalobos (2000) o bien, generar imprimadores específicos para el Aceituno.

Este trabajo es un primer paso hacia el estudio integral de las especies dioicas en el bosque tropical seco de nuestro país. Es necesario comprender el comportamiento de las especies en dicho hábitat y con ello establecer las mejores estrategias de conservación y aprovechamiento de las especies arbóreas. Costa Rica posee un gran potencial ecológico y es nuestra obligación conservar y manejar racionalmente estos recursos de tal forma que no pongamos en peligro el equilibrio de la naturaleza y con ello nuestra propia existencia.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSEN, R; EVANS, P; FAIRBANKS, D; RUAS, C; RUAS, P. y STUTZ, H. 1998. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae). American Journal of Botany 85: 162-167.

AGREN, J. 1988. Sexual differences in biomass and nutrient allocation in the dioecious *Rubus chamaemorus*. Ecology 69 (4): 962-973.

AVERY, A; DI STILLO, V; KESELI, R; MULCAHY, D; REHMAN, F. y ZHANG, Y. 1998. Y chromosome specific markers and evolution of dioecy in the genus *Silene*. Genome 41: 141-147.

BAWA, K. y OPLER, P. 1975. Dioecism in tropical forest trees. Evolution 29: 167-179.

BAWA, K. y OPLER, P. 1977. Why are pistillate inflorescences of *Simarouba glauca* eaten less than staminate inflorescences? Evolution 32: 673-676.

BAWA, K. y OPLER, P. 1978. Sex ratio in tropical forest trees. Evolution 32: 812-821.

BAWA, K.; BEACH, J. y BULLOCK, S. 1983. Episodic flowering and sexual dimorphism in *Guarea rhopalocarpa* in a Costa Rica rain forest. Ecology 64:851-861.

BELLO, N y SANCHEZ, A. 1999. The identification of sex-specific DNA markers in the ostrich using a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Molecular Ecology 8: 667-669.

BERNIER, G; HAVELANGE, A; HOUSSA, C; PETITJEAN, A y LEJEUNE, P. 1993. Physiological signals that induce flowering. The Plant Cell 5: 1147-1155.

BRENES, G.; MOLINA, M. y MORALES, D. 1996. Descripción y viverización de 14 especies forestales nativas del bosque tropical seco. Grecia, Costa Rica: Editorial Estera. 91 p.

CHARLESWORTH, D. 1999. Theories of the evolution of Dioecy. *In: Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Berlín: Springer Verlag. 305p.

CIPOLLINI, M. y STILES, E. 1991. Cost of reproduction in *Nyssa sylvatica*: sexual dimorphism, reproductive frequency and nutrient flux. *Oecología* 86: 585-593.

COLASANTI, J; YUAN, Z y SUNDARESAN, V. 1998. The indeterminate gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in Maize. *Cell* 93: 593-603.

DARWIN, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. Murray, London, England.

DAWSON, T. y BLISS, L. 1989. Patterns of water use and the tissue water relations in the dioecious shrub, *Salix artica*: the physiological basis for habitat partitioning between the sexes. *Oecología* 79: 332-343.

DAWSON, T. y GEBER, M. 1999. Sexual dimorphism in Physiology and Morphology. *In: Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Berlin: Springer- Verlag. 305p.

DAWSON, T. y EHLERINGER, J. 1993. Gender-specific physiology, carbon isotope discrimination, and habitat distribution in Boxelder, *Acer negundo*. *Ecology* 74 (3):798-815.

DELPH, L. 1990. Sex differential resource allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology* 71: 1342-1351.

DELPH, L. 1999. Sexual Dimorphism in Life History. *In: Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Berlin: Springer- Verlag. 305p.

DEMO, R. y KRISCHIK, V. 1990. Differences in environmental response between the sexes of the dioecious shrub, *Baccharis halimifolia* (Compositae). *Oecología* 83: 176-181.

DOLEZEL, J; KEJNOVSKY, E; MATSUNAGA, S; SIROKY, J; SOUCEK, P; VRANA, J. y VYSKOT, B. 2001. Localization of male- specifically expressed MROS genes of *Silene latifolia* by PCR on flow-sorted sex chromosomes and autosomes. *Genetics* 158: 1269-1277.

DONOVAN, L. y EHLERINGER, J. 1991. Ecophysiological differences among juvenile and reproductive plants of several woody species. *Oecología* 86: 594-597.

DONOVAN, L. y EHLERINGER, J. 1992. Contrasting water use patterns among size and life history classes of a semi-arid shrub. *Functional Ecology* 6: 482-488.

DOUST, L.J; DOUST, L.L. y O BRIEN, G. 1987. Effect of density on secondary sex characteristics and sex ratio in *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 74 (1): 40-46.

EDWARDS, K. y KARP, A. 1997. DNA markers: a global overview. *In: DNA markers: Protocols, applications, and overviews*. New York, USA: Wiley Liss, Inc. 364p.

FRASER, L; GARDNER, R; GILL, G y HARVEY, C. 1998. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. Theoretical Applied Genetic. 97: 439-445.

FREEMAN, D.C; HARPER, K.T. y CHARNOV, E.L. 1980. Sex change in plants: Old and new observations and new hypotheses. Oecología 47: 222-232.

FREEMAN, C; HARPER, K. y KLIKOFF, L. 1976. Differential resource utilization by the sexes of dioecious plants. Science 193: 597-599.

FREEMAN, D. y VITALE, J. 1985. Secondary sex characteristics in *Spinacia oleracea* L: quantitative evidence for the existence of at least three sexual morphs. American Journal of Botany. 72: 1061-1066.

GRALTAPAGLIA, D. 1997. Opportunities and challenges for the incorporation of genomic analysis in Eucalyptus breeding. En: Recent Advances in Biotechnology For Tree. Florianopolis, Brazil: Institutional Foundation For Science. 334p.

GRANT, S. 1999. Genetics of gender dimorphism in higher plants. *In*: Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants. Alemania: Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 305p.

GRESSHOFF, P.1997. DNA markers: Protocols, applications, and overviews. New York, USA: Wiley-Liss, Inc. 364p.

GIMENEZ, A y ALVES, A. 1994. Methods to measure gaseous volume in plants. Revista Brasileira do Fisiologia Vegetal 6: 153-162.

HARRINSON, T. y FOX, J. 1981. Habitat assortment of sex and water balance in a dioecious grass. Oecología 49: 233-235.

- HEMBORG, A. y KARLSSON, S. 1999. Sexual differences in biomass and nutrient allocation of first- year *Silene dioica* plants. *Oecología* 118: 453 - 560.
- HOFFMANN, A. y ALLIENDE, M. 1984. Interactions in the patterns of vegetative growth and reproduction in woody dioecious plants. *Oecología* 61:109-114.
- HOLDRIDGE, L.; POVEDA, L. y JIMENEZ, Q. 1997. Árboles de Costa Rica, 2 ed. San José, Costa Rica: Centro Científico Tropical. 349-408 p.
- HORMANZA, J; DOLLO, L. y POLITO, V. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theoretical Applied Genetic* 89: 9-13.
- JANSEN, D. H. 1986. Guanacaste National Park: tropical, ecological and cultural restoration. San José, Costa Rica: EUNED. 168 p.
- JIMENEZ, Q. 1993. Árboles maderables en peligro de extinción en Costa Rica. San José, Costa Rica: INCAFO.
- JJIMENEZ, Q. y POVEDA, L. 1996. Lista actualizada de los árboles maderables de Costa Rica. Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Investigación y Servicio Forestal de la Universidad Nacional. 36p.
- KOHORN, L. 1994. Shoot morphology and reproduction in Jojoba: Advantages of sexual dimorphism. *Ecology* 75 (8): 2384-2394.
- KORPOLAINEN, H. 1992. Patterns of resource allocation in male and female plantas of *Rumex acetosa* and *R. acetollosa*. *Oecología* 89: 133-139.

LAPORTE, M. y DELPH, L. 1996. Sex specific physiology and source-sink relations in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Oecología* 106: 63-72.

LECHOWICZ, M. y ZIMMERMAN, J. 1982. Responses to moisture stress in male and female plants of *Rumex acetosella* L. (Polygonaceae). *Oecología* 53: 305-309.

LEVY, Y. y DEAN, C. 1998. The transition to flowering. *The Plant Cell* 10: 1973-1989.

LICOR Inc. 1989. LI-1600 Steady State Porometer Instruction Manual. Nebraska, USA. 35p.

LOGMAN, K. 1976. Some experimental approaches to the problem of phase change in forest trees. *Acta Horticulturae* 56: 81-90.

MEINZER, F.C. 1993. Stomatal control of transpiration. *Trends in Ecology and Evolution* 8:289-294

MULCAHY, L; WEEDEN, N; KESSELI, R y CARROLL, S. 1992. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sexual Plant Reproduction* 3: 1-3.

NICOTRA, A. 1998. Sex ratio variation and spatial distribution of *Siparuna grandiflora*, a tropical dioecious shrub. *Oecología* 115: 102-113.

O'MALLEY, D. y WHETTEN, R. 1997. Molecular markers and forest trees. *In: DNA markers: Protocols, applications, and overviews*. New York, USA: Wiley-Liss, Inc. 364p.

OBESO, J; ALVAREZ, M. y RETUERTO, R. 1998. Sex ratios, size distributions, and sexual dimorphism in the dioecious tree *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae). American Journal of Botany 85: 1602-1608.

PEREZ, R.; ALVARADO, A.; RAMIREZ, E. 1978. Manual descriptivo del mapa de asociaciones de subgrupos de suelos de Costa Rica. San José, Costa Rica. 89 p.

PHARMACIA BIOTECH, 1997. Hoefer[®] DyNA Quant 200 fluorometer user manual. California, USA. 55p.

RITCHIE, G.A. y HINCKLEY, T.M. 1975. The pressure chamber as an instrument for ecological research. Advances in Ecology Resources 9: 165-224.

ROBINSON, L. y WAREING, P. 1969. Experiments on the juvenile- adult phase change in some woody species. New Phyt. 68, 67-78.

ROCHELEAU, A. y HOULE, G. 2001. Different cost of reproduction for the males and females of the rare dioecious shrub *Corema conradii* (Empetraceae). American Journal of Botany 88: 659-666.

SAKAI, A. y SÉLLER, S. 1999. Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants: A review of Terminology, Biogeographic Patterns, Ecological Correlates, and Phylogenetic Approaches. *In: Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants.* Alemania: Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 305p.

SIMPSON, G; GENDALL, A. y DEAN, C. 1999. When to switch to flowering. Annual Review of Cell Development Biology 99: 519-550.

SPRECHMANN, P. 1984. Manual de geología de Costa Rica. San José, Costa Rica: EUCR. 320 p.

TOSI, J. 1969. República de Costa Rica. Mapa ecológico según clasificación de zonas del mundo de L.R. Holdridge. San José, Costa Rica, C.C.T. Esc. 1:750 000.

VILLALOBOS, H. 2000. Análisis genético molecular de tres valiosas especies nativas aderables de Costa Rica. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica. 109p.

WALLACE, C. y RUNDEL, P. 1979. Sexual dimorphism and resource allocation in male and female Shrubs of *Simmondsia chinensis*. Oecología 44: 34-39.

WINTERS, A. F. 1997. Soils of the pleistocene ignimbric Bagaces Formation, Guanacaste, Costa Rica. A report on two thesis: 1) A soil mapping project, and 2) a study on the physical aspects of soil genesis. Agricultural University of Wageningen, The Netherlands. 63 p.

WONG, S.C., COWAN, I.R. y FARQUHAR, G.D. 1979. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. Nature 282:424-426

ZEEVAART, J.A.D. 1958. Flower formation as studied by grafting. Wageningen: H. Veenman Zonen. 88p.

ZIMMERMAN, R. 1972. Juvenility and flowering in woody plants: a review. Hortscience 7(5): 447-455.

ZIMMERMANN, U; MEINZER, F; BENKERT, R; ZHU, J; SCHNEIDER, G; GOLDSTEIN, G; KUCHENBROD, E. y HAASE, A. 1994. Xylem water transport: is the available evidence consistent with the cohesion theory ? Plant Cell and Environment 17: 1169-1181.