
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PATRONES DE VARIACIÓN QUÍMICA DE POBLACIONES DEL
COMPLEJO *PINUS AYACAHUITE-PINUS STROBIFORMIS***

Por

LETICIA MAYA ZEPEDA

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE ECOLOGÍA)**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO
MAYO DEL 2006**



**PATRONES DE VARIACIÓN QUÍMICA DE POBLACIONES DEL
COMPLEJO *PINUS AYACAHUITE-PINUS STROBIFORMIS***

Por

LETICIA MAYA ZEPEDA

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE ECOLOGÍA)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
MAYO DE 2006**

Aprobada por:

Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula
Asesor del Comité Particular

Fecha

M. en C. Antonio Rodríguez Rivas
Asesor del Comité Particular

Fecha

Dr.a Anne Santerre-Lucas
Sinodal del Comité Particular

Fecha

Dr. Jorge A. Pérez de la Rosa
Sinodal del Comité Particular

Fecha

Dr. Fernando A. López Dellamary
Presidente del Comité Particular

Fecha

Este trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Madera Celulosa y Papel y en el Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería de la División de Ingenierías del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías; Universidad de Guadalajara y forma parte del proyecto, “PINOS BLANCOS MEXICANOS: DIVERSIDAD GENÉTICA, QUÍMICA Y UBICACIÓN TAXONÓMICA”. financiado SEP-CONACYT (33129-B) (Responsable Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula), con la Beca de Proyectos de Investigación Número 3204 para Leticia Maya Zepeda.

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | vi |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | ix |
| RESUMEN..... | x |
| SUMMARY..... | xii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 3 |
| 1. Descripción del Complejo <i>Pinus ayacahuite-P. strobiformis</i> . | |
| 2. Variación de la Composición Química de los Pinos. | |
| 3. Quimiotaxonomía de Pinos. | |
| 4. Monoterpenos reportados en Pinos de México y Mesoamérica. | |
| 5. Biogeografía | |
| 6. Metabolómica | |
| OBJETIVO GENERAL..... | 11 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 11 |
| HIPÓTESIS..... | 11 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 12 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 15 |
| CONCLUSIONES..... | 40 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 42 |
| ANEXOS | 45 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Características morfológicas de acículas, conos y semillas del complejo <i>P. ayacahuite</i> - <i>P. strobiformis</i> | 17 |
| Figura 2. Mapa de localización de los sitios de colecta | 12 |
| Figura 3. Perfiles cromatográficos en diferentes extractos de acículas de <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex Schlechtendal, localizado en el Departamento de Madera Celulosa y Papel | 15 |
| Figura 4. Perfiles cromatográficos de ramas y acículas de <i>P. ayacahuite</i> y <i>P. strobiformis</i> | 16 |
| Figura 5 . Perfiles cromatográficos de muestras de acículas extraídas sonicación | 17 |
| Figura 6. Compuesto sugerido conforme a su índice de similitud | 18 |
| Figura 7. Perfil cromatográfico de <i>P. strobiformis</i> 138, localidad de Creel en Chihuahua | 24 |
| Figura 8. Perfil cromatográfico de <i>P. ayacahuite</i> , muestra 45b, comparado con el perfil cromatográfico de <i>P. oocarpa</i> , muestra 151 | 25 |
| Figura 9. . Perfil cromatográfico de <i>P. ayacahuite</i> , muestra 45b (arriba), comparado con el perfil cromatográfico del <i>P. ayacahuite</i> localizado en el DMCyP (abajo) | 26 |

| | |
|---|----|
| Figura 10. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. ayacahuite</i> , localidad: Las Palmas, municipio de Los Reyes, Michoacán | 27 |
| Figura 11. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. ayacahuite</i> , localidad: Comunidad de Palo Hueco, municipio de Real del Monte, en el Edo. de Hidalgo | 28 |
| Figura 12. Perfil cromatográfico de acículas de de <i>P. ayacahuite</i> , de la localidad Km. 228 carretera 186 Palenque-San Cristóbal, municipio de San Cristóbal Chiapas | 28 |
| Figura 13. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. ayacahuite</i> , de la localidad: Km. 4.5, 6, 9, 31 y 32 del camino Talpa-Cuale, municipio de Talpa de Allende, en el Edo. de Jalisco | 29 |
| Figura 14. Comparación de los perfiles cromatográficos de acículas de <i>P. ayacahuite</i> muestreado en diferentes localidades | 29 |
| Figura 15. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. ayacahuite</i> var. <i>Veitchii</i> | 30 |
| Figura 16. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> comparado con el perfil cromatográfico de acículas <i>P. ayacahuite</i> | 31 |
| Figura 17. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. strobiformis</i> , de la localidad: km 130 de la carretera 40 Durango-Mazatlán, 3 km al S por el camino a Chavaría, municipio de Pueblo Nuevo, en el Edo. de Durango | 32 |
| Figura 18. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. strobiformis</i> , de la localidad: Observatorio INAOE, en el municipio de Cananea, en el Edo. de Sonora | 33 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. strobiformis</i> , de la localidad: Carretera Creel-Divisadero, en el municipio de Boycona, Chihuahua | 33 |
| Figura 20. Comparación de los perfiles cromatográficos de acículas de <i>P. strobiformis</i> muestreado en diferentes localidades | 34 |
| Figura 21. Perfil cromatográfico de acículas de <i>P. strobis</i> var. <i>chiapensis</i> Martínez, de la localidad: Parada La Reforma, 8 km al oeste de Tlapacoyan, municipio de Tlapacoyan , Edo. de Veracruz | 35 |
| Figura 22. Perfil cromatográfico de <i>P. strobis</i> var. <i>chiapensis</i> Martínez, de la localidad: Km. 200 carretera 195 en el municipio de Bochil, Estado de Chiapas | 35 |
| Figura 23. Identificación de los compuestos elegidos | 36 |
| Figura 24. Correlación de los pinos blandos analizados en el estudio | 37 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Compuestos sugeridos en ramas del complejo <i>P. ayacahuite-P. strobiformis</i> | 19 |
| Tabla 2. Compuestos sugeridos para acículas del complejo <i>P. ayacahuite-P. strobiformis</i> | 21 |
| Tabla 3. Resumen de las funciones canónicas discriminante | 38 |
| Tabla 4. Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas | 38 |
| Tabla 5. Clasificación de los grupos | 39 |

RESUMEN

El complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* son pinos de condiciones ecológicas restringidas y como resultado de la enorme presión antropogénica hay una continua reducción de los bosques de estas especies. Este complejo presenta problemas para su correcta identificación porque aunque presenta algunas características distintivas, tiene muchas semejantes. Entre las características distintivas se puede mencionar las dimensiones relativas del ala de la semilla, tradicionalmente utilizadas para separar ambos taxa. El estudio de la composición de monoterpenos de las oleoresinas se ha utilizado como complemento en la definición de la variabilidad genética y ubicación taxonómica de ellos. La porción volátil es apropiada para propósitos de estudio de la geografía química de pinos. Los ácidos resínicos de coníferas son empleados también como biomarcadores. Sin embargo, no existe un tratamiento sistemático de la composición de la oleoresina de los pinos blancos mexicanos y en especial en lo que respecta a este complejo los estudios son escasos. En tal marco, este trabajo se efectuó con el objetivo de evaluar los patrones de composición química dentro y entre de las poblaciones del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* por cromatografía de gases con el fin de comparar los perfiles cromatográficos de las especies y la variación de estos en las diferentes localidades e identificar algunos de los compuestos presentes en las muestras por medio de espectrometría de masas. El estudio estuvo enmarcado dentro del proyecto CONACYT “PINOS BLANCOS MEXICANOS: DIVERSIDAD GENÉTICA, QUÍMICA Y UBICACIÓN TAXONÓMICA”. El muestreo se llevó a cabo de marzo del 2001 a junio del 2002. Las extracciones se realizaron de acículas y ramas por el método de sonicación en pentano y fueron analizadas por CG y CG/EM. Se encontró diferencias en los perfiles cromatográficos entre las muestras de las localidades analizadas. En las acículas es evidente el mayor proporción y número de compuestos, con respecto a las ramas Las ramas poseen mayor proporción de diterpenos. El análisis

discriminante muestra que las especies analizadas forman grupos discretos, aunque en algunos casos estos se traslapan. El patrón en los componentes químicos del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* tiene correspondencia con su taxa. El perfil cromatográfico podría ser empleado como una útil herramienta para distinguir entre especies de diferentes localidades.

SUMMARY

The *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* taxonomic complex is made up of pines that grow under restricted ecological conditions, as a result of high anthropogenic pressures and the resulting reduced forested areas. This complex has taxonomic difficulties within and although there are several characteristics that differentiate each taxon from another, there are many similarities. A specific characteristic is for example the seed wing size which has been used commonly to differentiate taxa. The oleoresin monoterpene composition has been used as a complement to study the genetic variability and thus their taxonomic position. The volatile fraction has been considered appropriate to study the chemical-geography of pines. Moreover, resinic acids have been used as biomarkers in conifers. However, there has not been any report on a systematic treatment of the chemical composition of oleoresins of the Mexican white pines, indeed this group has been almost neglected. Thus, this work has been carried out to evaluate the chemical composition patterns between and within populations of the *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* complex. Gas chromatography alone and coupled to Mass Spectrometry (GC and GC-MS) was chosen as the analytical tool to compare and assess the variability of the chromatographic profiles of samples obtained from different populations of the species comprising the complex. Mass spectrometry was used to identify chemically as much as possible the different and individual chromatographic peaks. This study was part of a broader project sponsored by CONACYT “ White Mexican Pines: Genetic, Chemical Diversity and Taxonomic Placement”. Sampling was carried out from March 2001 to June 2002. Extracts were obtained from pine needles and wood from branches using pentane under sonication, thereafter they were analyzed by GC(FID) and GC-MS. Clearly, differences were found in the chromatographic profiles when comparing samples from different populations and geographical regions. Pine needle extracts were more abundant in concentration and number in compounds than branch-wood extracts.

Branches show a larger share of diterpenes. Statistical discriminant analysis shows that the samples here studied constitute discrete groups, although some times they overlap. The chromatographic profile-chemical composition of the *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* complex exhibits a good correspondence to the taxonomic placement of its taxa. Thus, chromatographic profiles could be useful to distinguish different species from different localities.

INTRODUCCIÓN

Los pinos representan el componente dominante de la vegetación en amplias regiones del hemisferio norte. Su valor económico es muy importante como fuente de madera, pulpa celulósica, semillas, resina y otros productos. Los bosques de pinos tienen influencia en su entorno de muchas formas, afectan procesos biogeoquímicos, hidrológicos y los regímenes de incendios, proporcionan alimento y crean hábitat para muchas plantas y animales (Richardson, 1998). El género *Pinus* es el más grande de la familia Pinaceae con cerca de 120 especies reconocidas. El grupo tiene una distribución geográfica casi exclusiva en el hemisferio norte desde las zonas boreales hasta las francamente tropicales. Hay alrededor de 65 especies en centro y Norte-América, de las cuales 43 están representadas en México (Farjon y Styles, 1997), razón por la cual México es considerado el país más rico en especies de pinos del mundo. Mas aún, si se toman en cuenta variedades y formas reconocidas, el número de taxa aumenta a aproximadamente a 70 (Perry, 1991).

El complejo taxonómico *Pinus ayacahuite* Enrenberg ex. Schlechtendal -*P. strobiformis* Engelm. se encuentra ubicado dentro del subgénero *Strobus*, sección *Strobus*, subsección *Strobi* (Little y Critchfield, 1969), formando parte del grupo de pinos conocido como pinos blancos. Al ser pinos de condiciones ecológicas restringidas y como resultado de la enorme presión antropogénica hay una continua reducción de los bosques de estas especies, lo que afecta la distribución y calidad fenotípica de las poblaciones de Pinos Blancos Mexicanos (Mirov, 1997; Hernández, 1991; Ramírez, 1990).

El complejo taxonómico *Pinus ayacahuite*-*P. strobiformis*, presenta características similares morfológicamente, lo que dificulta frecuentemente su correcta identificación. Aunque se han definido tres variedades de *P. ayacahuite*: *P. ayacahuite* Ehrenb. Ex Schtdl. var. *ayacahuite*, *P. ayacahuite* Ehrenb. ex Schtdl. var. *brachyptera* Shaw (Martínez, 1948), existe aún controversia en relación a la variedad *brachyptera*, ya que las diferencias

se han considerado a nivel específico con el nombre de *P. strobiformis* (Little y Critchfield, 1969).

El estudio de la composición de monoterpenos de las oleoresinas se ha utilizado en la definición de la variabilidad genética y ubicación taxonómica de ellos. Sin embargo, no existe un tratamiento sistemático de la composición de la oleoresina de los pinos blancos mexicanos; en especial no se conocen con detalle los sesquiterpenos y ácidos diterpénicos. Tampoco hay estudios sistemáticos de los ciclitales identificados en algunos pinos blancos entre ellos *Pinus lambertiana* "sugar pine" y *Pinus ayacahuite*. La porción volátil de las oleoresinas ha sido considerada como la más apropiada para propósitos de estudio de la geografía química de pinos (Mirov, 1967).

En tal marco, este trabajo se efectuó con el objetivo de determinar los perfiles de los componentes químicos de acículas y ramas del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis*. Con ello se espera contribuir con el conocimiento del complejo y de los productos naturales obtenidos de este recurso.

ANTECEDENTES

1. Descripción del Complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis*

El género *Pinus* está dividido en dos subgéneros, el *Pinus* y el *Strobus*. La sección *Strobus* subsección *Strobi* del subgénero *Strobus* abarca a los llamados pinos blancos, que son alrededor de 16 especies en todo el mundo. En el noreste de Norteamérica, el *Pinus strobus* L., es uno de los más importantes árboles maderables, el cual es plantado ampliamente, lo mismo el *P. lambertiana* Dougl. en el Oeste Norteamericano. En México están representados principalmente por el complejo taxonómico *P. ayacahuite-P. strobiformis* y el *Pinus strobus* var *chiapensis* Martínez, además de unas pequeñas poblaciones norteñas de *Pinus lambertiana* en San Pedro Mártir, Baja California y de *Pinus flexilis* James en Chihuahua, Coahuila y Nuevo León (Farjon y Styles, 1997).

En México estos pinos se encuentran de manera dispersa, casi nunca formando masas puras y en muchos casos en poblaciones aisladas (Pérez de la Rosa, 1993; Ramírez y Musálem, 1999). De este grupo el *Pinus strobus* var. *chiapensis* (= *Pinus chiapensis*) y el complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis* son los más explotados comercialmente en México.

El complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis* presenta problemas para su correcta identificación al poseer muchas características semejantes y algunas distintivas; entre éstas últimas las dimensiones relativas del ala de la semilla, tradicionalmente utilizadas para separar ambos taxa. Little y Critchfield (1969), señalan que estas especies se encuentran ubicadas en la subsección *Strobi* y forman parte del complejo *Pinus flexilis-P. strobiformis-P. ayacahuite*. Estos poseen fascículos de vaina caediza y cinco acículas de 6-11.5 cm de longitud, conos ligeros de 20-45 cm de longitud (Fig. 1). Son árboles en general de gran porte, de hasta 200 cm de diámetro y hasta 50 m de altura (Farjon y Styles, 1997), con fustes rectos, de madera clara de buena calidad, ligera y fácil de trabajar, con amplia demanda en carpintería de muebles, construcción, torneados, ebanistería, etc. El tallo y las ramas también se usan como leña, la planta completa es explotada actualmente como el

árbol de Navidad Mexicano (SEMARNAT, 2003). En el proceso Kraft para obtener pulpa celulósica se obtiene aguarrás, colofonia y ácidos grasos. El aguarrás puede destilarse y así separar compuestos de alto valor como precursores para síntesis orgánica de aromas, perfumes y fármacos. La colofonia tiene más alto valor cuanto mayor cantidad de ácidos diterpénicos diinsaturados contenga, pues pueden ser condensados por reacciones Diels-Alder para la preparación de encolantes en la fabricación del papel y cartón (Drew y Props., 1981).

Clasificación de los pinos blancos mexicanos

Reino: Vegetal

División: Espermatofita

Subdivisión: Gymnospermae

Orden: Coniferales

Familia: Pinaceae

Género: *Pinus*

Subgénero: *Strobus*

Sección: *Strobus*

Subsección: *Strobi*

Especies:

Pinus lambertiana Dougl.

Pinus flexilis James

Pinus strobiformis Engelm.

Pinus chiapensis (Martínez) Andersen

Pinus ayacahuite Enrenberg ex. Schlechtendal

var. *veitchii* Shaw

var. *brachyptera* Shaw

(Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997).

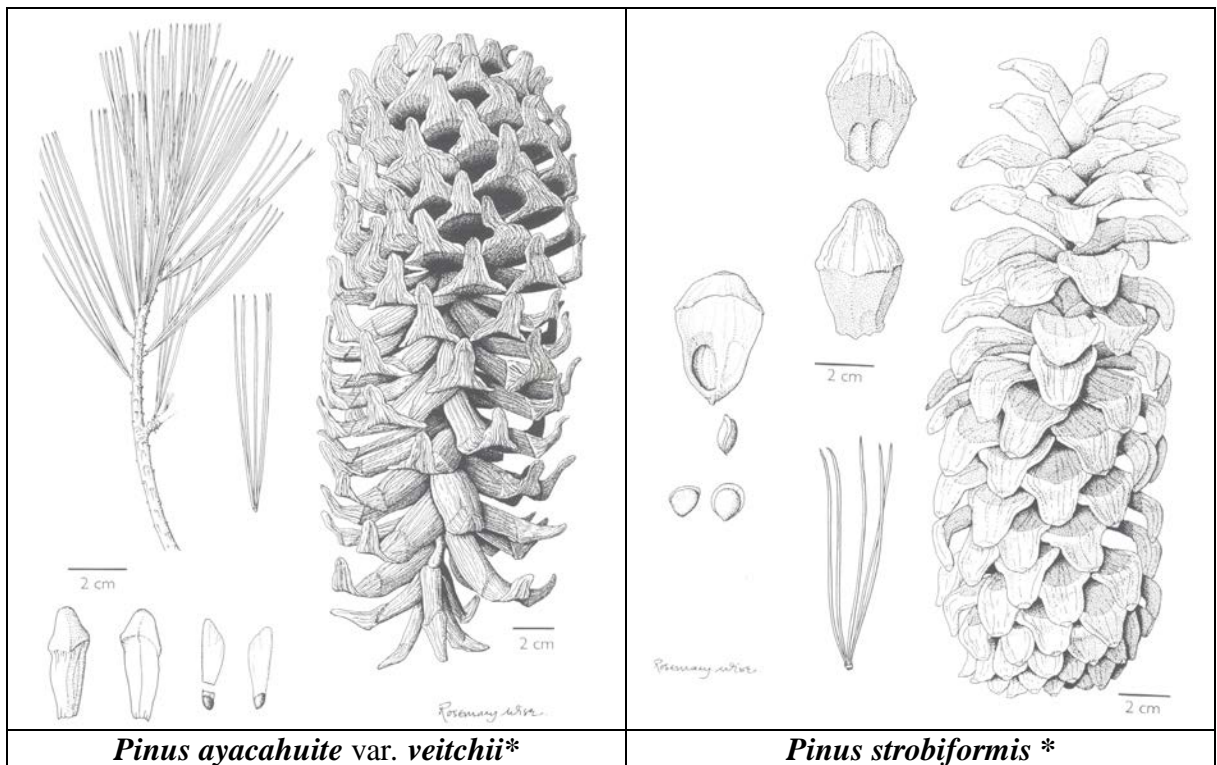


Fig. 1. Características morfológicas de acículas, conos y semillas del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*.
 * Ilustraciones por Rosemary Wise (Farjon et al., 1995)

Debido a su amplia y fragmentada distribución, los ejemplares de *P. ayacahuite-P. strobiformis* presentan tendencia a cierta variación ecotípica, Silba (1990) describe hasta cuatro variedades (*P. ayacahuite* var. *loudoniana* (Gordon) Silba, *P. ayacahuite* var. *oaxacana* Silba, *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) Shaw y *P. strobiformis* var. *potosiensis* Silba). En Jalisco existe una población de *P. ayacahuite* que presenta características morfológicas intermedias entre las poblaciones del norte y del centro. Ésta ha sido definida como: *P. ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw (Martínez, 1948), *P. ayacahuite* var. *novogaliciana* Carvajal (Carvajal, 1986).

Pinus ayacahuite es más frecuente en bosques mixtos de coníferas en sitios mesófilos de montaña. Su mejor desarrollo lo alcanza en suelos margosos y bien drenados, en altitudes entre 1500-3600 msnm. En México se encuentra según Frajon en Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Tlaxcala, México, Morelos, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Farjon *et. al.*, 1995).

Pinus strobiformis habita pinares y bosques mixtos de pino y encino de montaña, en sitios mesófilos con suelos relativamente profundos, también en laderas de exposición norte y en bosques de coníferas de las altas montañas con *Abies* y/o *Pseudotsuga*; en altitudes entre 1900-3500. En México se encuentra principalmente en la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre Oriental, en Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Durango, Jalisco y muy localmente en Zacatecas y San Luis Potosí (Farjon *et al.*, 1995).

2. Variación de la Composición Química de los Pinos

Los metabolitos secundarios de las células de las plantas, son compuestos de bajo peso molecular que no están involucrados en la actividad del metabolismo principal, incluidos monoterpenos C₁₀, sesquiterpenos C₁₅ y diterpenos C₂₀ (Croteau y Johnson, 1985). En los canales resiníferos se produce la oleoresina que es una mezcla de compuestos terpenoides, flavonoides y de ácidos grasos, éstos juegan un papel importante en la resistencia a enfermedades y en la defensa contra el ataque de insectos fitófagos y hongos (Phillips y Croteau, 1999).

Dado que la resina se sintetiza en los ductos resiníferos de cada tejido específico la composición obtenida de diferentes fuentes del mismo árbol no es la misma. Las concentraciones de monoterpenoides pueden variar entre los diferentes tejidos de un mismo árbol, entre los mismos tejidos del mismo árbol y entre localizaciones geográficas diferentes (Mannien *et al.*, 1998).

Los estudios relacionados con la composición química de la trementina en acículas y madera son escasos (Sjödin *et al.*, 1996, 2000; Kleinhentz *et al.*, 1999; Latta *et al.*, 2000). Recientemente, Mannien (2002) reportó para *Pinus sylvestris* L que la concentración de monoterpenos es más grande en acículas que en madera, y que la madera tiene más ácidos resínicos tricíclicos que las acículas. La composición varía en el mismo sistema a diferentes exposiciones cardinales del mismo árbol (Rockwood, 1973; Roberts, 1970). Hay variación por el estado de desarrollo del árbol y con la estación del año (von Rodloff, 1975). Loreto *et al.*, (2000), han determinado que la emisión de monoterpenos es mayor en plantas jóvenes y que la cantidad es diferente en acículas primarias que en secundarias. El estrés

generado por la sequía incrementa las concentraciones de varios monoterpenos y ácidos resínicos en *Pinus sylvestris*. (Turtola *et al.*, 2003, Langenheim, *et al.*, 1979).

Una infestación por insectos puede incrementar la producción de monoterpenos y diterpenos (Rafa & Berryman, 1983). Los monoterpenos constituyen parte de los volátiles de estas especies de coníferas y muchos de ellos se han encontrado ser activos en la interacción insecto-conífera. También ha sido reportada la variación intraespecífica en la cantidad relativa de monoterpenos, así como en su composición enantiomérica. Se conoce de grandes diferencias entre los contenidos de los tejidos del mismo árbol. Esta variación en la composición de monoterpenos puede afectar la preferencia de los insectos por un tejido específico o por un árbol en particular (Sjödin *et al.*, 1996; Loreto *et al.*, 2000).

3. Quimiotaxonomía de Pinos

Los criterios alternativos a los morfológicos que sean útiles para la clasificación y la identificación de taxa en grupos de plantas en donde la falta de consenso en la ubicación y delimitación de los diferentes elementos es una constante, como es el caso del género *Pinus*, pueden ser de mucha utilidad. Para que los componentes químicos de las plantas tengan importancia taxonómica, deben tener ciertas características, con patrones o perfiles tendientes a ser especie-específicos; es decir, una variación correlacionada y coherente entre taxa (Almaraz, 2000).

La composición de monoterpenos de las oleoresinas de los pinos ha sido ampliamente usada para ayudar en el estudio de la variabilidad genética y filiación taxonómica de ellos (Mirov, 1967; Perry, 1991; Farjon Styles, 1997; Donahue, 1995). Se piensa convencionalmente que los monoterpenos están bajo control genético, y que los niveles totales de éstos varían con la estación y la fenología (Langenheim, 1994). Los datos de monoterpenos tienen un papel importante en la delimitación de especies, como complemento a caracteres taxonómicos. Los ácidos resínicos de coníferas son empleados también como biomarcadores (Simoneit, 2005).

Inicialmente los caracteres cualitativos o discretos (la presencia o la ausencia de compuestos) han sido utilizados para examinar relaciones o para delimitar taxa, pero cuando la especie investigada presentaba el mismo sistema de compuestos, los rasgos cuantitativos ofrecen mejor apoyo para dicha delimitación de taxa. Ocasionalmente los datos de monoterpenos demuestran las diferencias cualitativas entre especies, pero a menudo son el reflejo de un muestreo inadecuado en uno o más niveles. También sucede que un compuesto que había sido declarado ausente en una población de estudio puede ser detectado en porciones pequeñas, o en frecuencias bajas en otra población (Birks y Kanowski, 1988). Algunos pinos, que se suponían estrechamente relacionados, pueden tener oleoresinas de diferente composición, por otro lado, se sabe que dos especies taxonomicamente remotas pueden tener oleoresinas de similar composición (Birks, 1997).

A pesar de que numerosos estudios acerca de la composición de oleoresina de varias especies de pinos han sido publicados desde principios del siglo pasado, lamentablemente un número limitado de ellos se refiere a los pinos blancos mexicanos. Mirov (1961) en su publicación “Composición de las Trementinas de los Pinos Mexicanos” es el único antecedente de análisis químico, en él se describe de manera somera la composición de la trementina de *P. ayacahuite*.

4. Monoterpenos reportados en Pinos de México y Mesoamérica

Las oleoresinas de pinos mexicanos y mesoamericanos se diferencian claramente de otros pinos; los constituyentes principales reportados han sido α -pineno y β -felandreno, el β -felandreno es casi único para las especies de México y Mesoamérica (Mirov, 1967). El Δ -3-careno y el longifoleno son constituyentes comunes de las oleoresinas, raramente encontrados en pinos de otras regiones excepto en especies del oeste de Norteamérica con la cuales hay relación estrecha. La oleoresina de *Pinus jeffreyi*, especie del norte de México, es dominada por n-heptano y mínima proporción de α -pineno. *P. culteri*, al norte de México posee una resina en la cual en sus componentes químicos domina α -pineno más β -felandreno. (Birke y Kanowski, 1988).

Entre los sesquiterpenos (C_{15}) de alguna posible importancia comercial, figuran las sustancias análogas al cadineno, estos se emplean como fijadores (porta-aromas) en la industria de la perfumería. El longifoleno, un sesquiterpeno que anteriormente sólo había sido encontrado en dos pinos de la India, es el sesquiterpeno más común en las trementinas mexicanas (así como en las de Norteamérica occidental). La presencia de un hidrocarburo parafínico semejante al queroseno, el undecano normal ($C_{11}H_{24}$) en algunas trementinas mexicanas tiene interés científico; pero existe otro hidrocarburo parafínico, el n-heptano (C_7H_{16}), que se ha encontrado en por lo menos seis pinos mexicanos (Mirov, 1967).

5. Biogeografía

De la misma manera que el estudio de grupos sanguíneos se usa para estudios del origen y migración de diferentes razas humanas, la distribución geográfica de los constituyentes químicos puede ser usada en estudios del género *Pinus* (Mirov, 1961, 1967). Con este propósito la porción volátil de las oleoresinas ha sido considerada como la más apropiada. Mirov en la década de los 60 hace una contribución valiosa a este respecto, reportando que el α -pineno se ha encontrado en toda el área donde está distribuido el género *Pinus*, variando solamente la proporción. Se encuentra más β -pineno en las especies encontradas en el este de Norte América y en Euroasia que en el oeste de América y México. El Δ -careno se ha reportado en el este asiático y oeste americano. metil chavicol se encuentra solamente en pinos del Nuevo Mundo, hacia el sur de la distribución general del género *Pinus*. El longifoleno ha sido reportado en más especies de pinos del oeste de Estados Unidos (no ha sido encontrado en especies del este), en especies de México y en unas pocas en Asia. Para un alcano, el n-heptano la distribución está restringida al oeste de Estados Unidos y en algunas especies a lo largo de México.

6. Metabolómica (*Metabolomics*)

La metabolómica es el “estudio sistemático de la huella digital particular de los productos de un proceso celular específico” - concretamente, el estudio de los perfiles de metabolitos de bajo peso molecular. Representa la colección de metabolitos en un organismo biológico, la cual es el producto final que resulta de la expresión genética. En la metabolómica, el objetivo principal es identificar diferencias en los perfiles metabólicos entre las muestras (Bahlla, *et al.*, 2005). La huella digital obtenida puede ser usada como una herramienta de

clasificación. La meta ideal sería llegar a identificar y cuantificar todos y cada uno de los metabolitos en un sistema biológico (Jonsson *et al.*, 2005).

La metabolómica es una herramienta poderosa para estudiar los cambios en la expresión genética y los efectos fenotípicos y metabólicos provocados por la repuesta al ambiente o al estrés. La clasificación de la muestra es rápida, representa un análisis global, sin la identificación precisa de los compuestos. Los resultados no son realmente cuantitativos, pero son consistentes para un análisis comparativo (Glass, 2000).

La metabolómica es una ciencia multidisciplinaria, requiere la cooperación entre químicos, biólogos e informáticos. No se utiliza un método analítico único, para detectar al conjunto de metabolitos en un sistema aislado de un tejido biológico, se requiere la preparación de un extracto. La elección del disolvente usado inicialmente para la extracción inmediatamente dictamina la clase de compuestos presentes en el extracto. Actualmente no existe un método analítico único capaz de detectar todas las clases de metabolitos y diferenciarlos. Por lo tanto se aplican una amplia variedad de métodos y los datos resultantes se conjuntan para evaluar y proporcionar el panorama más completo posible del estado metabólico del organismo en estudio. Las técnicas mas utilizadas son: Cromatografía de Gases (GC), Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los patrones de composición química dentro y entre de las poblaciones del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* por cromatografía de gases.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Establecer el método de extracción adecuado para acículas y ramas
- 2.- Identificar algunos de los compuestos presentes en las muestras por medio de espectrometría de masas
- 3.- Comparar los perfiles cromatográficos de las especies y la variación de estos en las diferentes localidades

HIPÓTESIS

El patrón en los componentes químicos del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* puede tener correspondencia con su taxa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área y métodos de muestreo.

Se analizaron las muestras colectadas para el proyecto CONACYT “PINOS BLANCOS MEXICANOS: DIVERSIDAD GENÉTICA, QUÍMICA Y UBICACIÓN TAXONÓMICA”. El muestreo se llevó a cabo de marzo del 2001 a junio del 2002 (Anexo 1). Las localidades donde se colectó el material se señalan en la figura 2.



Atlas mundial Encarta 1996

Fig. 2. Mapa de localización de los sitios de colecta

Se estudió la composición química en acículas de 132 individuos y en ramas de 20 individuos. En todos los casos se eligieron árboles adultos y de apariencia sana, las muestras fueron colectadas en diferentes condiciones ecológicas. Con fines comparativos se analizó también una muestra de acículas de *Pinus oocarpa*, colectada en el campo experimental del Bosque Escuela en la Sierra de La Primavera (área de protección) localizado en el municipio de Tala, Jalisco; la fecha de colecta se realizó el día 30 de octubre de 2005.

2. Tratamiento de las muestras.

Ramas: se seleccionaron ramas maduras de pinos tomados al azar de la población. Para minimizar la volatilización de compuestos entre el campo y laboratorio, las muestras fueron refrigeradas. Una vez en el laboratorio, se tomó una muestra del extremo de la rama distante al corte inicial para reducir la influencia sobre la composición que se hubiera causado con el primer corte. Se cortó una rebanada con espesor de 2 cm, se le despojó de la corteza y se redujo a astillas, posteriormente fueron congeladas con nitrógeno y molidas. Se pesó una alícuota de aproximadamente 10.0 g y se sometió a extracción con 20 mL de pentano sonicandola durante 15 minutos (Sulman *et al.*, 1998; Semagina *et al.*, 2000; Connors *et. al.*, 2001), utilizando el aparato de ultrasonido marca Bransonic, modelo 5210R.

Acículas: Igualmente se transportaron al laboratorio bajo refrigeración. Se tomaron aproximadamente 5 g de acículas, las cuales se congelaron con nitrógeno líquido para ser molidas y se sometieron a extracción con 20 mL de pentano (Sjödín *et al.*, 1996) y se sonicaron durante 15 minutos. Concluido el tiempo de extracción, las muestras se filtraron y concentraron hasta un volumen de 0.5 mL y se almacenaron a -25°C hasta su posterior análisis. A cada extracto se adicionaron 2 μL de una solución de guayacol (concentración 4.5 mg/mL en pentano), como estándar interno.

3. Materiales

El pentano utilizado en la extracción es grado HPLC, de Laboratorios Caledon (Ontario, Canada) y el guayacol es grado espectroscópico marca Merck (Darmstadt, Alemania).

4. Análisis Químico

Los cromatogramas se obtuvieron con un Cromatógrafo de Gases/Detector de Ionización de Flama (GC/F.I.D.), marca Chrompack mod CP9000 bajo las siguientes condiciones de análisis: tipo de columna, DB 5 (5% difenil, 95% dimetilsiloxano); largo de columna, 30.0 m; diámetro de columna, 0.32 mm, y película de 0.20 μm ; gas portador He; a flujo de 1.0

mL/min; relación de split, 1:3; inyector a temperatura de 250 ° C; en el horno el siguiente programa de temperaturas: temperatura inicial, 70 ° C con un tiempo inicial de 5 min., incremento de 5 ° C por min. hasta llegar a 220 ° C, con tiempo final de 19 min., inyectando 1 µL de muestra.

Los espectros de masas fueron registrados con un Cromatógrafo de gases/ Espectrómetro de masas (CG/EM), marca Varian modelo 1090, Espectrómetro de Masas marca Varian modelo Saturno. El CG/EM fue operado bajo las siguientes condiciones: Cromatógrafo de gases; tipo de columna, DB 5 (5% difenil, 95% dimetilsiloxano); largo de columna, 30.0 m; diámetro de columna, 0.25 mm, y película de 0.25 µm; gas portador He; a flujo de 1.0 mL/min; relación de split, 1:3; inyector a temperatura de 250 ° C; en el horno el siguiente programa de temperaturas: temperatura inicial, 70 ° C con un tiempo inicial de 5 min., incremento de 5 ° C por min. hasta llegar a 220 ° C, con tiempo final de 19 min., inyectando 1 µL de muestra. Espectrómetro de masas; modo EI; EI energía de 70 eV, intervalo de masas 20-600 Daltons, scan/min, 0.98; trampa 250 ° C, manifold 35 ° C y línea de transferencia a 250 ° C.

El perfil cromatográfico generado por cada muestra fue analizado en forma visual y empleado como huella digital con la finalidad de comparar entre los individuos y especies colectadas de las diferentes localidades y entre los tejidos analizados (ramas y acículas). Los nombres de los componentes sugeridos fueron identificados por comparación del generado por cada muestra con la espectroteca del banco de datos NIST98, y seleccionado como posible conforme a su índice de similitud.

Con la finalidad de comparar los componentes químicos de las muestras colectadas en las diferentes localidades, se eligieron al azar 20 compuestos, bajo el criterio de mayor abundancia aparente, representada por el área bajo la curva (cuando se menciona proporción del compuesto se refiere al área bajo la curva, del análisis correspondiente). Los datos obtenidos se analizaron con el método estadístico de Análisis Discriminante, en el programa Statgraphics Plus V.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Método de extracción

En la fig. 3 se presentan los perfiles cromatográficos de 2 extractos de acículas de *P. ayacahuite* Ehrenberg ex. Schlechtendal, de 6 años de edad, colectado en el DMCyP, el árbol fue germinado de semilla proveniente de la población de Cuale-Talpa, Jalisco. Los extractos fueron obtenidos por dos métodos diferentes: sonicación y maceración. Se observó que el extracto en pentano y sonicado durante 15 min. se intensificó la extracción de compuestos, lo que concuerda con los estudios de Sulman *et al.*, 1998; Semagina *et al.*, 2000; Connors *et al.*, 2001; en contraposición con el extracto extraído durante 24 horas en CH₂Cl₂:MeOH 3 : 1 el cual presenta una concentración menor.

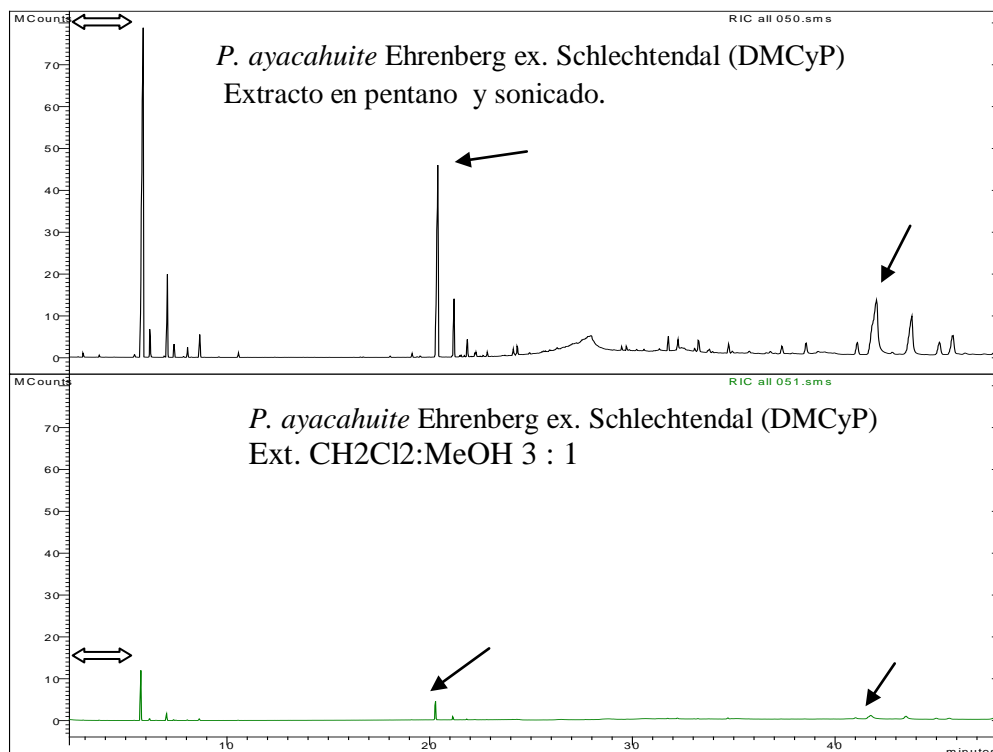


Fig. 3. Perfiles cromatográficos en diferentes extractos de acículas de *P. ayacahuite* Ehrenberg ex Schlechtendal, localizado en el Departamento de Madera Celulosa y Papel

2 Método de análisis cromatográfico para ambos tipos de tejidos

Se realizó una comparación entre el perfil cromatográfico de ramas y acículas de la muestra 54 de *P. ayacahuite* y la muestra 129 de *P. strobiformis* (anexo 1). En general las acículas contienen aproximadamente 10 veces más proporción de compuestos y son más abundantes en compuestos volátiles (fig. 4).

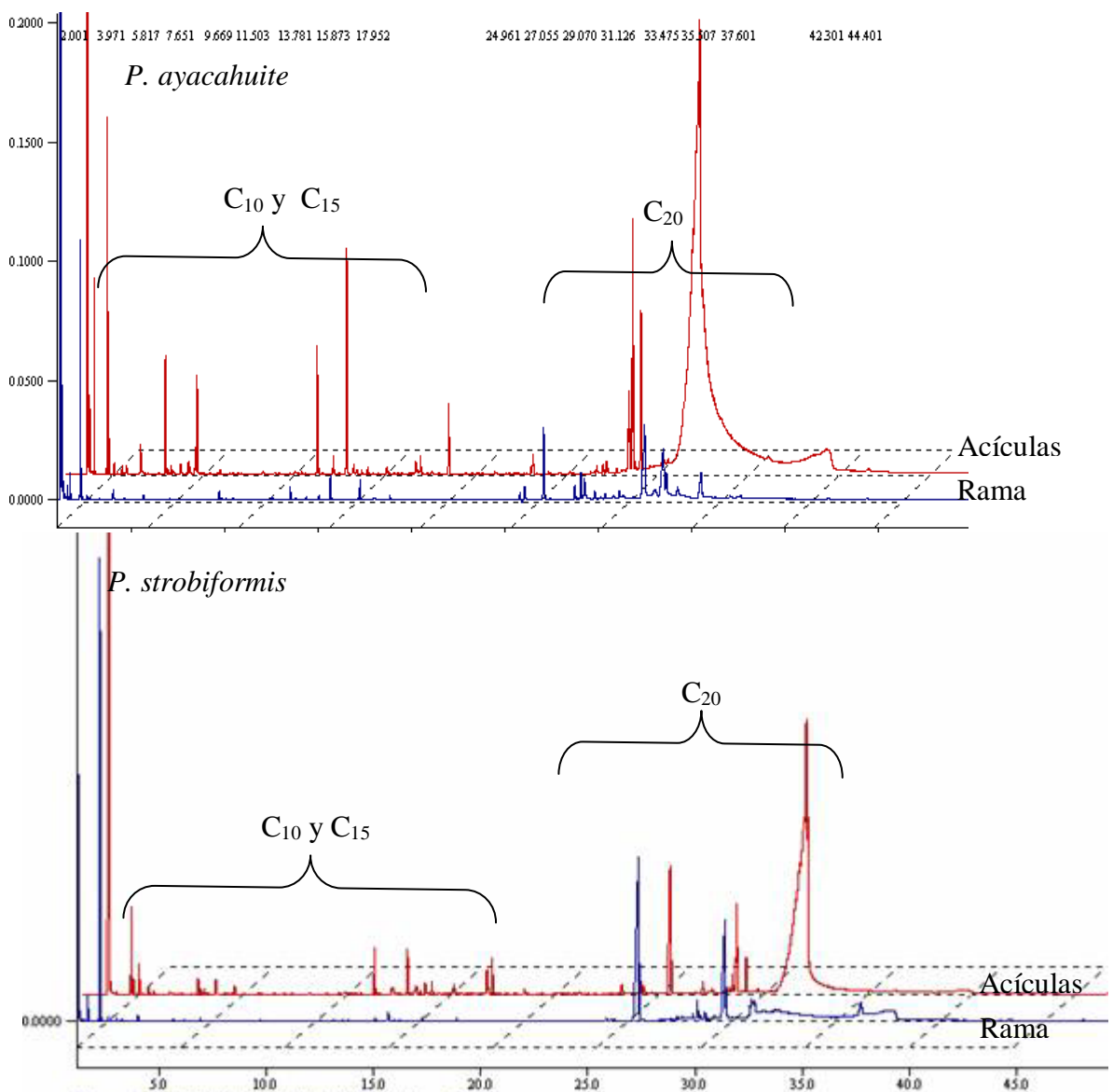


Fig. 4. Perfiles cromatográficos de ramas y acículas de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*

Mannien (2002) ha reportado para *Pinus sylvestris* que la concentración de monoterpenos es más grande en acículas que en madera; en la madera predominan ácidos resínicos tricíclicos.

Se compararon las muestras 101, 27, 89, 17 y 54, de acícula de diferentes taxa y se encontró que la proporción de los compuestos es similar; excepto que en la muestra 54 hay un compuesto predominante con un alta concentración (fig. 5).

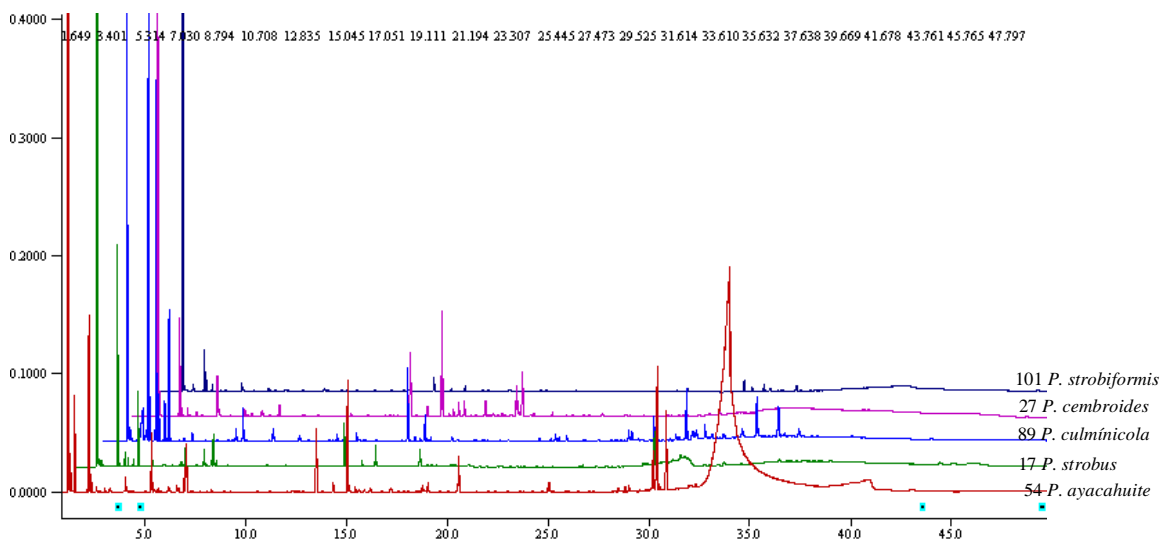


Fig. 5. Perfiles cromatográficos de muestras de acículas extraídas por sonicación

3 Identificación por espectrometría de masas de algunos compuestos presentes en las muestras

Los análisis fueron realizados en dos equipo analíticos con principios diferentes de detección, por lo que es importante considerar que la comparación entre los perfiles cromatográficos, la correspondencia con los tiempos de retención se muestra desplazada.

Los nombres de los compuestos sugeridos fueron identificados por comparación con la espectroteca NIST98, y elegido como compuesto posible conforme a su índice de similitud (fig. 6). En las Tablas 1 y 2 se resumen los compuestos encontrados en ramas y acículas del

complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*, algunos de los compuestos sugeridos aparecen bajo el mismo nombre, esto se debe a que se tratan de compuestos con espectro de masa semejante, diferenciados solamente por la proporción de la abundancia de los fragmentos generados. Adicionalmente debe considerarse que bajo ésta metodología de análisis es frecuente la co-elución de enantiómeros, por lo que los espectros de masa generados no corresponden a un compuesto puro, sino a la mezcla de estos isómeros ópticos (Sjödin, *et al.*, 2000).

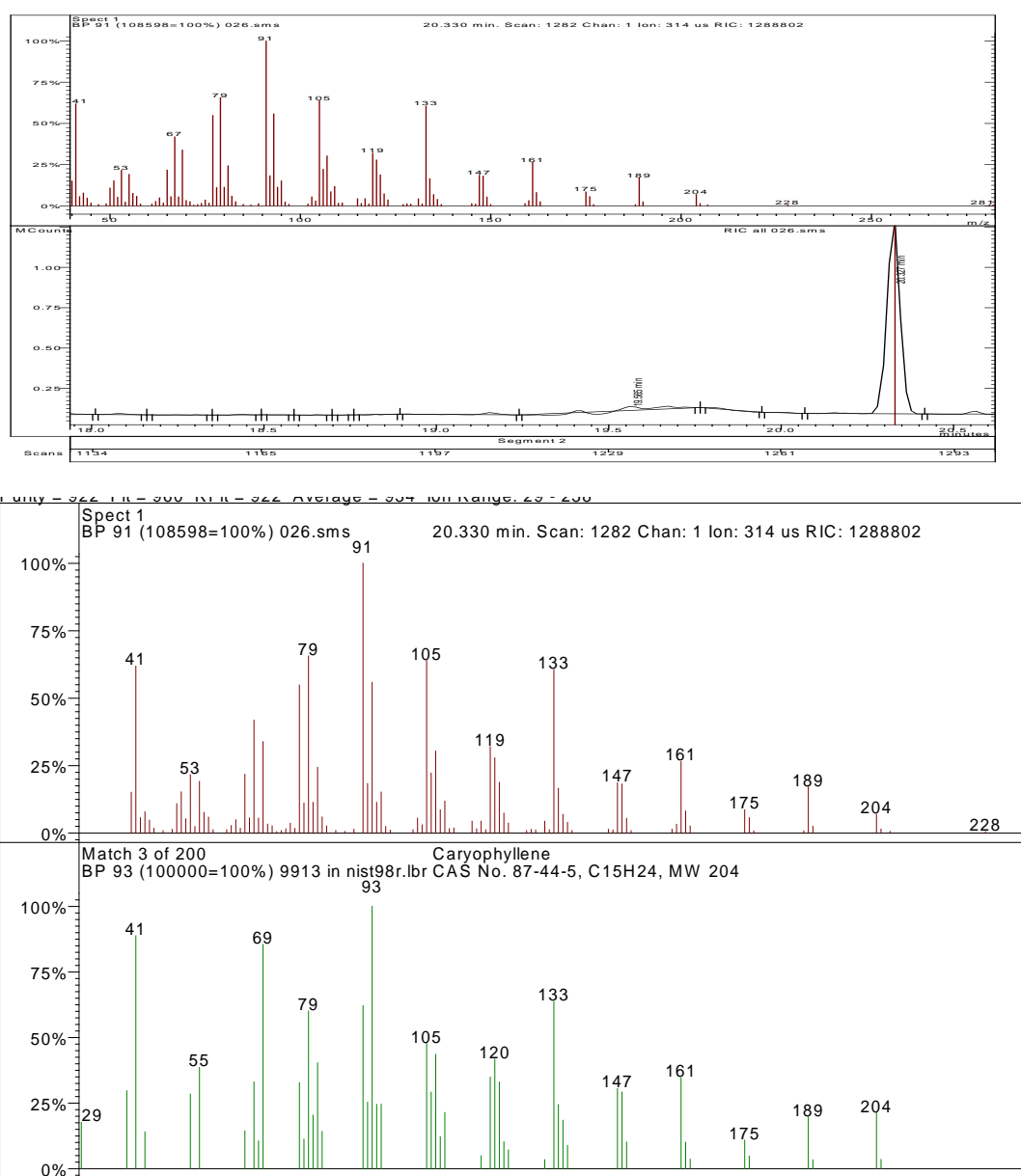


Fig. 6. Compuesto sugerido conforme a su índice de similitud

Tabla 1. Compuestos sugeridos en ramas del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*

| # | Tr min | Nombre del compuesto | Índice de Similitud % |
|----|--------|--|-----------------------|
| 1. | 5.40 | α -pineno | 97 |
| 2. | 5.70 | α -pineno | 96 |
| 3. | 6.59 | β -pineno | 95 |
| 4. | 6.71 | 6,6-dimetil-2-metilen-, (1S)-biciclo[3.1.1]heptano | 94 |
| 5. | 7.77 | Ácido hexanóico | 96 |
| 6. | 9.63 | Cis- β -terpineol | 96 |
| 7. | 10.5 | Guayacol (Estándar interno) | 99 |
| 8. | 10.73 | Undecano (1881 S4) | 95 |
| 9. | 12.16 | 4,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol | 90 |
| 10 | 12.84 | Borneol (1881 S4) | 91 |
| 11 | 13.82 | p-alil-anisol | 97 |
| 12 | 14.15 | Biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimetil-, (1S)- | 97 |
| 13 | 16.47 | Acetato de bornilo | 99 |
| 14 | 16.61 | (E,E)-2,4-Decadienal | 91 |
| 15 | 17.25 | (E,E)-2,4-Decadienal | 94 |
| 16 | 18.92 | [1S-(1.alfa.,2.alfa.,3a.beta.,4.alfa.,8a.beta.,9R*)]-1,2,4- decahidro-1,5,5,8a-tetrametil- metanoazuleno | 99 |
| 17 | 19.03 | Copaeno | 98 |
| 18 | 19.43 | NI | |
| 19 | 19.86 | [1S-(1.alfa.,3a.beta.,4.alfa.,8a.beta.)]-decahidro-4,8,8-trimetil-9-metilen-1,4-metanoazuleno | 98 |
| 20 | 20.44 | (+)-Epi-biciclosesquifelandreno | 95 |
| 21 | 21.62 | 1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)- naftaleno | 98 |
| 22 | 22.21 | α -muuroleno | 99 |
| 23 | 23.64 | 3,7,11-trimetil-, (E)-1,6,10-Dodecatrien-3-ol, | 91 |
| 24 | 25.55 | Copaeno | 96 |
| 25 | 28.75 | Ácido pimárico | 83 |
| 26 | 29.06 | Ácido pimárico | 83 |
| 27 | 30.10 | Ácido pimárico | 90 |
| 28 | 32.28 | Ácido n-hexadecanóico | 98 |
| 29 | 35.92 | Metil ester del ácido 9,12-octadecadienóico (Z,Z) | 95 |

| | | | |
|----|-------|---|----|
| 30 | 37.74 | Ácido abiético | 95 |
| 31 | 37.83 | Ácido abiético | 99 |
| 32 | 40.33 | Ácido abiético | 91 |
| 33 | 40.00 | Nonadecano | 97 |
| 34 | 40.45 | 11-Tricoseno | 99 |
| 35 | 43.24 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrencarboxílico | 99 |
| 36 | 45.8 | NI | |
| 37 | 47.32 | NI | |

Tabla 2. Compuestos sugeridos en acículas del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*.

| # | tr min | Nombre del compuesto | Índice de Similitud % |
|----|-----------|--|-----------------------------|
| 1. | 2.12 | n-heptano | 85 |
| 2. | 2.32 | Metil ciclohexano | 88 |
| 3. | 2.58 | 2-metil-heptano | 83 |
| 4. | 2.94 | 2,4-dimetil-heptano | 87 |
| 5. | 5.45 | α -pineno | 91 |
| 6. | 5.75 | 3-careno | 91 |
| 7. | 6.20 | camfeno | 90 |
| 8. | 7.05 | β -pineno | 95 |
| 9. | 7.40 | β -pineno | 91 |
| 10 | 8.09 | 3-careno | 92 |
| 11 | 8.37 | D-limoneno | 90 |
| 12 | 8.68 | NI | |
| 13 | 10.5 | Guayacol (estándar interno) | 83 |
| 14 | 11.1 | Tujol | 73 |
| 15 | 12.21 | 4-metilen-1-(1-metiletil), biciclo[3.1.0.] hexan-3-ol., | 84 |
| 16 | 12.37 | Camfor | 83 |
| 17 | 12.51 | Hidrato de cis-sabineno | 69 |
| 18 | 13.29 | 2,6,6,trimetil(1-alfa,2,alfa) biciclo[3.1.1]heptan-3-ona. | 81 |
| 19 | 13.79 | $\alpha,\alpha,4$ -trimetil- bencen metanol | 90 |
| 20 | 14.34 | 2,7,7-trimetil biciclo[3.1.1]hepten-2-en-ona | 87 |
| 21 | 15.09 | 2-metoxi-4-metil-1-C-(metiletil), benceno | 93 |
| 22 | 15.52 | 4-(2-propenil)-fenol | 95 |
| 23 | 16.51 | 1,2,4,-trietilbenceno | 93 |
| 24 | 16.61 | Acetato de bornilo | 87 |
| 25 | 18.35 | 2,6,6,9-tetrametil-triciclo[5.4.0.0(2,8)]undec-9-eno | 98 |
| 26 | 19.03 | 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-, (1S-cis)- naftaleno, | 83 |
| 27 | 19.43 | 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1- metiletenil)-, [1S-(1.alfa.,7.alfa.,8a.beta.)]- azuleno | 96 |
| 28 | 19.85 | Decahidro-4,8,8-trimetil-9-metilen-, [1S-(1.alfa.,3a.beta.,4.alfa.,8a.beta.)]- 1,4-metanoazuleno, | 99 |
| 29 | 20.30 | α -Cariofileno | 98 |

| | | | |
|----|-------|--|----|
| 30 | 21.18 | (+)-epi-biciclo, sesquifelandreno | 85 |
| 31 | 21.43 | 1-dodeceno | 83 |
| 32 | 21.86 | 1,2,3,4,4a,5,6, 8a-octahidro-7-metil-4-metilen-1-(1-metiletil), naftaleno | 83 |
| 33 | 22.66 | 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metilen-1-(1-metiletil), naftaleno | 90 |
| 34 | 22.86 | 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil),(1S-cis)-naftaleno | 88 |
| 35 | 23.63 | Ácido tridecanóico | 90 |
| 36 | 24.24 | Óxido de cariofileno | 86 |
| 37 | 25.38 | 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-ácido 1-fenantrenocarboxílico | 90 |
| 38 | 25.47 | Epóxido de isoaromadendreno | 89 |
| 39 | 25.61 | 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metilen-1-(1-metiletil), naftaleno | 86 |
| 40 | 25.93 | Tau-murolol | 84 |
| 41 | 26.28 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrenocarboxílico | 90 |
| 42 | 27.68 | Ácido pimárico | 90 |
| 43 | 28.08 | Ácido tetradecanoico | 95 |
| 44 | 28.87 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrenocarboxílico | 90 |
| 45 | 29.05 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrenocarboxílico | 90 |
| 46 | 29.69 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrenocarboxílico | 90 |
| 47 | 30.54 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrenocarboxílico | 90 |
| 48 | 30.99 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrenocarboxílico | 91 |
| 49 | 31.42 | Metil ester del ácido 14-metil-pentadecanóico | 98 |
| 50 | 32.28 | Dibutilftáto | 80 |
| 51 | 32.31 | Ácido hexadecanóico | 95 |
| 52 | 32.59 | NI | |
| 53 | 32.81 | Ácido abiético | 83 |
| 54 | 33.10 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrenocarboxílico | 79 |
| 55 | 33.73 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrenocarboxílico | 90 |
| 56 | 34.87 | 6,8,9-trimetil-4-(2-feniletil)-3-oxabicyclo[3.3.1]non-6-en-1-il)- metanol. | 84 |

| | | | |
|----|-------|---|----|
| 57 | 35.47 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrencarboxílico | 90 |
| 58 | 35.80 | Metil ester del ácido 9,12-octadecadienóico | 99 |
| 59 | 36.09 | Metil ester del ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienóico | 99 |
| 60 | 36.54 | Fitol | 99 |
| 61 | 38.09 | NI | |
| 62 | 39.55 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrencarboxílico | 90 |
| 63 | 41.92 | NI | |
| 64 | 42.81 | NI | |
| 65 | 43.69 | Ciclododecino | 84 |
| 66 | 45.10 | NI | |
| 67 | 47.91 | Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrencarboxílico | 91 |

4. Metabolómica a partir de Cromatografía de Gases

La muestra 138 de *Pinus strobiformis*, presenta el patrón de perfil cromatográfico de los 20 compuestos elegidos para el análisis de las 132 muestras analizadas en el estudio (fig. 7, anexo 3).

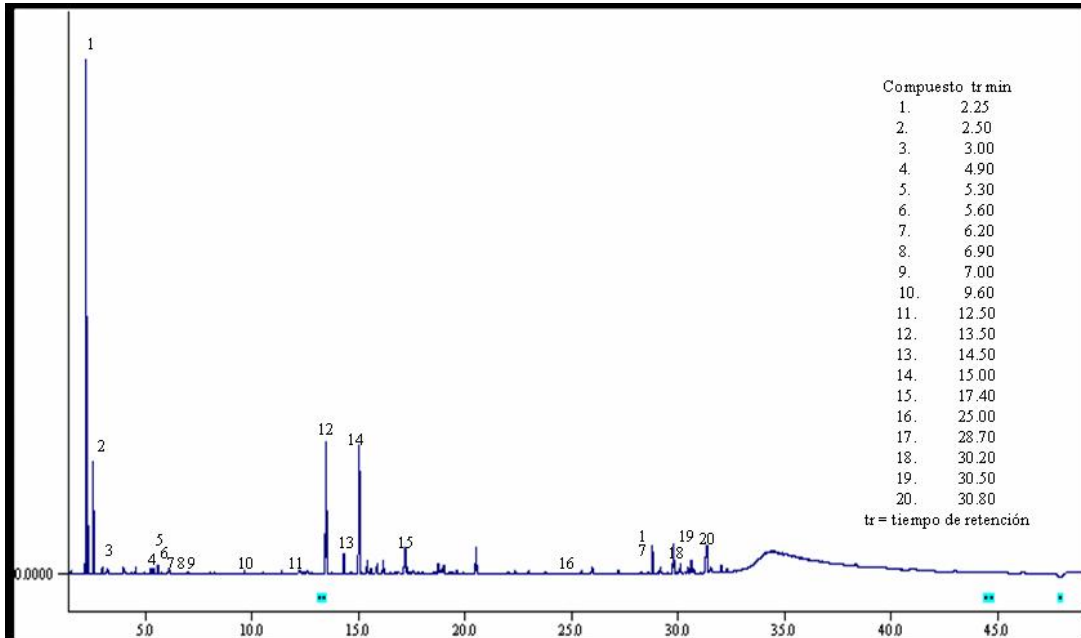


Fig 7. Perfil cromatográfico de *P. strobiformis* 138, localidad de Creel en Chihuahua

Los perfiles cromatográficos obtenidos vía CG/FID se analizaron en forma visual, ejemplos de estos perfiles cromatográficos se muestran en las figuras 8-19.

La comparación de un pino duro como *Pinus oocarpa* con un pino blando *P. ayacahuite*, muestra 45b, muestra diferencias en su composición; el cual es observado en el perfil cromatográfico (fig. 8). En el perfil cromatográfico de *P. ayacahuite* están representados un mayor número de compuestos distribuidos a través de los 50 minutos del análisis, comparado con el perfil cromatográfico de la muestra 151, donde el mayor número de compuestos eluidos aparecen entre los 20 y los 27 min.

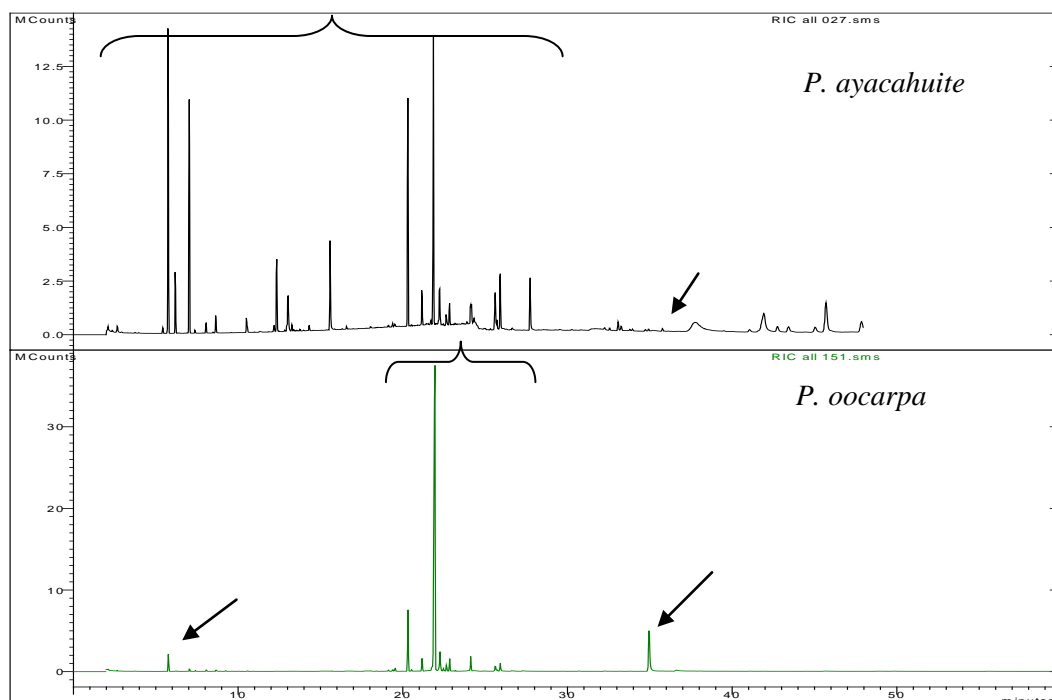


Fig. 8. Perfil cromatográfico de *P. ayacahuite*, muestra 45b, comparado con el perfil cromatográfico de *P. oocarpa*, muestra 151

El perfil cromatográfico de acículas, de una muestra de *P. ayacahuite*, que corresponde a la muestra 45b colectada en la localidad de Real del Monte en Hidalgo, comparado con una muestra de *P. ayacahuite* localizado en el Departamento de Madera Celulosa y Papel (DMCyP), los perfiles son similares en lo que se refiere a los compuestos presentes, la diferencia entre ellos es la proporción en que los compuestos se encuentran; siendo menor en la muestra 45b (fig. 9). Es probable, que esta diferencia sea atribuída a que la colecta localizada en el DMCyP fue procesada de manera inmediata después de su corte, por el contrario en la muestra 45b transcurrieron días antes de su procesamiento. Este hecho influye en la conservación y permanencia de los compuestos, algunos de los cuales se volatilizan muy rápidamente, por ejemplo los del grupo de los monoterpenos que es el caso de este estudio.

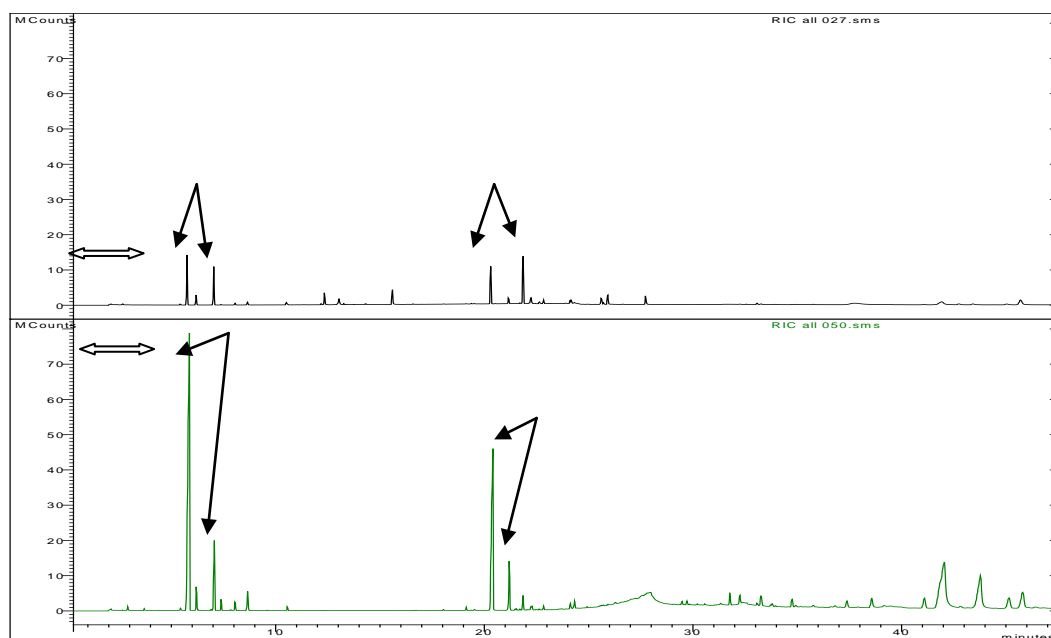


Fig. 9. Perfil cromatográfico de *P. ayacahuite*, muestra 45b (arriba), comparado con el perfil cromatográfico del *P. ayacahuite* localizado en el DMCyP (abajo)

Por otro lado, las acículas de seis individuos (muestras 3, 4, 5, 6 y 9) de la localidad Los Reyes, Michoacán fueron analizados (Anexo 1). De la comparación entre ellas (fig. 10) se observa similar proporción en los compuestos presentes excepto que el compuesto eluido a los 34 min (un ácido resínico), en las muestras 4 y 5 se presenta en mayor proporción. Esto es discutido por algunos autores (Roberts, 1970; Rockwood, 1973; Langenheim, *et al.*, 1979; Turtola *et al.*, 2003), lo cual es posible que se atribuya al stress hídrico. En los perfiles cromatográficos de las muestras de acícula de *P. ayacahuite*, localidad: Comunidad de Palo Hueco, municipio de Real del Monte, en el Edo. de Hidalgo, se observa baja proporción de compuestos (muestras 39-45B) (fig.11, anexo 1) cuando se compara con *P. ayacahuite* de las localidades de Las Palmas, municipio de Los Reyes, Michoacán (fig. 10); con las muestras Km. 4.5, 6 y 9, 31, y 32 del camino Talpa-Cuale, municipio de Talpa de Allende, en el Edo. de Jalisco y las muestras 83 a 89, de la localidad Km. 228 carretera 186 Palenque-San Cristóbal, municipio de San Cristóbal Chiapas (fig 12, anexo 1). Lo mismo ocurre con la muestra 29, de la localidad Omitlán, Guerrero y las muestras 48 y 49 de la localidad: Barranca El Copal, municipio de Pinal de Amoles, estado de Querétaro (anexo 1, figuras no mostradas).

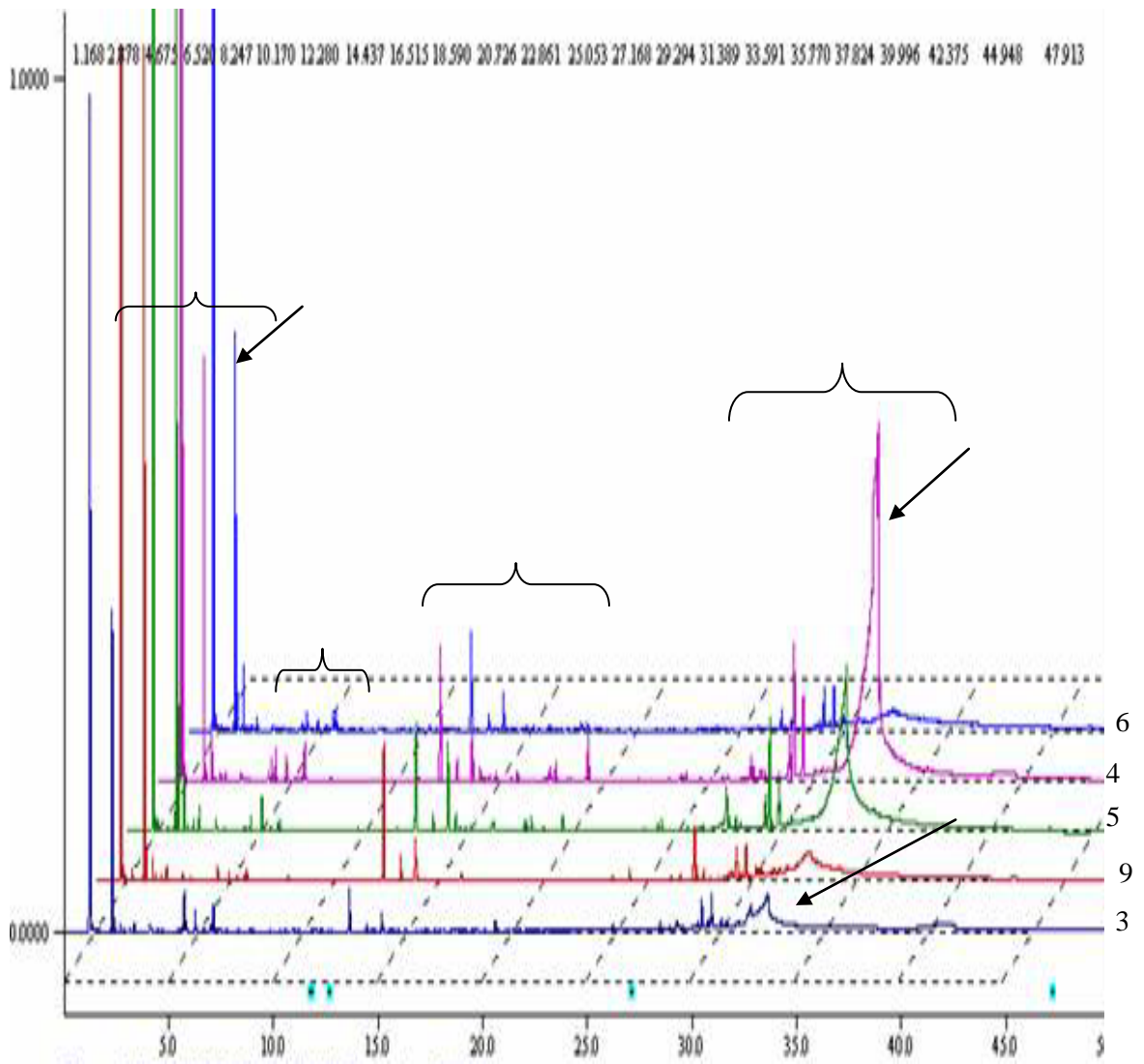


Fig. 10. Perfil cromatográfico de acículas de *P. ayacahuite*, localidad: Las Palmas, municipio de Los Reyes, Michoacán

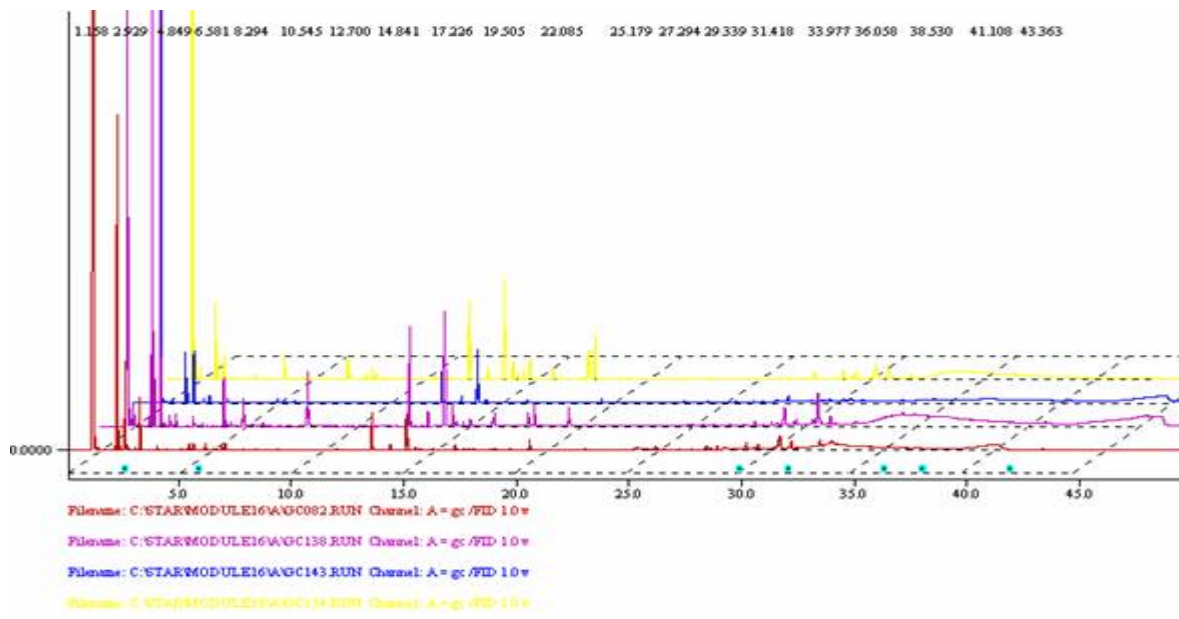


Fig.11. Perfil cromatográfico de acículas de *P. ayacahuite*, localidad: Comunidad de Palo Huevo, municipio de Real del Monte, en el Edo. de Hidalgo

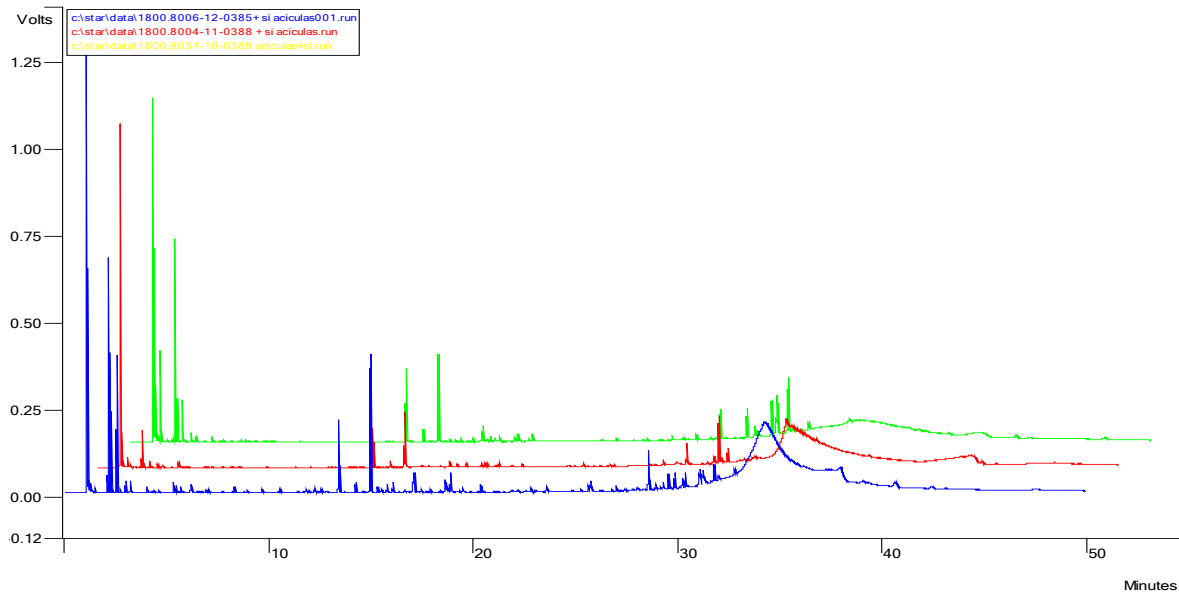


Fig. 12. Perfil cromatográfico de acículas de de *P. ayacahuite*, , de la localidad Km. 228 carretera 186 Palenque-San Cristóbal, municipio de San Cristóbal Chiapas

En los perfiles cromatográficos de las muestras 51, 54, 55, 56, 57, 60 (anexo 1), extraídos de acículas de *P. ayacahuite*, de la localidad: Km.32,32, 4.5, 6 y 9 del camino Talpa-Cuale, municipio de Talpa de Allende, en el Edo. de Jalisco, se observa mayor proporción del compuesto que aparece a los 34 min (fig. 13).

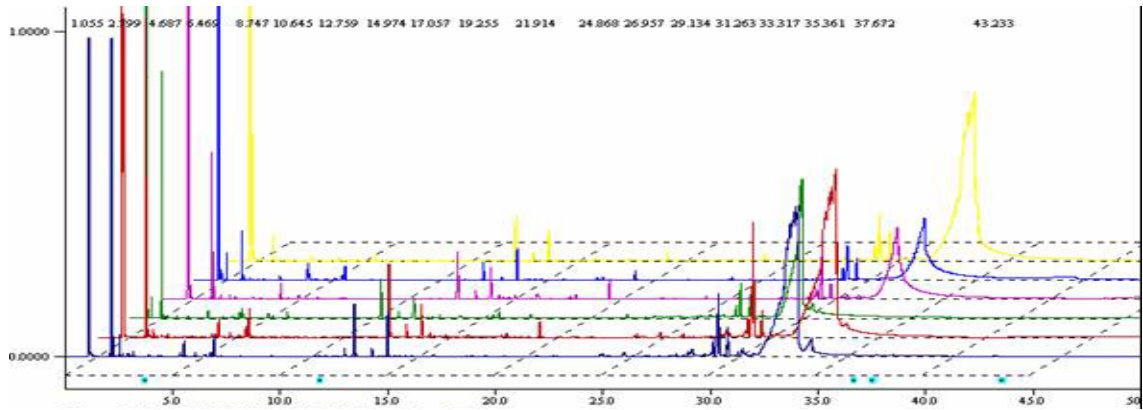


Fig. 13. Perfil cromatográfico de acículas de *P. ayacahuite*, de la localidad: Km. 4.5, 6 , 9, 31 y 32 del camino Talpa-Cuale, municipio de Talpa de Allende, en el Edo. de Jalisco

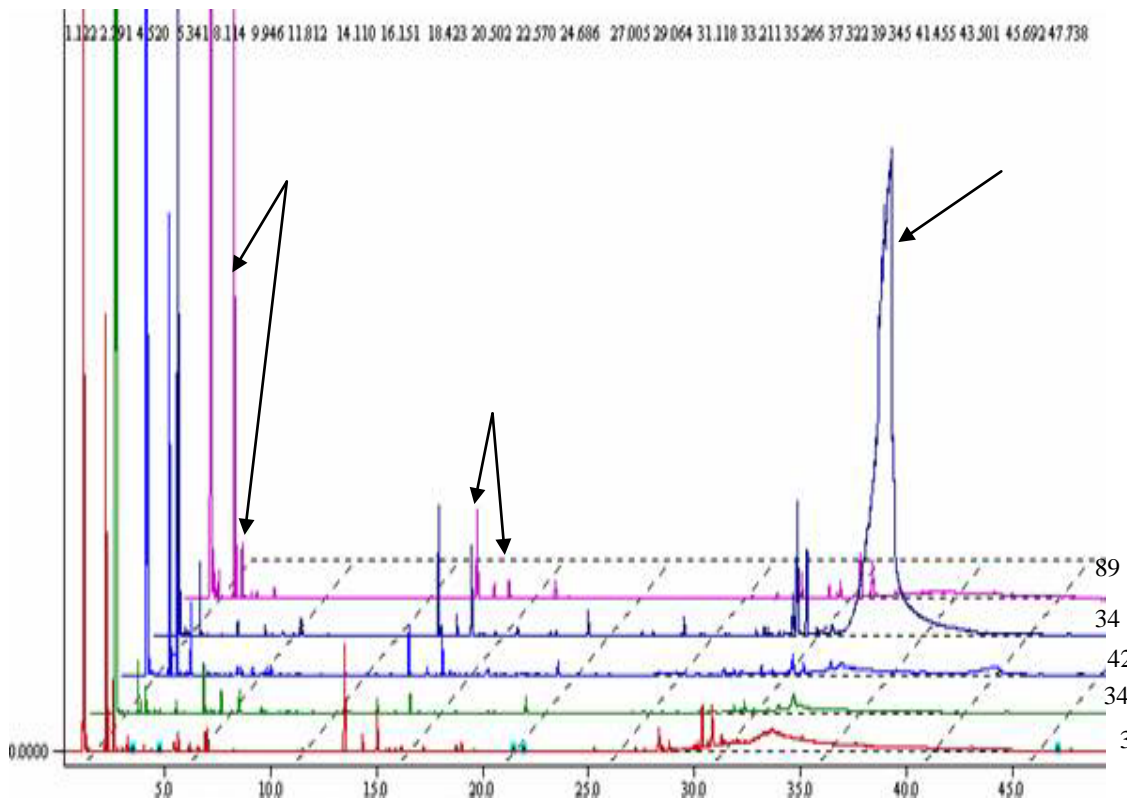


Fig. 14. Comparación de los perfiles cromatográficos de acículas de *P. ayacahuite* muestreado en diferentes localidades

Este es un peculiar resultado ya que las concentraciones para esta población son mucho más altas si la comparamos con el resto de las poblaciones del estudio (fig. 14). Este compuesto probablemente corresponde a un ácido resínico.

Las acículas de ocho muestras de *P. ayacahuite* var. *veitchii* fueron analizadas (muestras 30-37), de la localidad Cañada al E. de San Rafael, municipio de Tlalmanalco, Edo. De México, anexo 1. Los especímenes presentan baja proporción de compuestos volátiles (fig. 15) en relación con *P. ayacahuite* (fig. 9). Se observa mayor proporción en el grupo de los compuestos eluidos entre los min. 10 y 20. Esto sugiere un posible marcador químico para diferenciar la variedad, lo cual también es soportado por el análisis discriminante (fig. 24).

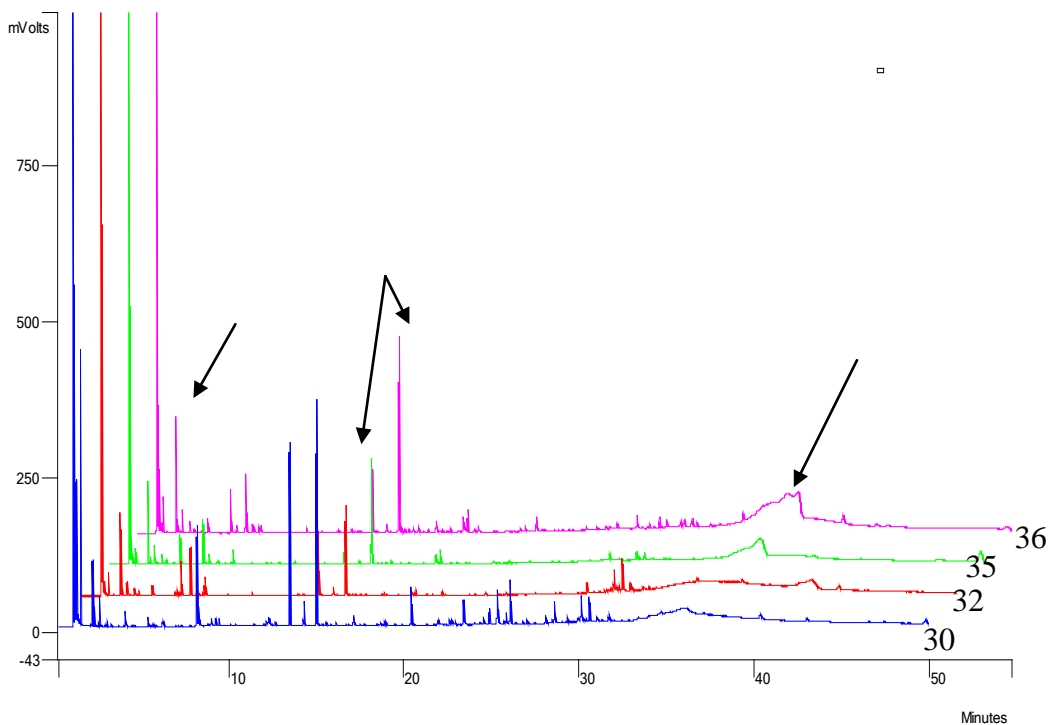


Fig. 15. Perfil cromatográfico de acículas de *P. ayacahuite* var. *veitchii*

La comparación de los perfiles cromatográficos de acículas de las muestras 82 y 114, de *P. ayacahuite* muestran mayor proporción de los compuestos con tiempo de retención 2, 14.9 min. respecto de los perfiles cromatográficos de las muestras 61 y 147, de *P. ayacahuite* var. *veitchii*. La variedad *veitchii* muestra mayor proporción del compuesto eluido a los 25 min. El resto de los compuestos presentan diferente proporción, incluso entre la misma variedad (fig. 16).

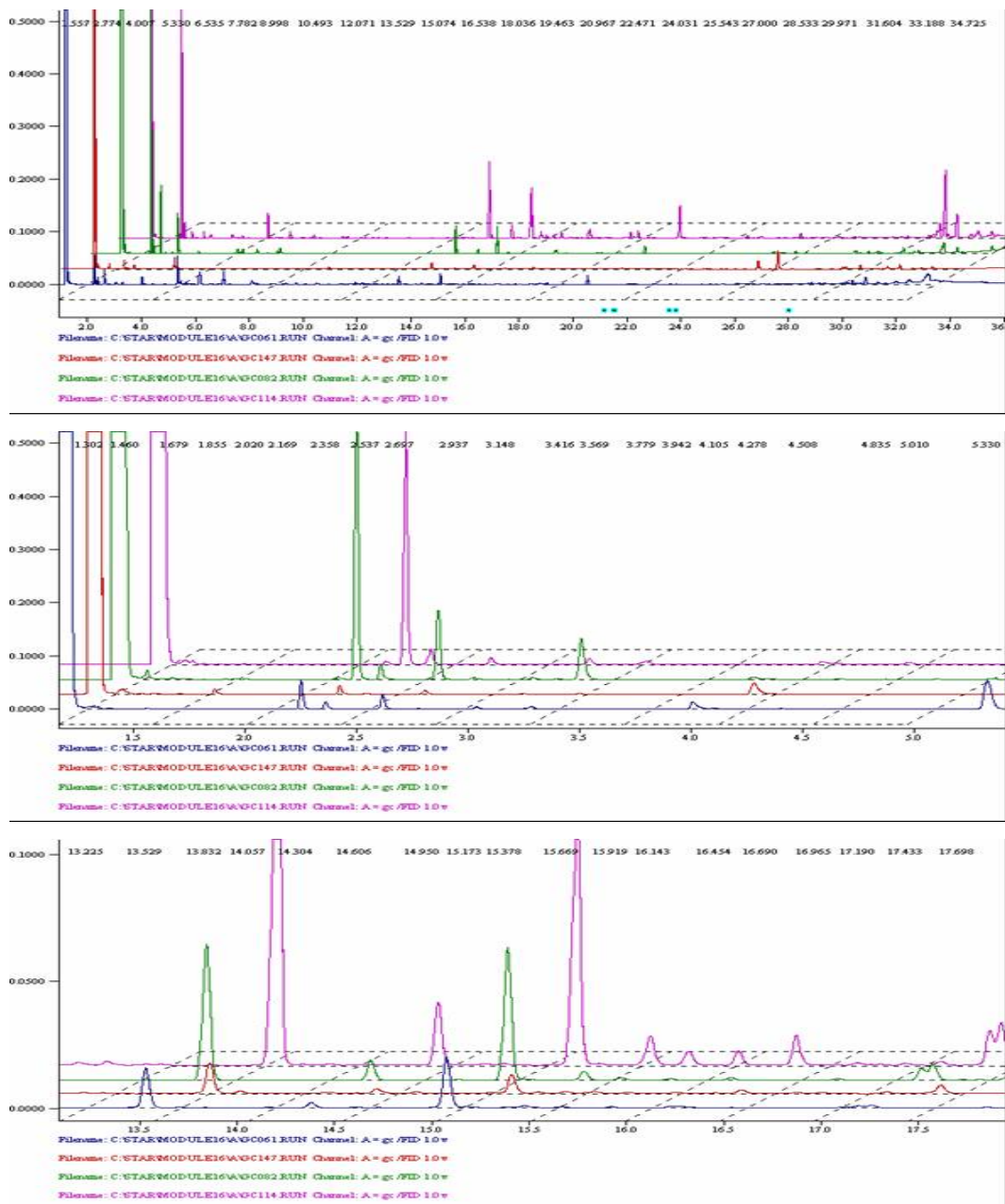


Fig. 16. Perfil cromatográfico de acículas de *P. ayacahuite* var. *veitchii* comparado con el perfil cromatográfico de acículas *P. ayacahuite*

El perfil cromatográfico de acículas de *P. strobiformis*, de las muestras 22 y 23 se observa diferencia en la proporción de compuestos volátiles (fig. 17). La muestra 23, presenta un compuesto eluido al min. 13.5, que no se observa en la 22; mientras que la en región tr = 5-10 min. algunos compuestos no aparecen o se encuentran en baja cantidad en la muestra 23. La región donde aparecen los monoterpenos (tr = 2-10 min.) y la de los sesquiterpenos (tr = 13-20 min.), son las de mayor variabilidad en estas muestras, cuyo incremento puede ser

ocasionado por infestación por insectos (Rafa & Berryman, 1983). Por otro lado, es importante considerar la edad del árbol, lo cual no fue considerado en este estudio (von Rodloff, 1975; Loreto *et al.*, 2005). Se encontró que los compuestos con mayor proporción son constantes en las diferentes muestras independientemente de la localidad, edad, exposición y estación del año, entre otras, los compuestos en menor proporción pueden estar o no presentes. Este hecho puede ser considerado para su uso en el análisis quimiotaixonómico.

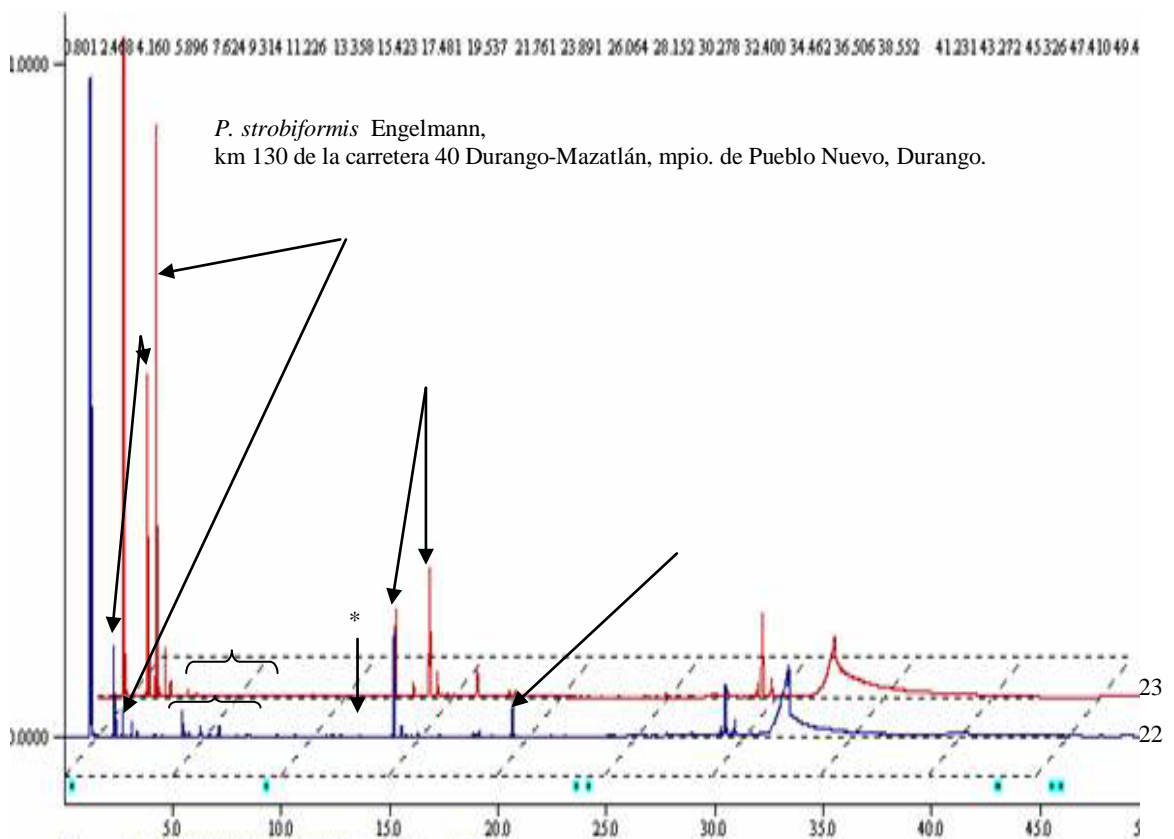


Fig. 17. Perfil cromatográfico de acículas de *P. strobiformis*, de la localidad: km 130 de la carretera 40 Durango-Mazatlán, 3 km al S por el camino a Chavarría, municipio de Pueblo Nuevo, en el Edo. de Durango

Las muestras 90-115 de *Pinus strobiformis*, de la localidad: Observatorio INAOE, en el municipio de Cananea, en el Edo. de Sonora presentan perfiles cromatográficos muy semejantes entre ellos, respecto a los compuestos presentes y la proporción en la que aparecen (fig. 18). Mientras que las muestras 116-140 de *P. strobiformis* de la localidad: Carretera Creel-Divisadero, en el municipio de Boycona, Chihuahua, presentan diferente proporción en los compuestos presentes (fig. 19). Al analizar los perfiles cromatográficos

de las muestras del estudio de *Pinus strobiformis*, los compuestos que aparecen en la región tr = 5-10 min, están siempre presentes, por lo que su ausencia en la muestra 23 puede deberse a una variación intraespecífica.

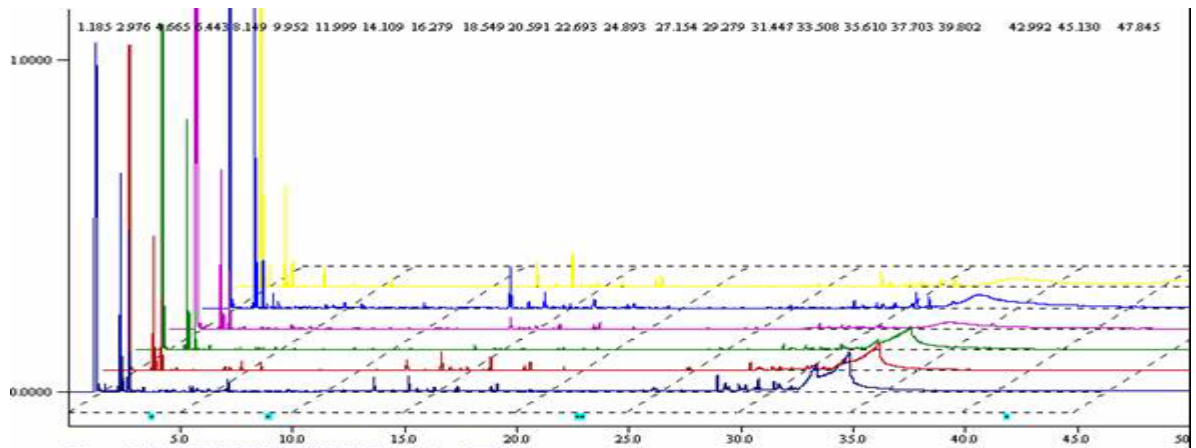


Fig. 18. Perfil cromatográfico de acículas de *P. strobiformis*, de la localidad: Observatorio INAOE, en el municipio de Cananea, en el Edo. de Sonora

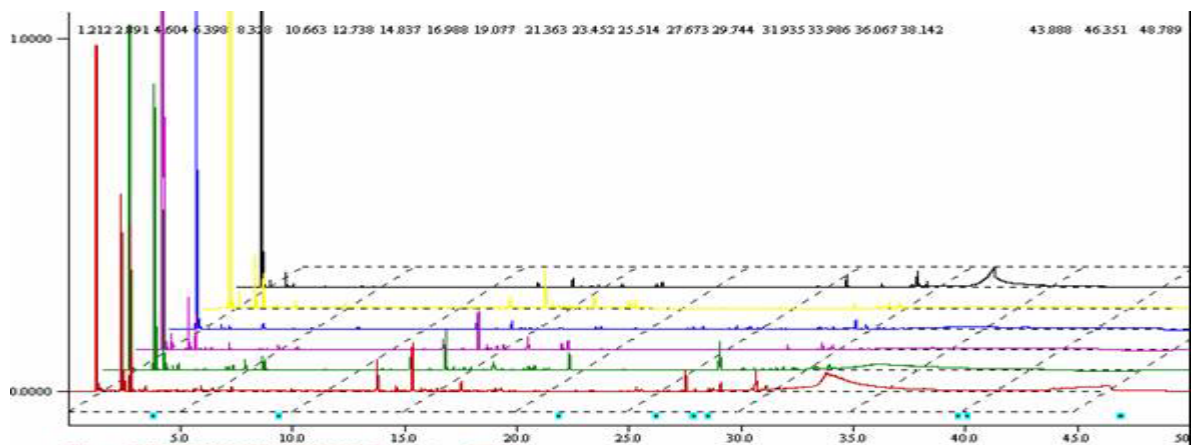


Fig. 19. Perfil cromatográfico de acículas de *P. strobiformis*, de la localidad: Carretera Creel-Divisadero, en el municipio de Boycona, Chihuahua

Las comparación de las muestras de *P. strobiformis* de las diferentes localidades muestran similitud en la presencia de compuestos en las diferentes regiones elución; sin embargo, la proporción de estos puede variar inclusive dentro de la misma localidad (fig. 20).

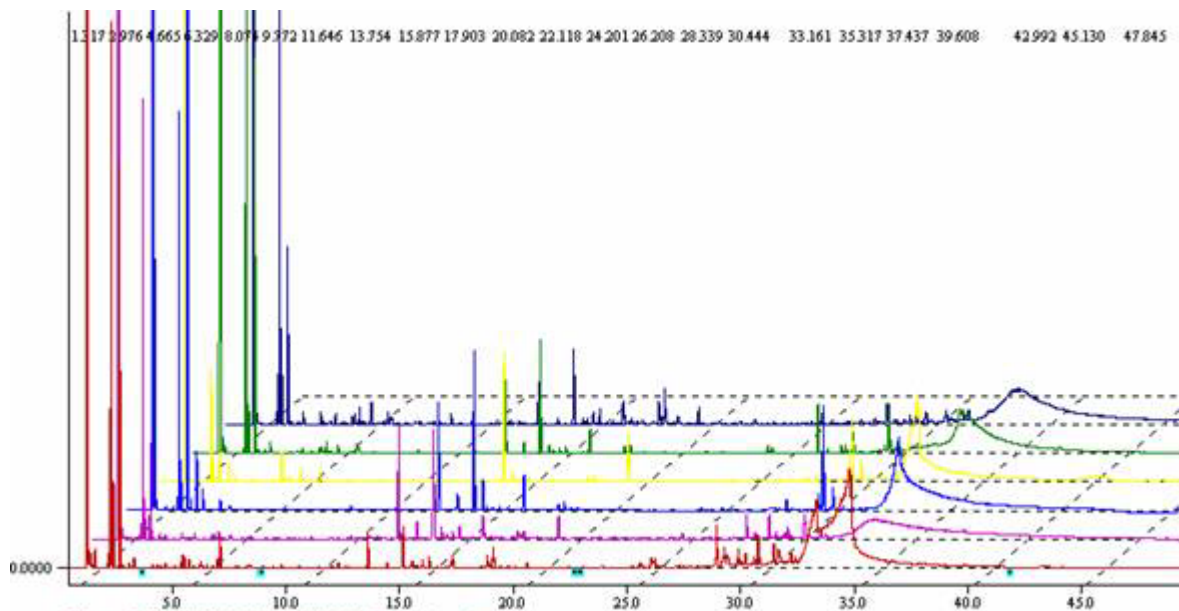


Fig. 20. Comparación de los perfiles cromatográficos de acículas de *P. strobiformis* muestreado en diferentes localidades

Los perfiles cromatográficos de las muestras 10-14, de acículas de *P. strobis* var. *chiapensis* Martínez, de la localidad: Parada La Reforma, 8 km al oeste de Tlapacoyan, municipio de Tlapacoyan, Edo. de Veracruz y las muestras 15-21 de *P. strobis* var. *chiapensis* Martínez, de la localidad: Km. 200 carretera 195 en el municipio de Bochil, Estado de Chiapas, muestran similitud de compuestos con las otras especies del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis* (figs. 21, 22). *Pinus strobis* var. *chiapensis* aunque es un pino blando no hace parte de éste complejo, por lo que se esperaba existieran diferencias significativas en la proporción y tipos de compuestos; sin embargo, con esta metodología no se detectaron diferencias en los compuestos eluidos por lo que es necesario realizar otro tipo de análisis.

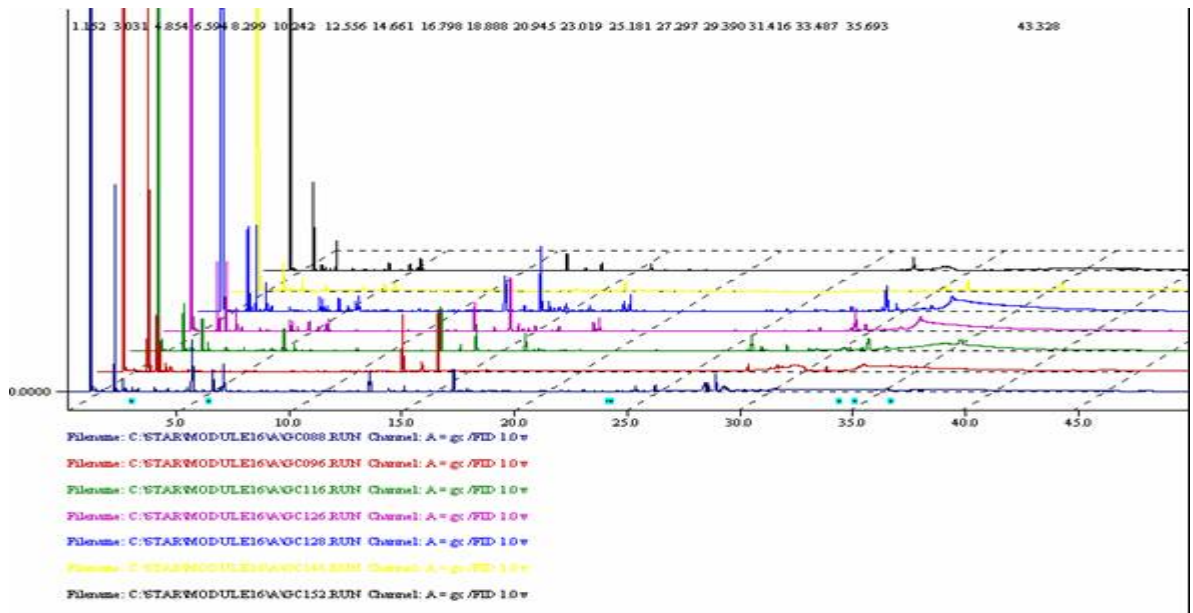


Fig. 21. Perfil cromatográfico de acúculas de *P. strobilus* var. *chiapensis* Martínez, de la localidad: Parada La Reforma, 8 km al oeste de Tlapacoyan, municipio de Tlapacoyan, Edo. de Veracruz

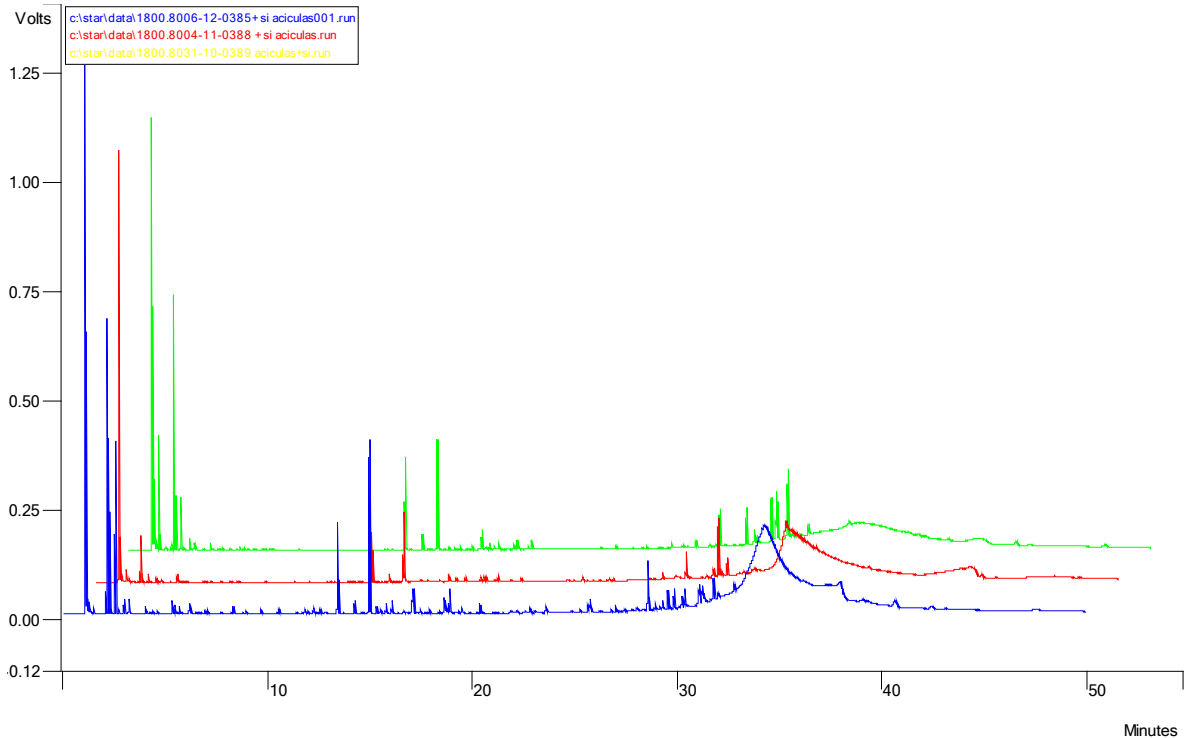


Fig. 22. Perfil cromatográfico de *P. strobilus* var. *chiapensis* Martínez, de la localidad: Km. 200 carretera 195 en el municipio de Bochil, Estado de Chiapas

De los 20 compuestos elegidos al azar, 18 de ellos fueron identificados (fig. 23, anexo 3)

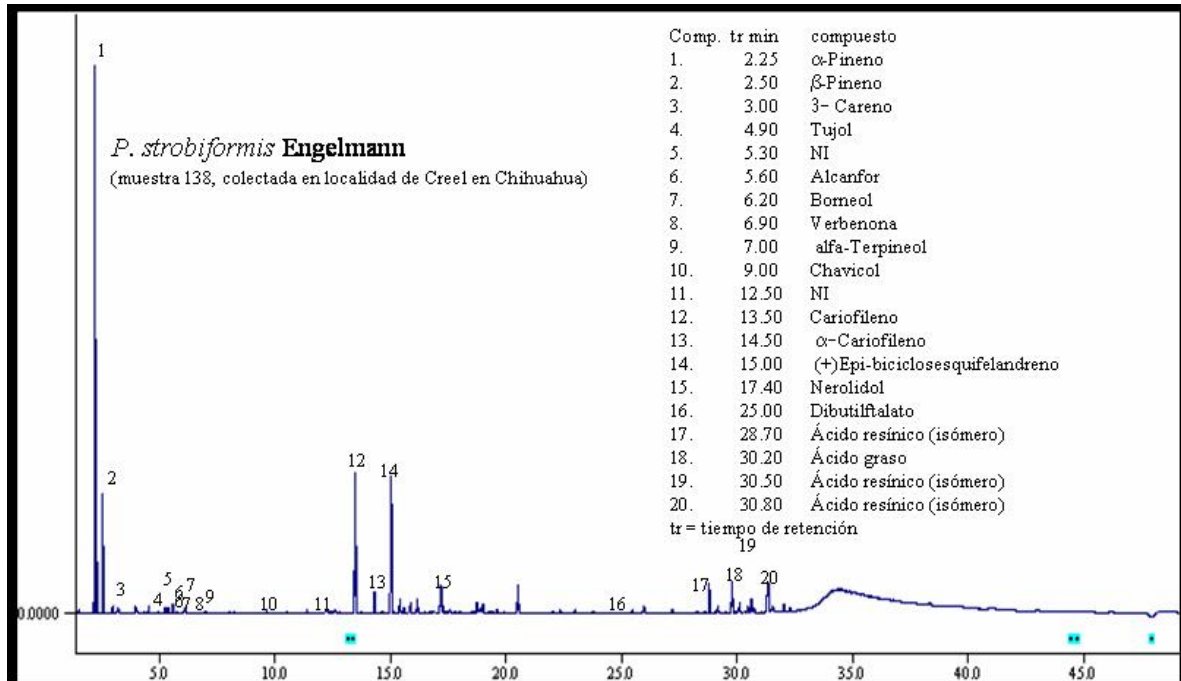


Fig.23. Identificación de los compuestos elegidos

Análisis Discriminante

Para el análisis discriminante se incluyeron seis especies de pinos blandos: *P. ayacahuite*, *P. ayacahuite* var. *veitchii*, *P. cembroides*, *P. culminícola*, *P. strobiformis* y *P. strobus* var. *chiapensis*); tres de ellos del complejo *P. ayacahuite*-*P. strobiformis*. Los análisis de correlación fueron realizados teniendo en cuenta 20 compuestos (anexo 3) de los aproximadamente 50 compuestos (tabla 1 y 2) que se observaron en los perfiles cromatográficos, los cuales fueron elegidos al azar, bajo el criterio de mayor abundancia aparente, representada por el área bajo la curva. De éste análisis se formaron 6 grupos, los pinos del complejo fueron agrupados de manera independiente, como se muestra en la figura 24. La correlación esta explicada por el 61.62% de los casos.

Gráfica de Funciones Discriminantes

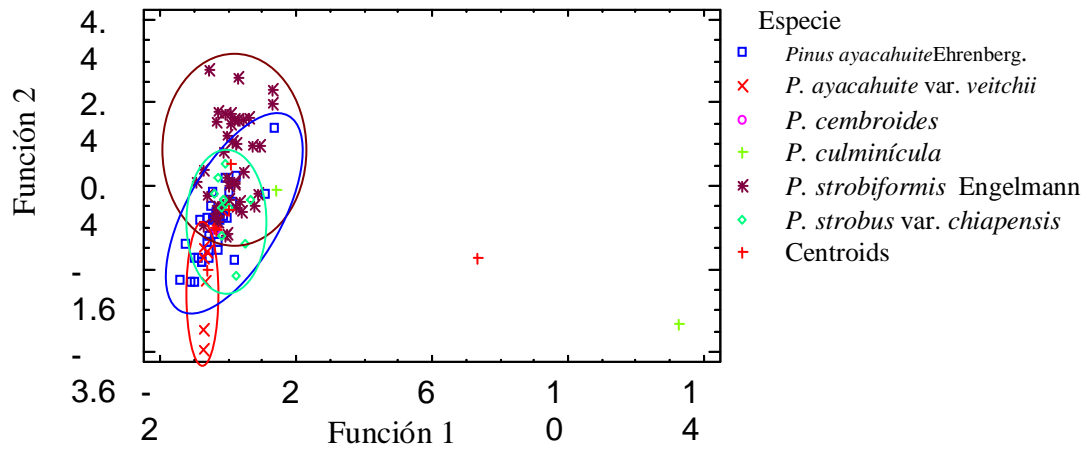


Fig 24. Correlación de los pinos blandos analizados en el estudio

Cuatro funciones fueron las que mejor explican la correlación de los grupos formados (tabla 3, 4 y 5).

- En la función 1 el compuesto que mejor explica la correlación es el chavicol (10), en contraste de una correlación negativa con el compuesto 20.
- En la función 2 quienes mejor explican la correlación son el β -pineno (2) y un isómero de ácido resínico (19), en contraste con los compuestos 20 y 14.
- En la función 3 la correlación es explicada por el 3-careno (3) en contraste con el compuesto 16.
- En la función 4 el borneol (7) es quien explica mejor la correlación, en contraste con el compuesto 18.

De las 35 muestras analizadas de *Pinus ayacahuite* Ehrenberg, 20 están bien identificados como grupo y esto corresponde al 57.14%. Respecto a las 8 muestras analizadas de *P. ayacahuite* var. *veitchii* cinco se hallan bien identificados como grupo, es decir, el 62.50%. En relación a las 42 muestras analizadas de *P. strobiformis* 27 están bien identificadas como grupo, esto se refiere al 64.29%. De *P. strobus* var. *chiapensis* se analizaron 11 muestras y 7 de ellas se encuentran bien identificadas como grupo, lo que corresponde al 63.64% (tabla 5).

Tabla 3. Resumen de las funciones canónicas discriminantes

| Función Discriminante | Autovalor | Porcentaje Relativo | Porcentaje acumulado | Correlación Canónica |
|------------------------------|------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 1.24665* | 38.93 | 38.93 | 0.74491 |
| 2 | 0.770542* | 24.07 | 63. | 0.6597 |
| 3 | 0.67193* | 20.99 | 83.99 | 0.63395 |
| 4 | 0.495712* | 15.48 | 99.47 | 0.57569 |
| 5 | 0.0170739* | 0.53 | 100 | 0.12957 |

Tabla 4. Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| comp1 | 0.210971 | -0.417496 | 0.257352 | -0.223565 | 0.311902 |
| comp2 | 0.15689 | 1.04169 | -0.349579 | 0.0159902 | 0.18972 |
| comp3 | 0.0402529 | 0.0726039 | 0.808592 | 0.0980561 | 0.189722 |
| comp4 | -0.00382208 | 0.273714 | 0.327222 | -0.0307632 | 0.285742 |
| comp5 | -0.144127 | -0.186994 | -0.105787 | -0.0378728 | 0.218375 |
| comp6 | -0.0942449 | 0.10879 | 0.16 | -0.153864 | -0.0252251 |
| comp7 | -0.158375 | -0.281228 | -0.203205 | 1.00559 | 0.564005 |
| comp8 | 0.106722 | -0.171104 | 0.128672 | 0.0853729 | 0.0644038 |
| comp9 | 0.15141 | -0.0237859 | -0.0914202 | 0.220612 | -0.491796 |
| comp10 | 0.868027 | -0.157192 | -0.074909 | -0.191631 | -0.215329 |
| comp11 | 0.328196 | 0.295303 | -0.0266752 | 0.0733115 | 0.122097 |
| comp12 | -0.228275 | -0.207586 | -0.245518 | -0.505896 | 0.533067 |
| comp13 | -0.170498 | 0.174648 | 0.333325 | -0.452266 | 0.191257 |
| comp14 | 0.00830989 | -0.498006 | -0.0398301 | 0.364681 | -0.59955 |
| comp15 | -0.00410215 | 0.34493 | 0.288927 | -0.166563 | -0.390431 |
| comp16 | -0.148631 | -0.356884 | -0.670708 | 0.413218 | 0.662812 |
| comp17 | 0.16387 | -0.0501238 | -0.0509226 | -0.0517343 | 0.101784 |
| comp18 | 0.189498 | 0.209454 | 0.0962081 | -0.545738 | -0.716557 |
| comp19 | 0.0643568 | 0.665961 | -0.201991 | -0.215934 | -0.10208 |
| comp20 | -0.260048 | -0.510681 | 0.0223017 | -0.111497 | 0.496199 |

Tabla 5. Clasificación de los grupos

| Grupo taxonómico actual | Tamaño de Grupo | <i>P. ayacahuite</i> Ehn | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veichii</i> | <i>P. cembroides</i> | <i>P. culminicola</i> | <i>P. strobiformis</i> | <i>P. strobis</i> var <i>chiapensis</i> |
|---|------------------------|---------------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|
| <i>P. ayacahuite</i> Ehn | 35 | 20 (57.14%) | 0 (0.00%) | 10 (28.57%) | 0 (0.00%) | 4 (11.43%) | 1 (2.86%) |
| <i>P. ayacahuite</i> <i>veichii</i> | 8 | 0 (0.00%) | 5 (62.5%) | 3 (37.50%) | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) |
| <i>P. cembroides</i> | 1 | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) | 1 (100.00%) | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) |
| <i>P. culminicola</i> | 2 | 0 (0.00%) | 0 (0.00) | 0 (0.00%) | 1 (50.00%) | 1 (50.00%) | 0 (0.00%) |
| <i>P. strobiformis</i> | 42 | 3 (7.14) | 2 (4.76%) | 9 (21.43%) | 0 (0.00%) | 27 (64.29%) | 1 (2.38%) |
| <i>P. strobis</i> var <i>chiapensis</i> | 11 | 1 (9.09) | 0 (0.00) | 1 (9.09%) | 0 (0.00%) | 2 (18.18%) | 7 (63.64%) |

Porcentaje de casos correctamente clasificados: 61.62%

CONCLUSIONES

La extracción con pentano y sonicación de las muestras intensifica la extracción de compuestos y disminuye el tiempo de procesamiento y análisis, por consiguiente es posible el tratamiento de un mayor número de muestras simultáneamente.

Las acículas poseen mayor número de compuestos respecto a las ramas. Las ramas contienen mayor proporción de compuestos del tipo diterpenos.

La concentración de compuestos totales extraídos conforme al área bajo la curva es aproximadamente 10 veces mayor en acículas que en ramas.

El perfil cromatográfico de los pinos blandos analizados es significativamente diferente al de *Pinus oocarpa*, el cual es un pino duro.

Es importante que transcurra el menor tiempo posible desde la toma de la muestra hasta su tratamiento, para evitar la pérdida de compuestos de característica volátil o semivolátil.

Las muestras de la localidad de Talpa, Jalisco presentan un peculiar perfil, pues es constante la abundancia del isómero de ácido resínico eluído a los 34 min.

En algunas localidades el compuesto eluído a los 34 min. se presenta en marcada proporción, este corresponde a un isómero de ácido resínico, el cual según algunos autores se incrementa por causa de estrés hídrico.

El análisis discriminante muestra que las especies analizadas forman grupos discretos, aunque en algunos casos estos se sobrelapan.

Los datos reflejan una amplia variabilidad lo cual sugiere la necesidad de un plan de muestreo estricto para tener conocimiento y en la medida de lo posible control de algunas de las diversas situaciones que causan variabilidad en la presencia y abundancia de los compuestos analizados.

BIBLIOGRAFIA

- Almaraz, A.N. 2000. Estudio quimiotaxonómico de *Pinus* Sección *Leiophyllae* (PINACEAE). Tesis de Doctorado en Ciencias Especialidad en Fisiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.
- Birks, J.S. y Kanowski, P.J. 1988. Interpretation of the coniferous resin. *Silvae Genetica* 37: 29-39
- Bhalla, R.; Narasimhan, K.; Swarup, S. 2005. Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Reports* 24: 562-571.
- Carvajal, S. 1986. Notas sobre la flora fanerogámica de Nueva Galicia. III. *Phytologia*. 59 : 127-147.
- Connors, T.E., Ungram, L.L., Su, W., Yan, H. 2001. Seasonal variation of southern pine terpenes. *Forest Products Journal*. 51: 89-94
- Critchfield, W. B. and Little, E. L. 1966. Geographic distribution of the pines of the world. V.S. Forest Serv. Misc Publ. 991. Washington, D.C. 97 p.
- Croteau, R y Jonson, M.A. 1985. Biosynthesis of Terpenoids Wood extractives. In: Higuchi. T. editor. *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Orlando, F.L. Academic Press.
- Donahue, J.K, 1995, Geographic variation in stem-xylem terpene chemistry in native populations of *Pinus greggi* Engelm. *Forest Genetics* 2(4):217-225 Raleigh N.C.
- Drew, J., Propst, M. 1981. Tall Oil. Pulp Chemical Association. N.Y.
- Dvorak, W. 1996, Conservación genética *ex situ* del *Pinus ayacahuite*, Recursos Genéticos Forestales N° 24: 269-291, Raleigh N.C.
- Farjon, A. y Styles B.T., 1997. *Pinus*, Flora Neotropica Monograph 75. The New York Botanic Gardens, New York.
- Farjon, A, Page CN. (1999). Conifers □ status survey and conservation action plan. IUCN□SSC Conifer Specialist Group: Cambridge, UK.
- Farjon, A. Pérez de la Rosa, J.A. and Styles B.T., 1997. Guía de Campo de los Pinos de México y América Central. The Royal Botanic Gardens, Kew. United Kingdom.
- Glass N., Beecher C., and Ryals J. 2000. Metabolic profiling an the right path.. *Nature Biotechnology* Vol. 18.
- Gómez N.E. and Witte Ludger. 2001. A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. *J.Chem. Ecol.* 27 (11) 2351-2359
- Hernández, G., 1990 Variación genética isoenzimática en *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades de México y Centroamérica. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Chapingo 103 p.
- Islas, O. E. 1992. Evaluación de Cinco Especies de Pino para la Producción de Pulpas Termomecánicas Blanqueadas. Tesis de Maestría en Ciencias, DMCyP, CUCEI, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

- Jonsson, P., Gullberg J., Nordström A., Kusano M., Kowalczyk M., Sjöström M., and Moritz T., 2004. A Strategy for Identifying Differences in Large Series of Metabolomic Samples Analyzed by GC/MS. *Anal. Chem.* 76: 1738-1745.
- Jonsson, P., Johansson A. I., Gullberg J., Trygg J., Grung B., Marklund S., Sjöström M., Antii H., and Moritz T., 2005. High-Throughput Data Analysis for Detecting and Identifying Differences between Samples in GC/MS-Based Metabolomic Analyses. *Anal. Chem.* 77: 5635-5642.
- Kleinhentz, M., Jactel, H., and Menassieu, P. 1999. Terpene Attractant Candidates of *Dioryctria Sylvestrella* in Maritime Pine (*Pinus pinaster*) Oleoresin, Needles, Liber, and Headspace Samples. *J. Chem. Ecol.* 25: 2741-2756.
- Koukos, P.K., Papadopoulou K.I., Patiaka, D.Th., and Papagiannopoulos, A. D. 2000. Chemical Composition of Essential Oils from Needles and Twigs of Balkan Pine (*Pinus peuce* Grisebach) Grown in Northern Greece. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1266-1268.
- Langheheim, J.H., W. H. Stubblebin & C.E. Foster. 1979. Effect of moisture stress on composition and yield in leaf resin of *Hymenaeae courbaril*. *Biochem Sys. Ecol.* 7: 21-28.
- Langenheim, J.H.. 1994. Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *J.Chem. Ecol.* 20: 1223-1280.
- Latta, R.G., Linhart, V. B., Lundquist, L., Shyder, M.A.,2000. Patters of monoterpene variation within individual trees in Ponderosa Pine. *J. Chem. Ecol.* 26: 1341-1355.
- Little, E.L., and Critchfield, W. B.1969. Subdivisions of the genus *Pinus*. U.S. Forest Serv.Misc. Publ. 1444. Wasington, D. C. 51 p.
- Loreto, F., Nascetti, P., Graverini, A. And Mannozi, M. 2000. Emission and content of monoterpenes in intact and wounded needles of the Mediterranean Pine, *Pinus pinea*. *Functional Ecology* 14: 589-595
- Mannien, A.-M., Vourienn, M., and Holopainen, J. K. 1998 Variation in Growth, Chemical Defense, and Herbivore Resistance in Scot Pine Provenances. *J. Chem. Ecol.* 28: 211-228
- Mannien, A.-M., Tarhanen, S., Vourienn, M., and Kainulainen, P. 2002 Comparing the variation of needle and wood terpenoids in Scot pine provenances. *J. Chem. Ecol.* 28: 211-228.
- Martínez, M. 1984. Los Pinos Mexicanos, 2ª edición. Ediciones Botas, México.
- Mirov, N.T. 1961. Composition of gum turpentines of pines. U.S.D.A. Tech. Bull 1239. 158 p.
- Mirov, N.T. 1967. The Genus *Pinus* Chemical Geography, pp. 505-519. The Roland Press Company. New York.
- Musálem M. A., Ramírez A. 2003. Monografía de *Pinus ayacahuite* Edición: INIFAP-CONABIO-SAGARPA.
- Newton, A. C., Allnut, T. R., Dvorak, W. S., Del Castillo, R. F. and Ennos, R. A. 2002. Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity.* 89: 191-198.
- Nilsson, J.-E. 1984. Genetic Variation in resin canal frequency and relationship to terpene production in foliage of *Pinus concorta*. *Silvae Genet.* 33: 79-84.

- Pérez de la Rosa J. A. 1993. Taxonomía de *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Perry, J. P., 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press Inc. Portland, Oregon.
- Pillips, M.A. and Croteau, R.B. 1999. Resin-based defenses in conifers. Trends Plants Sci. 4: 184-190
- Raffa, K. F. y A. A. Berryman. 1983. Physiological aspects of lodgepole pine wound response to a fungal symbiont of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). Canad. Entomol. 15: 723-734.
- Ramírez, L. A. 1999. Estado del conocimiento de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. Tesis. Chapingo, Texcoco, Edo. de México.
- Rzedowskii, J., 1981. Vegetación de México, pp 283-312. Limusa Ed. México
- Richardson, D.M., 1998. Ecology and Biogeography of *Pinus*, Cambridge University Press. United Kingdom.
- Roberts, D.R. 1970. Within-tree variation of monoterpene hydrocarbon composition of slash pine oleoresin. Phytochemistry. 9: 809-815.
- Rockwood, D.L. 1973. Variation in monoterpene composition of two oleoresin systems of loblolly pine. Forest Sci. 19: 147-153.
- Rudloff, E. von. 1975. Volatile leaf oil analysis in chemosystematic studies of North America conifers. Biochem. Sys. Ecol. 2: 131-167.
- SEMARNAT. Pino Ayacahuite, El árbol de navidad mexicano. Unidad de Comunicación Social. Diciembre 2003.
- Sermagina, N. V., Sulman, M. G., Sulman, E. M., Ankudinova, T.V. 2000. Study of the extraction of biologically active compounds from herbs under ultrasound. Khimiko-Pharmatsevticheski J. 2: 26-29.
- Silba, F. R., 1990. Análisis multivariado de caracteres morfológicos de *Pinus oocarpa* var *ochoteranae* Mart. y *Pinus tecunumanii* (Schwer.) Eg. Y Perry. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. 49 p.
- Simoneit, B. R. 2005. Seminario Caracterización de mezclas orgánicas a partir de espectros por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco.
- Sjödin, K., Persson, M., Borg-Karlson, A-K., and Norin, T. 1996. Enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in different tissues of four individuals of *Pinus sylvestris*. Phytochemistry 41: 439-445.
- Sjödin, K., Persson, M., Fäldt, J., Ekberg, I. And Borg-Karlson A-K, 2000. Occurrence and correlations of Monoterpenes hydrocarbon enantiomers in *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. J. Chem. Ecol. 26: 1701-1720.
- Styles, B.T. 1993. Genus *Pinus*: a Mexican preview. Pp. 397-420. In P.T. Ramamorrhthy, R. Bye. A. Lot & J. Fa (eds), Biological diversity of Mexico: origin and distribution. Oxford University Press, New York.
- Sulman, M.G., Ankudinova T.V., Pirog D.N., Sulman E.M., Semagina N.V. 1998 "Method for extraction from the vegetable raw material". Patent (Russia) 12104733.
- Turtola, S., Manninen A., Rikala R., and Kainulainen P., 2003. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots Pine and Norway Spruce Seedlings. J. Chem Ecol. Vol. 29: 1981-1995.
- Waterman, P.G., Mole A., 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications.
- White, E.E., 1983. Biosynthetic implications terpene correlations in *Pinus conorta*. Phytochemistry 22:1399-1405

ANEXO 1

Número de muestra y localidades

| Muestra | Especie | Estado | Localidad | Fecha |
|----------------|--|----------------|------------------|--------------|
| 1 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 12-Mar-01 |
| 2 | <i>P. strobiformis</i> Engelman | Nuevo León | Galeana | 19-Mar-01 |
| 3 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Michoacán | Los Reyes | 28-Abr-01 |
| 5 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Michoacán | Los Reyes | 28-Abr-01 |
| 6 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Michoacán | Los Reyes | 28-Abr-01 |
| 7 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Michoacán | Los Reyes | 28-Abr-01 |
| 8 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Michoacán | Los Reyes | 28-Abr-01 |
| 9 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Michoacán | Los Reyes | 28-Abr-01 |
| 10 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Veracruz | Tlapacoyan | 06-Jun-01 |
| 11 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Veracruz | Tlapacoyan | 06-Jun-01 |
| 12 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Veracruz | Tlapacoyan | 06-Jun-01 |
| 13 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Veracruz | Tlapacoyan | 06-Jun-01 |
| 14 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Veracruz | Tlapacoyan | 06-Jun-01 |
| 15 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Puebla | Hueytamalco | 06-Jun-01 |
| 16 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Puebla | Hueytamalco | 06-Jun-01 |
| 17 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Puebla | Hueytamalco | 06-Jun-01 |
| 18 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Puebla | Hueytamalco | 06-Jun-01 |
| 19 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Puebla | Hueytamalco | 06-Jun-01 |
| 20 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Puebla | Hueytamalco | 06-Jun-01 |
| 21 | <i>P. strobus chiapensis</i> Martínez | Puebla | Hueytamalco | 06-Jun-01 |
| 22 | <i>P. strobiformis</i> Engelman | Durango | Pueblo Nuevo | 06-Jun-01 |
| 23 | <i>P. strobiformis</i> Engelman | Durango | Pueblo Nuevo | 06-Jun-01 |
| 24 | <i>P. strobiformis</i> Engelman | Durango | Pueblo Nuevo | 06-Jun-01 |
| 25 | <i>P. culminícula</i> | NVL | POT | 19-Mar-01 |
| 26 | <i>P. culminícula</i> | NVL | POT | 19-Mar-01 |
| 27 | <i>P. cembroides</i> | NVL | POT | 19-Mar-01 |
| 28 | <i>P. cembroides</i> | NVL | POT | 19-Mar-01 |
| 29 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Guerrero | Omitlán | 18-Oct-01 |
| 30 | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> | Edo. De México | Tlalmanalco | 17-Oct-01 |
| 31 | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> | Edo. De México | Tlalmanalco | 17-Oct-01 |
| 32 | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> | Edo. De México | Tlalmanalco | 17-Oct-01 |
| 33 | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> | Edo. De México | Tlalmanalco | 17-Oct-01 |
| 34 | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> | Edo. De México | Tlalmanalco | 17-Oct-01 |
| 35 | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> | Edo. De México | Tlalmanalco | 17-Oct-01 |
| 36 | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> | Edo. De México | Tlalmanalco | 17-Oct-01 |
| 37 | <i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> | Edo. De México | Tlalmanalco | 17-Oct-01 |
| 39 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Hidalgo | Real del Monte | 18-Oct-01 |
| 40 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Hidalgo | Real del Monte | 18-Oct-01 |
| 41 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Hidalgo | Real del Monte | 18-Oct-01 |
| 42 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Hidalgo | Real del Monte | 18-Oct-01 |

| | | | | |
|------|--|-----------|----------------|-----------|
| 43 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Hidalgo | Real del Monte | 18-Oct-01 |
| 44 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Hidalgo | Real del Monte | 18-Oct-01 |
| 45-A | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Hidalgo | Real del Monte | 18-Oct-01 |
| 45-B | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Hidalgo | Real del Monte | 18-Oct-01 |
| 48 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Querétaro | El Copal | 18-Oct-01 |
| 49 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Querétaro | El Copal | 18-Oct-01 |
| 50 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 22-Jul-01 |
| 51 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 02-Nov-01 |
| 52 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 02-Nov-01 |
| 53 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 02-Nov-01 |
| 54 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 02-Nov-01 |
| 55 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 02-Nov-01 |
| 56 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 02-Nov-01 |
| 57 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 03-Nov-01 |
| 58 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 03-Nov-01 |
| 59 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 03-Nov-01 |
| 60 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 03-Nov-01 |
| 62 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 03-Nov-01 |
| 63 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Jalisco | Talpa | 03-Nov-01 |
| 64 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Veracruz | Xico | 08-Dic-01 |
| 65 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Veracruz | Xico | 08-Dic-01 |
| 66 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Veracruz | Xico | 08-Dic-01 |
| 80 | <i>P. strobilus chiapensis</i> Martínez | Chiapas | Bochil | 24-Feb-02 |
| 81 | <i>P. strobilus chiapensis</i> Martínez | Chiapas | Bochil | 24-Feb-02 |
| 83 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Chiapas | San Cristóbal | 20-Feb-02 |
| 84 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Chiapas | San Cristóbal | 20-Feb-02 |
| 85 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Chiapas | San Cristóbal | 20-Feb-02 |
| 87 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Chiapas | San Cristóbal | 20-Feb-02 |
| 88 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Chiapas | San Cristóbal | 20-Feb-02 |
| 89 | <i>P. ayacahuite</i> Ehrenberg ex. Schlechtendal | Chiapas | San Cristóbal | 20-Feb-02 |
| 90 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 91 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 92 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 93 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 94 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 95 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 96 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 97 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 98 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 99 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 100 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 101 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 102 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 103 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 104 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 106 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 107 | <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |

| | | | |
|--------------------------------------|-----------|---------|-----------|
| 108 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 109 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 110 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 111 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 112 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 113 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 114 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 115 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Sonora | Cananea | 12-Jun-02 |
| 116 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 117 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 118 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 119 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 120 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 121 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 122 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 123 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 124 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 125 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 126 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 127 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 128 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 129 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 130 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 131 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 132 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 133 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 134 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 135 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 136 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 137 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 138 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |
| 140 <i>P. strobiformis</i> Engelmann | Chihuahua | Bocoyna | 10-Jun-02 |

ANEXO 2

Localidades donde se colectaron las muestras de acículas y ramas.

Ubicación de las localidades de colecta *Pinus ayacahuite* Ehrenberg. ex Schlechtendal.

| Localidad | n ejemplares | Altitud msnm | Lat. N/Long. O | Hábitat | Observaciones | Fecha de colecta |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|---|--|---------------------|
| Sierra de Zimapán, Jal. | (1) | | | | | |
| Mina del Cuale, Jal. | 1 | 2000 | | Con <i>Pinus douglasiana</i> | Pino escaso | Mar. 12 2001 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Camino Talpa-Cuale, Jal | (50-63) | | | | | |
| Km 4.5 | 1 | 1810 | 20° 22' 41" / 105° 02' 37" | Bosque mixto de pino encino con <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>Abies guatemalensis</i> var. <i>jaliscana</i> y <i>Quercus</i> spp. | "Piñones" Árboles frecuentes de 25 m de altura. La época de dehiscencia de los conos fue en octubre. | Nov. 3 2001 |
| Km 6 | 3 | 1970 | 20° 22' 50" / 105° 02' 19" | Bosque mixto de pino encino con <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>P. lumholtzii</i> , <i>P. oocarpa</i> , <i>P. douglasiana</i> , <i>Abies guatemalensis</i> var. <i>jaliscana</i> y <i>Quercus</i> spp. | Árboles frecuentes de 10 a 22 m de altura. La época de dehiscencia de los conos fue en octubre. | Nov. 3 2001 |
| Km 9 | 3 | 2100 | 20° 21' 42" / 105° 02' 08" | Bosque mixto de pino encino con <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>P. herrerae</i> , <i>P. oocarpa</i> , <i>P. douglasiana</i> , <i>Abies guatemalensis</i> var. <i>jaliscana</i> y <i>Quercus</i> spp. | Árboles frecuentes de 25 m de altura. La época de dehiscencia de los conos fue en octubre. Colecta de ramas. | Nov. 3 2001 |
| Km 31 | 5 | 2340 | 20° 22' 25" / 104° 59' 32" | Bosque mixto de pino encino con <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>P. herrerae</i> , <i>P. douglasiana</i> y <i>Quercus</i> spp. | Árboles frecuentes de 18 a 25 m de altura. La época de dehiscencia de los conos fue en octubre. | Nov. 2 2001 |
| Km 32 | 1 | 2340 | 20° 21' 48" / 104° 59' 38" | Bosque mixto de pino encino con <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>Abies guatemalensis</i> var. <i>jaliscana</i> y <i>Quercus</i> spp. | Árboles frecuentes de 25 m de altura. La época de dehiscencia de los conos fue en octubre. | Nov. 2 2001 |
| Los Reyes | (3-9) | | | | | |

| | | | | | | |
|--|----------|------|-----------------------------|--|--|--------------|
| Mich. | | | | | | |
| Las Palmas | 9 | 2260 | 19° 40' / 102° 25' | | Excursión de reconocimiento de la fenología. Colecta de ramas. | Abr. 28 2001 |
| Omitlán Hgo. | (1) | | | | | |
| Poblado Guerrero | 1 | 2450 | 20° 09' 13'' / 98° 39' 20'' | Restos de bosque a orilla N del poblado con <i>P. teocote</i> , <i>Juniperus deppeana</i> y <i>Quercus</i> spp. | “Piñon Cimarron” Dos árboles de 20-30 m Topotipo de <i>P. ayacahuite</i> . | Oct 18 2001 |
| Real del Monte Hgo. | (39-45b) | | | | | |
| Comunidad Palo Hueco | 9 | 2630 | 20° 09' 13'' / 98° 38' 07'' | Bosque de <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>P. patula</i> y <i>Quercus rugosa</i> . | Pino frecuente localmente, comenzando la dispersión de semillas. Colecta de ramas. | Oct. 18 2001 |
| Pinal de Amoles, Qro. | (48-49) | | | | | |
| Barranca El Copal | 4 | 2800 | 21° 10' 09'' / 99° 41' 49'' | Bosque de <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>P. teocote</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i> y <i>Quercus</i> spp. | “Pino abeto” Pinos de 25-40 m, frecuentes localmente, iniciando la dehiscencia. Localidad nueva. Colecta de ramas. | Oct. 19 2001 |
| Xico, Ver. | | | | | | |
| Corral de Rajas | 3 | 2930 | 19° 31' 08'' / 97° 05' 42'' | Bosque húmedo de coníferas con <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>P. patula</i> , <i>P. teocote</i> y <i>Abies religiosa</i> . | “Jalocote” Árboles frecuentes de 15-25 m | Dic. 8 2001 |
| San Cristóbal Chis. | (83-89) | | | | | |
| Km 228 Carr 186 Palenque-San Cristóbal | 7 | 2930 | 16° 40' / 92° 33' | Bosque de <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>P. pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> y <i>Quercus</i> spp. | Pino abundante localmente de 15-25 m y DAP de 40-80 cm | Feb. 20 2002 |

Ubicación de las localidades de colecta *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) G.R. Shaw.

| Localidad | n | Altitud msnm | Lat. N./Long. O. | Hábitat | Observaciones | Fecha de colecta |
|---------------------------------|---------|--------------|-----------------------------|---|--|------------------|
| Tlalmanalco, Edo de Mex. | (30-37) | | | | | |
| Cañada al E. De San Rafael | 8 | 2720 | 19° 12' 38'' / 98° 44' 10'' | Bosque muy perturbado de <i>Pinus ayacahuite</i> , var. <i>veitchii</i> , <i>Pinus</i> spp. Y <i>Cupressus lusitanica</i> . | Pinos de 25-35 m <i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i> iniciando la dehiscencia | Oct. 17 2001 |

Ubicación de las localidades de colecta *Pinus strobiformis* Engelmann.

| Localidad | n | Altitud msnm | Lat. N./Long. O. | Hábitat | Observaciones | Fecha de colecta |
|--|---------------|-----------------|-------------------------------|---|--|---------------------|
| Cerro El Potosí, Galeana, N. L. | (2) | | | | | |
| Km 12 | 1 | 2800 | | | | Mar. 19 2001 |
| Pueblo Nuevo, Durango | (22-24) | | | | | |
| Km 130 Carr. 40 | 3 | 2520 | 23° 43' 37" / 105° 33' 33" | Bosque con <i>Pinus arizonica</i> , <i>P. strobiformis</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i> , <i>Cupressus arizonica</i> , <i>Populus</i> sp. Y <i>Quercus</i> spp. | Colecta de ramas. | Jul. 13 2001 |
| Cananea, Sonora | (90- 115) | | | | | |
| Observatorio INAOE | 26 | 2470 | 31° 03' / 110° 22' | Bosque de <i>P. strobiformis</i> , <i>P. arizonica</i> , <i>P. engelmannii</i> , <i>Juniperus deppeana</i> y <i>Quercus</i> spp. | Árboles frecuentes de 8-15 m de altura y 30-100 cm de DAP, en laderas de exposición norte. | Jun. 12 2002 |
| Bocoyna, Chihuahua | (116- 140) | | | | | |
| Carretera Creel- Divisadero | 25 | 2470 | 20° 43' / 107° 40' | Bosque de <i>P. strobiformis</i> , <i>P. arizonica</i> , <i>Juniperus deppeana</i> y <i>Quercus</i> spp. | Árboles frecuentes de 8-20 m de altura y 20-80 cm de DAP, en laderas de exposición norte. | Jun 10 2002 |

Ubicación de las localidades de colecta *Pinus strobus* var. *chiapensis* Martínez.

| Localidad | n | Altitud msnm | Lat. N./Long. O. | Hábitat | Observaciones | Fecha de colecta |
|-----------------------------|-------------|-----------------|------------------------------|---|---|---------------------|
| Tlapacoyan, Ver. | (10- 14) | | | | | |
| Parada la Reforma | 5 | 750 | 19° 55' 17" / 97° 15' 26" | Restos de bosque mesófilo en huertos de plátano y café. | Árboles de 20-25 m, muy escasos. Suelo profundo y húmedo. Colecta de ramas. | Jun. 6 2001 |
| Hueytamalco, Pue. | (15- 21) | | | | | |
| El Mohon | 7 | 1000 | 19° 53' / 97° 16' | Restos de bosque de | Árboles de 20-30 m. | Jun. 6 2001 |

| | | | | | | |
|--------------------------|---------|------|-------------------|---|---|-------------|
| | | | | pino entre las casas del poblado. | Suelo profundo y húmedo. Pinos utilizados como tutores de café. Colecta de ramas. | |
| Bochil, Chis. | (80-81) | | | | | |
| Km 200 carr. 195 | 2 | 1400 | 16° 59' / 92° 50' | Cañada húmeda en laderas de exposición norte, con <i>Pinus strobus</i> var. <i>chiapensis</i> y <i>P. pseudostrobus</i> . | Pino frecuente localmente de 15-25 m y DAP de 60-120 cm. | Feb.19 2002 |

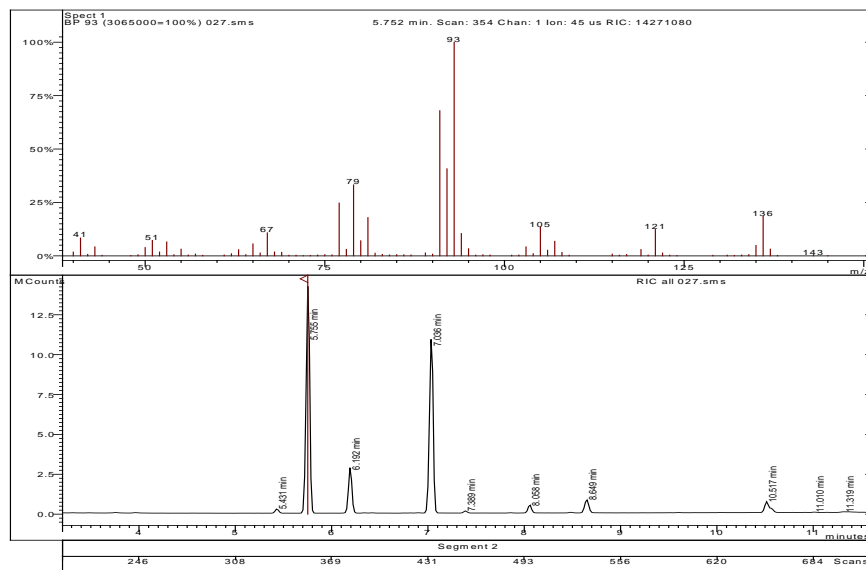
ANEXO 3

Identificación de los 20 compuestos elegidos

1 α -pineno (2.25)

Chromatogram Plot

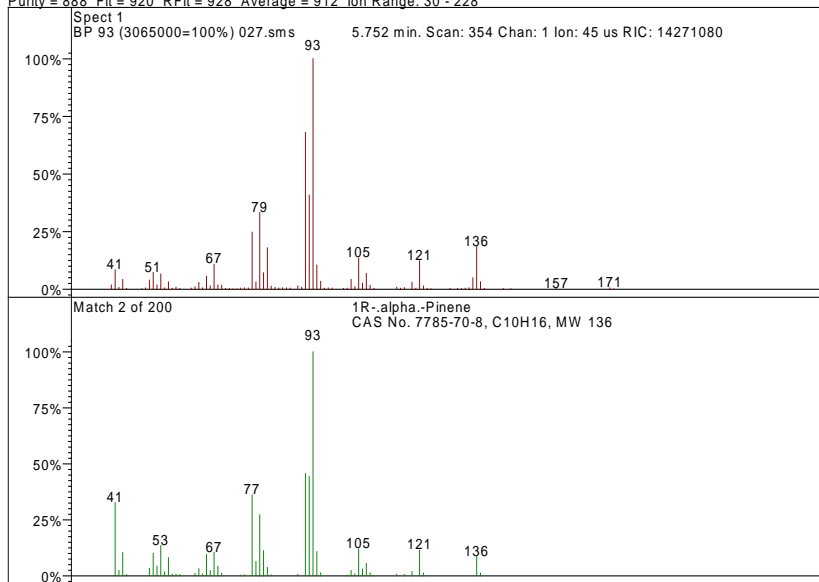
File: c:\... \mismos documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\027.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 2972 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 29/09/2005 7:23



Scan 354 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\027.sms

Entry 40147 from nist98m.lbr Saturn Library

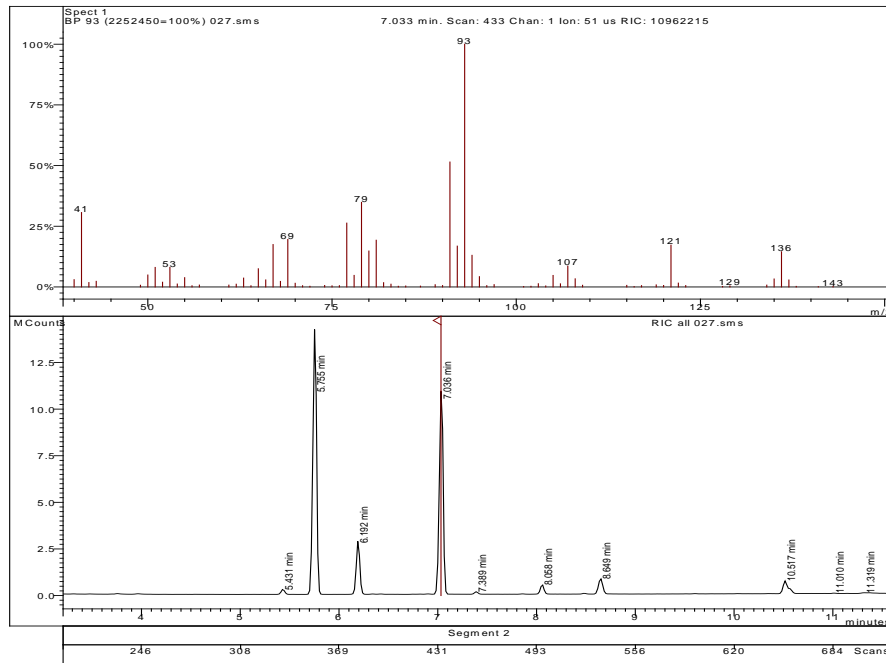
Purity = 888 Fit = 920 RFit = 928 Average = 912 Ion Range: 30 - 228



2 β -pineno (2.5 min)

Chromatogram Plot

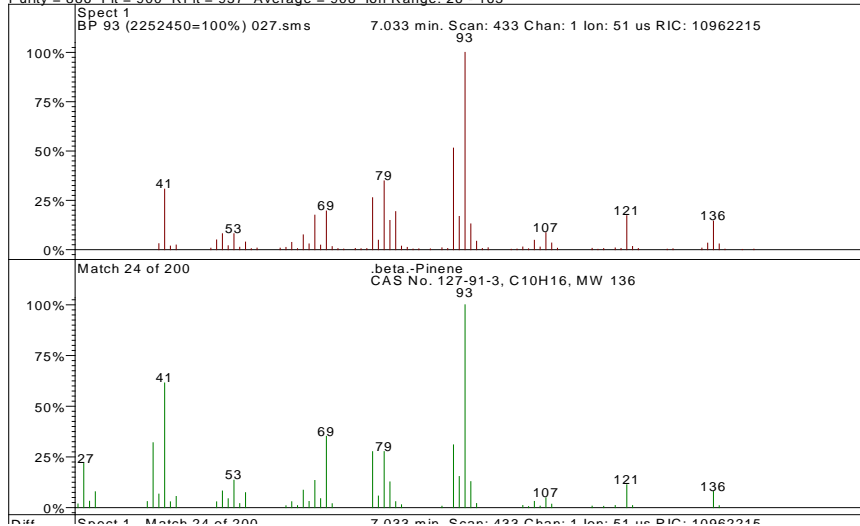
File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\027.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 2972 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 29/09/2005 7:23



Scan 433 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\027.sms

Entry 39850 from nist98m.lbr Saturn Library

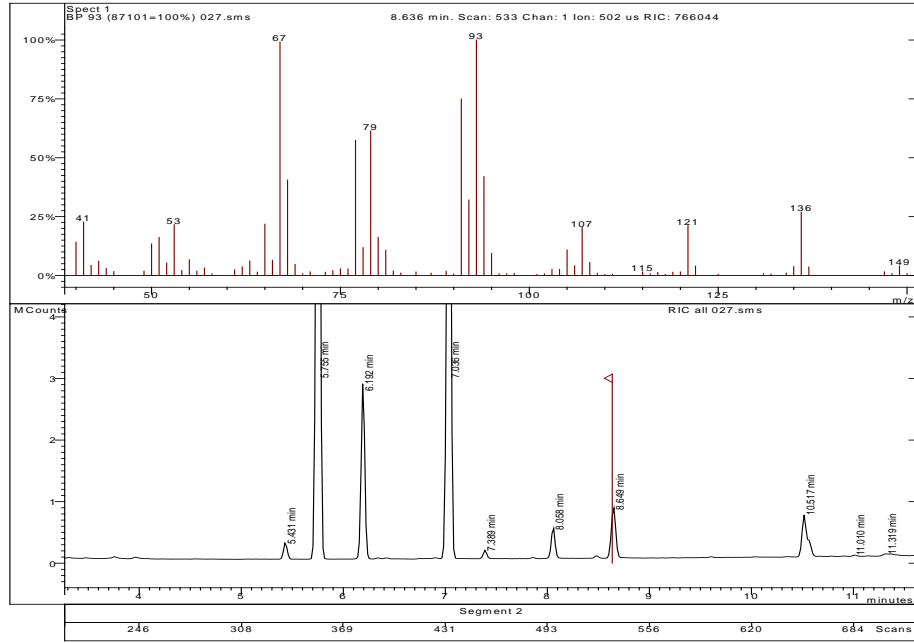
Purity = 886 Fit = 900 Rfit = 937 Average = 908 Ion Range: 26 - 163



3 3-Careno (3.00 min)

Chromatogram Plot

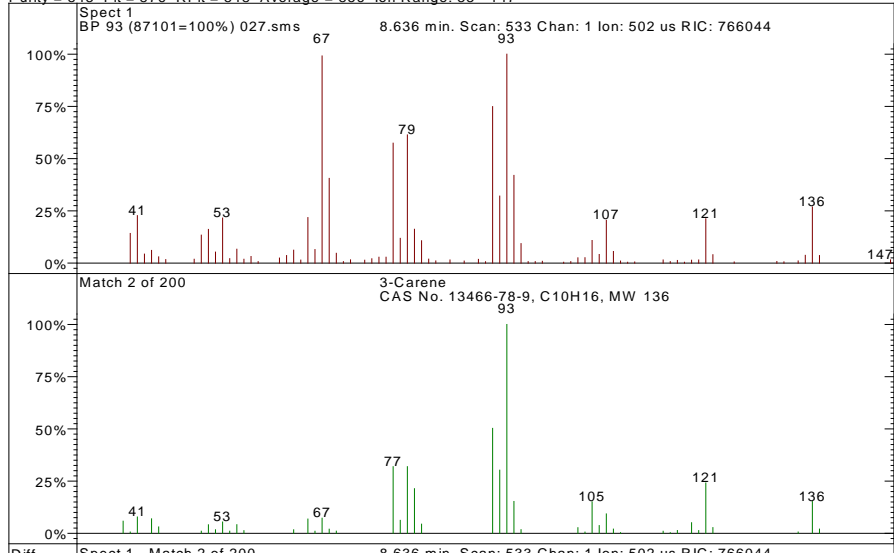
File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\027.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 2972 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 29/09/2005 7:23



Scan 533 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\027.sms

Entry 40142 from nist98m.lbr Saturn Library

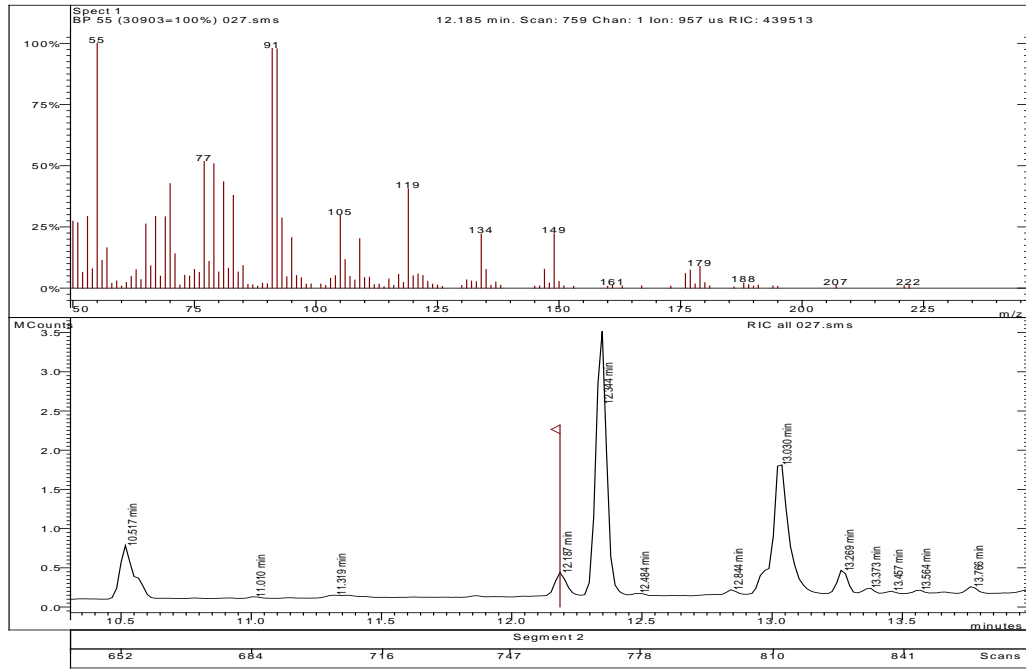
Purity = 843 Fit = 876 RFit = 848 Average = 856 Ion Range: 33 - 147



4 Tujol (4.90min)

Chromatogram Plot

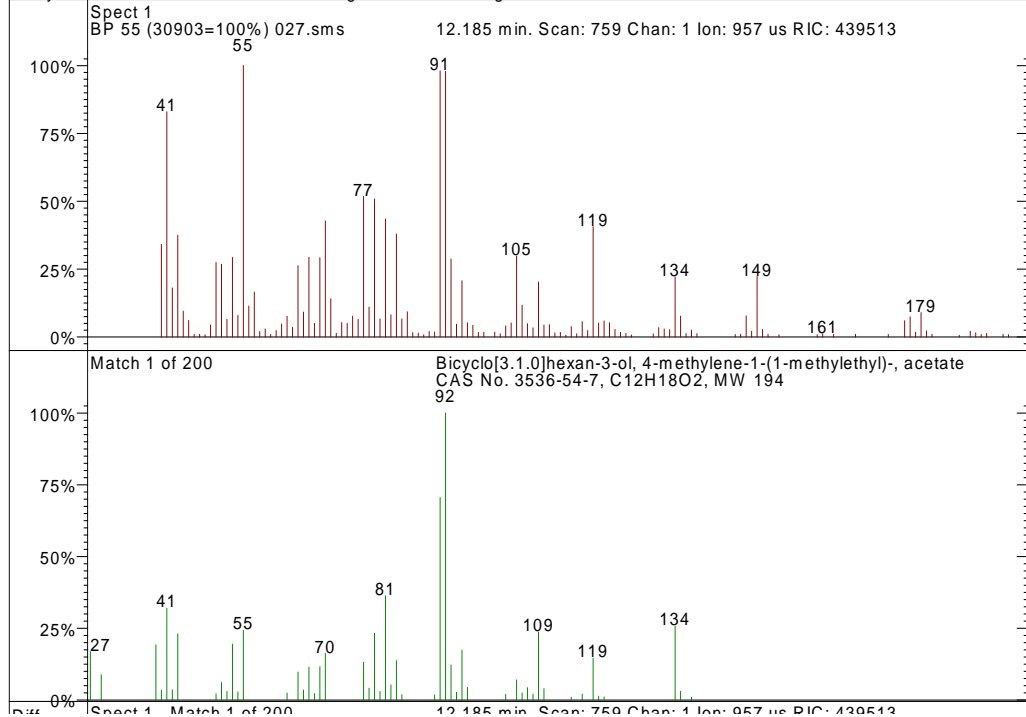
File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\027.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 2972 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 29/09/2005 7:23



Scan 759 from c:\... \escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\027.sms

Entry 39727 from nist98m.lbr Saturn Library

Purity = 718 Fit = 879 RFit = 761 Average = 786 Ion Range: 27 - 198

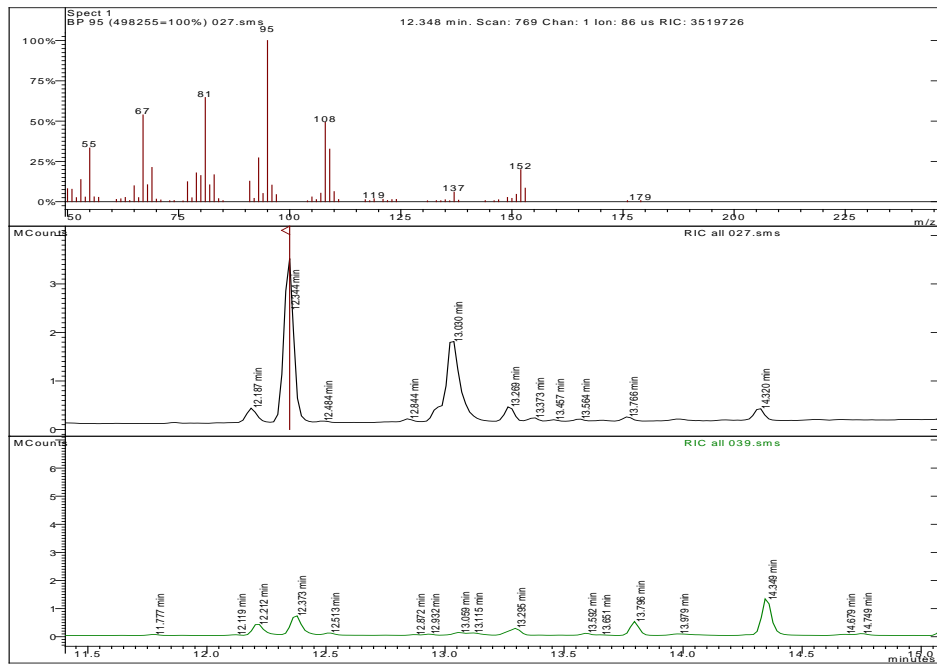


5 No identificado (5.30 min.)

6 Alcanfor (5.60 min)

Chromatogram Plots

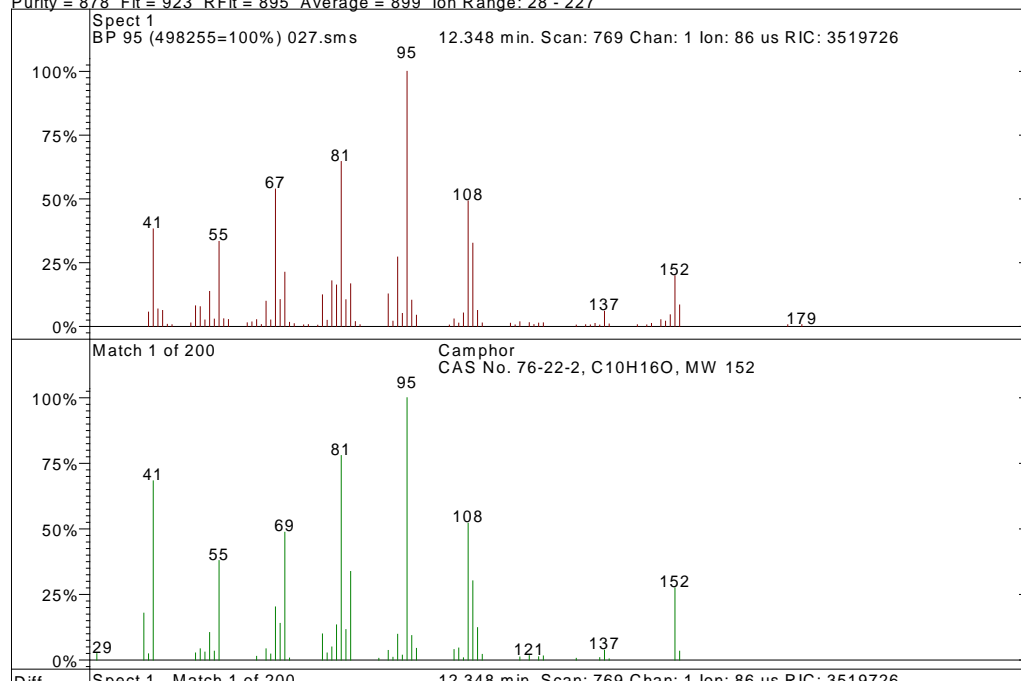
Plot 1: c:\... \busquedas maya\lety\lety\cg\027.sms RIC all
Plot 2: c:\... \busquedas maya\lety\lety\cg\039.sms RIC all



Scan 769 from c:\... \escritorio\busquedas maya\lety\lety\cg\027.sms

Entry 10288 from nist98r.lbr Saturn Library

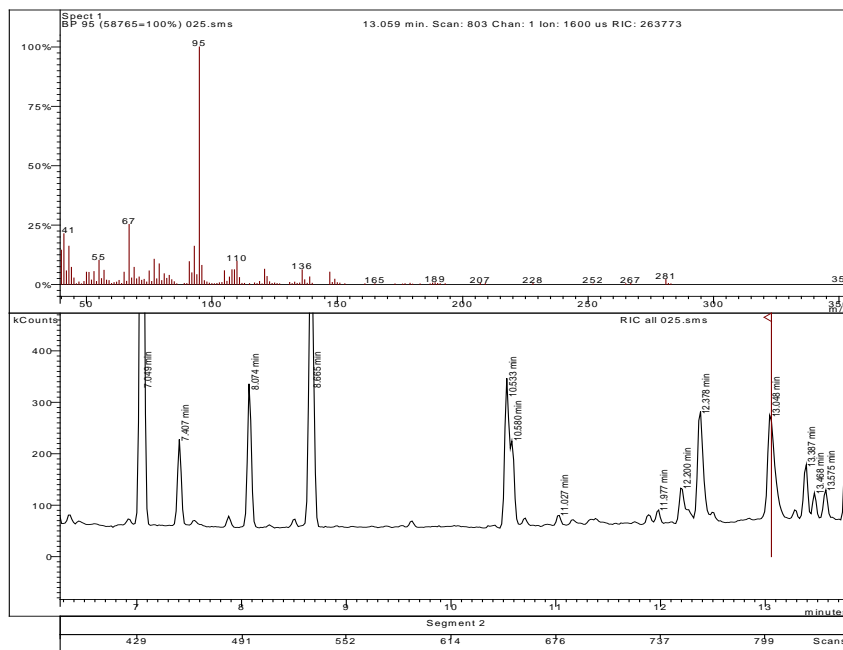
Purity = 878 Fit = 923 RFit = 895 Average = 899 Ion Range = 28 - 227



7 Borneol (6.20 min)

Chromatogram Plot

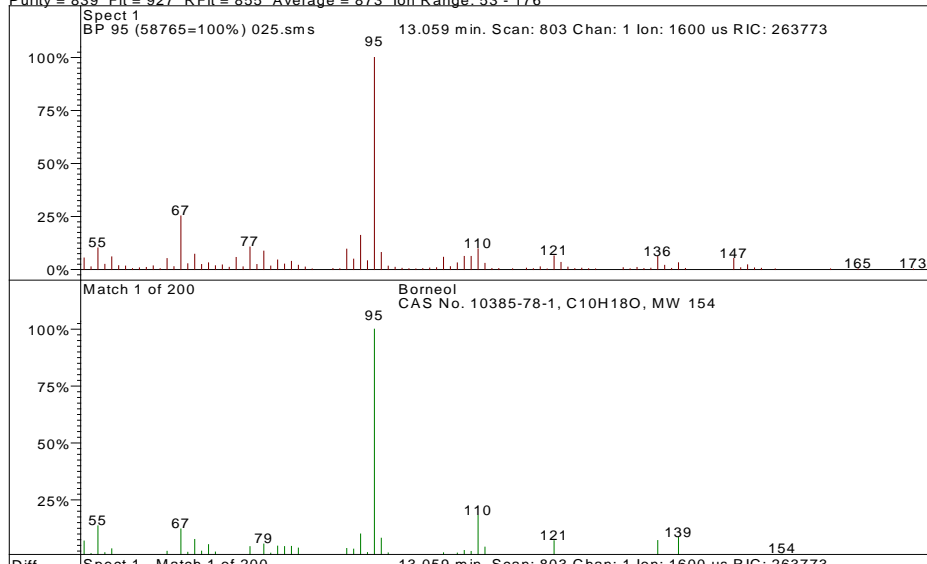
File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\lety\lety\cg\025.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 2998 Time Range: 0.00 - 47.98 min. Date: 28/09/2005 12:56



Scan 803 from c:\... \escritorio\busquedas maya\lety\lety\cg\025.sms

Entry 10217 from nist98r.lbr Saturn Library

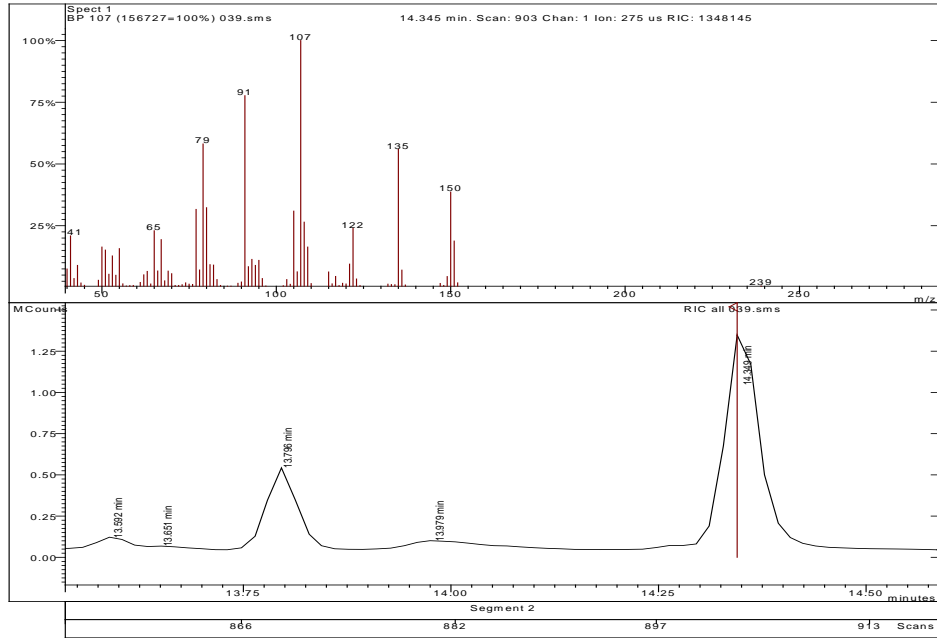
Purity = 839 Fit = 927 RFit = 855 Average = 873 Ion Range = 53 - 176



8 Verbenona (6.90 min)

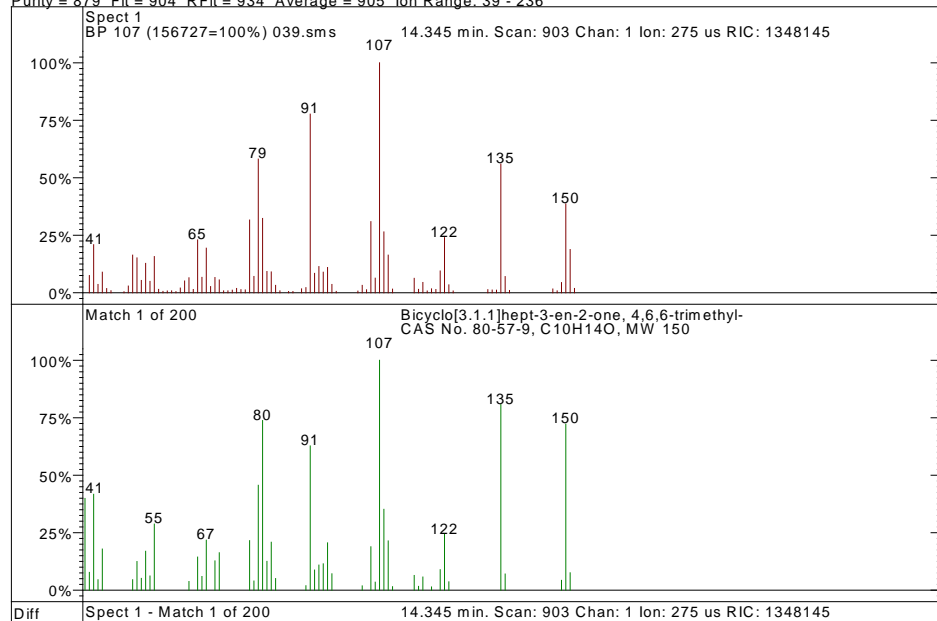
Chromatogram Plot

File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety'cg\039.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 3134 Time Range: 0.00 - 49.97 min. Date: 04/10/2005 10:52



Scan 903 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety'cg\039.sms
Entry 11790 from nist98r.lbr Saturn Library

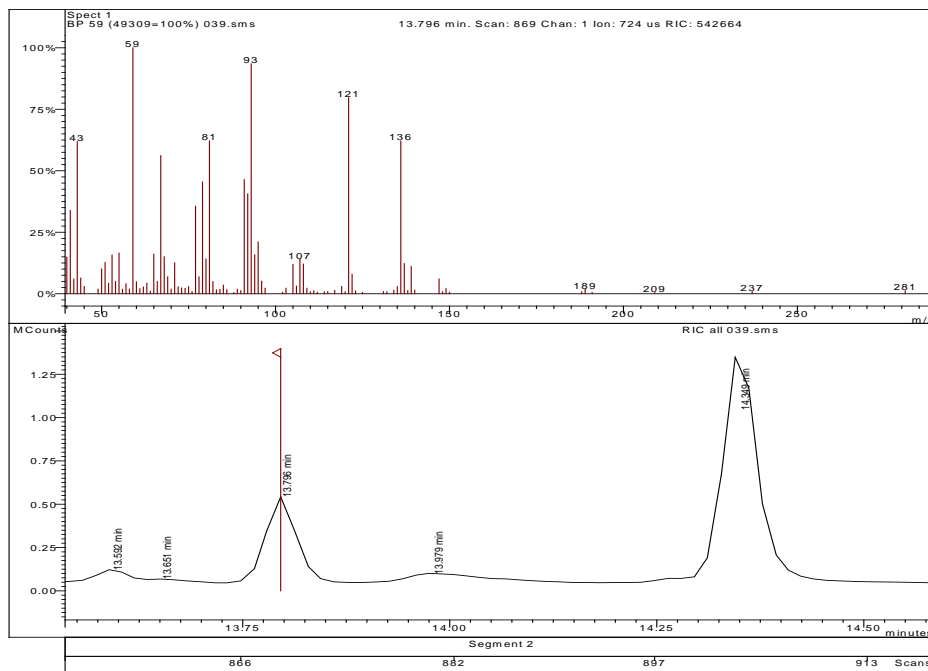
Purity = 879 Fit = 904 RFit = 934 Average = 905 Ion Range: 39 - 236



9 α -Terpineol (7.00min.)

Chromatogram Plot

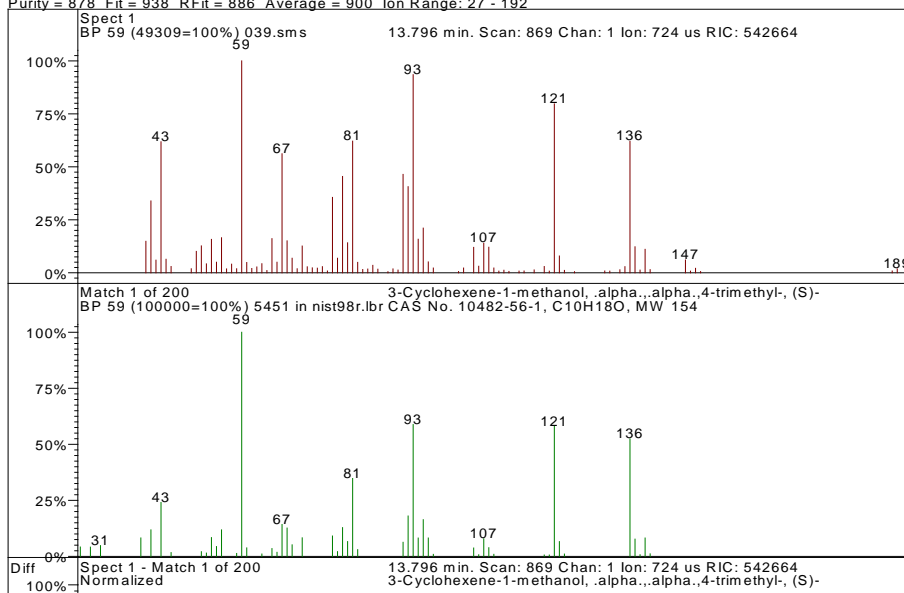
File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety'cg\039.sms
 Sample: Operator: maya
 Scan Range: 1 - 3134 Time Range: 0.00 - 49.97 min. Date: 04/10/2005 10:52



Scan 869 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety'cg\039.sms

Entry 5451 from nist98r.lbr Saturn Library

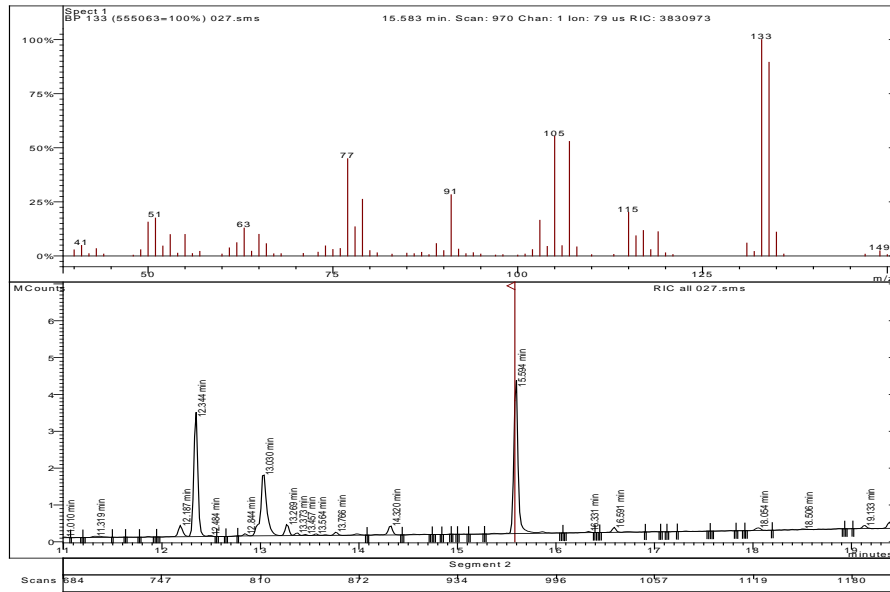
Purity = 878 Fit = 938 RFit = 886 Average = 900 Ion Range: 27 - 192



10 4-(2-propenil)-fenol (Chavicol 9.00min)

Chromatogram Plot

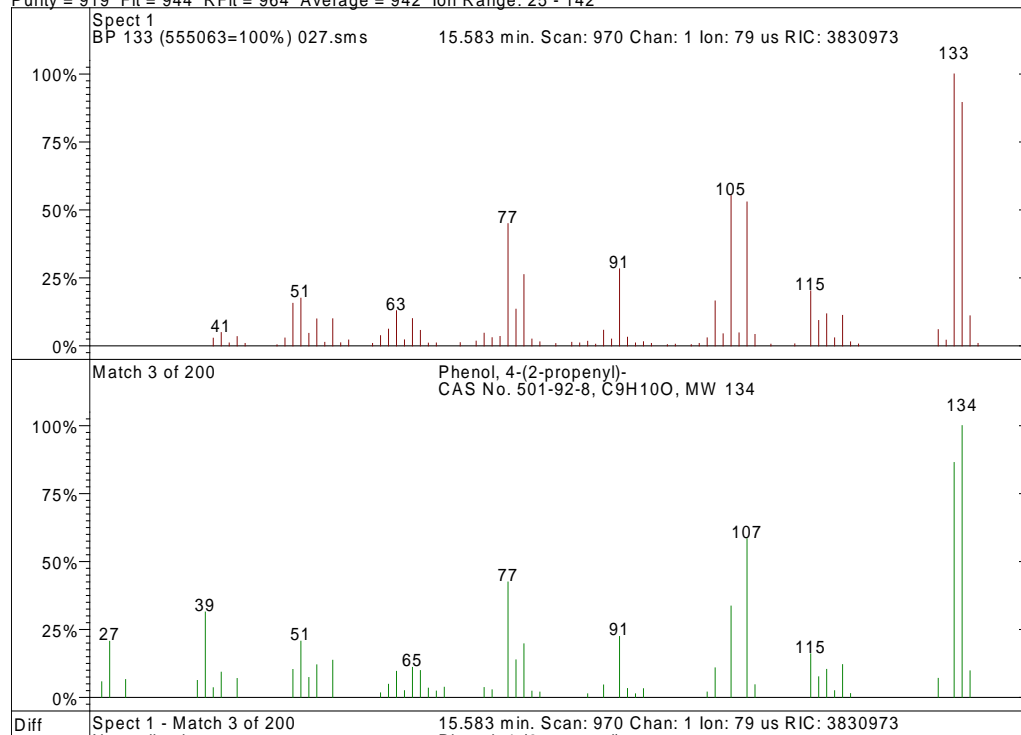
File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\027.sms
 Sample: Operator: maya
 Scan Range: 1 - 2972 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 29/09/2005 7:23



Scan 970 from c:\... \escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\027.sms

Entry 60606 from nist98m.lbr Saturn Library

Purity = 919 Fit = 944 RFit = 964 Average = 942 Ion Range: 25 - 142

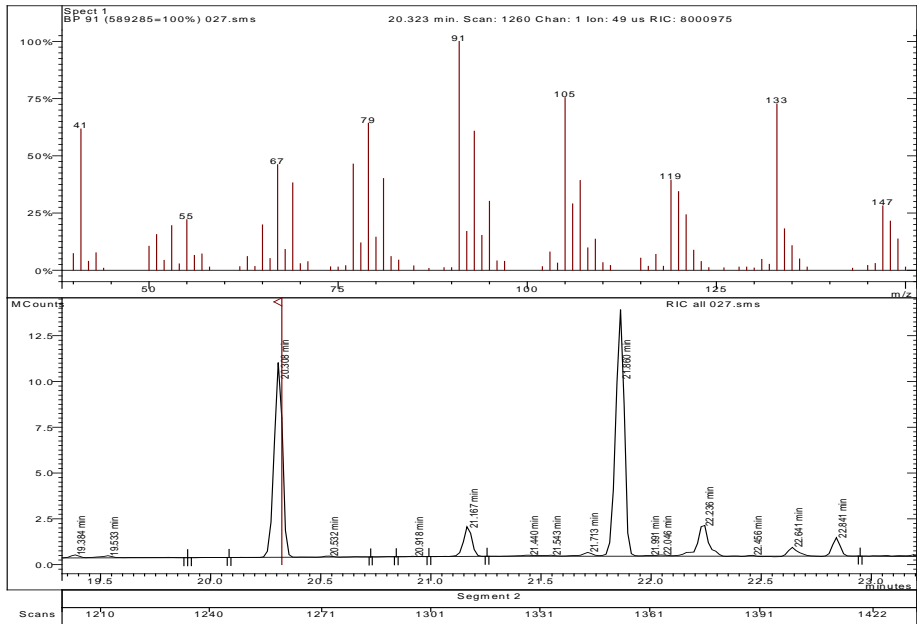


11 No identificado (12.5 min.)

12 Cariofileno (13.50 min.)

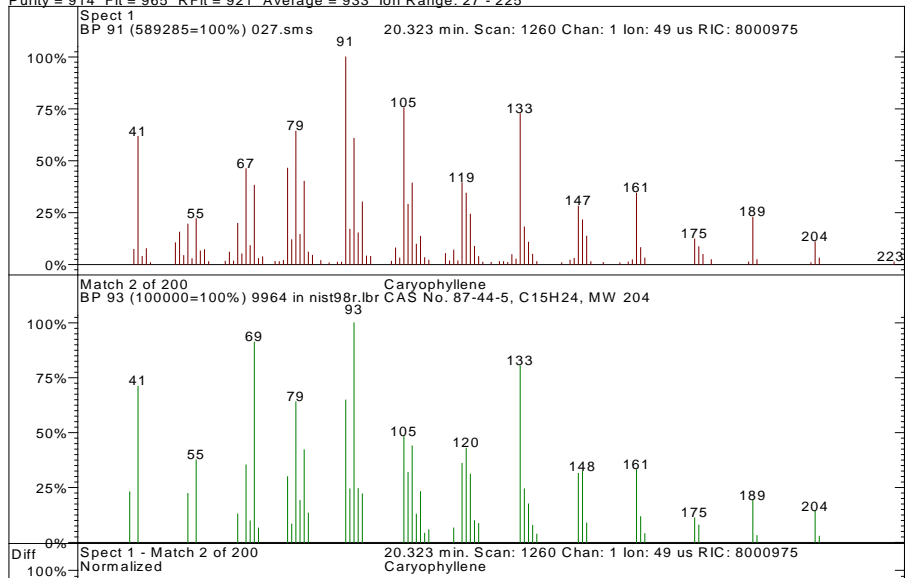
Chromatogram Plot

File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\lety\lety\cg\027.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 2972 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 29/09/2005 7:23



Scan 1260 from c:\... \escritorio\busquedas maya\lety\lety\cg\027.sms
Entry 9964 from nist98r.lbr Saturn Library

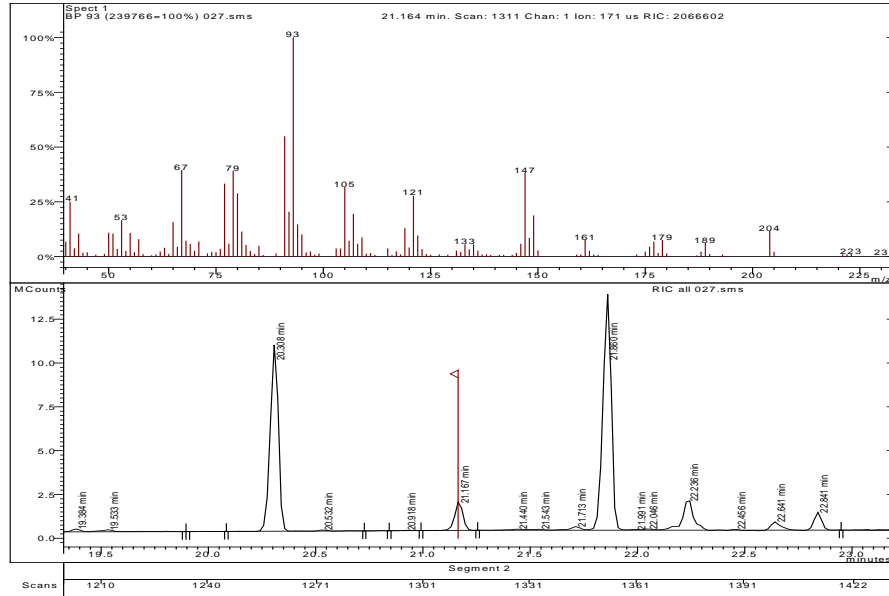
Purity = 914 Fit = 965 RFit = 921 Average = 933 Ion Range: 27 - 225



13 α -Cariofileno (14.50 min)

Chromatogram Plot

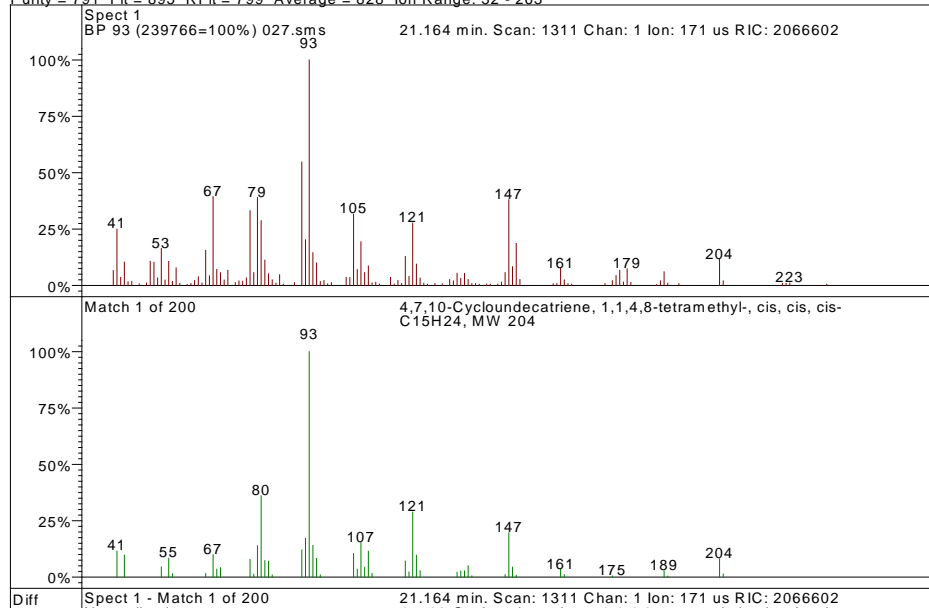
File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\027.sms
 Sample: Operator: maya
 Scan Range: 1 - 2972 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 29/09/2005 7:23



Scan 1311 from c:\... \escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\027.sms

Entry 40106 from nist98m.lbr Saturn Library

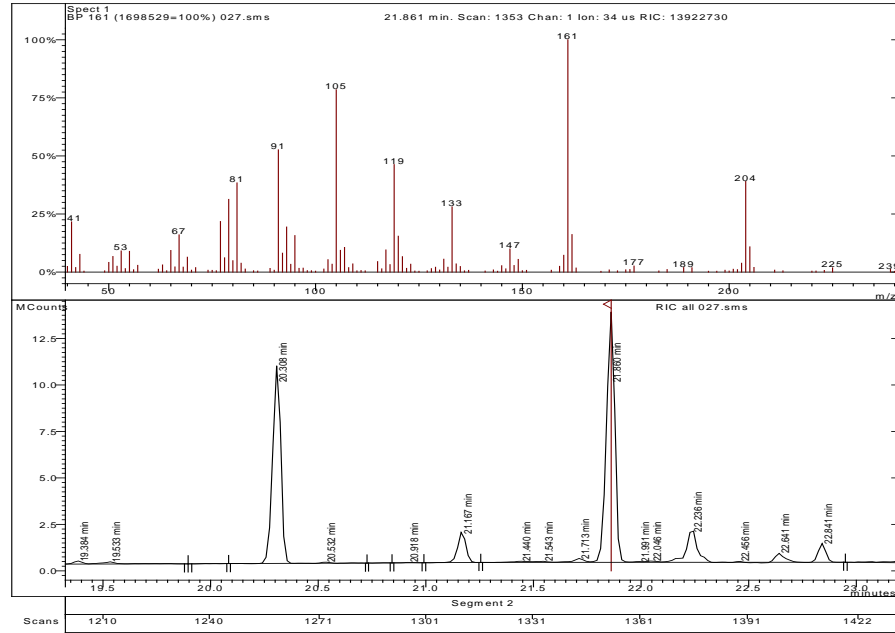
Purity = 791 Fit = 895 RFit = 799 Average = 828 Ion Range: 32 - 263



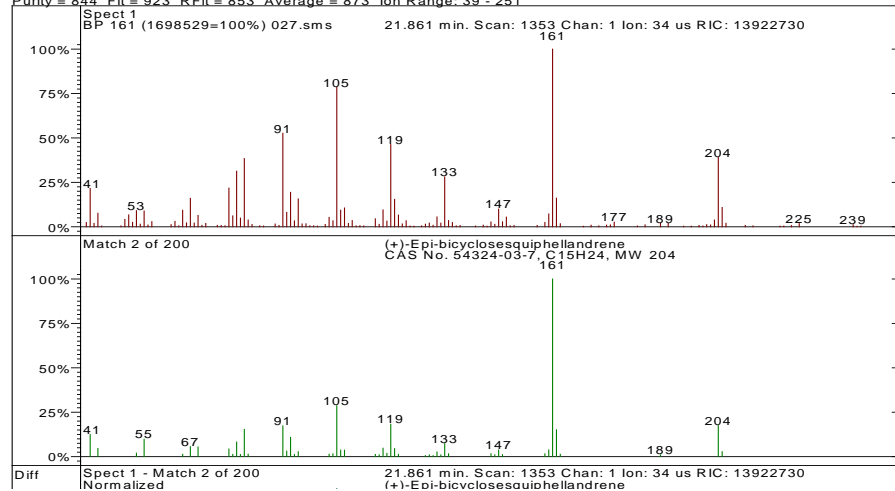
14 (+) epi-biciclosesquifelandreno (15min)

Chromatogram Plot

File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\027.sms
 Sample: Operator: maya
 Scan Range: 1 - 2972 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 29/09/2005 7:23



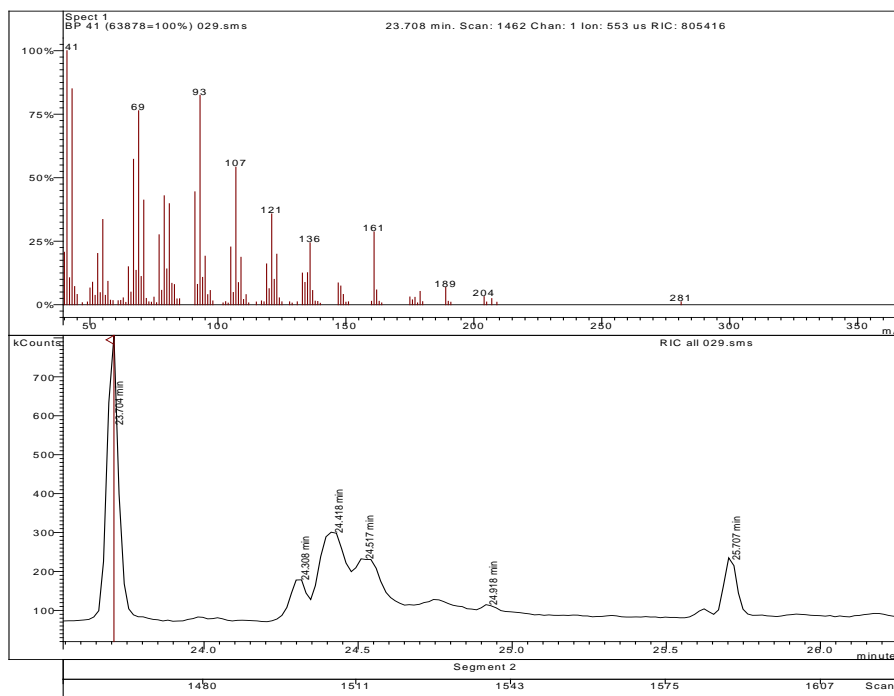
Scan 1353 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\027.sms
 Entry 71005 from nist98m.lbr Saturn Library
 Purity = 844 Fit = 923 RFit = 853 Average = 873 Ion Range: 39 - 251



15 Nerolidol (17.40 min)

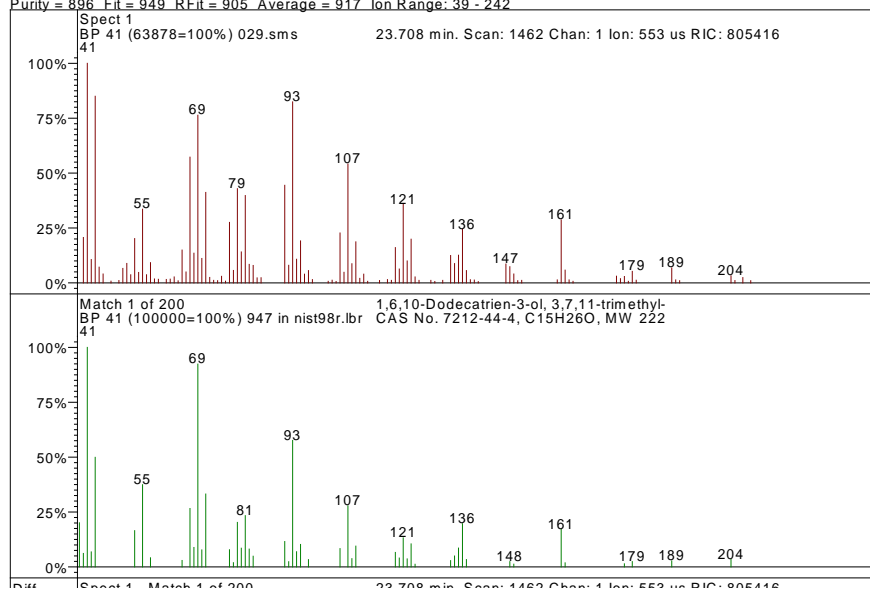
Chromatogram Plot

File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\029.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 3120 Time Range: 0.00 - 49.98 min. Date: 29/09/2005 9:10



Scan 1462 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\029.sms
Entry 947 from nist98r.lbr Saturn Library

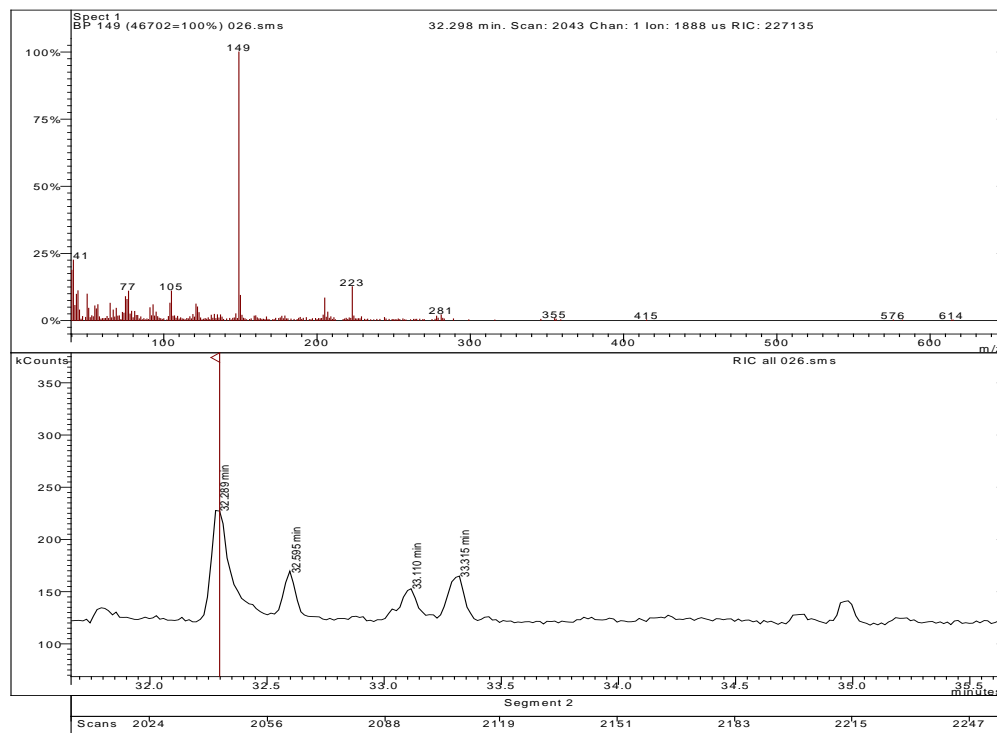
Purity = 896 Fit = 949 RFit = 905 Average = 917 Ion Range: 39 - 242



16 Dibutilftalato (25.00 min)

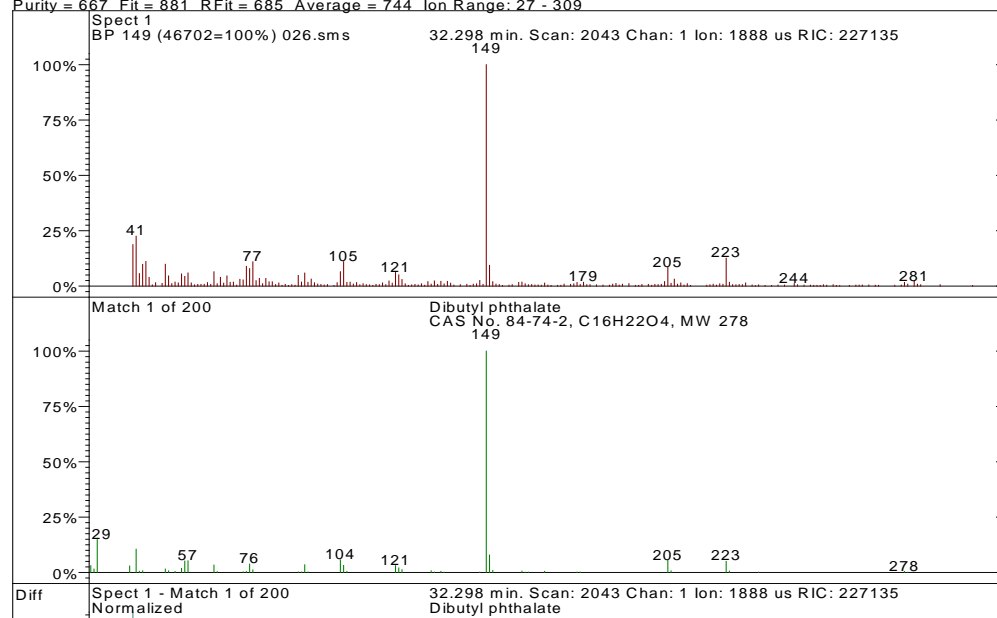
Chromatogram Plot

File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\026.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 3043 Time Range: 0.00 - 47.97 min. Date: 28/09/2005 13:50



Scan 2043 from c:\... \escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\026.sms
Entry 15540 from nist98r.lbr Saturn Library

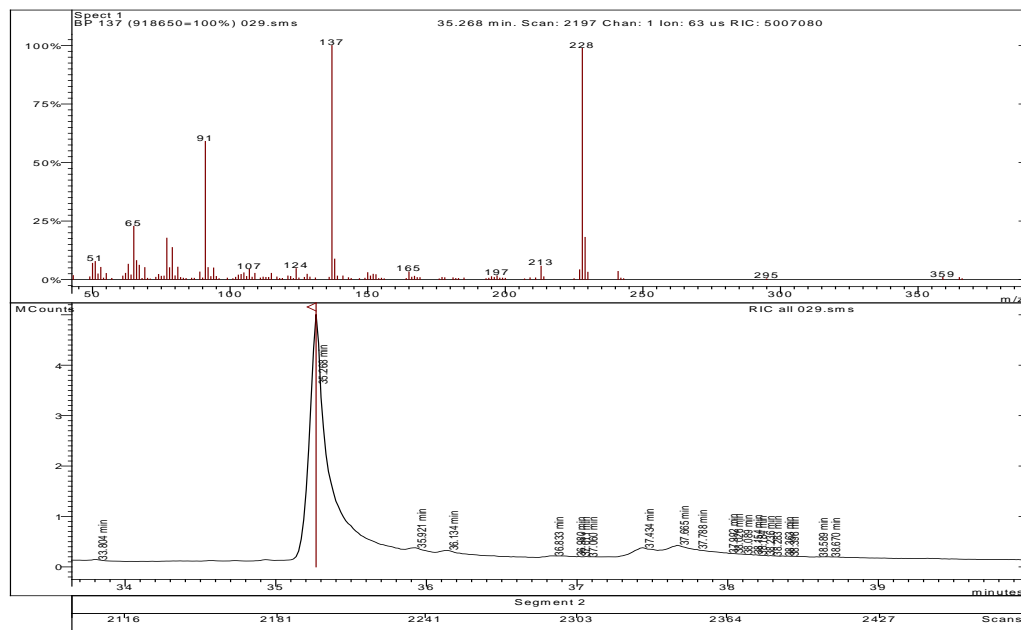
Purity = 667 Fit = 881 RFit = 685 Average = 744 Ion Range = 27 - 309



17 Ácido resínico (28.70 min)

Chromatogram Plot

File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\lety\lety'cg\029.sms
 Sample: Operator: maya
 Scan Range: 1 - 3120 Time Range: 0.00 - 49.98 min. Date: 29/09/2005 9:10

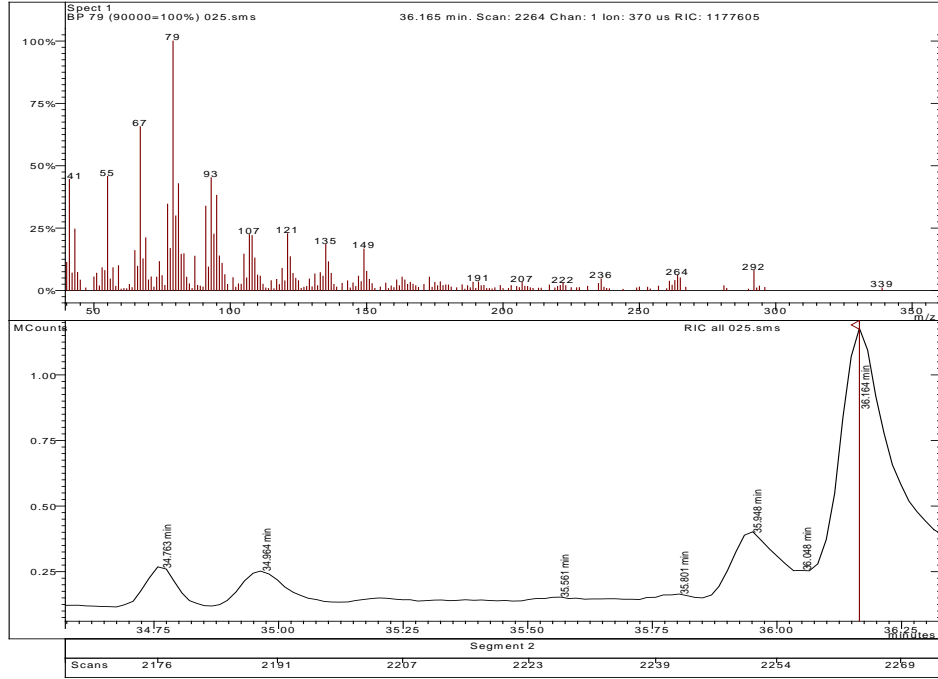


Ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1.alfa.,4a.beta.,10a.alfa.)]-1-fenantrencarboxílico

18 Ácido graso (30.20)

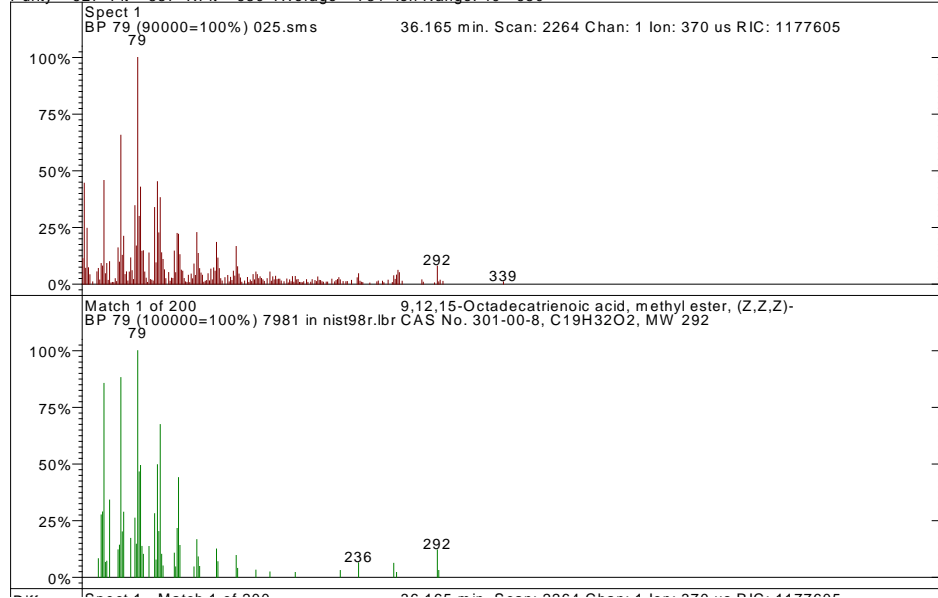
Chromatogram Plot

File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\025.sms
Sample: Operator: maya
Scan Range: 1 - 2998 Time Range: 0.00 - 47.98 min. Date: 28/09/2005 12:56



Scan 2264 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\025.sms
Entry 7981 from nist98r.lbr Saturn Library

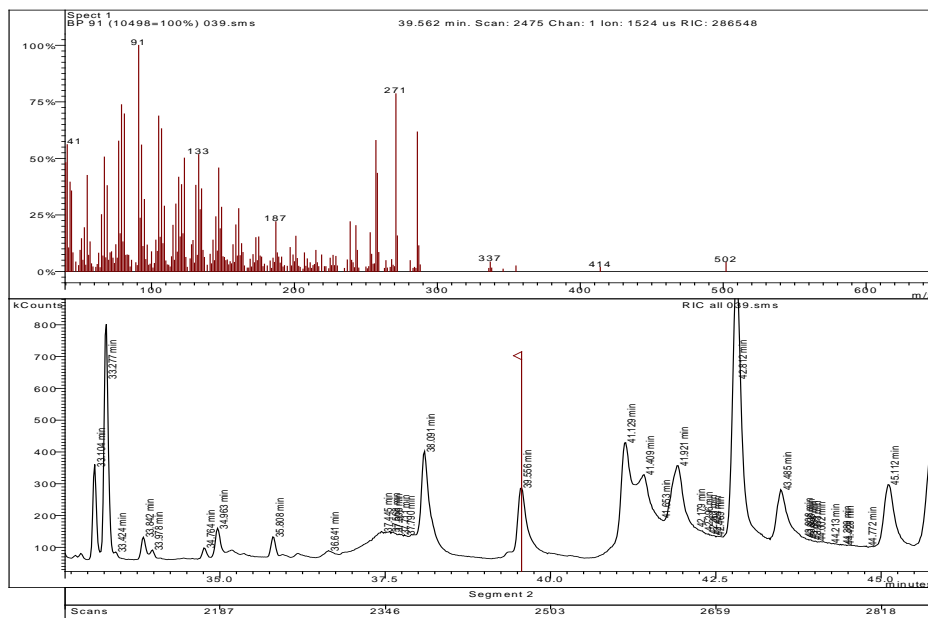
Purity = 627 Fit = 887 RFit = 680 Average = 731 Ion Range: 40 - 650



19 Isómero de ácido resínico (30.50 min)

Chromatogram Plot

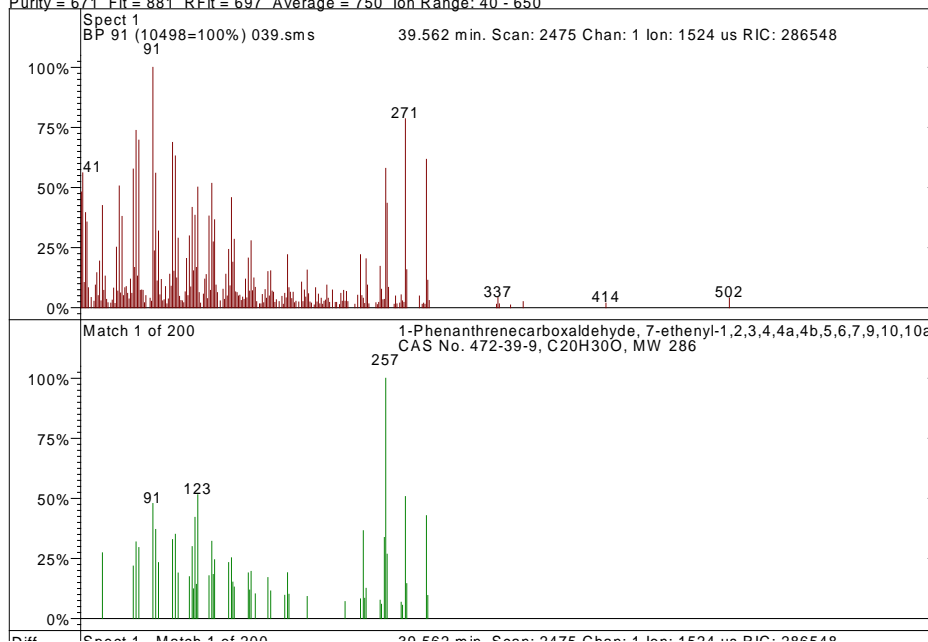
File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\lety\lety\cg\039.sms
 Sample: Operator: maya
 Scan Range: 1 - 3134 Time Range: 0.00 - 49.97 min. Date: 04/10/2005 10:52



Scan 2475 from c:\... \escritorio\busquedas maya\lety\lety\cg\039.sms

Entry 94154 from nist98m.lbr Saturn Library

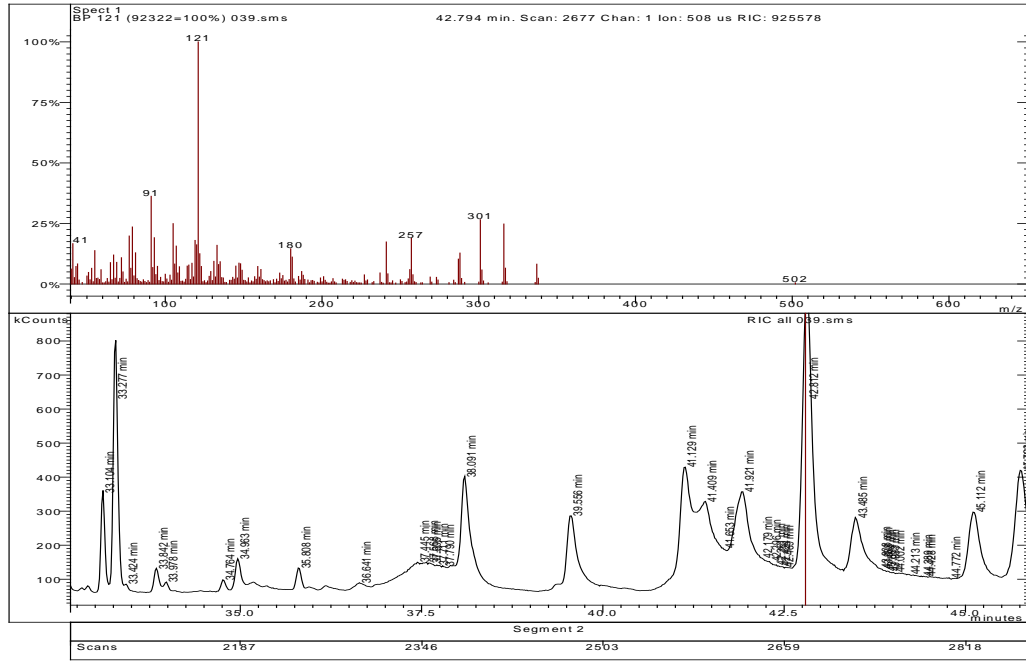
Purity = 671 Fit = 881 RFit = 697 Average = 750 Ion Range: 40 - 650



20 Isómero de ácido resínico (30.80 min)

Chromatogram Plot

File: c:\... \mis documentos\escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\039.sms
 Sample: Operator: maya
 Scan Range: 1 - 3134 Time Range: 0.00 - 49.97 min. Date: 04/10/2005 10:52



Scan 2677 from c:\... \escritorio\busquedas maya\letty\lety\cg\039.sms
 Entry 55258 from nist98m.lbr Saturn Library

Purity = 772 Fit = 966 Rfit = 782 Average = 840 Ion Range: 40 - 650

