



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Centro de Investigaciones en
Ecosistemas

Ecología evolutiva del árbol *Spondias
purpurea*: expresión sexual, herbivoría y
defensa química

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A:

YURIXHI MALDONADO LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. MAURICIO QUESADA AVENDAÑO

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Mauricio Quesada por sus enseñanzas, su paciencia y sobre todo por hacerme creer que cualquier cosa se puede lograr.

A Francisco Espinosa por haberme contagiado desde mi tesis de licenciatura el gusto por la ecología química. Le agradezco profundamente que continúe creyendo en mí.

A Juan Fornoni por sus comentarios tan acertados y enriquecimiento a mi trabajo.

A Ken Oyama por su invaluable ayuda, consejos y generosidad brindados durante mis estudios de maestría.

Al Dr. César Domínguez y la Dra. Karina Boege por sus valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Jorge Schondube por permitirme trabajar en su laboratorio.

A Nidia Pérez, por su amistad, por sus pláticas tan amenas y por brindarme su ayuda en el laboratorio.

A Ivonne Herrerías, por sus consejos y su ayuda en los análisis estadísticos de este trabajo, pero sobre todo por su excelente disposición en los momentos más inoportunos.

A Heberto, por su tan amable disposición para atender mi computadora.

A Cristian por acompañarme al campo y ayudarme en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de maestría, Diana, Nancy, Luisito y la Seles por hacerme reír tanto en las salidas al campo, los cursos y las fiestas.

Al siempre feliz Robertito, por ser mi amigo, por ayudarme en el campo y en todos los trámites enfadosos.

A mis antiguos y nuevos compañeros de laboratorio, Selene, Diana, la Tica, Ivonne, Víctor, Claudia, Ramiro, Lorena, Gume, Fernando, Óscar, Paola, Rogelio, Mariana, Josefa, Nancy y Luis por hacer agradables los días de trabajo.

A mis amigos y *quasi* compañeros de laboratorio Nidia, Couch, Toño, Yuny, Ana, Enrique, Selene, Lorena, Luisa, Hermilo y Chassin, por hacerme parte del clan.

A mi hermana Selene, por que compartimos el mismo camino.

A mi papá, por que muy pocas personas tienen la suerte de compartir el trabajo de sus hijos, por preguntar por mis avances domingo tras domingo, por ir conmigo a Chamela a coleccionar y por acompañarme al congreso en Barcelona.

A Pablo, por ayudarme a perder el miedo al campo, por que antepusiste muchas veces mis necesidades a las tuyas, por ayudarme a crear, realizar, analizar y escribir esta tesis. Por que has sabido combinar sanamente nuestra relación con el trabajo. Por mantenerme en mis días de pobreza.

A mi mamá,

Por enseñarme el amor a la vida

A mi papá,

Por enseñarme el amor al estudio

A Pablo,

El tiempo es demasiado lento para aquellos que esperan... demasiado rápido para aquellos que temen.... demasiado largo para aquellos que sufren.... demasiado corto para aquellos que celebran...pero para aquellos que aman, el tiempo es eterno.

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	9
1. Resistencia anti-herbívoro	10
2. Herbivoría en plantas dioicas	11
<i>a. Defensa química en plantas dioicas</i>	12
3. Factores de variación en los niveles de folivoría y resistencia en plantas	14
<i>a. Variación temporal de herbivoría y patrones de herbivoría en bosques tropicales secos</i>	14
<i>b. Estratos del dosel</i>	15
<i>c. Edad de la hoja</i>	15
<i>d. Vigor de la planta</i>	17
<i>e. Calidad nutricional</i>	17
II. HIPOTESIS	19
III. OBJETIVOS	
1. Objetivo general	20
2. Objetivos particulares	20
IV. MÉTODOS GENERALES	
1. Especie de estudio	21
<i>a. Distribución</i>	21
<i>b. Uso tradicional</i>	21
<i>c. Expresión sexual y desarrollo reproductivo de Spondias purpurea</i>	21
<i>d. Contenido nutricional de Spondias purpurea</i>	22
<i>e. Gremios de herbívoros asociados a Spondias purpurea</i>	22
<i>f. Metabolismo secundario de Spondias purpurea</i>	22
2. Área de estudio	23

V. DISEÑO EXPERIMENTAL	24
1. Patrón de herbivoría	
<i>a. Colecta de hojas para determinar diferencias en la intensidad de la herbivoría foliar en las hojas jóvenes y maduras de distintos estratos del dosel en individuos femeninos y masculinos de Spondias purpurea de distintos tamaños</i>	24
<i>b. Colecta de hojas para determinar diferencias en la calidad nutricional y defensa química en las hojas jóvenes y maduras de distintos estratos del dosel en individuos femeninos y masculinos de Spondias purpurea de distintos tamaños</i>	24
2. Análisis estadísticos	
<i>a. Folivoría diferencial entre individuos femeninos y masculinos de Spondias purpurea</i>	25
<i>b. Determinación de la calidad química de hojas de individuos de Spondias purpurea</i>	25
<i>c. Variación temporal de taninos hidrolizables y carbohidratos no estructurales en hojas de individuos de Spondias purpurea</i>	26
3. Cuantificación de los metabolitos secundarios asociados a defensa	
<i>a. Método de cuantificación de fenoles totales</i>	26
<i>b. Método de difusión radial de taninos</i>	26
<i>c. Método de cuantificación de galotaninos: determinación con rodanina</i>	27
<i>d. Método para la cuantificación de proantocianidinas (PAS)</i>	27
<i>e. Método de cuantificación de taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) después de la reacción con iodato de potasio</i>	27
<i>f. Método de cuantificación de flavonoides totales</i>	27
<i>g. Método de cuantificación de elagitaninos</i>	27
4. Cuantificación de la calidad nutricional de las hojas de individuos masculinos y femeninos de Spondias purpurea	
<i>a. Método de cuantificación del contenido de agua</i>	28
<i>b. Método de cuantificación de clorofila</i>	28
<i>c. Método de cuantificación de carbohidratos no estructurales</i>	
i. Extracción de azúcares simples	28
VI. RESULTADOS	
1. Determinación del patrón de herbivoría	29
2. Determinación de la calidad química de hojas de individuos de Spondias purpurea	
<i>a. Concentración de compuestos químicos</i>	33
i. Metabolitos secundarios	33
ii. Elementos nutricionales	33
<i>b. Variación en la concentración de metabolitos secundarios y elementos nutricionales en individuos femeninos y masculinos de Spondias purpurea</i>	34

<i>c. Variación temporal de taninos hidrolizables y carbohidratos no estructurales en hojas de individuos de Spondias purpurea</i>	41
VII. DISCUSIÓN	43
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. APÉNDICE	51
X. LITERATURA CITADA	62

RESUMEN

La herbivoría es una interacción antagónica que potencialmente reduce el crecimiento y la adecuación de las plantas hospederas. Las posibles causas de la variación en la herbivoría en diferentes especies de plantas son las diferencias en la defensa química, calidad nutricional, estratos del dosel y edad de las hojas. Particularmente, los trabajos en especies dioicas que han examinado las diferencias sexuales en las interacciones bióticas, presentan una tendencia hacia especies herbáceas de zonas templadas, por lo que la información generada en plantas leñosas de los bosques tropicales es escasa. La teoría de la asignación de recursos propone que las diferencias intersexuales en el daño por herbívoros están dadas por la inversión diferencial de los recursos a la reproducción, crecimiento y defensa (química y física), siendo el sexo masculino el más susceptible a la herbivoría. Sin embargo, los estudios disponibles muestran resultados contrastantes. En este trabajo examiné las diferencias intersexuales en los niveles de herbivoría del árbol dioico *Spondias purpurea* durante dos años consecutivos (2004 y 2005), considerando diferentes factores bióticos como la defensa química vegetal, la calidad nutricional, la edad de las hojas, la estratificación vertical del dosel y el tamaño de las plantas. Se esperaba que los individuos femeninos al invertir más recursos a la reproducción, presentaran una menor calidad nutricional, mayor inversión en defensa química y menor daño por folívoros que los individuos masculinos. Sin embargo, encontramos mayores porcentajes de folivoría en los individuos femeninos de *Spondias purpurea* que en los masculinos. Este patrón fue consistente durante los dos años consecutivos de muestreo (2004 y 2005). Nuestro resultado difiere de lo reportado en la mayor parte de los estudios que han analizado el daño por herbívoros en especies dioicas. La diferencia en folivoría entre sexos en *Spondias purpurea* podría estar asociado a una mayor calidad nutricional (contenido de clorofila) en los individuos femeninos. El estrato superior del dosel de los individuos de ambos sexos presentó menores porcentajes de folivoría que el estrato medio y el inferior, mientras que las hojas jóvenes presentaron mayores niveles de herbivoría foliar que las hojas maduras. No existen diferencias significativas entre sexos en las concentraciones de metabolitos secundarios asociados a defensa. Sin embargo, los metabolitos secundarios y la calidad nutricional están asociados al mayor daño en hojas jóvenes y en estratos bajos del dosel. En general, este estudio demuestra que la calidad nutricional es el factor determinante en la preferencia de los folívoros que se alimentan de *Spondias purpurea*.

ABSTRACT

The herbivory by insects is an antagonist relationship that potentially reduces the growth and host plant fitness. The possible causes of variation in the levels of herbivory are the differences in the diversity of chemical plant defense, nutritional quality and leaf age. Specifically, the effects of folivory on dioecious plants have been poorly documented in tropical species. The resource allocation theory predicts that the costs and resource allocation of chemical defense, nutritional quality, growth rate and plant reproduction are different between males and females. Therefore, it is possible to expect differences in the levels of herbivory among both sexes. However, some studies have demonstrated contradictory results. In this study, we determined the gender related differences in the levels of folivory of a dioecious tree, *Spondias purpurea*, in a tropical dry forest during two consecutive years (2004 and 2005). We considered plant defense, nutritional quality, leaf age and three different canopy strata as variation factors.

We expected to find less damage and higher secondary metabolites concentrations in the female trees. However, we found higher percentages of folivory in female trees of *Spondias purpurea* in both years and this difference in foliar herbivory is associated with the nutritional quality (chlorophyll concentration) of the leaves. Our result differs from the majority of studies that analyze biotic interaction in dioecious species. The superior canopy strata in both sexes presented lower levels of foliar herbivory than medium and inferior strata. We found significant differences in the levels of herbivory between young and mature leaves in female and male trees. The secondary metabolites concentrations were similar between male and female trees. However, the nutritional quality and the secondary compounds are associated with the different levels of damage in young leaves and in the lower strata.

I. INTRODUCCIÓN

La herbivoría es una interacción ecológica que afecta el crecimiento, el éxito reproductivo y la capacidad fotosintética de las plantas hospederas en bosques templados y tropicales (Karban y Strauss 1993, Rossi y Stiling 1998, Ågren *et al.* 1999, Lehtilä y Strauss 1999, Mothershead y Marquis 2000, Strauss *et al.* 2001, Doyle *et al.* 2002, Ávila-Sakar *et al.* 2003, Bañuelos y Obeso 2004, Parra-Tabla *et al.* 2004). Específicamente, los insectos folívoros son un grupo taxonómico muy diverso y son los consumidores de follaje más importantes en los bosques tropicales (Marquis 1984, Clark y Clark 1985, Coley y Aide 1991, Marquis 1992, Coley y Barone 1996). El nivel de herbivoría depende de varios factores como el órgano atacado, el porcentaje de daño previo, la edad y el estado fisiológico de la planta, así como las interacciones de la planta atacada con otras plantas (Coley y Barone 1996, Hartley 2001). Específicamente, la variación en el daño por folívoros puede deberse a factores como: *i*) la estratificación del dosel (Lowman 1985, Dial y Roughgarden 1995, Coley y Barone 1996); *ii*) la edad de las hojas (Marquis 1991, Coley y Barone 1996); *iii*) el vigor de la planta (Price 1991); *iv*) la expresión sexual de la especie de planta (Danell *et al.* 1985, Jing y Coley 1990, Krischik y Denno 1990). Además, en sistemas como el bosque tropical seco, la folivoría también está influenciada por la marcada estacionalidad entre la temporada húmeda y seca, concentrándose el daño por folívoros en la estación lluviosa (Murphy y Lugo 1986, Domínguez y Dirzo 1994).

Se ha demostrado que la herbivoría tiene efectos negativos sobre la planta como: *i*) aumento en la mortalidad de las plantas que son consumidas (Rausher y Feeny 1980); *ii*) reducción en la adecuación de la planta (Boecklen y Hoffman 1993, Delph *et al.* 1993, Quesada *et al.* 1995, Sacchi y Wise 1996, Strauss *et al.* 1996, Ågren 1997, Ahman 1997, Lehtilä y Strauss 1997, Wolfe 1997); *iii*) disminución en la biomasa de hojas, tallos o raíces (Marquis 1984). Como consecuencia, las plantas han desarrollado mecanismo que reducen la probabilidad de un ataque de herbivoría, afectando la preferencia (antixenosis) o el desempeño de los herbívoros (antibiosis) (Karban y Baldwin 1997, Strauss y Agrawal 1999, Leimu y Koricheva 2006).

Por lo tanto, para poder entender el potencial impacto de los insectos folívoros sobre sus plantas hospederas, es necesario documentar la cantidad y la variación espacio-temporal del consumo foliar por insectos así como los factores asociados a esta variación (i.e. defensa, expresión sexual de la planta, estratificación del dosel, edad de las hojas, el vigor de la planta) (Marquis 1991).

1. Resistencia anti-herbívoro

La resistencia es la manera en que las plantas reducen la probabilidad de un ataque de herbivoría, afectando la preferencia (antixenosis) o el desempeño de los herbívoros (antibiosis) (Karban y Baldwin 1997, Strauss y Agrawal 1999, Leimu y Koricheva 2006). Es un tipo de respuesta que las plantas han desarrollado al ataque por herbívoros para reducir la cantidad de daño (Weinig 2003). Las plantas han evolucionado diferentes tipos de resistencia, tanto físicas como químicas, como respuesta a las presiones ejercidas por herbívoros y patógenos (Rhoades y Cates 1976, Rhoades 1977, McKey 1979, Rhoades 1985, Harborne 1990, Coley y Barone 1996, Strauss y Agrawal 1999). Estas características reducen la palatabilidad de la planta mediante diversas estrategias: *i*) previenen el acceso a la planta (e.g. espinas) (Myers y Bazely 1991); *ii*) reducen la calidad nutricional incrementando el contenido de lignina del tejido o sintetizando metabolitos secundarios que interfieren con el consumo de la planta por parte del insecto (Bryant *et al.* 1991, 1992).

Algunos de los grupos de metabolitos secundarios asociados a la resistencia contra herbívoros son los fenoles (e.g. flavonoides, taninos, polifenoles, antocianidinas), terpenos (e.g. lactonas, saponinas, cucurbitacinas, compuestos cardenólicos), y compuestos nitrogenados (e.g. alcaloides, aminoácidos no proteicos, glicósidos cianogénicos) (Rhoades 1985, Harborne 1990, Coley y Barone 1996). Estos compuestos secundarios pueden ser tóxicos (Berenbaum 1978, Rosenthal 1991, Wink y Schimmer 1999, Izhaki 2002), inductores de desarrollo lento en los herbívoros (Bergelson *et al.* 1986, Harborne 1988, Bowers 1991), y repelentes, disuasivos y reductores de la digestión (Jones y Klocke *et al.* 1986, Coley y Aide 1991, Felton y Duffey 1991, Rosenthal y Berenbaum 1992, Hagerman y Robbins 1993, Izhaki 2002).

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden tener un efecto de resistencia constitutivo o inducido sobre los herbívoros. La resistencia constitutiva se refiere a los metabolitos secundarios que siempre están expresados en la planta como producto de las vías metabólicas en diferentes procesos fisiológicos y funcionan independientemente de que exista o no daño (Karban y Baldwin 1997). Consta principalmente de concentraciones bajas de compuestos de peso molecular bajo tales como algunos terpenoides (Gottlieb 1989) y compuestos con nitrógeno y/o azufre (Feeny 1976, Levin 1976, Rhoades y Cates 1976, McKey 1979, Mattson 1980, Coley *et al.* 1985).

Actualmente se ha reconocido que las características que ayudan a la planta a resistir la herbivoría pueden cambiar después de un ataque por herbívoros, tales cambios son referidos como respuestas inducidas (Karban y Baldwin 1997). La resistencia inducida se refiere a la producción de nuevos metabolitos secundarios como respuesta al daño mecánico

de alguna parte de la planta o por el ataque de herbívoros y patógenos (Baldwin 1994, Karban y Baldwin 1997, Agrawal 1999, Agrawal *et al.* 1999, Agrawal 2000, Hudgins *et al.* 2006, McCall y Karban 2006). Los cambios químicos inducidos pueden ser en diferentes escalas: temporales y espaciales, algunos ocurren rápidamente y otros a largo plazo (Hartley y Lawton 1991) y la inducción puede ser sistémica o local (Simms y Vision 1995, Karban y Baldwin 1997).

2. Herbivoría en plantas dioicas

La folivoría puede afectar el crecimiento, reproducción y capacidad fotosintética de especies hermafroditas (Rossi y Stiling 1998, Lehtilä y Strauss 1999, Mothershead y Marquis 2000, Strauss *et al.* 2001), así como a especies de plantas con alguna especialización sexual como plantas monoicas (Quesada *et al.* 1995, Vallius y Salonen 2000, Ávila-Sakar *et al.* 2003, Parra-Tabla *et al.* 2004), y plantas dioicas (Houle 1999, Doyle *et al.* 2002, Bañuelos y Obeso 2004). Particularmente, durante la última década ha aumentado el número de estudios que sugieren que los individuos masculinos y femeninos de las plantas dioicas son afectados de forma diferencial por la herbivoría (Alliende y Harper 1989, Jing y Coley 1990, Krischik y Denno 1990, Ågren *et al.* 1999, Houle 1999, Doyle *et al.* 2002, Bañuelos y Obeso 2004).

Diversos autores han hecho revisiones sobre el tema y han encontrado la misma tendencia de una mayor herbivoría en los individuos masculinos. Ågren *et al.* (1999) analizó 35 estudios, de los cuales, el 60% indicaron mayores niveles de herbivoría en plantas masculinas (Danell *et al.* 1985, 1991, Ågren 1987, Polhemus 1988, Alliende y Harper 1989, Jing y Coley 1990, Krischik y Denno 1990, Hjältén 1992, Boecklen y Hoffman 1993, Wolfe 1997, Ågren *et al.* 1999), únicamente el 17.7% de los estudios señalaron que las plantas femeninas presentan mayores niveles de herbivoría que los individuos masculinos (Lovett-Doust y Lovett-Doust 1985, Oyama y Dirzo 1991), y en el 22% de los trabajos no se encontraron diferencias entre sexos (Lovett-Doust y Lovett-Doust 1985, Strauss 1990, Hjältén 1992, Niesenbaum 1992, Ahman 1997). Boecklen y Hoffman (1993) en una revisión de 24 casos, encontraron que un 79% de los estudios analizados presentó una mayor herbivoría en individuos masculinos. En un trabajo más reciente, Cornelissen y Stiling (2005) realizaron un metanálisis con 33 estudios de plantas dioicas, y encontraron la misma tendencia de mayor abundancia y daño por herbívoros en el sexo masculino que en el femenino.

La teoría de asignación de recursos (Charnov 1997) propone que las plantas tienen un número finito de recursos que son distribuidos diferencialmente entre las funciones de reproducción, crecimiento y el mantenimiento (Bazzaz *et al.* 1987, Herms y Mattson 1992). Según esta teoría, las plantas femeninas de especies dioicas asignan más recursos a la

reproducción que los individuos masculinos (Ågren 1988, Allen y Antos 1988, García y Antor 1995, Marion y Houle 1996, Delph 1999, Obeso 2002, Bañuelos y Obeso 2004), debido a que se considera que la producción de frutos y semillas es un proceso más costoso que la producción de polen (Lloyd y Webb 1977, Obeso 1997, Ågren *et al.* 1999, Nicotra 1999, Obeso 2002). Por lo tanto, las plantas femeninas asignan menos recursos a otras funciones como el crecimiento y la sobrevivencia (Cipollini y Whigham 1994, Ågren *et al.* 1999). Diversos estudios han mostrado que este crecimiento retardado en las plantas femeninas favorece la inversión de recursos a la defensa (Coley *et al.* 1985, Ågren *et al.* 1999, Cornelissen y Stiling 2005). Estos resultados están acorde a la hipótesis de la disponibilidad de recursos propuesta por Coley *et al.* (1985), que indica que la tasa intrínseca de crecimiento determina el nivel de defensa. Esto quiere decir que las especies de lento crecimiento tienden a invertir más recursos a defensa que las especies de rápido crecimiento. Jing y Coley (1990) pusieron a prueba esta hipótesis en especies dioicas, prediciendo que los individuos femeninos al presentar menores tasas de crecimiento serían mejor defendidas. Otros estudios indican que las plantas masculinas son menos defendidas y por lo tanto, más susceptibles a la herbivoría (Hjältén y Palo 1992, Zangerl y Bazzaz 1992, Ågren *et al.* 1999, Dormann y Skarpe 2002), sugiriendo que las diferencias sexuales en características defensivas como la dureza de la hoja y las concentraciones de metabolitos secundarios son consecuencias del patrón diferencial de crecimiento (Ågren *et al.* 1999). Sin embargo, los estudios que han documentado el crecimiento vegetativo en especies dioicas han encontrado resultados contrastantes (Ågren *et al.* 1999). En muchas especies dioicas, las plantas masculinas presentan un mayor crecimiento vegetativo (Oyama 1990, Ågren *et al.* 1999, Delph 1999), en contraste, en otras especies los individuos femeninos crecen más que los masculinos (Grant y Mitton 1979, Sakai y Burris 1985, Delph y Meagher 1995, Ågren *et al.* 1999), y finalmente, otros estudios no encuentran ninguna diferencia entre sexos (Sakai y Sharif 1988, Alliende y Harper 1989, Marion y Houle 1996). De tal modo, no existen patrones claros que muestren diferencias en la calidad y cantidad de metabolitos secundarios presentes en las plantas masculinas y femeninas debido a una asignación diferencial de recursos.

a. Defensa química en plantas dioicas

Las diferencias sexuales en las características que afectan la calidad del tejido de la planta como alimento, pueden afectar la preferencia y el desempeño de los herbívoros en individuos masculinos o femeninos. Estas diferencias pueden estar asociadas a la concentración de nutrientes y diferencias cualitativas y cuantitativas de los metabolitos secundarios, lo cual influye en la palatabilidad a los herbívoros (Ågren *et al.* 1999). Los

estudios disponibles sugieren que los individuos masculinos de especies dioicas contienen mayores concentraciones de nitrógeno y menores concentraciones de metabolitos secundarios (Ågren *et al.* 1999, Hendricks y Collier 2003, Cornelissen y Stiling 2005). En un meta-análisis que examina el efecto del sexo de plantas dioicas en interacciones bióticas, no se encontraron diferencias intersexuales en el contenido nutricional. La diferencia en la calidad del tejido está asociada a defensas estructurales y compuestos secundarios (Cornelissen y Stiling 2005).

Cornelissen y Stiling (2005) encontraron mayores concentraciones de fenoles y terpenos en los individuos femeninos de 53 especies dioicas, mientras que los individuos masculinos a pesar de contener mayores concentraciones de algunos metabolitos secundarios, tricomas, resinas y dureza de hojas presentaron mayores niveles de daño por herbívoros. La información del metabolismo secundario asociado a defensa en especies dioicas proviene de datos restringidos a especies templadas, principalmente de la familia Salicaceae (Ågren *et al.* 1999). En el análisis de 13 especies dioicas, la concentración de por lo menos un metabolito secundario (principalmente fenoles, taninos y glicósidos fenólicos) presente en las hojas, corteza o ramas, fue mayor en las plantas femeninas que en las masculinas. Sin embargo, en 5 especies, los individuos masculinos presentaron mayores concentraciones de algunos metabolitos secundarios. Las diferencias en la composición química entre ambos sexos de las especies dioicas puede ser consecuencia de las diferencias en los patrones de crecimiento y de las diferencias en las presiones ejercidas por herbívoros y parásitos (Ågren *et al.* 1999). De acuerdo con la hipótesis de disponibilidad de recursos (Coley *et al.* 1985), la tasa intrínseca de crecimiento determina el nivel de defensa: especies de plantas de lento crecimiento tienden a invertir relativamente menos recursos a la defensa en comparación con las especies de rápido crecimiento. Jing y Coley (1990) aplicaron esta hipótesis en plantas dioicas, asumiendo que si las plantas femeninas presentaban una tasa de crecimiento más baja que los individuos masculinos, estarían mejor defendidas contra herbívoros.

A pesar de que la teoría de asignación de recursos (Charnov 1997) predice diferencias intersexuales en la calidad y cantidad de metabolitos secundarios debido a la asignación diferencial de recursos, aún es poca la evidencia empírica que corrobora esta hipótesis ya que los estudios que han analizado estos aspectos en especies dioicas no son consistentes en sus resultados (Ågren *et al.* 1999). Por lo tanto, esta hipótesis no se puede generalizar en plantas dioicas de diferentes ecosistemas.

3. Factores de variación en los niveles de folivoría y resistencia en plantas

a. Variación temporal de herbivoría y patrones de herbivoría en bosques tropicales secos

Los bosques tropicales estacionales ocupan el 42% de la superficie tropical mundial (Murphy y Lugo 1986). Este ecosistema se caracteriza por tener un patrón de lluvias marcadamente estacional (más de 4 meses secos al año), una temperatura media anual mayor a 22°C y un cociente de precipitación P/T (precipitación anual –temperatura media anual) de alrededor de 30 (Murphy y Lugo 1986). Debido a la estacionalidad, la folivoría se concentra en la época lluviosa, ya que la mayor parte de la flora presente en estos bosques es caducifolia (Coley y Barone 1996) y estos bosques tropicales estacionales también tienen vegetación riparia a lo largo de cañadas con cruces de agua (Domínguez y Dirzo 1994). Los patrones de forrajeo temporales y espaciales por parte de los herbívoros han ocupado un gran interés desde hace varias décadas (e.g. Coley 1983). Particularmente, Filip *et al.* (1995) encontraron diferencias interanuales e interespecíficas en los niveles de folivoría en 7 especies de árboles de 17 especies analizadas, en un bosque tropical caducifolio, medidos durante 3 años consecutivos. Igualmente, en insectos inductores de agallas (IIA), Cuevas *et al.* (2006) evaluaron los patrones temporales y espaciales de la abundancia y cantidad de daño foliar causado por IIA en hábitats caducifolios y riparios en un bosque tropical seco de México. La abundancia y la cantidad de daño foliar por IIA fue mayor en hábitats caducifolios que en riparios durante la estación húmeda. Estos resultados indican que plantas de hábitats riparios presentan dos picos de producción masiva de hojas, y los IIA colonizan las hojas producidas en el primer pico al inicio de la estación húmeda y se acumulan o recolonizan las hojas producidas en el segundo pico al inicio de la estación seca. Otro factor importante que afecta temporalmente los patrones de herbivoría es el cambio en la calidad nutricional de las hojas asociado a la ontogenia de las mismas, lo que produce diferencias en las tasas y porcentajes de consumo de área foliar dentro y entre temporadas (Janzen y Waterman 1984, Filip *et al.* 1995). Por lo tanto, en los bosques tropicales estacionales existen variaciones temporales en el daño por diferentes gremios de herbívoros debido a la estacionalidad entre la estación lluviosa y seca (Filip *et al.* 1995, Cuevas-Reyes *et al.* 2006), y a la considerable variación climática entre años (Bullock 1986, 1988), que puede afectar los patrones de fenología foliar y por lo tanto, la disponibilidad y abundancia de hojas para los diferentes herbívoros (Janzen 1981, Bullock y Solís-Magallanes 1990).

b. Estratos del dosel

La estratificación del dosel es uno de los factores que se han relacionado con las diferencias en los niveles de folivoría y resistencia a la herbivoría de árboles tropicales ya que representa para los herbívoros una gran diversidad de microambientes potenciales que pueden colonizar y afectar sus preferencias alimenticias (Kursar y Coley 2003). El patrón general muestra que las hojas expuestas al sol sufren un menor daño que las hojas de estratos más bajos (Lowman 1985). Los factores propuestos para explicar las diferencias en herbivoría entre los estratos del dosel son: la calidad foliar, el microclima y la depredación. Estos factores no son mutuamente excluyentes y su importancia puede variar con el tamaño y gremio de herbívoros (Coley y Barone 1996).

Se ha argumentado que la calidad nutricional es mayor en el estrato más bajo que en el superior, donde la irradiación puede modificar las propiedades físicas y químicas de las hojas (Lowman 1985, 1992), siendo más pequeñas, gruesas y con mayores concentraciones de metabolitos secundarios como fenoles (Lowman 1985, Lowman y Box 1983, Givnish 1988). Estas diferencias afectan directamente la densidad de herbívoros y la composición de la comunidad de especies entre estratos (Le Corff y Marquis 1999). Por lo general, el estrato superior del dosel tiene un microclima más caliente y seco que afecta severamente a los insectos herbívoros (Lowman 1985, Le Corff y Marquis 1999). Además, la depredación de herbívoros, principalmente por pájaros y hormigas puede ser más intensa y tener un efecto negativo en la sobrevivencia de los folívoros en el estrato superior (Dalhsten *et al.* 1990, Dial y Roughgarden 1995, Le Corff y Marquis 1999). Otros autores han argumentado que las diferencias en la densidad de herbívoros entre estratos, no se deben a la defensa química, sino a la calidad nutricional, ya que el daño en el dosel se concentra en el follaje joven, que es más rico en nitrógeno y agua (Basset 1991).

c. Edad de la hoja

La edad de la hoja es otro factor que determina las diferencias en la resistencia a la herbivoría y los niveles de folivoría en plantas de bosques templados y tropicales (Coley 1983, Coley y Barone 1996). Algunos factores que varían con la edad de las hojas y que por lo tanto afectan diferencialmente la tasa de daño por herbívoros son la calidad nutricional de la hoja (Boecklen y Hoffman 1993, Stamp y Casey 1993, Parker 1995) y la diversidad y concentración de los metabolitos secundarios asociados a la defensa contra herbívoros (Coley 1983, 1986, Ågren 1987, Jing y Coley 1990, Coley y Barone 1996).

El patrón general de herbivoría muestra mayores niveles de daño en hojas jóvenes que en hojas maduras por diferentes gremios de herbívoros (Coley 1983, Coley y Aide 1991, Steinbauer *et al.* 1998, Karban y Thaler 1999, Cornelissen y Fernandes 2001). Sin embargo, a pesar de que este patrón ha sido muy documentado, los factores involucrados son poco conocidos (Kursar y Coley 2003). En el caso particular de los bosques tropicales secos, las diferencias en los niveles de herbivoría asociadas a la ontogenia foliar (Coley y Barone 1996), se le han atribuido a la alta calidad nutricional (e.g. contenido de agua y nitrógeno) (Coley y Aide 1991, Coley y Barone 1996), al alto contenido de metabolitos secundarios de bajo peso molecular (Coley y Barone 1996), y a la poca dureza foliar que son atributos de hojas jóvenes (e.g. defensa física) (Coley 1983, Aide y Zimmerman 1990).

Los cambios del metabolismo secundario asociados a la defensa durante el crecimiento foliar son muy dinámicos y aumentan exponencialmente durante el desarrollo foliar y decaen conforme la hoja madura (Kursar y Coley 2003). Se ha demostrado que para las hojas en expansión es más ventajoso invertir sus recursos en compuestos de bajo peso molecular como fenoles (Coley 1983, Choong 1996, Read *et al.* 2003), terpenos (Crankshaw y Langenheim 1981, Hall y Langenheim 1986, Mihaliak y Lincoln 1989), alcaloides (van Dam *et al.* 1995, 1996) y glucósidos cianogénicos (Lamont 1993, Gleadow y Woodrow 2000) mientras que las hojas maduras contienen mayores concentraciones de taninos condensados y carbohidratos no estructurales (Waltz 1984, Coley y Barone 1996, Kursar y Coley 2003).

Coleman (1986) sugiere que algunas características nutricionales de las plantas cambian con la edad de la hoja: *i*) el contenido de nitrógeno foliar es mayor en las hojas jóvenes (3-7%) (Coley y Aide 1991) y comienza a declinar gradualmente durante el curso del crecimiento foliar hasta la senescencia (Mattson 1980), *ii*) el contenido de agua es menor en las hojas maduras (Coley y Aide 1991), *iii*) en muchas especies de plantas, las hojas jóvenes presentan mayores tasas de fotosíntesis que las hojas maduras (Bauer y Bauer 1980, Hutchison *et al.* 1990, Karban y Thaler 1999). Los elementos nutricionales son esenciales para el crecimiento de las hojas, principalmente en especies de rápida expansión foliar, como muchas especies de los bosques tropicales secos (Coley y Barone 1996). Debido a los costos del crecimiento (Kursar y Coley 2003) y del metabolismo secundario (i.e. biosíntesis, transporte y almacenaje de compuestos secundarios) (Herms y Mattson 1992), se ha propuesto que las hojas jóvenes son menos defendidas químicamente (Kursar y Coley 2003) y por lo tanto, sufren de mayores tasas de herbivoría que las hojas maduras (Coley y Barone 1996, Kursar y Coley 2003);

d. Vigor de la planta

Schoonhoven *et al.* (1998) proponen que las plantas pueden ser consideradas como recursos subóptimos para los herbívoros debido al bajo valor nutricional y a las altas concentraciones de compuestos de defensa que en general presentan las plantas. La preferencia de los herbívoros sobre la calidad del recurso que representan las plantas es un continuo debido a que existen herbívoros que prefieren plantas estresadas por que representan un recurso químicamente más susceptible para ser atacados (White 1984, Mattson y Haack 1987), mientras que otros herbívoros prefieren plantas más vigorosas por que son un recurso que ofrece una mayor calidad nutricional (Price 1991). La *hipótesis del vigor de la planta* (Price 1991) propone que la interacción planta-herbívoro es asimétrica, es decir, los herbívoros prefieren o se desempeñan mejor en módulos de la planta, individuos o especies más vigorosas (i.e. de mayor tamaño o de mayor tasa de crecimiento) debido a que los individuos más vigorosos tienen mayores concentraciones de nutrientes y menores concentraciones de compuestos de defensa que los menos vigorosos (Price 1991, Inbar *et al.* 2001). Diversos estudios han corroborado esta hipótesis en diferentes sistemas (Fritz *et al.* 1987, du Toit *et al.* 1990, Danell *et al.* 1991, Prado y Vieira 1999, Bergström *et al.* 2000, Invar *et al.* 2001, De Bruyn *et al.* 2002). En áfidos *Pemphigus* se ha observado que los sitios de colonización elegidos están relacionados con el tamaño de la hoja y su localización dentro del dosel (Karban y Agrawal 2002). Las hojas más grandes incrementan el peso de las madres y la progenie, el número de progenie, la tasa de desarrollo y la fecundidad (Whitham 1978). El área foliar, el alargamiento de ramas y el tamaño del individuo son un buen estimador del crecimiento vegetativo y por lo tanto del vigor de la planta (Niesenbaum 1992). Consecuentemente, el vigor de la planta es un factor muy importante que potencialmente puede afectar la incidencia y los niveles de herbivoría por diferentes gremios de herbívoros (Freitas *et al.* 1999, Faria y Fernandes 2001, Stastny *et al.* 2005).

e. Calidad nutricional

El desempeño y la fecundidad de los insectos herbívoros están influenciados por diversos factores asociados a la calidad nutricional de la planta huésped, como el contenido de compuestos secundarios, de elementos nutricionales, características físicas y el género de la planta (Price *et al.* 1980, Scriber y Slanski 1981, Haukioja *et al.* 1985, Krischik y Denno 1990, De Bruyn *et al.* 2002, Fritz *et al.* 2003, Hendricks y Collier 2003). El contenido de los elementos nutricionales (e.g. carbono, nitrógeno y agua) en la plantas es una característica vital en los procesos metabólicos de los herbívoros (Mattson 1980), ya que son factores

limitantes para el desarrollo de los insectos (Cooke *et al.* 1984, Finke 1988) y tiene consecuencias en los niveles de herbivoría (Moran y Hamilton 1980). Diversos trabajos han documentado que un bajo contenido de nitrógeno y agua foliar (Scriber y Slansky 1981, Haukioja *et al.* 1985, Wold y Marquis 1997, De Bruyn *et al.* 2002), están asociados a una baja fecundidad o desempeño de los herbívoros (Stamp y Casey 1993, Larcher 1995, Wold y Marquis 1997, Berner *et al.* 2005). La calidad nutricional de la hoja influye las tasas de crecimiento de los insectos (Finke 1988), ya que varía entre especies y entre edades de las hojas (Coley y Aide 1991, Coley y Barone 1996, Kursar y Coley 2003).

A pesar de que existe una gran cantidad de estudios que evalúan la dinámica entre las plantas y sus herbívoros, los mecanismos por los cuales surgen estos patrones han sido poco estudiados. Además, el número de trabajos en especies dioicas que han sido examinadas por diferencias sexuales en las interacciones bióticas es aún limitado en plantas leñosas de los bosques tropicales.

Bajo este contexto, en esta tesis examiné las posibles diferencias intersexuales en los niveles de herbivoría del árbol dioico *Spondias purpurea* considerando diferentes factores bióticos como la defensa química vegetal, la calidad nutricional, la edad de las hojas, la estratificación vertical del dosel y el tamaño de las plantas

II. HIPOTESIS

a. La herbivoría es diferencial entre individuos femeninos y masculinos debido a que los recursos asignados a la producción de flores, frutos y semillas en plantas femeninas es considerada como un proceso más costoso que la producción de polen. Por lo tanto, se espera que si los individuos femeninos invierten más recursos a la reproducción, presenten una menor calidad nutricional, mayor inversión en defensa química y menor daño por folívoros que los individuos masculinos.

b. Se espera que las hojas jóvenes tengan mayores niveles de herbivoría, mayor calidad nutricional y menores concentraciones de compuestos secundarios que las hojas maduras debido a los cambios en los procesos fisiológicos asociados al desarrollo foliar.

c. Las diferencias en la calidad foliar, microclima local y nivel de depredación entre los estratos del dosel, sugieren diferencias en el nivel de folivoría. Por lo tanto, las hojas del dosel superior al presentar menor calidad nutricional y mayores concentraciones de metabolitos secundarios, presentarán menores niveles de folivoría que las hojas de estratos más bajos.

d. La hipótesis del vigor de la planta predice una preferencia de los herbívoros por los individuos más vigorosos debido a una mayor calidad nutricional y menores concentraciones de compuestos de defensa. Por lo que se espera que los individuos más vigorosos presenten mayores niveles de folivoría, mayores concentraciones de nutrientes y menores concentraciones de compuestos secundarios asociados a defensa.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar el patrón de herbivoría foliar de individuos masculinos y femeninos de *Spondias purpurea* de distinto vigor, así como la importancia de la defensa química y calidad nutricional en los niveles de herbivoría encontrados en hojas de distintas edades y estratos del dosel.

2. Objetivos particulares

a. Demostrar si existen diferencias en la intensidad de la herbivoría foliar entre individuos femeninos y masculinos, y la relación de la folivoría con la defensa química y calidad nutricional en ambos sexos de *Spondias purpurea*.

b. Establecer si existen diferencias en la intensidad de la herbivoría foliar entre hojas jóvenes y maduras de individuos masculinos y femeninos de *Spondias purpurea*, y determinar si estas diferencias están relacionadas con la calidad nutricional y metabolitos secundarios asociados a defensa.

c. Determinar si existen diferencias en la intensidad de la herbivoría foliar en los distintos estratos del dosel de individuos masculinos y femeninos de *Spondias purpurea* y determinar si estos niveles están relacionados con la calidad nutricional y defensa química.

d. Demostrar si existen preferencia por lo individuos más vigorosos y determinar la posible relación de esta preferencia con las concentraciones de elementos nutricionales y metabolitos secundarios.

IV. MÉTODOS GENERALES

1. Especie de estudio

a. Distribución

Spondias purpurea L. (Anacardiaceae) se distribuye desde la parte tropical de México, hasta Perú y Brasil (Pennington y Sarukhán 1998, Macia y Barfod 2000). Se establece principalmente en bosques tropicales caducifolios o semicaducifolios de México y en sistemas perturbados (Barfod 1987). En el bosque tropical caducifolio de Chamela, Jalisco, las poblaciones de *S. purpurea* se ubican principalmente en laderas y cimas donde domina el bosque tropical caducifolio y es menos común en el bosque tropical subperennifolio (Mandujano *et al.* 1994). No es una especie muy abundante en Chamela, comparada con otras especies de plantas presentes (Lott *et al.* 1987).

b. Uso tradicional

Los nombres comunes de *Spondias purpurea* son ciruelo y ciruela colorada (Mandujano 2002). El uso de sus frutos se remonta a las culturas prehispánicas (De Acosta 1985, Benítez 1986). En épocas recientes, la demanda por los frutos se ha incrementado para su consumo en fresco y procesado, para elaborar jaleas y bebidas (Cuevas 1994) para lo cual, *S. purpurea* es cultivada en los trópicos y subtrópicos de México (Avitia-García 1997). La mayoría de los árboles son encontrados en cercas vivas y jardines (Cuevas 1994). Son propagados vegetativamente a través de cortes de ramas (Morton 1987). Hoy en día, la ciruela mexicana es una especie considerada por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) para utilizarse en la reforestación de tierras degradadas (Avitia 1996).

c. Expresión sexual y desarrollo reproductivo de *Spondias purpurea*

Esta especie presenta variación latitudinal en su sistema reproductivo en Mesoamérica (Bullock 1992, Pennington y Sarukhán 1998). Una revisión de las descripciones taxonómicas de esta especie indica que las plantas en el sur de Mesoamérica son monoicas mientras que las del límite norte son dioicas, como las poblaciones del bosque tropical caducifolio mexicano (Rzedowski 1978). Las flores son rojas, sésiles y dimórficas (Bullock 1992). Esta especie florece y madura sus frutos durante la estación seca (enero-mayo) cuando no posee hojas

(Bullock y Solís-Magallanes 1990, Bullock 1992). *Spondias purpurea* es polinizada por abejas y avispas pequeñas (Bullock 1994).

d. Contenido nutricional de *Spondias purpurea*

Las ramas de los árboles femeninos tienen mayor concentración de carbohidratos no-estructurales que las ramas de los árboles masculinos al inicio de la época seca (Bullock 1992). Las hojas jóvenes son suaves y poco lignificadas, mientras que las hojas maduras son más duras, lignificadas y con presencia de carbohidratos estructurales (De Pinto *et al.* 2000). *S. purpurea* produce una goma que está compuesta por los polisacáridos galactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y ácido glucurónico (De Pinto *et al.* 2000).

e. Gremios de herbívoros asociados a *Spondias purpurea*

Están reportados dos tipos de herbívoros que consumen distintas partes vegetativas de *Spondias purpurea*: *i*) barrenadores de troncos y ramas, tal es el caso de las hembras del escarabajo *Oncideres albomarginata chamela* que al inicio de la época seca cortan ramas de *S. purpurea* para ovipositar (Mandujano 2002, Uribe-Mú y Quesada 2006), modificando la arquitectura de los árboles notablemente; *ii*) durante la época de lluvias las hojas de los árboles adultos sufren un ataque por distintos herbívoros: folívoros como *Rothschildia cinta* (Lepidoptera: Saturniidae) (Bullock 1992), y cortadores de hojas como *Atta cephalotes* (Rockwood 1973). Además, venados y pecaríes consumen las hojas de *S. purpurea* en menor porcentaje (Mandujano 2002).

f. Metabolismo secundario de *Spondias purpurea*

Veinticinco de los 76 géneros de la familia Anacardiaceae están reportados como tóxicos (Mitchell 1990). Algunas especies se caracterizan por producir resinas en conductos resinosos esquizógenos o lisígenos que producen alergias al tacto (Montiel 1991). Otras especies producen látex en la corteza y floema. La fitoquímica de esta familia incluye la producción de 5-desoxiflavonoides y biflavonoides, acumulan quebrachitol y comúnmente taninos, proantocianinas y ácido gálico, y rara vez se ha detectado ácido elágico, saponinas y sustancias cianogénicas (Montiel 1991). Los compuestos tóxicos más comunes en esta familia son los fenoles: urushiol, cardol, heptadecilresorcinol, cardanol, haptadecadienilfenol y ácidos anacárdicos (Aguilar-Ortigoza *et al.* 2003). Estos fenoles restringen el crecimiento de hongos como *Alternaria sp.* (Cojocarú *et al.* 1986, Harborne 1999), *Fusarium sp.* y *Helmin*

thosporium (Rivero-Cruz *et al.* 1997). Además, Corthout *et al.* (1992) describió actividad antiviral de estos compuestos en el género *Spondias*. *Spondias purpurea* se caracteriza por la ausencia de biflavonoides tóxicos, resorcinoles y catecoles (Aguilar-Ortigoza *et al.* 2003) y la presencia de taninos, alquilfenoles y resinas que están asociados a funciones de reducción de la digestibilidad de insectos (Howard 1988, Bryant *et al.* 1991, 1992, De Pinto *et al.* 2000, Aguilar-Ortigoza *et al.* 2003).

2. Área de estudio

La Estación biológica de Chamela, situada dentro de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala, en la Costa Pacífico mexicana en el estado de Jalisco, entre el río San Nicolás al norte y el río Cuixmala al sur (Bullock 1988) en la zona intertropical del hemisferio norte (19°29'N de latitud y 105°03'W de longitud) dentro del municipio de la Huerta (Bullock 1986, Bullock y Solís-Magallanes 1990). La reserva comprende 13,000 hectáreas principalmente de bosque tropical caducifolio o selva baja caducifolia (Bullock 1986) con áreas pequeñas de bosque tropical subperennifolio y de vegetación secundaria. La precipitación es marcadamente estacional, concentrándose en los meses de Junio a Octubre (García-Oliva *et al.* 1991). En esta región se encuentran las poblaciones dioicas de *Spondias purpurea*. Actualmente se tienen marcados y sexados más de 100 individuos cuya expresión sexual se ha monitoreado durante los últimos ocho años. Se ha dado seguimiento a la expresión sexual para descartar hermafroditismo secuencial (Charnov 1982) en las poblaciones de *S. purpurea* de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Patrón de herbivoría

*a. Colecta de hojas para determinar diferencias en la intensidad de la herbivoría foliar en las hojas jóvenes y maduras de distintos estratos del dosel en individuos femeninos y masculinos de *Spondias purpurea* de distintos tamaños.*

Durante dos años consecutivos (2004 y 2005) y al final de la época de lluvias, se muestrearon 30 individuos de *S. purpurea* (15 femeninos, 15 masculinos) en el 2004 y 40 individuos en el 2005 (20 femeninos, 20 masculinos). Los individuos muestreados son distintos entre años. Se le midió a cada individuo el diámetro a la altura del pecho, como estimación del tamaño. Para determinar el porcentaje de herbivoría foliar en los distintos estratos del dosel en individuos femeninos y masculinos, en cada individuo se realizó un muestreo sistemático en los tres estratos del dosel: basal, medio y superior. En cada estrato, se colectaron aleatoriamente 4 ramas secundarias, de las cuales se eligieron al azar 60 hojas de distintas edades por estrato (5400 hojas en el 2004 y 7200 hojas en el 2005) en las que se determinó el porcentaje de folivoría. Para determinar si existía alguna preferencia de los herbívoros por hojas jóvenes o maduras de *S. purpurea*, se muestreo en las mismas 4 ramas secundarias elegidas por estrato. Cada rama se dividió en dos categorías de edad, la primera categoría se consideró de hojas jóvenes a partir del ápice de la rama la mitad de la misma y la segunda categoría de hojas maduras se consideró a partir de la mitad de la rama hasta la región basal de la rama (3600 hojas en el 2004 y 4800 en el 2005). Las hojas colectadas para esta sección son una submuestra de la colecta para determinar diferencias en la intensidad de la herbivoría foliar entre individuos femeninos y masculinos. Se tomó una fotografía digital de cada hoja y se estimó el área foliar total y el área removida por folívoros utilizando el "software" *Sigma Scan Pro 5* (Systat: SPSS 1999).

*b. Colecta de hojas para determinar diferencias en la calidad nutricional y defensa química en las hojas jóvenes y maduras de distintos estratos del dosel en individuos femeninos y masculinos de *Spondias purpurea* de distintos tamaños.*

Durante dos años consecutivos (2004 y 2005) y al final de la época de lluvias, se muestrearon 30 individuos de *S. purpurea* (15 femeninos, 15 masculinos) en el 2004 y 40 individuos en el 2005 (20 femeninos, 20 masculinos). Los individuos muestreados son distintos entre años. Se le midió a cada individuo el diámetro a la altura del pecho, como

estimación del tamaño. Para determinar la calidad nutricional y la defensa química en los distintos estratos del dosel en individuos femeninos y masculinos, en cada individuo se realizó un muestreo sistemático en los tres estratos del dosel: basal, medio y superior. En cada estrato, se colectaron aleatoriamente 4 ramas secundarias. Cada rama se dividió en dos categorías de edad, la primera categoría se consideró de hojas jóvenes a partir del ápice de la rama la mitad de la misma y la segunda categoría de hojas maduras se consideró a partir de la mitad de la rama hasta la región basal de la rama. Se determinó el porcentaje de folivoría (900 hojas en el 2004 y 1200 en el 2005). Las hojas colectadas se almacenaron en nitrógeno líquido para analizar la calidad nutricional (contenido de agua, clorofila y carbohidratos no estructurales) y defensa química (fenoles totales, flavonoides totales y taninos: taninos totales, galotaninos, elagitaninos, taninos hidrolizables, proantocianidinas). Para las muestras colectadas en el 2004 solo se analizó carbohidratos no estructurales y taninos hidrolizables.

2. Análisis estadísticos

a. Folivoría diferencial entre individuos femeninos y masculinos de *Spondias purpurea*

Para determinar las diferencias en los niveles de herbivoría foliar se realizó un análisis de varianza de tres vías (ANOVA tres vías) donde el sexo, estratos del dosel y edad de las hojas se consideraron como variables independientes y el nivel de folivoría como variable de respuesta. El DAP fue utilizado como covariable. Se utilizaron los datos transformados, obteniendo el arcoseno de la raíz cuadrada.

Las diferencias en los niveles de folivoría entre años se evaluó aplicando un análisis de varianza de dos vías (ANOVA dos vías) donde las variables independientes fueron el sexo y el año y la intensidad de herbivoría fue la variable de respuesta. Se utilizaron los datos transformados, obteniendo el arcoseno de la raíz cuadrada.

Para determinar si existía alguna relación entre el área foliar total y el área consumida por herbivoría se realizó un análisis de regresión lineal utilizando los valores por individuo.

b. Determinación de la calidad química de hojas de individuos de *Spondias purpurea*

Para determinar las diferencias en las concentraciones de los compuestos secundarios asociados a defensa y los elementos nutricionales entre sexos, estratos del dosel y edad de las hojas, se realizó tres tipos de análisis estadísticos: a) un análisis de componentes principales; b) un análisis de varianza multivariado (MANOVA); c) análisis de

varianza de tres vías (ANOVA tres vías) donde el sexo, estratos del dosel y edad de las hojas se consideraron como variables independientes y las concentraciones de los compuestos como variables de respuesta. El DAP fue utilizado como covariable. Se utilizaron los datos transformados, obteniendo el arcoseno de la raíz cuadrada.

*c. Variación temporal de taninos hidrolizables y carbohidratos no estructurales en hojas de individuos de *Spondias purpurea**

Para evaluar la variación temporal en las concentraciones de taninos hidrolizables y de carbohidratos no estructurales se realizó un análisis de medidas repetidas de una vía, donde el año se consideró como variable independiente y las concentraciones de los compuestos como variables de respuesta. Se utilizaron los datos transformados, obteniendo el arcoseno de la raíz cuadrada.

3. Cuantificación de los metabolitos secundarios asociados a defensa

El análisis de la defensa química se realizó en las muestras colectadas en el 2005, y en las muestras colectadas en el 2004 solo se cuantificaron los taninos hidrolizables y carbohidratos no estructurales. En esta sección solamente se mencionan las técnicas utilizadas y en el **APÉNDICE** (página 26) hay una descripción detallada de los métodos.

a. Método de cuantificación de fenoles totales

Se realizó la extracción con etanol al 80% y se cuantificó con un método modificado de Folin y Cicalteau (Waterman y Mole 1994).

b. Método de difusión radial de taninos

Se utilizó una modificación de este método, que permite cuantificar taninos totales a partir de su capacidad para precipitar proteínas como medida de su actividad biológica. Se evaluó con albúmina de suero de bovino y las muestras se extrajeron con nitrógeno líquido y acetona acuosa al 70% (Hagerman 1987).

c. Método de cuantificación de galotaninos: determinación con rodanina

Es un método basado en la reacción del grupo funcional del ácido gálico con la rodanina. Se utilizó una modificación del método desarrollado por Inoue y Hagerman (1988). Las muestras son hidrolizadas con ácido sulfúrico para liberar el ácido gálico presente en la planta en forma de éster.

d. Método para la cuantificación de proantocianidinas (pas)

Se utilizó una modificación del método de ácido/butanol para cuantificar taninos condensados. Este método emplea polivinilpirrolidina para evitar la interferencia de la clorofila en la absorbancia de las muestras (Watterson y Butler 1983).

e. Método de cuantificación de taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) después de la reacción con iodato de potasio

Este método convierte los taninos hidrolizables a metil galato vía metanólisis. Posteriormente el metil galato reacciona con el ioduro de potasio y forma una cromóforo (Hartzfeld *et al.* 2002).

f. Método de cuantificación de flavonoides totales

Se realizó la extracción con etanol al 80%. La muestra se analiza con $AlCl_3$ y se lee la absorbancia a 510 nm (Abdullin *et al.* 2001).

g. Método de cuantificación de elagitaninos

Se utilizó una modificación del método desarrollado por Wilson y Hagerman (1990). Este método esta basado en la hidrólisis de los elagitaninos para liberar el ácido elágico, que forma un producto colorido cuando reacciona con el ácido nítrico.

4. Cuantificación de la calidad nutricional de las hojas de individuos masculinos y femeninos de *Spondias purpurea*

a. Método de cuantificación del contenido de agua

Se pesaron 2 g de la muestra en un pesafiltros (tarado), se colocó en una estufa a 105°C por 36 horas. Se pasó a un desecador para dejarlos enfriar y se registró el peso.

b. Método de cuantificación de clorofila

Se cuantificó por medio del método SPAD (Soil Plant Analysis Development, Minolta® SPAD 502 Modelo DL) que mide el contenido de la clorofila. Los valores SPAD están basados en el principio de que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que es reflejada, entra en contacto con la celda detectora del SPAD-502 y es convertida en una señal eléctrica (Krugh *et al.* 1994).

c. Método de cuantificación de carbohidratos no estructurales (extracción de azúcares simples)

Las hojas de *Spondias purpurea* se secaron en estufa a 40°C. Se utilizó etanol al 80% para extraer y cuantificar azúcares simples presentes en las muestras.

VI. RESULTADOS

1. Determinación del patrón de herbivoría

Los resultados muestran que hay diferencias significativas en los niveles de folivoría entre sexos, estratos del dosel y edades de las hojas de los individuos de *S. purpurea* colectados en el 2004 y 2005, además, en el análisis de varianza de tres vías se encontró una interacción entre los 3 factores (Tabla 1 y Figura 1 y 2).

Tabla 1. Análisis de la variación de la folivoría entre sexos, estratos del dosel y edades de las hojas de los individuos de *S. purpurea* (ANOVA 3 vías).

Fuente	2004			2005		
	<i>F</i>	g.l.	<i>P</i>	<i>F</i>	g.l.	<i>P</i>
Sexo	25.42	1	0.0001	3.57	1	0.0001
Estrato	9.49	2	0.0092	3.63	2	0.0268
Edad	5.86	1	0.0029	21.97	1	0.0001
Sexo*Estrato	20.04	2	0.0001	0.09	2	0.9101
Sexo*Edad	21.34	1	0.0006	4.58	1	0.0325
Edad*Estrato	7.5	2	0.4974	1.48	2	0.2275
Sexo*Estrato*Edad	3.31	2	0.0103	0.89	2	0.0409
DAP	0.02	1	0.8845	3.61	1	0.05
Sexo*DAP	0.01	1	0.9403	0.03	1	0.8646
Error		0.0284516			0.1523705	

Los porcentajes de herbivoría foliar fueron significativamente mayores (alrededor del 3%) en los individuos femeninos que en los individuos masculinos de *S. purpurea*, en ambos años. En el análisis del 2005, el DAP utilizado como covariable muestra mayores niveles de herbivoría en los individuos de menor tamaño que en los individuos de tamaños mayores. En el 2004 no se encontró ningún efecto del DAP.

En el análisis de varianza de tres vías de la herbivoría del 2004 que consideró sexo, estrato y edad de las hojas encontramos una interacción entre estos tres factores. Sin embargo, encontramos un efecto de estrato por sexo es decir, que el mismo estrato de ambos sexos, sufre distintos porcentajes de folivoría. El patrón de folivoría es inverso en ambos

sexos: las hojas de las hembras de estratos más bajos, son más consumidas que las de estratos más altos. En el caso contrario, las hojas del estrato superior de los individuos masculinos presentan mayor área foliar removida por herbivoría. La edad de la hoja también presentó un efecto significativo sobre los niveles de folivoría independiente al sexo. Existe una tendencia hacia un mayor porcentaje de daño en las hojas jóvenes del estrato superior de ambos sexos (Figura 1).

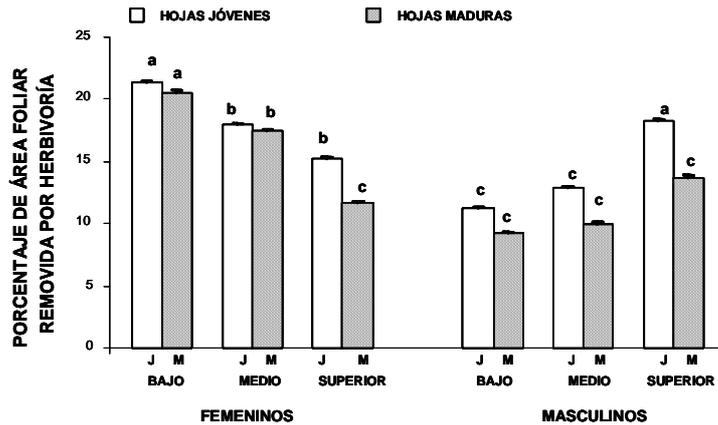


Figura 1. Comparación de los porcentajes de folivoría entre estratos del dosel y hojas de distintas edades en individuos femeninos y masculinos de *Spondias purpurea* colectados en el 2004. Se utilizaron los cuadrados medios mínimos para los porcentajes promedio de folivoría (letras diferentes indican las medias significativamente distintas). Se muestran los datos sin transformar.

En el 2005 encontramos una interacción entre sexo, estrato y edad y un efecto de los tres factores de forma independiente. Los tres estratos del dosel y las hojas jóvenes de los individuos femeninos son más consumidos por los herbívoros. Ambos sexos muestran el mismo patrón, es decir, una mayor tendencia al forrajeo en los estratos más altos (Figura 2).

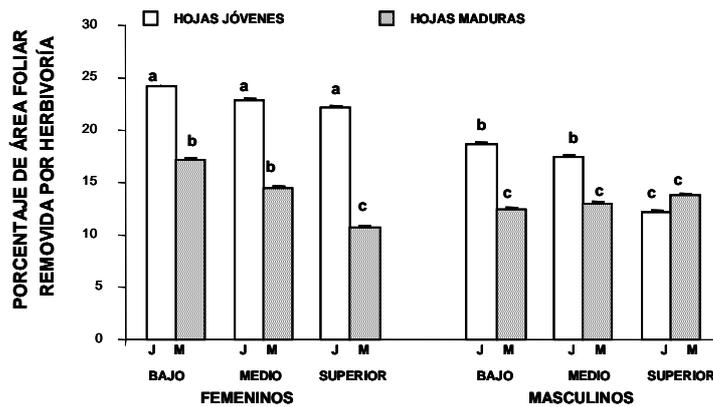


Figura 2. Comparación del porcentaje de folivoría entre estratos del dosel y hojas de distintas edades en individuos femeninos y masculinos de *Spondias purpurea* colectados en el 2005. Se utilizaron los cuadrados medios mínimos para los porcentajes promedio de folivoría (letras diferentes indican las medias significativamente distintas). Se muestran los datos sin transformar.

Se compararon los niveles de herbivoría foliar entre años. Los resultados muestran que los niveles de herbivoría son mayores en el 2005 para ambos sexos (ANOVA 2 vías, Sexo: $F=64.88$, $g.l.=1$, $P<0.0001$. Año: $F=35.9$, $g.l.=1$, $P<0.0001$, Prueba de Tukey-Kramer, $P<0.05$) (Figura 3).

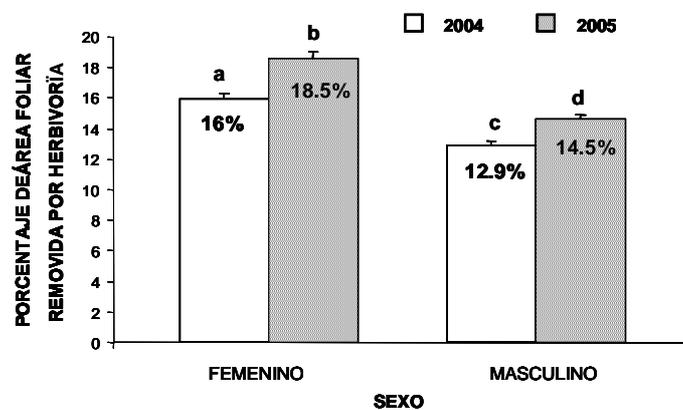


Figura 3. Comparación de los niveles de herbivoría foliar entre individuos femeninos y masculinos de *Spondias purpurea* colectados en el 2004 y 2005. Letras diferentes indican las medias significativamente distintas (Prueba de Tukey-Kramer, $P<0.05$). Se muestran los datos sin transformar.

Los resultados del análisis de regresión lineal del área foliar total y el área foliar removida por herbivoría por individuo muestran una relación positiva en ambos sexos en los

dos años de muestreo: (a) individuos femeninos (2004: $F=22.1935$, $g.l.=1$, $P<0.0006$, $R^2=0.6686$. 2005: $F=550.23$, $g.l.=1$, $P<0.0001$, $R^2=0.9386$) y (b) masculinos (2004: $F=5.5272$, $g.l.=1$, $P<0.0366$, $R^2=0.3152$. 2005: $F=513.80$, $g.l.=1$, $P<0.0001$, $R^2=0.9662$) de *Spondias purpurea* (Figura 4).

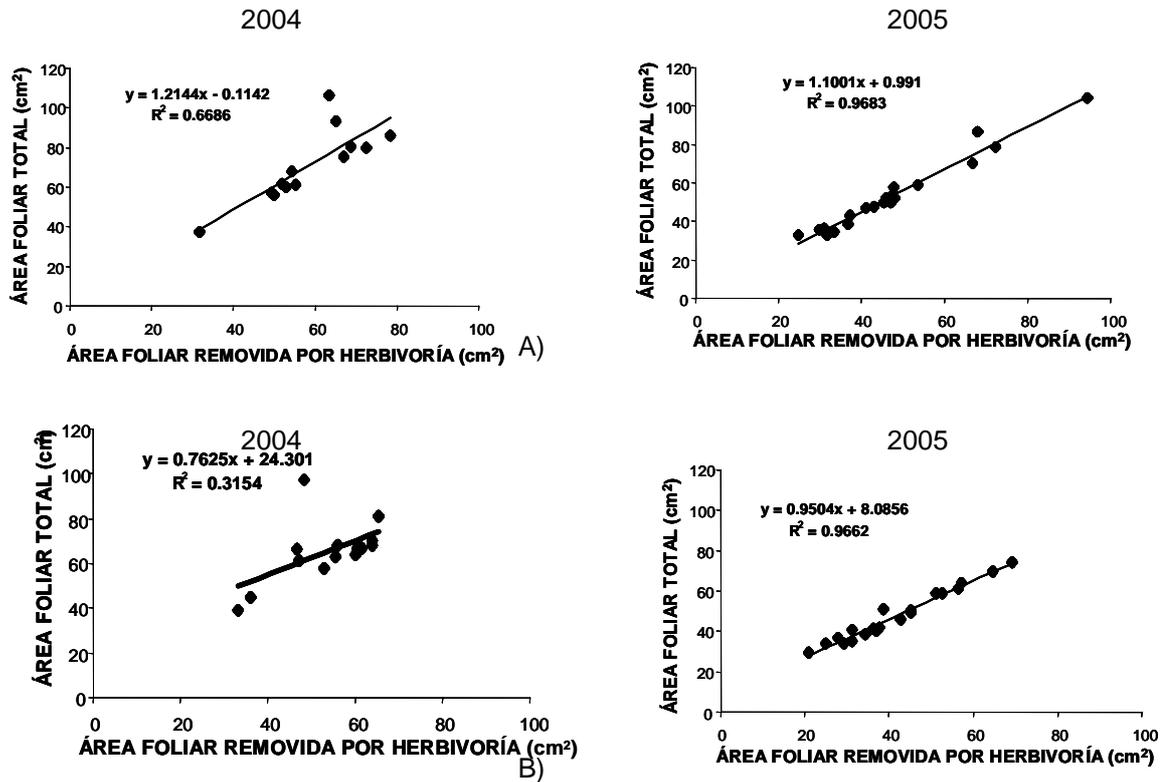


Figura 4. Relación positiva entre el área foliar total y el área removida por herbivoría en individuos (a) femeninos y (b) masculinos. Se muestran los datos sin transformar.

2. Determinación de la calidad química de hojas de individuos de *Spondias purpurea*

a. Concentración de compuestos químicos

i. Metabolitos secundarios

Los fenoles totales mostraron la mayor concentración en miligramos de compuesto por gramo de muestra, mientras que las proantocianidinas fue el compuesto que presentó una menor concentración en ambos sexos (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración promedio de metabolitos secundarios en individuos masculinos y femeninos de *S. purpurea*.

Sexo	Concentración en mg/g de muestra	D.E.	e.e.	
Femenino	Fenoles totales	3.17076775	2.40194757	0.15735682
	Flavonoides totales	0.27379862	0.25401192	0.01712548
	Galotaninos	0.20946232	0.17277794	0.01647373
	Proantocianidinas	0.0903378	0.06192829	0.0061621
	Taninos hidrolizables	0.548832429	0.166690767	0.01596608
	Taninos totales	0.677644946	0.441458256	0.042091393
	Elagitaninos	0.53901846	0.166289827	0.017060976
Masculino	Fenoles totales	3.08238427	1.85983041	0.12426515
	Flavonoides totales	0.25972711	0.2220238	0.0153211
	Galotaninos	0.19598112	0.04361242	0.00423601
	Proantocianidinas	0.08392577	0.02301368	0.00227869
	Taninos hidrolizables	0.546785178	0.148431499	0.015228751
	Taninos totales	0.708629039	0.469632851	0.04605129
	Elagitaninos	0.522053658	0.151682921	0.017285873

ii. Elementos nutricionales

Las concentraciones de los elementos nutricionales muestran valores muy similares entre sexos. Se muestra una tendencia a una mayor calidad nutricional en los individuos femeninos (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración promedio de los elementos nutricionales en individuos masculinos y femeninos de *S. purpurea*.

FUENTE		Concentración	D.E	e.e
Femenino	Agua	75.54 %	6.69085731	0.61078891
	Clorofila	34.78 $\mu\text{mol m}^{-2}$	0.30794921	0.01401217
	Carbohidratos no estructurales	24.32 mg/g	11.027247	1.25667142
Masculino	Agua	73.11 %	12.248328	1.1323583
	Clorofila	34.76 $\mu\text{mol m}^{-2}$	0.192612	0.00853738
	Carbohidratos no estructurales	22.09 mg/g	10.191346	1.0989611

b. Variación en la concentración de metabolitos secundarios y elementos nutricionales en individuos femeninos y masculinos de *Spondias purpurea*

Para determinar las relaciones entre los compuestos químicos medidos en las hojas de *S. purpurea*, se realizó un análisis de componentes principales (Tabla 4, Figura 5). Los resultados muestran que no hay diferencias entre sexos.

Tabla 4. Análisis de componentes principales de la calidad química de las hojas de los individuos de ambos sexos de *S. purpurea*. Se muestran los autovectores de los componentes principales 1 y 2.

Variable	Componente Principal 1	Componente Principal 2
Flavonoides	-0.182	0.355
Proantocianidinas	0.518	0.303
Taninos hidrolizables	-0.335	0.492
Galotaninos	0.506	0.345
Elagitaninos	-0.348	0.457
Fenoles	-0.137	0.165
Taninos totales	0.348	0.339
Agua	0.039	-0.138
Carbohidratos no estructurales	0.246	-0.182
Clorofila	-0.087	-0.133

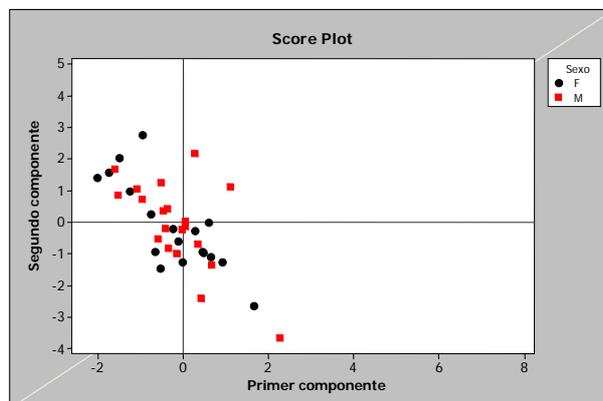


Figura 5. Análisis de componentes principales de la calidad química de las hojas de los individuos de ambos sexos de *S. purpurea*.

El análisis de varianza multivariado muestra que no existe ningún efecto global de los metabolitos secundarios y de la calidad nutricional (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de varianza multivariado de la concentración de metabolitos secundarios y elementos nutricionales en hojas de los individuos femeninos y masculinos de *S. purpurea*.

Compuestos	Prueba	Valor	F	g.l.		P
				Numerador	Denominador	
Metabolitos secundarios	Wilks's Lamba	0.6960279	0.9966	39	89	0.4908
Elementos nutricionales	Wilks's Lamba	0.6683336	1.3574	34	93	0.1268

Los resultados de los análisis de varianza de tres vías (ANOVA tres vías) muestran que ninguno de los compuestos secundarios analizados presentó diferencias entre sexos. Sin embargo, las concentraciones de algunos compuestos mostraron en algunos casos diferencias entre estratos del dosel y edad de las hojas (Tabla 6, Figuras 6, 7 y 8).

Tabla 6. Análisis de variación de la concentración de metabolitos secundarios asociados a defensa y efectos del sexo, estratos del dosel y edades de las hojas de los individuos de *S. purpurea* (ANOVA 3 vías).

Fuente	Elemento nutricional	F	g.l.	P
Sexo	Fenoles totales	0.71	1	0.401
	Flavonoides totales	1.34	1	0.2471
	Galotaninos	0.18	1	0.6708
	Proantocianidinas	0.01	1	0.9822
	Taninos hidrolizables (2004)	1.21	1	0.2759
	Taninos hidrolizables (2005)	3.76	1	0.054
	Taninos totales	0.2	1	0.657
Estrato	Elagitaninos	1.43	1	0.2336
	Fenoles totales	0.06	1	0.9458
	Flavonoides totales	0.62	2	0.5364
	Galotaninos	0.85	2	0.4295
	<u>Proantocianidinas</u>	<u>0.08</u>	<u>2</u>	<u>0.0061</u>
	Taninos hidrolizables (2004)	0.41	2	0.6624
	Taninos hidrolizables (2005)	0.78	2	0.4579
Edad	<u>Taninos totales</u>	<u>3.5</u>	<u>2</u>	<u>0.032</u>
	Elagitaninos	1.45	2	0.2377
	Fenoles totales	2.02	1	0.1564
	Flavonoides totales	0.08	1	0.7747
	Galotaninos	0.84	1	0.3605
	Proantocianidinas	1.66	1	0.1992
	Taninos hidrolizables (2004)	1.45	1	0.2427
Sexo*Estrato	<u>Taninos hidrolizables (2005)</u>	<u>6.75</u>	<u>1</u>	<u>0.0101</u>
	Taninos totales	0.74	1	0.3904
	<u>Elagitaninos</u>	<u>6.15</u>	<u>1</u>	<u>0.0142</u>
	Fenoles totales	2.34	2	0.0971
	Flavonoides totales	0.09	2	0.9118
	Galotaninos	0.31	2	0.7334
	<u>Proantocianidinas</u>	<u>3.6</u>	<u>2</u>	<u>0.0293</u>
Sexo*Edad	Taninos hidrolizables (2004)	0.06	2	0.9418
	Taninos hidrolizables (2005)	0.91	2	0.4052
	Taninos totales	0.31	2	0.732
	Elagitaninos	1.38	2	0.2545
	Fenoles totales	0.01	1	0.9036
	Flavonoides totales	0.01	1	0.9359
	Galotaninos	1.44	1	0.2314
Edad*Estrato	Proantocianidinas	1.22	1	0.2713
	Taninos hidrolizables (2004)	1.07	1	0.3498
	Taninos hidrolizables (2005)	2.18	1	0.1414
	Taninos totales	2.11	1	0.1478
	Elagitaninos	1.55	1	0.2149
	Fenoles totales	0.67	2	0.5137
	Flavonoides totales	1.3	2	0.2738
Sexo*Estrato*Edad	Galotaninos	0.49	2	0.6136
	Proantocianidinas	1.63	2	0.199
	Taninos hidrolizables (2004)	0.62	2	0.6475
	Taninos hidrolizables (2005)	0.42	2	0.6585
	Taninos totales	0.04	2	0.9622
	Elagitaninos	0.37	2	0.6907
	Fenoles totales	0.4	2	0.6731
Sexo*Estrato*Edad	Flavonoides totales	1.04	2	0.3532
	Galotaninos	0.32	2	0.7266
	Proantocianidinas	0.58	2	0.5636
	Taninos hidrolizables (2004)	0.34	2	0.8477
	Taninos hidrolizables (2005)	1.4	2	0.249
	Taninos totales	0.4	2	0.6729
	Elagitaninos	2.23	2	0.1107

Fuente	Elemento nutricional	F	g.l.	P
DAP	Fenoles totales	0.01	1	0.95811
	Flavonoides totales	2.65	1	0.1041
	Galotaninos	0.38	1	0.5373
	Proantocianidinas	0.51	1	0.4768
	Taninos hidrolizables (2004)	0.42	1	0.6768
	Taninos hidrolizables (2005)	2.23	1	0.1372
	Taninos totales	0.12	1	0.7315
	Elagitaninos	1.92	1	0.1679
	Sexo*DAP	Fenoles totales	0.6	1
Flavonoides totales		1.15	1	0.2849
Galotaninos		0.32	1	0.5695
Proantocianidinas		0.09	1	0.7684
Taninos hidrolizables (2004)		0.68	1	0.1324
Taninos hidrolizables (2005)		4.37	1	0.378
Taninos totales		0.05	1	0.8199
Elagitaninos		1.34	1	0.2492
Error		Fenoles totales		
	Flavonoides totales			0.00034860
	Galotaninos			0.0000657
	Proantocianidinas			0.00253771
	Taninos hidrolizables (2004)			0.0015169
	Taninos hidrolizables (2005)			0.00114950
	Taninos totales			0.00361098
	Elagitaninos			0.00120060

Los individuos masculinos presentaron mayores concentraciones de proantocianidinas en el estrato superior (Figura 6).

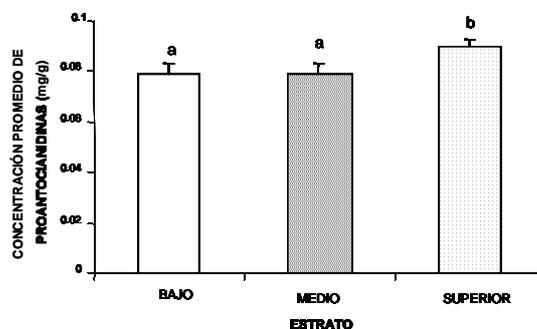


Figura 6. Diferencia en la concentración de proantocianidinas en los distintos estratos del dosel de individuos masculinos. Letras diferentes indican las medias significativamente distintas (cuadrados medios mínimos). Se muestran los datos sin transformar.

El estrato bajo del dosel de los individuos de ambos sexos presentaron una mayor concentración de taninos totales que los estratos medio y alto (Figura 7).

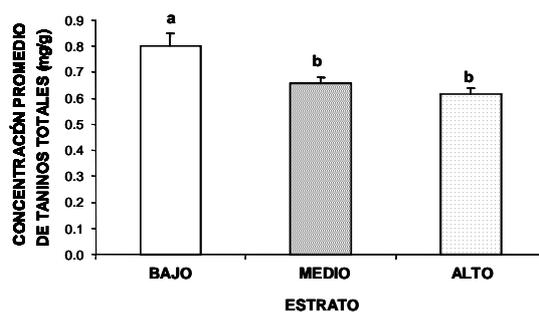


Figura 7. Diferencia en la concentración de taninos totales en los distintos estratos del dosel de individuos de *S. purpurea*. Letras diferentes indican las medias significativamente distintas (cuadrados medios mínimos). Se muestran los datos sin transformar.

Las hojas maduras de los individuos de *S. purpurea* presentaron mayores concentraciones de taninos hidrolizables y elagitaninos que las hojas jóvenes (Figura 8).

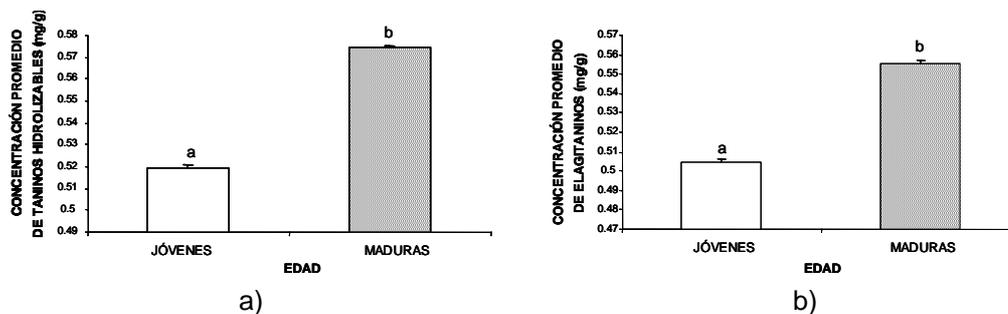


Figura 8. Diferencia en la concentración de a) taninos hidrolizables y b) elagitaninos (mg/g de muestra) en hojas de distintas edades de los individuos de *S. purpurea*. Letras diferentes indican las medias significativamente distintas (cuadrados medios mínimos). Se muestran los datos sin transformar.

En los análisis de varianza de tres vías (ANOVA tres vías) de los elementos nutricionales, los resultados muestran que los individuos femeninos presentan mayores concentraciones de clorofila que los individuos masculinos. Los individuos masculinos presentaron menores concentraciones de carbohidratos no estructurales en el estrato bajo del dosel que en estratos más altos. Además el DAP fue significativo en la concentración de clorofila (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de la variación en la concentración de elementos nutricionales entre sexos, estratos del dosel y edades de las hojas de los individuos de *S. purpurea* (ANOVA 3 vías).

Fuente	Elemento nutricional	F	g.l.	P
Sexo	Agua	0.15	1	0.6989
	<u>Clorofila</u>	<u>1.87</u>	<u>1</u>	<u>0.0001</u>
	Carbohidratos no estructurales (2004)	0.31	1	0.5801
	Carbohidratos no estructurales (2005)	0.56	1	0.4553
Estrato	Agua	0.72	2	0.4859
	Clorofila	0.73	2	0.4808
	Carbohidratos no estructurales (2004)	0.01	2	0.9862
	<u>Carbohidratos no estructurales (2005)</u>	<u>3.09</u>	<u>2</u>	<u>0.0484</u>
Edad	Agua	1.66	1	0.1984
	Clorofila	0.01	1	0.9805
	Carbohidratos no estructurales (2004)	1.57	1	0.8765
	Carbohidratos no estructurales (2005)	0.14	1	0.7121
Sexo*Estrato	Agua	0.37	2	0.6919
	Clorofila	1.53	2	0.2175
	Carbohidratos no estructurales (2004)	1.24	2	0.2951
	Carbohidratos no estructurales (2005)	0.26	2	0.7733
Sexo*Edad	Agua	0.01	1	0.9232
	Clorofila	0.01	1	0.9232
	Carbohidratos no estructurales (2004)	0.27	1	0.764
	Carbohidratos no estructurales (2005)	1.1	1	0.296
Edad*Estrato	Agua	1.62	2	0.2006
	Clorofila	10.2	2	0.1251
	Carbohidratos no estructurales (2004)	0.9	2	0.4711
	Carbohidratos no estructurales (2005)	1.74	2	0.1797
Sexo*Estrato*Edad	Agua	1.51	2	0.2234
	Clorofila	0.37	2	0.6924
	Carbohidratos no estructurales (2004)	1.62	2	0.1781
	Carbohidratos no estructurales (2005)	0.42	2	0.6543
DAP	Agua	0.06	1	0.8118
	<u>Clorofila</u>	<u>26.65</u>	<u>1</u>	<u>0.0001</u>
	Carbohidratos no estructurales (2004)	1.15	1	0.2578
	Carbohidratos no estructurales (2005)	2.11	1	0.1481
Sexo*DAP	Agua	0.06	1	0.809
	Clorofila	0.83	1	0.3628
	Carbohidratos no estructurales (2004)	0.02	1	0.7801
	Carbohidratos no estructurales (2005)	1.51	1	0.215
Error	Agua		0.09750548	
	Clorofila		0.00000468	
	Carbohidratos no estructurales (2004)		0.00519075	
	Carbohidratos no estructurales (2005)		0.01253647	

La concentración de clorofila fue mayor en los individuos femeninos que en los individuos masculinos (Figura 9).

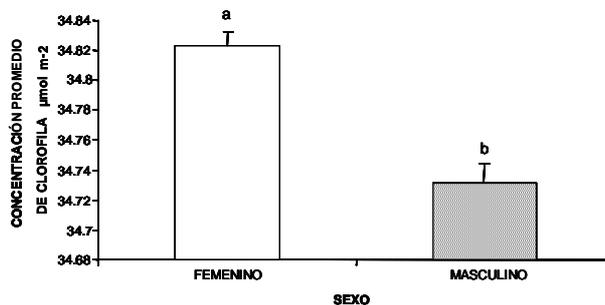


Figura 9. Diferencia en la concentración de clorofila entre los individuos femeninos y masculinos de *S. purpurea*. Letras diferentes indican las medias significativamente distintas (cuadrados medios mínimos). Se muestran los datos sin transformar.

Los individuos de *S. purpurea* muestreados en el 2005 presentaron menores concentraciones de carbohidratos no estructurales en el estrato bajo del dosel que en estratos más altos (Figura 10).

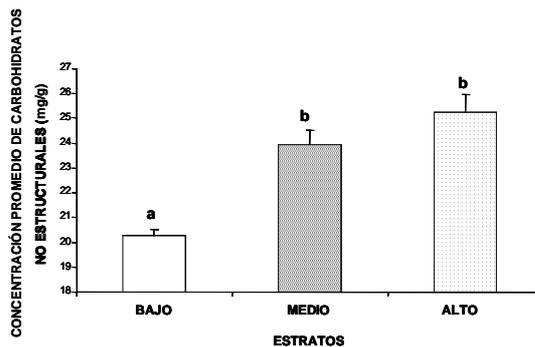


Figura 10. Diferencia en la concentración de carbohidratos no estructurales en los estratos del dosel de los individuos muestreados en el 2005. Letras diferentes indican las medias significativamente distintas (cuadrados medios mínimos). Se muestran los datos sin transformar.

c. Variación temporal de taninos hidrolizables y carbohidratos no estructurales en hojas de individuos de *Spondias purpurea*

Los resultados muestran que la concentración de taninos hidrolizables fue mayor en el 2004, mientras que los carbohidratos no estructurales presentaron mayores concentraciones en el 2005 (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de la variación temporal y entre sexos de la concentración de taninos hidrolizables y de carbohidratos no estructurales en individuos de *S. purpurea* (Análisis de medidas repetidas de dos vías).

FUENTE	g.l.	F	P
Taninos hidrolizables	1	14.5	0.002
Carbohidratos no estructurales	1	35.275	0.035

VII. DISCUSIÓN

En este estudio, encontré mayores porcentajes de folivoría en los individuos femeninos de *Spondias purpurea* que en los masculinos. Este patrón fue consistente durante los dos años consecutivos de muestreo (2004 y 2005). Nuestro resultado difiere de lo reportado en la mayor parte de los estudios que han analizado el daño por herbívoros en especies dioicas (Boecklen y Hoffman 1993, Ågren *et al.* 1999, Cornelissen y Stiling 2005). Diversos autores han realizado revisiones sobre este tema y han encontrado la misma tendencia de mayor herbivoría en los individuos masculinos. Ågren *et al.* (1999) analizó 35 estudios, de los cuales, el 60% indicaron mayores niveles de herbivoría en plantas masculinas (Danell *et al.* 1985, 1991, Ågren 1987, Polhemus 1988, Alliende y Harper 1989, Jing y Coley 1990, Krischik y Denno 1990, Hjältén 1992, Boecklen y Hoffman 1993, Wolfe 1997, Ågren *et al.* 1999), únicamente el 17.7% de los estudios presentaron mayores niveles de herbivoría en los individuos femeninos que en los masculinos (Lovett-Doust y Lovett-Doust 1985, Oyama y Dirzo 1991), y en el 22% de los trabajos no se encontraron diferencias entre sexos (Lovett-Doust y Lovett-Doust 1985, Strauss 1990, Hjältén 1992, Niesenbaum 1992, Ahman 1997). Boecklen y Hoffman (1993) en una revisión de 24 casos, encontraron que un 79% de los estudios presentó una mayor herbivoría en individuos masculinos. En un trabajo más reciente, Cornelissen y Stiling (2005) realizaron un metanálisis con 33 estudios de plantas dioicas, y encontraron la misma tendencia de mayor daño por herbívoros en el sexo masculino que en el femenino. La teoría de asignación de recursos (Charnov 1997) propone que las diferencias intersexuales en el daño por herbívoros, están dadas por la inversión diferencial de los recursos a la reproducción, crecimiento y defensa (química y física) (Lloyd y Webb 1977, Ågren *et al.* 1999, Delph 1999). Boecklen *et al.* (1990) propone que la calidad de las plantas dioicas varía a lo largo de un gradiente masculino/femenino debido a esta inversión diferencial. Esta calidad, es frecuentemente expresada como las características nutricionales y de defensa (Scriber y Slanski 1981).

En este trabajo, no encontré diferencias en la concentración foliar de agua y carbohidratos no estructurales entre los individuos masculinos y femeninos de *S. purpurea*. Sin embargo, la concentración de clorofila fue mayor en los individuos femeninos. El contenido de clorofila es una medida indirecta de la capacidad fotosintética de las plantas (Baker y Hardwick 1973, Kursar y Coley 1992). La clorofila absorbe la energía luminosa necesaria para la fotosíntesis, cuyos productos principales son el oxígeno y el carbono asimilado en forma de hidratos de carbono (Larcher 1995, Mathews y van Holde 1998). La mayor concentración de clorofila en los individuos femeninos de *S. purpurea*, podría representar una mayor capacidad de fotosíntesis y una mayor fijación de carbono en forma de

carbohidratos (Larcher 1995). En el caso particular de las especies dioicas, las diferencias en la demanda de carbono están asociadas con la reproducción de machos y hembras. De tal modo, las tasas de fotosíntesis parecen estar reguladas en gran medida por el balance entre los tejidos de la planta productores de carbohidratos que son órganos fotosintéticos y de almacenamiento y los tejidos que son consumidores de carbohidratos como flores y frutos (Retuerto *et al.* 2006), por lo que la tasa de fotosíntesis podría incrementarse dependiendo de la demanda de carbohidratos de la planta (Laporte y Delph 1996). Por lo tanto, es probable que los individuos femeninos de *S. purpurea* presentan mayor concentración de clorofila debido a la alta demanda de recursos que necesitan para llevar a cabo los eventos de reproducción en comparación con los individuos masculinos, y por lo tanto, las diferencias encontradas en la concentración de clorofila entre sexos sea un evento independiente al daño causado por herbívoros e intrínseco solo a la diferenciación sexual (Retuerto *et al.* 2006).

La mayor parte de los estudios químicos en especies dioicas, muestra que las plantas femeninas contienen mayores concentraciones de fenoles y terpenos y menores niveles de herbivoría, mientras que los individuos masculinos tienen una mayor calidad nutricional, tricomas y resinas y mayores niveles de herbivoría (Danell *et al.* 1985, Ågren 1987, Allen y Antos 1988, Polhemus 1988, Boecklen *et al.* 1990, Jing y Coley 1990, Krischik y Denno 1990, Danell *et al.* 1991, Hjältén 1992, Cipollini y Whigham 1994, Ågren *et al.* 1999, Verdu *et al.* 2004). En este trabajo, no encontré diferencias significativas en la concentración de los metabolitos secundarios entre individuos masculinos y femeninos de *Spondias purpurea*. Este resultado esta acorde con lo reportado en otros estudios de especies templadas y tropicales (Ågren *et al.* 1999, Dormann y Skarpe 2002). Sin embargo, los niveles de herbivoría fueron mayores en individuos femeninos, lo cual sugiere que la defensa química no tiene un papel importante sobre la diferencia en el consumo foliar en ambos sexos de *S. purpurea*. A pesar de que diversos estudios han demostrado la función defensiva de los fenoles (Karban y Myers 1989, Haukioja 1990, Karban y Baldwin 1997) y flavonoides (Harborne y Williams 2000) ya que reducen la digestibilidad del tejido fotosintético (Ayres *et al.* 1997), existe la posibilidad de que la razón de ser de estos compuestos sea independiente a la defensa de la planta, ya que los fenoles tienen funciones de protección a la luz ultravioleta, soporte estructural, resistencia a la desecación y regulación fitohormonal (Herms y Mattson 1992, Karban y Baldwin 1997), actividad antioxidante (Hagerman *et al.* 1998), actividad antimicótica, antimicrobiana y alelopática (Harborne 1991). Por lo tanto, una explicación alternativa es que los metabolitos secundarios presenten en *Spondias purpurea* pueden ser efectivos contra otros gremios de herbívoros, o estén relacionados con la actividad antiviral y antimicótico que han sido reportadas para el género *Spondias* (Cojocarú *et al.* 1986, Corthout *et al.* 1992, Harborne 1999).

El patrón general de los análisis de varianza de tres vías muestra un mayor daño por folívoros en los individuos femeninos. Existe un mayor riesgo de herbivoría en hojas jóvenes y de estratos bajos de los individuos femeninos. Independientemente del sexo y del estrato, si una hoja logra salir de los estadios ontogénicos tempranos, la probabilidad de ser consumida disminuye considerablemente. Este estudio muestra mayores niveles de folivoría en estratos bajos y hojas jóvenes de los individuos de *S. purpurea*. Esto concuerda con lo reportado en diversos estudios, que indican que los estratos más bajos del dosel sufren mayores niveles de herbivoría foliar (Coley y Barone 1996, Kursar y Coley 2003) y las hojas jóvenes son más consumidas por los herbívoros que las hojas maduras (Mole y Waterman 1987, Bernays *et al.* 1989, Cork y Foley 1991). Estos patrones se han atribuido a distintos factores como la calidad nutricional y la defensa vegetal (Coley y Barone 1996).

A pesar de que se encontraron mayores concentraciones de carbohidratos no estructurales en los estratos más altos del dosel de ambos sexos, lo que indica una mayor calidad nutricional, presentaron menores niveles de folivoría. Por lo tanto, las diferencias en folivoría por estrato están asociadas a la mayor concentración de taninos hidrolizables en los estratos más altos. Esto sugiere que la defensa química tiene un papel importante sobre la preferencia de hojas de estratos bajos. Además, en el caso de los individuos masculinos, la mayor folivoría en el estrato superior del dosel también está asociado a la mayor concentración de proantocianidinas en este estrato. Esta diferencia en la cantidad de taninos puede deberse a la variación de luz y temperatura entre estratos (Le Corff y Marquis 1999). Diversos trabajos han demostrado que las proantocianidinas son taninos condensados asociados a la defensa de las plantas contra diferentes herbívoros (Schultz 1989, Waterman y Mole 1994). Estos compuestos químicos presentan una alta afinidad por las proteínas de los tejidos foliares y forman complejos poco digeribles para el herbívoro (Bernays *et al.* 1989, Waterman y Mole 1994, Hagerman 1998). En el análisis de varianza de tres vías del 2004, encontramos que los individuos masculinos presentaron mayores niveles de folivoría en el estrato superior debido a la mayor herbivoría en las hojas jóvenes de este estrato. Por lo tanto, este resultado podría estar asociado a una mayor abundancia de follaje juvenil en el estrato superior del dosel. Algunos autores han propuesto que los altos regímenes de luz solar incrementan la producción de hojas jóvenes en el estrato superior del dosel (Basset *et al.* 1992, Lowman 1992). Basset (1991) analizó los niveles de folivoría en los estratos del dosel de *Argyrodendron actinophyllum* (Sterculiaceae), un árbol subtropical de Australia. El autor no encontró diferencias de folivoría entre estratos, sin embargo, propone que el daño es mayor en los sitios del dosel con mayores niveles de iluminación, debido a la mayor abundancia de hojas juveniles, mientras que la calidad nutricional y la defensa química de las hojas no tiene un papel importante en los niveles de forrajeo entre los estratos del dosel.

Las hojas jóvenes de los individuos de ambos sexos de *S. purpurea* presentaron mayores niveles de folivoría que las hojas maduras. Esta diferencia está asociada a la mayor concentración de proantocianidinas y elagitaninos en las hojas maduras. Esto sugiere que la defensa química tiene un papel importante sobre el consumo de hojas jóvenes por parte de los herbívoros. El carbono, al igual que todos los recursos, es limitado en tejidos en proceso de crecimiento (Herms y Mattson 1992). Por lo tanto, mientras que algunos aleloquímicos clasificados como toxinas o disuasivos disminuyen su concentración con la edad de la hoja, los compuestos que reducen la digestibilidad generalmente presentan el patrón contrario (Schoonhoven *et al.* 1998), ya que se encuentran en bajas concentraciones en las hojas en etapa de crecimiento y aumentan cuando la hoja llega a su etapa de madurez, ya que la asimilación de carbono es mayor al consumo (Schoonhoven *et al.* 1998, Waterman y Mole 1994, Cornelissen y Fernandes 2001).

Los niveles de herbivoría foliar encontrados en individuos femeninos de *S. purpurea* variaron entre 5.9% y 37.4% en el 2004 y 8.6% y 32.5% en el 2005, mientras que los porcentajes de folivoría de los individuos masculinos oscilaron entre el 4.8% y 58.4% en el 2004 y 8.5% y 29.5% en el 2005. Diversos estudios han demostrado que porcentajes bajos de remoción foliar pueden tener un efecto negativo sobre el crecimiento y la reproducción de las plantas (Houle 1999, Krupnick *et al.* 2000, Doyle *et al.* 2002, Bañuelos y Obeso 2004). En este trabajo no se evaluó el efecto de la folivoría sobre el éxito reproductivo de *S. purpurea*. Sin embargo, Uribe-Mú y Quesada (2006) evaluaron el efecto de la remoción de ramas por el cerambícido *Oncideres albomarginata chamela*, y encontraron un efecto negativo sobre la producción de flores de ambos sexos y frutos, siendo los individuos femeninos los que presentaron mayor herbivoría y un mayor efecto negativo sobre la reproducción. Es probable que la folivoría en *Spondias purpurea* tenga un efecto negativo sobre algún componente del crecimiento o la reproducción ya que el porcentaje promedio de área foliar consumida por folívoros en hembras y machos es considerablemente mayor que en otras especies de plantas tropicales (Coley y Barone 1996). Sin embargo, se ha documentado que el efecto de la herbivoría en hojas, ramas, raíces y flores sobre el crecimiento y la reproducción de las plantas, es diferencial, habiendo mayores efectos cuando el daño ocurre en órganos de mayor valor como ramas y flores (Zangerl y Bazzaz 1992).

Contrario a lo planteado por la *hipótesis del vigor de la planta* (Price 1991) que propone que los herbívoros prefieren los módulos de la planta, individuos o especies más vigorosas (i.e. de mayor tamaño o de mayor tasa de crecimiento), en este trabajo encontré mayores niveles de herbivoría en plantas de *S. Purpurea* de menor diámetro en ambos sexos. Debido a que no se encontraron diferencias en la concentración de metabolitos secundarios en los individuos de distintos tamaños, los individuos de menor tamaño de *Spondias purpurea*

no representan un recurso químicamente más susceptible para ser atacados, por lo que este resultado puede ser explicado por las mayores concentraciones de clorofila en los individuos de menor diámetro, lo que ofrece una mayor calidad nutricional. Otro resultado muestra una correlación positiva entre el área foliar total y el porcentaje del área foliar consumida por herbívoros en individuos femeninos y masculinos de *S. purpurea* en los dos años de estudio. Una mayor área foliar puede implicar una mayor susceptibilidad a la herbivoría (Feeny 1976, Lawton 1983, Cornelissen y Stiling 2005). Algunos trabajos han sugerido que los herbívoros pueden estar influenciados por características de las plantas que incrementen su desempeño, como tamaño y número de hojas o tallos (*hipótesis del vigor en plantas sensu* Price 1991, Rossi y Strong 1991, Preszler y Price 1995). Esto indica que una mayor disponibilidad de alimento esta asociada a un mayor consumo de hojas en ambos sexos de *S. purpurea*. El tamaño de la hoja potencialmente puede afectar tanto la eficiencia de forrajeo, abundancia y preferencia de los herbívoros, así como los niveles de depredación que pueden presentar (Ågren *et al.* 1999). Brown y Lawton (1991) proponen que hojas más pequeñas reducen la efectividad de forrajeo de los insectos herbívoros, afectando el consumo del área foliar. Karban y Agrawal (2002) encontraron que los áfidos *Pemphigus* eligen los sitios de colonización basados en el tamaño de la hoja y la localización. Las hojas más grandes incrementan el peso de las madres y la progenie, el número de progenie, la tasa de desarrollo y la fecundidad de los insectos (Whitham 1978).

Se encontró variación en el daño por folívoros y concentración de taninos hidrolizables y de carbohidratos no estructurales entre años. Los niveles de área foliar removida por herbívoros fueron mayores en el 2005 que en el 2004. Algunos trabajos han demostrado que en los bosques tropicales secos esta variación entre años en los niveles de daño por diferentes gremios de herbívoros (Filip *et al.* 1995) puede deberse a distintos factores:

i) diferencias entre años en la calidad química de las hojas, lo que afecta las tasas y niveles de consumo de área foliar dentro y entre temporadas. En nuestro estudio la concentración de taninos hidrolizables fue mayor en el 2004. Los niveles más bajos de folivoría y las mayores concentraciones de taninos hidrolizables ocurrieron en el 2004, tanto para individuos femeninos como para masculinos. Esto podría sugerir que los taninos hidrolizables actúan como compuestos de defensa reduciendo el daño por folívoros en este año, sin embargo, cuando comparé por individuo, la variación en el daño y defensa entre años, no encontré esta relación, es decir, que los individuos que sufrieron menores folivoría, no presentaban mayores concentraciones de taninos hidrolizables. Por el contrario, los carbohidratos no estructurales fueron más abundantes en el 2005 en ambos sexos, y los mayores niveles de folivoría de este año se relacionaron con una mayor calidad nutricional expresada en los carbohidratos no estructurales.

ii) *la marcada variación climática* (Bullock 1986, 1988). La precipitación en el BTS de Chamela es marcadamente estacional, concentrándose en los meses de Junio a Octubre (García-Oliva *et al.* 1991). El promedio de precipitación anual varió considerablemente en los años 2003-2005: para el 2003 fue de 817.57, para el 2004 fue de 651.76, y para el 2005 fue de 383.79. Aunque los muestreos se realizaron en los años 2004 y 2005, la precipitación anual promedio del 2003 es importante, ya que representa una medida indirecta de la cantidad de agua que las plantas pueden almacenar, para el crecimiento vegetativo del siguiente año. La diferencia considerable en el promedio de precipitación anual entre el 2004 y 2005 pudo haber afectado la calidad o disponibilidad de hojas en *S. purpurea* para los diferentes herbívoros, y por lo tanto, la abundancia de herbívoros.

Finalmente, aunque distintos autores han encontrado que una mayor preferencia y herbivoría por los individuos masculinos de las especies dioicas (Boecklen y Hoffman 1993, Ågren *et al.* 1999, Cornelissen y Stiling 2005). Los resultados de mi trabajo, al igual que los obtenidos por Uribe-Mú y Quesada (2006) demuestran que *Spondias purpurea* tiene una tendencia muy marcada a presentar mayor herbivoría en los individuos femeninos por folívoros y barrenadores de ramas. A pesar de que algunas revisiones indican que la calidad nutricional no es un factor determinante en las preferencias de los herbívoros comparado con la importancia de los compuestos de defensa (Ågren *et al.* 1999, Cornelissen y Stiling 2005), este estudio demuestra que la calidad nutricional es el factor que determina la preferencia por los individuos femeninos de *S. purpurea*. Esto corrobora los resultados obtenidos por Uribe-Mú y Quesada (2006), donde encontraron una preferencia por las ramas de las hembras debido al mayor contenido de nitrógeno. La importancia de la defensa química de *S. purpurea* es independiente del sexo y solo se ve reflejada a nivel de los estratos del dosel y las edades de las hojas. Las especies de rápido crecimiento y expansión foliar, como *S. purpurea* (Pimienta y Ramírez 2003) tienen una mayor capacidad de reemplazar el tejido perdido que de invertir en defensas para proteger estas estructuras (Coley *et al.* 1985) ya que no guardan una alta proporción del carbono en el follaje, a diferencia de las especies siempre-verdes (Vanderklein y Reich 1999). Además, datos no publicados de Uribe-Mú (Tesis PhD Claudia Uribe-Mú) muestran que posiblemente los niveles de resistencia en ramas de árboles hembras y machos de *Spondias purpurea* no tengan ningún efecto sobre la sobrevivencia de las larvas de *Oncideres albomarginata chamela*.

Para poder entender las preferencias de los herbívoros por los sexos de especies dioicas, se necesitan más estudios de interacción planta-herbívoro en plantas dioicas de diversos sistemas, sobre todo en árboles de especies tropicales. La revisión de Cornelissen y Stiling (2005) muestra que la mayor parte de los estudios en especies dioicas han analizado diferencias morfológicas y fisiológicas más frecuentemente que la herbivoría y calidad

nutricional de la planta. Este estudio ha aportado información de importancia en el estudio de las interacciones bióticas de plantas dioicas, ya que, mientras la tendencia a una mayor herbivoría en los individuos masculinos parecer ser un patrón común, nuestro estudio no corrobora esta hipótesis. Por lo tanto, no se puede generalizar el patrón de herbivoría mediada por el sexo en especies dioicas.

VII. CONCLUSIONES

Spondias purpurea es una especie de árbol dioico que presenta mayor daño por folívoros en los individuos femeninos que en los masculinos, debido a una aparente mayor calidad nutricional que los individuos masculinos. La defensa química de *S. purpurea* es independiente del sexo y parece explicar el mayor daño en hojas jóvenes y estratos del dosel bajos. Los individuos de *S. purpurea* de menor tamaño en ambos sexos, presentaron mayores niveles de folivoría y también está aparentemente relacionado con una mayor calidad nutricional de estos individuos.

IX. APÉNDICE

1. Métodos de análisis cuantitativo de metabolitos secundarios asociados a defensa

a. Método de cuantificación de fenoles totales

Se pesaron 125 mg de una muestra de cada hoja y se molieron con nitrógeno líquido y 10 ml de etanol al 80%. La muestra se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se conservó el sobrenadante. Un ml de sobrenadante se adicionó a 7 ml de agua desionizada. El blanco para calibrar se preparó agregando 1 ml de etanol en lugar de muestra y se agitó con vortex. Se agregó 0.5 ml de reactivo de Folin y Cicalteau (2.0 N, Sigma®). A los 8 minutos, se adicionó 1 ml de carbonato de sodio al 20%, y se agitó nuevamente. Después de 1 hora (a partir de los 30 minutos) se leyó la absorbancia a 760 nm. El compuesto estándar usado fue el ácido tánico. La ecuación obtenida mediante la curva de calibración se utilizó para realizar la transformación a miligramos/gramo de muestra.

b. Método de difusión radial de taninos

i. Preparación de la muestra

Se extrajeron 200 mg de cada muestra de hoja con nitrógeno líquido y 10 ml de acetona acuosa al 70%, macerándose por una hora a temperatura ambiente con agitación constante y se centrifugaron por 10 minutos a 3000 rpm. El material fue re-extraído 2 veces con el mismo disolvente. El extracto de acetona se redujo a la fase acuosa por evaporación a temperatura ambiente, se congeló y liofilizó. Se utilizó ácido ascórbico al 0.1% como conservador.

ii. Reactivos

Buffer acetato 0.05 M conteniendo 60 µM de ácido ascórbico pH 5.0. Para un litro, se diluyó 2.85 ml de ácido acético glacial en 800 ml, se añadió 10.6 mg de ácido ascórbico y se ajustó a pH de 5.0 con NaOH 2N. Después se aforó hasta 1 litro con agua destilada.

Agarosa: tipo I, bajo EEO, punto del gel 36°C (Sigma® a-6013).

Albúmina de Suero de bovino (ASB): fracción V en polvo, 96-99% albúmina (Sigma® a-3350).

iii. Preparación de los platos

Para preparar 8 cajas petri (80 muestras) se añadió 1.0 g de agarosa a 100 ml de buffer en un matraz de 150 ml, se calentó con agitación constante hasta que la agarosa se disolvió. La solución no debe dejarse sobre-hervir. Se colocó la solución caliente en un baño de agua a 45°C, se dejó enfriar la solución con agitación ocasional. Cuando la solución alcanzó los 45°C, se añadió 100 mg de ASB con agitación y se disolvió sin permitir que la solución se enfriara. Se utilizó una pipeta serológica de 10.0 ml para dispensar 9.5 ml de la solución en cada caja petri, las cuales fueron almacenadas a 4°C.

iv. Ensayo

Cada muestra se resuspendió en 200 µl de acetona al 70%. Se hicieron 10 hoyos por plato, con un sacabocados (4.0 mm de diámetro). Se utilizó una micropipeta para aplicar 100 µl de muestra en los pozos. Después de aplicar las muestras se cubrieron los platos y se sellaron con parafilm. Se colocaron en la incubadora por 96 horas a 30°C. Los platos se retiraron de la incubadora y se agregó anilina al 1.2% en K_3PO_4 para visualizar los anillos. Con un Vernier se midió el diámetro del anillo formado. El cuadrado del diámetro es proporcional a la concentración de taninos en la muestra.

v. Curva de calibración

Se prepararon las siguientes diluciones de ácido tánico por dilución: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 mg/ml. Se siguió el mismo procedimiento de las muestras.

c. Método de cuantificación de galotaninos: determinación con rodanina

i. Preparación de la muestra

Las muestras de 200 mg se extrajeron con nitrógeno líquido y 10 ml de acetona acuosa al 70%, macerándose por una hora a temperatura ambiente con agitación constante y se centrifugaron por 10 minutos a 3000 rpm. El material fue re-extraído 2 veces con el mismo disolvente. El extracto de acetona se redujo a la fase acuosa por evaporación a temperatura ambiente, se congeló y liofilizó. Se utilizó ácido ascórbico al 0.1% como conservador.

ii. Reactivos

Rodanina (Sigma®) 0.667% (P/V) en metanol (0.667g en 100 ml de metanol). Se almacenó en refrigeración. La solución es estable por 2 semanas.

KOH 0.5 N. *KOH* en agua (2.8 g en 100 ml). Es estable por varias semanas si se mantiene tapado previniendo la absorción de CO_2 .

H_2SO_4 4N. En agua, estable indefinidamente.

iii. Hidrólisis y determinación de ácido gálico

Se colocó 1 ml de extracto disuelto (el liofilizado) en 1 ml de H_2SO_4 1M en un tubo de vidrio de cultivo con tapa de rosca de teflón (volumen de 2 ml). El tubo se tapó y la hidrólisis se llevó a cabo por 4 hrs. a 100°C . Después los tubos se abrieron y se tomó 0.1 ml de hidrolizado y se diluyó a 1 ml con agua destilada. En un tubo de ensaye se añadió 0.3 ml de rodanina metanólica al 0.667% a 0.2 ml de la muestra. Después de 5 minutos, se añadió 0.2 ml de *KOH* 0.5 M después de 2.5 min. La mezcla se diluyó a 3 ml con agua destilada. Después de 5 a 10 min se leyó la absorbancia a 520 nm.

iv. Curva de calibración

Se estandarizó con ácido gálico utilizando las siguientes concentraciones por dilución 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 mg/ml en H_2SO_4 0.2N.

d. Método para la cuantificación de proantocianidinas (pas)

i. Preparación de la muestra

Cada muestra de 200 mg se extrajo con nitrógeno líquido y 10 ml de acetona acuosa al 70%, macerándose por una hora a temperatura ambiente con agitación constante y se centrifugaron por 10 minutos a 3000 rpm. El material fue re-extraído 2 veces con el mismo disolvente. El extracto de acetona se redujo a la fase acuosa por evaporación a temperatura ambiente, se congeló y liofilizó. Se utilizó ácido ascórbico al 0.1% como conservador.

ii. Reactivos

Polivinilpirrolidina (PVP) insoluble (Polyclar AT) (Sigma® P-6755). Se hirvió el PVP por 10 min en HCl al 10%, se decantó, filtró y se secó a temperatura ambiente.

Ácido butanol: se mezcla 950 ml de n-butanol con 50 ml de HCl concentrado.

Reactivo de hierro: 2% de sulfato férrico amonio en HCl 2N. 16.6 ml de HCl concentrado se mezcló con 100 ml de agua destilada para hacer el HCl 2 N. Se disolvió 0.5 g de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de HCl 2N. Se almacenó en un frasco ámbar.

iii. Modificación por pigmentos

Si las muestras estaban coloreadas antes del calentamiento, debido a los pigmentos naturales, se leyó la absorbancia de la muestra antes del calentamiento y se sustrajo ese valor de la lectura después del calentamiento.

iv. Método

Se colocó 0.1 g de PVP en un tubo de cultivo con tapa de rosca de 13x100 mm. Se añadió 1.0 ml de extracto conteniendo clorofila. Se adicionó 5.0 ml de metanol grado reactivo y se mezcló por 5 min. La muestra se centrifugó con PVP (10 min, 3000 rpm). Se descartó el sobrenadante de clorofila, y se repitió este paso hasta que el sobrenadante fue incoloro.

Se añadió 7.0 ml de butanol-HCl al PVP y 0.2 ml de reactivo de hierro. Se agitó por una hora a temperatura ambiente. Se centrifugó y se leyó la absorbancia a 550 nm del sobrenadante. El sobrenadante se regresó a los tubos de PVP-muestra.

Los tubos cerrados de manera floja se calentaron a 95°C por 1.5 hr. Se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugó la muestra con PVP. Se leyó la absorbancia a 550 nm del sobrenadante. Se sustrajo la absorbancia obtenida anterior al calentamiento.

v. Curva de Calibración

Los estándares se trataron de acuerdo al procedimiento aún cuando no contenían clorofila, ya que la absorción del PVP altera el color de la reacción.

La solución stock de tanino Catequina se preparó en acetona acuosa (70:30 v/v) con las siguientes concentraciones: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 de catequina mg/ml en acetona acuosa. De la curva de calibración se derivó una ecuación de regresión. Las concentraciones presentes en las muestras se obtuvieron de la ecuación.

e. Método de cuantificación de taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) después de reacción con iodato de potasio

i. Reactivos

Metanol anhidroso, grado reactivo.

Ácido sulfúrico concentrado, 18M.

Etanolamina (líquida, preparación comercial al 100%).

Acetato de amonio 3.7M (281.3 g para 1 litro de agua destilada).

Metil galato 5.00 mg/ml (Sigma®) disuelto en metanol.

HCl 0.3 N.

KIO₃ 5% (p/v) 5 g de KIO₃ para 100 ml de agua destilada.

ii. Metanólisis y ajuste de pH

Se pesaron 20 mg de tejido seco de cada hoja en un tubo pirex con tapa de teflón de 16x125 mm (20 ml), la parte superior del tubo actúa como condensador durante la metanólisis. Se añadió 2.0 ml de metanol y 200 µL de ácido sulfúrico concentrado (18M). Los tubos deben de estar bien cerrados para evitar que el solvente se evapore durante el calentamiento. Los tubos se colocaron en la estufa a 85°C y se dejaron reaccionar por 20 horas a 85°C.

Los tubos se centrifugaron brevemente a 3000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un cilindro graduado de 5.0 ml. El tubo de metanólisis se lavó 3 veces con volúmenes mínimos de agua destilada, y se re-centrifugó lo necesario. Se ajustó el volumen a 3.0 ml con agua destilada. Se añadió 50 µL de etanolamina con agitación suave en cada adición. La neutralización produce un calentamiento alto de la muestra, por lo que la etanolamina debe de ser añadida cuidadosamente y en pequeñas alícuotas.

Se añadieron 500 µl de acetato de amonio 3.7M y se ajustó el pH a 5.5 utilizando pequeñas cantidades de etanolamina diluida o de ácido sulfúrico.

El volumen de la muestra se ajustó a 4.0 ml con agua destilada y se mezcló. Se almacenó bien tapada a 4°C por un máximo de 48 hrs. Se puede formar un precipitado durante el almacenamiento, por lo que la solución se re-centrifuga brevemente y se remueve el precipitado antes del análisis.

iii. Reacción con el KIO_3

Las muestras se analizaron por reacción con iodato de potasio, que forma un pigmento característico con longitud de onda máxima de 525 nm. Si la muestra esta pigmentada, la lectura de absorbancia debe de corregirse, analizando en paralelo la muestra de reacción y la mezcla pigmentada a un pH bajo.

Se dispensaron 100 μL de la muestra (metanolizada proveniente del extracto y con pH ajustado, o el estándar metil galato) en un tubo de microcentrífuga de 2.0 ml. El reactivo blanco se añadió a la muestra para llevar el volumen a 100 μL .

Se adicionó 350 μL de agua y 1 ml de metanol a la muestra, y se agitó en un vortex. Los tubos se taparon bien y se colocaron en un baño de agua a 30°C por 50 minutos.

Se preparó una mezcla "background" para cada muestra, de la misma forma que las muestras de reacción, excepto que los 350 μL de agua son remplazados por 350 μL de HCl 0.3 N.

Se añadió 40 μL de KIO_3 al 5% (p/v) a cada muestra, a intervalos de tiempo. Los tubos se taparon y se agitaron en un vortex y se llevaron al baño de agua a de 30°C. Cincuenta minutos exactos después de añadir el KIO_3 se leyó la absorbancia a 525 nm contra agua.

iv. Curva de calibración

Se estandarizó el método con ácido tánico. La solución stock del tanino se preparó en acetona acuosa (70:30 v/v) con las siguientes concentraciones: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 de ácido tánico mg/ml en acetona acuosa. Se metanolizaron y se ajustó el pH según lo indicado para las muestras. Se derivó una ecuación de regresión. Las concentraciones presentes en las muestras se derivaron de la ecuación.

f. Método de cuantificación de flavonoides totales

i. Preparación de la muestra

Las muestras de 200 mg se extrajeron con nitrógeno líquido y 15 ml de etanol al 80%, macerándose por 24 hrs a temperatura ambiente con agitación constante y se centrifugaron por 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se concentró en rotavapor a presión reducida a 40°C y el residuo se redissuelve en etanol al 96% y se mantiene en un frasco oscuro a temperatura ambiente.

ii. Cuantificación

0.1 ml del extracto se diluyó en etanol al 80% (0.9 ml). Una alícuota de volumen conocido (0.5 ml) se añadió a un tubo de ensaye. Se aforó la muestra a 5 ml con agua destilada y se agregó 0.3 ml de NaNO_2 (1:20). Después de 5 min se agregó 3 ml de AlCl_3 (1:10 o 5%). 6 minutos después, se añadió 2 ml de NaOH 1M. La solución se mezcló en vortex y se leyó la absorbancia a 510 nm.

iii. Curva de calibración

El contenido de flavonoides totales se calculó a partir de una curva estándar de quercetina con las siguientes concentraciones por dilución: 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml. Se trataron según lo indicado para las muestras. Se derivó una ecuación de regresión.

g. Método de cuantificación de elagitaninos

i. Reactivos

$2N \text{H}_2\text{SO}_4$

Solución de lavado: acetona/agua/ HCl concentrado (70/30/1, v/v/v).

NaNO_2 1% en agua: 1.00 gr de NaNO_2 a 100 ml de agua.

Solución stock de ácido elágico. Ácido elágico (Sigma) 0.5 mg/ml

Piridina

Filtro de policarbonato (Nucleopore SN:110607 PC MEMB 4 μm) y *filtros de fibra de vidrio* (Gelman tipo E).

ii. Preparación de la muestra

Se pesaron 50 mg de la muestra seca, en tubos de vidrio obstruido de la mitad hacia abajo. Se añadió 5.0 ml de H_2SO_4 2N y se congelaron. Los tubos se extrajeron al vacío y se calentaron por 24 hrs a 100°C . Después de la hidrólisis, se filtró la muestra con vacío (el ácido elágico es insoluble en solvente bajo hielo y se lava para eliminar los pigmentos) utilizando filtros de policarbonato. Posteriormente se lavó el material insoluble varias veces y se descartaron los lavados.

Se colocó cuidadosamente el material insoluble en un tubo y se añadió 10.0 ml de piridina, se mezcló con el vortex para diluir el ácido elágico. Podrían estar presente material insoluble de la planta. Se filtró la solución con un filtro de fibra de vidrio para remover el material insoluble y salvar la solución de piridina para reutilizar.

iii. Determinación del ácido elágico

El volumen de las muestras fue de 2.1 ml de piridina y 2 ml de muestra. Se añadió 0.1 ml de HCl concentrado a la muestras y se colocaron a 30°C en un baño de agua por 5 minutos. Al tiempo cero, se añadieron 0.1 ml de NaNO₂, se llevaron al vortex y se leyó la absorbancia a 538 nm. Se colocaron las muestras en un baño de agua. Exactamente 36 minutos después de añadir NaNO₂, se leyó de nuevo la absorbancia. La diferencia entre absorbancias es una función de la concentración del ácido elágico.

iv. Curva de calibración

El contenido de elagitaninos se calculó a partir de una curva estándar de ácido elágico con las siguientes concentraciones por dilución: 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml. Se trataron según lo indicado para las muestras. Se derivó una ecuación de regresión.

2. Métodos de análisis cuantitativo de la calidad nutricional

a. Método de cuantificación del contenido de agua

i. Procedimiento

Se pesó 2 g de la muestra en un pesafiltros (tarado), se colocó en una estufa a 105°C por 36 horas. Se pasó a un desecador para dejarlos enfriar y se registró el peso.

ii. Cálculos

Gramos de muestra = peso del pesafiltros con la muestra húmeda – peso del pesafiltros constante (vacío)

Gramos de humedad = peso del pesafiltros con la muestra húmeda – peso del pesafiltros con muestra seca

% de humedad = gramos de humedad/gramos de muestra X 100

b. Método de cuantificación de clorofila

Se cuantificó el contenido total de clorofila por medio del método SPAD (Soil Plant Analysis Development, Minolta® SPAD 502 Modelo DL).

i. Fundamentos del instrumento

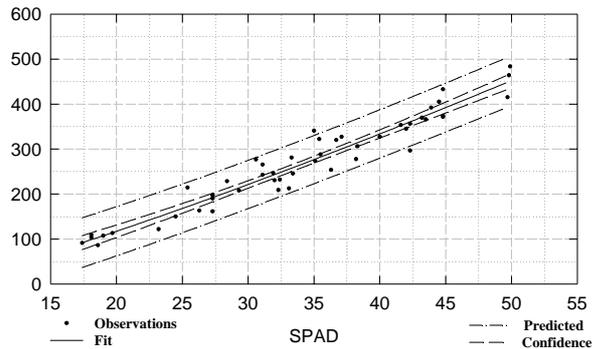
El SPAD mide la absorbancia a 650 y 940 nm y determina el contenido relativo de clorofila o “índice de clorofila” (Richardson *et al.* 2002). Los valores SPAD están basados en el principio de la absorción de luz de la clorofila, una parte del espectro de luz es absorbido y el resto es reflejado. La luz entra en contacto con la celda detectora del SPAD-502 y es convertida en una señal eléctrica. La cantidad de luz captada por la celda es inversamente proporcional a la cantidad de luz utilizada por la clorofila, la señal es procesada, y la absorbancia es cuantificada en valores dimensionales que van de 0 a 199, por lo que las unidades SPAD serán siempre las mismas de acuerdo con el tono verde de las hojas (Krugh *et al.* 1994).

ii. Procedimiento

En cada uno de los 40 árboles muestreados, se colectaron 20 hojas de cada edad por estrato. Se hicieron 6 lecturas con el medidor de clorofila en distintos puntos de la hoja (Yadava 1986), y se obtuvo un valor promedio (Krugh *et al.* 1994).

iii. Cálculos

Se aplicó la ecuación de regresión lineal obtenida con los valores del SPAD y la cuantificación de clorofila en hojas de *Spondias purpurea* por el método químico de extracción con dimetilsulfóxido (Hisox e Israelstam 1979).



Ecuación: $y=30.669587 + 2.4696538 \cdot \ln(x)$; $r^2=0.93$; $F_{stat}=681.24$

Error estándar: 26.48

c. Método de cuantificación de carbohidratos no estructurales

i. Extracción de azúcares simples

Extracción

Las hojas de *Spondias purpurea* se secaron en estufa a 40°C. Se añadió 1.5 ml de etanol al 80% a un tubo de microcentrífuga con la muestra seca, previamente pesada (20 mg aproximadamente). Los tubos se agitaron por 12 hrs a 27°C en baño de agua. Posteriormente, los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 10000 rpm, y se separó el sobrenadante en un tubo de ensaye. Se añadió 5 ml de etanol al 80% y se agitó la muestra 2 hrs a 27°C en baño de agua. Nuevamente se centrifugó la muestra y se separó en el tubo de ensaye. El sobrenadante se aforó a 5 ml con agua desionizada y se almacenó a 4°C.

Cuantificación

Con una pipeta calibrada se preparó un blanco con 2 ml de agua desionizada. Las muestras se prepararon añadiendo 1 ml de la muestra y 1 ml de agua en un tubo de ensaye. Se adicionó 50 µl de fenol al 80% a cada tubo. Se mezcló en vortex por 5 segundos y se adicionó 2 ml de H₂SO₄ al 80% mezclando en vortex 20 seg. Las muestras se leyeron a 487 nm.

Curva de calibración

El contenido azúcares simples se calculó a partir de una curva estándar de glucosa. Las siguientes concentraciones se prepararon por dilución: 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml. Se trataron según lo indicado para las muestras. Se derivó una ecuación de regresión.

X: LITERATURA CITADA

- Abdullin, I.F., E.N. Turova y G.K. Budnikov. 2001. Colorimetric determination of the antioxidant capacity of tea extracts using electrogenerated bromine. *Journal of Analytical Chemistry*, 56:557-559.
- Agrawal, A.A. 1998. Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, 279:1201-1202.
- Agrawal, A.A. 1999. Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology*, 80:1713-1723.
- Agrawal, A.A., P.M. Gorski y D.W. Tallamy. 1999. Polymorphism in plant defense against herbivory: constitutive and induced resistance in *Cucumis sativus*. *Journal of Chemical Ecology*, 25:2285-2304.
- Agrawal, A.A. 2000. Benefits and cost of induced plant defense for *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). *Ecology*, 81:1804-1813.
- Ågren, J. 1987. Intersexual differences in phenology and damage by herbivores and pathogens in dioecious *Rubus chamaemorus* L. *Oecologia*, 72:161-169.
- Ågren, J. 1988. Sexual differences in biomass and nutrient allocation in the dioecious *Rubus chamaemorus*. *Ecology*, 69:962-973.
- Ågren, J. 1997. Growth, herbivory and disease in relation to gender in *Salix viminalis* L. *Oecologia*, 111:61-68.
- Ågren, J., K. Danell, T. Elmqvist, L. Ericson y J. Hjältén. 1999. *Sexual dimorphism and biotic interactions*. En: Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Geber, M.A., T.E. Dawson y L.F. Delph (eds). Springer Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 217-246.
- Aguilar-Ortigoza, C., J. Aguilar-Ortigoza, V. Sosa y M. Aguilar-Ortigoza. 2003. Toxic phenols in Anacardiaceae. *Economic Botany*, 57:354-364.
- Ahman, I. 1997. Growth, herbivory and disease in relation to gender in *Salix viminalis* L. *Oecologia*, 111:61-68.
- Aide, T.M. y J.K. Zimmerman. 1990. Patterns of insects herbivory, growth, and survivorship in juvenils of a neotropical liana. *Ecology*, 7:1412-1421.
- Allen, G.A. y J.A. Antos. 1988. Relative reproductive effort in males and females of the dioecious shrub *Oemleria cerasiformis*. *Oecologia*, 76:111-118.
- Alliende, M.C. y J.L. Harper. 1989. Demographic studies of a dioecious tree. II. Colonization, sex and age structure of populations of *Salix cinerea*. *Journal of Ecology*, 77:1029-1047.
- Ávila-Sakar, G., L.L. Leist y A.G. Stephenson. 2003. Effects of the spatial pattern of leaf damage on growth and reproduction: nodes and branches. *Journal of Ecology*, 91:867-879.
- Avitia, G.E. 1996. Anatomía precigótica y postcigótica en relación al aborto de óvulos y semillas en *Spondias purpurea* L. Unpublished doctoral thesis, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico.
- Avitia-García, E. 1997. Estructura floral y anatomía del aborto de óvulos y semillas en ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.). *Horticultura Mexicana*, 5:282-288.
- Ayres, M.P., T.P. Clausen, S.F. McLean, A.M. Redman y P.B. Reichardt. 1997. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*, 78:1696-1712.
- Baker, N.R. y K. Hardwick. 1973. Biochemical and physiological aspects of leaf development in cacao (*Theobroma cacao*) I. Development of chlorophyll and photosynthetic activity. *New Phytologist*, 72:1315-1324.
- Baldwin, I.T. 1994. *Chemical changes rapidly induced by folivory*. En: Insects-plant interactions. Bernays, E.A. (ed). Vol. V. C.R.C. Press, inc., Boca Ratón. Pp. 1-23.
- Bañuelos, M.J., M. Sierra y J.R. Obeso. 2004. Sex, secondary compounds and asymmetry. Effects on plant-herbivore interaction in a dioecious shrub. *Acta Oecologica*, 25:151-157.
- Barfod, A. 1987. Anacardiaceae. *Flora of Ecuador*, 30:11-47.
- Basset, Y. 1991. The spatial distribution of herbivory, mines and galls within an Australian rain forest tree. *Biotropica*, 23:271-281.
- Basset, Y. 1992. Host specificity of arboreal and free-living insect herbivores in rain forest. *Biological Journal of Linnean Society*, 47:115-133.

- Bauer, H. y U. Bauer. 1980. Photosynthesis in leaves of the juvenile and adult phase of ivy (*Hedera helix*). *Physiologia Plantarum*, 49:366-372.
- Bazzaz, F.A., N.R. Chiariello, P.D. Coley y L.F. Pitelka. 1987. Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience*, 37:58-67.
- Benitez, F. 1986. *La ruta de Hernán Cortes*. Fondo de Cultura Económica, México, D.F. Pp. 308.
- Berenbaum, M. 1978. Toxicity of furanocoumarin to armyworms: a case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science*, 201:532-534.
- Bergelson, J., S. Fowler y S. Hartley. 1986. The effects of foliage damage on casebearing moth larvae *Coleophora serrata*, feeding on birch. *Ecological Entomology*, 11:241-250.
- Bergström, R., C. Skarpe y K. Danell. 2000. Plant responses and herbivory following simulated browsing and stem cutting of *Combretum apiculatum*. *Journal of Vegetal Science*, 11:409-414.
- Bernays, E.A., G. Cooper-Driver y M. Bilgener. 1989. Herbivores and plant tannins. *Advances in Ecological Research*, 19:263-302.
- Berner, D., W.U. Blanckenhorn y C. Körner. 2005. Grasshoppers cope with low host plant quality by compensatory feeding and food selection: N limitation challenged. *Oikos*, 111:525-533.
- Boecklen, W.J., P.W. Price y S. Mopper. 1990. Sex and drugs and herbivores: sex-biased herbivory in arroyo willow (*Salix lasiolepis*). *Ecology*, 71:581-588.
- Boecklen, W.J. y M.T. Hoffman. 1993. Gender-biased herbivory in *Ephedra trifurca*: the importance of gender by environment interactions. *Oecologia*, 96:49-55.
- Bowers, W.S. 1991. *Insect hormones and antihormones in plants*. En: Herbivores: their interactions with secondary metabolites. Rosenthal, G.A. y M.R. Berenbaum (eds). Volumen 1. Academic Press, USA. Pp. 431-456.
- Brown, V.K. y J.H. Lawton. 1991. Herbivory and the evolution of leaf size and shape. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 333:265-272.
- Bryant, J., F.D. Provenza, J. Pastor, P.B. Reichardt, T.P. Clausen y J.T. Du-Toit. 1991. Interactions between woody plants and browsing mammals mediated by secondary metabolites. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22:431-446.
- Bryant, J.P., P.B. Reichart, T.P. Clausen, F.D. Provenza y P.J. Kuropat. 1992. *Woody plant-mammal interactions*. En: Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, vol II. Ecological and evolutionary processes. Rosenthal, G.A. y M.R. Berenbaum (eds). Academic Press, San Diego, California. Pp. 343-370.
- Bullock, S.H. 1986. Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of Mexico. *Arch. Met. Geog. Bioclim. Ser. B*, 72:551-585.
- Bullock, S.H. 1988. Rasgos del ambiente físico y biológico de Chamela, Jalisco, México. *Folia Entomologica Mexicana*, 77:5-7.
- Bullock, S.H. y J.A. Solís-Magallanes. 1990. Phenology of canopy trees of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica*, 22:22-35.
- Bullock, S.H. 1992. Seasonal differences in nonstructural carbohydrates in two dioecious monsoon-climate trees. *Biotropica*, 24:140-145.
- Bullock, S.H. 1994. Wind pollination of neotropical dioecious trees. *Biotropica*, 26:172-179.
- Charnov, E.L. 1982. *The theory of sex allocation*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Charnov, E.L. 1997. Trade-off-invariant rules for evolutionarily stable life histories. *Nature*, 387:393-393.
- Choong, M.F. 1996. What makes a leaf tough and how this affects the pattern of *Castanopsis fissa* leaf consumption by caterpillars. *Functional Ecology*, 10:668-674.
- Cipollini, M.L. y D.F. Whigham. 1994. Sexual dimorphism and cost of reproduction in the dioecious shrub *Lindera benzoin* (Lauraceae). *American Journal of Botany*, 81:65-75.
- Clark, D.B. y D.A. Clark. 1985. Seedling dynamics of a tropical tree: impacts of herbivory and meristem damage. *Ecology*, 66:1884-92.
- Cojocarú, M., S. Droby, E. Glotter, A. Goldman, H.E. Gottlieb, B. Jacoby y D. Prusky. 1986. 5-(12-Heptadecenyl)-resorcinol, the major component of the antifungal activity in the peel of mango fruit. *Phytochemistry*, 25:1093-1095.
- Coleman, J.S. 1986. Leaf development and leaf stress: increased susceptibility associated with sink-source transition. *Tree Physiology*, 2:289-299.

- Coley, P.D. 1983. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs*, 53:209-233.
- Coley, P.D., J.P. Bryant y F.S. Chapin III. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230:895-899.
- Coley, P.D. 1986. Costs and benefits of defense by tannins in a neotropical tree. *Oecologia*, 70:238-241.
- Coley, P.D. y T.M. Aide. 1991. *A comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forest*. En: Plant animal interactions, evolutionary ecology in tropical and temperate regions. Price, P.W., T.M. Lewinsohn, G.W. Fernandes y W.W. Benson (eds). Wiley, New York. Pp. 25-49.
- Coley, P.D. y J.A. Barone. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27:305-335.
- Cooke, F., C.F. Findlay y R.F. Rockwell. 1984. Recruitment and the timing of breeding in Lesser Snow Geese (*Chen caerulescens caerulescens*). *Auk*, 101:451-458.
- Cork, S.J. y W.J. Foley. 1991. *Digestive and metabolic strategies of arboreal mammalian folivorous in relation to chemical defenses in temperate and tropical forests*. En: Plant defenses against mammalian herbivory. Palo, R.T. y C.T. Robbins (eds). CRC Press, Boca Ratón. Pp. 134-166.
- Cornelissen, T.G. y W. Fernandes. 2001. Defence, growth and nutrient allocation in the tropical shrub *Bauhinia brevipes* (Leguminosae). *Austral Ecology*, 26:246-253.
- Cornelissen, T. y P. Stiling. 2005. Sex biased herbivory: a meta-analysis of the effects of gender on plant-herbivore interactions. *Oikos*, 111:488-500.
- Corthout, J., J.L. Pieters, M. Claeys, D. Vandenberghe y A. Vlietinck. 1992. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 31:1979-1981.
- Crankshaw, D. y J.H. Langenheim. 1981. Variation in terpenes and phenolics through leaf development in Hymenaceae and its possible significance to herbivore. *Biochemical Systematics and Ecology*, 9:115-124.
- Cuevas, A.J. 1994. *Spanish plum, red Bombin*. En: Neglected Crops: 1492 from a different perspective. Plant production and protection. Series no. 26. Hernado-Bermejo, J.E. y J. León (eds). FAO-ONU, Roma, Italia. Pp. 111-115.
- Cuevas-Reyes, P., M. Quesada y K. Oyama. 2006. Abundance and leaf damage caused by gall-inducing Insects in a mexican tropical dry forest. *Biotropica*, 38:107-115.
- Dalhsten, D.L., W.A. Copper, D.L. Rodney y P.K. Kleintjes. 1990. Quantifying bird predation of arthropods in forest. *Studies in Avian Biology*, 13:44-52.
- Danell, K., T. Elmqvist, L. Ericson y A. Salomonsson. 1985. Sexuality in willows and preference by bark-eating voles: defence or not? *Oikos*, 44:82-90.
- Danell, K., P. Niemelä, T. Varvikko y T. Vuorisalo. 1991. Moose browsing on scots pine along a gradient of plant productivity. *Ecology*, 72:1624-1633.
- Danell, K., J. Hjältén, L. Ericson y T. Elmqvist. 1991. Vole feeding on male and females willow shoots along a gradient of plant productivity. *Oikos*, 62:145-152.
- De Acosta, J. 1985. *Historia natural y moral de las Indias*. Segunda edición. Fondo de cultura Económica, México, D.F. Pp. 444.
- De Bruyn, L., J. Scheirs y R. Verhagen. 2002. Nutrient stress, host plant quality and herbivore performance of a leaf-mining fly on grass. *Oecologia*, 130:594-599.
- De Pinto, G.L., M. Martínez, L. Sanabria, F. Rincón, A. Vera, O. Beltrán y C. Clamens. 2000. The composition of two *Spondias* gum exudates. *Food Hydrocolloids*, 14:259-263.
- Delph, L.F., Y. Lu. y L.D. Jayne. 1993. Patterns of resource allocation in a dioecious *Carex* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, 80:607-615.
- Delph, L.F. y T.R. Meagher. 1995. Sexual dimorphisms masks life history trade-offs in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Ecology*, 76:775-785.
- Delph, L.F. 1999. *Sexual dimorphism in live history*. En: Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Geber, M.A., T.E. Dawson y L.F. Delph (eds). Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Dial, R. y J. Roughgarden. 1995. Experimental removal of insectivores from rain forest canopy: direct and indirect effects. *Ecology*, 76:821-834.
- Domínguez, C.A. y R. Dirzo. 1994. Effects of defoliation on *Erythroxylum havanense*, a tropical proleptic species. *Ecology*, 75:1896-1902.

- Dormann, C.F. y C. Skarpe. 2002. Flowering, growth and defense in the two sexes: consequences of herbivore exclusion of *Salix polaris*. *Functional Ecology*, 16:649-656.
- Doyle, R.D., M. Grodowitz, R.M. Smart y C. Owens. 2002. Impact of herbivory by *Hydrellia pakistanae* (Diptera: Ephydriidae) on growth and photosynthetic potential of *Hydrilla verticillata*. *Biological Control*, 24:221-229.
- du Toit, J.T., J.P. Bryant y K. Frisby. 1990. Regrowth and palatability of *Acacia* shoots following pruning by African savanna browsers. *Ecology*, 71:149-154.
- Faria, M.L. y G.W. Fernandes. 2001. Vigor of a dioecious shrub and attack by a galling herbivore. *Ecological Entomology*, 26:37-45.
- Feeny, P. 1976. Plant apparency and chemical defense. *Recent Advances in Phytochemistry*, 10:1-40.
- Felton, G.W. y S.S. Duffey. 1991. Reassessment of the role of gut alkalinity and detergency in insect herbivory. *Journal of Chemical Ecology*, 17:1821-1836.
- Fenner, M., M.E. Hanley y R. Lawrence. 1999. Comparison of seedling and adult palatability in annual and perennial plants. *Functional Ecology*, 13:546-551.
- Fernandes, G.W. 1998. Hypersensitivity as a phenotypic basis of plant induced resistance against a galling insect (Diptera: Cecidomyiidae). *Environmental Entomology*, 27:260-267.
- Fernandes, G.W., T.G. Cornelissen, R.M.S. Isaias y A.F. Lara. 2000. Plants fight gall formation: hypersensitivity. *Ciën Cult*, 52:49-54.
- Filip, V., R. Dirzo, J.M. Maas y J. Sarukhán. Within and among year variation in the levels of herbivory on the foliage of trees from a Mexican tropical deciduous forest. *Biotropica*, 27:78-86.
- Finke, O.M. 1988. *Sources of variation in lifetime reproductive success in a nonterritorial damselfly (Odonata: Coenagrionidae)*. En: Reproductive success: studies of individual variation in contrasting breeding systems. Clutton-Brock, T.H. (ed). Chicago University Press. Pp. 24-43.
- Freitas, A.V.L., I.R. Leal y S.O. Ferreira. 1999. Selection of oviposition sites by a lepidopteran community of a tropic forest in southeastern Brazil. *Biotropica*, 31:372-375.
- Fritz, R.S., W.S. Gaud, C.F. Sacchi y P.W. Price. 1987. Patterns of intra and interspecific association of gall forming sawflies in relation to shoot size on their willow host plant. *Oecologia*, 73:159-169.
- Fritz, R.S., B.A. Crabb y C.G. Hochwender. 2000. Preference and performance of a gall-inducing sawfly: a test of the plant vigor hypothesis. *Oikos*, 89:555-563.
- Fritz, R.S., B.A. Crabb y C.G. Hochwender. 2003. Preference and performance of a gall-inducing sawfly: plant vigor, sex gall traits and phenology. *Oikos*, 102:601-613.
- García, M.B. y R.J. Antor. 1995. Sex ratio and sexual dimorphism in the dioecious *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *Oecologia*, 101:59-67.
- García-Oliva, F., E. Ecurra y L. Galicia. 1991. Pattern of rainfall distribution in the Central Pacific coast of Mexico. *Geografiska Annaler*, 73:179-186.
- Givnish, T.J. 1988. *Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective*. En: Ecology of photosynthesis in sun and shade. Evans, J.R., S. von Caemmerer y W.W. Adams III (eds). CSIRO: Melbourne. Pp. 63-92.
- Gleadow, R.M. y I.E. Woodrow, 2000. Temporal and spatial variation in cyanogenic glycosides in *Eucalyptus cladocalyx*. *Tree Physiology*, 20:591-598.
- Gottlieb, O.R. 1989. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. *Phytochemistry*, 28:2545-2558.
- Grant, M.C. y J.B. Mitton. 1979. Elevational gradients in adult sex ratios and sexual differentiation in vegetative growth rates of *Populus tremuloides* Michx. *Evolution*, 33:914-918.
- Hagerman, A.E. 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *Journal of Chemical Ecology*, 13:437-449.
- Hagerman, A.E. y C.T. Robbins. 1993. Specificity of tannin-binding salivary proteins relative to diet selection by mammals. *Canadian Journal of Zoology*, 71:628-633.
- Hagerman, A.E. 1998. Tannin Analysis. <http://www.muohio.edu/~hagermae/handbook/>.
- Hall, G.G. y J.H. Langenheim. 1986. Temporal changes in the leaf monoterpenes of *Sequoia sempervirens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14:61-69.
- Harborne, J.B. 1988. *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press, UK.

- Harborne, J.B. 1990. Constraints on the evolution of biochemical pathways. *Biological Journal of the Linnean Society*, 39:135-151.
- Harborne, J.B. 1991. *Flavonoid pigments*. En: Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites. Rosenthal, G.A. y A.H. Janzen (eds). Academic Press. New York, USA. Pp.389-429.
- Harborne, J.B. 1999. *Classes and function of secondary products from plants*. En: Chemicals from plants. Walton, N.J. y D.E. Brown (eds). Imperial College Press, London, England. Pp. 17–19.
- Harborne, J.B. y C.A. Williams. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55:481-504.
- Hartley, S.E. y J.H. Lawton. 1991. *Biochemical aspects and significance of the rapidly induced accumulation of phenolics in birch foliage*. En: Phytochemical induction by herbivores. Tallamy, D.W. y M.J. Ranpp (eds). JohnWiley, New York. Pp. 105–132.
- Hartley, S.E. 2001. *Plant Interactions with Biotic Factors*. Encyclopedia of Life Sciences. University of Sussex, Brighton, UK, Pp.1-10.
- Hartzfeld, P.W., R. Forkner, M.D. Hunter y A.E. Hagerman. 2002. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50:1785-1790.
- Haukioja, E., P. Niemela y S. Siren. 1985. Foliage phenols and nitrogen in relation to growth, insect damage, and ability to recover after defoliation, in the mountain birch *Betula pubescens* ssp. tortuosa. *Oecologia*, 65:214-222.
- Haukioja, E. 1990. Induction of defenses in trees. *Annual Review of Entomology*, 36:25–42.
- Hendricks, B.J. y B.D. Collier. 2003. Effects of sex and age of a dioecious tree, *Forchammeria pallida* (Capparaceae) on the performance of its primary herbivore *Murgantia varicolor* (Hemiptera: Pentatomidae). *Ecological Research*, 18:247-255.
- Hermis, D.A. y W.J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67:283-335.
- Hiscox, J.D. y G.F. Israelstam. 1979. Method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57:1332–1334.
- Hjältén, J. 1992. Plant sex and hare feeding preferences. *Oecologia*, 89:253-256.
- Hjältén, J. 1999. Willow response to pruning: the effect on plant growth, survival and susceptibility to leafgallers. *Écoscience*, 6:62-67.
- Hjältén, J. y R.T. Palo. 1992. Selection of deciduous trees by free ranging voles and hares in relation to plant chemistry. *Oikos*, 63:477-484.
- Houle, G. 1999. Nutrient availability and plant gender influences on the short-term compensatory response of *Salix planifolia* spp. planifolia to simulated leaf herbivory. *Canadian Journal of Forest Research*, 29:1841.
- Howard, J.J. 1988. Leafcutting ant diet selection: relative influence of leaf chemistry and physical features. *Ecology*, 69:250-260.
- Hudgins, J.W., S.G. Ralph, V.R. Franceschi y J. Bolhmann. 2006. Ethylene in induced conifer defense: cDNA cloning, protein expression, and cellular and subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in resin duct and phenolic parenchyma cells. *Planta*, 224:865-877.
- Hutchison, K.W., C.D. Sherman, J. Weber, S.S. Smith, P.B. Singer y M.S. Greenwood. 1990. Maturation in larch. II. Effects of age on photosynthesis and gene expression in developing foliage. *Plant Physiology*, 94:308–1315.
- Inbar, M., H. Doostdar y R.T. Mayer. 2001. Suitability of stressed and vigorous plants to various insect herbivores. *Oikos*, 94:228-235.
- Inoue, K.H. y A.E. Hagerman. 1988. Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry*, 169:363-369.
- Izhaki, I. 2002. Emodin: a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155:205-217.
- Janzen, D.H. 1981. Patterns of herbivory in a tropical deciduous forest. *Biotropica*, 13:271-281.
- Janzen, D.H. y P.G. Waterman. 1984. A seasonal census of phenolics, fibre and alkaloids in foliage of forest trees in Costa Rica: some factors affecting their distribution and relation to host selection by Spingidae and Saturniidae. *Biological Journal of Linnean Society*, 21:439-454.

- Jing, S.W. y P.D. Coley. 1990. Dioecy and herbivory: the effect of growth rate on plant defense in *Acer negundo*. *Oikos*, 58:368-377.
- Jones, K.C. y J.A. Klocke. 1987. Aphid feeding deterrence of ellagitannins, their phenolic derivatives. *Entomologia Experimentalia Applicata*, 44:229-232.
- Kaitaniemi, P., S. Neuvonem y T. Nyssönen. 1999. Effects of accumulative defoliations on growth, reproduction, and insect resistance in Mountain Birch. *Ecology*, 80:524-532.
- Karban, R. y J.H. Myers. 1989. Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20:331-348.
- Karban, R. 1993. Costs and benefits of induced resistance and plant density for a native shrub, *Gossypium thurberi*. *Ecology*, 74:9-19.
- Karban, R. y S.Y. Strauss. 1993. Effects of herbivores on growth and reproduction of their perennial host, *Erigeron glaucus*. *Ecology*, 74:39-46.
- Karban, R. y I.T. Baldwin. 1997. *Induced responses to herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.
- Karban, R. y J.S. Thaler. 1999. Plant phase and resistance to herbivory. *Ecology*, 80:510-517.
- Karban, R. y A.A. Agrawal. 2002. Herbivore offense. *Annual Review of Ecology*, 33:641-664.
- Kingsley, P., J.M. Scriber, C.R. Grau y P.A. Delwiche. 1983. Feeding and growth performance of *Spodoptera eridania* (Noctuidae: Lepidoptera) on "vernal" alfalfa, as influenced by *Verticillium* wilt. *Protect Ecol* 5:127-134.
- Krischik, V.A. y R. Denno. 1990. Patterns of growth, reproduction, defense and herbivory in the dioecious shrub *Baccharis halimifolia* (Compositae). *Oecologia*, 83:182-190.
- Krugh, B., L. Bichham y D. Miles. 1994. The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves. Maize genetics cooperation. *News Letter*, 68:25-27.
- Krupnick, G.A., G. Avila, K.M. Brown y A.G. Stephenson. 2000. Effects of herbivory on internal ethylene production and sex expression in *Cucurbita texana*. *Functional Ecology*, 14:215-225.
- Kursar, T.A. y P.D. Coley. 1992. Delayed greening in tropical leaves: an anti-herbivore defense? *Biotropica*, 24:256-262.
- Kursar, T.A. y P.D. Coley. 2003. Convergence in defense syndromes of young leaves in tropical rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31:929-949.
- Lamont, B.B. 1993. Injury-induced cyanogenesis in vegetative and reproductive parts of two *Grevillea* species and their F1 hybrid. *Annals of Botany*, 71:537-542.
- Laporte, M.M. y L.F. Delph. 1996. Sex specific physiology and source-sink relations in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Oecologia*, 106:63-72.
- Larcher, W. 1995. *Physiological plant ecology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Third edition.
- Lawton, J. 1983. Plant architecture and the diversity of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 28:23-39.
- Le Corf, J. y R.J. Marquis. 1999. Differences between understory and canopy in herbivore community composition and leaf quality for two oaks species in Missouri. *Ecological Entomology*, 24:46-58.
- Lehtilä, K. y S.Y. Strauss. 1997. Leaf damage by herbivores affects attractiveness to pollinators in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia*, 111:396-403.
- Lehtilä, K. y S.Y. Strauss. 1999. Effects of foliar herbivory on male and female reproductive traits of wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Ecology*, 80:116-124.
- Leimu, R. y J. Koricheva. 2006. A meta-analysis of tradeoffs between plant tolerance and resistance to herbivores: combining the evidence from ecological and agricultural studies. *Oikos*, 112:1-9.
- Levin, D.A. 1976. Alkaloid-bearing plants: an ecogeographic perspective. *The American Naturalist*, 110:261-284.
- Lloyd, D.G. y C.J. Webb. 1977. Secondary sex characters in plants. *The Botanical Review*, 43:177-216.
- Lott, E., S.H. Bullock y J.A. Solís- Magallanes. 1987. Floristic diversity and structure of upland and arroyo forest of coastal Jalisco. *Biotropica*, 19:228-235.

- Lovett-Doust, J. y L. Lovett-Doust. 1985. *Sex ratios, clonal growth and herbivory in Rumex acetosella*. En: Studies on plant demography. White, J. (ed). Academic Press, London. Pp 327-341.
- Lowman, M.D y J.D. Box. 1983. Variation in leaf toughness and phenolic content among five species of Australian rain forest trees. *Australian Journal of Ecology*, 8:17-25.
- Lowman, M.D. 1985. Temporal and spatial variability in insect grazing of the canopies of five Australian rainforest tree species. *Australian Journal of Ecology*, 10:7-24.
- Lowman, M.D. 1992. Herbivory in Australian rain forest, with particular reference to the canopies for *Doryphora sassafras* (Monimmiaceae). *Biotropica*, 24:263-272.
- Macia, J.M. y A.S. Barfod. 2000. Economic botany of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) in Ecuador. *Economic Botany*, 54:449-458.
- Mandujano, S. 2002. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). *Ciruelo*. En: Historia Natural de Chamela. Noguera, F.A., J.H. Vega, A.N. García y M. Quesada (eds). Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. Pp. 145-150.
- Mandujano, S., S. Gallina y S.H. Bullock. 1994. Frugivory and dispersal of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) in a tropical dry forest of Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 42:105-112.
- Marion, C. y G. Houle 1996. No differential consequences of reproduction according to sex in *Juniperus communis* var. *depressa* (Cupressaceae). *American Journal of Botany*, 83:480-488.
- Marquis, R.J. 1984. Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science*, 226:537-39.
- Marquis, R.J. 1991. Evolution of resistance in plants to herbivores. *Evolution in Trends Plants*, 5:23-29.
- Marquis, R.J. 1992. A bite is a bite? Constraints on response to folivory in *Piper arieianum* (Piperaceae). *Ecology*, 73:143-52.
- Massei, G., R. Watkins y S.E. Hartley. 2006. Sex-related growth and secondary compounds in *Juniperus oxycedrus macrocarpa*. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 29:135-140.
- Mathews, C.K. y K.E. van Holde. 1998. *Bioquímica*. Mc Graw Hill. Segunda edición.
- Mattson, W.J. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11:119-161.
- Mattson, W.J. y R.A. Haack. 1987. The role of drought in outbreaks of plant-eating insects. *Bioscience*, 37:110-118.
- McCall, A.C. y R. Karban. 2006. Induced defense in *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) fruit and flowers. *Oecologia*, 46:566-571.
- McKey, D. 1979. *The distribution of secondary compounds within plants*. En: Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites. Rosenthal, G.W. y D.H. Janzen (eds). Academic Press, New York. Pp. 55-133.
- Mihaliak, C.A. y D.E. Lincoln. 1989. Plant biomass partitioning and chemical defense: response to defoliation and nitrate limitation. *Oecologia*, 80:122-126.
- Mitchell, J.D. 1990. The poisonous Anacardiaceae genera of the world. *Advances in Economic Botany*, 8:103-129.
- Mole, S. y P.G. Waterman. 1987. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia*, 72:137-147.
- Montiel, M.L. 1991. *Familias más importantes de la flora costarricense*. En: Introducción a la flora de Costa Rica. Segunda Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Moran, N y W.D. Hamilton. 1980. Low nutritive quality as a defense against herbivores. *Journal of Theoretical Biology*, 86:247-54.
- Morton, J.F. 1987. *Fruits of Warm Climates*. Dowling, C.F. Jr. (ed). Creative Resources Systems, Miami.
- Mothershead, K. y R.J. Marquis. 2000. Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology*, 81:30-40.
- Murphy, P.G. y A.E. Lugo. 1986. Ecology of tropical dry forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17:67-88.
- Myers, J.H. y D. Bazely. 1991. *Thorns, spines, prickles, and hairs: are they stimulated by herbivory and do they deter herbivores*. En: Phytochemical induction by herbivores. Tallamy, D.W. y M.J. Raupp (eds). Wiley, New York, N.Y. Pp. 325-344.

- Nicotra, A.B. 1999. Sexually dimorphic growth in the dioecious tropical shrub, *Siparuna grandiflora*. *Functional Ecology*, 13:322-331.
- Niesenbaum, R.A. 1992. The effects of light environment on herbivory and growth in the dioecious shrub *Lindera benzoin* (Lauraceae). *American Midland Naturalist*, 128:270-275.
- Obeso, J.R. 1997. Cost of reproduction in *Ilex aquifolium*: effects at tree, branch and leaf levels. *Journal of Ecology*, 85:159-166.
- Obeso, J.R. 2002. The cost of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155:321-348.
- Oyama, K. 1990. Variation in growth and reproduction in the neotropical dioecious palm *Chamaedorea tepejilote*. *The Journal of Ecology*, 78:648-663.
- Oyama, K. y R. Dirzo. 1991. Ecological aspects of the interaction between *Chamaedorea tepejilote*, a dioecious palm and *Calyptocephala marginipennis*, an herbivorous beetle, in a mexican rain forest. *Principes*, 35:86-93.
- Parker, G.G. 1995. *Structure and microclimate of forest canopies*. En: Forest Canopies. Lowman, M.D. y N.M. Nadkarni (eds). Academic Press, San Diego, California. Pp. 431-455.
- Parra-Tabla, V., V. Rico-Gray y M. Carbajal. 2004. Effect of defoliation on leaf growth, sexual expression and reproductive success of *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Plant Ecology*, 173:153-160.
- Pennington, T.D. y J. Sarukhán. 1998. *Árboles tropicales de México*. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuidad Universitaria, Distrito Federal, México.
- Pimenta-Barrios, E. y B.C. Ramírez-Hernández. 2003. Phenology, growth, and response to light of ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L., Anacardiaceae). *Economic Botany*, 57:481-490.
- Polhemus, D.A. 1988. Intersexual variation in densities of plant bugs (Hemiptera: Miridae) on *Juniperus scopulorum*. *Annals of the Entomological Society of America*, 81:742-747.
- Prado, P.I.K.L. y E.M. Vieira. 1999. The interplay between plant traits and herbivore attack: a study of a stem galling midge in the neotropics. *Ecological Entomology*, 24:80-88.
- Preszler, R.W. y P.W. Price. 1995. A test of plant-vigor, plant-stress, and plant-genotype effects on leaf-miner oviposition and performance. *Oikos*, 74:485-492.
- Price, P.W., C.E. Bowton, P. Gross, P.A. McPherson, J.N. Thompson y A.E. Weis. 1980. Interactions among three trophic levels: influence on plants on interactions between insects herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11:41-65.
- Price, P.W. 1991. The plant vigor hypothesis and herbivore attack. *Oikos*, 62:244-251.
- Quesada, M., K. Bollman y A.G. Stephenson. 1995. Leaf damage decreases pollen production and hinders pollen performance in *Cucurbita texana*. *Ecology*, 76:437-443.
- Rausher, M.D. y P. Feeny. 1980. Herbivory, plant density, and plant reproduction success: The effect of *Battus philenor* on *Aristolochia reticulata*. *Ecology*, 61:905-917.
- Read, J., E. Gras y G.D. Sanson. 2003. Does chemical defence decline more in developing leaves that become strong and tough at maturity? *Australian Journal of Botany*, 51:489-496.
- Rehill, B.J. y J.C. Schultz. 2001. *Hormaphis hamamelidis* and gall size: a test of the plant vigor hypothesis. *Oikos*, 95:94-104.
- Retuerto, R., B. Fernández-Lerma y J.R. Obeso. 2006. Changes in photochemical efficiency in response to herbivory and experimental defoliation in the dioecious tree *Ilex aquifolium*. *International Journal of Plant Science*, 167:279-289.
- Rhoades, D.F. 1977. Integrated antiherbivore, antidesiccant, and ultraviolet screening properties of creosotebush resin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5:281-290.
- Rhoades, D.F. y R.G. Cates. 1976. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. *Recent Advances in Phytochemistry*, 10:168-213.
- Rhoades, D.F. 1985. Offensive-defensive interactions between herbivores and plants: their relevance in herbivore population dynamics and ecological theory. *The American Naturalist*, 125:205-238.
- Richardson, A.D., S.P. Duigan y G.P. Berlyn. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153:185-194.
- Rivero-Cruz, J.F., D. Chávez, B. Hernández, A.L. Anaya y R. Mata. 1997. Separation and characterization of *Metopium brownie* urushiol components. *Phytochemistry*, 45:1003-1008.

- Rockwood, L.L. 1973. The effect of defoliation on seed production of six Costa Rica tree species. *Ecology*, 54:1363-1369.
- Rosenthal, G.A. 1991. *Nonprotein aminoacids as protective allelochemicals*. En: Herbivores: their interactions with secondary metabolites. Rosenthal, G.A. y M.R. Berenbaum. Volumen 1. Academic Press, USA. Pp. 1-34.
- Rosenthal, G.A. y M.R. Berenbaum. 1992. *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. Rosenthal, G.A. y M.R. Berenbaum (eds). 2nd ed. New York, Academic Press.
- Rossi, A.M. y D.R. Strong. 1991. Effects of host-plant nitrogen on the preference and performance of laboratory populations of *Carneocephala floridana* (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 20:349-1355.
- Rossi, A.M. y P. Stiling. 1998. The interactions of plant clone and abiotic factors on gall-making midge. *Oecologia*, 116:170-176.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México. Pp. 432.
- Sacchi, C.F. y M.J. Wise. 1996. Impact of two specialist insects herbivores on reproduction of horse nettle, *Solanum carolinensis*. *Oecologia*, 108:328-337.
- Sakai, A.K. y T. Burris. 1985. Growth in male and female aspen clones: a twenty-five-year longitudinal study. *Ecology*, 66:1921-1927.
- Sakai, A.K. y T.L. Sharik. 1988. Clonal growth of male and female bigtooth aspen (*Populus grandidentata*). *Ecology*, 69:2031-2033.
- Schoonhoven, L.M., T. Jermy, J.J.A. van Loon. 1998. *Insect-plant biology*. En: From physiology to evolution. Chapman & Hall.
- Schultz, J.C. 1989. *Tannin-insect interactions*. En: Chemistry and significance of condensed tannins. Hemingway, R.W. y J.J. Karchesy (eds). Plenum Press: New York. Pp. 417-433.
- Scriber, J.M. y F. Slansky. 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annual Review of Entomology*, 26:183-211.
- Simms, E.L. y T.J. Vision. 1995. Pathogenic-induced systemic resistance in *Ipomoea purpurea*. *Oecologia*, 102:494-500.
- SPSS Science Marketing Department. 1999. Sigma Scan Users Guide, Science, Chicago.
- Stamp, N.E. y T.M. Casey. 1993. *Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging*. Chapman y Hall, New York. Pp. 587.
- Stastny, M., U. Schaffner y E. Elle. 2005. Do vigour of introduced populations and escape from specialist herbivores contribute to invasiveness? *Journal of Ecology*, 93:27-37.
- Steinbauer, M.J. 1998. Seasonal fluctuations in bodyweight, lipid content and the starvation-longevity of *Amorbus obscuricornis* (Westwood) and *Gelonus tasmanicus* (Le Guillou) (Hemiptera: Coreidae). *Australian Journal of Entomology*, 37:90-96.
- Strauss, S.Y. 1990. The role of plant genotype, environment and gender in resistance to a specialist chrysomelid herbivore. *Oecologia*, 84:111-116.
- Strauss, S.Y., J.K. Conner y S.L. Rush. 1996. Foliar herbivory affects floral implications for male and female fitness. *American Naturalist*, 147:1098-1107.
- Strauss, S.Y. y A.A. Agrawal. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution*, 14:179.
- Strauss, S.Y., J.K. Conner y K.P. Lehtilä. 2001. Effects of foliar herbivory by insects on the fitness of *Raphanus raphanistrum*: damage can increase male fitness. *American Naturalist*, 158:496-504.
- Uribe-Mú, C.A. y M. Quesada. 2006. Preferences, patterns and consequences of branch removal on the dioecious tropical tree *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) by the insect borer *Oncideres albomarginata* chamela (Cerambycidae). *Oikos*, 112:691-697.
- Uribe-Mú, C.A. 2006. Interacción entre el insecto barrenador *Oncideres albomarginata* chamela y su planta hospedera *Spondias purpurea*. Tesis PhD.
- Vallius, E. y V. Salonen. 2000. Effects of defoliation on male and female reproductive traits of a perennial orchid, *Dactylorhiza maculate*. *Functional Ecology*, 14:668-674.
- van Dam, N.M., L.W.M. Vuister, C. Bergshoeff, H. De Vos y E. Van der Meijden. 1995. The "raison d'être" of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent effect against generalist herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 21:507-523.
- van Dam, N.M., T.J. de Jong, Y. Iwasa y T. Kubo. 1996. Optimal distribution of defenses: are plants smart investors. *Functional Ecology*, 10:128-136.

- Vanderklein, D.W., y P.B. Reich. 1999. The effect of defoliation intensity and history on photosynthesis, growth and carbon reserves of two conifers with contrasting leaf lifespans and growth habits. *New Phytologist*, 144:121-132.
- Verdú, M., P. García-Fayos y G. Gleiser. 2004. Mites attack males of the sexually dimorphic tree *Acer opalus* more harmfully and more often. *Functional Ecology*, 18:592-597.
- Vivien, P., V.P. Thomson, S.A. Cunningham, M.C. Ball y A.B. Nicotra. 2003. Compensation for herbivory by *Cucumis sativus* through increased photosynthetic capacity and efficiency. *Oecologia*, 134:167-175.
- Waltz, S.A. 1984. *Comparative study of predictability, value, and defenses of leaves of tropical wet forest trees (Costa Rica)*. Ph. D. diss., University of Washington, Seattle.
- Waterman, P.G. y S. Mole. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.
- Watterson, J.J. y L.G. Butler. 1983. Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31:41-45.
- Weinig, C. 2003. Heterogeneous selection at specific loci in natural environments in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 165:321-329.
- White, T.C.R. 1984. The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia*, 63:90-105.
- Whitham, T.G. 1978. Habitat selection by *Pemphigus* aphids in response to resource limitation and competition. *Ecology*, 59:1164-1176.
- Wilson, T.C. y A.E. Hagerman. 1990. Quantitative determination of ellagic acid. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38:1678-1683.
- Wink, M. y O. Schimmer. 1999. *Modes of action of defensive secondary metabolites*. En: Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Wink, M. (ed). Sheffield, UK. Sheffield Academic Press. Pp. 17-133.
- Wise, M.J. y J.J. Cummins. 2006. Strategies of *Solanum carolinense* for regulating maternal investment in response to foliar and floral herbivory. *Journal of Ecology*, 94:629-636.
- Wold, E.N. y J.R. Marquis. 1997. Induced defense in white oak: Effects on herbivores and consequences for the plant. *Ecology*, 78:1356-1369.
- Wolfe, L. 1997. Differential herbivory and gall formation on males and females of *Neea psychotrioides*, a dioecious tree. *Biotropica*, 29:169-174.
- Yadava, V.L. 1986. A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. *Horticultural Science*, 21:1449-1495.
- Zangerl, A.R. y F.A. Bazzaz. 1992. *Theory and pattern in plant defense allocation*. En: Plant resistance to herbivores and pathogens. Fritz, R.S. y E.L. Simms (eds). University of Chicago Press, Chicago. Pp. 363-391.