

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y ANATÓMICA DE *Picea mexicana*
Martínez EN POBLACIONES NATURALES DE MÉXICO

POR:

DAVID HERNÁNDEZ SALINAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO FORESTAL

SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

MAYO DE 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y ANATÓMICA DE *Picea mexicana*
Martínez EN POBLACIONES NATURALES DE MÉXICO

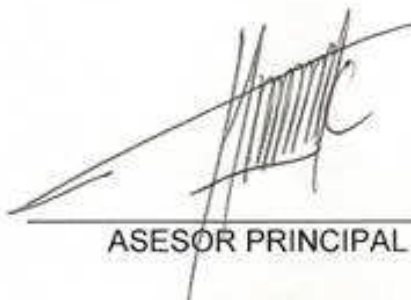
POR:

DAVID HERNÁNDEZ SALINAS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO FORESTAL



ASESOR PRINCIPAL



Coordinador
División de Agronomía



COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE
AGRONOMÍA

M.C. CELESTINO FLORES LÓPEZ

DR. MARIO ERNESTO VÁZQUEZ BADILLO

SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

MAYO DE 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO FORESTAL

VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y ANATÓMICA DE *Picea mexicana*
Martínez EN POBLACIONES NATURALES DE MÉXICO

POR:

DAVID HERNÁNDEZ SALINAS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO FORESTAL

APROBADA:



ASESOR PRINCIPAL

M.C. CELESTINO FLORES LÓPEZ

ASESOR



M.C. SALVADOR VALENCIA MANZO

DEPARTAMENTO FORESTAL
ASESOR

M.C. LAURA MARIA GONZALEZ MÉNDEZ

SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

MAYO DE 2009

Esta tesis ha sido apoyada por el Proyecto de Investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro con clave 02.03.0207.2385 a cargo del M.C. Celestino Flores López.

DEDICATORIA

A mis padres

Jesús Hernández Vásquez y María Salinas Zárate por darme la vida, y por sus sabios consejos para forjar de mi una persona de bien.

A mis hermanos

Humberto, José, Gerardo, Paulino, Germán y Jesús por el apoyo económico y moral incondicional que me brindaron en mi estancia en la Universidad, y a lo largo de mi vida.

A mi novia

Rocío por darme la oportunidad de compartir alegrías y tristezas a su lado, y por sus consejos para salir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir, y haber nacido en una familia humilde, para aprender a valorar la vida, así como a la Virgen de Juquila por permitirme llegar a esta etapa que es uno de los grandes anhelos de mi vida.

A mi *Alma Mater* la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por abrirme sus puertas para la culminación de mis estudios.

Al M. C. Celestino Flores López por darme la oportunidad y confianza para realizar este trabajo, así como por los conocimientos que me aportó, sin dejar atrás su amistad y apoyo incondicional.

Al M. C. Salvador Valencia Manzo por su amistad, consejos compartidos, y por la revisión rápida y precisa de este trabajo.

A M.C. Laura María González Méndez, por la revisión y contribuciones para la mejora de este trabajo.

Al Departamento Forestal que formó parte de mi formación académica, tanto a los maestros como a todo el personal que en él laboran.

Al Departamento de Botánica, por permitirme realizar los trabajos de laboratorio, en especial a la T. L. Q. Angélica Martínez Ortiz, por su amistad, confianza y apoyo durante la realización de las técnicas de laboratorio.

Para Juan Carlos Méndez por su ayuda en la elaboración del mapa de este trabajo.

A mis compañeros de la generación CVI, por su amistad.

A todas aquellas personas que participaron directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo.

SINCERAMENTE GRACIAS...

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo	5
2 MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1 Descripción del área de estudio	6
2.1.1 Localización	6
2.1.2 Aspectos ecológicos	6
2.2 Obtención de las muestras botánicas	9
2.3 Variables evaluadas	9
2.3.1 Variables morfológicas de acículas	10
2.3.2 Variables anatómicas de acículas	11
2.3.3 Variables morfológicas de conos	12
2.3.4 Variables morfológicas de semillas	12
2.4 Análisis estadístico	14
2.4.1 Verificación de normalidad	14
2.4.2 Estadísticas descriptivas.	14
2.4.3 Análisis de varianza y estimación de los componentes de varianza	14
2.4.4 Análisis multivariado	15
3 RESULTADOS	16
3.1 Normalidad	16
3.2 Comparación entre poblaciones	16
3.3 Componentes de varianza	18
3.4 Componentes principales	21

3.4	Análisis canónico discriminante	22
4	DISCUSIÓN	27
4.1	Comparación entre poblaciones	27
4.2	Componentes de varianza	28
4.3	Análisis multivariado	30
5	CONCLUSIONES	32
6	RECOMENDACIONES	33
7	LITERATURA CITADA	34
	APÉNDICE	39

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Localización de <i>Picea mexicana</i> Martínez en los estados de Chihuahua, Nuevo León y Coahuila, México.	6
Cuadro 2. Prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de separación de medias entre las tres poblaciones naturales de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	18
Cuadro 3. Estimación de los componentes de varianza entre y dentro de las poblaciones de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	20
Cuadro 4. Correlaciones de variables con componentes principales de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	22
Cuadro 5. Distancia al cuadrado de Mahalanobis entre las poblaciones de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución actual <i>Picea mexicana</i> Martínez en México.	7
Figura 2. Características morfológicas de acículas de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	10
Figura 3. Estomas en la sección lineal de 1mm en <i>Picea mexicana</i> Martínez. ...	10
Figura 4. Características anatómicas en la sección transversal de acículas de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	11
Figura 5. Características morfológicas del cono de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	13
Figura 6. Características morfológicas de escamas y semillas de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	13
Figura 7. Frecuencia de canales resiníferos en las tres poblaciones de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	19
Figura 8. Gráfica que muestra los valores de los componentes 1 y 2 de las tres poblaciones de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	23
Figura 9. Gráfica que muestra los valores de los componentes 1 y 3 de las tres poblaciones de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	24
Figura 10. Gráfica que muestra los valores de dos funciones canónicas y los centroides de las tres poblaciones de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	26

RESUMEN

Se estudiaron las tres poblaciones naturales conocidas de *Picea mexicana* Martínez con la finalidad de determinar la magnitud de la variación morfológica y anatómica entre y dentro de las poblaciones, así como los patrones de similitud.

El tamaño de muestra fue diferente entre poblaciones y entre variables. Los árboles se seleccionaron a lo largo y ancho del rodal con distanciamiento variado de acuerdo al tamaño del rodal, tratando que fueran representativos, las muestras fueron colectadas de árboles maduros. Se evaluaron cinco variables morfológicas y cinco anatómicas de acículas, así como seis variables morfológicas de conos y cuatro de semillas. Para cada una de las variables se realizó la verificación de normalidad, se obtuvieron los valores de tendencia central y de dispersión, se desarrolló un análisis de varianza y uno de componentes de varianza considerando un modelo de efectos mixtos. También se realizaron análisis multivariado de componentes principales y canónico discriminante, para caracterizar a las poblaciones.

El análisis de varianza mostró que en 10 de las variables analizadas la población El Coahuilón es muy parecida a El Mohinora. Por otra parte, las variables que ayudan más a diferenciar las poblaciones, son el número de hileras de estomas en el haz, el largo del cono y grosor de la escama, debido a que en las tres poblaciones se encontraron diferencias, y las que no son significativas son las características anatómicas de acículas excepto la frecuencia de canales resiníferos. El análisis de componentes indica que los tres primeros componentes explican el 61% de la varianza total, además caracterizan a La Marta con los conos y semillas más grandes. Con respecto al análisis canónico discriminante se encontró que la población El Mohinora presenta mayor distancia de Mahalanobis con respecto a la población de La Marta, no así para la población El Coahuilón, además se demostró que existen diferencias morfológicas y anatómicas entre las poblaciones.

Palabras clave: *Picea mexicana*, variación morfológica, anatomía.

ABSTRACT

Three known natural populations of *Picea mexicana* Martínez were studied for the purpose of determining the magnitude of the anatomical and morphological variation among and within populations, and the patterns of similarity.

The sample size was different between populations and variables. The trees were selected throughout the stand and the distance between trees varied according to the size of the stand, trying to be representative, the samples were collected from mature trees. five morphological variables and five anatomical variables of needles were evaluated, also six morphological cone and four seeds variables. For each of the variables the normality was verified, was obtained the values of central tendency and dispersion, was developed an analysis of variance and a variance components considering a mixed effects model. Were also performed multivariate analysis of principal components and canonical discriminant to characterize the populations.

The variance analysis showed that in 10 of the variables analyzed El Coahuilón population is very similar to El Mohinora. Moreover, the variables that help to differentiate populations are the number of rows of stomata on the face, length of cone and thickness of the cone scale, because in the three populations was different, and the anatomical characteristics of needles not are significant except the frequency of resin ducts. Components analysis indicated that the first three components explain 61% of the total variance, also characterize the Marta with larger cones and seeds. With respect to the canonical discriminant analysis found that The Mahalanobis distance is larger between El Mohinora and La Marta, not for El Coahuilón, also showed that there are morphological and anatomical differences between populations.

Keywords: *Picea mexicana*, morphological variation, anatomy.

1 INTRODUCCIÓN

Las diferencias entre árboles son el resultado de tres factores, los diferentes ambientes en los cuales crecen, las diferencias genéticas entre árboles y las interacciones existentes entre el genotipo de los árboles y los ambientes en los cuales éstos crecen. La variación en los árboles forestales puede agruparse en varias categorías que pueden ser entre especies, entre orígenes geográficos (procedencias), entre sitios, entre rodales, entre árboles individuales, y dentro de árboles (Zobel y Talbert, 1988).

La variación entre especies, entre poblaciones de diferentes procedencias y entre individuos dentro de una población se puede utilizar en un programa de mejoramiento genético, porque tienen como meta aumentar la frecuencia de los mejores genotipos y/o producir genotipos nuevos con mejores combinaciones de genes (Nienstaedt, 1990).

La variación dentro de las especies es importante, ya que determina la manera en que se aprovechan y se conservan estos recursos. Si hay pocas diferencias entre poblaciones, la pérdida de cualquier población no es tan grave debido a que no se pierde una unidad genética única. Por otra parte, si las poblaciones son muy diferenciadas, cada una representa un recurso único y se tendrá que mantener más poblaciones en programas de conservación y mejoramiento (Furnier, 2004).

La variación entre los árboles causada por diferencias ambientales con frecuencia no puede predecirse, pero algunos factores ambientales que afectan el crecimiento del árbol se pueden controlar y manipular, pero con otros no es posible hacerlo, así se tiene que los factores internos y ambientales controlan la variación. El factor interno (genotipo) tiene los genes que determinan las propiedades hereditarias de un individuo. El fenotipo, por otro lado, es el tipo de árbol en cuanto a sus características sensibles, apreciables directamente por sentidos (Zobel y Talbert, 1988; Nienstaedt, 1990).

Existe una variedad de métodos para medir la variación genética en plantas, desde las medidas de la morfología (botánicas-taxonómicas, las morfoagronómicas y las evaluativas como respuesta a factores bióticos y abióticos), hasta los que requieren técnicas de laboratorio como los marcadores moleculares (Hidalgo, 2003; Furnier, 2004).

La manera más fácil de medir los niveles y patrones de variación genética es medir directamente la morfología en campo. Simplemente se mide uno o más caracteres en el campo y se analiza la variación. Este método es relativamente barato, rápido, y sencillo, pero sufre el problema de que la variación genética está confundida con la variación ambiental. Sin embargo, hay algunos caracteres que son poco afectados por el ambiente. Una de las opciones que se tienen es plantar genotipos diferentes (por medio de semillas o propágulos vegetativos) en un solo sitio con un ambiente uniforme, lo que se conoce como ensayo de procedencias y prueba de progenie. Así todos los genotipos experimentan el mismo ambiente y cualquier diferencia que se observa entre las plantas es debida principalmente a diferencias genéticas (Furnier, 2004).

Los marcadores moleculares ayudan a describir la variabilidad del germoplasma de una especie; la variabilidad o polimorfismo de estos marcadores puede ser usado en los diferentes estudios sobre la diversidad genética de las especies vegetales y su herencia puede ser monitoreada. Los grandes grupos de marcadores moleculares reconocidos son: (1) las proteínas, que pueden ser de reserva o almacenamiento, y las isoenzimas o aloenzimas que son formas diferentes de una enzima que comparten una misma actividad; y (2) el ADN (Ácido desoxirribonucleico) cuyas diferencias en las secuencias, principalmente de fragmentos, se presentan por poliformismos o variabilidad (Hidalgo, 2003).

Sin embargo, la importancia de la variación morfológica radica en que las plantas en su estado natural tienen una dinámica evolutiva y están continuamente produciendo variabilidad. Tanto la variabilidad visible como la no-visible han sido usadas por el

hombre para identificar, estudiar y utilizar las especies vegetales. Así, mediante la identificación de características claves como colores, formas, olores y texturas es posible inferir sobre los usos potenciales de una especie en particular (Hidalgo, 2003).

En México se han realizado diversos estudios morfológicos y anatómicos, para conocer la variación entre poblaciones. La mayoría de los estudios revisados ha sido en especies del género *Pinus* y muy pocos en otras especies de coníferas. Las especies en las que se tiene referencia de este tipo de estudios son *Pinus arizonica* Engelm. (Rodríguez, 1996; Rodríguez y Capó, 2005), *P. cembroides* Zucc. (Muñoz, 1995; Sánchez *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006), *P. chiapensis* (Martínez) Andresen (Hernández, 1986), *P. greggii* Engelm. (Beristáin, 1992; Cornejo, 1992), *P. hartwegii* Lindl. (Iglesias y Tivo, 2006), *P. maximartinezii* Rzedowski (García, 1986), *P. oaxacana* Mirov (Aparicio-Rentería *et al.*, 2002), *P. patula* Schl. *et* Cham. (Castillo *et al.*, 2004), *P. pseudostrobus* Lindl. (Márquez y Mendizábal, 2004) y *Pseudotsuga* sp. (Santos, 1998; Reyes *et al.*, 2005).

La mayoría de los estudios antes mencionados se basan en características de acículas, conos y semillas. En acículas se ha evaluado el largo, ancho y número de acículas por fascículo, longitud de acículas mayores y menores, longitud del fascículo y largo de la vaina, así como el número de estomas en diferentes caras, aristas y secciones y número de hileras de estomas en la cara ventral y dorsal. También se han evaluado características anatómicas de acículas como el número, posición y orientación de canales resiníferos y distribución de haces vasculares. Con respecto a conos se ha evaluado el largo, ancho, grueso, peso, color, forma, fragilidad y número de conos por verticilo, además se han incluido variables de escamas como longitud, ancho, grueso, y número de escamas bien desarrolladas. En semillas se ha incluido largo, ancho, grosor, peso, número de semillas por kilogramo, número de semillas de los conos, longitud y ancho del ala.

En el caso de la especie de interés en este estudio, *Picea mexicana* había sido considerada una especie norteamericana, debido a su semejanza con *Picea*

engelmannii Parry en la ausencia de canales resiníferos y en las ramillas pubescentes, pero un análisis minucioso comparativo demostró que se trataba de una nueva especie a la que se nombró *Picea mexicana* (Martínez, 1961). Posteriormente se realizaron estudios desde el punto de vista biosistemático de *Picea*. Las muestras fueron analizadas usando características químicas y morfológicas, llegando a la conclusión que *Picea mexicana* era una variedad de *Picea engelmannii* (Taylor y Patterson, 1980; Taylor *et al.*, 1994). Recientemente se compararon muestras de *Picea* mediante isoenzimas y llegaron a la conclusión que *Picea engelmannii* ni siquiera estaba cerca de *Picea mexicana* y que las piceas de Cerro El Mohinora en Chihuahua, son claramente *Picea mexicana* y no híbridos de *Picea chihuahuana* Martínez o de *Picea pungens* Engelm. (Ledig *et al.*, 2004).

En los estados de Coahuila, Chihuahua y Nuevo León, *Picea mexicana* es de un gran valor científico y ecológico porque aquí son las únicas entidades del país y del mundo donde existen poblaciones naturales, y además por ser una especie en peligro de extinción (SEMARNAT, 2003).

En *Picea mexicana* se han realizado estudios morfológicos que describen a dos poblaciones (Taylor y Patterson, 1980; Prieto, 1992; Taylor *et al.* 1994). Pero la población El Coahuilón que se encuentra localizada en Coahuila, no está descrita morfológicamente, por lo que es necesario evaluar las tres poblaciones naturales e incluir variables como: el diámetro del haz vascular, el diámetro y posición de los canales resiníferos que han sido utilizadas para diferenciar especies americanas del género *Picea* (Weng y Jackson, 2000), así como otras variables que han sido utilizadas para caracterizar especies de coníferas, como el número de hileras de estomas en la parte media del haz de las acículas y el envés, así como el número de estomas en un milímetro de longitud sobre el haz de las acículas (Beristáin, 1992; Reyes *et al.*, 2005).

1.1 Objetivo

Determinar la magnitud de la variación de 20 variables morfológicas y anatómicas de acículas conos y semillas entre y dentro de las tres poblaciones naturales de *Picea mexicana* en México.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción del área de estudio

2.1.1 Localización

Las poblaciones La Marta y El Coahuilón (Cuadro 1, Figura 1) se encuentran en la Sierra de Arteaga, pertenecientes a los municipios de Rayones, N. L. y Arteaga, Coah. (Ledig *et al.*, 2000; Ledig *et al.*, 2002), dentro de la región hidrológica ARH 37, perteneciente a El Salado (SPP, 1981; SPP, 1998).

La población El Mohinora (Cuadro 1, Figura 1) corresponde al nombre del cerro más alto ubicado al suroeste de Chihuahua, perteneciente a la provincia fisiográfica Sierra Madre Occidental, específicamente en la subprovincia gran meseta y cañones duranguenses. Forma parte importante de la región Hidrológica 010 Sinaloa y proveedor del agua potable que se consume en el poblado de Guadalupe y Calvo (CONANP, 2005).

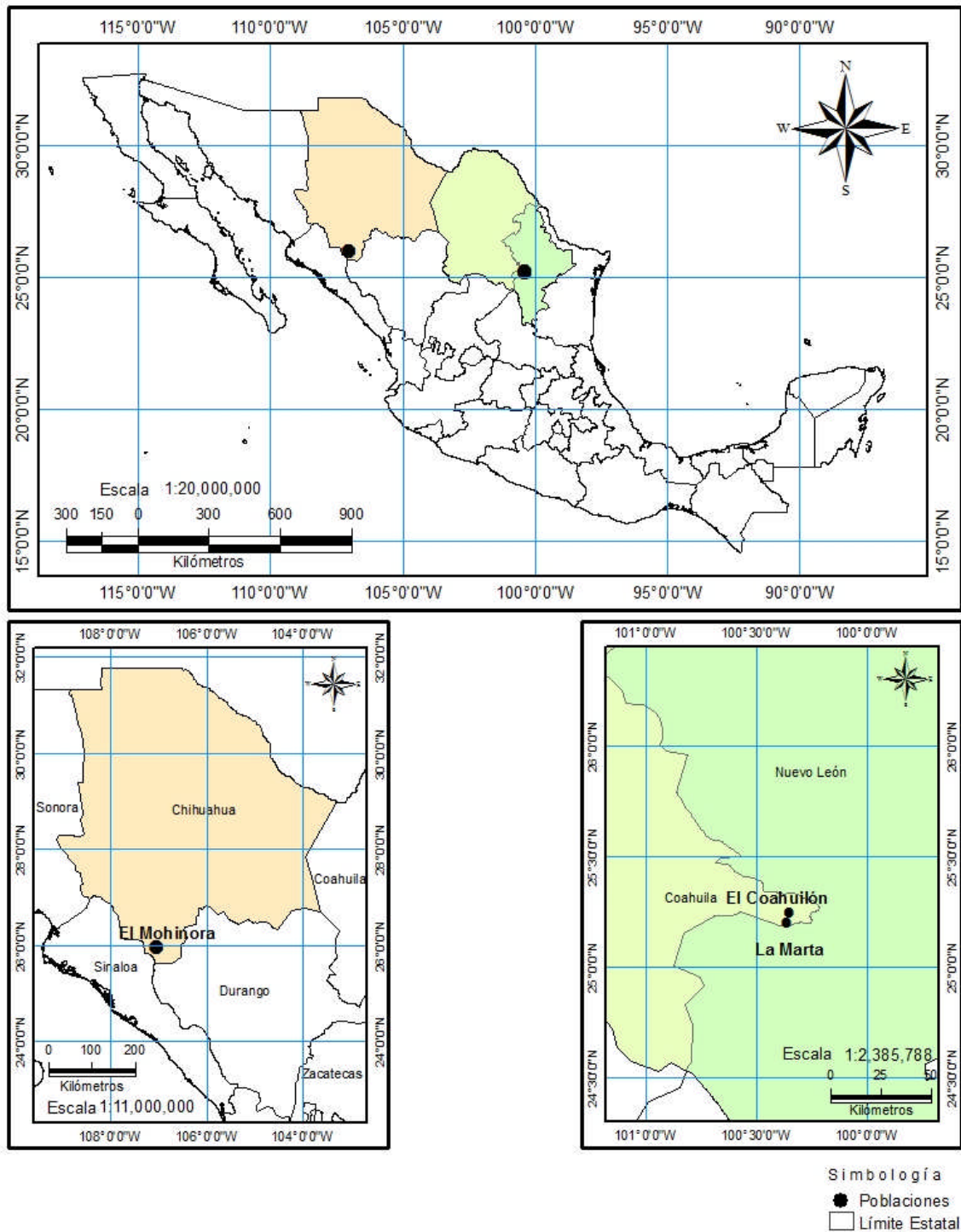
Cuadro 1. Localización de *Picea mexicana* Martínez en los estados de Chihuahua, Nuevo León y Coahuila, México.

Población	Propiedad	Municipio	Coordenadas	Altitud (msnm)
Sierra La Marta	Propiedad privada: Familia Sánchez de la Peña	Rayones, Nuevo León	25° 11.9'N 100° 21.8'W	3500
Sierra El Coahuilón	Ejido Nuncio	Arteaga, Coahuila	25° 14.8'N 100° 21.2'W	3470
El Mohinora	Propiedad privada: El Venadito	Guadalupe y Calvo, Chihuahua	25° 57.7'N 107° 02.4'W	3185

Fuente: Ledig *et al.*, 2000; Ledig *et al.*, 2002.

2.1.2 Aspectos ecológicos

Para describir el clima de las localidades se tomó como referencia la estación climática más cercana al área de estudio. En las poblaciones de La Marta



Fuente: Coberturas tomadas de CONABIO, 2005.

Figura 1. Distribución actual de *Picea mexicana* Martínez en México.

y El Coahuilón, se usó como referencia la estación de San Antonio de las Alazanas que presenta una temperatura media anual de 12.7° C, y una precipitación media anual de 470.6 mm, las heladas se pueden presentar en cualquier época del año, pero son más recurrentes en octubre, noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo, con temperaturas extremas de hasta -8° C, el mes más cálido se presenta antes de junio y con una fórmula climática Cx´b(e´)g que corresponde a un clima templado, subhúmedo con lluvias escasas todo el año, verano fresco largo y muy extremo, (Mendoza, 1983).

Para describir la población El Mohinora se usó como referencia la estación de Guadalupe y Calvo que presenta una temperatura media anual de 13° C y una precipitación media anual de 1083.4 mm y con una fórmula climática Cb(w2)(x´)(e) que corresponde a un clima templado húmedo con verano fresco, extremo, con lluvias escasas todo el año, con (García, 1987).

La Marta y el Coahuilón presentan rocas mesozoicas de origen sedimentario marino de tipo calizas, lutitas y areniscas, con un tipo de suelo litosol, rendzina y regosol eútrico, con textura media (SPP, 1981; SPP, 1983), mientras que la población del Cerro El Mohinora presenta rocas de tipo ígneas y sedimentarias, con un tipo de suelo litosol, regosol eútrico y feozem háplico, con fase física lítica, con textura media (INEGI, 1988; CONANP, 2005).

En la población La Marta, el tipo de vegetación que existe es un bosque constituido por tres estratos. El arbóreo lo componen *Pseudotsuga flahualti* Flous, *Pinus hartwegii* Lindl., *Abies vejari* Martínez, *Pinus ayacahuite* C. Ehrenb. ex Schltdl y *Picea mexicana* Martínez. El arbustivo lo integran *Quercus pungens* Liebm., *Q. Emory* Torr., *Q. hypoxantha* Trel., *Arbutus xalapensis* Kunth, *Cercocarpus mojadensis* C.K.Schneid, *Yucca carnerosana* (Trel.) McKelvey, *Gymnisperma glutinosum* (Spreng.) Less. y *Dasylirium* sp. Y el estrato herbáceo lo constituyen *Bromus* sp., *vulpia octaflora* (Walter) Rydberg, *geranium mexicanum* Kunth. e *Hibiscus cardiophyllus* A. Gray (Cornejo, 1987).

Para el caso de El Coahuilón, la vegetación está constituida por un chaparral secundario con renuevos y relictos de *Abies* sp., *Pseudotsuga macrolepis* Flous y *Picea mexicana* Martínez (Braham, 1995).

El Cerro El Mohinora presenta vegetación dominada por bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque de encino, bosque de encino-pino, bosque de *Abies-Pseudotsuga*, bosque de *Abies* y bosque de *Abies-Picea*, donde la vegetación dominante está constituida por: *Picea mexicana*, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *Populus tremuloides* Michx., *Abies durangensis* Martínez, *Pinus cooperi* Blanco, *Pinus ayacahuite* C. Ehrenb. ex Schldl. var. *brachyptera* Shaw y *P. arizonica* Engelm (CONANP, 2005; Vega y Flores, 2008).

2.2 Obtención de las muestras botánicas

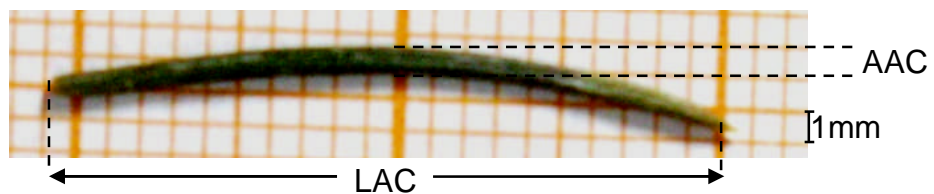
La recolección del material vegetativo se realizó en las tres poblaciones naturales donde se distribuye *Picea mexicana*, el tamaño de muestra (número de árboles) fue diferente entre poblaciones y entre variables, para acículas fue de 32-33, para conos de 25-30 y para semillas de 9-28, debido a que no todos los árboles tenían presencia de conos, y no todos los conos tenían semillas. Los árboles se tomaron a lo largo y ancho del rodal con distanciamiento variado de acuerdo al tamaño del rodal, tratando que fueran representativos del rodal, las muestras fueron colectadas de árboles maduros arriba de 15 cm de diámetro normal, con evidencias de conos desarrollados. Se colectaron conos del último tercio de la copa del árbol en las cuatro exposiciones, además se colectaron cuatro ramillas terminales que tuvieran por lo menos acículas de un año de edad, correspondientes a las cuatro exposiciones del árbol.

2.3 Variables evaluadas

Las variables morfológicas y anatómicas seleccionadas para este estudio se basaron en los trabajos de Taylor y Patterson (1980), Weng y Jackson (2000) y Reyes *et al.* (2005).

2.3.1 Variables morfológicas de acículas

Se muestrearon diez ramillas por árbol, de cada una de ellas se tomó la acícula más larga y se midió el largo (LAC) y ancho (AAC) calculándose la media para cada árbol (Figura 2).



LAC= Largo de acícula; AAC= Ancho de acícula.

Figura 2. Características morfológicas de acículas de *Picea mexicana* Martínez.

Después las acículas fueron sometidas a una rehidratación utilizando alcohol etílico al 70% durante 24 horas, posteriormente se evaluó el número de hileras de estomas en la parte media del haz (NHEH) y envés (NHEE) y el número de estomas (NE1M) se evaluó en la parte media de la hoja en una sección lineal de 1mm (Figura 3).

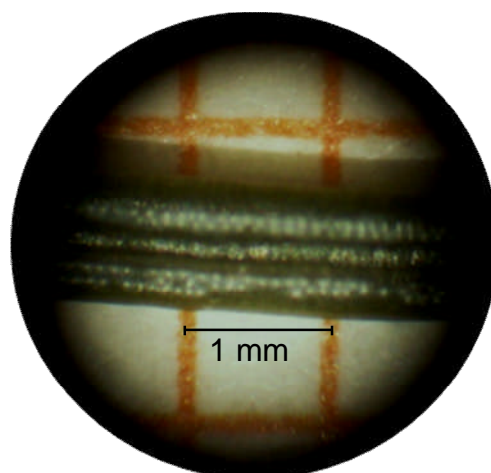
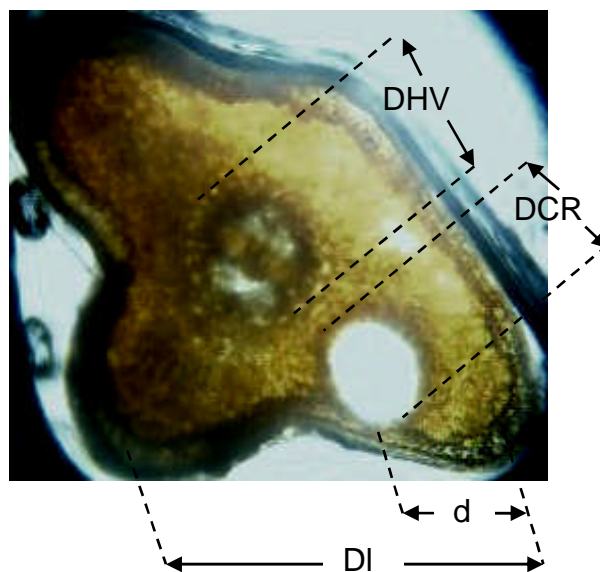


Figura 3. Estomas en la sección lineal de 1mm en *Picea mexicana* Martínez.

2.3.2 Variables anatómicas de acículas

Para el caso de la anatomía, una vez rehidratadas las acículas se efectuaron cortes transversales. Cada corte fue colocado en un portaobjeto, con una gota de ácido láctico para facilitar la visibilidad de las estructuras de interés. Las preparaciones temporales se hicieron utilizando un sellador (barniz) alrededor del cubreobjetos.

En la sección transversal de la hoja (Figura 4) se evaluó el número de canales resiníferos (NCR), el tamaño y posición de los canales resiníferos. Se midió el diámetro del ducto del canal resinífero (DCR) así como el diámetro del haz vascular incluyendo las células epiteliales (DHV) (se midieron en micras, μ). En el lado de la posición del canal se tomó la longitud lateral al lado de la posición del canal resinífero (DI) y la distancia desde la esquina lateral (ángulo) al centro del canal resinífero (d).



DHV= Diámetro del haz vascular incluyendo sus células epiteliales; DCR= Diámetro del canal resinífero; d= Distancia desde la esquina lateral (ángulo) al centro del canal resinífero; DI= Longitud lateral al lado de la posición del canal resinífero.

Figura 4. Características anatómicas en la sección transversal de acículas de *Picea mexicana* Martínez.

En el análisis de las hojas se revisó la continuidad de los canales resiníferos, seccionando una acícula aleatoria por árbol a cada milímetro (mm), y clasificándola en grados de continuidad o discontinuidad.

Para rectificar el número de canales resiníferos (NCR), el tamaño y posición de éstos se realizó el procedimiento para la preparación permanente del corte transversal de las acículas, que consistió en fijación, deshidratación, inclusión en parafina, microtomía, extensión de los cortes con la técnica del adhesivo de Haupt, tinción de la doble coloración, preparación y sellado de la muestra permanente, de acuerdo con López *et al.* (2005), Gaviño *et al.* (1979) y las modificaciones correspondientes de la T.L.Q. Angélica Martínez Ortiz del Laboratorio de Anatomía e Histología Vegetal del Departamento de Botánica de la UAAAN. Dichos procedimientos se detallan en el Apéndice 1.

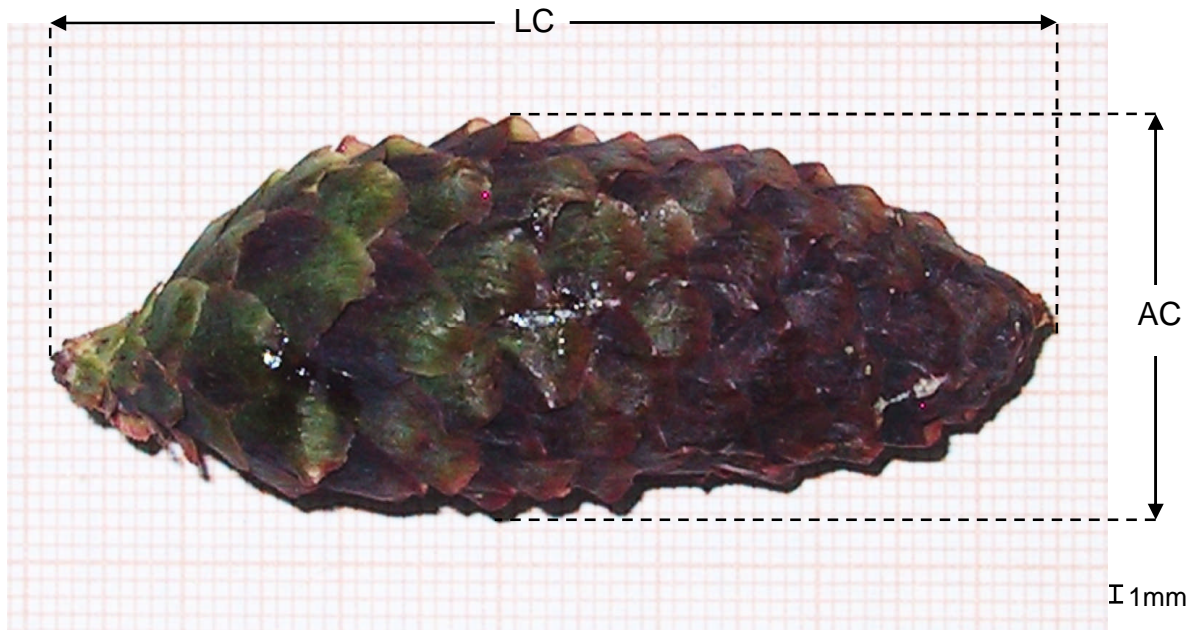
2.3.3 Variables morfológicas de conos

Se evaluaron 10 conos por árbol. Las características del cono fueron medidas con escamas cerradas, midiendo longitud del cono (LC), y el diámetro más ancho del cono (AC) como se observa en la Figura 5. Estas variables fueron medidas con un vernier con aproximación a 0.01mm.

De cada cono se midieron 10 escamas, de cada una de ellas se evaluó largo (LAE), ancho (AE), grosor (GRE) y longitud de la escama libre (LEL) en milímetros, con la ayuda del vernier (Figura 6a).

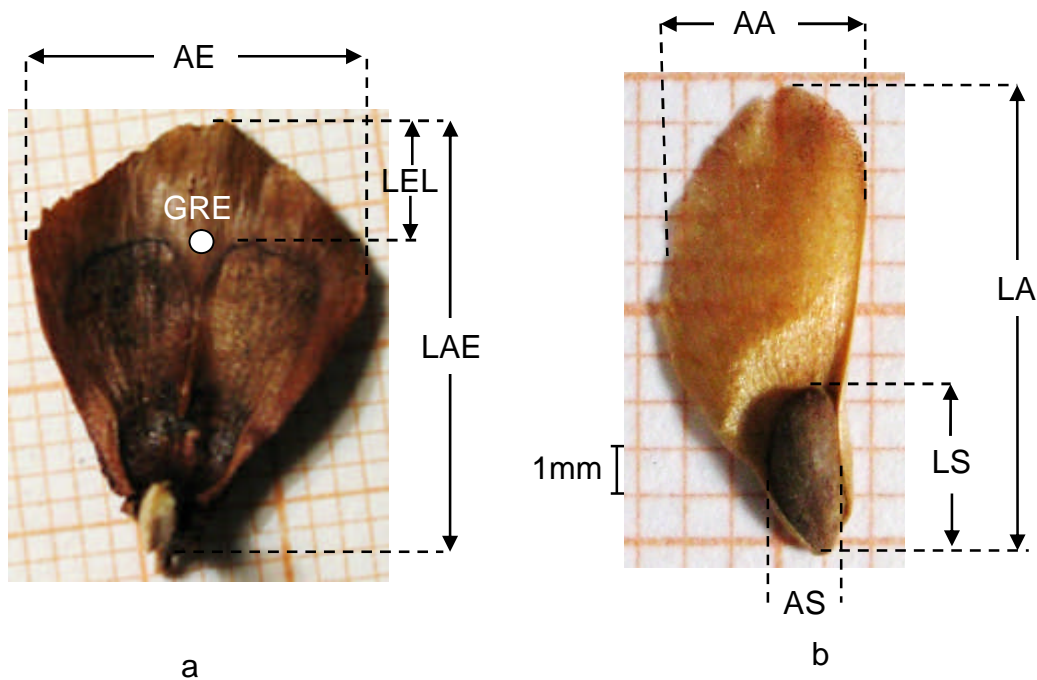
2.3.4 Variables morfológicas de semillas

Se evaluaron 20 semillas por árbol, seleccionadas al azar, las variables fueron longitud de semilla (LS), ancho de semilla (AS), longitud del ala con semilla (LA), y ancho del ala (AA) (Figura 6b). Estas variables también fueron medidas con vernier y 0.01mm de precisión.



LC= Longitud del cono; AC= Ancho del cono.

Figura 5. Características morfológicas del cono de *Picea mexicana* Martínez.



a. Escama; b. Semilla; LAE= Largo de escama; AE= Ancho de la escama; GRE= Grosor de escama; LEL= Longitud de la escama libre; LS= Longitud de semilla; AS= Ancho de semilla; LA= Longitud del ala con semilla; AA= Ancho del ala.

Figura 6. Características morfológicas de escamas y semillas de *Picea mexicana* Martínez

2.4 Análisis estadístico

2.4.1 Verificación de normalidad

Debido a que existen características morfológicas y anatómicas consideradas como variables binarias y discretas, así como continuas se realizó una prueba de normalidad para cada una de las variables utilizando como apoyo el diagrama de árbol y el diagrama de caja (Hines y Montgomery, 1996), la gráfica de probabilidad normal, asimetría, Kurtosis y la prueba de normal de Kolmogorov-Smirnov (Zar, 1984). Para las variables binarias y discretas se utilizaron las transformaciones de Box y Cox (1964), que consisten en elevar los valores a un lambda (λ) para normalizarlas.

2.4.2 Estadísticas descriptivas

Con el propósito de caracterizar las poblaciones, para cada variable se presentó un cuadro con los valores de tendencia central y dispersión de las características morfológicas y anatómicas de cada una de las poblaciones. La medida de tendencia central es la media y las medidas de dispersión son error estándar, valores mínimos y máximos y coeficiente de variación con el propósito caracterizar las poblaciones (Infante y Zárate de Lara, 1990).

2.4.3 Análisis de varianza y estimación de los componentes de varianza

Con los propósitos de conocer la variación entre y dentro de poblaciones se realizaron análisis de varianza (ANVA) considerando un modelo de efectos mixtos con muestras de clasificación jerárquica o muestreo anidado, considerando únicamente a las poblaciones y a los árboles dentro de ellas. Cuando hubo diferencias con el ANVA se procedió a realizar la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de separación de medias y con el apoyo de Proc Mixed de SAS se estimaron los componentes de varianza de acuerdo al siguiente modelo (Snedecor y Cochran, 1981; Sit, 1995; Littell *et al.*, 1996).

Modelo

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + A_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor observado de la característica en la k-ésima muestra del j-ésimo árbol en la i-ésima localidad.

μ = Valor promedio de la característica.

L_i = Efecto aleatorio de la i-ésima población.

$A_{j(i)}$ = Efecto aleatorio del j-ésimo árbol dentro de la i-ésima población.

$\varepsilon_{k(ij)}$ = Error aleatorio de muestreo dentro de árboles.

2.4.4 Análisis multivariado

Se realizaron dos tipos de análisis, primero el de componentes principales con el apoyo del programa SAS y utilizando el procedimiento Proc Princomp con el propósito de examinar las relaciones de las variables cuantitativas y examinar los datos con la posibilidad de reducir el número de las variables respuesta, también se graficaron los primeros componentes mediante un diagrama de dispersión (SAS Institute Inc., 1988) y después se realizó el análisis canónico discriminante usando Proc Candisc con la finalidad de contrastar la hipótesis de que las medias de las poblaciones de un conjunto de variables independientes para dos o más poblaciones son iguales, de la misma forma se realizó una gráfica con las funciones canónicas (SAS Institute, 1988; Hair *et al.*, 1999; Johnson, 2000).

3 RESULTADOS

3.1 Normalidad

De acuerdo con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (D calculada) realizada para todas las variables, resultó que el número de hileras de estomas en el haz, grosor de la escama y longitud de semilla tienen un valor D superior al valor crítico de ajuste a un nivel de significancia de 0.05 ($D \geq D_{0.05,n}$), por lo tanto no presentan normalidad, mientras que las demás variables analizadas son de forma normal, y la mayoría de los valores de asimetría y kurtosis se encuentran dentro del rango -0.5 a 0.5 (Martínez, 2007) (Apéndice 2).

A las variables que no presentaron normalidad se les realizó una transformación mediante el procedimiento de Box y Cox (1964). Para el número de hileras de estomas en el haz (NHEH) y el grosor de la escama (GRE) se utilizó un $\lambda=0.05$, mientras que para la longitud de semilla (LS) se utilizó un $\lambda=2$. Se usaron estos valores de lambda porque fueron los valores óptimos para normalizar a las variables. Una vez normalizadas las variables se calcularon los valores de tendencia central y dispersión para cada una de las poblaciones (Apéndice 3).

3.2 Comparación entre poblaciones

Al realizar el análisis de varianza se encontró que para todas las características morfológicas existen diferencias estadísticas significativas. Sin embargo en las variables anatómicas evaluadas no se encontraron diferencias significativas.

De acuerdo con la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de separación de medias, las variables morfológicas largo de acículas, número de estomas en un milímetro, número de hileras de estomas en el envés resultó que la población El Coahuilón y el Cerro El Mohinora son iguales. Mientras que para ancho de acículas La Marta y El Coahuilón son iguales, con las medias más altas que El Mohinora. Para la

variable número de hileras de estomas en el haz las tres poblaciones son diferentes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de separación de medias entre las tres poblaciones naturales de *Picea mexicana* Martínez.

Característica	Variable	Poblaciones		
		La Marta	El Coahuilón	El Mohinora
Acículas	LAC (mm)	20.24 a [†]	18.48 b	18.40 b
	AAC (mm)	1.05 a	1.03 a	0.99 b
	NHEH	5.44 c	6.58 a	6.09 b
	NHEE	4.03 b	4.68 a	4.88 a
	NE1M	42.16 b	51.77 a	49.59 a
	DHV (μ) [‡]	29.06	28.76	27.06
	DCR (μ) [‡]	17.61	17.79	13.83
	d (μ) [‡]	16.51	17.60	20.20
	DI (μ) [‡]	76.57	78.04	83.55
	Conos	LC (mm)	56.79 a	48.91 c
AC (mm)		20.94 a	18.97 b	20.17 a
AE (mm)		10.21 a	9.66 b	9.67 b
LAE (mm)		15.50 a	14.06 b	13.90 b
LEL (mm)		4.21 a	3.58 b	3.69 b
GRE (mm)		0.32 a	0.28 b	0.24 c
Semillas	LS (mm)	3.63 a	3.17 b	2.91 b
	AS (mm)	2.06 a	1.72 b	1.73 b
	LA (mm)	9.25 a	8.55 b	8.14 b
	AA (mm)	4.08 a	3.72 b	3.78 b

[†]: Promedios seguidos de la misma letra, en cada fila, no son diferentes estadísticamente, según la prueba DMS ($p \leq 0.05$).

[‡]: Características anatómicas de acículas.

LAC= Largo de acícula; AAC= Ancho de acícula; NHEH= Número de hileras de estomas en el haz; NHEE= Número de hileras de estomas en el envés; NE1M= Número de estomas en un milímetro; DHV= Diámetro del haz vascular incluyendo sus células epiteliales; DCR= Diámetro del canal resinífero; d= Distancia desde la esquina lateral (ángulo) al centro del canal resinífero; DI= Longitud lateral al lado de la posición del canal resinífero; LC= Longitud del cono; AC= Ancho del cono; LAE= Largo de escama; AE= Ancho de la escama; GRE= Grosor de escama; LEL= Longitud de la escama libre; LS= Longitud de semilla, AS= Ancho de semilla; LA= Longitud del ala con semilla; AA= Ancho del ala.

En las características anatómicas de acículas las cuatro variables analizadas (DCR, d, DI, DHV) resultó que no difieren entre poblaciones (Cuadro 2). Pero al momento de realizar las mediciones se notó la ausencia de canales resiníferos en algunas muestras, por lo que se decidió realizar un análisis de frecuencia por árbol en

cada una de las poblaciones. Este análisis muestra claramente que las poblaciones son diferentes en la frecuencia de canales resiníferos, ya que en El Coahuilón se nota más frecuencia de canales, La Marta con menor proporción y en El Mohinora son prácticamente nulos (Figura 7).

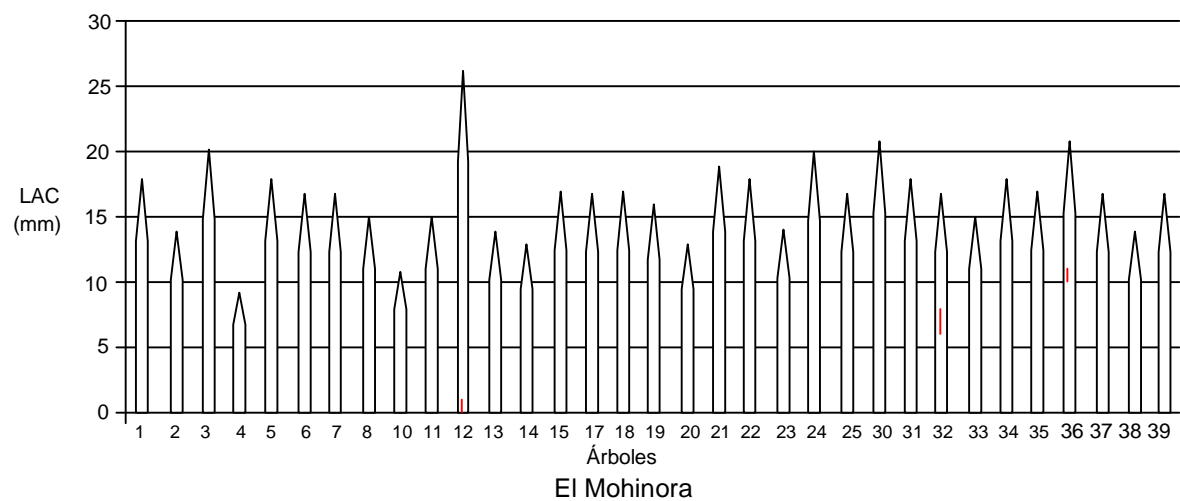
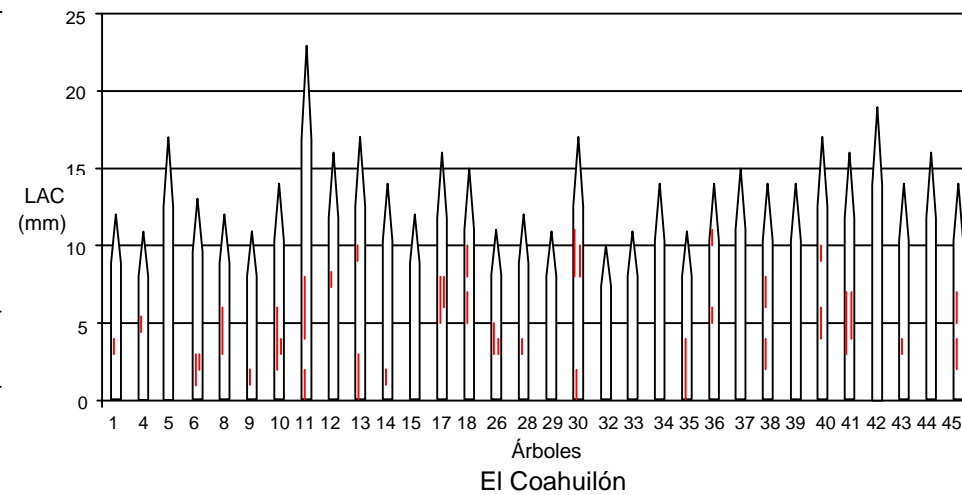
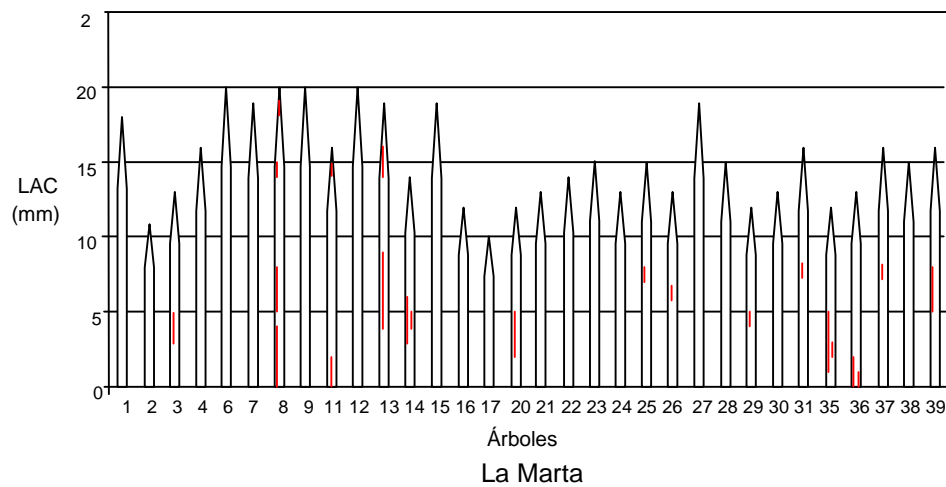
Respecto a conos las variables largo de escama, ancho de escama y longitud de la escama libre las poblaciones El Coahuilón y El Mohinora son iguales, pero con los valores de las medias más bajas que la población de La Marta. En ancho del cono La Marta es igual a la población El Mohinora, pero diferentes a El Coahuilón, para las variables largo del cono y grosor de la escama el análisis demostró que las tres poblaciones son diferentes y con la media más alta la población de La Marta (Cuadro 2).

En las variables longitud de semilla, ancho de semilla, longitud del ala con semilla y ancho del ala, la población La Marta es diferente a las otras dos poblaciones con el valor de la media más alta en todas las características analizadas para semillas (Cuadro 2).

En general, la población de El Coahuilón es muy parecida a El Mohinora, debido a que en 10 de las variables analizadas se encontraron similitudes. Mientras que sólo en la variable ancho de acículas son similares las poblaciones cercanas (La Marta y El Coahuilón). Las variables número de hileras de estomas en el haz, el largo del cono y grosor de la escamas ayudan más a diferenciar las poblaciones, porque en las tres poblaciones se encontraron diferencias. Las variables anatómicas de acículas no ayudan a diferenciar las poblaciones.

3.3 Componentes de varianza

En las variables morfológicas de acícula, la variación entre las poblaciones aporta de un 12% a 27% de la variación. En largo de acícula y número de estomas en 1mm la mayor variación es aportada por los árboles dentro de poblaciones. En ancho de acículas y número de hileras de estomas la mayor variación es aportada por las




LAC= Largo de acículas por árbol; = Representación de una hoja por árbol de *Picea mexicana* con presencia de canal resinífero.

Figura 7. Frecuencia de canales resiníferos en las tres poblaciones de *Picea mexicana* Martínez.

muestras dentro de árboles (error aleatorio), mientras que los árboles dentro de poblaciones no aportan a la variación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estimación de los componentes de varianza entre y dentro de las poblaciones de *Picea mexicana* Martínez.

Característica	Variable (Abreviatura)	Componentes de varianza %		
		Poblaciones	Árboles dentro de poblaciones	Muestras dentro de árboles
Acículas	Largo de acícula (LAC)	12.60	75.05	12.35
	Ancho de acícula (AAC)	12.17	0.00	87.83
	Número de hileras de estomas en el haz (NHEH)	26.88	0.00	73.12
	Número de hileras de estomas en el envés (NHEE)	21.14	0.00	78.86
	Número de estomas en 1 mm (NE1M)	18.37	80.81	0.82
	Diámetro del haz vascular (DHV) [†]	2.78	92.53	4.69
	Diámetro del canal resinífero (DCR) [†]	0.00	95.69	4.31
	Distancia desde la esquina lateral (ángulo) al centro del canal resinífero (d) [†]	0.00	95.57	4.43
	Longitud lateral al lado de la posición del canal resinífero (DI) [†]	0.00	99.45	0.55
	Conos	Largo del cono (LC)	25.59	72.63
Ancho del cono (AC)		25.02	52.16	22.81
Ancho de escama (AE)		9.39	30.09	60.52
Largo de escama (LAE)		30.23	34.85	34.92
Longitud de la escama libre (LEL)		23.85	0.19	75.96
Grosor de la escama (GRE)		43.93	0.00	56.07
Semillas	Longitud de semilla (LS)	55.19	35.82	9.00
	Ancho de semilla (AS)	45.30	0.00	54.70
	Longitud del ala con semilla (LA)	27.89	0.00	72.12
	Ancho del ala (AA)	25.98	0.00	74.02

[†]: Características anatómicas de acículas.

En las características anatómicas, la variación entre las poblaciones no contribuye a la variación total, ya que los árboles dentro de poblaciones aportan prácticamente casi el total de la variación (de un 92% a un 99%) (Cuadro 3).

En las variables morfológicas de conos, la variación entre las poblaciones aporta de un 9% a 43% de la variación total, en las variables largo y ancho de cono, la variación entre los árboles dentro de poblaciones aportan más a la variación. Para las variables

largo y ancho de escama, longitud de la escama libre y grosor de la escama la mayor variación es aportada por el error o las muestras dentro de árboles (Cuadro 3).

En las características morfológicas de semillas la variación entre poblaciones aportan de 25% a 55% de la variación total, mientras que la variación entre los árboles dentro de poblaciones no contribuyen a la variación excepto en longitud de semilla donde aporta un 35.8%. En las variables ancho de semilla, longitud y ancho de semilla el error aleatorio o muestras dentro de árboles aportan la mayor variación (Cuadro 3).

3.4 Componentes principales

El análisis muestra que los tres primeros componentes explican el 61% de la varianza total, 0.36%, 0.16% y 0.09% respectivamente (Apéndice 4). Las variables más correlacionadas positivamente con el primer componente fueron todas las características de conos y semillas, mientras que en el segundo componente fueron ancho de acículas, número de hileras de estomas en el haz y envés, asimismo número de estomas en un milímetro y diámetro del haz vascular. Para el tercer componente fueron ancho de acículas y largo de semilla, en forma negativa se correlacionan las variables ancho de cono y ancho de escama. El largo de acículas presenta correlación baja con los tres primeros componentes (Cuadro 4).

Al graficar los valores del componente 1 con los valores del componente 2 se muestran claramente que la Marta presenta los conos y semillas más grandes, por lo tanto son características que ayudan a separarla de las otras dos poblaciones (Figura 8). Mientras que al graficar el componente 1 con el 3, se puede observar que La Marta también se separa y además ayuda a separar a El Coahuilón del Mohinora, ya que El Coahuilón presenta semillas más largas y acículas más anchas respecto a El Mohinora (Figura 9). Sin embargo al graficar el componente 2 con el 3 no se aprecia una separación de las poblaciones, porque los valores están mezclados (Apéndice 5).

Cuadro 4. Correlaciones de variables con componentes principales de *Picea mexicana* Martínez.

Característica	Variable	Componente principal		
		1	2	3
Acículas	LAC	0.17	-0.01	0.22
	AAC	0.10	0.34 [†]	0.33 [†]
	NHEH	-0.21	0.47 [†]	0.11
	NHEE	-0.19	0.39 [†]	0.15
	NE1M	-0.18	0.43 [†]	0.04
	DHV	0.05	0.39 [†]	0.15
Conos	LC	0.28 [†]	0.17	-0.21
	AC	0.23 [†]	0.22	-0.36 [†]
	AE	0.27 [†]	0.26	-0.30 [†]
	LAE	0.32 [†]	0.13	-0.28
	LEL	0.26 [†]	0.09	-0.32 [†]
	GRE	0.25 [†]	0.05	0.06
Semillas	LS	0.33 [†]	-0.06	0.37 [†]
	AS	0.32 [†]	-0.07	0.28
	LA	0.32 [†]	0.00	0.27
	AA	0.31 [†]	-0.01	0.21

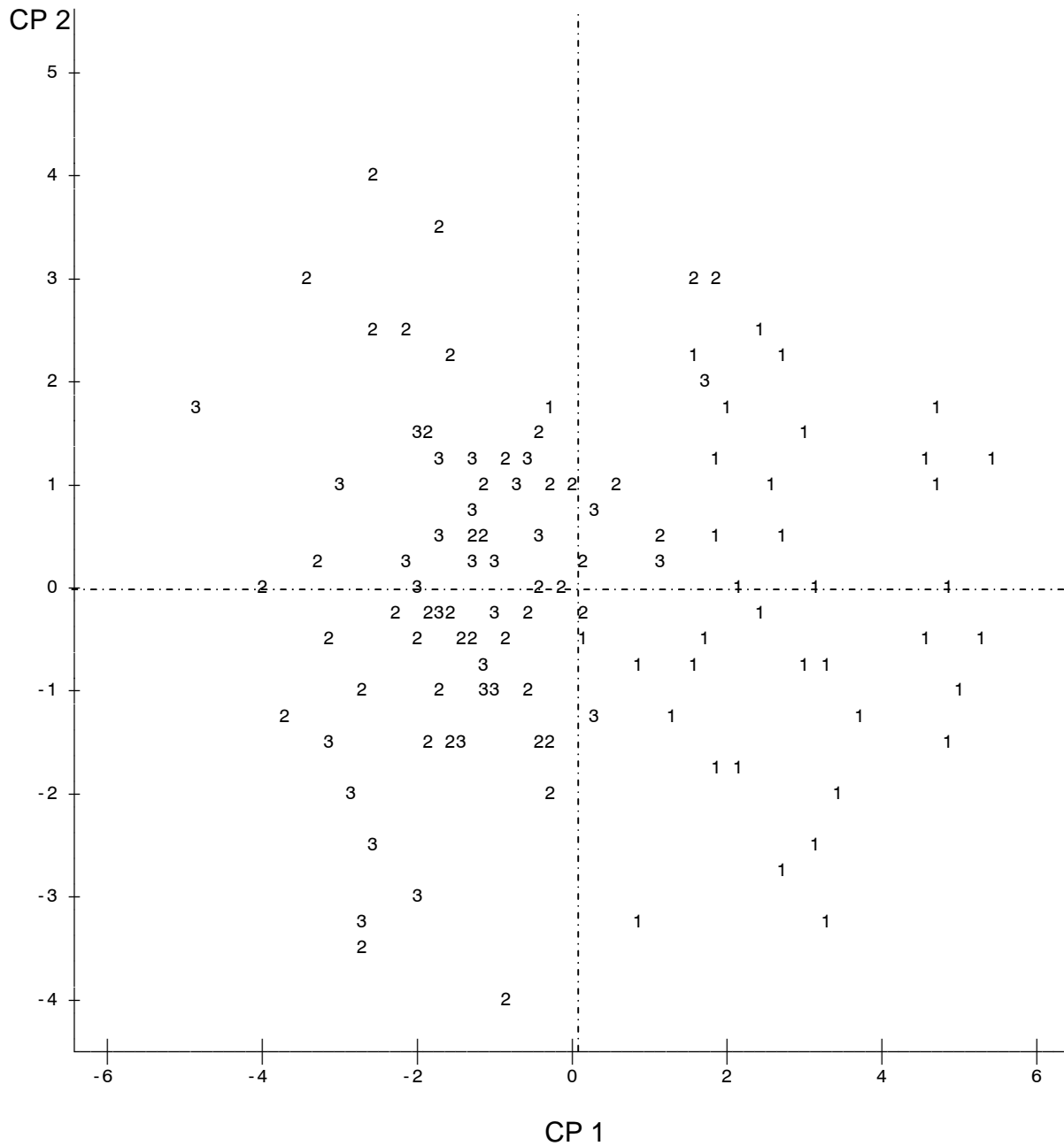
[†]: Variables fuertemente correlacionadas al componente.

LAC= Largo de acícula; AAC= Ancho de acícula; NHEH= Número de hileras de estomas en el haz; NHEE= Número de hileras de estomas en el envés; NE1M= Número de estomas en un milímetro; DHV= Diámetro del haz vascular incluyendo sus células epiteliales; LC= Longitud del cono; AC= Ancho del cono; LAE= Largo de escama; AE= Ancho de la escama; GRE= Grosor de escama; LEL= Longitud de la escama libre; LS= Longitud de semilla; AS= Ancho de semilla; LA= Longitud del ala con semilla; AA= Ancho del ala.

3.5 Análisis canónico discriminante

Con la distancia al cuadrado de Mahalanobis, se puede observar que la población La Marta presenta mayor distancia con respecto a la población El Mohinora, mientras que la menor distancia se encuentra entre El Coahuilón y El Mohinora (Cuadro 5).

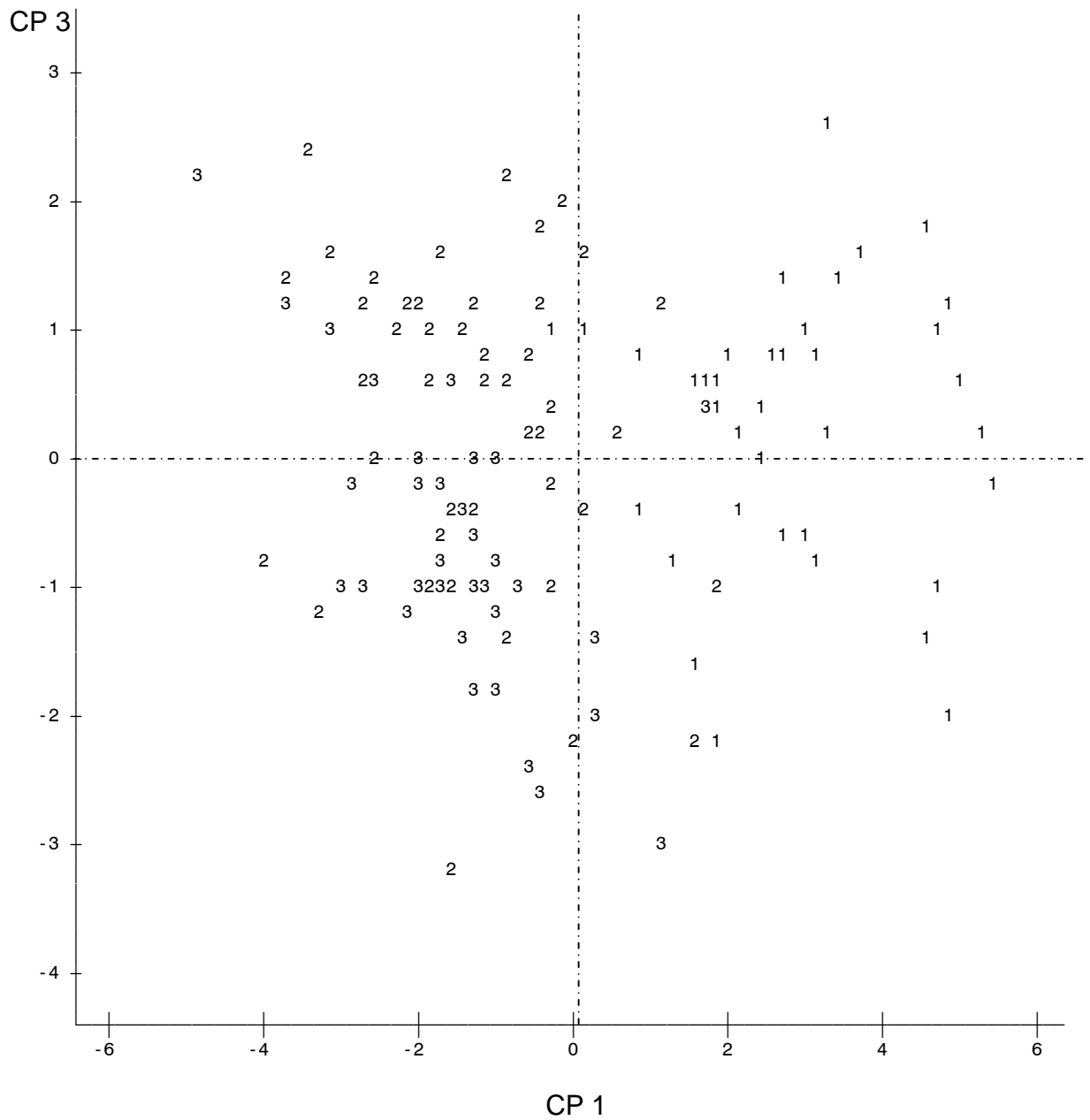
De acuerdo a la estadística F para la distancia al cuadrado de Mahalanobis y considerando una probabilidad de 0.05 las tres poblaciones son diferentes, por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de promedios en las características en cada población (Apéndice 6).



Nota: 5 observaciones escondidas.

CP= Componente principal; 1= La Marta; 2= El Coahuilón; 3= El Mohinora.

Figura 8. Gráfica que muestra los valores de los componentes 1 y 2 de las tres poblaciones de *Picea mexicana* Martínez.



Nota: 1 observación escondida

CP= Componente principal; 1= La Marta; 2= El Coahuilón; 3= El Mohinora.

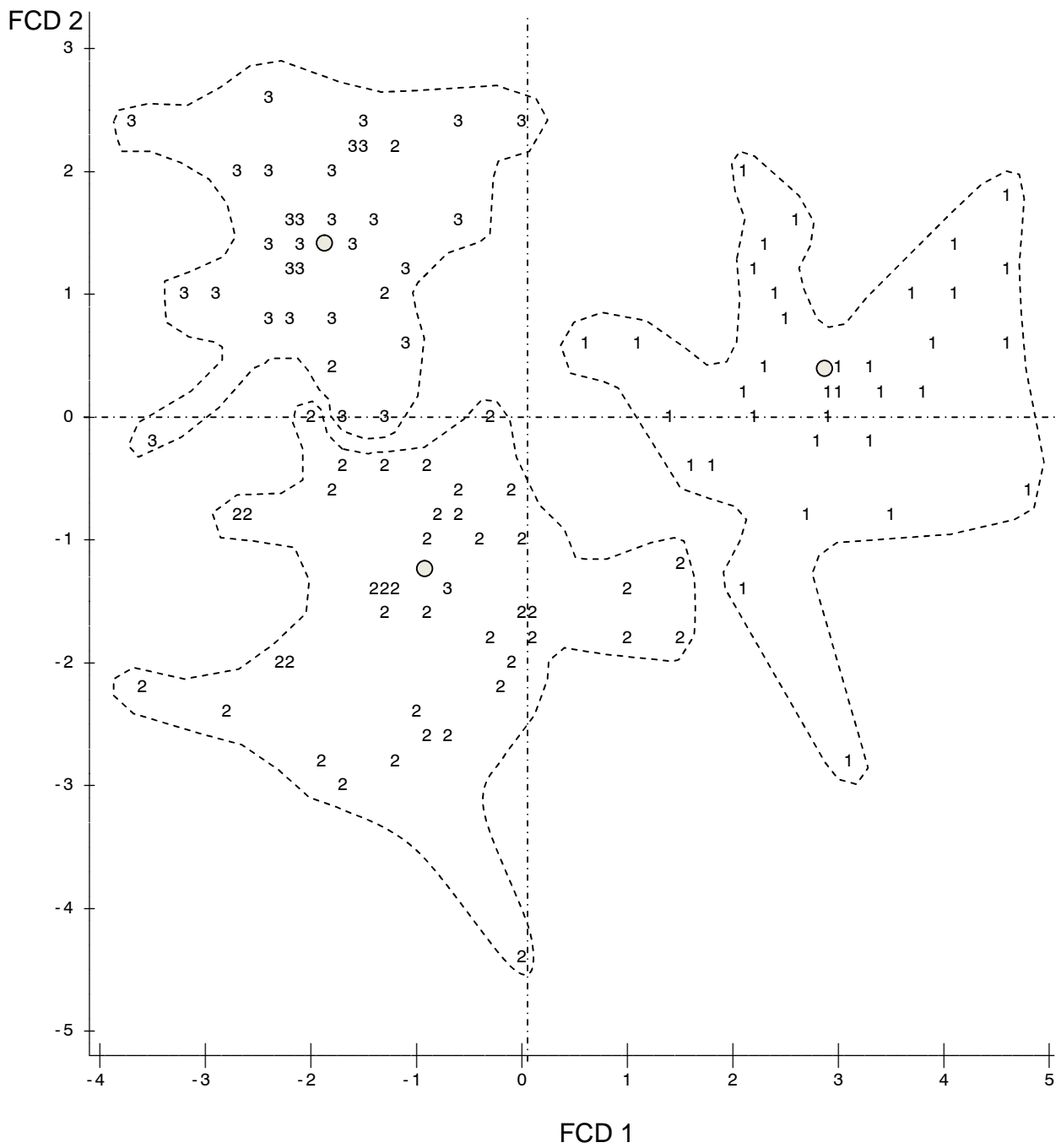
Figura 9. Gráfica que muestra los valores de los componentes 1 y 3 de las tres poblaciones de *Picea mexicana* Martínez.

Cuadro 5. Distancia al cuadrado de Mahalanobis entre las poblaciones de *Picea mexicana* Martínez.

Poblaciones	El Coahuilón	El Mohinora
La Marta	17.06	23.64
El Coahuilón		8.37

También se evaluaron los eigenvectores más grandes (λ) y la prueba de razón de verosimilitud para determinar la dimensionalidad del espacio canónico, donde se puede observar que las dos funciones canónicas son significativas a 0.05 y explican el 100% de la variabilidad total (Apéndice 7).

En la Figura 10 se presentan los centroides con sus respectivas áreas, donde se muestra claramente los agrupamientos de los valores canónicos que definen las diferencias morfológicas y anatómicas que existen entre las poblaciones. La primera función discriminante separa a la población La Marta con semillas más grandes, conos más anchos y escamas largas y gruesas. La segunda función separa a El Coahuilón del Mohinora; El Coahuilón presenta los conos más pequeños, semillas y alas menos anchas, así como el menor número de hileras de estomas en el envés. Cabe destacar que en las dos funciones canónicas discriminantes, el diámetro del haz vascular y longitud de escama libre aportan poca variación para diferenciar poblaciones.



Nota: 5 observaciones escondidas.
 ○ = Centroides; FCD= Función canónica discriminante; 1=La Marta; 2= El Coahuilón; 3= El Mohinora.

Figura 10. Gráfica que muestra los valores de dos funciones canónicas y los centroides de las tres poblaciones de *Picea mexicana* Martínez

4 DISCUSIÓN

4.1 Comparación entre poblaciones

La población El Coahuilón es muy similar a El Mohinora, a pesar que son las localidades más separadas geográficamente. La Marta se encuentra geográficamente muy cerca del Coahuilón pero son muy diferentes, en sus características morfológicas.

En las variables morfológicas de acículas evaluadas se encontraron diferencias entre poblaciones, en *Pinus greggii* también se encontraron diferencias (Beristáin, 1986), así como en *P. chiapensis* (Hernández, 1986). En el número de hileras de estomas se encontraron diferencias en *Pseudotsuga* (Santos, 1998; Reyes *et al.*, 2005) y en *Pinus arizonica* se encontraron diferencias significativas en el número de estomas (Rodríguez, 1996; Rodríguez y Capó, 2005), lo anterior indica que las variables morfológicas de acículas son útiles en la diferenciación de poblaciones.

Las características anatómicas de acículas analizadas en este estudio para *Picea mexicana* no ayudan a diferenciar a estas poblaciones, pero sí la frecuencia de canales resiníferos (Figura 7), debido a que en La Marta y El Coahuilón se encontraron con más frecuencia, a diferencia del Mohinora donde son prácticamente nulos, lo cual es relevante porque en la descripción inicial de esta especie se reporta sin la presencia de canales resiníferos (Martínez, 1961), además se encontraron canales resiníferos en la base, en la parte media y en el ápice, mientras que Weng y Jackson (2000) reportan que existen canales sólo en la base de las acículas, pero de una muestra que fue cultivada, sin saber su procedencia.

En las variables largo del cono, ancho del cono, largo de la escama, ancho de la escama, grosor de la escama contribuyen a la diferenciación de las poblaciones. De la misma forma en un trabajo sobre *Picea* se encontraron diferencias significativas (Prieto, 1992), al igual que en otras coníferas se encontraron diferencias en las primeras cuatro variables como en *Pseudotsuga* (Reyes *et al.*, 2005), *Pinus cembroides* (Muñoz, 1995)

y *P. chiapensis* (Hernández, 1986). Para la variable longitud de la escama libre también fue analizada en *Picea* encontrando diferencias (Taylor y Patterson, 1980).

Las variables largo y ancho de semillas, así como largo y ancho del ala mostraron diferencias entre poblaciones, estas variables han sido considerados en otros estudios como en *Picea* (Prieto, 1992), *Pinus chiapensis* (Hernández, 1986) y *P. greggii* (Cornejo, 1992). Por lo tanto estas variables se pueden considerar útiles en estudios posteriores para diferenciar poblaciones.

4.2 Componentes de varianza

En lo que respecta a componentes de varianza en la mayoría de las variables analizadas la mayor variación es aportada por el error o muestras dentro de árboles, como los encontrados en el crecimiento de plántulas de *Pseudotsuga* donde la mayor variación es atribuida al error experimental (Juárez *et al.*, 2006).

Las variables largo de acícula y el número de estomas en 1 mm la mayor variación es aportada por los árboles dentro de poblaciones, estos resultados son similares a los encontrados en *Pinus chiapensis* (Hernández, 1986). Sin embargo, en *P. greggii* la mayor variación se le atribuye a las poblaciones (Beristáin, 1992). Para la variable largo de acícula en *Pseudotsuga* se le atribuye a las poblaciones (Santos, 1998).

En ancho de acícula en este estudio la variación se le atribuye a las poblaciones, al igual que lo encontrado en *Pinus greggi* (Beristáin, 1992). Por otro lado en *P. chiapensis* (Hernández, 1986) y en *Pseudotsuga* (Santos, 1998) la mayor variación es aportada por los árboles dentro de poblaciones.

En lo que respecta al número de hileras de estomas las poblaciones aportan más a la variación, estos resultados coinciden con los encontrados en *Pseudotsuga* (Santos, 1998; Reyes *et al.*, 2005), mientras que en *Pinus chiapensis* (Hernández, 1986) y en *P.*

greggii (Beristáin, 1992) encontraron que la mayor aportación está dada por árboles dentro de poblaciones.

En anatomía de acículas la mayor variación es aportada por los árboles dentro de poblaciones, estas variables fueron evaluadas para diferenciar especies americanas de *Picea* (Weng y Jackson, 2000), pero no realizaron análisis de componentes de varianza.

En las variables largo del cono, ancho del cono, ancho y largo de escama aporta mayor variación los árboles dentro de poblaciones, resultados similares se encontró en *Pinus chiapensis* (Hernández, 1986) y en *P. greggii* (Cornejo, 1992). Pero en *Picea* (Prieto, 1992) y en *Pseudotsuga* (Reyes *et al.*, 2005), para las mismas variables encontraron que las poblaciones aportan mayor variación, al igual que Santos (1998) en *Pseudotsuga* para largo y ancho del cono. En lo que respecta a la longitud de la escama libre y grosor de la escama en el presente estudio se encontró que las poblaciones aportan mayor variación, coincidiendo en la última variable con el trabajo realizado en *Picea* (Prieto, 1992).

En las variables de semillas son las poblaciones que aportan mayor variación, resultados que coinciden con los encontrados en *Picea* (Prieto, 1992). En *Pinus chiapensis* (Hernández, 1986) también se encontró que las poblaciones aportan más variación en el ancho de semillas, y las demás variables se atribuye a los árboles dentro de poblaciones. Sin embargo en *Pinus greggii*, se reporta que los árboles dentro de poblaciones aportan mayor variación en semillas (Cornejo, 1992).

En relación a lo anterior Zobel y Talbert (1988) mencionan que en variación natural, aquellas características que se ven más afectadas por las poblaciones, están ligadas con los efectos ambientales, mientras que cuando son los árboles dentro de poblaciones quienes aportan más variación, se debe a efectos genéticos. Las variables más afectadas por el ambiente son ancho de acícula, número de hileras de estomas, longitud de escama libre, grosor de escama y todas las características de semillas,

mientras que las variables largo de acícula, número de estomas en un milímetro, características anatómicas de acículas (DHV, DCR, d, DI), largo de cono, ancho de cono, largo de escama y ancho de escama son más afectadas por el control genético.

4.3 Análisis multivariado

En un principio el análisis de componentes principales ayudó a separar a las tres poblaciones de *Picea mexicana*. En un estudio del género *Picea*, los componentes principales también ayudaron a separar a las poblaciones de *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière del complejo de *P. engelmannii* (Taylor *et. al.*, 1994). En otro estudio se separó *Pinus pseudostrobus* de *P. montezumae* Lamb. mediante componentes principales (Favela, 1991).

El análisis canónico discriminante en este estudio demostró claramente los agrupamientos que existen entre las poblaciones de *Picea mexicana*. En un estudio realizado en el género *Picea*, se analizaron tres poblaciones de *Picea chihuahuana*, dos de *Picea engelmannii* y una de *Picea mexicana* (La Marta), *P. híbrida* (El Mohinora) y *P. pungens*, mediante análisis canónico discriminante. Encontraron afinidades de *Picea* híbrida (El Mohinora) con el grupo *Picea engelmannii-Picea mexicana*, sugiriendo que no se considere a *Picea engelmannii* y *Picea mexicana* como dos especies separadas, sino que *Picea mexicana* se mantenga como una variedad de *Picea engelmannii* (Taylor y Patterson, 1980). También el análisis discriminante ha sido utilizado para agrupar coníferas como es el caso de *Pinus pseudostrobus* contra *P. montezumae* que se separaron gráficamente, de igual forma *P. montezumae* contra *P. hartwegii*, no así para *P. hartwegii* con *P. rudis* Endl. donde el análisis canónico discriminante no separó a estas dos especies, quedando como un solo grupo (Favela, 1991).

En componentes principales las variables que separan a las poblaciones, coinciden con los encontrados en la prueba DMS de separación de medias (Cuadro 2). Esto reafirma la caracterización de las poblaciones. En el análisis canónico discriminante, los resultados fueron semejantes a los obtenidos en componentes

principales; sin embargo, no siempre estos resultados pueden ser semejantes, porque en el análisis canónico discriminante se crean nuevas variables al tomar combinaciones lineales especiales de las variables originales y no se calculan de la misma manera que en componentes principales (Johnson, 2000).

5 CONCLUSIONES

Las variables morfológicas son significativas entre y dentro de poblaciones. Sin embargo las variables anatómicas no son significativas entre las poblaciones.

El Coahuilón y El Mohinora son afines morfológicamente, a pesar que son las poblaciones geográficamente más separadas.

6 RECOMENDACIONES

Realizar un estudio con más repeticiones de acículas por árbol, para determinar la frecuencia de canales resiníferos en cada una de las poblaciones, así como incluir la evaluación de la granulosis y pubescencia de las ramillas.

7 LITERATURA CITADA

- Aparicio-Rentería, A., L. C. Mendizábal-Hernández, y J. Alba-Landa. 2002. Variación en semillas de *Pinus oaxacana* Mirov de dos cosechas procedentes de una población natural del estado de Veracruz, México. *Foresta Veracruzana* 4 (2): 11-16.
- Beristáin B., J. J. 1992. Variación morfológica y anatómica de acículas de *Pinus greggii* Engelm. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 93 p.
- Box, G. E. P. y D. R. Cox. 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society Series B.* 26: 211-252.
- Braham S., S. 1995. Regeneración natural de *Picea engelmannii* var. *mexicana* en Arteaga Coah. y Rayones, N. L. Tesis profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 74 p.
- Castillo T., J. R., L. C. Mendizábal-Hernández, y E. O. Ramírez-García. 2004. Variación en semillas de *Pinus patula* Schl. et Cham. Procedentes de un huerto semillero de tercera generación en Orizaba, Veracruz, México. *Foresta Veracruzana* 6 (2): 27-30.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2005. División Política Estatal. Escala 1:1000000. Extraído de Conjunto de Datos vectoriales topográficos y toponímicos. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). México. [En línea]. 10 de enero de 2009. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/informacion/cgi-bin/geo_metadatos_esp.cgi?Id=398.
- CONANP-SEMARNAT. 2005. Estudio previo justificativo para el establecimiento de área natural protegida: Área de Protección de Flora y Fauna Cerro del Mohinora. CONANP-SEMARNAT. 64 p.
- Cornejo M., G. 1992. Variación morfológica de conos y semillas en once poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. México. 71 p.
- Cornejo O., E. H. 1987. Aspectos ecológicos y dasonómicos del bosque de *Pseudotsuga*, *Pinus*, *Abies* en la Sierra La Marta, Arteaga, Coahuila. Tesis profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 196 p.
- Favela L., S. 1991. Aplicación de técnicas numéricas en algunos pinos mexicanos. Reporte científico N° 25. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Forestales. Linares, N. L. 35 p.

- Furnier, R. 2004. Métodos para medir variación genética en las plantas. *In: Manejo de recursos genéticos forestales*. Vargas H., J. J., B. Bermejo V. y F. T. Ledig Editores. 2ª Ed. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. pp. 20-31.
- García N., R. M. 1986. Variación morfológica de acículas, conos y semillas de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 54 p.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). 4ª Ed. Secretaría de la Presidencia. Comisión de Estudios del Territorio Nacional. México. 217 p.
- Gaviño, G., C. Juárez y H. H. Figueroa. 1979. Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo. Ed. Limusa. México. 251 p.
- González A., J., E. García M., J. J. Vargas H., A. Trinidad S., A. Romero M., y V. M. Cetina A. 2006. Evaluación de la producción y análisis de conos y semillas de *Pinus cembroides* Zucc. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 12 (2): 133-138.
- Hair, J. F., R. E. Anderson, R. L. Tatham y W. C. Black. 1999. Análisis multivariante. Quinta edición. Prentice Hall. Madrid, España. 799 p.
- Hernández G., J. J. 1986. Variación morfológica de acículas, conos y semillas de *Pinus chiapensis* de Oaxaca y Chiapas. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 91 p.
- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. *In: análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos*. Franco, T. L., R. Hidalgo Editores. Boletín Técnico No. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) Cali, Colombia. pp. 2-26.
- Hines, W. W., y D. C. Montgomery. 1996. Probabilidad y estadística para ingeniería y administración. Traductor Nagore, G. 2ª ed. Ed. Continental. México. 834 p.
- Iglesias A., L. G., y Y. Tivo F. 2006. Caracterización morfométrica de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Ra Ximhai*. 2 (2): 449-468.
- INEGI. 1988. Mapa de suelos dominantes. Estados Unidos Mexicanos. Escala 1:4,000,000.
- Infante G., S. y G. P. Zarate de L. 1990. Métodos estadísticos. 2ª edición. Trillas. México. 643 p.

- Johnson, D. E. 2000. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Primera edición en español. International Thomson Editores, S. A. de C. V. México, D. F. 566 p.
- Juárez A., A., J. López U., J. J. Vargas H. y C. Sáenz Romero. 2006. Variación geográfica en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agrociencia* 40 (6): 783-792.
- Ledig, F. T., B. Bermejo V., P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson, C. Flores L. y V. Jacob C. 2000. The mating system and genetic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of México's Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Canadian Journal Forest Research* 30: 1-9.
- Ledig, F. T., P. D. Hodgskiss y V. Jacob-Cervantes. 2002. Genetic diversity, mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martínez. *Conservation Genetics* 3 (2): 113-122.
- Ledig, F. T., P. D. Hodgskiss, K. V. Krutovskii, D. B. Neale y T. Eguiluz-Piedra. 2004. Relationships among the Spruces (*Picea*, Pinaceae) of Southwestern North America. *Systematic Botany* 29 (2): 275–295.
- Littell, R. C., G. A. Milliken, W.W. Stroup y R. D. Wolfinger. 1996. SAS[®] System for mixed models. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA 633 p.
- López C., M. L., J. Márquez G. y G. Murguía.S. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. 2ª ed. UNAM. México. 178 p.
- Márquez G., A. V. y L. C. Mendizábal H. 2004. Variación en el tamaño de conos de *Pinus pseudostrobus* Lindl. del Esquilón, Municipio de Coacoatzintla, Veracruz, México. *Foresta Veracruzana* 6 (1): 33-37.
- Martínez, A. G. 2007. Medidas de distribución - Asimetría y curtosis. Spss para todos – Bogotá – Colombia. [En línea]. 8 de Mayo de 2009. Disponible en: <http://www.spssfree.com/spss/analisis3.html>
- Martínez, M. 1961. Una nueva especie de *Picea* en México. *Anales de Instituto de Biología*. XXXII: 137-142.
- Mendoza H., J. M. 1983. Diagnóstico climático para la zona de influencia inmediata de la UAAAN. Departamento de Agrometeorología UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah. México. 619 p.
- Muñoz C., E. 1995. Variación morfológica de acículas, conos y plántulas en distintas procedencias de *Pinus cembroides* Zucc. Tesis profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 41 p.

- Nienstaedt, H. 1990. Importancia de la variación natural. *In*: Memoria mejoramiento genético y plantaciones forestales. T. Eguiluz P. y A. Plancarte B. Editores. Ed. Centro Genética Forestal, A. C. Lomas de San Juan, Chapingo. pp. 16-23.
- Prieto M., E. 1992. Variación morfológica de conos y semillas de 13 poblaciones naturales de *Picea* (pinaceae) en México. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. México. 73 p.
- Reyes H., V. J., J.J. Vargas H., J. López U., y H. Vaquera H. 2005. Variación morfológica y anatómica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* (pinaceae). *Acta Botanica Mexicana* 70: 47-67.
- Rodríguez L., R., y M. A. Capó A. 2005. Morfología de acículas y conos en poblaciones naturales de *Pinus arizonica* Engelm. *Ra Ximhai* 1 (1): 131-152.
- Rodríguez, L. R. 1996. Variación morfológica en algunas poblaciones naturales de *Pinus Arizona* Engelm. Tesis profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 61 p.
- Sánchez T., V., L. C. Mendizábal-Hernández, y V. Rebolledo-Camacho. 2002. Variación en conos y semillas de *Pinus cembriodes* subsp. *orizabensis* D.K. Bailey de las Cuevas, Altzayanca, Tlaxcala. *Foresta Veracruzana* 4 (1): 25-30.
- Santos G., R. 1998. Variación morfológica y anatómica en hojas y conos de ocho localidades de *Pseudotsuga* en el Norte de México. Tesis profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 60 p.
- SAS Institute Inc. 1988. SAS/STAT[®]User's guide, release 6.03 Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.
- SEMARNAT. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, protección ambiental – especies nativas de México de flora y fauna silvestres – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación (D.O.F.)* 23 de abril de 2003. México. 153 p.
- Sit, V. 1995. Analyzing ANOVA Designs. *Biometrics Information Handbook* 5. Research Branch, B. C. Ministry of Forests. Working Paper 07/1995. Victoria, B. C, Canadá. 61 p.
- Snedecor, W. G. y G. W. Cochran. 1981. *Métodos estadísticos*. Ed. Continental. México. 703 p.
- SPP-INEGI. 1981. *Síntesis geográfica de Nuevo León*. México. 170 p.
- SPP-INEGI. 1983. *Síntesis geográfica de Coahuila*. México. 163 p.

- Taylor, R. J. y T. F. Patterson. 1980. Biosystematics of Mexican spruce species and populations. *Taxon* 29 (4): 421-469.
- Taylor, R. J., T. F. Patterson y R. J. Harrod. 1994. Systematics of Mexican spruce-
Revised. *Systematic Botany* 19 (1): 47-59.
- Vega E., R. A. y C. Flores-López. 2008. Aspectos ecológicos de *Picea mexicana* Martínez en poblaciones naturales de México. *In: Memoria del Congreso Estudiantil Forestal Nacional*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 25 p.
- Weng, C. y S. T. Jackson. 2000. Species differentiation of North American spruce (*Picea*) based on morphological and anatomical characteristics of needles. *Canadian Journal of Botany* 78 (11): 1367-1383.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2ª ed. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 718 p.
- Zobel, B. y J. Talbert. 1988. *Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales*. Traductor M. Guzmán O. Limusa. México. 545 p.

APÉNDICE

Apéndice 1. Preparación permanente del corte transversal de acícula de *Picea Mexicana* Martínez.

Para la preparación se siguieron los siguientes pasos:

1 Fijación

El propósito de este paso fue prevenir los daños a la morfología de la acícula provocando la muerte rápida del tejido y a la vez manteniendo la estructura original para manipular ese tejido posteriormente (López *et al.*, 2005).

Para fijar las acículas se utilizaron dos fijadores de acuerdo a las concentraciones especificadas por Gaviño *et al.* (1979). Primero se utilizó el líquido de Carnoy que posee una gran capacidad para penetrar rápidamente, matando al protoplasma por medio de una deshidratación violenta. Las acículas se sumergieron en este líquido durante una semana. Después se utilizó el Formol-aceto-alcohol que es un fijador preparado a base de formol. En la cual se sumergieron las acículas durante un mes.

2 Deshidratación

El propósito de este paso fue remover todo el agua del tejido fijado y lavado remplazándolo por un solvente orgánico en el cual pueda disolverse el medio de inclusión que se utilizó para posteriormente permitir cortes delgados (López *et al.*, 2005).

La deshidratación de las muestras se realizó en dos etapas. Las sustancias y tiempos de inmersión utilizados fueron de acuerdo con la experiencia obtenida por la T.L.Q. Angélica Martínez Ortiz. En la primera etapa las muestras se colocaron en alcohol a 70° por una hora, después en alcohol al 80° durante hora y media, posteriormente en alcohol a 96° y se le agregó eosina ahí permanecieron una hora, por

último las muestras se enjuagaron en alcohol a 96° y se pusieron en alcohol a 100° durante 19 horas aproximadamente.

En la segunda etapa las muestras se colocaron en alcohol absoluto con xilol (en proporción 3:1) por dos horas, luego en alcohol absoluto con xilol (en proporción 1:3) durante una hora, por último las muestras se quedaron inmersas en xilol puro durante 18 horas, aproximadamente.

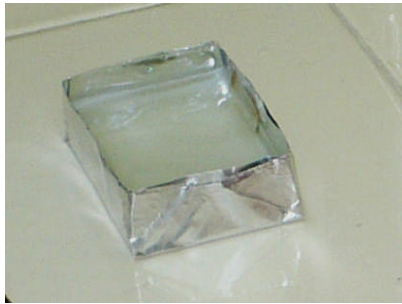
3 Inclusión en parafina

Este procedimiento se realizó con el propósito de obtener cortes transversales satisfactorios en las acículas de *Picea mexicana*, para esto se utilizó el medio de inclusión de parafina sobre todo que sirve de soporte para los tejidos y que no produce reacción química con ellas.

La inclusión en parafina consistió en dos etapas. En una primera etapa se realizó la preinclusión que consistió en combinar el xilol con parafina con diferentes tiempos y temperaturas (de acuerdo a la experiencia obtenida por T.L.Q. Angélica Martínez Ortiz), para al final dejar las acículas en parafina pura. Primero las muestras se colocaron en xilol con parafina en escamas y se metieron en una estufa a 35 °C durante tres horas, después se les colocó nuevamente xilol con parafina en escamas, pero se aumentó la temperatura a 45 °C por un tiempo de dos horas, y por último las muestras se colocaron en parafina pura en la estufa a 55 °C, ahí permanecieron hasta ser utilizadas en la segunda etapa.

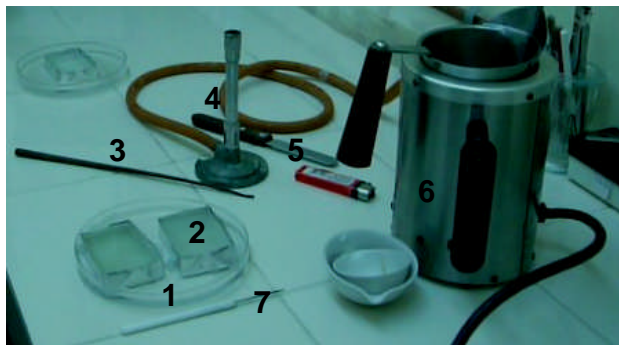
Como segunda etapa se realizó la orientación de las muestras en base a la siguiente metodología de López *et al.* (2005) con modificaciones de T.L.Q. Angélica Martínez Ortiz:

- a) Se realizaron cajas de papel aluminio como se presenta Fotografía 1.
- b) Se hicieron etiquetas para la identificación de las muestras.



Fotografía 1. Caja de aluminio para los bloques de parafina.

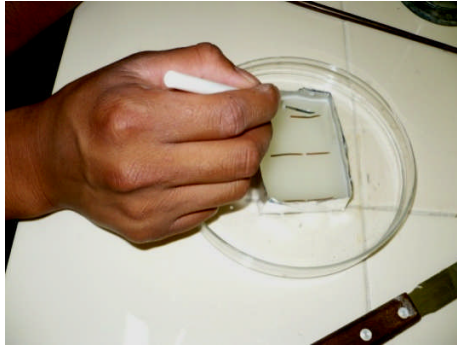
- c) En una caja de petrí con agua se colocaron las cajas de aluminio (Fotografía 2).
- d) Se llenó la caja de aluminio con parafina líquida (Fotografía 2).



1= Caja de petrí con agua; 2=Cajas de aluminio con parafina; 3= Soplete; 4=Mechero Bunsen; 5= Espátula; 6= Calentador de parafina; 7=Aguja de disección.

Fotografía 2. Cajas de aluminio y material utilizado para la elaboración de los bloques de parafina.

- e) Se colocaron las etiquetas de identificación.
- f) Se colocaron las muestras en el fondo de la caja y orientándola con ayuda de una aguja de disección como se muestra en la siguiente Fotografía 3.
- g) Cuando era necesario se hacían correcciones a la orientación de la muestra, calentando ligeramente la aguja de disección en la flama del mechero Bunsen, para que éste se pudiera sumergir sin resistencia en la parafina.



Fotografía 3. Orientación de las muestras con apoyo de la aguja de disección.

h) Se dejó reposar la parafina hasta que se tornara sólida (Fotografía 4).



Fotografía 4. Bloques de parafina con acícula de *Picea mexicana* Martínez.

Nota: En todo el proceso se utilizó el mechero Bunsen y el soplete para evitar la solidificación de la parafina y eliminación de burbujas.

4 Microtomía

Es la técnica para seccionar (cortar) el tejido ya incluido o que tiene la suficiente dureza para que al ser cortado conserve los suficientes detalles para su identificación y estudio estructural al microscopio (Gaviño *et al.*, 1979). Para este procedimiento se utilizó el micrótopo rotatorio que se presenta en la Fotografía 5.



Fotografía 5. Micrótopo rotatorio utilizado para realizar cortes transversales de acículas de *Picea mexicana* Martínez.

Antes de usar el micrótopo, se utilizó la platina del micrótopo para fijar la torre de parafina donde se encontraba la acícula de *Picea mexicana* (Fotografía 6a). Para fijar la torre de parafina se hizo un precalentamiento de la base de la platina y de la torre, con el fin de quitarle solidez a la cera y que quedara adherido a la base de la platina. Para asegurar la fijación de la torre alrededor de éste se adhirió suficiente cera precalentada con la ayuda de la espátula, de tal forma que la torre estuviera bien sujeta, después en un vaso de precipitado con agua se introdujo la torre para enfriar la muestra (Fotografía 6b), posteriormente con una navaja de un solo filo se retalló la torre con el propósito de quitar la parafina sobrante.



a



b

1= Platina del micrótopo; 2=Torre de parafina; 3 Mechero de alcohol.

Fotografía 6. a) Fijación de la torre de parafina a la platina del micrótopo, b) Enfriamiento de la muestra.

La platina con la torre de parafina se fijo al micrótopo conservando la orientación como se observa en la Fotografía 7.



Fotografía 7. Micrótopo con la la torre de parafina.

Para definir el ancho del corte con el micrótopo se hicieron cortes a 14,16 y 18 micras, se seleccionó el de 16 micras porque hubo menos desgarre de tejido vegetativo y porque la claridad del corte fue similar al de 18 micras prefiriendo el de 16 por ser más delgado.

La cuchilla permaneció fija al micrótopo y la torre de parafina pasaba por el borde y así se obtuvieron los cortes, esto se realizó con apoyo de movimiento de la manivela de micrótopo. De cada muestra se obtuvieron cintas de cortes de parafina con las secciones transversales de acículas.

4.1 Extensión de los cortes con la técnica del adhesivo de Haupt

Se realizó con la finalidad de adherir las muestras al portaobjetos y evitar que se desprendieran al realizar la tinción de las mismas.

Primero se aplicó un poco de “vaho” a la laminilla con el propósito de asegurar la persistencia del adhesivo, posteriormente se aplicó una capa delgada de adhesivo de Haupt, luego se agregó una gota de formalina al 4%, posteriormente se colocaron las cintas de cortes seleccionadas (cortes menos rasgados).

Una vez extendidos las cintas de cortes se retiró el exceso de la formalina absorbiéndola con una franela, con el propósito de eliminar el contenido de humedad de los cortes, el portaobjetos con la muestra se pasó varias veces por la flama de un mechero Bunsen y se después se frotaba sobre la mano para calcular el tiempo de exposición de la muestra a la flama y evitar que la cera se derritiera (entre 10 a 15 minutos se realizó). Posteriormente con una aguja de disección se rayó la parafina para verificar que estuviera seca. En caso contrario se repitió la exposición de la muestra a la flama hasta que se secura.

Nota: Por seguridad la cuchilla del micrótopo se manejó con mucho cuidado desde su funda de protección hasta la puesta al micrótopo, de igual manera se tuvo mucho cuidado al poner la torre con el bloque de parafina.

5 Modificación de tinción de la doble coloración

Este procedimiento se realizó debido a que diversos tejidos vegetales poseen índices de refracción muy similares, que hacen la diferenciación óptica difícil por lo que hace necesario teñir los cortes. En este procedimiento se utilizó la combinación de safranina y verde rápido para teñir los tejidos. La safranina tiñe de rojo las paredes lignificadas, nucléolos, cromatina y taninos condensados, mientras que el verde rápido proporcionó un verde azulado a las paredes no lignificadas y un tono verde violacio al citoplasma (López *et al.*, 2005).

El primer procedimiento consistió en una desparafinación con el propósito de eliminar la parafina de los cortes adheridos al portaobjetos. Las muestras se colocaron por un tiempo de cinco minutos en cada una de las siguientes sustancias: xilol I, xilol II, xilol III, alcohol absoluto, alcohol a 96°, alcohol a 85°, alcohol a 70° y agua destilada (experiencias de T.L.Q. Angélica Martínez Ortiz).

El segundo procedimiento consistió en la coloración de los cortes, las muestras se colocaban en safranina durante un tiempo de 1 a 24 horas, posteriormente se

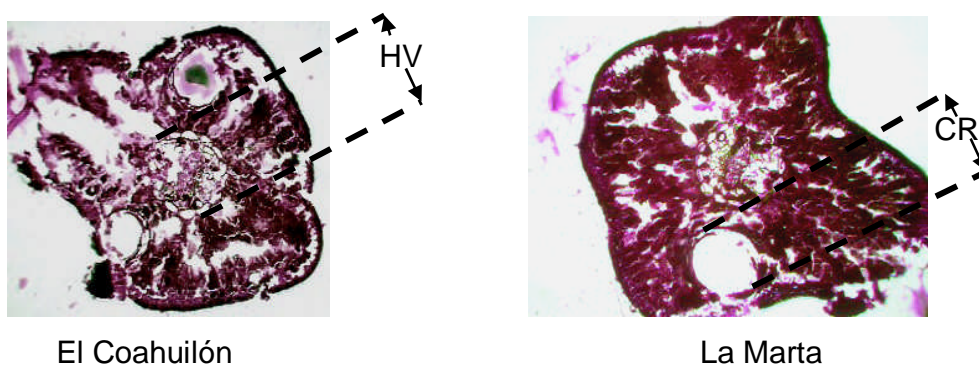
enjuagaron sin perder el orden en cada una de las siguientes sustancias: agua corriente, agua destilada, alcohol al 70°, alcohol al 85°, alcohol al 96° I, fast green, alcohol al 96° II, alcohol absoluto I, alcohol absoluto II, carbol xilol, xilol I y xilol II (experiencias por T.L.Q. Angélica Martínez Ortiz).

6 Preparación y sellado de la muestra permanente

Al momento de extraer las muestras del xilol, se procedió a eliminar la pintura alrededor de los cortes con la ayuda de pinzas y algodón, al mismo tiempo se cuidaba que no se deshidratara la muestra, sumergiéndolas en carbol xilol, posteriormente se colocaba una gota de bálsamo de Canadá sobre los cortes transversales, para adherir un cubreobjetos. Una vez terminado este proceso las muestras fueron colocadas en laminillas dentro de una estufa, para acelerar el secado de las mismas.

7 Limpieza de las muestras

Una vez secas las muestras se procedió a quitar el bálsamo de Canadá sobrante alrededor del cubreobjetos, simplemente raspándolas con una navaja de doble filo, después se limpiaban con algodón humedecido con xilol, posteriormente con la ayuda de un microscopio se observaron las muestras para verificar la presencia de canales resiníferos (Fotografía 8).



HV= Haz vascular; CR= Canal resinífero.

Fotografía 8. Corte transversal con presencia de canales resiníferos de *Picea mexicana* Martínez.

Apéndice 2. Prueba de normalidad para las variables morfológicas y anatómicas de *Picea mexicana* Martínez.

Característica	Variable (Abreviatura)	<i>n</i>	Valores de D	$D_{\infty, n}^{\dagger}$	Asimetría	Kurtosis
Acículas	Largo de acícula (LAC)	97	0.071 [¶]	0.091	0.257	-0.329
	Ancho de acícula (AAC)	97	0.046 [¶]	0.091	-0.504	0.277
	Número de hileras de estomas en el haz (NHEH)	97	0.110	0.091	0.934	1.772
	Número de hileras de estomas en el envés (NHEE)	97	0.054 [¶]	0.091	0.220	0.174
	Número de estomas en 1 mm (NE1M)	97	0.074 [¶]	0.091	0.739	0.733
	Diámetro del haz vascular (DHV) [§]	97	0.057 [¶]	0.091	0.387	0.937
	Diámetro del canal resinífero (DCR) [§]	39	0.084 [¶]	0.140	0.445	0.326
	Distancia desde la esquina lateral (ángulo) al centro del canal resinífero (d) [§]	39	0.106 [¶]	0.140	0.999	3.363
	Longitud lateral al lado de la posición del canal resinífero (DI) [§]	39	0.119 [¶]	0.140	-0.994	3.060
	Conos	Largo del cono (LC)	80	0.084 [¶]	0.099	0.134
Ancho del cono (AC)		80	0.064 [¶]	0.099	0.010	-0.291
Ancho de escama (AE)		80	0.068 [¶]	0.099	-0.218	-0.445
Largo de escama (LAE)		80	0.061 [¶]	0.099	0.140	0.280
Longitud de la escama libre (LEL)		80	0.098 [¶]	0.099	0.456	-0.530
Grosor de la escama (GRE)		80	0.127	0.099	0.160	-0.485
Semillas	Longitud de semilla (LS)	54	0.133	0.120	-0.691	-0.304
	Ancho de semilla (AS)	54	0.109 [¶]	0.120	0.088	-0.175
	Longitud del ala con semilla (LA)	54	0.065 [¶]	0.120	-0.025	0.285
	Ancho del ala (AA)	54	0.096 [¶]	0.120	0.468	-0.385

[†]: Valor crítico de D para la prueba de ajuste de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Donde $D \geq D_{\infty, n}$ la H_0 es rechazada a nivel de significancia ∞ .

[¶]: Existe normalidad.

[§]: Características anatómicas de acículas.

n=Número de árboles muestreados.

Apéndice 3. Valores de tendencia central y dispersión para cada una de las variables por población.

Característica	Variable	La Marta			El Coahuilón			El Mohinora		
		$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Min-Max	CV (%)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Min-Max	CV (%)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Min-Max	CV (%)
Acículas	LAC (mm)	20.24 (0.44) a [†]	15.88-25.38	12.37	18.48 (0.48) b	13.54-24.67	14.70	18.40 (0.38) b	14.16-23.45	11.92
	AAC (mm)	1.05 (0.01) a	0.89-1.14	5.03	1.03 (0.01) a	0.85-1.16	8.18	0.99 (0.01) b	0.81-1.13	5.95
	NHEH	5.44 (2.41E-57) c	4.00-7.10	0.01	6.58 (2.37E-56) a	4.90-10.30	0.04	6.09 (3.71E-59) b	4.90-8.10	0.0001
	NHEE	4.03 (0.15) b	2.40-5.90	20.50	4.68 (0.15) a	2.70-7.20	18.68	4.88 (0.13) a	3.80-6.50	14.89
	NE1M	42.16 (1.45) b	29.30-59.80	19.48	51.77 (2.15) a	34.30-86.10	23.49	49.59 (1.57) a	33.50-68.50	18.20
	DHV (μ) [¶]	29.06 (0.89) a	19.09-42.75	17.26	28.76 (0.81) a	15.77- 40.67	15.94	27.06 (0.63) a	21.58-34.86	13.44
	DCR (μ) [¶]	17.61 (1.11) a	9.13-24.90	23.51	17.79 (1.05) a	10.79-29.88	27.66	13.83 (2.93) a	8.30-18.26	36.66
	d (μ) [¶]	16.51 (1.10) a	11.21-22.83	24.92	17.60 (1.05) a	8.30-34.03	28.08	20.20 (2.46) a	16.60-24.90	21.09
	DI (μ) [¶]	76.57 (4.39) a	30.71-95.87	21.45	78.04 (2.55) a	58.52-101.26	15.32	83.55 (0.55) a	83.00-84.66	1.15
	Conos	LC (mm)	56.79 (1.15) a	47.64-73.41	11.13	48.91 (1.50) c	33.72-66.23	15.29	53.11 (1.04) b	45.23-62.75
AC (mm)		20.94 (0.27) a	18.62-24.54	7.18	18.97 (0.35) b	16.34- 22.81	9.17	20.17 (0.33) a	16.59-22.89	8.30
AE (mm)		10.21 (0.15) a	8.41-11.52	8.05	9.66 (0.17) b	7.91- 11.16	8.54	9.67 (0.18) b	7.62-11.12	9.48
LAE (mm)		15.50 (0.22) a	13.63-18.27	7.70	14.06 (0.31) b	10.87-18.09	11.08	13.90 (0.22) b	11.43-15.61	7.95
LEL (mm)		4.21 (0.11) a	2.94-5.24	14.60	3.58 (0.12) b	2.71-5.24	16.84	3.69 (0.09) b	2.94-4.61	12.55
GRE (mm)		0.32 (5.13E-58) a	0.22-0.40	0.01	0.28 (1.22E-56) b	0.19-0.38	0.04	0.24 (7.67E-57) c	0.14-0.33	0.03
Semillas		LS (mm)	3.63 (0.53) a	3.31-4.01	3.34	3.17 (0.86) b	2.30-3.84	5.52	2.91 (0.70) b	2.40-3.21
	AS (mm)	2.06 (0.04) a	1.57-2.41	10.99	1.72 (0.05) b	1.26-1.95	11.15	1.73 (0.05) b	1.47-1.92	8.13
	LA (mm)	9.25 (0.16) a	7.67-11.28	9.13	8.55 (0.23) b	6.37-10.00	11.17	8.14 (0.17) b	7.56-8.95	6.17
	AA (mm)	4.08 (0.06) a	3.52-4.75	7.72	3.72 (0.06) b	3.23-4.18	7.02	3.78 (0.13) b	3.48-4.65	10.00

[†]: Promedios seguidos de la misma letra, en cada fila, no son diferentes estadísticamente, según la prueba DMS ($p \leq 0.05$).

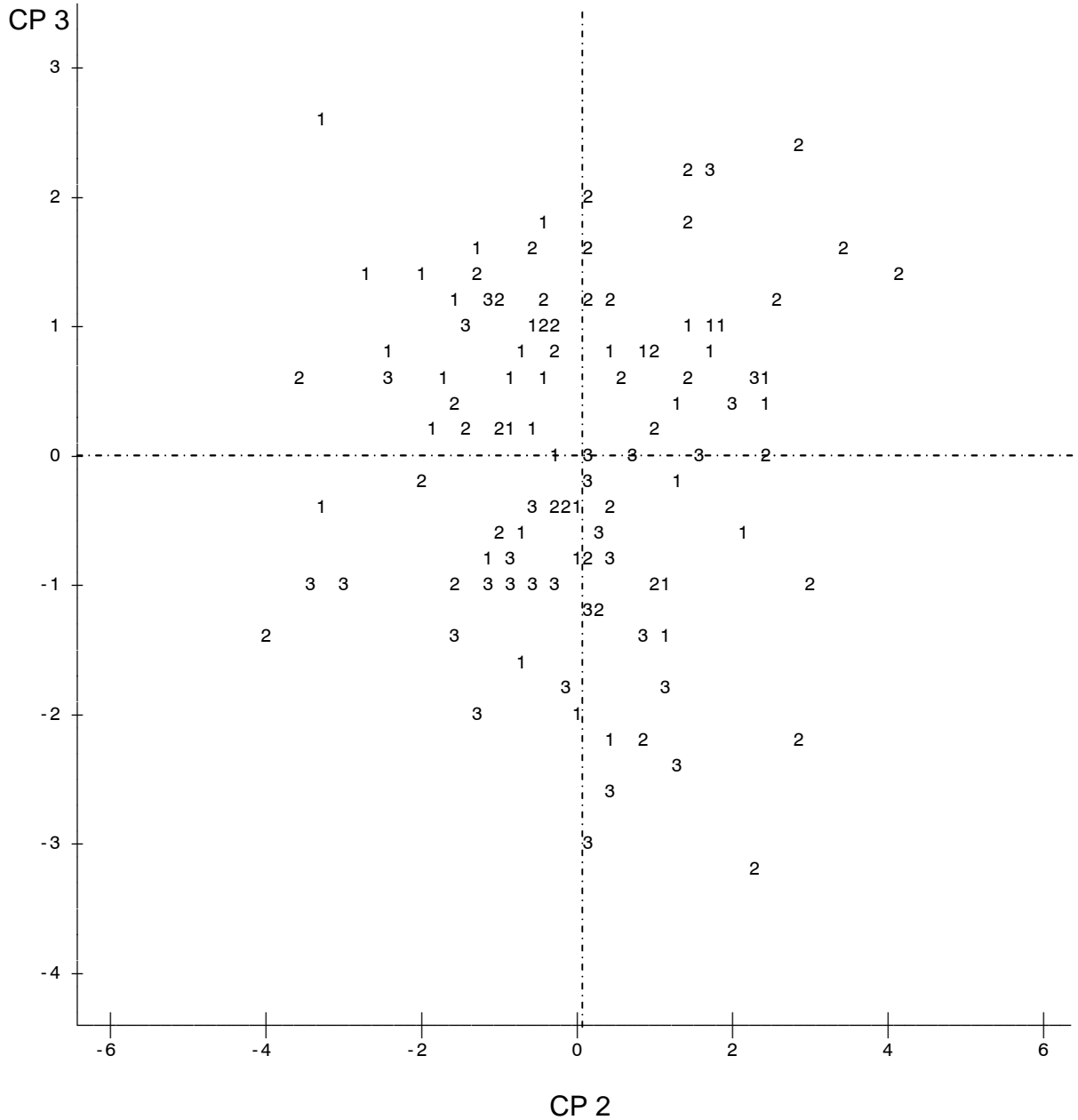
[¶]: Características anatómicas de acículas.

\bar{x} = Media; $S\bar{x}$ = Error estándar; Min= Mínimo; Max= Máximo; CV= Coeficiente de variación expresado en porcentaje; LAC= Largo de acícula; AAC= Ancho de acícula; NHEH= Número de hileras de estomas en el haz; NHEE= Número de hileras de estomas en el envés; NE1M= Número de estomas en un milímetro; DHV= Diámetro del haz vascular incluyendo sus células epiteliales; DCR= Diámetro del canal resinífero; d= Distancia desde la esquina lateral (ángulo) al centro del canal resinífero; DI= Longitud lateral al lado de la posición del canal resinífero; LC= Longitud del cono; AC= Ancho del cono; LAE= Largo de escama; AE= Ancho de la escama; GRE= Grosor de escama; LEL= Longitud de la escama libre; LS= Longitud de semilla; AS= Ancho de semilla; LA= Longitud del ala con semilla; AA= Ancho del ala.

Apéndice 4. Matriz de correlación de los eigenvalores de *Picea mexicana* Martínez.

Componente	Eigenvalor	Diferencia	Proporción	Acumulativo
1	5.69	3.18	0.36	0.36
2	2.51	0.99	0.16	0.51
3	1.51	0.36	0.09	0.61
4	1.15	0.12	0.07	0.68
5	1.04	0.27	0.06	0.74
6	0.77	0.02	0.05	0.79
7	0.74	0.16	0.05	0.84
8	0.58	0.13	0.04	0.87
9	0.46	0.12	0.03	0.90
10	0.34	0.01	0.02	0.92
11	0.33	0.06	0.02	0.94
12	0.27	0.07	0.02	0.96
13	0.20	0.03	0.01	0.97
14	0.16	0.03	0.01	0.98
15	0.14	0.02	0.01	0.99
16	0.12		0.01	1.00

Apéndice 5. Gráfica que muestra los valores de los componentes 2 y 3 de las tres poblaciones de *Picea mexicana* Martínez.



Nota: 9 observaciones escondidas.

CP= Componente principal; 1= La Marta; 2= El Coahuilón; 3= El Mohinora.

Apéndice 6. Estadística F para la distancia cuadrada de Mahalanobis entre las poblaciones de *Picea mexicana* Martínez.

Poblaciones	El Coahuilón	EL Mohinora
La Marta	20.00 ($<.0001$) [†]	24.44 ($<.0001$)
EL Coahuilón		9.37 ($<.0001$)

[†]: Probabilidad > Distancia Mahalanobis para la distancia al cuadrado para Pob.

Apéndice 7. Eigenvalores y prueba de hipótesis nula del espacio canónico de *Picea mexicana* Martínez.

Función	Eigenvalores de $INV(E)^*H = CanRsq/(1-CanRsq)$				Prueba de H_0 [†]				
	Eigenvalor	Diferencia	Proporción	Acumulativo	Proporción de probabilidad	Valor de F aproximado	Num DF	Den DF	Pr > F
1	4.11	2.79	0.76	0.76	0.084	15.99	30	196	<.0001
2	1.32		0.24	1.00	0.430	9.37	14	99	<0.001

[†]: Las correlaciones canónicas en las siguientes hileras corresponden a cero