

NIVELES Y PATRONES DE VARIACIÓN QUÍMICA EN RESINAS DE LAS HOJAS DEL GÉNERO *Abies* DEL NORTE DE MÉXICO

LEVELS AND PATTERNS OF CHEMICAL VARIATION IN LEAF RESINS OF THE GENUS *Abies* FROM NORTHERN MÉXICO

Yolanda Nava-Cruz, Francisco J. Espinosa-García y Glenn R. Furnier-Whitelaw

Centro de Investigaciones en Ecosistemas. Universidad Nacional Autónoma de México. Campus Morelia. Antigua carretera a Pátzcuaro Núm. 8701. Colonia Ex-Hacienda de San José de la Huerta. 58190. Morelia, Michoacán. (espinosa@ate.oikos.unam.mx)

RESUMEN

El género *Abies* se caracteriza por dificultades en su taxonomía, pues la hibridación interespecífica es frecuente y presenta alta variación morfológica intraespecífica. Así, las propuestas para clasificar a las especies de *Abies* son discordantes. En este estudio se analizó por cromatografía de gases la composición de la fracción volátil de las resinas foliares de 11 poblaciones de cuatro especies de *Abies* del norte de México (dos *A. concolor*, tres *A. durangensis*, dos *A. coahuilensis* y cuatro *A. vejari*), para explorar las relaciones filogenéticas y los niveles de diferenciación entre especies y poblaciones. Los análisis multivariados y fenéticos revelan poca diferenciación entre especies. Además, ningún resultado coincide con los esquemas taxonómicos actuales. Se encontró mucha variación entre poblaciones dentro de los taxa (39.42%) y poca entre éstos (1.69%), corroborándose la inconsistencia en la definición de las especies y variedades propuestas para el norte de México. Estos resultados sugieren que las poblaciones de *Abies* analizadas posiblemente forman parte de variedades en proceso de diferenciación que se originaron de las migraciones al sur de *Abies concolor*, o que dichas poblaciones se diferenciaron entre ellas, pero un contacto genético posterior favoreció su homogeneización.

Palabras clave: *Abies coahuilensis*, *Abies concolor*, *Abies durangensis*, *Abies vejari*, quimiotaxonomía, terpenoides.

INTRODUCCIÓN

El género *Abies* Miller (Pinaceae, Coniferophyta) cuenta con cerca de 40 especies distribuidas principalmente en zonas boreales o subalpinas (Liu, 1971). Taxonómicamente el género *Abies* presenta serias dificultades, pues con frecuencia se encuentran formas intermedias de especies bien diferenciadas entre sí en las zonas donde coinciden (Cope, 1983). Aparentemente, la polinización cruzada entre las poblaciones de *Abies* puede ser uno de los factores más importantes que causa dificultades en la delimitación taxonómica entre especies (Hunt y von Rudloff, 1974, 1979).

Recibido: Noviembre, 2004. Aprobado: Noviembre, 2005.
Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 40: 229-238. 2006.

ABSTRACT

Frequent interspecific hybridization of the genus *Abies* poses difficulties in its taxonomic classification causing broad morphological intraspecific variation. Thus, the proposals for classifying species of *Abies* are discordant. In this study the composition of the volatile fraction of leaf resins of 11 populations of four species of *Abies* of northern México (two *A. concolor*, three *A. durangensis*, two *A. coahuilensis* and four *A. vejari*) was analyzed by gas chromatography to explore the Phylogenetic relationships and levels of differentiation among Species and populations. The multivariate and phenetic analyses reveal little differentiation among species. Also, none of the results coincide with present taxonomic schemes. Broad variation was found among populations within the taxa (39.42%) and little among these (1.69%). This corroborates inconsistency in the definition of the species and varieties proposed for northern Mexico. These results suggest that the populations of *Abies* analyzed possibly form part of varieties that are undergoing a process of differentiation that originated from southern migrations of *Abies concolor*, or that these populations differentiated among themselves, but later genetic contact favored homogenization.

Key words: *Abies coahuilensis*, *Abies concolor*, *Abies durangensis*, *Abies vejari*, chemiotaxonomy, terpenoids.

INTRODUCTION

The genus *Abies* Miller (Pinaceae, Coniferophyta) comprises nearly 40 species distributed mainly in northern or subalpine areas (Liu, 1971). Taxonomically, the genus *Abies* poses serious problems since often intermediate forms of well differentiated species are found in zones where they coincide (Cope, 1983). Apparently, cross-pollination among the populations of *Abies* may be one of the most important factors that cause difficulties in taxonomic delimitation among the species (Hunt and von Rudloff, 1974, 1979).

Because of the heterogeneity of its orography and climates, México is a center of diversity of this genus (Martínez, 1948, 1953). Mexican *Abies* emigrated from

México, por su heterogeneidad orográfica y climática, es un centro de diversidad de este género (Martínez, 1948, 1953). Los *Abies* mexicanos emigraron desde lo que hoy es Estados Unidos y aparentemente hubo varios eventos de migración con las glaciaciones recurrentes desde hace 60 millones de años (Rzedowski, 1978). Las especies de *Abies* del norte del país están distribuidas principalmente en las Sierra Madre Oriental y Occidental y pudieron haber experimentado flujo génico entre sí durante las glaciaciones.

Según Martínez (1948) en México existen ocho especies, seis de ellas endémicas, y cinco variedades; para el norte del país propuso cuatro especies (*A. durangensis* Martínez, *A. mexicana* Martínez, *A. concolor* (Gordon) Lindley, y *A. vejari* Martínez) y dos variedades (*A. durangensis* var. *coahuilensis* (Johnston) Martínez y *A. vejari* var. *macrocarpa* Martínez). Liu (1971) sólo reconoció a tres especies de Martínez y redujo a *A. mexicana* como *A. vejari* var. *mexicana* (Martínez) Liu, porque afirma que las diferencias morfológicas no ameritan el estatus de especie. Liu también eliminó *A. vejari* var. *macrocarpa* pues no le fue posible distinguirla de *A. vejari* var. *vejari* ni de *A. vejari* var. *mexicana*. Debreczy (1994) describió una nueva especie (*A. neodurangensis* Debreczy) del norte del país y notificó por primera vez la existencia en México de *A. concolor* var. *lowiana* (Gord.) Lemm; sin embargo, la validez de esta variedad ya había sido cuestionada por Farjon y Rushforth (1989) en referencia a reportes previos.

Rushforth (1987) situó *A. coahuilensis* como una especie diferente de *A. durangensis*, pero después se redujo al estatus de variedad como en la propuesta de Martínez (Farjon y Rushforth, 1989). Todos estos cambios y controversias reflejan la inestabilidad de la taxonomía del género para el norte de México.

Además de que la taxonomía de los *Abies* del norte de México aún no está resuelta, tampoco hay suficiente evidencia para esclarecer la relaciones filogenéticas de estas especies. Martínez (1948) propuso que todas las especies mexicanas de *Abies* son descendientes de *A. concolor*, aunque no especificó claramente las razones para su suposición. Para Liu (1971), las especies del norte de México se encuentran en dos secciones del género: Secc. Grandes que incluye *A. durangensis* var. *durangensis*, *A. durangensis* var. *coahuilensis*, *A. concolor* var. *concolor*, y *A. concolor* var. *lowiana*; y Secc. Vejariana, que incluye *A. vejari* var. *vejari* y *A. vejari* var. *mexicana*. Esto implica que la hipótesis del origen monofilético de las especies mexicanas de Martínez es válida, o que las secciones de Liu son artificiales.

Las hipótesis actuales relacionadas con la taxonomía de los abetos mexicanos están basadas principalmente en características morfológicas así como en muestras poblacionales con muy pocos individuos. Por eso es

what is today the United States and, apparently, there were several migratory events with the recurrent glaciations 60 million years ago (Rzedowski, 1978). The species of *Abies* in the northern part of the country are distributed mainly in the eastern and western Sierra Madre ranges and may have experienced genetic flow among themselves during the glaciations.

According to Martínez (1948), there are eight species in México, six of them endemic, and five varieties. For the northern part of the country, he proposed four species (*A. durangensis* Martínez, *A. mexicana* Martínez, *A. concolor* (Gordon) Lindley, and *A. vejari* Martínez) and two varieties (*A. durangensis* var. *coahuilensis* (Johnston) Martínez and *A. vejari* var. *macrocarpa* Martínez). Liu (1971) recognized only three of Martínez' species and reduced *A. mexicana* to *A. vejari* var. *mexicana* (Martínez) Liu, because he claimed that the morphological differences did not merit the status of species. Liu also eliminated *A. vejari* var. *macrocarpa* since he was not able to distinguish it from *A. vejari* var. *vejari* or from *A. vejari* var. *mexicana*. Debreczy (1994) described a new species (*A. neodurangensis* Debreczy) in the northern part of the country and notified for the first time of the existence in México of *A. concolor* var. *lowiana* (Gord.) Lemm. However, the validity of this variety had been questioned by Farjon and Rushforth (1989) in reference to previous reports.

Rushforth (1987) situated *A. coahuilensis* as a species different from *A. durangensis*, but later reduced its status to variety as in the proposal of Martínez (Farjon and Rushforth, 1989). All of these changes and controversies reflect instability in the taxonomy of the genus for northern México.

Added to the still unsolved taxonomy of *Abies* of northern México, there is not sufficient information to clarify the phylogenetic relationships of these species. Martínez (1948) proposed that all of the Mexican *Abies* species are descendants of *A. concolor*, although he did not clearly specify the reasons for his assumption. For Liu (1971), the species of northern México are found in two sections of the genus: Sec. Grandes that includes *A. durangensis* var. *durangensis*, *A. durangensis* var. *coahuilensis*, *A. concolor* var. *concolor*, and *A. concolor* var. *lowiana*; and Sec. Vejariana, which includes *A. vejari* var. *vejari* and *A. vejari* var. *mexicana*. This implies that the hypothesis of monophyletic origin of the Mexican species of Martínez is valid, or rather that the sections of Liu are artificial.

Present hypotheses related to taxonomy of Mexican firs are based principally on morphological traits as well as on population samples with very few individuals. For this reason it is necessary to use other tools that allow clarification of phylogenetic patterns among the populations with very large sample sizes. The estimates

necesario usar otras herramientas que permitan esclarecer los patrones filogenéticos entre sus poblaciones con tamaños de muestras más grandes. Las estimaciones de niveles y patrones de variación así obtenidos serían muy útiles en el diseño de programas de aprovechamiento y conservación de los bosques de *Abies*, partiendo de la suposición de que a menor diversidad entre las poblaciones, el número de las áreas destinadas a la conservación del género será también reducido. En el caso particular de los *Abies* es necesario diseñar programas de aprovechamiento y conservación, dado que la presión sobre los bosques mexicanos aumenta, debido a que se utilizan como leña, madera, ornato y que el bosque se elimina principalmente para realizar actividades agropecuarias.

Dada la falta de una filogenia confiable para los *Abies* mexicanos y dado el tamaño del grupo, este estudio está enfocado en las especies del norte de México; aunque las poblaciones del sur del país se evaluaron en otra parte de un proyecto más amplio (Niveles y patrones de variación genética en el género *Abies* de México). Esto se justifica porque las poblaciones de *Abies* del norte y sur de México difieren isoenzimáticamente y se sitúan en dos grupos bien definidos en un árbol fenético (Furnier *et al.*, 1996a).

En este estudio se usó la incidencia de terpenoides foliares como herramienta para estimar los niveles y patrones de variación encontrados en 11 poblaciones de *Abies* del norte del país; además, las resinas foliares de las especies del género *Abies* son ricas en terpenoides. La composición terpénica es una herramienta útil, confiable y frecuentemente usada para este tipo de estudios (Schiller y Genizi, 1993; Savage *et al.*, 1994; Roussis *et al.*, 2000; Bagci y Babac, 2003). Los terpenoides son marcadores taxonómicos muy útiles para plantas actuales y fósiles, que tienen gran concordancia con marcadores moleculares y morfológicos (Otto y Wilde, 2001; Adams *et al.* 2003; Otto *et al.* 2003; Hillig, 2004).

En adelante se mencionará *A. coahuilensis* como una especie como propone Rushforth (1987), y no como una variedad de *A. durangensis*, con el fin de tratarla bajo el mismo esquema en los análisis estadísticos, y que el posible parentesco encontrado derive efectivamente de las características compartidas, sin juicios de valor *a priori*.

MATERIALES Y MÉTODOS

De junio a agosto de 1995 se recolectaron hojas maduras y sin señales aparentes de herbivoría o daño por patógenos para evitar cambios ontogenéticos en el perfil de terpenoides o la posibilidad de inducción por los enemigos naturales de los árboles (Karban y Baldwin, 1997; Langenheim, 2003). Se tomaron hojas (ca. 1 g peso seco por árbol) de un promedio de 20 árboles en cada una de las 11 poblaciones de *Abies*. Las hojas de cada árbol se mantuvieron en un frasco con

of levels and patterns of variation obtained in this way would be very useful in the design of programs of use and conservation of *Abies* forests, parting from the assumption that the less the diversity among populations, the more reduced the number of areas destined to the conservation of the genus. In the particular case of *Abies*, it is necessary to design programs of use and conservation, given that the pressure on the Mexican forests increases because they are used for firewood, lumber, and as an ornamental, and because forests are eliminated mainly for agriculture and livestock.

Given the lack of reliable phylogeny and given the size of the group, this study is focused on the species of northern México, although the populations of the south were evaluated in another part of a broader project (Levels and patterns of genetic variation of the *Abies* genus of México). This is justified because the populations of *Abies* of northern and southern México differ isoenzymatically and are situated in two well-defined groups on a phenetic tree (Furnier *et al.*, 1996a).

In this study the incidence of leaf terpenoids was used as a tool to estimate the levels and patterns of variation found in 11 populations of *Abies* of the northern part of the country. Also, the leaf resins of the species of the genus *Abies* are rich in terpenoids. The terpenic composition is a useful tool, reliable and often used for this type of study (Schiller and Genizi, 1993; Savage *et al.*, 1994; Roussis *et al.*, 2000; Bagci and Babac, 2003). Terpenoids are taxonomic markers that are very useful for both existing plants and fossils and coincide greatly with molecular and morphological markers (Otto and Wilde, 2001; Adams *et al.*, 2003; Otto *et al.*, 2003; Hillig, 2004).

Below, *A. coahuilensis* will be mentioned as a species that Rushforth (1987) proposes, and not as a variety of *A. durangensis*, with aim of treating it under the same scheme in the statistical analysis, and so that any relationship that might be found derive effectively from shared traits, without *a priori* judgment.

MATERIALS AND METHODS

From June to August 1995 mature leaves with no apparent damage from herbivores or pathogens were collected to avoid any ontogenic changes in the profile of terpenoids or the possibility of induction by the trees' natural enemies (Karban and Baldwin, 1997; Langenheim, 2003). Leaves (ca 1 g dry weight per tree) were taken from an average of 20 trees of each of the 11 populations of *Abies*. The leaves from each tree were kept in a container with hexane at 4 °C until processing. The collection sites of the populations are those indicated by Martínez (1948): *A. concolor* in San Pedro Mártir, Baja California (30° 58.9' N, 115° 34' W; 2300 m) and Pinos Altos, Chihuahua (28° 15.339' N, 108° 18.108' W; 2370 m); *A. durangensis* in Pinos Altos (28° 15.2' N, 108° 18.76' W; 2130 m), Creel (27° 42.65' N, 107° 37.114' W; 2430 m)

hexano a 4 °C hasta su procesamiento. Las localidades de recolección de las poblaciones de las especies corresponden a las indicadas por Martínez (1948): *A. concolor* en sierra San Pedro Mártir, Baja California (30° 58.91' N, 115° 34' O; 2300 m) y Pinos Altos, Chihuahua (28° 15.339' N, 108° 18.108' O; 2370 m); *A. durangensis* en Pinos Altos (28° 15.2' N, 108° 18.76' O; 2130 m), Creel (27° 42.65' N, 107° 37.114' O; 2430 m) y Cerro Las Iglesias, Chihuahua (26° 16.33' N, 106° 36.398' O; 3030 m); *A. durangensis* var. *coahuilensis* en Sierra Madera (27° 6.585' N, 102° 30.608' O; 2280 m) y Sierra La Encantada, Coahuila (28° 27.59' N, 102° 2.951' O; 1710 m); y *A. vejari* en Jame (25° 19.98' N, 100° 33.53' O; 2850 m), Mesa de Las Tablas (25° 12.74' N, 100° 23.636' O; 2880 m), Los Lirios, Coahuila (25° 26.90' N, 100° 32.834' O; 2700 m) y Sierra Potosí, Nuevo León (24° 55.05' N, 100° 12.653' O; 2100 m).

Para cada muestra se molieron las hojas con un mortero y arena inerte con 50 mL de hexano adicionado con 1 mg de linalool como estándar interno. El hexano recuperado y filtrado se concentró bajo una corriente suave de nitrógeno hasta un volumen de 0.1 mL, del cual se inyectó 1 µL en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 4010, con columna (5%-fenil)-metilpolisiloxano (DB5-30W, J & W Scientific), 30 m longitud por 1 mm diámetro interno, con detector de ionización de flama, inyección dividida (50:1), y helio a 0.786 m seg⁻¹; inyector 220 °C, y detector 350 °C. El programa de corrida se inició con horno a 40 °C por 3 min, incremento de 15 °C min⁻¹ hasta 280 °C, que se mantuvo 5 min, incremento de 30 °C min⁻¹ hasta 300 °C que se mantuvo 3 min.

Análisis de datos

Se obtuvo una matriz de 220 individuos por la abundancia relativa de 108 picos cromatográficos para realizar un análisis de componentes principales (Kendall, 1980; Pla, 1986).

Las relaciones entre poblaciones se examinaron mediante un análisis fenético y un análisis cladístico. Para el primero, se obtuvo una matriz de distancias euclidianas entre cada par de poblaciones a partir de los promedios de cada compuesto en cada población, y se usó el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) para agrupar las poblaciones. Para el análisis cladístico se construyó una matriz de presencia-ausencia de cada compuesto en cada población, considerando un compuesto como presente si estaba en más de 25% de los individuos de la población y se realizó un análisis de parsimonia (Forey *et al.*, 1992), con una búsqueda heurística, obteniendo los cuatro árboles fenéticos más parsimoniosos con el programa PAUP (Swofford, 1989).

La estimación de los componentes y las magnitudes de variación entre los taxa, entre poblaciones dentro de los taxa y dentro de poblaciones, se hizo utilizando un ANDEVA anidado. Para este análisis se consideró *A. concolor*, *A. durangensis*, *A. vejari* y *A. coahuilensis* (Rushforth, 1987) como especies.

Se realizó un ANDEVA anidado para cada compuesto, incluyendo los 220 individuos, para estimar las fuentes de variación entre especies, entre poblaciones dentro de especies y el error (Meffe y Carroll, 1994), que corresponde a la varianza entre los individuos dentro de las poblaciones.

and Cerro las Iglesias, Chihuahua (26° 16.33' N, 106° 36.398' W; 3030 m); *A. durangensis* var. *coahuilensis* in Sierra Madera (27° 6.585' N, 102° 30.608' W; 2280 m) and Sierra La Encantada, Coahuila (28° 27.59' N, 102° 2.951' W; 1710 m); and *A. vejari* in Jame (25° 19.98' N, 100° 33.53' W; 2850 m), Mesa de Las Tablas (25° 12.74' N, 100° 23.636' W; 2880 m), Los Lirios, Coahuila (25° 26.90' N, 100° 32.834' W; 2700 m), and Sierra Potosí, Nuevo León (24° 55.05' N, 100° 12.653' W; 2100m).

For each sample the leaves were ground in a mortar with inert sand and 50 mL of hexane with 1 mg of linalool as an internal standard. The hexane recovered and filtered was concentrated under a soft current of nitrogen until it reached a volume of 0.1 mL; of this concentrate, 1 µL was injected into a Perkin Elmer 4010 gas chromatograph with (5%-phenyl)-methylpolisiloxane column (DB5-30W, J&W Scientific) 30 m long by 1 mm internal diameter, with flame ionization detector, divided injection (50:1), and helium at 0.786 m s⁻¹; 220 °C injector, and 350 °C detector. The running program was initiated with the oven at 40 °C for 3 min, with increment of 15 °C min⁻¹ up to 280 °C, which was maintained for 5 min, with increment of 30 °C min⁻¹ up to 300 °C, which was maintained for 3 min.

Data analysis

A matrix of 220 individuals was obtained by the relative abundance of 108 chromatographic peaks to carry out an analysis of principal components (Kendall, 1980; Pla, 1986).

The relationships among populations were examined with phenetic and cladistic analyses. For the former, a matrix was obtained of Euclidian distances between each pair of populations from the averages of each compound in each population, and the algorithm UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) was used to group the populations. For the cladistic analysis, a matrix was constructed of presence-absence of each compound in each population, considering a compound present if it was found in more than 25% of the individuals in the population, and a parsimony analysis (Forey *et al.*, 1992) was performed with a heuristic search, obtaining the four most parsimonious phenetic trees with the PAUP software (Swofford, 1989).

Estimation of the components and the magnitudes of variation among taxa, among population within taxa and within populations was performed using a nested ANOVA. For this analysis, *A. concolor*, *A. durangensis*, *A. vejari* and *A. coahuilensis* (Rushforth, 1987) were considered species.

A nested ANOVA was performed for each compound, including the 220 individuals, to estimate the sources of variation among species, among populations within species and the error (Meffe and Carroll, 1994), which correspond to the variance among individuals within the populations.

RESULTS AND DISCUSSION

In the 18 populations, 108 peaks were detected, but many had minimal concentrations; thus, those with an average below 1% of the total in the 11 populations were eliminated. The percentages of the 38 remaining peaks

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron 108 picos en las 18 poblaciones, pero muchos tenían concentraciones mínimas, por lo que se eliminaron aquellos con promedio menor de 1% del total en las 11 poblaciones. Se recalcularon los porcentajes de los 38 picos restantes en cada individuo. De acuerdo con los tiempos de retención de los compuestos en la columna DB5, muy posiblemente la mayoría eran mono, sesqui o diterpenos (Adams, 1995; Fady *et al.*, 1992; Hanover, 1992).

Hay mucha variación (**Cuadro 1**) entre poblaciones dentro de los taxa (39.42%), pero poca entre éstos

in each individual were recalculated. According to the retention times of the compounds in the DB5 column, very likely most were mono-, sesqui- or diterpenes (Adams, 1995; Fady *et al.*, 1992; Hanover, 1992).

There is great variation (Table 1) among populations within taxa (39.42%), but little among these (1.69%). The main component analysis indicates high variation among individuals and low correlation among the peaks, since the first three main components explained 31.3% of the total variation (12.8%, 10.6% and 7.9%). The *A. concolor* individuals, species proposed as a root group (Martínez, 1948), are found mixed with the other taxa,

Cuadro 1. Variación (V), porcentaje de variación (%) y la p entre especies (esp), entre poblaciones dentro de especies (pob/esp) y dentro de poblaciones (dentro/pob); para el ANDEVA de cada uno de los 38 compuestos. Además, la variación total y los promedios de los % para cada fuente de variación.

Table 1. Variation (V), percent of variation (%), and p among species (esp), among populations within species (pob/esp) and within populations (dentro/pob) for the analysis of variance of each one of the 38 compounds. Also, total variation and averages of % for each source of variation.

Núm. pico	Prom. de tiempos de retención	V(esp)	p (esp)	% esp	V (dentro pob)	p (pob/esp)	%pop/esp.	V(dentro pob)	%dentro pob	V(total)
1	0.1	0.000241	0.8781	-19.98%	0.0005	0.0001	77.41%	0.0005	42.57%	0.0012
5	2.3	-0.00012	0.9946	-13.77%	0.0006	0.0001	44.35%	0.0006	69.42%	0.0009
6	0.4	0.00044	0.1248	20.25%	0.0009	0.0001	38.36%	0.0009	41.39%	0.0022
7	0.0	0.00026	0.1092	10.76%	0.0018	0.0001	15.27%	0.0018	73.97%	0.2418
8	5.0	0.00026	0.1092	10.76%	0.0018	0.0001	15.27%	0.0018	73.97%	0.0024
9	14.0	0.000812	0.0449	17.41%	0.0033	0.0001	12.80%	0.0033	69.79%	0.0047
10	4.1	0.000142	0.3331	2.57%	0.0037	0.0001	30.16%	0.0037	67.26%	0.0055
11	0.7	-0.00013	0.669	-3.10%	0.0037	0.0001	14.13%	0.0037	88.98%	0.0041
16	0.0	0.000105	0.1365	11.51%	0.0006	0.0001	21.82%	0.0006	66.67%	0.0009
17	0.0	-0.00057	0.8814	-21.73%	0.001	0.0001	84.25%	0.001	37.48%	0.0026
21	0.1	-7.09E-05	0.4763	-4.07%	0.0005	0.0001	74.60%	0.0005	29.48%	0.0017
22	0.5	-0.00039	0.8959	-21.13%	0.0008	0.0001	80.11%	0.0008	41.02%	0.0018
25	2.0	0.00015	0.353	3.32%	0.0017	0.0001	58.65%	0.0017	38.03%	0.0045
28	2.2	0.001492	0.058	35.99%	0.0011	0.0001	38.18%	0.0011	25.83%	0.0041
30	0.9	0.000202	0.1777	14.52%	0.0006	0.0001	40.96%	0.0006	44.52%	0.0014
34	1.9	6.80E-07	0.4074	0.03%	0.0018	0.0003	12.59%	0.0018	87.37%	0.0021
36	1.2	5.53E-05	0.0606	14.23%	0.0003	0.0001	12.37%	0.0003	73.39%	0.0004
40	3.8	1.78E-05	0.3963	0.58%	0.0017	0.0001	15.56%	0.0017	53.86%	0.0031
42	3.9	-7.54E-05	0.7388	-6.83%	0.0008	0.0001	30.60%	0.0008	76.23%	0.0011
43	4.6	-9.32E-06	0.4279	-0.44%	0.0016	0.0001	24.19%	0.0016	76.26%	0.0021
46	0.3	3.05E-05	0.3921	1.17%	0.0007	0.0001	72.22%	0.0007	26.62%	0.0026
65	1.6	-0.00062	0.7282	-14.94%	0.0017	0.0001	75.05%	0.0017	39.89%	0.0042
66	2.3	0.001201	0.107	18.85%	0.0033	0.0001	30.10%	0.0033	51.05%	0.0064
68	13.3	-9.83E-06	0.4136	-0.23%	0.0016	0.0001	63.80%	0.0016	36.43%	0.0043
69	0.0	-0.00051	0.7774	-11.80%	0.0026	0.0001	52.07%	0.0026	59.72%	0.0043
70	0.5	0.000473	0.1907	10.68%	0.0025	0.0001	32.20%	0.0025	57.12%	0.0044
73	5.1	-4.57E-05	0.5999	-3.78%	0.001	0.0001	24.79%	0.001	79.00%	0.1206
74	1.3	-8.35E-05	0.8802	-8.26%	0.0008	0.0001	28.80%	0.0008	79.46%	0.001
82	2.8	-0.0001	0.7603	-10.11%	0.0006	0.0001	45.51%	0.0006	64.60%	0.001
89	3.4	-4.63E-05	0.6734	-4.89%	0.0008	0.0001	24.93%	0.0008	79.96%	0.0009
91	0.0	6.30E-05	0.3684	2.93%	0.0005	0.0001	74.19%	0.0005	22.88%	0.0022
93	0.0	-9.54E-06	0.4216	-0.35%	0.0019	0.0001	29.96%	0.0019	70.39%	0.0027
94	11.7	0.000346	0.1479	10.92%	0.0021	0.0001	22.69%	0.0021	66.39%	0.0032
96	0.0	-4.69E-05	0.5225	-3.70%	0.0008	0.0001	40.10%	0.0008	63.60%	0.0013
101	1.9	-5.64E-05	0.5391	-5.25%	0.0006	0.0001	51.96%	0.0006	53.29%	0.0011
102	7.5	2.20E-06	0.405	0.15%	0.001	0.0001	33.72%	0.001	66.13%	0.0015
105	0.0	5.63E-05	0.2659	4.43%	0.0009	0.0001	23.24%	0.0009	72.33%	0.0013
106	1.0	0.000257	0.0671	27.36%	0.0004	0.0001	30.95%	0.0004	42.69%	0.0009
Promedio				1.69%			39.42%		58.13%	

(1.69%). El análisis por componentes principales indica alta variación entre los individuos y correlación baja entre los picos, pues los primeros tres componentes principales explicaron 31.3% de la variación total (12.8%, 10.6% y 7.9%). Los individuos de *A. concolor*, especie propuesta como grupo raíz (Martínez, 1948), se encuentran entremezclados con los de los otros taxa, excepto con el grupo de la mayoría de individuos de *A. coahuilensis* (Figura 1).

Algunos patrones se repiten en los diferentes análisis utilizados (Figura 1, 2 y 3). Por ejemplo, los individuos de las poblaciones V27 y V28 así como DC24, DC25, V27 y C32 en todos los análisis se conservan juntos, salvo la población C32 que en el árbol fenético se observa junto al grupo de V28 y V29 (Figura 2).

Si bien los resultados muestran patrones, aparentemente en ninguna de las figuras hay alguno que corresponda a la taxonomía actual. Así, en el caso de los árboles fenético y cladísticos, las poblaciones de *A. vejari* no se mantienen juntas, pues la V27 se sitúa en otras ramas junto a *A. concolor* y *A. coahuilensis*, mientras que V30

except with the group of the majority of *A. coahuilensis* individuals (Figure 1).

Some patterns are repeated in the different analyses used (Figures 1, 2 and 3). For example, the individuals of populations V27 and V28, as well as DC24, DC25, V27 and C32 remain together in all of the analyses, except for population C32, which is observed next to the group of V28 and V29 on the phenetic tree (Figure 2).

Although the results show patterns, there is none, apparently, that corresponds to present taxonomy in any of the figures. Thus, in the case of phenetic and cladistic trees, the *A. vejari* populations are not together; V27 is located on other branches with *A. concolor* and *A. coahuilensis*, while V30 from Cerro Potosí in the Eastern Sierra Madre always groups with populations from western México and not with those of the east as was expected (Figures 2 and 3). *A. coahuilensis* is also found with *A. vejari* (V27) and *A. concolor*, but not with *A. durangensis* var. *durangensis*, to which it should be more related, according to Martínez (1948), Liu (1971) and Farjon and Rushforth (1989).

The results of leaf terpenoid analyses on *Abies* of northern México indicate that no present taxonomic scheme is suitable for clearly delimiting the species and varieties of this group. Terpenes have been very useful as taxonomic tools in *Abies* and other conifers (Roussis *et al.*, 2000; Adams, 2000; Adams *et al.*, 2003; Bagci and Babac, 2003) because of its high heritability (White

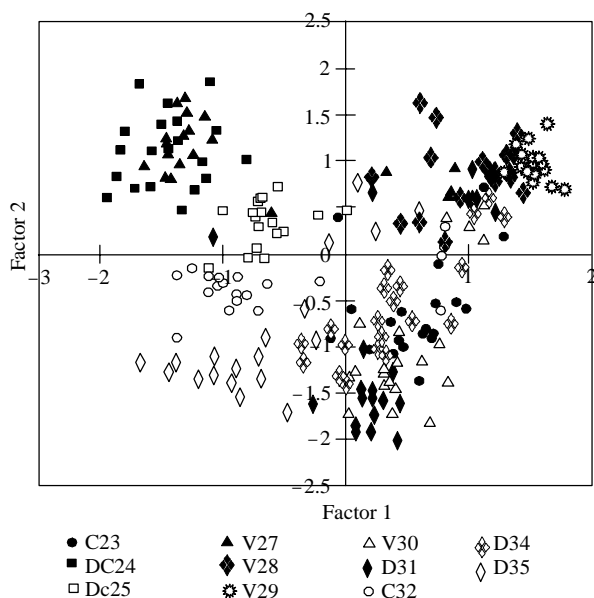


Figura 1. Gráfica de los primeros dos componentes principales que representan 12.8% y 10.6% de la variación química en las resinas de las hojas de 20 individuos por cada una de las 11 poblaciones de *Abies* del norte de México (C=*A. concolor*, D=*A. durangensis*, DC=*A. coahuilensis*, V=*A. vejari*). La escala representa la desviación del promedio medida en unidades de desviación estándar en cada eje.

Figure 1. Graph of the first two principal components that represent 12.8% and 10.6% of the chemical variation in the leaf resins of 20 individuals for each of the 11 *Abies* populations of northern México (C=*A. concolor*, D=*A. durangensis*, DC=*A. coahuilensis*, V=*A. vejari*). The scale represents deviation from the average, measured in units of standard deviation in each axis.

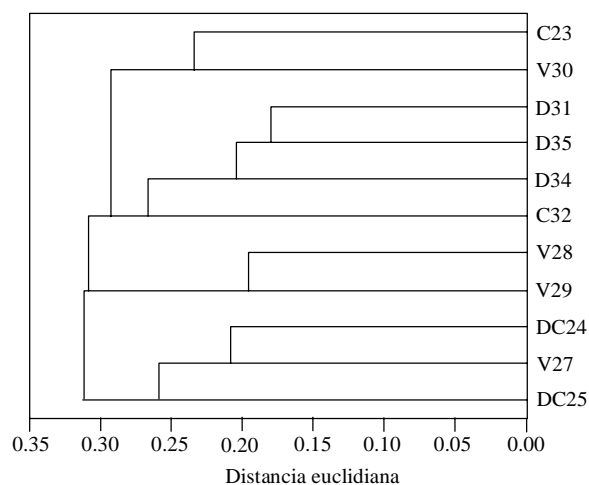


Figura 2. Árbol fenético de 11 poblaciones de los *Abies* del norte de México (C = *A. concolor*, D = *A. durangensis*, DC = *A. durangensis* var. *coahuilensis*, V = *A. vejari*), hecho por el algoritmo UPGMA basado en las distancias euclidianas entre poblaciones.

Figure 2. Phenetic tree of 11 populations of *Abies* of northern México (C=*A. concolor*, D=*A. durangensis*, DC=*A. coahuilensis*, V=*A. vejari*), constructed with the UPGMA algorithm based on the Euclidian distances between populations.

de Cerro Potosí en la Sierra Madre Oriental, siempre se agrupa con las poblaciones del oeste de México y no con las del este como se esperaba (Figuras 2 y 3). *A. coahuilensis* también se encuentra junto con *A. vejari* (V27) y *A. concolor*, pero no con *A. durangensis* var. *durangensis* con la cual, según Martínez (1948), Liu (1971) y Farjon y Rushforth (1989), estaría más emparentada.

Los resultados de los análisis de terpenoides foliares de los *Abies* del norte de México indican que ningún esquema taxonómico actual es adecuado para delimitar claramente las especies y variedades de este grupo. Los terpenos han sido muy útiles como herramienta taxonómica en *Abies* y otras coníferas (Roussis *et al.*, 2000; Adams, 2000; Adams *et al.* 2003; Bagci y Babac, 2003) por su alta heredabilidad (White y Nilsson, 1984; Kossuth y Barnard, 1983; Sabor y Skrzyszewska, 2002). El uso de terpenoides como herramienta taxonómica ha ayudado a delimitar especies de *Abies* y sus híbridos que antes habían sido clasificados como taxa diferentes por su morfología (Hunt y von Rudloff, 1979). En las especies del género *Abies* es frecuente una alta variación intraespecífica e hibridación interespecífica (Cope, 1983; Liu, 1971). Por ejemplo, *Abies concolor* puede hibridarse con *A. religiosa* y producir semilla fértil (St. Clair y Critchfield, 1988), a pesar de que estas especies han sido clasificadas en secciones diferentes y que están distantes geográficamente.

La hibridación podría explicar que la población de *A. coahuilensis* que coexiste en la Sierra Madre Oriental con *A. vejari* fuera clasificada cerca de esta especie en lugar de cerca de *A. duranguensis*, ya que *A. coahuilensis* es considerada una variedad de *A. duranguensis* por Farjon y Rushforth (1989).

La relación entre algunas poblaciones estudiadas se conserva en los diferentes análisis estadísticos, como el grupo estable de dos poblaciones geográficamente muy cercanas de *A. vejari* (V28 y V29). Sin embargo, existen otras cuyo comportamiento no es tan consistente, como V27, geográficamente ubicada entre las otras poblaciones, pero clasificada más cercanamente con una población de *A. concolor*. La población 30 de *A. vejari*, situada en la Sierra Madre Oriental, se encuentra relacionada con alguna de las poblaciones del occidente. La falta de coherencia entre las afinidades de las poblaciones de esta especie sugiere que *A. vejari* requiere una nueva delimitación taxonómica o que la morfología como carácter taxonómico no es suficiente para esta especie.

El hecho de que las relaciones filogenéticas inferidas de los análisis no corresponden a la taxonomía actual puede deberse a varios factores. Una posible explicación es que la taxonomía actual basada en muestras con pocos individuos no refleja bien la identidad de cada población. Otra posibilidad es que los caracteres

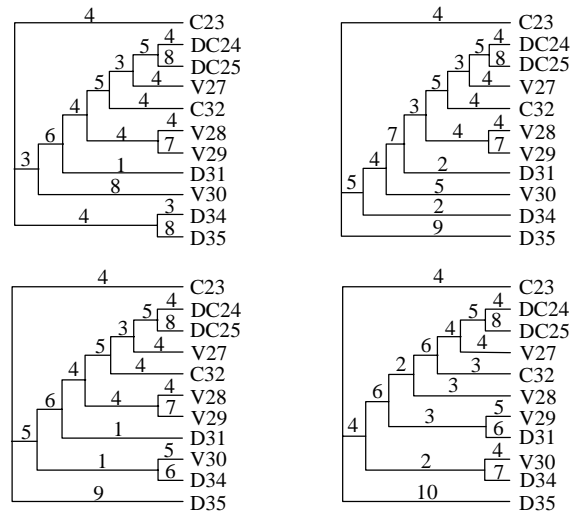


Figura 3. Los cuatro árboles filogenéticos más parsimoniosos de 11 poblaciones de los *Abies* del norte de México (C = *A. concolor*, D = *A. durangensis*, DC = *A. durangensis* var. *coahuilensis*, V = *A. vejari*), basados en la presencia o ausencia de compuestos químicos en las resinas de las hojas. Los árboles son sin raíz y requirieron 89 pasos para obtener la solución más parsimoniosa. Los números representan las longitudes de las ramas.

Figure 3. The four most parsimonious phylogenetic trees of 11 *Abies* populations of northern México (C = *A. concolor*, D = *A. durangensis*, DC = *A. durangensis* var. *coahuilensis*, V = *A. vejari*), based on the presence or absence of chemical compounds in leaf resins. The trees do not have root and require 89 steps to obtain the most parsimonious solution. Numbers represent branch length.

and Nilsson, 1984; Kossuth and Bernard, 1983; Sabor and Skrzyszewska, 2002). The use of terpenoids as a taxonomic tool has helped to delimit species of *Abies* and its hybrids, which had before been classified, by morphology, as different taxa (Hunt and von Rudloff, 1979). In the species of the genus *Abies*, high intraspecific variation and interspecific hybridization are frequent (Cope, 1983; Liu, 1971). For example, *Abies concolor* can hybridize with *A. religiosa* and produce fertile seed (St. Clair and Critchfield, 1988), even though these species have been classified in different sections and are geographically distant.

Hybridization could explain why the *A. coahuilensis* population, which coexists in the eastern Sierra Madre with *A. vejari*, would be classified near this species instead of near *A. durangensis*, since *A. coahuilensis* is considered a variety of *A. durangensis* by Farjon and Rushforth (1989).

The relationship among some populations studied is maintained in the different statistical analyses, such as the stable group of two populations geographically very near *A. vejari* (V28 and V29). There are others, however,

morfológicos no son suficientes para delimitar los taxa del género *Abies*.

El bajo nivel de diferenciación observado entre taxa sugiere otras explicaciones. Una es que los taxa no han estado separados físicamente por muchas generaciones y no han tenido suficiente tiempo para diferenciarse [por ejemplo, los casos de *A. cephalonica* (Fady *et al.*, 1992) y de *A. alba* (Lang, 1994)]. La otra, es que todavía exista flujo génico entre las poblaciones, incluso hibridación interespecífica, como ocurre en otras especies como *A. balsamea* y *A. lasiocarpa* (Parker *et al.*, 1984) y *A. lasiocarpa* y *A. bifolia* (Hunt y von Rudloff, 1979) que está aplazando su diferenciación (Liu, 1971). Hay distancias muy grandes entre algunos grupos de poblaciones que deben limitar el flujo de polen, pero aún eventos ocasionales de flujo génico pueden amortiguar la diferenciación entre los taxa (Hartl y Clark, 1989).

Un buen registro de datos paleobotánicos de los *Abies* del norte de México sería muy útil para estimar el número de generaciones que han pasado desde el último evento de simpatria entre los taxa. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha reportado la presencia de *Abies* en el sur de Veracruz para la mitad del plioceno (hace 7 a 26 millones de años) y se dice que estuvieron en el norte de México desde el cretácico (Rzedowski, 1978). En la glaciación de Wisconsin (hace 12000 años) la cota altitudinal para las especies boreales bajó al menos 1000 m, lo que permitió una mayor oportunidad de contacto genético entre las poblaciones de *Abies* que antes había en México. Una hipótesis sería que entonces hubiera existido un bosque subalpino mucho más continuo que habría permitido más eventos migratorios que la distribución actual. El periodo desde el fin del pleistoceno no representa tantas generaciones en las especies de *Abies* y puede ser que, desde entonces, no haya habido suficiente tiempo para lograr una gran diferenciación entre las especies descritas en sus perfiles químicos, mientras que la selección ha actuado más fuertemente para diferenciar las poblaciones morfológica y fenológicamente.

Un análisis isoenzimático de las mismas poblaciones usadas en el presente estudio muestra resultados muy parecidos: falta de diferenciación entre especies, diferenciación significativa entre poblaciones y falta de concordancia con la taxonomía actual (Aguirre-Planter *et al.*, 2000; Furnier *et al.*, 1996a; Furnier *et al.*, 1996b, Furnier *et al.*, 1996c). Esto corrobora nuestros resultados que sugieren contacto genético reciente entre los taxa.

El problema básico en la genética de la conservación es que las pequeñas poblaciones naturales o manejadas (como algunas poblaciones de *Abies* en peligro de extinción) tienden a perder con facilidad variación genética, que se traduce en un decremento de la habilidad potencial de los individuos para responder a los cambios ambientales. Esta pérdida de variación puede incrementar

whose behavior is not so consistent, such as V27, geographically located among other populations, but classified more closely to a population of *A. concolor*. Population 30 of *A. vejari*, located in the Western Sierra Madre, is found related to one of the western populations. The lack of coherence among the affinities of the populations of this species suggests that *A. vejari* requires a new taxonomic delimitation or that morphology as a taxonomic trait is not sufficient for this species.

The fact that the phylogenetic relationships inferred from the analyses do not correspond to present taxonomy may be due to several factors. One possible explanation is that present taxonomy based on samples of few individuals does not well reflect the identity of each population. Another possibility is that the morphological traits are not sufficient to delimit the taxa of the genus *Abies*.

The low level of differentiation observed among taxa suggests other explanations. One is that the taxa have not been separated physically for many generations and have not had sufficient time for differentiation [for example, the cases of *A. cephalonica* (Fady *et al.*, 1992) and *A. alba* (Lang, 1994)]. The other is that there still exists genic flow among populations, including interspecific hybridization as occurs in other species such as *A. balsamea* and *A. lasiocarpa* (Parker *et al.*, 1984) and *A. lasiocarpa* and *A. bifolia* (Hunt and von Rudloff, 1979) which is delaying its differentiation (Liu, 1972). There are very long distances among groups of populations that should restrict the flow of pollen, but even occasional events of genic flow can buffer differentiation among taxa (Hartl and Clark, 1989).

A good record of paleobotanical data of *Abies* of northern México would be very useful to estimate the number of generations that have passed since the last sympatric event among the taxa. Until now, however, the presence of *Abies* has been reported only in southern Veracruz by mid-Pliocene (7 to 26 million years ago), and it is said that they were in northern México by the Cretaceous Period (Rzedowski, 1978). During the glaciations in Wisconsin (12 000 years ago) the altitudinal limit for northern species lowered by at least 1000 m; this gave more opportunity for genetic contact among the *Abies* populations that existed previously in México. One hypothesis would be that at that time there was a much more continuous subalpine forest that would have permitted more migratory events than the present distribution. The period from the end of the Pleistocene did not cover so many generations of *Abies* species and it may be that since then there may not have been sufficient time to achieve great differentiation among the species described in their chemical profiles, while selection has acted more strongly in differentiating populations morphologically and phenologically.

la probabilidad de la extinción o la reducción de oportunidades a futuras adaptaciones a través de cambios evolutivos. Así mismo, la fragmentación y destrucción continua de hábitats naturales da como resultado pequeñas poblaciones de plantas y animales aisladas entre sí, cuyo futuro deviene en una situación similar (Frankel y Soulé, 1981).

Para las poblaciones de *Abies*, el ANDEVA indica que existe poca variación entre los taxa (1.69%), pero altos niveles entre las poblaciones dentro de los taxa (39.42%). En este sentido, los programas de conservación y manejo de recursos deben contemplar una estrategia que garantice la permanencia de niveles similares en ambos componentes de la diversidad genética, para captar la máxima variación y mantenimiento de la estructura genética natural de las poblaciones.

CONCLUSIONES

Las poblaciones mexicanas analizadas de *Abies concolor*, *A. durangensis*, *A. durangensis* var. *coahuilensis*, y *A. vejari* mostraron poca variación entre sí, alto nivel de diferenciación interpoblacional y patrones filogenéticos inconsistentes con la taxonomía actual. Estos resultados sugieren que las poblaciones de *Abies* analizadas posiblemente forman parte de variedades en proceso de diferenciación que se originaron de las migraciones al sur de *Abies concolor*, o que dichas poblaciones se diferenciaron entre ellas, pero un contacto genético posterior favoreció su homogeneización.

A pesar de la poca diferenciación química entre los taxa, el alto nivel de diferenciación interpoblacional tendrá que considerarse para diseñar programas de conservación de los *Abies* del norte de México.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al M.C. René Martínez su ayuda en el procesamiento de las muestras y el manejo de los datos. La CONABIO y el Instituto de Ecología de la UNAM apoyaron financiera y logísticamente la realización de la investigación. YNC agradece a la fundación UNAM la beca otorgada para la realización de su tesis.

LITERATURA CITADA

- Adams, R. P. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA. 469 p.
- Adams, R. P. 2000. Systematics of the one seeded Juniperus of the eastern hemisphere based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Bioch. Sys. Ecol.* 28: 529-543.
- Adams, R. P., A. E. Schwarzbach, and R. N. Pandey. 2003. The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from Juniperus. *Bioch. Sys. Ecol.* 31: 375-387.

One isoenzymatic analysis of the same populations used in this study shows very similar results: lack of differentiation among species, significant differentiation among populations and lack of concordance with present taxonomy (Aguirre-Planter *et al.*, 2000; Furnier *et al.*, 1996a; Furnier *et al.*, 1996b, Furnier *et al.*, 1996c). This corroborates our results, which suggest recent genetic contact among taxa.

The basic problem in the genetics of conservation is that the small natural or managed populations (such as some *Abies* populations in danger of extinction) tend to lose genetic variation easily, translating into a decrease in potential for the individuals to respond to environmental changes. This loss of variation can increase the probability of extinction or the reduction in opportunities for future adaptation through evolutionary changes. Also, continuous fragmentation and destruction of natural habitats result in small populations of plants and animals that are isolated from each other and whose future promises a similar situation (Frankel and Soulé, 1981).

For the *Abies* population, ANOVA indicates that there is little variation among the taxa (1.69%), but high levels of variation among the population within the taxa (39.42%). In this sense, resource conservation and management programs must consider a strategy that guarantees the permanence of similar levels of both components of genetic diversity to capture maximum variation and maintain the natural genetic structure of the populations.

CONCLUSIONS

The Mexican populations analyzed of *Abies concolor*, *A. durangensis*, *A. durangensis* var. *coahuilensis* and *A. vejari* exhibited little variation among the species, high level of differentiation among populations and phylogenetic patterns that are inconsistent with present taxonomy. These results suggest that the *Abies* populations analyzed possibly form part of varieties in process of differentiation that originated from southern migrations of *Abies concolor*, or rather that these populations differentiated among themselves, but later genetic contact favored homogenizing.

In spite of the scarce chemical differentiation among taxa, the high level of interpopulation differentiation must be considered to design conservation programs for *Abies* of northern México.

—End of the English version—



- Aguirre-Planter, E., G. R. Furnier, and L. E. Eguiarte. 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic

- differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *Am. J. Bot.* 87: 362-371.
- Bagci, E., and M. T. A. Babac. 2003. Morphometric and chemosystematic study on the *Abies* Miller (Fir) species in Turkey. *Acta Botanica Gallica* 150: 355-367. Read as abstract in Cambridge Abstracts in Biology AN: 20033184097.
- Cope, E. A. 1983. Chemosystematic affinities of a California population of *Abies lasiocarpa*. *Madroño* 30: 110-114.
- Debreczy, R. 1994. News Brief. International Dendrological Research Institute, Inc. 6: 1-8.
- Fady, B., M. Arbez, and A. Marpeau. 1992. Geographic variability of terpene composition in *Abies cephalonica* Loudon an *Abies* species around the Aegean: Hypotheses for their possible phylogeny from the Miocene. *Trees* 6: 162-171.
- Farjon, A., and K. D. Rushforth. 1989. A classification of *Abies* Miller (Pinaceae). *Notes Royal of the Botanical Garden Edinburg* 46: 59-79.
- Forey, P. L., C. J. Humphries, I. L. Kitching, R. W. Scotland, D. J. Siebert, and D. M. Williams. 1992. *Cladistics*. Oxford University Press, Oxford, UK. 191 p.
- Frankel, O. H., and M. E. Soulé. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, USA. 327 p.
- Furnier, G. R., Y. G. Nava-Cruz, A. Keiman, E. Aguirre, F. Espinosa, and L. E. Eguiarte. 1996a. Genetic variation in the Mexican *Abies*. *Proceedings of the 14th North American Forest Biology Workshop*. Université Laval, Quebec, Canada. p. 100.
- Furnier, G. R., Y. G. Nava-Cruz, A. Keiman, E. Aguirre, F. Espinosa, and L. E. Eguiarte. 1996b. Variation in isozymes and foliar resin chemical composition in the *Abies* of northern Mexico. *Proceedings of the Western Forest Genetics Association Meeting*, Newport, Oregon, USA. pp: 9.
- Furnier, G. R., Y. G. Nava-Cruz, A. Keiman, E. Aguirre, F. Espinosa, and L. E. Eguiarte. 1996c. Isozyme and foliar terpene variation in the *Abies* of northern Mexico. 47th Annual Meeting of the American Institute of Biological Sciences, Seattle, Washington, USA. Supplement of the *Am. J. Bot.* 83: 157.
- Hanover, J. W. 1992. Applications of terpene analysis in forest genetics. *New For.* 6: 159-178.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*, 2nd. Ed. Sinauer Association. Sunderland, Massachusetts, USA. 682 p.
- Hillig, K. W. 2004. A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in *Cammabis*. *Bioch. Syst. and Ecol.* 32: 875-891.
- Hunt, R. S., and E. von Rudloff. 1974. Chemosystematic studies in the genus *Abies*. I. Leaf and twig oil analysis of alpine and balsam firs. *Can. J. Bot.* 52: 477-487.
- Hunt, R. S., and E. von Rudloff. 1979. Chemosystematic studies in the genus *Abies*. IV. Introgression in *Abies lasiocarpa* and *Abies bifolia*. *Taxon* 28: 297-305.
- Karban, R., and I. T. Baldwin. 1997. *Induced Responses to Herbivory*. The University of Chicago Press, Chicago, USA. 319 p.
- Kendall, M. 1980. *Multivariate Analysis*. Charles Griffin Company LTD, 2nd ed. London, UK. 210 p.
- Kossuth, S. V., and E. L. Barnard. 1983. Monoterpene content of healthy sand pine and sand pine with root disease. *For. Sci.* 29: 791-797.
- Lang, K. J. 1994. *Abies alba* Mill.: Differentiation of provenances and provenance groups by the monoterpene patterns in the cortex resin of twigs. *Bioch. Syst. Ecol.* 22: 53-63.
- Langenheim, J. H. 2003. *Plant Resins. Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany*. Timber Press, Portland, USA. 586 p.
- Liu, T. 1971. *A Monograph of the Genus Abies*. Department of Forestry, College of Agriculture. National Taiwan University, Taipei, Taiwan, China. 608 p.
- Martínez, M. 1948. Las Pináceas de México. *Anales del Instituto de Biología*. No. 1 Tomo XIX. Instituto de Biología. México D. F. pp: 11-107.
- Martínez, M. 1953. *Las Pináceas Mexicanas*. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Subsecretaría de Recursos Forestales y de Caza. México D. F., México. 366 p.
- Meffe, G. K., and C. R. Carroll. (eds). 1994. *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Association. Sunderland, Massachusetts, USA. 729 p.
- Otto, A., and V. Wilde. 2001. Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers - a review. *Bot. Rev.* 67: 2, 141-238.
- Otto, A., B. R. T. Simoneit, W. C. Rember. 2003. Resin compounds from the seed cones of three fossil conifer species from the Miocene Clarkia flora, Emerald Creek, Idaho, USA, and from related extant species. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 126: 225-241.
- Parker, W. H., J. Maze, E. Bennett, T. A. Cleveland, and G. McLachlan. 1984. Needle flavonoid variation in *Abies balsamea* and *Abies lasiocarpa* from western Canada. *Taxon* 33: 1-12.
- Pla, L. 1986. *Análisis Multivariado: Método de Componentes Principales*. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C., USA. pp: 1-48.
- Roussis, V., M. Couladis, O. Tzakou, A. Loukis, P. V. Petrakis, N. M. Dukic, and R. Jancic. 2000. A comparative study on the needle volatile constituents of three *Abies* species grown in South Balkans. *J. Ess. Oil Res.* 12: 41-46.
- Rushforth, K. 1987. *Conifers. Facts on File Publications*. Oxford, England. 232 p.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, Mexico D. F., México. 432 p.
- Sabor, J., and K. Skrzyszewska. 2002. The role of genetic terpene markers in selection and taxonomy of forest tree species. Part II. Study of forest tree species genetic population structure. [Polish] *Sylvan* 146: 49-60. Read as abstract in Cambridge Abstracts in Biology AN: 20033004254.
- Savage, T. J., M. W. Hatch, and R. Croteau. 1994. Monoterpene Syntheses of *Pinus contorta* and related conifers. *J. Bot. Chem.* 269: 4012-4020.
- Schiller, G., and A. Genizi. 1993. An attempt to identify the origin of *Pinus brutia* Ten. Plantations in Israel by needle resin composition. *Silvae Genetica* 42: 63-68.
- Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman Editorial, San Francisco, USA. 573 p.
- St. Clair, J. B., and W. B. Critchfield. 1988. Hybridization of a Rocky Mountain fir (*Abies concolor*) and a Mexican fir (*Abies religiosa*). *Can. J. For. Res.* 18: 640-643.
- Swofford, D. L. 1989. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP)*. Version 3.0. Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois, USA.
- White, E. E., and J. E. Nilsson. 1984. Foliar terpene heritability in *Pinus contorta*. *Silvae Genetica* 33: 16-22.