

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

VARIACIÓN NATURAL EN CUATRO ESPECIES DE ROBLE, *QUERCUS* spp. EN LA
CORDILLERA DE TALAMANCA,
COSTA RICA

INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD PARA OPTAR POR EL GRADO DE
BACHILLER EN INGENIERÍA FORESTAL.

Xinia Quirós Camacho

Cartago, Noviembre 2001

VARIACIÓN NATURAL EN CUATRO ESPECIES DE ROBLE, *QUERCUS* spp. EN LA
CORDILLERA DE TALAMANCA,
COSTA RICA

Informe presentado a la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa
Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería Forestal

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Dr. Olman Murillo Gamboa
Profesor guía

M.Sc. Braulio Vílchez Alvarado

M.Sc. Quírico Jiménez Madrigal

Resumen

Se estudió la variabilidad en poblaciones naturales de robles, (*Quercus* spp.) de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica. En el primer capítulo se investigó la morfología foliar de cuatro especies de roble de poblaciones naturales ubicadas en Villa Mills (*Q. copeyensis* y *Q. costaricensis*, 2700m), El Empalme (*Q. copeyensis* y *Q. seemannii*, 2200m) y Copey de Dota (*Q. copeyensis* y *Q. corrugata*, 1800m). Se evaluó el largo del pecíolo, el largo y ancho de la lámina foliar y la relación largo/ancho de la lámina foliar. Se realizó un análisis de varianza para cada sitio con dos especies y para *Q. copeyensis* en los tres sitios. Se encontraron diferencias significativas entre las especies en cada sitio y diferencias altamente significativas en todos los caracteres entre individuos de cada especie. Para *Quercus copeyensis* se encontraron diferencias significativas entre los sitios y entre los árboles de cada sitio, y un patrón de variación clinal para los caracteres evaluados de una disminución de las dimensiones foliares con el aumento de altitud. En el análisis de los componentes de varianza para el *Q. copeyensis* se encontró que para el largo del pecíolo, el largo de la lámina foliar y la relación largo ancho, la varianza entre sitios presentó los porcentajes más altos: 48%, 52% y 43% respectivamente. Para el ancho de la lámina foliar el porcentaje más alto correspondió a la varianza entre las hojas de un mismo árbol: 40%.

Las principales características observadas en el campo se resumieron en una tabla que se propone como información básica para reconocer estas especies en el campo: *Q. copeyensis* se distingue principalmente por su fuste y tallos blancuzcos y hojas obadas, *Q. costaricensis* por su tronco oscuro y por encontrarse en sitios mayores a los 2400 msnm, mientras *Q. seemannii* presenta las hojas más lanceoladas y fuste grisáceo y *Q. corrugata* es la única especie con el borde de la lámina foliar aserrado y fustes rosáceos.

Se concluyó que la observación de las hojas de las especies estudiadas permite la adecuada diferenciación de estas y se consideró recomendable realizar estudios de este tipo para otras especies de *Quercus* y en otros sitios del país donde se ubiquen poblaciones de este género.

En el segundo capítulo se efectuaron pruebas de electroforesis de isoenzimas utilizando muestras de plántulas de la especie *Quercus copeyensis* y muestras colectadas en poblaciones naturales de las especies *Q. copeyensis*, *Q. costaricensis*, *Q. seemanii* y *Q. corrugata*. Se probaron los sistemas enzimáticos PGM, PGI, 6-PGDH, MDH, IDH, G-6PDH, MNR y SKDH; además se evaluaron dos buffer de extracción con los sistemas de Tris-HCl y Soltis and Soltis modificado con el fin de adaptar un protocolo para la investigación de la variabilidad en *Quercus* spp. Los resultados obtenidos no fueron favorables por lo que se señalan posibles fuentes de error en cada una de las etapas involucradas y se recomienda realizar más ensayos con el género *Quercus*.

Palabras claves: *Quercus copeyensis*, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemanii*, *Quercus corrugata*, roble, variabilidad, cline, isoenzimas, electroforesis, Cordillera de Talamanca.

Abstract

The natural variability was researched in natural populations of oaks, (*Quercus* sp) in the Cordillera of Talamanca, Costa Rica. In the first chapter the leaves's morphology was researched in four species of oaks in natural populations located in Villa Mills (*Q. copeyensis* and *Q. costaricensis*, 2700m), El Empalme (*Q. copeyensis* and *Q. seemannii*, 2200m) and Copey de Dota (*Q. copeyensis* and *Q. corrugata*, 1800m). The leaf's length and width and the petiole's length were assessed. A variation analysis was carried out for each site with two species at a time, and for *Q. copeyensis* in the three sites. Significant differences between species in each site and highly significant differences in all characters between individuals from each species were found. For *Quercus copeyensis* significant differences between sites and between trees within each population were obtained. A clinal variation pattern for the characteristics assessed from the decrease of the foliage dimensions with the increase in altitude was determined. A variance components analysis for *Quercus copeyensis* on its petiole length, the foliage length and the length-width ratio was performed. The variance among sites presented the highest proportion: 48%, 52%, and 43% for the petiole length, foliage length and width respectively. For the foliage width the highest proportion corresponded to the variance among leaves within the same tree (40%).

The main observed characters for each of the four tree species in the field were summarized in a table which proposed basic information to recognize them in the field: *Q. copeyensis* is recognized mainly because of its white stem and white little terminal branches. It has ovuled leaves. *Q. costaricensis* is distinguished because of its dark stem and being found only in sites above 2400m in elevation. While *Q. seemannii* has the longest and thin leaves and a grey stem. *Q. corrugata* is the only species with sawed-edge leaves and a pinky stem.

In conclusion, the observation from the leaves in the researched species allows a right differentiation of each one. Similar research for other *Quercus* species in other country sites is recommended.

In the second chapter were included the trial with electrophoresis and isozymes, based on seedling samples from the specie *Quercus copeyensis* and natural population samples from the species *Q. copeyensis*, *Q. costaricensis*, *Q. seemannii* and *Q. corrugata*. The enzymes systems PGM, PGI, 6-PGDH, MDH, IDH, G-6PDH, MNR and SKDH were tested, but with no acceptable results.

Key words: *Quercus copeyensis*, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii*, *Quercus corrugata*, oaks, variability , cline, isozymes , electrophoresis , Cordillera de Talamanca.

Índice General

Resumen.....	iii
Abstract.....	v
Índice General.....	vii
Índice de Cuadros.....	x
Índice de Figuras.....	xii
Dedicatoria.....	xiii
Agradecimientos.....	xiv
Introducción.....	1
Revisión general de literatura del género <i>Quercus</i>	3
COMPARACIÓN DE CARACTERES FOLIARES EN POBLACIONES NATURALES DE CUATRO ESPECIES DE ROBLE <i>QUERCUS</i> spp., DE LA CORDILLERA DE TALAMANCA.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Objetivos.....	8
Revisión de literatura.....	8
<i>Los robledales en Costa Rica</i>	8
<i>Variación de las hojas entre especies y dentro de las especies de roble</i>	10
Materiales y métodos.....	13
Resultados.....	14
<i>Variación foliar de cuatro especies de roble en poblaciones naturales de la Cordillera de Talamanca</i>	14
<i>Patrones de variación foliar entre y dentro de tres poblaciones naturales de <i>Quercus copeyensis</i></i>	17

<i>Propuesta para la identificación en el campo de cuatro especies de roble Quercus spp., en tres sitios de la Cordillera de Talamanca.....</i>	20
Discusión	22
<i>Variación foliar de cuatro especies de roble en poblaciones naturales de la Cordillera de Talamanca.....</i>	22
<i>Patrones de variación foliar entre y dentro de tres poblaciones naturales de Quercus copeyensis</i>	23
<i>Propuesta para la identificación en el campo de cuatro especies de roble Quercus spp. en tres sitios de la Cordillera de Talamanca.....</i>	24
Conclusiones y recomendaciones	26
Literatura citada	27
ANEXOS	30
Anexo 1	30
Anexo 2.....	30
ADAPTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE ISOENZIMAS POR ELECTROFORESIS EN ESPECIES DE ROBLE <i>QUERCUS spp.</i>	32
Resumen.....	33
Abstract.....	33
Introducción.....	34
Objetivo	35
Revisión de literatura.....	35
<i>Isoenzimas como marcadores moleculares</i>	35
<i>Técnica de estudio: la electroforesis</i>	36
<i>Interpretación de zimogramas</i>	37
Materiales y métodos	37
<i>Recolección de las muestras:.....</i>	37

<i>Preparación de geles de almidón</i>	38
<i>Extracción</i>	39
<i>Electroforesis</i>	39
<i>Revelado de isoenzimas</i>	40
<i>Prueba en la Universidad de Costa Rica</i>	41
Resultados.....	42
<i>Geles de almidón</i>	42
<i>Extracción</i>	42
<i>Electroforesis</i>	42
<i>Revelado de isoenzimas</i>	43
<i>Prueba en la UCR</i>	43
Discusión	43
<i>Gel de almidón</i>	44
<i>Extracción</i>	44
<i>Electroforesis</i>	45
<i>Revelado de las isoenzimas</i>	46
Conclusiones y recomendaciones	47
Literatura citada	48
ANEXOS	49
ANEXO 1	49
ANEXO 2	50
<i>Continuación del Anexo 2</i>	51

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Análisis de varianza de cuatro características de las hojas de <i>Quercus costaricensis</i> y <i>Quercus copeyensis</i> , en la localidad de Villa Mills, Cartago (2900 msnm).	15
Cuadro 2. Análisis de varianza de cuatro características de las hojas de dos especies de roble, <i>Quercus seemannii</i> y <i>Quercus copeyensis</i> , en la localidad de El Empalme, Cartago (2200 msnm).	15
Cuadro 3. Análisis de varianza de cuatro características de las hojas de <i>Quercus corrugata</i> y <i>Quercus copeyensis</i> en la localidad de Copey de Dota, San José (1800 msnm).	16
Cuadro 4. Análisis de varianza de la medición de cuatro caracteres foliares de árboles de <i>Quercus copeyensis</i> provenientes de tres poblaciones naturales.	17
Cuadro 5. Porcentajes de varianza para cuatro caracteres foliares de árboles de <i>Q. copeyensis</i> de tres poblaciones naturales de la Cordillera de Talamanca.	19
Cuadro 6. Promedio y error estándar para las variables evaluadas en <i>Quercus copeyensis</i> de tres sitios de la Cordillera de Talamanca.	30
Cuadro 7. Cálculos de los porcentajes de varianza para cuatro caracteres foliares de árboles de <i>Quercus copeyensis</i> en tres sitios de la Cordillera de Talamanca.	30
Cuadro 8. Componentes de varianza para cada una de las fuentes de variación de cada uno de los caracteres investigados.	31
Cuadro 9. Composición de los geles utilizados en las pruebas de electroforesis para cuatro especies de roble (<i>Quercus spp.</i>).	38
Cuadro 10. Condiciones de corrido utilizadas en diferentes pruebas de electroforesis de isoenzimas para cuatro especies de roble, <i>Quercus spp.</i>	40
Cuadro 11. Sistemas probados para el revelado de isoenzimas en cuatro especies de roble, <i>Quercus spp.</i>	40

Cuadro 12. Composición de tres buffer de extracción utilizados en la maceración de muestras de para electroforesis de isoenzimas en cuatro especies de roble, (<i>Quercus</i> spp.).....	49
Cuadro 13. Composición de los sistemas utilizados en las pruebas de tinción de isoenzimas en cuatro especies de roble (<i>Quercus</i> spp.).....	50

Índice de Figuras

Figura 1. Variación clinal de 4 características de la hoja de <i>Quercus copeyensis</i>	18
Figura 2. Información para la identificación en el campo de cuatro especies de roble, <i>Quercus</i> spp. en tres sitios de la Cordillera de Talamanca.	21
Figura 3. Ejemplo de un mapa de corrido para electroforesis de isoenzimas para cuatro especies de roble (<i>Quercus</i> spp.).....	39

Dedicatoria

A mi papá (q d D g) por su ejemplo de honradez, humildad y responsabilidad.

A mi mamá por todo su amor y apoyo.

A mi hermana y hermanos por su ayuda y apoyo durante estos años de estudio.

A mi prima y mejor amiga Silvia por su apoyo

A los robledales de Costa Rica

“Los friolentos robles han tenido que cubrirse con musgos y los más añosos se dejaron crecer su “barba de viejo”. En las axilas de las ramas tiritan las orquídeas, y se descuelgan por los bejucos los quejidos del robledal.”

De “Un grito”
Carlos Salazar Herrera

Agradecimientos

A Dios por ser mi guía y mejor amigo en todos los momentos de mi vida, por darme tanto cada día.

A mi profesor guía, el Dr. Olman Murillo G., por confiar en mi para la realización de este trabajo, por toda su ayuda, consejos y apoyo. Gracias siempre.

A los profesores lectores, M. Sc. Braulio Vílchez A. y M. Sc. Quirico Jiménez M, por sus valiosas sugerencias para este trabajo.

A la escuela de Biología por permitirme realizar parte de este trabajo en el Laboratorio de Biología Molecular.

A los ingenieros en biotecnología Emmanuel Araya e Iván Rodríguez por toda su ayuda en el trabajo de laboratorio.

A la ingeniera Yorleny Badilla por su colaboración en el análisis estadístico y por brindarme su amistad.

A los profesores de la Escuela de Ingeniería Forestal del ITCR, quienes durante estos años contribuyeron a mi formación profesional.

A todos mis compañeros durante estos años de estudio y muy especialmente a aquellos que además me han brindado su valiosa amistad: Laura, Wagner (Pin), Cristina, Jorge, Ginna, Juan Manuel, Ángela, Alfonso, Sofía, Luis (Cach), Esteban, Vinicio y Antonio (Chaca).

Introducción

La preocupación por la pérdida de bosques naturales en el mundo ha llevado a buscar razones que justifiquen la protección de estos y garantizar así su permanencia. Una de estas razones es la biodiversidad, la cual en el caso de nuestro país es considerada muy alta según las investigaciones realizadas hasta hoy.

El concepto de biodiversidad involucra cualquier tipo de variabilidad en el mundo vivo, tal como riqueza y abundancia de especies, distribución geográfica de las especies, variabilidad genética o distribución de la variabilidad genética, (Valverde y Paredes-López, 1996).

Por lo anterior, se entiende que el estudio de la biodiversidad puede hacerse desde distintos puntos, por ejemplo por medio de la variabilidad genética en poblaciones forestales. Al ser las poblaciones grupos de individuos de la misma especie que se encuentran ocupando un área dada y se entrecruzan, es decir, que comparten un territorio geográfico delimitado por el contacto de apareamiento (Starr y Taggart 1989, Zobel y Talbert 1988, Murillo 2001), las alteraciones que sufren debido a las intervenciones del hombre repercuten directamente en dicha variabilidad y por lo tanto en la biodiversidad.

La variabilidad genética es un fenómeno común en la naturaleza, necesario para la evolución de los organismos y que se observa tanto a nivel de individuos como de poblaciones, en donde las diferencias se encuentran entre grupos de individuos y pueden ser predecibles o aleatorias (Valverde y Paredes-López, 1996, Zobel y Talbert, 1988).

Una de las formas de estudiar la variabilidad genética entre poblaciones forestales y dentro de estas es por medio de los llamados marcadores genéticos, los cuales se caracterizan como morfológicos y moleculares. Los primeros son caracteres que se pueden detectar fácilmente en un organismo, como la forma de las hojas, los cuales presentan la desventaja de verse afectados por las condiciones ambientales. Por su parte entre los marcadores moleculares se encuentran los marcadores proteínicos o isoenzimas (Valverde y Paredes-López, 1996).

Ambos tipos de marcadores pueden ser utilizados para caracterizar la variabilidad en poblaciones naturales de especies forestales y determinar la influencia que ejerce el ambiente y con los resultados que se obtengan en este tipo de estudios generar información útil que relacione el estado de las poblaciones con las condiciones del sitio de crecimiento; por ejemplo, la variabilidad de una especie que crezca en lugares con diferentes condiciones de clima, suelo, etc., o la variabilidad entre especies distintas que se encuentren en un mismo sitio.

El presente trabajo busca conocer esta relación en poblaciones naturales de cuatro especies de roble, *Quercus* spp., ubicadas en tres sitios de la Cordillera de Talamanca. Para esto se realizaron dos estudios con las especies *Quercus copeyensis*, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii* y *Quercus corrugata*. En el primero se evaluaron caracteres de las hojas de estas especies para establecer la variación que se presenta entre los sitios, entre los individuos y entre las hojas de un mismo árbol. En el segundo estudio se realizaron pruebas con la técnica conocida como electroforesis para los marcadores proteínicos o isoenzimas, con el propósito de adaptar un protocolo de investigación para este género.

Revisión general de literatura del género *Quercus*.

La familia Fagaceae consta de 8 géneros compuestos de unas 500 especies presentes en las zonas frías de ambos hemisferios y en las tierras altas del trópico (Burger, 1977). El género *Quercus* es el único representante en Costa Rica de esta familia, con aproximadamente 12 especies que se ubican en las partes altas de las cordilleras, excepto el *Quercus oleoides*, el cual crece en elevaciones bajas en la provincia de Guanacaste (Jiménez, et al, 1999).

Los árboles de este género se reconocen por presentar hojas coriáceas, simples, en posición alterna en una espiral, pecioladas o subsésiles, con venas que se extienden generalmente más allá de los márgenes y sabia incolora; las estipulas asociadas son intrapeciolares y caedizas, además, es característico observar el agrupamiento de yemas al final de las ramas con estipulas caedizas asociadas a ellas, (Burger, 1977 y Jiménez, et al, 1999). Las ramas jóvenes son lisas pero pueden presentar lenticelas, las inflorescencias son axilares y emergen de los crecimientos nuevos, generalmente son unisexuales: las flores femeninas son solitarias y las masculinas se presentan en racimos (Jiménez, et al, 1999 y Morales, 2001). Con respecto a los frutos, Morales (2001) y Burger (1977) mencionan que son nueces, rodeados basal o totalmente por una copa involucral y con una semilla por fruto, con un período de maduración de 1 o 2 años.

Comúnmente a estos árboles se les conoce como Robles o Encinos, (Morales, 2001) y de todas las especies reportadas cuatro se consideran maderables y algunas son usadas para producir carbón, (Jiménez, et al, 1999). En general se ubican sobre los 2000 m.s.n.m. en las partes medias y altas de las de las cordilleras. En la Cordillera de Talamanca las tres especies que más se han observado son *Quercus copeyensis* CH. Mueller (roble blanco, varsino), *Quercus costaricensis* Lieb. (encino blanco, roble encino) y *Quercus seemannii* Lieb. (encino, roble) (Kappelle, 1996).

COMPARACIÓN DE CARACTERES FOLIARES EN POBLACIONES NATURALES
DE CUATRO ESPECIES DE ROBLE *QUERCUS* spp., DE LA CORDILLERA DE
TALAMANCA

Xinia Quirós Camacho

Cartago, 2001

Resumen

Se identificaron poblaciones naturales de cuatro especies de roble en tres sitios pertenecientes a la Cordillera de Talamanca: *Q. copeyensis* y *Q. costaricensis* en Villa Mills; *Q. copeyensis* y *Q. seemannii* en El Empalme; y *Q. copeyensis* y *Q. corrugata* en Copey de Dota. De cada especie se escogieron al azar quince árboles y de cada uno de estos quince hojas a las que se les midió el largo del pecíolo, el largo y ancho de la lámina de la hoja y se calculó la relación largo/ancho de la hoja. Con estos datos se realizaron análisis de varianza entre las especies en cada sitio, entre individuos dentro de cada población, así como un análisis de varianza para *Q. copeyensis* presente en todos los sitios. Se encontraron diferencias significativas para todas las variables entre especies en los sitios de Villa Mills y El Empalme. En Copey de Dota no se encontraron diferencias entre las dos especies en el largo del pecíolo ni en la relación largo/ancho, sí para las otras dos variables. Para todas las variables entre individuos de cada especie en los tres sitios se encontraron diferencias significativas. En *Quercus copeyensis* se encontraron diferencias significativas entre los sitios y entre los árboles de cada sitio, además de un patrón de variación clinal para las características evaluadas. Para esta especie se calcularon los componentes de la varianza total, encontrándose que en los caracteres largo del pecíolo, largo de la lámina foliar y la relación largo/ancho la varianza entre los sitios presentó el porcentaje más alto dentro de la varianza total: 48%, 52% y 43% respectivamente y para el ancho de la lámina foliar el porcentaje más alto se obtuvo para la varianza entre las hojas de un mismo árbol con valor de 40%. Con las observaciones realizadas y parte de los resultados obtenidos se diseñó una tabla con información básica para la identificación en el campo en los tres sitios visitados de las cuatro especies evaluadas. Se concluyó que la observación de las hojas de cada una de las especies es suficiente para su reconocimiento y se recomienda la realización de estudios similares en otras especies de *Quercus* y en otros sitios del país donde se ubiquen poblaciones de este género.

Palabras claves: *Quercus copeyensis*, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii*, *Quercus corrugata*, roble, variabilidad, cline, Cordillera de Talamanca.

Abstract

Natural populations of four oak species in three sites in the Cordillera de Talamanca, Costa Rica were studied: *Quercus copeyensis* and *Quercus costaricensis* in Villa Mills, *Quercus copeyensis* and *Quercus seemannii* in El Empalme and *Quercus copeyensis* and *Quercus corrugata* in Copey de Dota. Fifteen trees of each species were chosen randomly and their leaf length, leaf width and petiole's length in fifteen leaves in each tree were measured. A variation analysis between species in each site, between individuals within each population and for *Q. copeyensis* present in the three sites was carried out. Significant differences for all characters between species in Villa Mills and El Empalme were found. In Copey de Dota were not found differences between species in the petiole's length and length-width ratio. For all characters significant differences among individuals of each species in the three sites were found. For *Quercus copeyensis* significant differences were found in all traits among sites and trees within site. A clinal variation pattern for the characteristics assessed was found. For these species a variance components analysis was performed: the variance among sites presented the highest proportion 48%, 52% and 43% for petiole length, leaf length and length-width ratio respectively. For the leaf width the highest proportion corresponded to the variance among leaves within the same tree (40%). The main observed field characteristics and the principal results were summarized in a table which proposes basic information for the identification of these three species in the field. It was concluded that the observation from the leaves of each species was enough for their correct differentiation. Similar research for other *Quercus* species in other country places is recommended.

Key words: *Quercus copeyensis*, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii*, *Quercus corrugata*, oaks, variability, isozymes, electrophoresis, Cordillera de Talamanca.

Introducción

En Costa Rica la familia Fagaceae solo está representada por el género *Quercus* con 12 especies que se reconocen en forma general por sus hojas coriáceas en posición alterna. Sin embargo, la identificación en el campo puede dificultarse debido a que la morfología de las hojas dentro de una misma especie es muy variable (Morales, 2001). Algunos autores como Burger (1977) y Morales (2001), consideran que este género tiene la habilidad de hibridarse entre especies similares y de producir poblaciones de gran variabilidad.

Se debe tomar en cuenta la influencia que puede ejercer la fragmentación de los bosques, donde se encuentran las poblaciones de estas especies, sobre los factores mencionados. De hecho, algunas poblaciones se localizan en sitios antes aprovechados en la extracción de madera, con grandes claros e incluso quedando solo unos cuantos individuos dentro de potreros o bosques secundarios.

Otro aspecto a considerar es la presencia de poblaciones de una misma especie en diferentes sitios, cada uno con sus propias características de altitud, clima, suelo, etc., lo cual puede influenciar la variabilidad de la especie; mientras que otras especies solo se localizan en lugares con ciertas características determinadas y por lo tanto la variación puede presentarse entre individuos de una misma población o dentro de cada individuo, por ejemplo diferencias entre las hojas de un mismo árbol.

Lo anterior representa una razón para realizar estudios entre especies y dentro de estas, que puedan mostrar diferencias relacionadas con los sitios donde crecen y el estado de las poblaciones. La comparación de las hojas puede proporcionar datos al respecto por medio de características morfológicas de las mismas.

Objetivos

- Comparar la variación foliar de 4 especies de roble, *Quercus* spp. en poblaciones naturales de la Cordillera de Talamanca.

- Determinar la magnitud y patrones de variación foliar entre y dentro de tres poblaciones naturales de *Quercus copeyensis*.

- Contribuir con la determinación taxonómica de los robles de la Cordillera de Talamanca.

Revisión de literatura

Los robledales en Costa Rica

En Costa Rica los robles no están representados por muchas especies, pero generalmente forman un grupo dominante en los bosques de las tierras altas (Burger, 1977). Morales (2001) afirma que pueden formar rodales bastante puros en los bosques donde crecen, por lo que a estos últimos se les conoce como robledales y se localizan principalmente entre los 2000 y los 3000 msnm, ocupando a menudo las laderas de las montañas. Gran parte del área cubierta por estos bosques se ha incluido en reservas forestales para dar protección al suelo y a las nacientes de agua (Jiménez *et al.*, 1988).

Las zonas de vida donde habitan los robles de altura, según el sistema internacional de clasificación de Holdridge (1978), son el bosque húmedo, muy húmedo y pluvial Premontano; el bosque húmedo y pluvial Montano Bajo y el bosque muy húmedo y pluvial Montano (Madrigal, 1997). En general, estas zonas de vida se caracterizan por las bajas temperaturas la mayor parte del año, entre los 6 y los 17 °C, con un período seco inexistente o no mayor a los cuatro meses anualmente y un tipo de bosque siempre verde, con árboles de estatura baja y media (10 a 35 m), alta presencia de epífitas y en las zonas más frías gran parte de la vegetación muestra hojas coriáceas (Bolaños y Watson, 1993).

Cuatro de las especies de roble más frecuentes que se pueden encontrar en estos bosques son el *Quercus copeyensis*, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii* y *Quercus corrugata*.

□ *Quercus copeyensis* C. H. Muller.

Especie dominante entre los 2000 y los 2800 m de altitud. Se le puede encontrar en la Cordillera Volcánica Central cerca de Zarcero en Alajuela hasta el Volcán Irazú, en los cerros de Escazú y en San José y a lo largo de la parte central de la Cordillera de Talamanca (Burger, 1977). Se reconoce fácilmente por sus tallos y troncos grisáceos a blanco grisáceos, las hojas son comúnmente enteras y presentan estípulas persistentes en las ramas jóvenes después del crecimiento, además de tener usualmente pubescencia a lo largo del nervio central en el envés (Morales, 2001).

□ *Quercus costaricensis* Lieb.

Especie restringida a las montañas altas entre los 2700 y los 3300 metros de elevación. Se conoce solo en una pequeña área en el oeste de las pendientes del Volcán Irazú y a lo largo de la Cordillera de Talamanca, (Burger, 1977). La corteza de los troncos se caracteriza por ser negra a negro marrón, lisa o con escasas lenticelas; sus hojas son enteras y moderadamente bulladas, (apariencia de ampollas), pueden ser densamente pubescentes o glabras, sésiles o con pecíolos de hasta 4 mm.; en material fresco son las hojas más coriáceas (Jiménez *et al.* 1999, Morales, 2001).

□ *Quercus seemannii* Lieb.

Se encuentra entre los 1400 y los 2400m de elevación en áreas de San Ramón y Zarcero en Alajuela, en la Cordillera Volcánica Central y a lo largo de la Cordillera de Talamanca (Burger, 1977). Las hojas presentan pecíolos desde 0.1 hasta 0.6 cm, son generalmente elípticas y acuminadas, enteras, glabras y con las estípulas rápidamente caedizas (Morales, 2001). Esta especie es morfológicamente muy variable por lo que en ausencia de material comparativo como frutos, podría ser difícil separarla de especies similares como el *Quercus tonduzii* (Jiménez *et al.*, 1999 y Burger, 1977).

- *Quercus corrugata* Hooker.

Esta especie se localiza en los bosques muy húmedos de la Cordillera de Talamanca y sus estribaciones, en los cerros de Puriscal (Zona Protectora La Cangreja), en altitudes de los 1000 a los 2000 metros (Morales, 2001). Las hojas presentan pecíolos desde 0.9 hasta 2.3 cm de longitud, se caracterizan por presentar el borde finamente aserrado (Morales, 2001 y Jiménez et al. 1999).

Variación de las hojas entre especies y dentro de las especies de roble

Para el género *Quercus*, Morales (2001), menciona que existe variabilidad en la morfología de sus hojas dentro de una especie y en una misma población se pueden encontrar diferencias morfológicas. De hecho, en una misma población los árboles individuales tienden a variar fuertemente entre ellos, aún cuando crezcan en condiciones ambientales similares (Murillo, 2001).

Las razones que explican este fenómeno pueden ser muchas, algunas se mencionan a continuación.

Según Zobel y Talbert (1988), todas las diferencias entre los árboles son el resultado de tres factores: las diferencias ambientales en las que crecen, las diferencias genéticas entre los árboles y la interacción entre estos dos factores.

Los factores ambientales que influyen en la variabilidad de los árboles se refieren a las condiciones que los afectan y que no son heredables. Algunos de estos factores pueden controlarse y manipularse, como aquellos relacionados con la competencia y el espaciamiento, que a su vez influyen en el suelo (pH, drenaje, erosión, escorrentía, etc) y en la disponibilidad lumínica, de agua y de nutrimentos. Otros factores ambientales no pueden ser controlados y son todos aquellos efectos que pueda ocasionar el medio natural donde se desarrolla el árbol, tales como calidad natural del sitio, pH, presencia de nutrimentos, disponibilidad de agua, acción del viento, duración de la época seca, temperaturas, presencia de predadores naturales, profundidad del suelo, pendiente, saturación de agua en el suelo y muchos otros más (Murillo 2001).

Con respecto a las diferencias genéticas que afectan la variabilidad, entre otros factores Murillo (2001) sita las fuerzas evolutivas más importantes que moldean a las poblaciones:

- Selección natural: determina cuáles individuos sobrevivirán y se reproducirán, afectando así la base genética de la población. Como resultado ocurre un aumento de aquellos genotipos mejor adaptados y la población reduce su variabilidad.

- Migración y flujo genético: cuando la semilla de una población es transportada hasta una segunda población y cuando el polen es transportado hasta una segunda población, respectivamente. Por otro lado la introgresión es el fenómeno que se da cuando una especie migra y se “introduce” dentro de otra, posterior a un proceso de hibridación, creando numerosos genotipos nuevos (recombinaciones). Estos nuevos híbridos naturales pueden llegar a ocupar nuevos nichos, con lo que la población aumenta su variabilidad y tamaño efectivo. También se puede decir que con la migración y el flujo genético se logra romper el aislamiento geográfico de la población.

- Mutación: La naturaleza siempre está “probando” nuevos intentos por mejorar a través de mutaciones, las cuales son un cambio en el código genético de un organismo con posibilidad de ser heredado, lo cual produce un aumento de la poza genética de la población.. La mayoría de las mutaciones son eliminadas por acción de las otras fuerzas naturales.

- Deriva genética: cuando una población de tamaño muy pequeño queda aislada del resto de poblaciones, se inicia el fenómeno de aumento de la consanguinidad o endogamia, al contar con muy pocos individuos efectivos con los que se pueda realizar intercambio genético. Al cabo de pocas generaciones todos los individuos estarán emparentados, compartiendo casi todo su ADN, lo que produce cambios en la base genética de la población disminuyendo su variabilidad.

□ Sistema de apareamiento o reproductivo: Distintos tipos del sistema de apareamiento (dioico, monoico, auto polinización, polinización cruzada o abierta, entre otros), afectan claramente la estructura genotípica de una población. Esto incluye la proporción de homocigotas y heterocigotas en la población.

Para las características relacionadas con el crecimiento la influencia del ambiente suele ser la causa más importante de variabilidad (Zobel y Talbert, 1988), además se sabe que la variación de los rasgos en la morfología puede presentarse de forma clinal, es decir a través de un cambio continuo siguiendo algún gradiente ambiental, sin fluctuaciones bruscas en el patrón de variación. Estas variaciones se asocian generalmente a los cambios graduales de temperatura o precipitación o a la interacción de ambas (Hocker, 1984).

Jiménez (1991) encontró que el largo del pecíolo, el ancho y el largo de la lámina foliar de jaúl (*Alnus acuminata* ssp. *Arguta*) en individuos de la región de El Empalme, muestran un comportamiento clinal al que denomina positivo, pues disminuyen su tamaño conforme aumenta la altitud.

Dentro de una población dada puede haber toda una serie de clinas para diferentes características y la variación de estas características puede o no estar fijada genéticamente (Zobel y Talbert, 1988). Si la variación de uno o varios caracteres no sigue ningún patrón ambiental definido entonces se trata de un ecotipo y representa una variación natural con alto control genético (Murillo, 2001).

Tomando como criterio la variación clinal en hojas de Pochote (*Bombacopsis quinata*), Calderón (1993) afirma que 4 poblaciones de esta especie ubicadas en sitios distintos tienden a ser diferentes pues a mayor altitud o mayor humedad del sitio mayor será el tamaño de las hojuelas.

A pesar de que gran cantidad de los robledales se encuentran en áreas protegidas han sufrido degradación producto de la deforestación (Kappelle, 1996). Esto tiene una relación directa con los efectos ambientales mencionados de la competencia y el espaciamiento los que modifican el ambiente lumínico el cual afecta a las plantas y en especial la estructura y funcionamiento de las hojas. Lo anterior se puede observar en las hojas de un mismo individuo que crecen en distintas posiciones de la copa, o entre ecotipos de una misma especie que se desarrollan en ambientes diferentes (Boardman, 1977, citado por Camacho y Bellefleur, 1996).

Por último se debe mencionar que las hojas de muchas plantas presentan un fenómeno llamado heterofilia: Las hojas de un vástago muestran variedad de formas alternativas que puede ser la transición gradual o abrupta de formas juveniles o adultas, o también la habilidad con que las hojas en desarrollo respondan a las condiciones ambientales prevalecientes (Flores, 1994).

Materiales y métodos

Se identificaron poblaciones naturales de las especies de roble *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii* y *Quercus corrugata*, en tres sitios pertenecientes a la Cordillera de Talamanca, Villa Mills (2900 msnm) , El Empalme (2200 msnm) y Copey de Dota (1800 msnm), respectivamente; así como de la especie *Q. copeyensis* en los tres sitios.

Estos sitios se encuentran en dos zonas de vida distintas: Villa Mills se localiza en la Zona de vida Bosque pluvial Montano. El Empalme y Copey de Dota comparten la misma zona de vida, el bosque muy húmedo-Montano Bajo.

Las poblaciones de Villa Mills se caracterizan por formar parte de un bosque característico o típico de la zona, el cual es administrado por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y es utilizado para realizar trabajos de investigación. Por otro lado, las poblaciones de El Empalme y Copey de Dota se encuentran en sitios cuya madera fue aprovechada anteriormente y en donde la mayor parte de la cobertura boscosa se perdió, quedando solo individuos de las especies mencionadas en pequeños grupos y algunos pocos de otras especies.

Las poblaciones fueron visitadas en los días 21, 25 y 30 de mayo. Por especie se seleccionaron 15 árboles según aparecían en los sitios y por árbol se colectaron muestras que consistieron de dos o tres ramas con suficiente cantidad de hojas en buen estado. Las hojas se identificaron debidamente para luego realizar el análisis respectivo.

De cada muestra correspondiente a un árbol se tomaron 15 hojas al azar, a cada una se le midió el largo del pecíolo, el largo y ancho de la lámina foliar en centímetros y se calculó la relación largo ancho de la lámina. Con los datos generados se realizó un análisis de varianza para cada sitio con dos especies y para la especie *Q. copeyensis* en los tres sitios, utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS, 1998).

Se registraron además otras características observadas en las hojas tales como textura, presencia de pubescencia y color de los tallos.

Con la información obtenida se diseñó una propuesta para la identificación el campo de las cuatro especies de roble estudiadas.

Resultados

Variación foliar de cuatro especies de roble en poblaciones naturales de la Cordillera de Talamanca

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico realizado para cuatro características evaluadas en las hojas de cuatro especies de roble se presentan para cada uno de los sitios donde se ubicaron las poblaciones naturales de estas especies.

En los cuadros 1 y 2 se resume el análisis de varianza para las dos especies de roble presentes en el sitio 1 (Villa Mills) y en el sitio 2 (El Empalme).

Cuadro 1. Análisis de varianza de cuatro características de las hojas de *Quercus costaricensis* y *Quercus copeyensis*, en la localidad de Villa Mills, Cartago (2900 msnm).

Variable	Fuente de variación	GL	SC Tipo III	CM	F	P>F
Largo pecíolo	Especie	1	1.97342	1.97342	234.75	<.0001
	Árbol (especie)	28	6.02035	0.21501	25.58	<.0001
Largo lámina	Especie	1	231.95708	231.95708	126.62	<.0001
	Árbol (especie)	28	1736.58626	62.020938	33.86	<.0001
Ancho lámina	Especie	1	110.11280	110.11280	216.10	<.0001
	Árbol (especie)	28	207.50497	7.41089	14.54	<.0001
Largo/ancho	Especie	1	4.27531	4.27531	48.61	<.0001
	Árbol (especie)	28	28.05702	1.00203	11.39	<.0001

Cuadro 2. Análisis de varianza de cuatro características de las hojas de dos especies de roble, *Quercus seemannii* y *Quercus copeyensis*, en la localidad de El Empalme, Cartago (2200 msnm).

Variable	Fuente de variación	GL	SC Tipo III	CM	F	P>F
Largo pecíolo	Especie	1	3.75380	3.75380	17.85	0.0002
	Árbol (especie)	28	5.88977	0.21034	13.05	<.0001
Largo lámina	Especie	1	263.58080	263.58080	89.55	<.0001
	Árbol (especie)	28	994.81564	35.52913	12.07	<.0001
Ancho lámina	Especie	1	600.8888889	600.8888889	1261.16	<.0001
	Árbol (especie)	28	118.7902222	4.2425079	8.90	<.0001
Largo/ancho	Especie	1	210.9885059	210.9885059	2000.09	<.0001
	Árbol (especie)	28	42.8303601	1.5296557	14.50	<.0001

En los cuadros 1 y 2 se observa que existen diferencias significativas para todas las variables evaluadas tanto entre las dos especies de cada sitio, como dentro de especies o entre individuos de una misma especie.

En el cuadro 3 se presenta el análisis de varianza para las dos especies presentes en el sitio 3 (El Empalme).

Cuadro 3. Análisis de varianza de cuatro características de las hojas de *Quercus corrugata* y *Quercus copeyensis* en la localidad de Copey de Dota, San José (1800 msnm).

Variable	Fuente de variación	GL	SC Tipo III	CM	F	P>F
Largo pecíolo	Especie	1	2.26135	2.26135	0.96	0.3345
	Árbol (especie)	28	65.67128	2.34540	9.92	<.0001
Largo lámina	Especie	1	520.56888	520.56888	7.89	0.0089
	Árbol (especie)	28	1846.34888	65.94103	11.90	<.0001
Ancho lámina	Especie	1	104.16055	104.16055	11.34	0.0022
	Árbol (especie)	28	257.22435	9.18658	11.77	<.0001
Largo/ancho	Especie	1	2.14315	2.14315	1.52	0.2277
	Árbol (especie)	28	39.44856	1.40887	10.84	<.0001

En el cuadro 3 se observa que no existen diferencias significativas para el largo del pecíolo entre el *Quercus corrugata* y el *Quercus copeyensis* en Copey de Dota. Sin embargo, si se obtuvieron diferencias entre los árboles dentro de cada especie. El largo y el ancho de las láminas foliares si exhibieron diferencias entre las especies y dentro de estas, mientras que la relación largo ancho tiene diferencia significativa dentro de las especies pero no entre estas.

Patrones de variación foliar entre y dentro de tres poblaciones naturales de Quercus copeyensis

Al encontrarse poblaciones naturales de la especie *Quercus copeyensis* en los tres sitios, el análisis estadístico dio resultados que permiten observar la variación foliar de la especie entre los sitios y entre los árboles de cada sitio; es decir entre y dentro de las tres poblaciones.

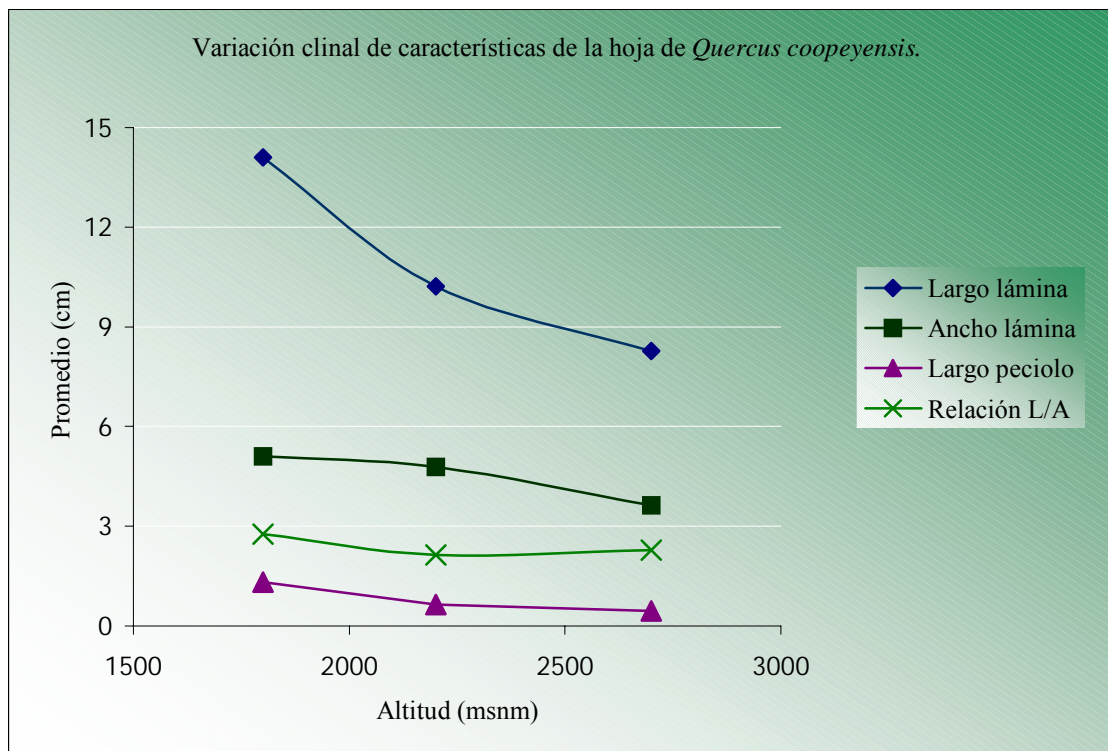
En el cuadro 4 se muestra el análisis de varianza para los cuatro caracteres medidos en las hojas de *Quercus copeyensis* provenientes de los sitios Villa Mills, El Empalme y Copey de Dota.

Cuadro 4. Análisis de varianza de la medición de cuatro caracteres foliares de árboles de *Quercus copeyensis* provenientes de tres poblaciones naturales.

Variable	Fuente de variación	GL	SC Tipo III	CM	F	P>F
Largo peciolo	Sitio	2	93.48328	46.74164	39.17	<.0001
	Árbol (sitio)	42	50.11324	1.19317	8.48	<.0001
Largo lámina	Sitio	2	3966.42900	1983.21450	32.32	<.0001
	Árbol (sitio)	42	2577.45315	61.36793	15.99	<.0001
Ancho lámina	Sitio	2	268.07902	134.03951	14.85	<.0001
	Árbol (sitio)	42	379.16977	9.02785	11.89	<.0001
Largo/Ancho	Sitio	2	49.66229	24.83114	38.46	<.0001
	Árbol (sitio)	42	27.11836	0.64567	6.42	<.0001

En el cuadro 4 se observa que todas las variables evaluadas tienen diferencias significativas tanto entre los sitios como entre los árboles de cada sitio para *Quercus copeyensis*.

La relación de las variables medidas con respecto a la altitud de los tres sitios, donde se encuentran las poblaciones naturales de *Quercus copeyensis* evaluadas, se presenta en la figura 1. El promedio calculado para cada variable medida se muestra en el anexo 1.



Excel

Figura 1. Variación clinal de 4 características de la hoja de *Quercus copeyensis*.

En la figura 1 se observa que las cuatro variables presentaron un cambio en su tamaño conforme aumentó la altitud, es decir se dio una variación clinal. El largo de la lámina fue la variable que mostró un cambio más fuerte conforme aumentó la altitud, presentando valores muy diferentes para cada sitio. De forma similar el ancho de la lámina foliar y el largo del peciolo disminuyeron su valor conforme aumentó la altitud pero el cambio fue mucho más continuo. La relación largo/ancho presentó el mismo comportamiento pero con valores muy similares para los tres sitios.

Se obtuvo además el porcentaje que corresponde a la varianza entre los sitios, la varianza entre los árboles dentro de cada sitio y la varianza dentro de un mismo árbol, es decir entre las hojas de este, con respecto a la varianza total para los caracteres evaluados. Estos porcentajes se presentan en el cuadro 5. Los cálculos respectivos se detallan en el anexo 2.

Cuadro 5. Porcentajes de varianza para cuatro caracteres foliares de árboles de *Q. copeyensis* de tres poblaciones naturales de la Cordillera de Talamanca.

Variable	Varianza entre sitios (%)	Varianza entre árboles dentro del sitio (%)	Varianza entre hojas de un mismo árbol (%)
Largo pecíolo	48,98	16,98	34,04
Largo lámina foliar	52,68	23,65	23,67
Ancho lámina foliar	29,77	29,54	40,68
Relación largo/ancho	43,99	14,87	41,13

Fuente: Anexo 2

En el cuadro 5 se puede observar que la varianza entre los tres sitios representó el porcentaje más alto de la varianza total para el largo del pecíolo, el largo de la lámina foliar y la relación largo ancho, 48.98%, 52.68% y 43.99% respectivamente. Para el ancho de la lámina foliar se obtuvo que la varianza entre las hojas de un mismo árbol representó el mayor porcentaje dentro de la varianza total, 40.68 %. En el largo del pecíolo y en la relación largo/ancho el porcentaje de varianza entre las hojas de un mismo árbol, 34.04% y 41.13%, fue más alto dentro de la varianza total que el correspondiente a la varianza entre árboles dentro del mismo sitio, 16.98% y 14.87%.

Por último se observa que para el largo de la lámina foliar la varianza entre árboles dentro del mismo sitio y la varianza entre las hojas de un mismo árbol tuvieron porcentajes casi iguales dentro de la varianza total, 23.65% y 23.67% respectivamente. Para el ancho de la lámina foliar la varianza entre sitios y la varianza entre árboles dentro del sitio obtuvieron porcentajes muy similares con un 29.77% y 29.54% respectivamente.

Propuesta para la identificación en el campo de cuatro especies de roble Quercus spp., en tres sitios de la Cordillera de Talamanca.

En el estudio se observó, además, que las hojas de *Quercus costaricensis* presentan pubescencia sobre todo en el envés y en el caso de las más jóvenes también en el haz. No se observó pubescencia en las otras especies.

Para el *Quercus copeyensis* colectado en Villa Mills las hojas son mucho más coriáceas que en los otros sitios y para Copey de Dota son las hojas más grandes y de textura más suave.

En la figura 2 se presentan una serie de datos, provenientes de la observación realizada en el campo y de los resultados obtenidos, los cuales se ordenaron según el sitio y la especie. Esta figura se propone como información básica para la identificación en el campo de las cuatro especies de roble utilizadas en el estudio.

SITIO 1: VILLA MILLS (2700 m)			
Especie 1: <i>Quercus copeyensis</i> C. H. Muller.			
Corteza	Grisácea a blanco grisácea. Presencia de lenticelas.		
Hojas	Largo pecíolo (cm)	Largo lámina foliar (cm)	Ancho lámina foliar (cm)
	0.1-0.8 Prom.: 0.5	4.1-17 Prom.: 8.3	2-6.4 Prom.: 3.6
Textura coriácea. Borde entero con tendencia revoluta. Tallos blancuzcos.			
Especie 2: <i>Quercus costaricensis</i> Lieb.			
Corteza	Negrusca, sin lenticelas.		
Hojas	Largo pecíolo (cm)	Largo lámina foliar (cm)	Ancho lámina foliar (cm)
	0.1-0.8 Prom.: 0.32	4.7-19.1 Prom.: 9.70	2.2-7.6 Prom.: 4.63
Textura coriácea. Presencia de pubescencia sobre todo en el envés. Borde entero. Revolutas. Tallos negruscos.			

Continuación de la figura 2.

SITIO 2: EL EMPALME (2200 m)			
Especie 1: <i>Quercus copeyensis</i> C. H. Muller			
Corteza	Grisácea a blanco grisácea. Presencia de lenticelas.		
Hojas	Largo pecíolo (cm)	Largo lámina foliar (cm)	Ancho lámina foliar (cm)
	0.3-1.3 Prom.: 0.66	6.1-18.5 Prom.: 10.22	2.8-7.8 Prom.: 4.78
Textura poco coriácea. Borde entero con tendencia revoluta. Tallos blancuzcos.			
Especie 3: <i>Quercus seemannii</i> Liebmann.			
Corteza	Grisácea, oscura. Presencia de lenticelas.		
Hojas	Largo pecíolo (cm)	Largo lámina foliar (cm)	Ancho lámina foliar (cm)
	0.2-0.9 Prom.: 0.48	4.1-15.7 Prom.: 8.69	1.4-4.3 Prom.: 2.47
Borde entero, poco revolutas. Elípticas acuminadas. Sin pubescencia.			
SITIO 3: COPEY DE DOTA (1800 m)			
Especie 1: <i>Quercus copeyensis</i> C. H. Muller			
Corteza	Grisáceo, oscuro. Poca presencia de lenticelas		
Hojas	Largo pecíolo (cm)	Largo lámina foliar (cm)	Ancho lámina foliar (cm)
	0.2-9.8 Prom.: 1.33	0.3-23.5 Prom.: 14.10	2.7-13.6 Prom.: 5.11
Borde entero. Textura suave. Tallos blancuzcos.			
Especie 4: <i>Quercus corrugata</i> Hooker			
Corteza	"Gris-rosácea". Pocas lenticelas		
Hojas	Largo pecíolo (cm)	Largo lámina foliar (cm)	Ancho lámina foliar (cm)
	0.4-2.3 Prom.: 1.18	1.9-24.9 Prom.: 11.95	2.2-7.2 Prom.: 4.14
Borde aserrado. Alta presencia de agallas en la lámina.			

Figura 2. Información para la identificación en el campo de cuatro especies de roble, *Quercus* spp. en tres sitios de la Cordillera de Talamanca.

Discusión

Variación foliar de cuatro especies de roble en poblaciones naturales de la Cordillera de Talamanca

Las diferencias significativas dentro de cada especie y población eran de esperarse ya que los árboles se muestrearon al azar y se encontraban en condiciones ambientales muy diferentes.

La diferencia significativa que se presentó entre las especies *Quercus copeyensis* y *Quercus costaricensis* para todas las variables evaluadas en las hojas, indica que aunque estas especies comparten un mismo sitio de crecimiento (Villa Mills), mantienen características foliares que permiten diferenciarlas al observar sus hojas. Además las poblaciones muestreadas de estas especies se encuentran en un bosque natural que se utiliza para realizar estudios sobre todo de tratamientos silviculturales, donde se han variado las condiciones lumínicas al realizar cortas de árboles; sin embargo Camacho y Bellefleur (1996) afirman que *Q. costaricensis* puede considerarse una especie que se aclimata bien a la luz y a la sombra y *Q. copeyensis* se aclimata bien a la sombra y es tolerante a la luz, por lo que se puede decir que estos cambios no han afectado las características propias de las hojas de estas especies.

Para las especies de El Empalme, *Quercus copeyensis* y *Quercus seemannii*, se debe tomar en cuenta que se encuentran en zonas de grandes claros, con poca o ninguna presencia de otras especies arbóreas. Esto hace que se libere a las poblaciones de la competencia con otras especies por nutrientes, agua y luz, y esto podría estar favoreciendo el desarrollo óptimo en su hábitat natural y por lo tanto mantener las características propias de cada especie en las hojas. Es natural, entonces, que se presenten diferencias significativas entre *Q. copeyensis* y *Q. seemannii*. Lo mismo puede aplicarse para las especies *Quercus copeyensis* y *Quercus corrugata* en Copey de Dota, aunque no registren diferencias significativas en el largo del pecíolo ni para la relación largo ancho de las hojas. Entre estas dos especies si se encontraron diferencias en el largo y ancho de la lámina. En el caso del largo del pecíolo en *Q. copeyensis* y *Q. corrugata*, el resultado concuerda con el tamaño reportado en la literatura para ambas especies desde 0.2 hasta 2.3 cm (Morales, 2001 y Jiménez Q. et al. 1999).

En los tres sitios se hallaron diferencias significativas dentro de los árboles de cada especie para todas las variables. Esto puede deberse al estado de desarrollo de los individuos muestreados, la edad de las hojas y la posición de la hoja dentro del árbol pues esta determina la influencia que pueda ejercer la luz. Al respecto Zobel y Talbert (1988) afirman que dentro de un árbol pueden existir grandes diferencias solo para algunas características, como en las hojas de un mismo árbol expuestas al sol y a la sombra.

Patrones de variación foliar entre y dentro de tres poblaciones naturales de Quercus copeyensis

La presencia de poblaciones de la especie *Quercus copeyensis* en los tres sitios visitados permite afirmar que es la más abundante, lo cual podría deberse a factores relacionados con la evolución y a que esta especie posea una mayor capacidad de adaptación a los suelos y a otros factores ambientales predominantes en las formaciones boscosas donde se le encuentra (Jiménez W. et al. 1988).

El análisis de varianza hecho para *Q. copeyensis* en los tres sitios registró diferencias significativas tanto entre los sitios, como entre los árboles de cada sitio. Estas diferencias entre individuos dentro de una misma población se deben principalmente a diferencias en el estado de desarrollo (edad), posición sociológica y en especial a diferencias genéticas (Zobel y Talbert, 1988).

Con respecto a las diferencias entre los sitios, estas pueden deberse a la altitud de cada lugar lo que implica diferentes condiciones de temperatura, del suelo y el grado de humedad de los bosques (Orozco y Camacho, 1994). También puede corresponder en algún grado a diferencias genéticas y de adaptación de las poblaciones naturales a las condiciones ambientales marcadamente diferentes (Murillo, 1997).

Calderón (1993) encontró que la variación foliar en cuatro poblaciones de Pochote (*Bombacopsis quinata*) tendía a seguir un patrón clinal pues a mayor altitud y humedad las hojas presentan un largo y ancho mayores. Para *Q. copeyensis* la variación clinal observada en la figura 1 confirma el mayor peso del ambiente para todos los caracteres investigados, las cuales disminuyeron su tamaño conforme aumentó la altitud. Villa Mills (2700 m) es el sitio más alto y es donde *Quercus copeyensis* presentó un valor menor para todos los caracteres. Fournier (1982) afirma que conforme se asciende en las altas montañas las condiciones climáticas ejercen más su influencia limitante en el crecimiento normal de los árboles y en forma general estos disminuyen su tamaño y su fisonomía y Kappelle (1996) indica que varios autores han demostrado la relación negativa que existe entre el tamaño foliar promedio y la altitud sobre el nivel del mar en diferentes ecosistemas tropicales, esta disminución del tamaño puede ser la respuesta de las plantas para adaptarse al medio (Cronquist, 1980 citado por Jiménez M., 1991).

Con respecto a los porcentajes de variación, los valores más altos para la variación entre los sitios en tres de los caracteres, (largo del pecíolo, largo de la lámina foliar y la relación largo/ancho), concuerdan con la variación clinal observada. La mayor parte de la variación encontrada para las hojas de *Q. copeyensis* se registró entre sitios. Sin embargo, para el ancho de la lámina foliar la variación entre las hojas de un mismo árbol es mayor o muy similar a la variación entre individuos y a la variación entre poblaciones. Estos resultados concuerdan con lo mencionado sobre la influencia de la posición de las hojas en un árbol sobre su morfología.

Propuesta para la identificación en el campo de cuatro especies de roble Quercus spp. en tres sitios de la Cordillera de Talamanca.

El *Quercus copeyensis* de Villa Mills presenta las hojas más coriáceas en concordancia con las características del bosque de la zona de vida a la que pertenece el sitio, (bosque pluvial Montano), mientras que en Copey de Dota las hojas son más grandes y suaves siendo este el sitio de menor altitud (1800 m) y con un clima más cálido (Bolaños y Watson, 1993).

Las especies *Q. corrugata* (lámina foliar de borde aserrado y fustes rosáceos) y *Q. costaricensis* (tronco oscuro habitando en sitios mayores a los 2400 msnm), no presentan mayor dificultad práctica para su identificación en el campo. El mayor problema taxonómico podría presentarse entre el *Q. seemannii* y el *Q. copeyensis*, que traslapan en parte su ámbito de distribución natural. Además el *Q. copeyensis* presenta una morfología foliar muy amplia que depende de la altitud.

En términos prácticos puede aplicarse un criterio foliar y otro de color del fuste: el *Q. copeyensis* presenta un fuste blancuzco-grisáceo, tallos blancuzcos y hojas más ovadas, mientras *Q. seemannii* presenta fustes más grisáceos, oscuros y sus hojas son más lanceoladas y delgadas.

La información presentada en la figura 2 concuerda en forma general con lo reportado para estas especies en la literatura.

Conclusiones y recomendaciones

Morfológicamente es fácil separar o identificar los árboles de estas especies con la sola observación de las hojas y el color de sus tallos:

- ❑ *Q. copeyensis*: tallos jóvenes blancos.
- ❑ *Q. costaricensis*: tallos negruscos.
- ❑ *Q. seemannii*: tallos negruscos, hojas más delgadas.
- ❑ *Q. corrugata*: borde de las hojas aserrado.

Quercus copeyensis presentó diferencias importantes en todos los caracteres evaluados, debidos a las diferencias entre los distintos sitios de crecimiento, diferente zona de vida y altitud, por lo que se puede afirmar que la especie mostró variación clinal para los caracteres foliares evaluados.

Para las tres poblaciones muestreadas de *Quercus copeyensis* el porcentaje de variación más alto correspondió al obtenido entre los sitios, lo cual permite reafirmar la variación de tipo clinal en los caracteres foliares.

Se recomienda realizar este mismo tipo de estudio en poblaciones de estas especies que se encuentren en otros lugares del país y para otras especies de *Quercus*, con el fin de aumentar la información de la morfología de las hojas relacionada con los sitios de crecimiento.

Se recomienda realizar estudios similares en inflorescencias y frutos, así como considerar otras posibles variables para evaluar en las hojas de este género.

Literatura citada

- BOLAÑOS, R. y WATSON, V. 1993. Mapa Ecológico de Costa Rica. Hoja Quepos. Centro Científico Tropical. San José, Costa Rica. Mapa. Escala 1:200000.
- BOLAÑOS, R. y WATSON, V. 1993. Mapa Ecológico de Costa Rica. Hoja San José. Centro Científico Tropical. San José, Costa Rica. Mapa. Escala 1:200000.
- BOLAÑOS, R. y WATSON, V. 1993. Mapa Ecológico de Costa Rica. Hoja Talamanca. Centro Científico Tropical. San José, Costa Rica. Mapa. Escala 1:200000.
- BURGER, W. 1977. Fagaceae, Flora costarricense. Fieldiana: Botany. **40**: 59-79
- CALDERÓN, I. 1993. Análisis de las poblaciones de Pochote (*Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand) en Costa Rica. Tesis presentada como requisito parcial para optar por el grado de licenciatura el Silvicultura Tropical. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Departamento de Ingeniería Forestal, Programa de Licenciatura. 54p.
- CAMACHO, M. y BELLEFLEUR, P. 1996. Aclimatación morfológica a la luz en seis especies arbóreas de los bosques montanos de Costa Rica. Rev. Biol. Trop. **44**: 71-79.
- FLORES, E. 1994. La Planta: estructura y función. 2da. Edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 504p.
- FOURNIER, L. 1982. La vegetación arbórea en las tierras altas de Costa Rica. Antología para el curso de Ecología Forestal. Escuela de Ciencias Ambientales, Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.
- HOCKER, H. 1984. Introducción a la Biología Forestal. A. G. T. Editor S. A. México D. F., México. 446p.

- HOLDRIDGE, L. 1982. Ecología basada en zonas de vida. IICA. San José, Costa Rica . 216p.
- JIMÉNEZ, M. 1991. Estudio de variabilidad en Jaúl (*Alnus acuminata* ssp. *Arguta* (Schlectendal) Furlow), en la Cordillera de Talamanca, Costa Rica. Informe de práctica de especialidad para optar por el título de Ingeniero Forestal. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Departamento de Ingeniería Forestal. 50p.
- JIMÉNEZ, W.; CHAVERRI, A.; MIRANDA, R.; ROJAS, I. 1988. Aproximaciones silviculturales al manejo de un robledal (*Quercus spp.*) en San Gerardo de Dota, Costa Rica. Turrialba. **38**: 208-214
- JIMÉNEZ, Q.; ESTRADA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ARROYO, P. 1999. Manual dendrológico de Costa Rica. 2da Edición. ITCR. Cartago, CR, .150p.
- KAPPELLE, M. 1996. Los bosques de Roble (*Quercus*) de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica: biodiversidad, ecología, conservación y desarrollo., Instituto Nacional de Biodiversidad. Heredia, CR 336p.
- MADRIGAL, T. 1996. Fenología y ecofisiología del *Quercus oocarpa* (Fagaceae), Cartago, Costa Rica. Rev. Biol.Trop. **44**: 117-123.
- MORALES, J. F. 2001. Fagaceae. In, B.E. Hammel, N. Zamora & M. H. Grayum (editores), Manual de plantas de Costa Rica. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis & Instituto Nacional de Biodiversidad, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica. (Manuscrito en preparación).
- MURILLO, O. 1997. Genetic investigations in natural populations of *Alnus acuminata* ssp *arguta* (Schlectendal) Furlow from Central America. Cuvillier Verlag. Göttingen, Germany. 145p.
- MURILLO, O. 2001. Notas del curso de Mejoramiento Genético Forestal. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

OROZCO, L. Y CAMACHO, M. 1994. Caracterización ecológica y estructura de los robledales de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica. *Biocenosis*. **10**: 18-22.

SAS. 1998. SAS Institute Inc. Cary. North Carolina. EVA. Software. Versión 7.

ZOBEL, B. y TALBERT, J. 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Editorial Limusa. México DF., México. 545p.

ANEXOS

Anexo 1

Cuadro 6. Promedio y error estándar para las variables evaluadas en *Quercus copeyensis* de tres sitios de la Cordillera de Talamanca.

Sitio	N (observaciones)	Variable (cm)	Promedio	Error estándar (+ -)
Villa Mills (2700m)	225	L. pecíolo	0.45	0.0092
		Largo lámina	8.27	0.1520
		Ancho lámina	3.63	0.0650
		Largo/Ancho	2.28	0.02458
El Empalme (2200m)	225	L. pecíolo	0.65	0.0120
		Largo lámina	10.22	0.1536
		Ancho lámina	4.78	0.0718
		Largo/Ancho	2.16	0.0208
Copey de Dota (1800m)	225	L. pecíolo	1.32	0.0502
		Largo lámina	14.1	0.2289
		Ancho lámina	5.11	0.0872
		Largo/Ancho	2.79	0.02747

Anexo 2

Con el análisis estadístico se obtuvieron los siguientes valores:

Cuadro 7. Cálculos de los porcentajes de varianza para cuatro caracteres foliares de árboles de *Quercus copeyensis* en tres sitios de la Cordillera de Talamanca.

VARIABLE	CM Error	CM Sitio	CM Árbol (sitio)
largo hoja	3,8379	1983,2145	61,3679
largo pecíolo	0,1407	46,7416	1,1931
ancho hoja	0,7592	134,0395	9,0278
largo/ancho	0,1005	24,8311	0,6456

Estos valores se usaron para calcular los porcentajes de varianza de la siguiente forma:

Para el estudio realizado el 100% de la varianza total se compone de tres varianzas:

- $\delta^2 s$: varianza entre los sitios
- $\delta^2 a(s)$: varianza entre árboles dentro del sitio
- $\delta^2 e$: varianza del error = varianza entre las hojas de un mismo árbol = cuadrado medio del error (CME).

$$\delta^2 a(s) = \frac{CMA(s) - CME}{n} \quad \text{y} \quad \delta^2 s = \frac{CMS - CMA(s)}{n * A}$$

Donde:

- CMA(s) = cuadrado medio del error de los árboles en un sitio
- CMS = cuadrado medio del error entre los sitios
- CME = cuadrado medio del error entre las hojas de un árbol
- n = 15 (N° de hojas por árbol)
- A = 15 (N° de árboles por sitio)

El cuadro 8 presenta los valores para cada una de las varianzas y para la suma total de estas.

Cuadro 8. Componentes de varianza para cada una de las fuentes de variación de cada uno de los caracteres investigados.

VARIABLE	$\delta^2 s$	$\delta^2 a(s)$	$\delta^2 e$	Total
largo hoja	8,5415	3,8353	3,8379	16,2148
largo peciolo	0,2024	0,0702	0,1407	0,4133
ancho hoja	0,5556	0,5512	0,7592	1,8660
largo/ancho	0,1075	0,0363	0,1005	0,2443

Tomando el total como 100% se calculó el porcentaje de cada fuente de variación en cada uno de los caracteres investigados en las hojas de *Quercus copeyensis*.

ADAPTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE ISOENZIMAS POR
ELECTROFORESIS EN ESPECIES DE ROBLE *QUERCUS spp.*

Xinia Quirós Camacho

Cartago, 2001

Resumen

Se realizaron pruebas de electroforesis de isoenzimas para cuatro especies de roble, utilizando muestras tomadas de plántulas de la especie *Quercus copeyensis* del vivero de la Escuela de Ingeniería Forestal, así como colectadas en poblaciones naturales de las especies *Quercus copeyensis*, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii* y *Quercus corrugata*, ubicadas en tres sitios: Villa Mills, El Empalme y Copey de Dota. Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología del ITCR, variando distintos factores involucrados en la electroforesis de isoenzimas con el fin de establecer una metodología adecuada y confiable para las especies. Se probaron 8 sistemas de tinción, de los cuales solo tres, (IDH, PGI y MNR) mostraron algún resultado positivo pero no lo suficientemente confiable como para realizar una interpretación de zimogramas. Se considera que diferentes elementos involucrados en las etapas de las pruebas pudieron influir de forma negativa en los resultados, por lo que se recomienda la realización de más estudios.

Palabras claves: *Quercus* sp., roble, variabilidad, isoenzimas, electroforesis, Cordillera de Talamanca.

Abstract

Electrophoresis and isozymes tests were run based on seedling samples from the species *Quercus copeyensis*. Natural population samples from the species *Q. copeyensis*, *Q. costaricensis*, *Q. seemannii* and *Q. corrugata*, located in three sites were collected: Villa Mills, El Empalme and Copey de Dota. This tests were made in the Molecular Biology Laboratory of the Escuela de Biología of ITCR. To establish a proper method for the species, different factors of the electrophoresis protocol were varied. Eight enzymes systems were assessed which three (IDH, PGI and MNR) showed some acceptable results but not enough to a good zymogram interpretation. More similar research with *Quercus* sp. is recommended.

Key words: *Quercus* sp., oaks, variability, isozymes, electrophoresis, Cordillera de Talamanca.

Introducción

Cuando se evalúa la diversidad genética de una especie o población debe buscarse un medio de registro que sea fácil y preciso. Los marcadores moleculares se consideran una buena opción debido a que permiten la identificación de todos los posibles genotipos, pueden identificarse en cualquier tejido y pueden existir numerosos alelos de un mismo marcador. Según el nivel en el que se identifican los genes los marcadores moleculares se dividen en marcadores de ADN y marcadores proteínicos o isoenzimas (Valverde y Paredes-López, 1996).

En el campo de las especies forestales estos marcadores pueden ser de gran utilidad para evaluar cómo se ven afectadas las especies de un bosque que ha sufrido la intervención del hombre, sobre todo para la extracción, en su variación genética; también en los programas de mejoramiento genético forestal donde se necesite conocer las características genéticas del material seleccionado.

Para la aplicación de estos marcadores se utilizan procedimientos o protocolos de trabajo que implican varias etapas y su complejidad puede variar según el tipo de investigación. Las isoenzimas, como marcadores moleculares, presentan la ventaja de que la metodología para su estudio es sencilla y los costos son accesibles.

Sin embargo, en la escogencia de las isoenzimas como marcadores moleculares para un estudio, influyen distintos factores tales como programas limitados de investigación y la seguridad, facilidad y confiabilidad de los protocolos establecidos. Además, entre las isoenzimas algunas son más fáciles de probar que otras o pueden producir resultados más consistentes o más fáciles de interpretar (Acquaah, 1992). Por lo tanto, en muchos casos se debe iniciar la investigación con la adaptación de un protocolo para la o las especies que se estudian, probando distintas variantes de otros protocolos previamente establecidos y registrando los resultados que se obtienen con el fin de que en el momento de realizar el análisis respectivo los resultados sean los más confiables y se obtenga la mayor cantidad de información.

Objetivo

- Adaptar un protocolo para la caracterización isoenzimática de poblaciones naturales de cuatro especies de roble, *Quercus spp.*

Revisión de literatura

Isoenzimas como marcadores moleculares

El desarrollo de una estructura vegetal con una forma determinada por herencia implica la selección cuidadosa de las reacciones químicas que se presentan y sobre las que actúan las enzimas (Rost et al, 1985), las cuales son proteínas especiales capaces de catalizar reacciones químicas de forma específica, es decir que cada una de ellas cataliza una sola reacción o grupos de reacciones muy afines (Freifelder, 1988).

Un enzima puede presentar diferentes formas moleculares que comparten una misma actividad catalítica, se derivan del mismo organismo o tejido y son específicas del estado de desarrollo y de la especie, a las que se les conoce como isoenzimas (Valverde y Paredes-López, 1996).

Las isoenzimas pueden observarse como bandas, resultado de una reacción enzimática dada al aplicarse la técnica conocida como electroforesis. El conjunto de bandas reveladas se denomina zimograma y su intensidad depende de la actividad enzimática, de la estructura de la enzima, del número de locus y del número de alelos que contribuyan para la síntesis de la enzima, (Couto, et al, 1991).

Como marcadores genéticos las isoenzimas presentan la ventaja de la especificidad enzimática que permite identificar alelos que se pueden comparar en diferentes poblaciones o especies; además, cualquier diferencia alélica es detectable como diferencias en la movilidad electroforética. Por otro lado la metodología de estudio es sencilla y los costos accesibles. Entre las desventajas se tienen: la utilización de diferentes reactivos de extracción y tinción, pueden ser específicas para un tejido y el número de marcadores que presentan puede ser insuficiente debido a que muestran poco polimorfismo (Valverde y Paredes-López, 1996).

En el campo forestal han sido usadas como marcadores genéticos para determinar la identidad de plantas parientes en cruzamientos y clones, la identidad de lotes de semillas, la validación de cruces controlados, el nivel de contaminación por polen extraño en plantaciones comerciales, la diversidad genética tanto dentro como entre poblaciones naturales, los daños a los recursos genéticos como consecuencia del deterioro de los ecosistemas y la reducción del tamaño de las poblaciones (Couto, et al, 1991), entre otros.

Técnica de estudio: la electroforesis

La electroforesis se define como el movimiento de una partícula cargada en respuesta a un campo eléctrico cuando es colocada en dicho campo (Robles,1982), es también el nombre que se le da a la técnica de separación de moléculas basada en las diferencias de movilidad de estas en un campo eléctrico (Valverde y Paredes-López, 1996). Acquah (1992) afirma que esta es una técnica bioquímica versátil para detectar variación genética, cuyo resultado debe ser la separación exitosa de moléculas de manera que las diferencias entre genotipos puedan detectarse sin ambigüedad.

Muchos factores están involucrados en esta técnica de estudio, pero para la mayor parte del procedimiento no se necesita tener más que un conocimiento rudimentario de varios principios, de hecho muchos detalles de métodos específicos se han desarrollado de forma empírica, por prueba y error (Brewer y Sing, 1970)

Por otro lado, al ser las proteínas sustancias capaces de adquirir carga positiva o negativa en función del nivel de acidez o pH, puede aplicarse la electroforesis a extractos proteicos obtenidos por maceración de tejido vegetal, que son impregnados de soluciones extractoras y colocados en un gel para ser sometidos a dicha técnica. (Couto, et al, 1991).

El gel se utiliza como medio de soporte y en su escogencia el investigador debe considerar el costo, la seguridad, la facilidad de manipulación y la duración de la electroforesis (Acquah, 1992). Uno de los tipos de gel utilizado es el gel de almidón, el cual es más barato y tiene la ventaja de servir como un “tamiz molecular”, lo que contribuye con la separación de las proteínas (Brewer y Sing, 1970), aunque su resolución, comparada con otros tipos de gel, puede ser inferior (Couto, et al, 1991).

Una vez aplicada la electroforesis los geles son laminados y cada lámina puede revelarse individualmente para la detección de enzimas específicas por medio de las bandas que aparecen. El conjunto de bandas reveladas se denomina zimograma y su intensidad depende de la actividad enzimática, de la estructura de la enzima, del número de locus y del número de alelos que contribuyan para la síntesis de la enzima (Couto, et al, 1991).

Interpretación de zimogramas

Las bandas en los zimogramas dependen del tipo de enzima, Kephart (1990), citado por Trejos (2000), menciona que los individuos heterocigotas presentan dos bandas en las enzimas monoméricas, tres para las enzimas diméricas y cinco para las tetraméricas; mientras que para los individuos homocigotas todos los tipos de isoenzimas presentan una sola banda.

Estas bandas representan diferentes locus de un sistema enzimático, de acuerdo con la distancia de migración que presenten se pueden codificar los alelos por medio de la enumeración de dichas bandas y así facilitar la descripción genética del polimorfismo (Couto, et al, 1991).

Materiales y métodos

Recolección de las muestras:

La electroforesis de isoenzimas se realizó en dos etapas:

1. Utilizando muestras tomadas de plántulas de la especie *Quercus copeyensis*, del vivero de la Escuela de Ingeniería Forestal, las cuales consistieron en pequeños fragmentos de las hojas más jóvenes de 10 individuos. Estas muestras fueron llevadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica para ser sometidas a la electroforesis. Esta etapa se llevó a cabo durante los meses de febrero, marzo, abril y parte del mes de mayo.

2. Utilizando muestras colectadas en los siguientes sitios: Villa Mills, El Empalme y Copey de Dota, donde se encuentran poblaciones naturales de las especies, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii* y *Quercus corrugata* respectivamente, además de la especie *Quercus copeyensis* presente en los tres sitios. De cada especie se colectaron muestras de 15 individuos, las cuales consistieron en fragmentos de hojas jóvenes, yemas y frutos jóvenes, que fueron colocados en tubos ependorff, separados por especie y transportados en hielo para evitar la degradación de los tejidos. La colecta se realizó en las dos últimas semanas del mes de mayo y las muestras fueron almacenadas en congelación para ser utilizadas en pruebas durante el mes siguiente.

Preparación de geles de almidón

Todas las pruebas se hicieron utilizando gel de almidón. En el cuadro 1 se presentan las diferentes composiciones usadas en la preparación de los geles. Las cantidades se refieren a la preparación de 400 ml de gel.

Cuadro 9. Composición de los geles utilizados en las pruebas de electroforesis para cuatro especies de roble (*Quercus spp.*).

Gel	Buffer de corrido	ml buffer de corrido	ml buffer de gel	ml de agua destilada	% de almidón	gr. de almidón	% de sacarosa	gr. de sacarosa
Histidina-citrato	Histidina-citrato	80		320	10	40	3	12
	Histidina-citrato	80		320	10	40	4.5	18
Tris-citrato	Tris-citrato	28.6		371.4	10	40	3	12
Litio-Borato	ASHTON (Litio-borato)	31.6	368		10	40	3	12

Cada gel se colocó en refrigeración dentro de una cámara antes de introducir las muestras para realizar la electroforesis.

Extracción

De las muestras colectadas se tomaron pequeñas cantidades a las cuales se les aplicó una gota de buffer de extracción y se maceraron una a una a temperatura ambiente.

En la mayoría de las pruebas se utilizó el buffer de extracción basado en Tris-HCl, además se probó el buffer Soltis and Soltis (modificado); la composición de cada uno se especifica en el Anexo 1.

En las muestras maceradas se puso papel de filtro por unos minutos. Estos papeles, una vez impregnados del extracto se introdujeron en el gel por medio de un incisión, junto con un papel filtro humedecido con azul de bromofenol el cual tiene la finalidad de actuar como indicador de la migración.

Electroforesis

Para cada prueba se registró la colocación de los papeles de filtro en el gel, por medio de mapas de corrido (ver figura 1).

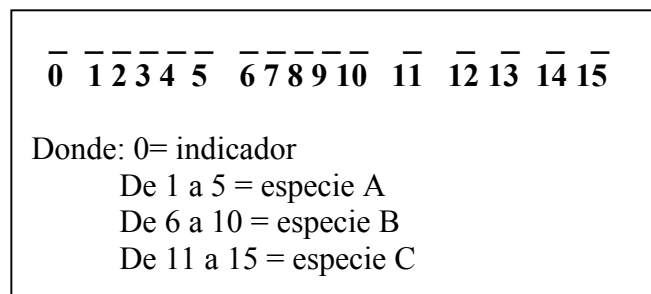


Figura 3. Ejemplo de un mapa de corrido para electroforesis de isoenzimas para cuatro especies de roble (*Quercus* spp.).

Los soportes de las cámaras se introdujeron en recipientes con electrodos a los cuales se les agregó la cantidad de buffer de corrido, sin diluir, necesaria para poner en contacto el gel con la corriente eléctrica. Cada gel se cubrió con plástico antes de ser conectado a la fuente de poder y se mantuvo en refrigeración para evitar la evaporación excesiva durante la electroforesis. En el cuadro 2 se presentan las diferentes condiciones de corrido utilizadas en las pruebas.

Cuadro 10. Condiciones de corrido utilizadas en diferentes pruebas de electroforesis de isoenzimas para cuatro especies de roble, *Quercus* spp.

Mili amperaje (mA)	Voltaje (V)	Tiempo de corrido (h)
30	150	3
30	160	4
40	150	4.5
20	220	4.5
24	300	5

Revelado de isoenzimas

Una vez finalizada la electroforesis cada gel se separó de la cámara y se cortaron de 5 a 6 tajadas de forma horizontal. Cada tajada se colocó en un vidrio y se rotuló con el nombre del sistema utilizado para el revelado de bandas. El nombre de cada sistema corresponde a una isoenzima específica.

En el cuadro 3 se presentan los sistemas usados, su composición completa se especifica en el anexo 2.

Cuadro 11. Sistemas probados para el revelado de isoenzimas en cuatro especies de roble, *Quercus* spp.

Sistema	Nombre de la isoenzima
PGM	Fosfoglucomutasa
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
6-PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
MDH	Malato deshidrogenasa
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
G-6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
MNR	Menadiona reductasa
SKDH	Shikamato deshidrogenasa

Las soluciones de cada sistema se prepararon según composiciones probadas previamente en otros estudios y en algunas pruebas se aumentó la cantidad de enzima con el fin de mejorar el revelado, (ver anexo 2).

A cada solución de tinción se le agregó cierta cantidad de agar para obtener una consistencia gelatinosa que permitiera una mejor distribución sobre las láminas de gel.

Una vez aplicado cada sistema a la lámina de gel respectiva, estas se colocaron en una incubadora a 37⁰ C de temperatura durante un promedio de 30 minutos, para luego observar los resultados de la tinción, en el caso de obtener un buen revelado de bandas se procedió a registrar los zimogramas correspondientes.

Prueba en la Universidad de Costa Rica

Se realizó una prueba en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la UCR usando muestras de plántulas de *Quercus copeyensis*. Se usaron tres buffer de extracción: Tris-HCl y Soltis and Soltis usados en las pruebas en el ITCR y Tris-HCl usado en la UCR. La composición de cada uno se especifica en el anexo 1.

La extracción se realizó con cada muestra en un tubo eppendorf aplicando 50 µl (microlitros), de buffer, macerando en frío con un pistilo para eppendorf y agitando simultáneamente con un agitador eléctrico. Los macerados se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos a 4⁰ C.

Se usó gel de almidón Histidina-citrato al 10% para la electroforesis. Las condiciones de corrido fueron 25 mA, 300V y 4 horas.

Se usaron los siguientes sistemas de tinción: IDH, PGI, PGM, MNR.

Resultados

Geles de almidón

La concentración de almidón se mantuvo constante en todas las pruebas realizadas, (10 %) sin observarse algún cambio importante entre los geles preparados con diferente buffer por lo que el gel de Histidina-citrato se utilizó en más cantidad de pruebas. Para este tipo de gel no se encontró diferencia al variar la concentración de sacarosa de 12 gr., (3 %), a 18 gr. (4.5%).

El único inconveniente que se registró en la preparación del gel fue la formación de grumos al iniciar un nuevo lote de almidón, pero esto se corrigió con una mayor agitación para homogenizar mejor la mezcla.

La consistencia del gel no sufrió cambios ni presentó problemas para obtener las láminas necesarias para el revelado de las isoenzimas.

Extracción

El buffer de extracción Tris-HCl se utilizó en la mayoría de las pruebas ya que no se encontró diferencia importante con respecto a la utilización del buffer de extracción Soltis and Soltis. Las muestras tomadas de los árboles de las poblaciones naturales fueron más fáciles de macerar que las tomadas de plántulas del vivero, estas últimas presentaron mayor “dureza”.

Electroforesis

Las condiciones iniciales para la electroforesis en cada prueba, (amperaje, voltaje y tiempo), se mantuvieron siempre constantes, solo en algunos caso se acortó el tiempo indicado al principio.

Revelado de isoenzimas

Los mejores resultados en la tinción se obtuvieron en las pruebas donde se usaron las muestras de población natural más frescas, pero sin diferencia entre las especies.

Entre los sistemas se obtuvieron los mejores resultados con IDH, PGI y MNR; este último iniciaba el revelado casi de inmediato al ser aplicado. Los otros sistemas usados, PGM, 6-PGDH, MDH, G-6PDH y SKDH no mostraron un revelado que pudiera considerarse al menos regular. No se presentó un cambio importante con los aumentos de reactivo que se realizaron.

Estos buenos resultados en la tinción se refieren a que se visualizaron mejor las bandas en los individuos evaluados; sin embargo, no fueron lo suficientemente claras como para registrar los respectivos zimogramas.

Prueba en la UCR

No se observó un buen revelado de bandas con ninguno de los sistemas usados.

Discusión

Dos factores pueden considerarse fundamentales en el resultado esperado de la electroforesis de isoenzimas: La separación de las bandas, es decir la distancia entre estas debe ser la apropiada para minimizar errores en el registro de los datos. Esta separación depende de otros factores incluyendo el pH de los buffer, la porosidad del medio de soporte y la duración de la electroforesis. El otro factor es la resolución, que se refiere a la definición de las bandas, ya que estas pueden estar adecuadamente separadas pero tener rayas en medio o ciertas gotas. La calidad de las muestras y el tipo de buffer usado pueden ser determinantes en la resolución (Acquaah, 1992).

Al adaptar un protocolo para la electroforesis de isoenzimas se hace uso del “método” de prueba y error para obtener técnicas determinadas para las especies, en este caso 4 especies de roble. Brewer y Sing, (1970) mencionan que muchos detalles de métodos específicos se han desarrollado de forma empírica, ya que solo es necesario tener un conocimiento rudimentario de varios principios, a pesar de que son muchos los factores involucrados en la electroforesis.

Sin embargo, es de este procedimiento del que pudieron surgir la mayor cantidad de errores que llevaron a la obtención de resultados pobres en la electroforesis de isoenzimas del estudio realizado. Por lo tanto en cada etapa pueden encontrarse posibles fuentes de error.

Gel de almidón

El almidón es un medio activo ya que agrega restricciones adicionales a la migración debido a sus propiedades de tamizaje molecular, lo que implica que la migración de las moléculas de las isoenzimas se vea influenciada por la porosidad del gel y en los de almidón esta es menos controlada y la resolución es inferior (Couto et al. 1991 y Acquah 1992). Además el almidón es un polímero natural por lo que su composición puede variar entre los lotes lo cual es posible que afecte la consistencia y la resolución (Couto et al. 1991), de allí que los geles preparados para las pruebas pudieron influir en el resultado final de la electroforesis, a pesar de no observarse algún cambio importante entre los geles preparados.

Extracción

La utilización de tejidos vivos y jóvenes, sobre todo de hojas, se debe al hecho de presentar mayor actividad metabólica lo que facilita la obtención y extracción de proteínas, además las hojas se pueden obtener todo el año, en el caso de los robles.

Sin embargo, en esta etapa del estudio pudieron presentarse algunos factores que afectaron el resultado de la electroforesis:

- ❑ Liberación de compuestos fenólicos los cuales pueden ser oxidados y que en ambas formas pueden inactivar las enzimas y o alterar la movilidad de las moléculas,(Couto et al. 1991).
- ❑ Insuficiente cantidad de buffer de extracción, lo que pudo hacer que el papel de filtro no se impregnara con suficiente cantidad de extracto, o por el contrario mucha cantidad lo que implicaría un “sobre manchado” en el gel (Acquaah, 1992).
- ❑ La desnaturalización de las proteínas, que produce la pérdida de actividad enzimática, debido a que la extracción se realizó a temperatura ambiente.
- ❑ Las últimas pruebas se realizaron usando muestras con mucho tiempo de colectadas y aunque se mantuvieron en congelación es muy probable que se degradaran.

Couto, et al. (1991), recomiendan que la extracción se realice a baja temperatura y que las muestras se almacenen por un máximo de una semana; además indican que la solución para la extracción puede variar según la especie y hasta con el tipo de tejido, por lo que se debe determinar de forma experimental.

Electroforesis

El tiempo de corrido se varió en algunas pruebas ya que se observó que la migración se dio de forma muy rápida.

Se buscó que el voltaje necesario para alcanzar el mili Amperaje fuera el suficiente para que la migración se diera a una velocidad adecuada. La escogencia del voltaje y de la intensidad de la corriente eléctrica se hacen de forma empírica, generalmente el voltaje es constante entre 100 y 200 V (Couto et al. 1991).

En la electroforesis se utiliza lo que se conoce como un sistema de buffer, que se compone de buffer de electrodo y buffer de gel y que se usa para impartir conductividad eléctrica al medio de soporte (neutro) y para mantener la actividad fisiológica de las moléculas de las proteínas. El resultado de la electroforesis depende de la apropiada escogencia de los buffer, pero también de una preparación y mantenimiento adecuados de estos para evitar contaminación como moho o cambios en el pH (Acquaah, 1992), por lo que es posible que en el caso de las pruebas realizadas los buffer empleados no fueran los más adecuados para lograr resultados positivos en las especies de roble (*Quercus* spp.) o presentaran algún problema en su estado.

Revelado de las isoenzimas

Como se explicó anteriormente es muy probable que luego de cierto tiempo las muestras colectadas y almacenadas en congelación perdieran actividad enzimática por lo que los resultados de revelado fueron mejores en las muestras más frescas.

Las soluciones de tinción se prepararon en recipientes transparentes por lo que esto podría haber afectado la efectividad de las mismas al ser sustancias sensibles a exposición de la luz. También se debe considerar que alguno de los reactivos usados en la preparación de estas soluciones pudo estar degradado por un almacenaje o manipulación incorrectos.

Las bandas reveladas en los resultados considerados como los mejores no se representaron en zimogramas pues no se consideró que fueran lo suficientemente confiables como para suponer que estos sistemas (IDH, PGI y MNR), estuvieran presentando polimorfismo para las especies de roble estudiadas.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados obtenidos pudieron ser influenciados por la época del año en que se colectaron las muestras, por lo que se recomienda realizar pruebas de electroforesis colectando en distintas épocas del año. Lo mismo se recomienda para las muestras tomadas de plántulas de vivero, pues las utilizadas en este estudio se tomaron en época seca.

Se considera necesario un mejor control de las condiciones de la extracción, manteniendo a baja temperatura las muestras y estableciendo una relación más directa y exacta entre la cantidad de muestra a macerar y la cantidad de buffer de extracción.

Los resultados considerados como los mejores no alcanzaron la calidad de revelado suficiente para definir zimogramas que pudieran interpretarse de manera confiable para las especies de roble evaluadas. Por lo tanto es conveniente probar con distintas condiciones de corrido con respecto a la corriente eléctrica, el voltaje y el tiempo así como realizar más variaciones en los sistemas probados para la tinción. En este último caso se recomienda reforzar las pruebas con los tres sistemas considerados como regulares en los resultados obtenidos, (IDH, PGI y MNR), así como ensayar con otros sistemas no usados en este estudio pero que se han probado en el campo forestal.

Literatura citada

- ACQUAAH, G. 1992. Practical protein electrophoresis for genetic research. Dioscorides Press. Portland, Oregon. USA. 127p.
- COUTO, A.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. 1991. Electroforese de proteínas e isoenzimas de Fungos e Esencias Florestais. Universidad Federal de Viçosa. Viçosa. Brazil. 242p.
- BREWER, G.; SING, C. 1970. An Introduction to Isozyme Tecniques. Academic Press. New York and London. 186p.
- FREIFELDER, D. 1988. Fundamentos de Biología Molecular. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 329p.
- OCEANO GRUPO EDITORIAL.1995. Enciclopedia Océano de la Ecología. Tomo 1. Océano Grupo Editorial S.A. Barcelona, España. Pág. 26
- ROBLES, R. 1982. Terminología genética y Fitogenética. 2da Edición. Editorial Trillas, S.A. México D.F. 145p.
- ROST, T.; BARBOUR, M.; THORNTON, R.; WEIER, T.; STOKING, C. 1985. Botánica: Introducción a la biología vegetal. Editorial Limusa S.A. México D.F. 466 p.
- TREJOS, R. 2000. Caracterización isoenzimática de tres poblaciones silvestres de *Carica papaya*. Tesis Bach. Cartago, C.R. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. 26p.
- VALVERDE, M; y PAREDES-LÓPEZ, O.1996. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad: el caso de los hongos. Ciencia y Desarrollo. **128**: 29-37.

ANEXOS

ANEXO 1

Cuadro 12. Composición de tres buffer de extracción utilizados en la maceración de muestras de para electroforesis de isoenzimas en cuatro especies de roble, (*Quercus* spp.).

BUFFER	COMPONENTE
<i>Tris-HCl</i>	Tris-HCl 0.3 M, pH 7.3 Titriplex II 0.4mM Ditiotreitol (DDT) 0.3 mM Polivinilpirrolidona (PVP) 4% 2- Mercaptoetanol 1%
<i>Soltis and Soltis (modificado)</i>	Tris-HCl pH 7.5, 75 mM Sacarosa 5% Polivinilpirrolidona (PVP) 5% Ácido ascórbico (BSA) 0.1%50 mM Ditiotreitol (DTT) 10 mM Mercaptoetanol 0.1%
Buffer usado en la UCR	Tris- HCl 75 mM, pH 7.5 Glicerol 5% Polivinilpirrolidona (PVP) 40, 2% β Mercaptoetanol 0.1% Ácido ascárbico (BSA) 50 mM dietilditio carbamato 10 mM

ANEXO 2

Cuadro 13. Composición de los sistemas utilizados en las pruebas de tinción de isoenzimas en cuatro especies de roble (*Quercus* spp.).

SISTEMA	COMPONENTE
PGM	50 ml de Tris- HCl (pH 8.0) 50 mg D-Glucosa- 1 – fosfato * 2ml de MTT 5 ml NADP 1.5 ml PMS 1.5 ml MgCl ₂ 2 µl Glucosa–6-fosfato –Deshidrogenasa
PGI	50ml Tris-HCl (pH 8.0) 30 mg Fructosa – 6-fosfato * 10 ml MTT 5 ml NADP 1.5 ml PMS 1.5 ml MgCl ₂ 2µl, Glucosa –6-fosfato –Deshidrogenasa
6-PGDH	50 ml de Tris- HCl (pH 8.0) 40 mg Fosfoglucosa * 2ml de MTT 5 ml NADP 1.5 ml PMS 1 ml MgCl ₂
MDH	50 ml de Tris- HCl (pH 8.0) 80 mg ácido málico o maleico * 10 ml MTT 5ml NAD 1.5 ml PMS 1 ml MgCl ₂
IDH	50ml de Tris- HCl (pH 8.5) 100 mg ácido Isocítrico * 10 mg MTT 5ml NADP 1.5 ml PMS 1.5 ml MgCl ₂
G-6PDH	50ml de Tris- HCl (pH 9.0) 50 mg D-Glucosa-6-fosfato * 10 mg MTT 5ml NADP 1.5 ml PMS 1 ml MgCl ₂

Continuación del Anexo 2

SISTEMA	COMPONENTE
MNR	50 ml Tris-HCl, (pH 8.0) 10mg MTT 50 mg NADH 50 mg Menadiona *
SKDH	50 ml Tris-HCl, (pH 8.0) 60 mg ácido Shikimico * 10mg MTT 5 ml NADP 1.5 ml PMS 1 ml MgCl ₂

NOTA :

- *: enzima, en algunas pruebas se aumentó la cantidad, incluso al doble.
- Las cantidades anteriores se usan como modelo para la preparación de menor cantidad de solución de tinción. Se usaron solo 10 ml Tris-HCl por lo que las demás cantidades anotadas en la tabla anterior se dividieron entre 5 para obtener la relación adecuada.
- La abreviatura µl se refiere a microlitros, (un ml es igual a 1000 µl).