

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES
DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA
DEL GÉNERO *Podocarpus* L'HÉR. EX PERS.
(PODOCARPACEAE) EN CHIAPAS, MÉXICO.**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

JORGE MARTÍNEZ MELÉNDEZ



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2016.

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DEL GÉNERO *Podocarpus* L'HÉR. EX PERS. (PODOCARPACEAE) EN CHIAPAS, MÉXICO.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

JORGE MARTÍNEZ MELÉNDEZ

DR. MIGUEL ÁNGEL PÉREZ FARRERA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS,
UNICACH
DIRECTOR

DR. ANDRÉW P. VOVIDES
LABORATORIO DE BIOLOGÍA EVOLUTIVA
DE CYCADALES, INSTITUTO DE ECOLOGÍA,
A.C.
CO-DIRECTOR

DR. EDUARDO ESPINOZA MEDINILLA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS,
UNICACH
ASESOR

DR. SERGIO LÓPEZ MENDOZA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS,
UNICACH
ASESOR



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Agosto de 2016.

ÍNDICE GENERAL

	No. de Página
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN	5
3.1.La especie como unidad de estudio.....	7
IV. MARCO TEÓRICO	10
4.1.El concepto unificador de especie.....	10
4.2.Caracteres tradicionales y nuevas herramientas para la delimitación de especies.....	12
4.3.Descripción de la familia y el género.....	13
4.4.Distribución geográfica de <i>Podocarpus</i>	14
4.5.La problemática de <i>Podocarpus</i> en México.....	15
V. OBJETIVOS	17
5.1.General.....	17
5.2.Particulares.....	17
VI. HIPÓTESIS	17
VII. MATERIALES Y MÉTODO	17
7.1.Zona de estudio.....	17
7.1.1.Localización del área de estudio.....	17
7.2.Variación morfológica.....	20
7.2.1.Trabajo de campo.....	20
7.2.2.Análisis de datos morfológicos.....	23
7.3.Variación genética.....	24
7.3.1.Obtención de muestras.....	24
7.3.2.Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.....	24
7.3.3.Análisis de datos genéticos.....	26
VIII. RESULTADOS	28
8.1.Análisis univariado.....	28
8.1.1.Análisis de varianza.....	28
8.2.Análisis multivariado.....	31
8.2.1.Análisis de componentes principales (PCA).....	31
8.2.2.Análisis discriminante (DA).....	33
8.3.Análisis genéticos.....	35
8.3.1.Análisis de clústers de distancias genéticas.....	36
8.3.2.Variabilidad genética.....	38
8.3.3.Índice de Tajima.....	39
8.4.Tratamientos taxonómicos y descripción de las especies.....	40
8.4.1. <i>Podocarpus oleifolius</i> D. Don ex Lamb.....	41

8.4.2. <i>Podocarpus matudae</i> subsp. <i>matudae</i>	41
8.4.3. <i>Podocarpus matudae</i> subsp. <i>jaliscanus</i>	42
8.5. Categorías de riesgo.....	46
IX. DISCUSIÓN	47
X. CONCLUSIONES	53
XI. RECOMENDACIONES	54
XII. LITERATURA CITADA	55
10.1. Referencias electrónicas.....	68
XIII. ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	No. Pág.
1	A) Morfología del árbol de <i>Podocarpus</i> en el municipio de Tenejapa; B) Cono masculino en El Triunfo; C) Cono femenino (con epimacio) en Lagos de Montebello, Chiapas.....	14
2	Distribución actual de la familia Podocarpaceae a nivel mundial.....	15
3	Poblaciones exploradas y colectadas de <i>Podocarpus</i> en el estado de Chiapas, México. T) El Triunfo (Sierra Madre de Chiapas), N) Nahá (Montañas del Oriente) y C) Coapilla (Montañas del Norte).....	19
4	Variables morfológicas tomadas en seco de los ejemplares colectados según Stark-Schilling (2005) (1. Largo de la semilla, 2. Ancho de la semilla, 3. Largo del pedúnculo, 4. Largo del receptáculo, 5. Ancho del receptáculo, 6. Ancho de la hoja, 7. Largo de la hoja, 8. Ancho de la vena central, 9. Distancia entre hojas, 10. Largo de la escama terminal, 11. Ancho de la escama terminal, 12. Largo del mucrón).....	21
5	Visualización de la extracción de ADN de cinco individuos de la población de <i>Podocarpus</i> de Coapilla, en gel de Agarosa al 1%.....	24
6	Visualización de las bandas amplificadas de ADN en gel de Agarosa al 2% (De izquierda a derecha se muestran: Nh3, Nh5, Tr2, Tr3, Cp4 y Cp5).....	25
7	Ejemplo de alineamiento de las secuencias mediante el programa Clustal X para observar el número de sitios variables en las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> de Chiapas.....	26
8	Variables analizadas mediante la prueba de Contraste Kruskal-Wallis (datos no normales) de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	30
9	Variables analizadas mediante el Análisis de varianzas (ANOVA) para datos normales de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	31
10	Análisis de componentes principales (PCA) que muestran grupos de poblaciones usando las variables con mayor peso de los datos de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	32
11	Análisis discriminante mostrando la separación de grupos de poblaciones de <i>Podocarpus</i> analizadas.....	34

12	Clúster de distancias mediante UPGMA utilizando MEGA v5.0 de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	37
13	Clúster obtenido mediante la prueba del Vecino más cercano (NJ) con el programa MEGA v5.0 de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	37
14	Clúster de Máxima verosimilitud (ML) mediante el programa Mega v5.0 de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	38
15	Morfología de la rama de <i>Podocarpus oleifolius</i> D. Don ex Lamb. en la población de Coapilla. A) Ejemplar en vivo, B) Ejemplar de herbario.....	41
16	Morfología de la rama de <i>Podocarpus matudae</i> subsp. <i>matudae</i> en la población de El Triunfo. A) Ejemplar en vivo, B) Ejemplar de herbario.....	42
17	Morfología de la rama de <i>Podocarpus matudae</i> subsp. <i>jaliscanus</i> en la población de Nahá. A) Ejemplar en vivo, B) Ejemplar de herbario.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Título	Página No.
1	Datos de morfología gruesa para la toma de datos de <i>Podocarpus</i> según Stark-Schilling (2005). Algunas variables consideran ausencias (0, cero) y presencias (1).....	22
2	Caracteres morfológicos usados en el DA y PCA de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	23
3	Poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas analizadas en el presente estudio.....	28
4	Datos de Kruskal-Wallis para datos no normales de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	29
5	Análisis de varianza (ANOVA) para variables normales de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	31
6	Valores de la matriz de correlación y resultados estadísticos de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	32
7	Factores coordinados de las variables, basado en correlaciones. Se muestran solo tres de los doce factores analizados y en negritas los que presentaron los valores más altos de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	33
8	Distancias cuadráticas de Mahalanobis (negritas) entre las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> de Chiapas.....	34
9	Resumen del análisis discriminante de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> de Chiapas, donde se muestran el nivel de significancia (Wilks' Lambda: 0,03768 approx. F (24,272)=47,055 p<0,0000).....	35
10	Coeficientes de funciones discriminantes estandarizadas para los factores más importantes de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> de Chiapas.....	35
11	Individuos utilizados en la amplificación de ADN mediante la técnica de PCR de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> en Chiapas.....	36
12	Variación genética y divergencia entre las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> de Chiapas, mediante el uso de secuencias de ADNcl.....	39
13	Valores de flujo genético entre dos de las tres poblaciones de <i>Podocarpus</i> de Chiapas.....	39
14	Comparación del Índice de Tajima (<i>D</i>) entre poblaciones	

	utilizando los programas MEGA y DnaSP.....	40
15	Claves para diferenciar las especies de <i>Podocarpus</i> en Chiapas (Basado y modificado de Mill, 2015). Se anexan otras especies parecidas.....	43
16	Comparación de las características morfológicas de las tres especies de <i>Podocarpus</i> en México, según Mill (2015).....	45

“Como un río, la evolución avanza donde encuentra menos resistencia...”

DEDICATORIA

A mis preciosas sobrinas:

Rebecca y Melissa

AGRADECIMIENTOS

A Dios (esa fuerza desconocida que hace posible la chispa de vida) nuevamente por prestarme tiempo para terminar otra etapa de mi desarrollo profesional.

A mis padres nuevamente: Lucelia y Jorge, los amo. Porque me siguieron apoyando en este camino y me han demostrado ser los mejores padres y maestros del mundo.

A mis hermanos: Nayely y Manuel, y a toda mi maravillosa familia. Son quienes me han alentado a seguir y a no haber tirado la toalla durante este proyecto.

Al Dr. Miguel Ángel Pérez Farrera, por su apoyo en el desarrollo del proyecto, por las enseñanzas, por ser un amigo y por confiar en que concluiría este trabajo.

A mis compañeros del Herbario Eizi Matuda: Rubén, Angelita, Anahí, Héctor, César, Armando, Francisco, Kaleb, Eduardo, quienes me apoyaron durante el trabajo de campo y de herbario, les agradezco.

A mis compañeros de la generación: Nayely, Angélica, Héctor, Sara, Xóchitl, Sofía, Manuel y Hugo, por los momentos que pasamos en clases y en campo, fue muy padre!!.

A mis maestros: Dr. Miguel, Dr. Sergio, Dr. Medinilla, Dr. César, Dr. Felipe, Dr. Nettel, Dra. Tamara, Dra. Clara Luz, Dra. Silvia, por sus enseñanzas.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Evolutiva: Andrea, Christian, Nancy, Lupita, Gaby, Xóchitl y Sofía, por el apoyo con los análisis genéticos y los gratos momentos.

A mis amigos David, Bernardo, Manuel, Alonso, Claudia, Carlos, Tito y Malintzi, por esos buenos y malos ratos que hemos tenido pero que a final de cuentas han reforzado esa amistad por años.

Y por último y no menos importantes, a aquellas personas que de una u otra forma han sido parte de mi vida y que me han dejado muy buenos recuerdos e importantes lecciones.

I. RESUMEN

Se estudió la diferenciación morfológica y genética en tres poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas, México. Para el análisis morfológico se midieron 12 variables de 150 muestras, a partir de 29 individuos adultos, a los que se aplicaron análisis univariados para determinar niveles de significancia en los datos, y análisis multivariados para separar grupos de poblaciones. El análisis genético se realizó a partir de cinco secuencias de ADN a partir de las regiones Trn-L y Trn-F del ADN de cloroplasto para establecer relaciones entre poblaciones, obtener los clúster de distancias genéticas, así como calcular valores de variación y diferenciación genética entre las mismas. Los análisis univariados indican que hay diferencias significativas para cada una de las variables morfológicas de las tres poblaciones. El PCA indica que dos factores explican más de la mitad de la variación de los datos originales y el DA agrupa los datos en dos grupos de poblaciones: Coapilla y Nahá-El Triunfo. Las distancias de Mahalanobis predicen que El Triunfo y Nahá son las más relacionadas. El valor de Wilks-Lambda para las 12 variables fue estadísticamente significativo. Las funciones canónicas estandarizadas muestran que las dos variables que mejor separan a los grupos de especies son el largo de la semilla y ancho de la semilla. El análisis genético muestra secuencias de aproximadamente 900 pb. Los clúster de distancias genéticas UPGMA, NJ y ML muestran dos grupos de poblaciones: Nahá-El Triunfo y Coapilla. La diversidad nucleotídica predice que Nahá y El Triunfo son las poblaciones más similares y Coapilla y Nahá las más diferentes. Se reconocen dos especies para Chiapas: *Podocarpus oleifolius* en Coapilla y *Podocarpus*

matudae en Nahá y El Triunfo, además de que estas últimas dos poblaciones corresponden cada una a una subespecie diferente. El índice de Tajima predice que la diferencia genética entre las poblaciones podría ser efecto de la deriva genética y la endogamia.

Palabras clave. Especie, taxonomía, extinción, NOM-059-SEMARNAT-2010, genes.

II. ABSTRACT

Morphological and genetic differentiation was studied in three populations of *Podocarpus* of Chiapas, Mexico. For morphological analysis 12 variables 150 samples were measured, from 29 adult individuals, who univariate analyzes were applied to determine significance levels in the data and multivariate analyzes to separate groups of populations. Genetic analysis was performed from five DNA sequences from the Trn-L and Trn-F regions of the chloroplast DNA to establish relationships between populations obtain the cluster of genetic distances and calculate values of variation and genetic differentiation therebetween. Univariate analyzes indicate that there are significant for each of the variables morphological differences among the three populations. The PCA indicates that two factors account for more than half of the variation in the original data and the DA groups the data into two population groups: Coapilla and Nahá-El Triunfo. Mahalanobis distances predict that El Triunfo and Nahá are most related. The value of Wilks-Lambda for 12 variables was statistically significant. Standardized canonical functions show that the two variables that best separate the groups of species are seed length and width of the seed. Genetic analysis shows sequences of about 900 bp. The cluster of genetic distances UPGMA, NJ and ML show two population groups: Nahá-El Triunfo and Coapilla. The nucleotide diversity predicts that Nahá and El Triunfo are the most similar populations and Coapilla and Nahá more different. Two species are recognized for Chiapas: *Podocarpus oleifolius* in Coapilla and *Podocarpus matudae* in Nahá and El Triunfo, in addition to these last two populations each corresponding to a different subspecies. Tajima index

predicts that the genetic difference between populations could be the effect of genetic drift and inbreeding.

Key words. Specie, taxonomy, extinction, NOM-059-SEMARNAT-2010, genes.

III. INTRODUCCIÓN

Los caracteres morfológicos, tradicionalmente, han servido como la única base para la mayoría de los estudios taxonómicos (Stevens, 1984; 1986). Estos caracteres han generado el sistema básico de clasificación para la mayoría de los taxa. En la medida que estos sistemas se pretenden refinar, se han usado datos adicionales como: número de cromosomas, fitoquímica, micromorfología, anatomía y ultraestructura entre otros (Bisby *et al.*, 1980; Ferguson, 1980; Grant, 1984).

Cerritos en Eguiarte *et al.* (2007) menciona que en el reconocimiento de las especies la forma comúnmente utilizada es intuitivamente muy sencilla: basta con la utilización de cualquier tipo de caracteres morfológicos, conductuales, fisiológicos u otros para descartar o en su defecto integrar individuos a estas entidades biológicas. Este tipo de reconocimiento se formalizó antes de la teoría evolutiva, en especial con Linneo, quien en 1753 propuso un sistema binomial que permitió estandarizar la clasificación de los seres vivos, y que además introdujo, en 1757 el concepto de especie como una forma de reconocer a las distintas entidades biológicas creadas por un ser superior, es decir, un Dios. Este tipo de reconocimiento a través de cualquier carácter morfológico se conoce en honor a Linneo como concepto linneano o morfológico de especie (Mayden, 1997). Por lo general, este tipo de caracteres se asocian con el método fenético, que tiene como característica principal la de tomar la mayor cantidad posible de caracteres independientemente de su relación ancestro-descendiente. El concepto fenético de especie forma grupos de acuerdo con la similitud de una gran cantidad de caracteres (Sneath, 1976), incluyendo los moleculares.

Algunos de los problemas más comunes que se presentan en el momento de reconocer y, sobre todo, de delimitar especies son casos como las homoplasias, en que las variantes de determinado carácter provienen de más de un ancestro común. Los caracteres fenotípicos, principalmente morfológicos, conductuales y en algunos casos fisiológicos y bioquímicos, están expuestos a experimentar convergencias evolutivas -un tipo de homoplasia- en donde los

caracteres tienden a converger en forma y función independientemente de la relación ancestro-descendiente. Además, un carácter fenotípico es producto no solo de la información genética, también el ambiente y la interacción entre genes y ambiente lo moldean; por ejemplo, puede ser que las diferencias encontradas a nivel morfológico no existan a nivel genético y lo que se observe sea simplemente producto de una plasticidad fenotípica (Falconer, 1989; Cerritos en Eguiarte *et al.* 2007).

Plasticidad fenotípica significa, por lo tanto, cualquier tipo de variación fenotípica inducida por el ambiente, sin que sean necesarias alteraciones en los genes (Bradshaw, 1965; Stearns, 1989). Así, para las plantas, que carecen de los complejos mecanismos de movimiento y comportamientos peculiares de los animales, la plasticidad fenotípica es una herramienta adaptativa muy importante para soportar las variaciones climáticas y edáficas (Bradshaw, 1965). Entonces, cuando tomamos caracteres con plasticidad fenotípica o que han experimentado convergencias evolutivas, los límites de una especie pueden ser erróneos. Tal y como lo plantean Clausen, Keck y Hiesey (1940), en sus estudios de *Achillea* y *Potentilla* en California demuestran la distinción entre la determinación del medio ambiente y la genética de los rasgos, además de la diferenciación en rasgos cuantitativos y cualitativos (fenotipos) de las plantas. Por otro lado, los caracteres fenotípicos no son los únicos expuestos a homoplasias, también los marcadores moleculares pueden experimentar convergencias evolutivas, evolución paralela y reversiones a estados ancestrales (Bradshaw, 1965).

El clima como factor medioambiental, es uno de los principales factores que actúan sobre la vegetación, afectando tanto su composición florística (Elleberg, 1963) como a los caracteres morfológicos y funcionales de las especies que la conforman (Floret *et al.*, 1990; Specht, 1969), tal es el caso de algunas especies del género *Podocarpus* en México, a los cuales se les han asignado distintos nombres y que al parecer corresponden a una misma especie (Contreras-Medina *et al.*, 2006). Biswas y Johri (1997) mencionan que la familia Podocarpaceae es de gran interés porque muestra una amplia gama de caracteres morfológicos (forma y

arreglo de las hojas, escamas, conos masculinos y femeninos, etc.) y anatómicos (Stockey *et al.*, 1992; Stockey *et al.*, 1998; Mill y Stark-Schilling, 2009). Sin embargo, Stark-Schilling (2005) menciona que el género *Podocarpus* presenta problemas taxonómicos por poseer pobres caracteres morfológicos, como los que reconocen Buchholz y Gray (1948) para separar secciones: número y posición de los canales resiníferos de las hojas, tejido de transfusión accesoria de las hojas, presencia de “florin ring” rodeando al estoma, las brácteas ubicadas debajo del receptáculo del cono femenino, la forma de la superficie superior de las hojas y la posibilidad de una cresta en la parte terminal de las semillas, generando así mucha controversia y confusión en cuanto a la delimitación de los taxa.

En el estado de Chiapas, Breedlove (1981) reporta dos especies para dicho género, aunque este número podría ser mayor de acuerdo a los caracteres morfológicos de material de herbario. En muchos casos la delimitación morfológica de las especies de plantas vasculares en los trópicos es difícil debido a la escasez de material herborizado y al insuficiente inventario de sus áreas de distribución. Además, la recolección de pocas (muchas veces una sola) muestras en un lugar no permiten detectar la variabilidad local de los caracteres de importancia taxonómica, lo cual puede conducir a conclusiones erróneas (Zipp *et al.*, 2003).

Por lo tanto, el propósito del siguiente trabajo es diferenciar morfológica y genéticamente algunas poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas, mediante un análisis fenético y utilizando secuencias de ADN de cloroplasto, con la finalidad de observar la diversidad genética de las mismas y diferenciar las especies que existen en el estado, las cuales, debido a la poca exploración de sus poblaciones aún no han sido analizadas, además que podrían dar pauta para estudios posteriores sobre su manejo y conservación dentro de las áreas naturales protegidas donde tienen su distribución.

3.1. La especie como unidad de estudio

Tinaut y Ruano, en Soler (2002) mencionan que los seres vivos, tanto en la naturaleza como en los ambientes artificiales, se muestran en su mayoría como

“entidades discretas”, bien por la forma, el color u otras características. Esta discontinuidad permite establecer diferentes clases, modelos o categorías, las cuales son la base para los estudios sobre su diversidad y evolución, y han sido denominadas tradicionalmente como “especies”. Conseguir una definición de especie aquilatada y generalizada viene intentándose desde Platón y Aristóteles y es un tema debatido con profusión a partir del siglo XIX, como resultado del afianzamiento de la teoría evolutiva. El resultado es que actualmente se pueden contar más de veinte conceptos diferentes de especie, buena parte de los cuales se diferencian por pequeños matices y no son de uso habitual. Algunos de ellos son:

Concepto tipológico de especie: Adoptada por Linneo y sus precursores, mencionan que “es aquella que corresponde al holotipo” (ejemplar tipo que constituye el modelo o referente de una especie).

Concepto biológico de especie: Mayr (1991) lo define como “grupos de poblaciones actual o potencialmente reproductoras que están reproductivamente aisladas de otros grupos similares”. Considera que no sólo las características morfológicas pueden servir para definir a una especie, sino que la existencia de un aislamiento reproductor justifica, en último extremo, la validez o no de los caracteres morfológicos utilizados. Este inconveniente junto con la existencia de organismos asexuales, representan los dos problemas más importantes para la aceptación general de este concepto.

Concepto evolutivo de especie: Simpson (1961) menciona que una especie evolutiva “es un linaje (una secuencia de poblaciones ancestro-descendiente) que evoluciona separadamente de otros y con su propio papel y tendencias en la evolución”. El concepto evolutivo de especie implica que existe un origen, una existencia y un fin para cada especie.

Concepto filogenético de especie: Hennig (1966) la define como “grupos de individuos que están interconectados por relaciones tocogenéticas (relaciones genealógicas entre individuos)”. Hennig tiene el gran mérito de distinguir entre

ontogenia, tocogenia y filogenia. La ontogenia es la historia del desarrollo del individuo, la tocogenia el desarrollo histórico de un grupo de individuos interconectados genéticamente y la filogenia la historia evolutiva de las especies. Meier y Willmann (2000) sugieren una modificación a la definición de Hennig señalando que: las especies son poblaciones naturales reproductivamente aisladas que se originan a través de la disolución de la especie troncal en un proceso de especiación y dejan de existir bien por extinción o por una nueva especiación.

Concepto ecológico de especie: Van Valen (1976) menciona que se refiere a un linaje (o grupo de linajes fuertemente relacionados) que ocupa una zona adaptativa mínimamente diferente a la de otros linajes. La forma de reconocer las especies ecológicas es correlacionando las condiciones y los recursos del ambiente con algunas características adaptativas, generalmente morfológicas, de cada una de las poblaciones en evaluación.

Concepto genético de especie: Ravin (1963) la define como un grupo de individuos con capacidad de intercambiar información genética por medio de la conjugación, transducción o transformación. Posteriormente, con el avance de las técnicas en biología molecular, Wayne *et al.* (1987) proponen con base en este concepto una manera de reconocer y delimitar especies: aquellas muestras que tengan más del 70% de hibridación ADN-ADN serán consideradas como una misma especie.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. El concepto unificador de especie

De Queiroz (2007) menciona que las especies son una de las unidades fundamentales de la biología, haciéndolo comparable en importancia a los conceptos de genes, células y organismos. Sin embargo, en el último medio siglo, la cuestión de la delimitación de las especies ha sido confundida por un problema relacionado con el concepto de especie en sí misma. En una serie de artículos (De Queiroz, 1998; 1999; 2005a; 2005b; 2005c) ha tratado de plantear una alternativa para resolver el problema de la conceptualización y delimitación de las especies, así como analizar los diferentes conceptos para unificarlos en uno solo, lo cual permitirá a los biólogos abordar de manera más sencilla este antiguo inconveniente.

¿Cómo reconcilia estos diferentes conceptos? De Queiroz (2007) menciona que la clave para conciliar los conceptos alternativos de especie se basa en la identificación de tres aspectos importantes: 1) Ubicar el elemento de uso o de un elemento común (similitudes) para no hacer hincapié en las diferencias, las cuales tienden a oscurecer la solución. Considera para ello a las especies como segmentos de linajes (serie de ancestro-descendiente) metapoblacionales a través del tiempo (Simpson, 1951). El punto es que las especies dan lugar a otras especies, formando de esta manera linajes. Cualquier especie dada no es sino uno de los muchos segmentos que componen un linaje tal de un nivel de especie (De Queiroz, 1998). No se debe confundir con un grupo clado monofilético compuesto de varios linajes (ramas separadas), más bien se refiere a una metapoblación que incluye a la población compuesta de subpoblaciones conectados (Levins, 1970); 2) considera las diferencias que se generan a partir de todos los conceptos de especie, creando estas “propiedades secundarias” dadas por la misma definición, y que a pesar de compartir un elemento común fundamental, no obstante, pueden conducir a conclusiones diferentes acerca de cuáles linajes merecen ser reconocidos como especie, y 3) obtener un concepto unificado de especie, en el que conserva el elemento que es común a todos los

conceptos de especies contemporáneas, y elimina los conflictos entre esos conceptos rivales sin negar la importancia de las propiedades que son la base de sus diferencias obvias. Estas diferencias sirven como criterios operativos importantes o líneas de evidencia que sirvan para evaluar la separación de los linajes y su divergencia (existencia de diferentes especies), manteniendo relación directa con el tema de la delimitación de las especies. Además, pueden ser utilizadas para definir subcategorías de la categoría de especies, para reconocer diferentes clases de especies basándose en las propiedades que aquellas especies poseen (p.e. especie biológica-especies aisladas reproductivamente, especie ecológica-especies ecológicamente diferenciadas, especie filogenética-especies monofiléticas, etc.) (De Queiroz, 2007).

Claramente esto también tiene consecuencias para la cuestión de la delimitación de especies, una de las cuales es que separa claramente el problema conceptual de la definición de la categoría de especie (conceptualización de especies) desde el problema metodológico de inferir los límites y el número de especies (delimitación de especies). La siguiente es que muchas propiedades diferentes son pertinentes a la cuestión de la delimitación de especies. Esta práctica crea la situación indeseable en la que cada concepto alternativo de especie hace hincapié indebidamente en solo una de las diversas propiedades y a expensas de las demás (Bush, 1995), lo que crea una batalla entre biólogos sobre cual propiedad debería ser considerada la más importante, y por último, la ausencia de uno o más propiedades cualesquiera no constituye una evidencia que contradiga la hipótesis de la separación del linaje. En otras palabras, un linaje puede carecer de una o más de estas propiedades incluso si está evolucionando por separado de todos los otros linajes. La razón, por supuesto, es que el linaje simplemente puede no haber evolucionado de las propiedades, como podría esperarse si todavía está en las primeras etapas de la divergencia (De Queiroz, 2007).

4.2. Caracteres tradicionales y nuevas herramientas para la delimitación de especies

En su revisión de *Podocarpus*, Buchloz y Gray (1978) utilizan los caracteres de la anatomía foliar para delimitar las especies. Dentro de ellos destacan el tamaño y forma de la hoja, la superficie y nervio medio, escamas de las yemas y, finalmente los caracteres reproductivos que son de suma importancia, como el largo del pedúnculo y el largo y ancho del receptáculo, entre otros. Los estudios de micromorfología cuticular para la observación de la disposición y forma de los estomas en la cara abaxial y adaxial de las hojas también han sido usados para la caracterización de géneros y especies de coníferas (Mill y Stark-Schilling, 2009).

Estos análisis han sido aplicados en muchos grupos de angiospermas y gimnospermas: *Hymenocallis* (Amaryllidaceae) Raymunde *et al.* (2005); *Gnetum* (Gnetaceae) Jáuregui y Benítez de Rojas (2005); *Pinus* (Pinaceae) Garcia *et al.* (2009); *Ceratozamia* (Zamiaceae) Vovides *et al.* (2012), Pérez-Farrera *et al.* (2014).

Por otro lado, algunas técnicas moleculares que ayudan a revelar la variación genética de una población son a) Microsatélites (STR): secuencias cortas repetitivas, b) DNA fingerprint (VNTR): minisatélites o número variable de secuencias repetitivas, c) Secuenciación de ADN, d) Nucleótidos polimórficos sencillos (SNP), e) Polimorfismo no sinónimo, f) Polimorfismo sinónimo, g) Índice de deleciones/inserciones polimórficas (Indel), h) Fragmentos largos de restricción polimórfica (RFLP), i) Fragmentos largos de amplificación polimórfica (AFLP) y j) Hebras cortas de conformación polimórfica (SSCP) (Frankham *et al.*, 2004).

Los estudios filogeográficos en plantas, recientemente con gran auge, han mostrado que el uso de marcadores citoplásmicos (principalmente del ADN de cloroplasto, cpADN), además de permitir inferencias sobre patrones históricos de migración, colonización y demografía (McCauley, 1995) pueden también revelar eventos históricos y contemporáneos de hibridación e introgresión difíciles de

detectar mediante análisis morfológicos o marcadores nucleares (Rieseberg y Soltis, 1991).

En el caso de *Podocarpus*, las técnicas modernas incluyen análisis moleculares y genéticos, como por citar algunos: análisis de ADNr (ADN ribosomal) (Kelch, 1998; Murray *et al.*, 2002), ADNcp (ADN de cloroplastos) (Taberlet *et al.*, 1991), ADNc (ADN complementario o copia) (Vázquez-Lobo *et al.*, 2007), todos ellos asociados a la parte morfológica y anatómica (Kausic, 1975; Stockey *et al.*, 1998; Mill y Stark-Schilling, 2009).

El uso de secuencias ha sido útil para expandir la descripción de la biodiversidad y clarificar si algunas formas más o menos distintas en su fenotipo o aisladas geográficamente son especies diferentes o no (García-Moreno, 2003). Por otro lado, solo hasta que se incluyeron secuencias de ADN en la determinación de especies, se ha podido identificar nuevas especies que fenotípicamente son idénticas a otras (Molbo *et al.*, 2003).

4.3. Descripción de la familia y el género

Las especies de la familia Podocarpaceae existentes presentan las hojas y otras partes dispuestas en hélice, algunas son opuestas. La hoja varía de sésil, decurrente a falcada con una sola vena principal y plana, y contiene algunas venas paralelas (Biswas y Johri, 1997).

Asimismo, Page (1847) en Kramer y Green (1998) menciona que el género *Podocarpus* se caracteriza por ser árboles siempre verdes, dioicos, raramente arbustos (Figura 1A). Hojas principalmente linear-lanceoladas o linear-elípticas a estrechamente elongadas, amfistomáticas o (usualmente) hipostomáticas, cada una con un nervio central prominente más o menos conspicuo en la parte inferior con múltiples canales resiníferos, espiralmente arregladas a subopuestas, extendidas ampliamente en torno a los brotes. Conos masculinos solitarios o en grupos en las axilas de las hojas, pedúnculos axilares (Figura 1B). El polen presenta dos sacos de aire. Los conos femeninos usualmente son óvulos solitarios o raramente más, terminales, desnudos, con brácteas axilares, poco carnoso o

brillante, similar a una drupa o nuez, elipsoide-globoso, frecuentemente apiculado, receptáculo algo apretado que se vuelve hinchado y carnoso y, a menudo, muy colorido cuando madura (epimacio) (Figura 1C). Las semillas son solitarias, con dos cotiledones (Hernández, 2006).

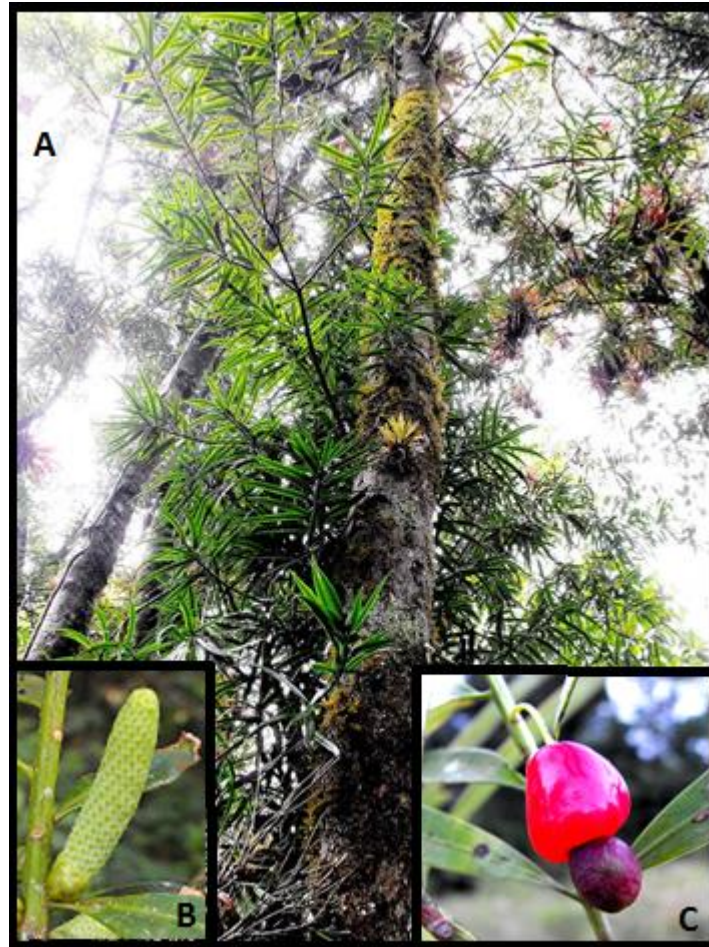


Figura 1. A) Morfología del árbol de *Podocarpus* en el municipio de Tenejapa; B) Cono masculino en El Triunfo; C) Cono femenino (con epimacio) en Lagos de Montebello, Chiapas (Fotos por Jorge Martínez Meléndez).

4.4. Distribución geográfica de *Podocarpus*

El género *Podocarpus* consta de aproximadamente 100 especies, y se encuentra ampliamente extendido por el hemisferio sur, y hacia el noroeste de la India, México, sureste de China y sureste de Japón (Figura 2). En el continente americano, la familia Podocarpaceae presenta su mayor diversidad en América del

Sur (Farjon, 1998) y en México es donde alcanza su límite más septentrional, en el estado de Tamaulipas (Contreras-Medina, 2004). Rzedowski (1981) menciona que en México, *Podocarpus* se encuentra en los bosques mesófilos de montaña asociado a otras gimnospermas como *Pinus* y *Abies*, además de diversas cicadáceas como *Ceratozamia*, *Dioon* y *Zamia*, el cual es uno de los ecosistemas más diversos y a su vez de los más amenazados.

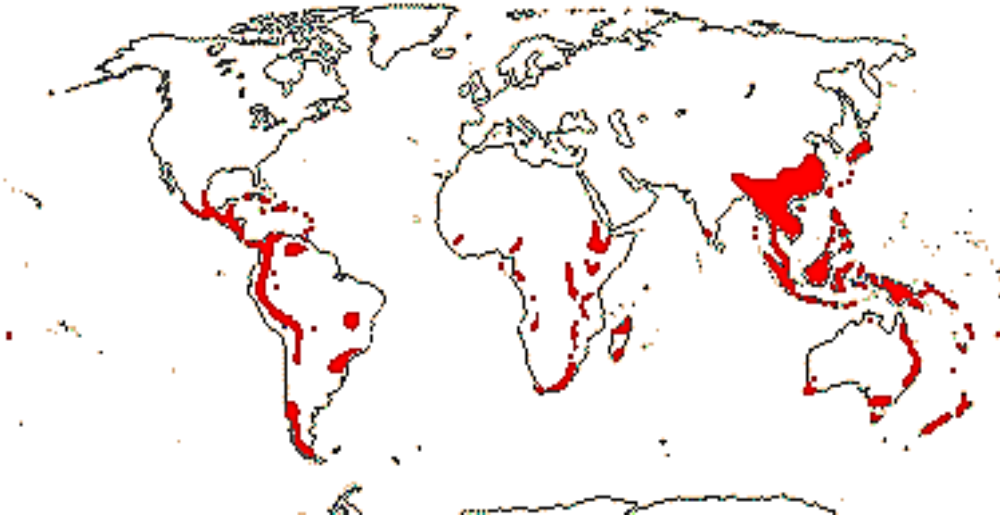


Figura 2. Distribución actual de la familia Podocarpaceae a nivel mundial (Fuente: www.mobot.org¹).

4.5. La problemática de *Podocarpus* en México

Muchos de los estudios realizados para el género a nivel mundial incluyen análisis sobre su morfología, más recientemente análisis genéticos y moleculares, así como anatómicos han adquirido mayor importancia. *Podocarpus* en México también es un caso controversial cuando de delimitar las especies se trata, debido a que aún no se sabe con certeza cuántas especies habitan en nuestro país. Los primeros trabajos en los que se citan algunas especies del género son los de Sharp (1946) y el de Buchholz y Gray (1948a). Estos últimos reportan tres especies en México.

Zamudio (2002) y Stark-Schilling (2005) mencionan que en México la familia Podocarpaceae está representada por un género y cuatro especies.

Recientemente, Gernandt y Pérez-de la Rosa (2014) mencionan que en México existen tres de las 97 especies de *Podocarpus* (*P. guatemalensis*, *P. matudae* y *P. oleifolius*).

Por otro lado, el uso de las sinonimias incrementa esta incertidumbre, lo que resulta en altos porcentajes de especímenes nombrados erróneamente en la mayoría de los herbarios (Buchholz y Gray, 1948a). Un ejemplo en México es el de Contreras y Alcántara (2006), quienes consideran a *Podocarpus reichei* como una especie discreta, mientras que para otros autores es un sinónimo de *Podocarpus matudae* (De Laubenfels, 1985; Vovides *et al.*, 1997) e incluso llega a ser reconocida como una variedad llamada *Podocarpus matudae* var. *matudae* y reconociendo una segunda variedad: *Podocarpus matudae* var. *jaliscanus* (Silba, 1990; Mill, 2015).

Diversos estudios en México incluyen ciertas especies de la familia, principalmente de Chiapas (Breedlove, 1986), Guerrero (Lozada *et al.*, 2003), Oaxaca (Ruiz-Jiménez *et al.*, 2000) y Tamaulipas (Puig, 1993), o bien, por regiones, como Nueva Galicia (McVaugh, 1966, 1992), el Bajío (Zamudio, 2002) y la Sierra Madre Oriental (Contreras-Medina, 2004).

El trabajo de Breedlove (1986) menciona que en Chiapas ocurren dos especies de *Podocarpus*: *P. matudae* y *P. oleifolius*, mientras que Mill (2015) añade a *P. guatemalensis* en esta lista (tres especies); pero a falta de un análisis de todas las poblaciones existentes en la Sierra Madre de Chiapas, las Montañas del Oriente, Meseta Central y Montañas del Norte, se ha creado confusión acerca de la verdadera identidad taxonómica de cada una de ellas.

Por tal motivo, en el presente estudio se pretenden analizar los caracteres morfológicos cuantitativos para diferenciar entre las poblaciones, así como también analizar su diversidad desde la parte genética utilizando secuencias de ADN de Cloroplasto, que son útiles a bajos niveles taxonómicos (Wolfe *et al.*, 1987), y que debido a sus bajas tasas de evolución permiten detectar niveles interespecíficos (Taberlet *et al.*, 1991). Los conocimientos obtenidos pueden

contribuir a la conservación de la (s) especie (s) y establecer zonas para su conservación.

V. OBJETIVOS

5.1. General:

Caracterizar morfológica y genéticamente las poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas, México.

5.2. Particulares:

Determinar la variación morfológica a través de un análisis fenético.

Obtener un clúster de distancias genéticas entre poblaciones a través de secuencias de ADN de cloroplasto.

Determinar la variación y diferenciación genética a través de secuencias de ADN de cloroplasto.

Con base en los resultados de análisis genéticos y morfológicos, determinar si las poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas, corresponden a una misma entidad taxonómica.

Realizar una descripción morfológica de la (s) especie (s) de cada población analizada.

VI. HIPÓTESIS

Las poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas están compuestas por **especies discretas** (H_0) y **no por una sola especie polimórfica** (H_1), las cuales debido a la falta de información sobre su ecología, variación morfológica, genética, biología reproductiva y pérdida de caracteres en ejemplares de herbario ha llevado a tratarlas como una sola.

VII. MATERIALES Y MÉTODO

7.1. Zona de estudio

7.1.1. Localización del área de estudio

El estado de Chiapas se encuentra ubicado entre los 41°31' y 18° 0.5' de latitud Norte y entre los 5° 00' y los 8° 35' de longitud Este del meridiano de México, o sea entre los meridianos 90° 23' y 94° 08' al Oeste de Greenwich (Müllerried, 1957). Cuenta con una superficie de 70,254 Km² y presenta siete regiones fisiográficas.

De estas siete regiones, el género *Podocarpus* se distribuye solo en cuatro de ellas, que son: la "Sierra Madre de Chiapas" posee 280 Km de largo y entre 50 a 60 Km de ancho, su mayor altitud va desde los 1,500 msnm en el límite con Oaxaca hasta 4,000 msnm en el volcán Tacaná en el límite con Guatemala; la "Altiplanicie de Chiapas" tiene una extensión de 160 Km, con una anchura de 75 Km de suroeste o noreste, con altitudes de hasta 2,858 msnm; las "Montañas del Oriente" posee 150 Km de longitud y anchura de 70 a 100 Km, con altitudes que varían entre los 90 y 1,200 msnm y las "Montañas del Norte", con 250 Km de longitud y una anchura de 65 Km, posee altitudes entre los 800 y 1,500 msnm. El estudio realizado se basó en tres de ellas, solamente sin contar la Altiplanicie de Chiapas (Figura 3).

La población de El Triunfo (T) se encuentra a 15°40'58.6" LN y 92°40'58.6" LO a una altitud de 1800 msnm, en bosque mesófilo de montaña conservado, con suelos arenosos (Cambisoles) con una cubierta de materia orgánica y en pendientes de aproximadamente 50°, y un clima A(C) m(w) (templado húmedo con periodos de lluvias intensas y niebla frecuentes). La población de Nahá (N) se localiza a 16°58'28.6" LN y 91°35'04.4" LO a una altitud de 950 msnm, en acahuales de bosque tropical perennifolio, con suelos arenosos (Litosoles) y abundante materia orgánica, con pendientes bajas de aproximadamente 20° y un clima A f(m) (cálido húmedo con lluvias la mayor parte del año). La población de Coapilla (C) se ubica a 17°10'16.6" LN y 93°08'18.1" LO a 1950 msnm, en

acahuales de bosque mesófilo de montaña con elementos de bosque de *Pinus*, *Abies* y *Liquidambar*, en suelos arenosos (Litosoles) con materia orgánica abundante, pendientes de casi 35°, con clima (A)(C) f(m) (templado húmedo y periodos de lluvia, niebla y vientos frecuentes gran parte del año).

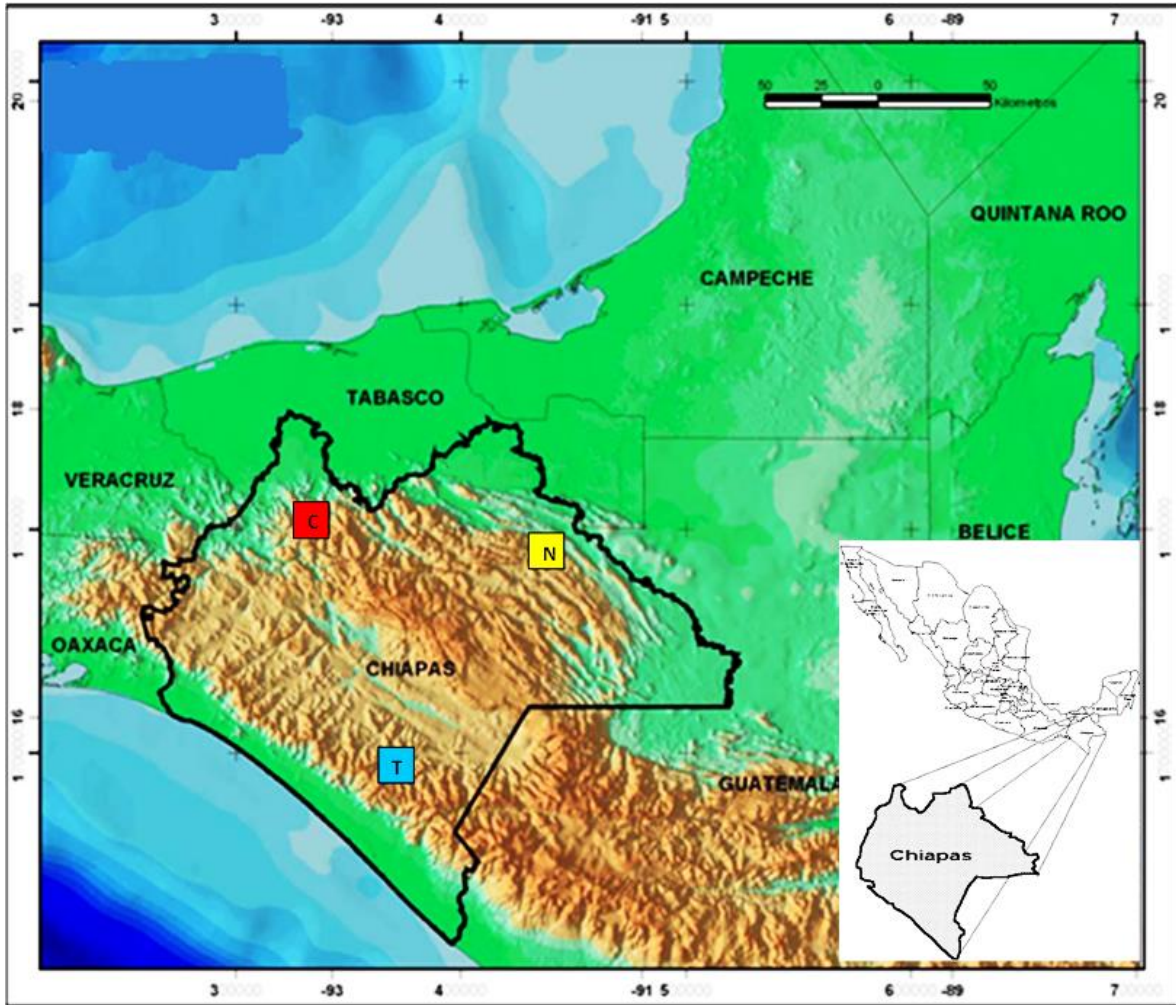


Figura 3. Poblaciones exploradas y colectadas de *Podocarpus* en el estado de Chiapas, México. T) El Triunfo (Sierra Madre de Chiapas), N) Nahá (Montañas del Oriente) y C) Coapilla (Montañas del Norte) (Fuente: Modificado de ECOSUR, 2002).

7.2. Variación morfológica

7.2.1. Trabajo de campo

Se muestrearon tres poblaciones de *Podocarpus*, las cuales se ubican en las regiones fisiográficas Sierra Madre de Chiapas, Montañas del Oriente y Montañas del Norte, del estado de Chiapas (Figura 3). Dicho muestreo se realizó de acuerdo a Long y Heath (1991), siguiendo las veredas, senderos de animales, cañadas y orillas de arroyos. Las poblaciones fueron georreferenciadas con un Geoposicionador marca Garmin®, de las cuales se colectaron como máximo 10 individuos adultos fértiles por población y de cada individuo se tomaron cinco muestras botánicas, las cuales se procesaron según Lot y Chiang (1986). Las muestras principales fueron resguardadas en el Herbario Eizi Matuda (HEM) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) y los duplicados fueron destinados a distintos herbarios como el Herbario del Instituto de Historia Natural y Ecología (CHIP), Instituto de Ecología A.C. (XAL), Herbario Nacional de México (MEXU), Missouri Botanical Garden (MO) y California Academy Sciences (CAS).

Cabe mencionar que los ejemplares se colectaron entre los meses de Octubre 2011 y Febrero de 2012 pues este es el periodo de fructificación, y que para cada ejemplar colectado se tomaron medidas de ancho la parte media de cada hoja, largo de la misma, distancia entre hojas, largo y diámetro del tallo, dimensión de nervadura, ápice y fruto, después de haber pasado por los procesos de secado y esterilizado (Figura 4). Dichos datos se tomaron con ayuda de un vernier digital marca Truper®, según lo establecido por Stark-Schilling (2005) para *Podocarpus* (Cuadro 1, Anexo 1).

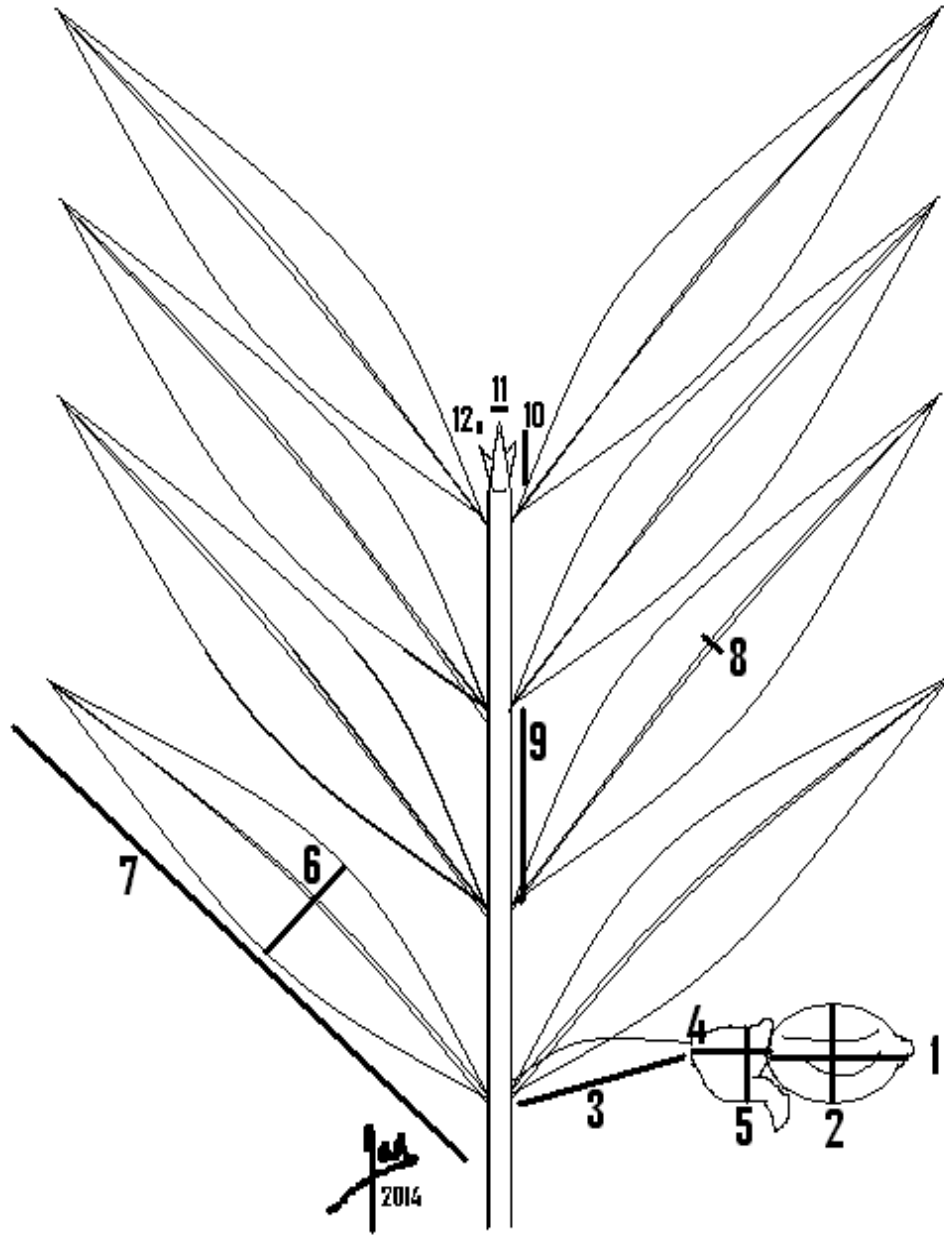


Figura 4. Variables morfológicas tomadas en seco de los ejemplares colectados según Sark-Schilling (2005) (1. Largo de la semilla, 2. Ancho de la semilla, 3. Largo del pedúnculo, 4. Largo del receptáculo, 5. Ancho del receptáculo, 6. Ancho de la hoja, 7. Largo de la hoja, 8. Ancho de la vena central, 9. Distancia entre hojas, 10. Largo de la escama terminal, 11. Ancho de la escama terminal, 12. Largo del mucrón) (Esquema por Jorge Martínez Meléndez).

Cuadro 1. Datos de morfología gruesa para la toma de datos de *Podocarpus* según Stark-Schilling (2005). Algunas variables consideran ausencias (0, cero) y presencias (1).

Brotos terminales	Curvatura ápice de la escama	
	Long Mucrón de escamas (mm)	
	Forma brote	
	Ancho escama (mm)	
	Largo escama (mm)	
	Filas de estomas (y-n)	
Hojas	Revolutas (No=0, Si=1)	
	Distancia entre hojas (mm)	
	Canal en envés (A=0, P=1)	
	Canal en haz (A=0, P=1)	
	Protuberancia en envés (A=0, P=1)	
	Protuberancia en haz (A=0, P=1)	
	Ancho vena central (mm)	
	Forma de la hoja	
	Forma del ápice	
	Largo mucrón (mm)	
	Mucrón (A=0, P=1)	
	Largo (mm)	
	Ancho (mm)	
	Cono masculino	Ancho (mm)
Largo (mm)		
Etapa maduración (I-M)		
Cono femenino	Receptáculo	Núm. Brácteas.
		Ancho (mm)
		Long (mm)
		Long. Pedúnculo (mm)
	Semilla	Cresta (s=1, n=0)
		Ancho (mm)
		Largo (mm)
		Número de semillas
		Etapa maduración (I-M)
No. de rama		
Número de individuo		
Localidad		

7.2.2. Análisis de datos morfológicos

De la lista de caracteres planteados por Stark-Schilling (2005) se descartaron aquellos que implicaran ausencias-presencias y los que tuvieran más de un estado de carácter (variables discretas), resultando en 12 variables continuas morfológicas, las cuales se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Caracteres morfológicos usados en el DA y PCA de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

No.	Nombre de variable	No.	Nombre de variable
1	Largo de semilla	7	Largo hoja
2	Ancho semilla	8	Ancho vena central
3	Largo pedúnculo	9	Distancia entre hojas
4	Largo receptáculo	10	Largo de la escama
5	Ancho receptáculo	11	Ancho de escama
6	Ancho hoja	12	Largo mucrón de escama

Análisis univariados: Las variables se analizaron de acuerdo a la normalidad que presentaron y los que no fueron normales se analizaron a través de una prueba de Contraste de Kruskal-Wallis (Siegel y Castellan, 1995). Para variables normales se analizaron a través de un análisis de Varianza (ANOVA).

Análisis multivariados: Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para obtener un pequeño número de variables que explican la mayoría de la variabilidad en los datos y posteriormente se realizó un Análisis Discriminante (DA) para determinar cómo se están utilizando las variables independientes para diferenciar entre los grupos de poblaciones en base a los caracteres morfológicos

Los análisis univariados como multivariados se realizaron con el programa STATGRAPHIC Plus Versión 5.1 y Statistica para Windows.

7.3. Variación genética

7.3.1. Obtención de muestras

Se colectaron muestras de hojas de 10 individuos por cada población de *Podocarpus* en las siguientes localidades: El Triunfo, Nahá y Coapilla, las cuales se colocaron en bolsas herméticas con Sílica gel. Las hojas colectadas se mantuvieron a -70°C en un congelador marca General Electric® hasta su posterior utilización. Las muestras se encuentran resguardadas en el Laboratorio de Ecología Evolutiva de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH).

7.3.2. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

El ADN genómico (Figura 5) fue obtenido con el método de Lisis celular/Fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico descrito originalmente por Hamilton *et al.* (1999) y modificado por Espinoza y García (2003).

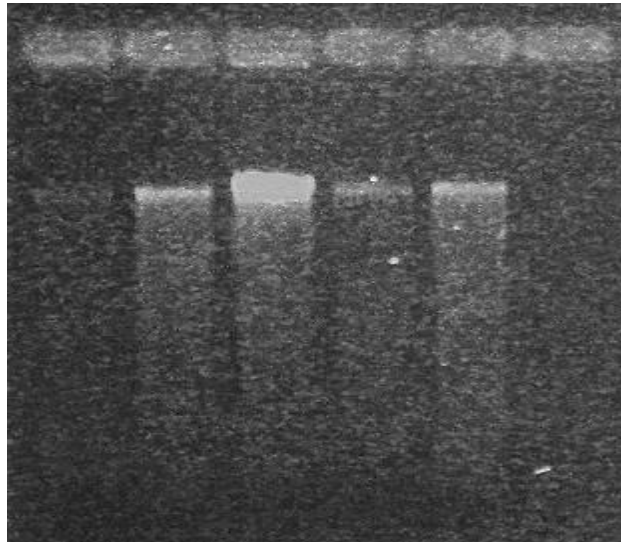


Figura 5. Visualización de la extracción de ADN de cinco individuos de la población de *Podocarpus* de Coapilla, en gel de Agarosa al 1%.

La amplificación del ADN se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para lo cual se utilizaron dos cebadores (o primers) de la región TrnL-F intron/spacer: C (5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3') y F (5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3') (Taberlet *et*

al., 1991). Este proceso se llevó a cabo en un termociclador Techne TC-3000®. Se realizó un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C; un ciclo de 45 minutos a 95°C; un ciclo de 45 segundos a 53°C (o 55°C según la especie); un ciclo de 1 hora con 30 minutos a 72°C y un ciclo final de 5 minutos a 72°C. Cabe señalar que de los pasos 2 al 4 pueden ser 25 o 30 ciclos dependiendo de la especie. Para cada 24µl de reacción PCR se utilizaron: 13µl de Green Master Mix, 10µl de agua libre de endonucleasas (Nuclease-Free Water), 1µl de cada primer y 1.5µl de ADN diluido.

El tampón de carga consistió de 2µl de ADN amplificado+1µl de Azul de Bromofenol y 3µl de escalera (Ladder) 100 pares de bases (pb)+1 µl de Azul de Bromofenol, durante un tiempo de corrimiento de 30 a 40 minutos a 100V. Finalmente las muestras de ADN amplificado se visualizaron en gel de Agarosa al 2% el cual fue teñido en Bromuro de Etidio. La imagen fue tomada con una cámara Finepix S1000® y editada en el programa Microsoft Office Picture Manager (Figura 6).

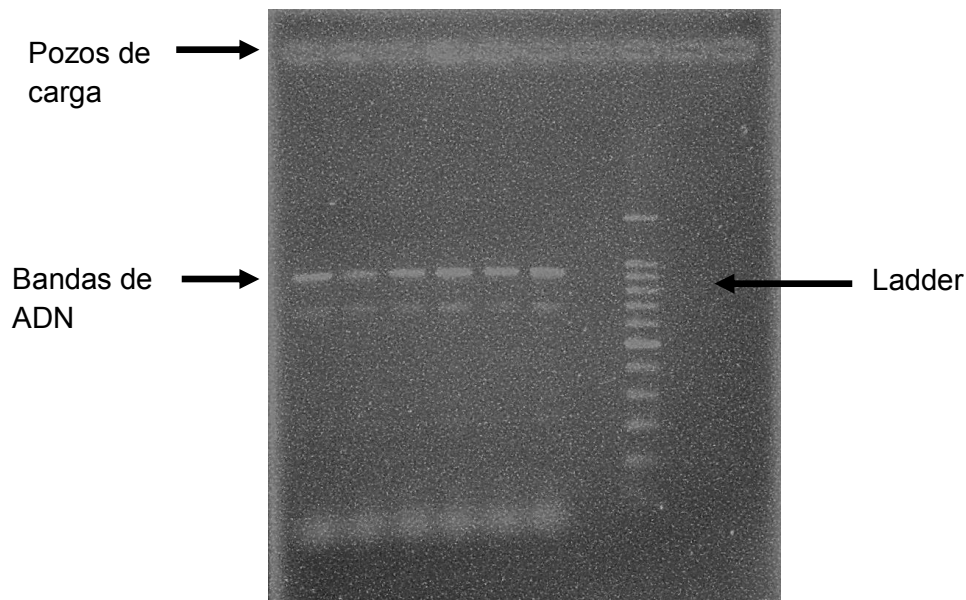


Figura 6. Visualización de las bandas amplificadas de ADN de *Podocarpus* en gel de Agarosa al 2% (De izquierda a derecha se muestran: Nh3, Nh5, Tr2, Tr3, Cp4 y Cp5).

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en la compañía MACROGEN en Seúl, Corea. Los cromatogramas se editaron con el programa CHROMAS Versión 2.33 (McCarthy, 1998-2008). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa CLUSTAL X Versión 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Posteriormente se revisaron manualmente para descartar posibles errores como los “huecos” (*gaps*, en inglés) que quedan en muchas ocasiones y que se pueden eliminar comparando con el resto de las secuencias (Figura 7).

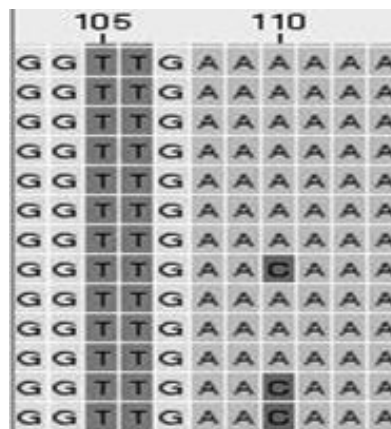


Figura 7. Ejemplo de alineamiento de las secuencias mediante el programa Clustal X para observar el número de sitios variables en las tres poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas.

7.3.3. Análisis de datos genéticos

Se llevó a cabo con el programa MEGA Versión 5.2 (Tamura *et al.*, 2007) a través de una prueba de Bootstrap con 1000 y 1500 repeticiones, mediante el cual se obtuvieron los árboles filogenéticos usando los análisis UPGMA o Método de distancias promedio (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic mean, en inglés) para identificar los clados principales, así como la prueba de Vecino más cercano o NJ (Neighbor-Joining, en inglés) y el criterio de optimización Máxima Parsimonia o MP (Maximum Parsimony, en inglés). También se calcularon las distancias genéticas para estimar las relaciones evolutivas entre poblaciones basadas en las similitudes intra e inter poblacionales utilizando el Parámetro 2 de Kimura (Kimura, 1980) y el modelo de Tamura y Nei (Tamura y Nei, 1993).

Se analizó la variabilidad y estructura genética mediante el programa DnaSP Versión 5 (Librado y Rozas, 2009) con los siguientes parámetros: sitios polimórficos (θ), que es la proporción de sitios nucleotídicos esperados en la muestra; diferencias nucleotídicas (Kt); diversidad de nucleótidos (π) que se refiere a la probabilidad de obtener al azar dos nucleótidos homólogos distintos de la muestra, diversidad de haplotipos (h) que es la probabilidad de obtener al azar dos secuencias en la misma muestra (Mancebo, 2007). También se obtuvo el flujo génico Nm (Nei, 1982), movimiento de genes de una población a otra y la diferenciación genética (Fst) (Hudson *et al.*, 1992). El cálculo del estadístico F permite determinar las diferencias genéticas entre localidades en donde los valores de $Fst = 0$ indican que no hay diferenciación genética entre poblaciones, mientras que los valores diferentes a cero estadísticamente significativos son un indicativo de diferenciación poblacional, es decir, presencia de estructura genética (Tripp, 2009).

Adicionalmente se calculó el índice D de Tajima (1989), el cual está basado en la detección de las diferencias de estimadores de diversidad genética (π) y el número de sitios variables en una secuencia (θ). Un valor esperado de D negativo indica la presencia de mutaciones deletéreas (selección purificadora). En cambio, un valor de D positivo indica que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva (selección balanceadora o diversificadora). Si D es igual a cero quiere decir que no existe diferenciación alguna entre ambos estimadores y nos encontramos bajo equilibrio neutral (Eguiarte *et al.*, 2007).

VIII. RESULTADOS

8.1. Análisis univariado

8.1.1. Análisis de varianza

Se analizaron tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas (Cuadro 3) y un total de 12 variables (siete vegetativas y cinco reproductivas, Cuadro 2) fueron medidas a partir de 29 individuos adultos de tres poblaciones, de los cuales se tomaron 150 muestras en total.

Cuadro 3. Poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas analizadas en el presente estudio.

Población/No. de individuos/No. de muestras	No. colecta HEM	Latitud N	Longitud O	Altitud (msn m)	Tipo de Vegetación	Región fisiográfica
El Triunfo (Tr)/10/55	JMM 2210- 2219	15°41'17. 5"	92°47'33. 5"	1600- 1800	Bosque mesófilo de montaña	Sierra Madre de Chiapas
Nahá (Nh)/10/51	JMM 2230- 2239	16°58'29. 6"	91°34'48. 6"	950	Bosque tropical perennifoli o	Montañas del Oriente
Coapilla (Cp)/9/44	JMM 2221- 2229	17°10'33. 5"	93°07'59. 6"	1950	Bosque mesófilo de montaña	Montañas del Norte

Se observó diferencias significativas (Kruskal-Wallis y ANOVA) para cada una de las variables morfológicas en las tres poblaciones (Cuadros 4 y 5; Figuras 8 y 9).

Cuadro 4. Datos de Kruskal-Wallis para datos no normales del análisis morfométrico de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

Variable	X²	g.L.	p-valor
Largo de semilla	62,509	149	0,0
Ancho de semilla	80,778	149	0,0
Largo del pedúnculo	77,6758	149	0,0
Largo del receptáculo	63,8239	149	0,0
Ancho del receptáculo	73,389	149	0,0
Largo de hoja	68,4301	149	0,0
Ancho de vena central	67,0767	149	0,0
Largo de escama	81,2524	149	0,0
Ancho de escama	11,7286	149	0,00
Largo del mucrón	111,432	149	0,0

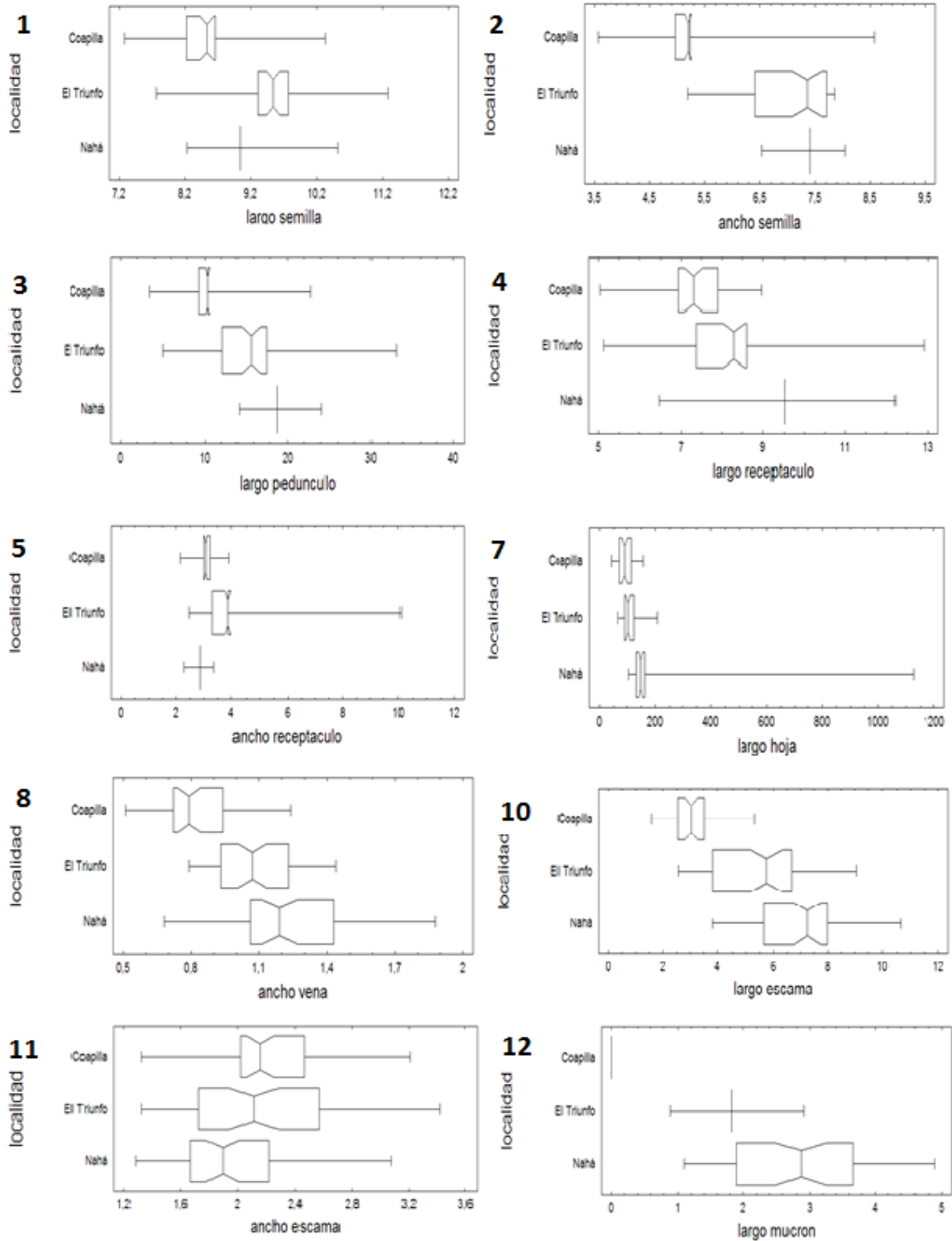


Figura 8. Variables analizadas mediante la prueba de Contraste Kruskal-Wallis (datos no normales) de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

Cuadro 5. Análisis de varianza (ANOVA) para variables normales de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

Variable	F	g.L.	p-valor
Ancho de hoja	13,11	149	0,0000
Distancia entre hojas	32,75	149	0,0000

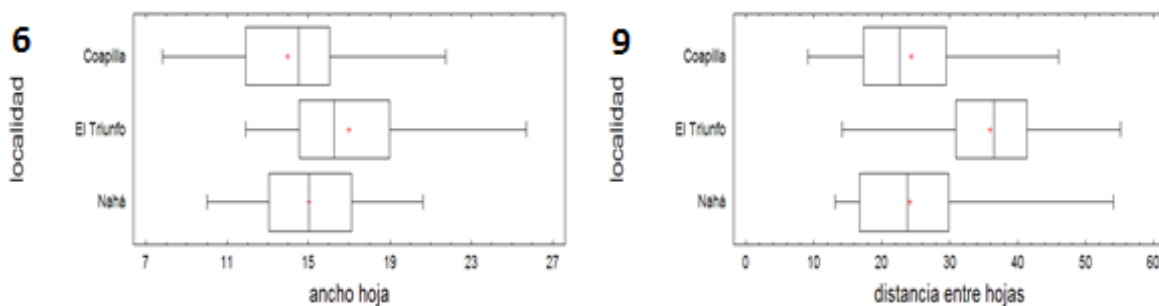


Figura 9. Variables analizadas mediante el Análisis de varianzas (ANOVA) para datos normales de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

8.2. Análisis multivariados

8.2.1. Análisis de componentes principales (PCA)

En la figura 10 se presenta la dispersión del PCA aplicada a 149 individuos de *Podocarpus*, donde los Factores 1 y 2 explican 53.53 % de la variabilidad en los datos originales (Cuadro 6), dando como resultado la formación de dos entidades diferentes. Para el primer factor (37.42%) las variables con mayor peso que diferencian a los dos grupos son el largo de la escama, ancho de la semilla y largo del pedúnculo, mientras que para el segundo factor (16.12%) las variables con mayor carga son la distancia entre hojas, ancho del receptáculo y ancho de la escama (Cuadro 7).

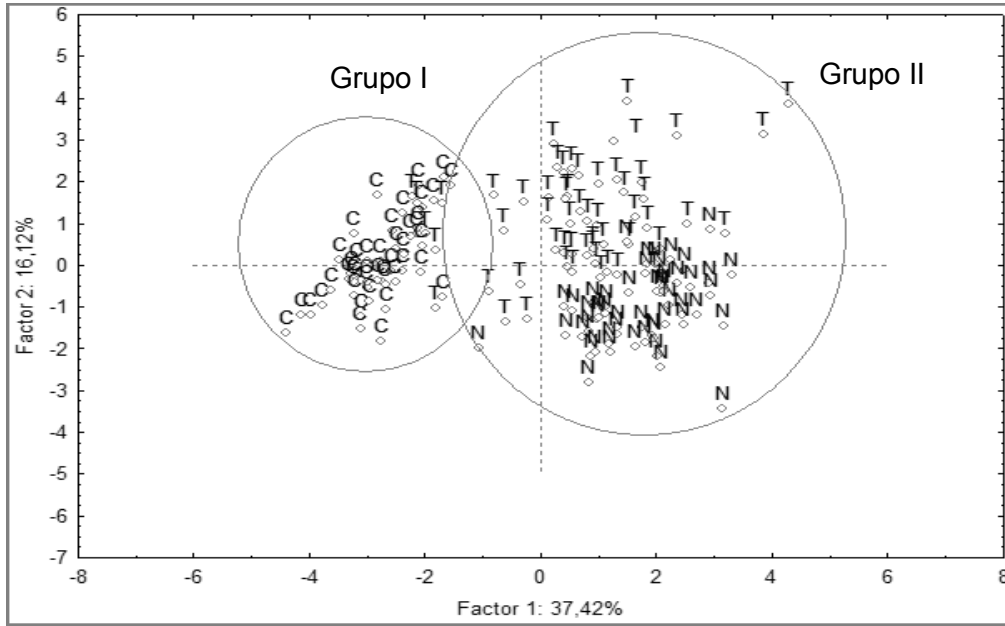


Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) que muestran grupos de poblaciones usando las variables con mayor peso de los datos de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

Cuadro 6. Valores de la matriz de correlación y resultados estadísticos de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

Factor	Eigenvalor	% Total varianza	acumulativo Eigenvalor	acumulativo %
1	4,490041	37,41701	4,49004	37,4170
2	1,933934	16,11612	6,42398	53,5331
3	1,108176	9,23480	7,53215	62,7679
4	0,880107	7,33423	8,41226	70,1022
5	0,819187	6,82656	9,23145	76,9287
6	0,674788	5,62323	9,90623	82,5520
7	0,573737	4,78114	10,47997	87,3331
8	0,470803	3,92335	10,95077	91,2564
9	0,379867	3,16556	11,33064	94,4220
10	0,308249	2,56874	11,63889	96,9907
11	0,211897	1,76581	11,85079	98,7566
12	0,149213	1,24344	12,00000	100,0000

Cuadro 7. Factores coordinados de las variables, basado en correlaciones. Se muestran solo tres de los doce factores analizados y en negritas los que presentaron los valores más altos de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Largo de semilla	0,549552	0,305498	0,511591
Ancho de semilla	0,840063	-0,072597	0,194471
Largo pedúnculo	0,826437	-0,070613	-0,067683
Largo receptáculo	0,661635	-0,139250	-0,028457
Ancho de receptáculo	0,122469	0,610898	0,381357
Ancho hoja	0,430883	0,566137	-0,374118
Largo de hoja	0,382112	-0,196215	-0,534445
Ancho vena central	0,693752	-0,018989	-0,051662
Distancia entre hojas	0,279530	0,797371	-0,010516
Largo escama	0,855540	-0,138302	-0,066265
Ancho escama	-0,142794	0,602826	-0,473580
Largo mucrón escama	0,838530	-0,245075	-0,027652

8.2.2. Análisis discriminante (DA)

Asimismo, en la figura 11 se presenta la dispersión derivada del análisis discriminante basado en las características morfológicas. Se observa nuevamente cómo se separan dos grupos (I y II) en un espacio bidimensional: el grupo I formado exclusivamente por la población de Coapilla (*P. oleifolius*) y el grupo II (*P. matudae*) formado por las poblaciones de El Triunfo y Nahá. Las dos funciones discriminantes con p-valores inferiores a 0.05 fueron estadísticamente significativas con un nivel de confianza <0.01.

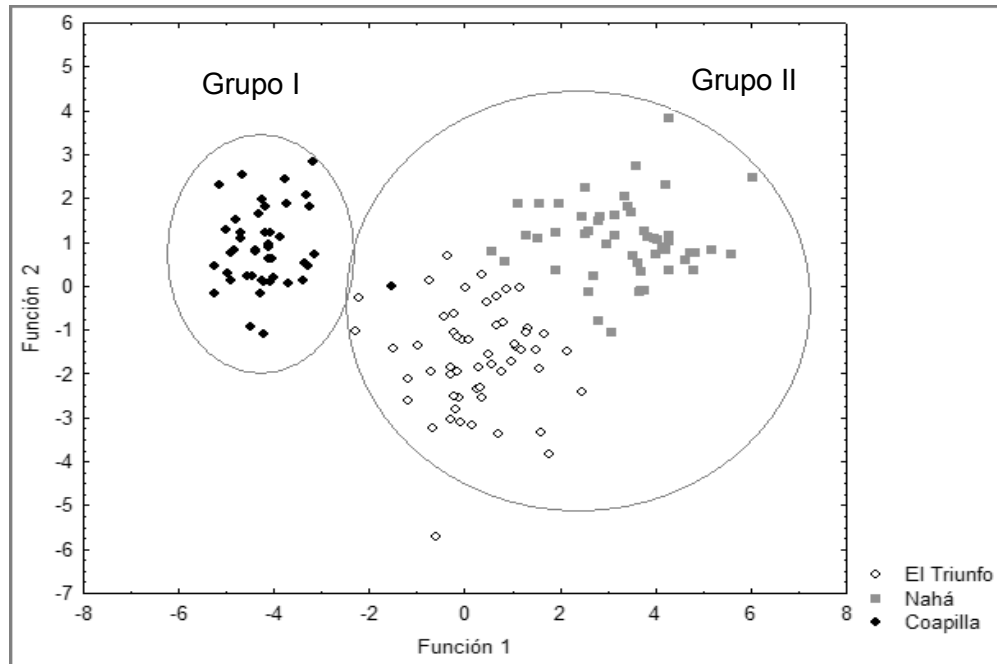


Figura 11. Análisis discriminante mostrando la separación de grupos de las tres poblaciones de *Podocarpus* analizadas.

Las distancias cuadráticas de Mahalanobis (Cuadro 8) que se muestran por debajo de cero (valores más altos y más bajos analizados) predicen que las poblaciones más relacionadas son El Triunfo y Nahá (16.902), mientras que las menos relacionadas son Nahá y Coapilla (56.305). Esto en base al análisis morfométrico. Los valores de F se muestran por arriba de cero y en todos los casos $p < 0.00$.

Cuadro 8. Distancias cuadráticas de Mahalanobis (negritas) entre las tres poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas. Los valores de F (arriba de ceros), distancias cuadráticas de Mahalanobis (abajo de ceros). En todos los casos la $p < 0.001$.

LOCALIDAD	El Triunfo	Nahá	Coapilla
El Triunfo	0	34.4849	48.5980
Nahá	16.90289	0	102.5396
Coapilla	25.78684	56.30564	0

El análisis de Wilks-Lambda también fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para las 12 variables analizadas, a un nivel de confianza del 95% (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resumen del análisis discriminante de las tres poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas, donde se muestran el nivel de significancia (Wilks' Lambda: 0,03768 approx. $F(24,272)=47,055$ $p < 0,0000$).

Funciones derivadas	Wilks-Lambda	X2	GI	P
1	0.0376757	463.9416	24	0
2	0.379636	137.0489	11	0

De las 12 variables que incluyeron las funciones discriminantes canónicas estandarizadas, solamente dos variables tuvieron los valores más altos y son las que mejor separan a los grupos de especies, estas son el largo de la semilla y ancho de la semilla. La primera variable demuestra más del 80 % de la variación en función de las variables morfológicas analizadas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Coeficientes de funciones discriminantes estandarizadas para los factores más importantes de las tres poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas.

Función Discriminante	Autovalor	Porcentaje Relativo (%)	Correlación Canónica
1	9.0764	84.74	0.94908
2	1.63411	15.26	0.78763

8.3. Análisis genéticos

En el cuadro 11 se resumen las pruebas de PCR aplicadas con diferentes diluciones de ADN y la combinación de diferentes primers (en este caso se usaron secuencias de ADN de cloroplastos, así como diferentes temperaturas). Se

observa que todas las muestras del fragmento TrnL-TrnF del ADNcp resultaron variables, amplificando en aproximadamente 900 pares de bases (pb) (Figura 4).

Cuadro 11. Individuos utilizados en la amplificación de ADN mediante la técnica de PCR de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

Individuo	Dilución	Primers	Temperatura	Resultado	Visualización
Tr2	3:25	TrnL f(c) TrnF r(f)	Touchdown	Banda marcada	bien 900 pb
Nh3	3:50	TrnL f(c) TrnF r(f)	Touchdown	Banda marcada	bien 900 pb
Nh5	3:20	TrnL f(c) TrnF r(f)	Touchdown	Banda marcada	bien 900 pb
Cp4	3:25	TrnL f(c) TrnF r(f)	Touchdown	Banda marcada	bien 900 pb
Cp5	3:25	TrnL f(c) TrnF r(f)	Touchdown	Banda marcada	bien 900 pb

8.3.1. Análisis de clústers de distancias genéticas

Se obtuvieron tres clústers mediante el programa MEGA versión 5.0, utilizando el método de distancias: UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean Tree*) y Vecino más cercano (*Test Neighbor-Joining Tree*), además del método de Máxima verosimilitud (*Test Maximum-Likelihood Tree*).

La figura 12 muestra el clúster ultramétrico de distancias obtenido mediante UPGMA, en el cual se pueden observar dos grupos principales: en el grupo I se concentran aquellos individuos formados por las poblaciones de Nahá y El Triunfo, mientras que el grupo II lo conforma exclusivamente la población de Coapilla.

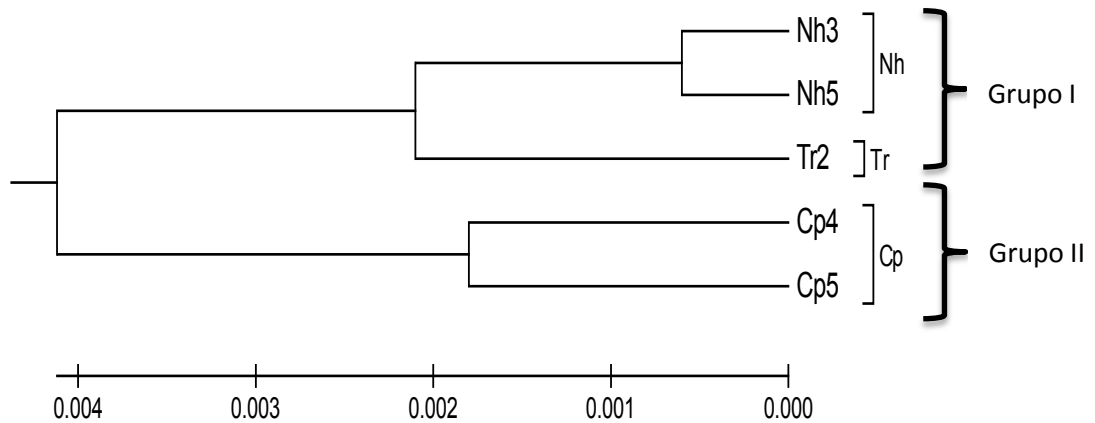


Figura 12. Clúster de distancias mediante UPGMA utilizando MEGA v5.0 de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

También se obtuvieron los clústers no ultramétricos de Vecino más cercano (NJ) (Figura 13) y Máxima verosimilitud (ML) (Figura 14). En ambos casos se observa que las poblaciones de Nahá y El Triunfo siguen como un grupo genéticamente relacionado (grupo I), mientras que la población de Coapilla aparece como un grupo diferente (grupo II).

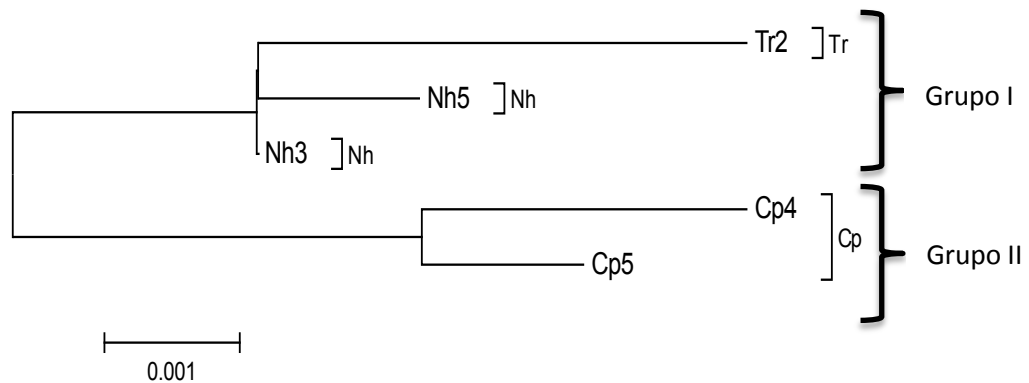


Figura 13. Clúster obtenido mediante la prueba del Vecino más cercano (NJ) con el programa MEGA v5.0 de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

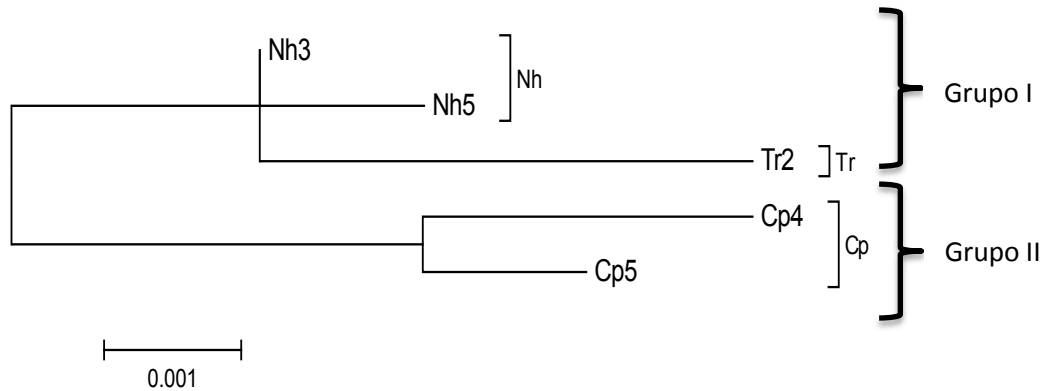


Figura 14. Clúster de Máxima verosimilitud (ML) mediante el programa MEGA v5.0 de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

Cabe señalar que no se realizó un análisis de red de haplotipos debido a que todos los individuos son considerados como genotipos diferentes únicos ($Hd=1.000$).

8.3.2. Variabilidad genética

Se analizaron cinco secuencias (Coapilla $n=2$, Nahá $n=2$ y El Triunfo $n=1$) con el programa DnaSP v5.1, el cual arrojó un total de 853 sitios nucleotídicos, 836 sitios excluyendo los gaps. El número de sitios polimórficos en la muestra es de $S=11$, el número de mutaciones $\eta=11$, la diversidad de haplotipos de $Hd=1.0000$, el número promedio de diferencias nucleotídicas $Kt=5.20000$ y la diversidad de nucleótidos $\pi=0.00622$.

En el cuadro 12 se muestran las diferencias genéticas que existen entre las poblaciones. Se observa que los valores más altos de diversidad nucleotídica (π) estuvieron entre Coapilla y Nahá, es decir, estas poblaciones son las más diferentes entre sí; mientras que los valores más bajos fueron entre Nahá y El Triunfo (son más similares). Esto concuerda con el número de sitios polimórficos (S), el cual corresponde al número total de mutaciones (η) que presentan cada una de ellas. Estas diferencias corresponden a “sustituciones” que se repiten entre las secuencias de ADN de las tres poblaciones.

Cuadro 12. Variación genética y divergencia entre las tres poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas, mediante el uso de secuencias de ADNcl.

Población	No. de sitios nucleotídicos	No. de secuencias (n)	No. de sitios polimórficos (S)	No. de mutaciones (η)	Diferencias nucleotídicas (k)	Diversidad nucleotídicas (π)
Cp	853	2	4	4	4.000	0.00478
Nh	853	2	1	1	1.000	0.00119
Cp	853	2	4	4	4.000	0.00478
Tr	853	1	0	0	0.000	0.00000
Nh	853	2	3	3	3.000	0.00352
Tr	853	1	0	0	0.000	0.00000

El Cuadro 13 muestra los valores de diferenciación genética entre Nahá y Coapilla, los cuales resultaron relativamente altos ($F_{ST} = 0.66667$), lo que indica el grado de lejanía entre poblaciones. Debido a que para el análisis se requerían mínimo dos secuencias de ADN (y de la población de El Triunfo solo se analizó una) no se generaron los valores para comparar entre El Triunfo-Nahá y El Triunfo-Coapilla.

Cuadro 13. Valores de flujo genético entre dos de las tres poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas.

POB. 1	POB. 2	K_s	K_{XY}	G_{ST}	N_{ST}	F_{ST}	D_{XY}	D_a
Nh	Cp	2.00000	6.00000	0.00000	0.66762	0.66667	0.00718	0.00478

8.3.3. Índice de Tajima

El valor de la D de Tajima presenta valores negativos ($D = -0.109$) (Cuadro 14) y es estadísticamente no significativo ($p > 0.10$). Esto podría traducirse como el hecho de que estas poblaciones no se encuentran en equilibrio neutral, hasta cierto punto; es decir, la diferencia genética entre las poblaciones podría deberse más por

efecto de la deriva génica, que por selección natural o cualquier otra fuerza evolutiva.

Cuadro 14. Comparación del Índice de Tajima (D) entre poblaciones utilizando los programas MEGA y DnaSP de las tres poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas.

	MEGA v5.2	DnaSP v5
Diversidad nucleotídica (π)	0.006220	0.00622
Número de sitios polimórficos (S)	11	11
Número de sitios	853 pb	853 pb
Valor Índice D	-0.109050	-0.10905

8.4. Tratamientos taxonómicos y descripción de las especies

En base a los resultados obtenidos por ejemplares colectados, el análisis morfológico y el análisis genético se determinó que existen dos especies de *Podocarpus* en Chiapas, las cuales se identificaron según el criterio de Mill (2015). Una de ellas la conforma el grupo I que pertenece a la población de Coapilla, cuya especie se determinó como *Podocarpus oleifolius* D. Don ex Lamb. (Figura 15). El grupo II se identificó como *Podocarpus matudae* Lundell, pero al parecer corresponden cada población corresponde a una subespecie diferente: *P. matudae* Lundell. subsp. *matudae* en El Triunfo (Figura 16) y *P. matudae* Lundell. subsp. *jaliscanus* (De Laub. & Silba) Silba en Nahá (Figura 17).

A continuación se presenta una comparación descriptiva basada en los datos morfológicos y genéticos obtenidos en el presente estudio. En seguida, el Cuadro 15 compara las características morfológicas analizadas por Buchholz y Gray (1948) de las especies que Mill (2015) reporta para Chiapas. Posteriormente se presenta una clave modificada para la identificación de las especies de las poblaciones de *Podocarpus* de Chiapas analizadas (Cuadro 16):

8.4.1. *Podocarpus oleifolius* D. Don ex Lamb.

Árboles de aproximadamente de 10-30 m de alto. **Hojas** lanceoladas-elípticas, de 4.2-15.7 cm de largo x 0.7-2.1 cm de ancho; **vena central** de 0.5-1.2 mm de ancho; **canal en el haz** de la lámina presente; **ápice de la hoja** acuminado a largamente apiculado, distancia entre hojas de 1-4.6 cm de longitud. **Brote terminal** cónico a globoso; **escamas** de la yema terminal de 1.5-5.3 mm de largo x 1.3-3.2 mm de ancho; **mucrón** de la escama de la yema terminal ausente. **Conos femeninos** axilares con una semilla, **semillas** ovaladas, de 7.2-10.3 mm de largo x 3.5-8.5 mm de ancho, **cresta** muy evidente; **receptáculo** con dos brácteas, de 5-9 mm de largo x 2-4 mm de ancho; **pedúnculo** de 0.3-2.2 cm de largo (Figura 15).



Figura 15. Morfología de la rama de *Podocarpus oleifolius* D. Don ex Lamb. en la población de Coapilla. A) Ejemplar en vivo, B) Ejemplar de herbario.

8.4.2. *Podocarpus matudae* Lundell subsp. *matudae*

Árboles de aproximadamente 7-20m de alto. **Hojas** lanceoladas a falcadas, de aproximadamente 6.3-20.7 cm de largo x 1.2-2.5 cm de ancho; **vena central** de 0.8-1.4 mm de ancho; **canal en el haz** de la lámina presente; **ápice de la hoja**

apiculado-largamente apiculado a agudo, **distancia entre las hojas** de 1.4-5.5 cm de longitud. **Brote terminal** generalmente cónico, a veces globoso; **escamas** de la yema terminal de 2.5-9 mm de largo x 0.1-0.3 cm de ancho; **mucrón** de la escama de la yema terminal de 0.1-0.3 cm de largo. **Conos femeninos** axilares con una semilla, raramente dos, **semillas** elípticas, de 7.7-11.2 mm de largo x 5.1-7.8 mm de ancho, **cresta** muy poco evidente; **receptáculo** con dos brácteas, raramente tres, de 0.5-1.3 cm de largo x 0.2-1 cm de ancho; **pedúnculo** de 0.4-3.3 cm de largo (Figura 16).



Figura 16. Morfología de la rama de *Podocarpus matudae* Lundell subsp. *matudae* en la población de El Triunfo. A) Ejemplar en vivo, B) Ejemplar de herbario.

8.4.3. *Podocarpus matudae* Lundell subsp. *jaliscanus* (De Laub. & Silba) Silba

Árboles de aproximadamente 7-10(-15)m de alto. **Hojas** linear-lanceoladas a falcadas, de aproximadamente 10.6-19.7 cm de largo x 1-2.1 cm de ancho; **vena central** de 0.68-1.88 mm de ancho; **canal en el haz** de la lámina presente; **ápice de la hoja** acuminado-agudo a largamente apiculado; **distancia entre las hojas** de 1.3-5.4 cm de longitud. **Brote terminal** generalmente cónico; **escamas** de la yema terminal de 3.8-10.6 mm de largo x 0.1-0.3 cm de ancho; **mucrón** de la escama de

la yema terminal de 0.1-0.5 cm de largo. **Conos femeninos** axilares con una semilla, **semillas** elípticas, de 8.2-10.5 mm de largo x 6.5-8.5 mm de ancho, **cresta** muy poco evidente; **receptáculo** con dos brácteas, raramente tres, de 0.6-1.2 cm de largo x 0.2-0.3 cm de ancho; **pedúnculo** de 1.4-2.4 cm de largo (Figura 17).

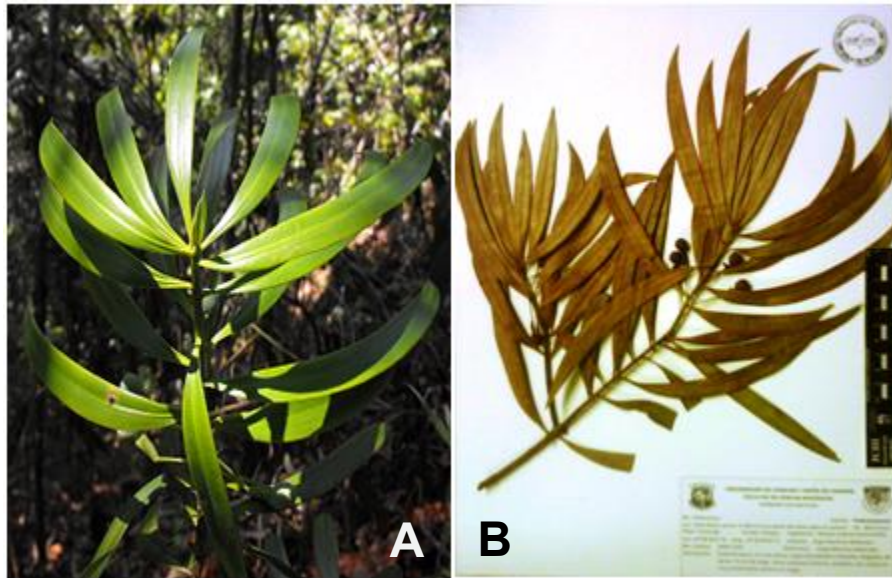


Figura 17. Morfología de la rama de *Podocarpus matudae* Lundell subsp. *jaliscanus* (De Laub. & Silba) Silba en la población de Nahá. A) Ejemplar en vivo, B) Ejemplar de herbario.

Cuadro 15. Claves para diferenciar las especies de *Podocarpus* en Chiapas (Basado y modificado de Mill, 2015). Se anexan otras especies centroamericanas similares.

CLAVE	CARACTERISTICAS	IR A
1a	Hojas sin ranura en el haz.....	2
1b	Hojas con ranura en el haz.....	4
2a	Yemas terminales esféricas; pedúnculos menos de 5 mm de largo; receptáculo con dos brácteas (México a Panamá).....	<i>P. guatemalensis</i>
2b	Yemas terminales cónicas; pedúnculos más 10 mm de largo; receptáculo hasta con tres brácteas (México a El Salvador).....	3. <i>P. matudae</i>
3a	Hojas lanceoladas a falcadas, de aprox. 6.3-20.7 cm de largo x 1.2-2.5 cm de ancho; pedúnculo de 0.4-3.3 cm de largo.....	<i>P. matudae</i> subsp. <i>matudae</i>
3b	Hojas linear-lanceoladas a falcadas, de aprox. 10.6-19.7 cm de largo x 1-2.1 cm de ancho; pedúnculo de 1.4-2.4 cm de largo.....	<i>P. matudae</i> subsp. <i>jaliscanus</i>
4a	Yemas terminales cónicas; escamas de las yemas más de 6 mm de largo (solo Costa Rica).....	<i>P. costaricensis</i>
4b	Yemas terminales globosas o globoso-abiertas; escamas de las yemas no superior a 5 mm de largo (México a Panamá).....	5
5a	Yemas terminales globosas a esféricas; pedúnculo de 2-6 (-8) mm de largo; receptáculo 3.6–6.3 (-7.2) mm con 1 bráctea estéril y a veces hasta 2 brácteas fértiles (México a Panamá).....	<i>P. oleifolius</i> subsp. <i>costaricensis</i>
5b	Yemas terminales esféricas curvadas hacia afuera (dudosamente registrado en Panamá).....	<i>P. magnifolius</i>

Cuadro 16. Comparación de las características morfológicas de las tres especies de *Podocarpus* en México, según Mill (2015).

Caracter	<i>P. matudae</i>	<i>P. guatemalensis</i>	<i>P. oleifolius</i>
Forma y textura de la hoja.	Lanceolada, a veces falcada. Coriácea.	Lanceolada, a veces falcada. Coriácea.	Lanceolada-aguda. Coriácea.
Largo y ancho hoja.	4-8.5cm x 1.2-1.9cm.	14cm x 1-1.2 cm.	3-4cm x 0.7-1cm.
Ápice hoja.	Acuminado.	Agudo.	Agudo.
Base hoja.	Corto-atenuado.	Cuneado.	Atenuado-agudo.
Forma de la semilla y cresta.	Ligeramente ovaladas y cresta roma poco evidente.	Ligeramente elipsoidal y cresta cónica pequeña.	Ovoide-globosa con cresta muy marcada.
Largo y ancho de las semillas.	0.8-1cm x 0.7-0.8cm.	Aprox. 0.8cm largo.	0.7-0.8cm largo.
Número de semillas.	1 semilla, raramente 2.	1 semilla.	1 semilla.
Largo del pedúnculo.	0.4-0.6cm.	0.4-0.5cm.	0.5-1cm.

8.5. Categorías de riesgo

Podocarpus matudae es una especie catalogada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010) como “sujeta a protección especial” (Pr) y “no endémica”; mientras que bajo el criterio de la Lista Roja de Especies Amenazadas la IUCN (2015) se encuentra como una especie “casi amenazada” (NT) desde 2007, con una tendencia poblacional “decreciente”, debido a los frágiles ecosistemas donde habita (bosques de niebla y bosques perennifolios). Por el contrario, *Podocarpus oleifolius* no se encuentra bajo alguna categoría de riesgo en las normas de protección mexicanas (a pesar de encontrarse también en bosques de niebla altamente fragmentados), en tanto que para la IUCN (2015), se ubica como “preocupación menor” (LC) desde 1998, con tendencia poblacional aún desconocida debido a la carencia de estudios relacionados a la misma.

IX. DISCUSIÓN

Se presenta el análisis de los datos morfológicos y genéticos, así como la descripción de las especies. En cuanto al análisis morfológico hay que mencionar que los datos fueron tomados de ejemplares secos colectados y herborizados. Algunos datos no fueron incluidos en el análisis como aquellos que tuvieran más de un estado de carácter o los que requerían estados de presencia-ausencia. En el caso del análisis genético se excluyeron algunos individuos de poblaciones como Lagos de Montebello y Tenejapa, debido a errores en el proceso de extracción y amplificación del ADN y aquellos que no contaban con la cantidad de individuos suficientes para dicho análisis, y así evitar conflictos durante la interpretación de los datos.

En general, el análisis morfológico univariado muestra la variación morfológica que hay entre las 12 variables utilizadas para las poblaciones de *Podocarpus*. Las diferencias entre las variables estudiadas evidencian que existe mayor similitud morfológica entre las poblaciones de Nahá y El Triunfo (Figuras 7 y 8). Por otra parte, tanto el análisis de componentes principales como el análisis discriminante indicaron la separación en dos grupos (Figuras 9 y 10). A diferencia del PCA, el análisis discriminante divide las poblaciones en dos grupos, pero el grupo II a pesar de pertenecer a lo que se interpreta como una sola especie hay una segunda separación, lo que pudiera indicar la presencia de infraespecies.

En los resultados de PCA, las variables que mayor variación presentan las poblaciones son el largo de la escama, ancho de la semilla, largo del pedúnculo, distancia entre hojas, ancho del receptáculo y ancho de la escama (Cuadro 6), estando la mayor parte de ellos relacionados al estróbilo femenino. Este resultado concuerda con el análisis discriminante, ya que las variables que mejor diferenciaron entre las poblaciones en su mayoría son estructuras relacionadas con dicha estructura: largo de la semilla y ancho de la semilla (Cuadro 9). Cabe mencionar que la mayor parte de las variables están relacionadas al largo y ancho de las mismas (estróbilos, hojas y brotes terminales), salvo algunas de ellas que están relacionadas con la forma de dicha variable (hojas y brotes terminales).

Las distancias cuadráticas de Mahalanobis confirman la separación morfológica de las poblaciones, demostrando que las más relacionadas son El Triunfo y Nahá (16.90289) con los valores más bajos y las menos relacionadas son Nahá y Coapilla (56.30564). Los valores de Wilks Lambda para los primeros dos factores ($F_1 = 0.037$ y $F_2 = 0.379$) también concuerdan con lo establecido por Pardo y Ruiz (2002), quienes mencionan que valores próximos a 1 indicarán un gran parecido entre los grupos, mientras que los valores próximos a 0 indicaran una gran diferencia entre ellos.

Existe mucha similitud entre los resultados obtenidos en el presente trabajo con el realizado por Stark-Schilling (2005). Este último obtuvo que los caracteres morfológicos más importantes para identificar especies o grupos de especies son: presencia/ausencia del mucrón en el ápice de las hojas, presencia/ausencia de un canal en el haz o envés de las hojas, forma de los brotes terminales, longitud de las escamas de los brotes terminales, longitud del pedúnculo y longitud del cono masculino, de los cuales dos concuerdan con el presente estudio según el PCA: longitud de las escamas de los brotes terminales y longitud del pedúnculo (y el ancho de las escamas de los brotes terminales, caracter que no es considerado por el segundo autor). El análisis discriminante separa los grupos de especies según dos variables: el largo de la semilla y el ancho de la semilla. La primera de ellas explica más del 80% de la variación. En promedio, las semillas de la población de Coapilla resultan ser más pequeñas que las de El Triunfo y Nahá, las cuales son ligeramente más grandes y similares en su forma (ver descripciones).

Los clústers de distancias genéticas (UPGMA, NJ y ML), en conjunto con el análisis morfológico (Figuras 12 y 13) revelan la presencia de dos grupos (I y II) y muestran que sí hay diferencias entre las poblaciones. Por lo tanto, en el presente estudio se considera como una especie a las poblaciones de El Triunfo y Nahá (grupo I) y como una especie distinta a la de Coapilla (grupo II). Dichas especies se determinaron como *Podocarpus matudae* y *Podocarpus oleifolius*, respectivamente, de acuerdo al criterio de Mill (2015), quien además reconoce dos subespecies para *P. matudae*: *P. matudae* subsp. *matudae* y *P. matudae* subsp.

jaliscanus. La primera ocurre en la Sierra Madre de Chiapas (El Triunfo) y Altiplanicie de Chiapas, mientras que la segunda se encuentra en las Montañas del Oriente (Nahá).

En cuanto al largo de la hoja, ancho de la hoja y la forma de la hoja, Stark-Schilling (2005) menciona que son variables que solo permiten diferenciar grupos de especies, pero no son tan confiables debido a que a veces varían según el estadio de desarrollo de los individuos. Esto fue observado en las tres poblaciones analizadas, donde incluso en un mismo individuo se pueden observar hojas tanto lanceoladas como falcadas. En el presente estudio, el promedio del largo de las hojas es de 6 -20 cm para las poblaciones de El Triunfo y Nahá (*P. matudae*), mientras que para la población de Coapilla (*P. oleifolius*) es de 4.2-9.9 (-15.7) cm. Estos promedios coinciden con los valores mostrados por Stark-Schilling (2005) (6-17.5 cm y hasta 9 cm para cada especie, respectivamente).

Cuando hablamos de las estructuras reproductoras, en las poblaciones de *P. matudae* (El Triunfo y Nahá) se observó que el receptáculo (estróbilo femenino) presenta comúnmente dos brácteas (a veces tres), lo cual difiere a lo observado por Stark-Schilling (2005), quien menciona que dicha especie posee, en promedio, tres brácteas en el receptáculo en lugar de dos como es lo común en el género. Por el contrario, coincide en que *P. oleifolius* (población de Coapilla) presenta también dos brácteas en el receptáculo. El estróbilo masculino se encontró en muy pocos individuos, por lo cual no fueron utilizados para el análisis morfológico.

Genéticamente, las secuencias de ADN nuclear (Espaciadores Intergénicos o ITS) no fueron viables debido a la gran variación en las amplificaciones (ITS 1 y 2= 250 pb, ITS 3 y 4= 350 pb, ITS 4 y 5= 600 pb), lo cual es muy común en gimnospermas (Liston *et al.*, 1996). Por lo tanto, se optó por las secuencias de ADN de cloroplastos amplificados de la región Trn-L f y c. Estos arrojaron secuencias de aproximadamente 853 pb, que resultan mayores a los obtenidos por Stark-Schilling (2005) para *Podocarpus* (742-748 pb) y para la misma región cloroplástica.

En cuanto a la estructura genética, la diversidad nucleotídica (Cuadro 11) nos muestra que las poblaciones de Nahá y El Triunfo están más relacionadas ($\pi=0.00352$), mientras que las menos relacionadas son Nahá y Coapilla ($\pi=0.00478$). En cuanto a la divergencia entre las poblaciones, la diversidad nucleotídica (π) y el número de mutaciones (η) presentan valores muy bajos, lo que se traduce en un menor número de haplotipos; es decir, que los 853 sitios de cada secuencia de cada individuo por población no son los suficientemente grandes para discernir cuales fragmentos se repiten entre ellos y elaborar una red de haplotipos. Tal y como lo mencionan Gernandt *et al.* (2011), el genoma del cloroplasto presenta una tasa de evolución relativamente baja de muchos genes.

En el presente estudio, los valores de diferenciación genética entre Nahá-Coapilla ($F_{ST}=0.66667$) claramente resultan altos (son más lejanas), lo cual apoya el hecho de que se consideren dos especies. Cabe destacar que también se podrían esperar valores similares entre las poblaciones de El Triunfo-Coapilla. Al contrario de las poblaciones anteriores, entre El Triunfo-Nahá, se esperarían valores más bajos de diferenciación genética (son más cercanas), puesto que corresponden a la misma especie (*Podocarpus matudae*) y el flujo genético es mayor. Análisis posteriores con un mayor número de secuencias podría confirmar este hecho.

Tal y como lo demuestran Ornelas *et al.* (2010) entre poblaciones de *P. matudae*, los valores de G_{ST} ($=0.707$) indican estructura poblacional, corroborado por un alto índice de fijación ($F_{ST}=0.813$). Estos valores altos de F_{ST} podrían explicarse en el hecho de que las poblaciones de Chiapas y Guatemala presentan cierto grado de aislamiento de las de la Sierra Madre Oriental (del sureste de Tamaulipas al noreste de Oaxaca) y la Sierra de Los Tuxtlas (Oaxaca-Veracruz) (Ornelas *et al.*, 2010). Hay que señalar que en su análisis, solo dos corresponden a Chiapas (Buenos Aires en la Sierra Madre de Chiapas y Lagos de Montebello en la Altiplanicie Central) y no se incluyen otras como por ejemplo: la Sierra Madre de Chiapas (Volcán Tacaná, El Triunfo, El La Fraylescana y La Sepultura),

Coapilla (en las Montañas del Norte), Nahá (Montañas del Oriente) y Tenejapa (Altiplanicie Central), entre otras.

En Sudamérica, Quiroga y Premoli (2007) obtienen valores bajos de divergencia genética ($G_{ST}= 0.103$) para poblaciones de *Podocarpus parlatorei* Pilger, mientras que para poblaciones de *Podocarpus nubigena* los valores de $F_{ST}= 0.181$ indican bajo porcentaje de flujo genético (Quiroga y Premoli, 2010), lo que se explica por la distribución geográfica de las especies.

Sin embargo, el valor negativo de D de Tajima ($D= -0.109$) señala un leve proceso de selección purificadora (Simmons *et al.*, 1995), por lo cual se puede asumir que la poca variación genética entre las poblaciones se puede deber más a la deriva genética y la endogamia, que a fuerzas como la selección natural o el flujo genético, y que se ve favorecida en las poblaciones pequeñas (Nei *et al.*, 1975).

Existen factores como la presencia de las mismas barreras geográficas que separan a las poblaciones de *Podocarpus* que podrían generar estos bajos niveles de variación genética, o también desde el hecho de que muchas las mismas se encuentran en zonas donde los bosques han sido aprovechados para la extracción de recursos como maderas y se han reducido a niveles muy bajos en su número de individuos, llevándolas a un proceso de endogamia.

En cuanto a la distribución altitudinal actual de las poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas, esta concuerda con las encontradas por Stark-Schilling (2005), quien menciona que *P. matudae* se distribuye de los 1200-1600 msnm (900 msnm en Nahá y 1400-1900 msnm en El Triunfo), mientras que *P. oleifolius* se ubica de los 1000-3500 msnm (2000 msnm en Coapilla). Se encuentran en zonas de pendientes moderadas a fuertes (20-30° de inclinación), con suelos ligeramente arenosos con presencia de abundante materia orgánica superficial y altos niveles de humedad. A este respecto, Quiroga (2009) menciona que la distribución de muchas especies de *Podocarpus* y otros géneros de Podocarpaceae es consecuencia de una serie de periodos glaciarios (25000-

16000 años antes del presente), durante las cuales, estas especies tolerantes a bajas temperaturas se expandieron durante los periodos fríos, y quedaron confinadas en refugios de altura durante los periodos cálidos, a los que se denominan “refugios pleistocénicos”.

Sorprendentemente la familia Podocarpaceae no ha sido objeto de un estudio biogeográfico moderno (Mill, 2003). La teoría convencional (Florin, 1940; Kelch, 1997) propone un origen Gondwánico con una consecuente migración hacia el norte hasta alcanzar los límites actuales en el Caribe, Etiopia y Este de Asia.

Aún hace falta mucho trabajo por realizar con *Podocarpus* en México. Esto será posible con una mayor exploración de los hábitats característicos del género, una mayor revisión de ejemplares de herbario, así como análisis moleculares y anatómicos de dichas poblaciones que nos permitan esclarecer su situación taxonómica y proveer información para su conservación.

X. CONCLUSIONES

- 1) El análisis morfológico separa a las poblaciones en dos grupos: 1) Coapilla y 2) Nahá-El Triunfo.
- 2) Los caracteres morfológicos más importantes que permiten discriminar entre las poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas son el largo de la semilla y ancho de la semilla.
- 3) Se diferenciaron dos especies de *Podocarpus* en el presente estudio: *P. oleifolius* en Coapilla y *P. matudae* en El Triunfo y Nahá.
- 4) La plasticidad fenotípica en *P. matudae* permitió diferenciar dos subespecies: *P. matudae* subsp. *matudae* en El Triunfo y *P. matudae* subs. *jaliscanus* en Nahá.
- 5) La plasticidad fenotípica foliar en *Podocarpus matudae* puede estar influenciada por la disponibilidad de luz solar en los ecosistemas donde habitan.
- 6) En Chiapas, las poblaciones de *Podocarpus* se localizan de 900 a 2000 msnm, en hábitats de Bosque tropical perennifolio y Bosque mesófilo de montaña.
- 7) Los clústers de distancias genéticas UPGMA confirman la separación de las poblaciones en dos grupos de especies: I) Coapilla y II) Nahá-El Triunfo.
- 8) La variación genética y divergencia entre las poblaciones muestran que Coapilla presenta mayor diversidad genética y se encuentra más alejada con respecto a El Triunfo y Nahá, las cuales presentan menor diversidad genética y están más relacionadas.
- 9) La diferenciación genética (F_{ST}) entre Nahá y Coapilla presenta valores relativamente altos, lo que confirma la lejanía entre dichas poblaciones con la parte morfológica.
- 10) El índice de Tajima predice que la baja diversidad genética mostrada entre las poblaciones de *Podocarpus* en Chiapas puede estar influenciada por la deriva genética y endogamia.

XI. RECOMENDACIONES

El muestreo de un mayor número de poblaciones no exploradas (Volcán Tacaná, Cerro Tres Picos, Tenejapa y Lagos de Montebello), así como de más individuos permitirá un mejor análisis acerca de la variación morfológica entre ellas, incluyendo estados de carácter de presencia-ausencia que no fueron considerados, integrando el análisis genético (incluyendo otros marcadores moleculares) y datos de anatomía y micromorfología foliar, permitirán esclarecer los problemas taxonómicos del género en Chiapas, lo que daría pauta también a análisis filogenéticos de las especies.

XII. LITERATURA CITADA

Barrett, S.C.H. y J.R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size plants: implications for conservation. En: Falk, D.A. y K.E. Holsinger. Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York.

Berlyn, G. y J. Mikshe. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State University Press. USA. 130 p.

Bisby, F.A., J.G. Vaughn y C.A. Wright (Eds.). 1980. Chemosystematics: principles and practices. Academic Press, New York.

Biswas, C. y B.M. Johri. 1997. The Gymnosperms. Narosa Publishing House. India. 494 p.

Bradshaw, A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in genetics* **13**: 115-155.

Breedlove, D.E. 1981. Flora of Chiapas, part I: Introduction to the Flora of Chiapas. The California Academy of Sciences, San Francisco. 35 p.

Breedlove, D.E. 1986. Listados florísticos de México: IV Flora de Chiapas. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. 246 p.

Buchholz, J.T. y N.E. Gray. 1948a. A taxonomic revision of *Podocarpus* I. The sections of the genus and their subdivisions with special reference to leaf anatomy. *Arnold Arbor.* **29**: 49-63.

Buchholz, J.T. y N.E. Gray. 1948b. A taxonomic revision of *Podocarpus* II. The American species of *Podocarpus*: section *Stachycarpus*. *J. Arnold Arbor.* **29**: 64-76.

Buchholz, J.T. y N.E. Gray. 1948c. A taxonomic revision of *Podocarpus* IV. The American species of section *Eupodocarpus*, Subsections C and D. *J. Arnold Arbor.* **29**: 123-151.

- Bush, G. L. 1995. Reply from G. L. Bush. *Trends Ecol. Evol.* **10**: 38.
- Castillo Cobián, A. La Selección Natural a nivel molecular. Capítulo 1. En: Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. 2007. *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México. 594 p.
- Clausen, J., D. D. Keck, y W. Hiesey. 1940. Experimental studies on the nature of species. I. Effects of varied environments on western North American plants. Carnegie Inst. Wash. Publ. 520 p.
- Contreras-Medina, R. 2004. Gimnospermas. En: Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. Luna, I.; Morrone, J.J. y Espinosa, D. (Eds.). Las Prensas de Ciencias, México, D.F. p. 137-148.
- Contreras-Medina, R., I. Luna-Vega y O. Alcántara-Ayala. 2006. La familia Podocarpaceae en el estado de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **77**: 115-118.
- De Laubenfels, D.J. 1985. A taxonomic revision of the genus *Podocarpus*. *Blumea* **30**: 251-278.
- De Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. En: Howard, D.J. y Berlocher, S.H. (Eds.). *Endless forms: Species and speciation*. Oxford University Press, New York. p. 57–75.
- De Queiroz, K. 1999. The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. En: Wilson, R.A. (Ed.). *Species: New interdisciplinary essays*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts. p. 49–89.
- De Queiroz, K. 2005a. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 6600–6607.
- De Queiroz, K. 2005b. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proc. Calif. Acad. Sci.* **56**: 196–215.

De Queiroz, K. 2005c. Different species problems and their resolution. *BioEssays* **27**: 1263–1269.

De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* **56(6)**: 879-886.

Donoghue, M.J. 1994. Progress and prospects in reconstructing plant phylogeny. *Annals of Missouri Botanical Garden* **81**: 405-418.

Cerritos Flores, R. En Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre. 2007. Ecología molecular. SEMARNAT-CONABIO. México. 592 p.

ECOSUR. El Colegio de la Frontera Sur. 2002. Programa Estatal de Ordenamiento Territorial. Fase III. Subsistema Natural, Económica y Social. 406 p.

Elleberg, H. 1963. Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen. Fishcher. Jena.

Ellstrand, N.C. y D.R. Elam. 1993. Populations genetic consequences of small populations size: implications for plant conservation. *Annual Review Ecology and Systematic* **24**: 217-242.

Espinoza, M.E. y B.M. García. 2003. Manual de laboratorio de genética, ECOSUR-San Cristóbal de las Casas. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR).

Falconer, D.S. 1989. Introduction to quantitative genetics. Richard Clay Ltd., Bungay Suffolk, Great Britain. p. 129-185.

Farjon, A. 1998. World checklist and bibliography of conifers. Royal Botanic Garden, Kew. 309 p.

Ferguson, A. 1980. Biochemical systematics and evolution. J. Wiley & Sons, New York.

Floret, C., M.J. Galan, E. LeFloc'h, E. Orshan y F. Romane. 1990. Growth forms and phenomorphology traits along an environmental gradient: tool for studying vegetation? *Journal of Vegetable Science* **1**: 71-80.

Florin, R. 1940. The Tertiary fossil conifers of South Chile and their phytogeographical significance (with a review of the fossil conifers of southern lands). *Kongl. Svenska Vetenskapsakad. Handl.* **19**: 1-107.

Frankham, R.; J.D. Ballou y D.A. Briscoe. 2004. A Primer of Conservation Genetics. 1ª edición. Cambridge University Press. Cambridge, England.

García-Moreno, J. 2003. Conservación a largo plazo. En: Gómez de Silva, H. y A. Oliveras de Ita (Eds.). Conservación de aves experiencias en México. Editorial CIPAMEX. México.

Gaussen, H. 1976. Les Gymnospermes actuelles et fossiles. Fascicule XIV. Genre *Podocarpus*. Conclusion des Podocarpaceae. Trav. Lab. Forest. Toulouse tome 2, vol. 1, fasc. XIV. Toulouse: Faculté des Sciences. 296 p.

Gernandt, D., G. Salazar, F. Vergara, S. Arias, V. Sosa, A. García, J. Reyes, L. Cabrera y P. Rosas. 2011. Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Instituto de Ecología, A.C., Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. GE021, México D.F.

Gernandt, D.S. y J.A. Pérez-de la Rosa. 2014. Biodiversidad de Pinophyta (Coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**: 126-133.

Grant, W.F. (Ed.). 1984. Plant biosystematics. Academy Press, London.

Gray, N.E. 1953a. A taxonomic revision of *Podocarpus* VII. The African species of *Podocarpus* section *Afrocarpus*. *J. Arnold Arbor.* **34**: 67-76.

Gray, N.E. 1953b. A taxonomic revision of *Podocarpus* VIII. The African species of section *Eupodocarpus*, subsections A and E. *J. Arnold Arbor.* **34**: 163-175.

Gray, N.E. 1955. A taxonomic revision of *Podocarpus* IX. The South Pacific species of section *Eupodocarpus*, subsection F. *J. Arnold Arbor.* **36**: 199-206.

Gray, N.E. 1956. A taxonomic revision of *Podocarpus* X. The South Pacific species of Section *Eupodocarpus*, subsection D. *J. Arnold Arbor.* **37**: 160-172.

Gray, N.E. 1958. A taxonomic revision of *Podocarpus* XI. The South Pacific species of Section *Podocarpus*, subsection B. *J. Arnold Arbor.* **39**: 424-477.

Gray, N.E. 1960. A taxonomic revision of *Podocarpus* XII. Section *Microcarpus*. *J. Arnold Arbor.* **41**: 36-39.

Gray, N.E. 1962. A taxonomic revision of *Podocarpus* XIII. Section *Polypodiopsis* in the South Pacific. *J. Arnold Arbor.* **43**: 67-79.

Gray, N.E. y J.T. Buchholz. 1948. A taxonomic revision of *Podocarpus* III. The American species of *Podocarpus*: section *Polypodiopsis*. *J. Arnold Arbor.* **29**: 117-123.

Gray, N.E. y J.T. Buchholz. 1951a. A taxonomic revision of *Podocarpus* V. The South Pacific species of *Podocarpus*: section *Stachycarpus*. *J. Arnold Arbor.* **32**: 82-92.

Gray, N.E. y J.T. Buchholz. 1951b. A taxonomic revision of *Podocarpus* VI. The South Pacific species of *Podocarpus*: section *Sundacarpus*. *J. Arnold Arbor.* **32**: 93-97.

Hamilton, M., E. Pincus, A. Di Fiore y R.C. Fleischer. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* **27**: 500-507.

Hennig, W. 1966. *Phylogenetics Systematics*. University Illinois Press. Urbana.

Hernández Martínez, T. 2006. Propagación vegetativa de *Podocarpus reichei* Buchh. por medio de estacas, bajo condiciones de invernadero en Chapingo, México. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Estado de México. 83 p.

Hollingsworth, M.L., J.P. Bailey, P.M. Hollingsworth y C. Ferris. 1999. Chloroplast DNA variation and hybridization between invasive populations of Japanese Knotweed and Giant Knotweed (Fallopia, Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **129**: 139-154.

Holman, R.M. y W.W. Robbins. 1961. Botánica General. UTHEA (Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana). México. 632 p.

Hudson, R.R., D.D. Boss y N.L. Kaplan. 1992. A statistical test for detecting population subdivision. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 138-151.

IUCN. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 19 November 2015.

Jauregui, D. y C. Benitez de Rojas. 2005. Aspectos morfológicos y anatomía foliar de las especies de *Gnetum* (Gnetaceae-Gnetophyta) presentes en Venezuela. *Acta Bot. Venez.* **28(2)**: 349-368.

Kausic, S.B. 1975. The leaf structure in *Podocarpus brevifolius* (Stapf.) Foxw. *Proc. Indian Acad. Sci.* **81(5)**: 17-206.

Kelch, D.G. 1997. The phylogeny of the Podocarpaceae based on morphological evidence. *Sistematic Botany* **22(1)**: 113-131.

Kelch, D.G. 1998. Phylogeny of Podocarpaceae: Comparison of evidence from morphology and 18S rDNA. *American Journal of Botany* **85(7)**: 986-996.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.

Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson y D.G. Higgins. 2007. Clustal W y Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Levins, R. 1970. Extinction. En: Some mathematical problems in biology. Desternhaber, M. (Ed.). American Mathematical Society, Providence, Rhode Island. p. 77–107.

Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.

Liston, A.; A.W. Robinson y M.J. Oliphant. 1996. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non-flowering seed plants. *Systematic Botany* **21**(2): 109-120.

Long, A. y M. Heath. 1991. Flora of the El Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, Mexico: A preliminary floristic inventory and the plant communities of Polygon I. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. *Serie Botánica* **62**: 133-172.

Lot, A. y F. Chiang. 1986. Manual de Herbario: Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos. Consejo Nacional de la Flora de México. México. 142 p.

Lozada, L.; León, M.E.; Rojas, J. y De Santiago, R. 2003. Bosque Mesófilo de Montaña en El Molote. En: Estudios florísticos en Guerrero. Fascículo 13. Diego-Pérez, N. y Fonseca, R.M. (Eds.). Facultad de Ciencias, UNAM, D.F. 35 p.

Mancebo del C., Y.R. 2007. Filogeografía e historia demográfica poblacional de *Lepus flavigularis* (Mammalia: Lagomorpha) basada en ADN mitocondrial. Tesis de maestría. El Colegio de la Frontera Sur. San Cristóbal de las Casas, Chiapas. México. 24 p.

Mayden, R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. En: Oaridge, M.F., Dawah, H.A. and Wilson, M.R. Species: The Units of Biodiversity. p. 381-424.

Mayr, E. 1991. One long, argument, Charles Darwin and the genesis of modern evolutionary thought. Harvard University Press. Cambridge, Mass.

McCarthy, C. 1998-2008. Chromas Version 2.33. School of Health Science, Griffith University. Queensland.

McCauley, D.E. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 198-202.

McVaugh, R. 1966. The occurrence of the genus *Podocarpus* in western Mexico. *Ciencia (México)* **24**: 223-226.

McVaugh, R. 1992. Podocarpaceae. En: Flora Novo-Galiciana. Anderson, W.R. (Ed.). The University of Michigan Herbarium, *Ann. Arbor.* **17**: 101-103.

Meier, R. y R. Willmann. 2000. A defense of the Hennigian Species Concept. En Wheeler, Q.D. y R. Meier (Eds.): Species concept and phylogenetic theory. Columbia University Press. New York. p. 167-178.

Mill, R.R. 2003. Towards a biogeography of the Podocarpaceae. *Acta Horticulturae (ISHS)* **615**: 137-147.

Mill, R.R. y D.M. Stark-Schilling. 2009. Cuticle micromorphology of Saxegothaea (Podocarpaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 58-67.

Mill, R.R. 2015. A monographic revision of the genus *Podocarpus* (Podocarpaceae): III. The species of the Central America and Northern Mexico Bioregions. *Edinburgh Journal of Botany* **72(2)**: 243-341.

Molbo, D., C. Machado, J. Sevendter, L. Keller y E. Herre. 2003. Cryptic species of figpollinating wasps: implications for the evolution of the fig-wasp mutualism, sex, allocation, and precision of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5867-5872.

Möller, M. y Q.C.B. Cronk. 1997. Origin and relationships of *Saintpaulia* (Gesneriaceae) based of ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *American Journal of Botany* **84**: 956-965.

Müllerried, F.K.G. 1957. La geología de Chiapas. Gobierno Constitucional del Estado de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez. 180 p.

Murray, B.G.; N. Friesen y J.S. Heslop-Harrison. 2002. Molecular cytogenetic analysis of *Podocarpus* and comparison with other Gymnosperm species. *Annals of Botany* **89**: 483-489.

Nei, M. 1982. Evolution of human races at the gene level. En Human genetics, part A: The unfolding genome. Bonne-Tamir B., T. Cohen y Goodman R.M. (Eds.). Alan R. Liss, New York. p. 167-181.

Nei, M.; T. Maruyama y R. Charaborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**: 1-10.

Newton, A.C., T.R. Allnutt, A.C.M. Gillies, A.J. Lowe y R.A. Ennos. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* **14**: 140-145.

Ornelas, J.F., E. Ruíz-Sánchez y V. Sosa. 2010. Phylogeography of *Podocarpus matudae* (Podocarpaceae): pre-Quaternary relicts in northern Mesoamerican cloud forest. *Journal of Biogeography* **37**: 2384–2396.

Page, C.N. 1847. Podocarpaceae. En: Kramer, K.U. and P.S. Green. 1998. The families and genera of vascular plants. I Pteridophytes and Gymnosperms. Springer-Verlag. p. 279-391.

Pardo, A. y M.A. Ruiz. 2002. SPSS 11. Guía para el análisis de datos. McGraw-Hill. Madrid.

Pérez-Farrera, M.A., A.P. Vovides y S. Avendaño. 2014. Morphology and Leaflet Anatomy of the *Ceratozamia norstogii* (Zamiaceae, Cycadales) Species Complex in Mexico with comments on relationships and speciation. *International Journal of Plant Sciences* **175(1)**: 110-121.

Pigliucci, M. 2001. Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. John Hopkins University Press, Baltimore.

Pilger, R. 1926. Gymnospermae. En: Engler A. y K. Prantl. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* **13**: 121-407.

Puig, H. 1993. Árboles y arbustos del bosque mesófilo de montaña de la Reserva El Cielo, Tamaulipas, México. Instituto de Ecología A.C. y Centre National de la Recherche Scientifique, Xalapa, Veracruz, México. 85 p.

Quiroga, M.P. 2009. Contribución para la conservación de Podocarpaceae del Sur de Sudamérica a partir de patrones genéticos y biogeográficos. Tesis de Doctorado. Centro Regional Universitario Bariloche INIBIOMA-CONICET y Universidad Nacional de Comahue. 200 p.

Ravin, A.W. 1963. Experimental approaches to the study of bacterial phylogeny. *American Naturalist* **97**: 307-318.

Raymúndez U., M.B., M. Escala y N.X. de Enrech. (2005). Morfoanatomía foliar como herramienta para la delimitación de especies del género *Hymenocallis* Salisb. (Amaryllidaceae) presentes en Venezuela. *Acta Bot. Venez.* **28(2)**: 301-319.

Rieseberg, L.H. y D.E. Soltis. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* **5**: 65-84.

Ruiz-Jiménez, C.A.; Meave, J. y Contreras-Jiménez, J.L. 2000. El bosque mesófilo de la región de Puerto Soledad (Oaxaca), México: análisis estructural. *Bol. Soc. Bot. Mex.* **65**: 23-37.

Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México. 417 p.

Savolainen, V., M.W. Chase, S.B. Hoot, C.M. Morton, D.E. Soltis, C. Bayer, M.F. Fay y A.Y. De Bruijn. 2000. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. *Systematic Biology* **49(2)**: 306-362.

Schaal, B.A., D.A. Haywordth, K.M. Olsen y T.J. Rauscher. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**: 465-474.

Scheiner, A.M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 35-68.

Schlichting, C.D. 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**: 667-693.

SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, 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*. Jueves 30 de diciembre de 2010.

Sharp, A. 1946. La distribución del género *Podocarpus* en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **4**: 17-18.

Siegel, S. y N.H. Castellan. 1995. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Trillas. México. 437 p.

Simpson, G.G. 1951. The species concept. *Evolution* **5**: 285–298.

Simpson, G.G. 1961. Principles of Animal Taxonomy. Columbia University Press. New York.

Sneath, P.H. 1976. Phenetic taxonomy at the species level and above. *Taxon* **25**: 437-500.

Soler Cruz, M. 2002 (coord.). Evolución: la base de la Biología. Editorial Proyecto Sur. España. 548 p.

Specht, R.L. 1969. A comparison of the sclerophyllous vegetation characteristic of the Mediterranean type climates in France, California, and Southern Australia. *Australian Journal of Botany* **17**: 293-308.

Stark-Schilling, D.M. 2005. Estudios taxonómicos y filogenéticos de las especies de *Podocarpus* del Caribe y América Central. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. 41 p.

Stearns, S.C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology* **3**: 259-268.

Stevens, P.F. 1984. Metaphors and typology in the development of Botanical systematics 1690-1960, or the art of putting new wine in old bottles. *Taxon* **33**: 169-211.

Stevens, P.F. 1986. Evolutionary classifications in botany, 1960-1985. *Journal of the Arnold Arboretum* **67**: 313-339.

Stockey, R.A., B.J. Frevel y P. Woltz. 1998. Cuticle micromorphology of *Podocarpus*, subgenus *Podocarpus*, section *Scytopodium* (Podocarpaceae) of Madagascar and South Africa. *International Journal of Plant Sciences* **159(6)**: 923-940.

Stockey, R.A., H. Ko y P. Woltz. 1992. Cuticle micromorphology of *Falcatifolium De Laubenfels* (Podocarpaceae). *International Journal of Plant Sciences* **153(4)**: 589-601.

Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou y J. Bouvet. 1991. Universal primers for the amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105-1109.

Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and Evolution* **10**: 512-526.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and Evolution* **24**: 1596-1599.

Tinaut Ranera, J.A. y F. Ruano Díaz. Capítulo 17: Biodiversidad, clasificación y filogenia. En: Soler Cruz, M. 2002 (coord.). Evolución: la base de la Biología. Editorial Proyecto Sur. España. 548 p.

- Tripp, V.M.A. 2009. Análisis de la estructura genética poblacional del dorado (*Coryphaena hippurus*; Linnaeus, 1758) en el noroeste del Pacífico Mexicano y Golfo de California mediante el uso de microsatélites. Tesis de maestría. La Paz, Baja California Sur, México. 106 p.
- Van Valen, L. 1976. Ecological species, multispecies and oaks. *Taxon* **25**: 233-239.
- Vovides, A.P.; Luna Vega, I. y Medina, G. 1997. Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación. *Acta Botánica Mexicana*. **39**: 1–42.
- Vovides, A.P., S. Avendaño, M.A. Pérez-Farrera y D.W. Stevenson. 2012. What is *Ceratozamia brevifrons* (Zamiaceae)? *Brittonia* **64**: 35–42.
- Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E. Moore, R.G. Murray y E. Stackebrandt. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacteria systematics. *International Journal of Systematics Bacteriology* **37**: 463-464.
- White, T.J.; T. Burns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. En: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White (Eds.). PCR protocols. London Academic Press.
- Wolfe, K.H., W-H Li y P.M. Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 9054-9058.
- Zamudio, S. 2002. Familia Podocarpaceae. En: Flora del Bajío y regiones adyacentes, Fascículo 105. Rzedowski, J. y G. Calderón de Rzedowski (Eds.). Instituto de Ecología A.C., Patzcuaro, Michoacán. 7 p.

Zawko, G., L. Krauss, K.W. Dixon y K. Sivasithamparam. 2001. Conservation genetics of the rare endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Molecular Ecology* **10**: 2389-2396.

Zipp, D., J.V. Schneider, J. Gaviria y G. Zizka. 2003. Variación morfológica de una población de *Tillandsia biflora* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) en un bosque altoandino de Venezuela (La Caña, Valle de San Javier, Edo. Mérida). *Plantula* **3(2)**: 83-87.

12.1. Referencias electrónicas

¹<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/conifers.html> (Fecha de consulta: 14 de Marzo de 2014).

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN por el método de Lisis celular/fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico.

Día 1

- Las muestras (tejido u órgano) se parten en trozo pequeños (30 mg de muestra) y se colocan en tubos de micro-centrífuga de 1.5 µl de capacidad. Los tubos con las muestras deben estar con hielo de este punto en adelante y siempre se deben usar guantes y bata.
- Se agrega a cada tubo 360 µl de EDTA 0.5 M (pH 8.0); 19 µl de SDS al 10%, 25 µl de Tris HCl 0.1 M (pH 8.0) y 25 µl de Proteinasa K (10 mg/ml.) y se agitan en el vórtex durante 20 segundos.
- Las muestras se dejan a baño María de 12 a 18 horas a 55°C hasta que se disuelva el tejido.

Día 2

- Tratamiento con RNAasa
- Se retiran las muestras del baño María y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. A cada tubo se le agregan 2.2 µl de RNAasa a una concentración de 10 mg/ml y se dejan a baño María durante una hora a 37°C.
- Se retiran los tubos y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agrega a cada tubo 400 µl de acetato de amonio y se agitan en el vórtex por 20 segundos.
- Los tubos se centrifugan durante 5 minutos a 14,000 revoluciones por minutos (rpm en adelante). Se retira el sobrenadante y se coloca en tubos que contengan 600 µl de alcohol etílico puro frío.

Día 3

- Las muestras se centrifugan durante 6 minutos a 14,000 rpm. El alcohol etílico se retira con cuidado de mantener el botón de ADN. Se les añade 125 µl de alcohol etílico al 80% y se deja reposar de uno a dos minutos para que reinicie la hidratación del ADN. Se centrifuga durante 4 minutos a 14,000 rpm.

- Se retira el alcohol, se destapan y se centrifugan de 5 a 8 minutos a 30°C en una micro-centrífuga de vacío (concentración de vacío). Se agregan 100 µl de agua estéril para hidratar el ADN, hasta que se desaparezca el botón.

Anexo 2. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% (p/v).

- Se prepara la solución de agarosa al 1% en TAE al 1%. Se disuelven 0.375 mg de agarosa en 375 ml de amortiguador TAE 1% en un matraz. El matraz se mete al horno de microondas aproximadamente por un minuto y medio hasta que la mezcla se vea cristalina y el hervor disminuya un poco.
- La mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 5 minutos. Antes de vaciar la mezcla en el molde de la cámara de electroforesis, se coloca el peine de 10 pozos. La mezcla se vierte en el molde y se deja reposar de 15 a 20 minutos para que el gel solidifique.
- Una vez solidificado, se retira el peine, se colocan las muestras en el gel. En un parafilm se colocan 3 µl de azul de metileno más 5 µl de ADN, se resuspende bien con la micropipeta y se toma una alícuota para colocarla dentro del gel en cada uno de los pozos.
- La cámara de electroforesis se conecta con la fuente de poder a un voltaje de 90 a 100 voltios aproximadamente por una hora. Una vez que el gel haya corrido, se tiñe durante 15 minutos en una charola que contiene agua de la llave más 25 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml).
- Se retira el gel de la charola y se observa en el transiluminador de luz ultravioleta por unos instantes. Se fotografía la imagen del gel directamente en el transiluminador (se recomienda en calidad de blanco y negro para mayor apreciación de resultados).

Anexo 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- En un tubo de microcentrífuga estéril se debe colocar la siguiente mezcla de reacción:

REACTIVOS	CANTIDAD
Green Master Mix	13 μ l
H2O	10 μ l
Primer 1	1 μ l
Primer 2	1 μ l
ADN	1 μ l
Volúmen total	25 μl

- El ADN es colocado al final en cada tubo con 24.0 μ l de la mezcla y posteriormente se colocan los tubos en el termociclador y se someten a condiciones específicas de amplificación programadas para el ADN de cada especie a estudiar.

Anexo 4. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% (p/v).

- Se prepara la solución de agarosa al 1% en TAE al 1%. Se disuelven 0.6 mg de agarosa en 37.5 ml de amortiguador TAE al 1% en un matraz. El matraz se mete al horno de microondas aproximadamente por un minuto y medio hasta que la mezcla se vea cristalina y el hervor haya disminuido un poco.
- La mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 5 minutos. Antes de vaciar la mezcla en el molde de la cámara de electroforesis, se coloca el peine de 10 pozos. La mezcla se vierte en el molde y se deja reposar de 15 a 20 minutos para que el gel solidifique.
- Cuando esté solidificado se retira el peine y se colocan las muestras en el gel. En un parafilm se colocan 3 μ l de ADN, 1 μ l de ladder más 1 μ l de azul de bromofenol; se resuspende bien con la micropipeta y se toma una alícuota para colocarla dentro del gel en cada uno de los pozos. La cámara de electroforesis se conecta con la fuente de poder a un voltaje de 90 a 100 voltios aproximadamente por una hora.
- Una vez que el gel haya corrido, se tiñe durante 15 minutos en una charola que contiene agua de la llave más 25 μ l de Bromuro de Etidio, se retira el gel de la charola y se observa en un transiluminador de luz ultravioleta por unos instantes.

Se fotografía la imagen del gel directamente en el transiluminador (se recomienda en calidad de blanco y negro para mayor apreciación de los resultados).

Anexo 5. Lista de caracteres y sus estados según Stark-Schilling (2005).

1. Longitud de la hoja adulta mm

2. **Ancho de la hoja adulta** (en el punto más ancho) mm

3. Canal en el haz de la hoja

1. Presente en todo el largo

2. Presente en el extremo proximal

3. Presente en el extremo distal

4. Ausente

4. Canal en el envés de la hoja

1. Presente en todo el largo

2. Presente en el extremo proximal

3. Presente en el extremo distal

4. Ausente

5. Protuberancia en el haz de la hoja

1. Presente en todo el largo

2. Presente en el extremo proximal

3. Presente en el extremo distal

4. Ausente

6. Protuberancia en el envés de la hoja

1. Presente en todo el largo

2. Presente en el extremo proximal

3. Presente en el extremo distal

4. Ausente

7. Ápice de la hoja

1. Acuminado

2. Largamente acuminado

3. Apiculado

4. Largamente apiculado

5. Agudo

6. Largamente agudo

8. Mucronado

9. Pungente

8. Forma de la hoja

1. Lanceolada

2. Lanceolada-falcada

3. Falcada

4. Elíptica

- 5. Lanceolada-elíptica
 - 6. Elíptica-oblancoada
 - 7. Linear
 - 8. Linear-elíptica
- 9. Hoja revoluta**
- 1. Revolutas
 - 2. No revolutas
- 10. Mucrón o arista en el ápice de la hoja**
- 1. Ausente
 - 2. Presente
- 11. Longitud del mucrón de la hoja mm**
- 12. Ancho de la vena central** (medida en el envés en el punto más ancho) mm
- 13. Número de filas de estomas** (a un lado de la vena central)
- 14. Longitud de las escamas del brote terminal mm**
- 15. Ancho de las escamas de los brotes** (en el punto más ancho) mm
- 16. Mucrón en el ápice de las escamas de los brotes terminales**
- 1. Presente
 - 2. Ausente
- 17. Curvatura de las escamas del brote terminal**
- 1. Derechas
 - 2. Curvadas hacia adentro
 - 3. Curvadas hacia afuera
- 18. Longitud de las escamas del brote terminal mm**
- 19. Forma del brote terminal**
- 1. Globoso
 - 2. Ovoide
 - 3. Esférico
 - 4. Cónico
- 20. Longitud de la semilla madura mm**
- 21. Ancho de la semilla madura** (al punto más ancho) mm
- 22. Número de brácteas en el receptáculo**
- 1. Dos brácteas
 - 2. Tres brácteas
- 23. Número de semillas por cono femenino**
- 1. Una semilla
 - 2. Dos semillas
- 24. Longitud del pedúnculo mm**

25. **Longitud del receptáculo** mm (en cono femenino maduro)

26. **Ancho del receptáculo** mm (al punto más ancho de conos maduros)

27. **Cresta en la semilla**

1. Presente

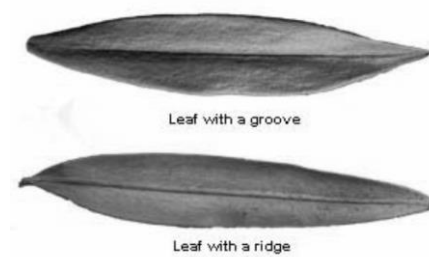
2. Ausente

28. **Longitud del cono masculino maduro** mm

29. **Ancho del cono masculino maduro** mm

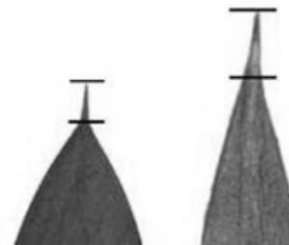
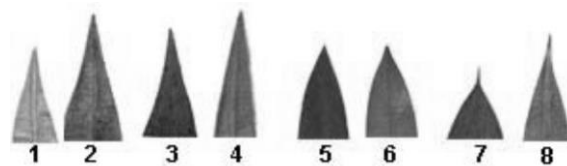
Anexo 7. Fotografías mostrando algunos caracteres según Stark (2005).

Caracteres 3; 4; 5 & 6



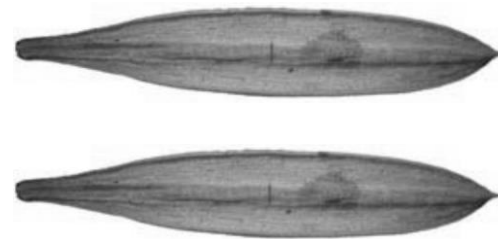
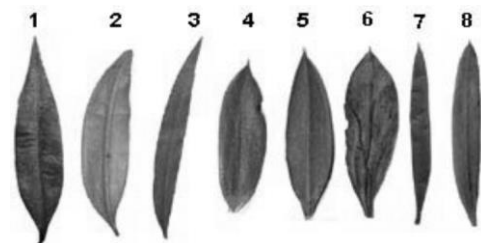
Carácter 11

Carácter 7



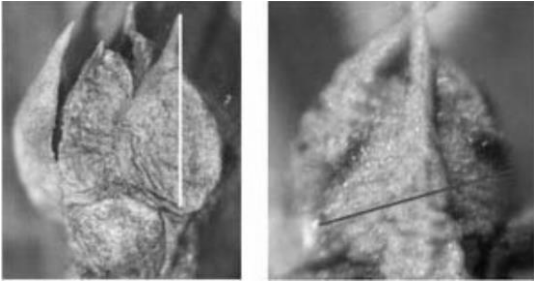
Carácter 12

Carácter 8

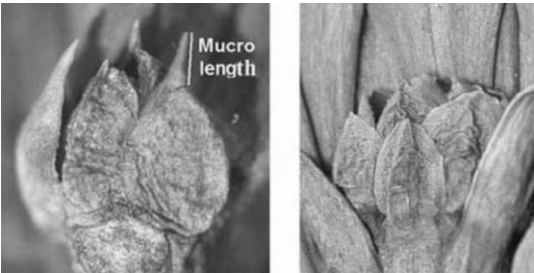


Caracteres 14 y 15

Carácter 10



Caracteres 16 y 18



Carácter 22



Caracteres 25 y 26

