

Phytochemical variation among sacred fir (*Abies religiosa* [Kunth] Schltdl. & Cham.) provenances in an altitudinal gradient

Variación fitoquímica entre procedencias de oyamel (*Abies religiosa* [Kunth] Schltdl. & Cham.) en un gradiente altitudinal

Ana L. Cruzado-Vargas¹; Yolanda M. García-Rodríguez²; Marisol A. Ortiz-Bibian³; Francisco J. Espinosa-García²; Pedro Antonio-López⁴; Cuauhtémoc Sáenz-Romero⁵; Roberto A. Lindig-Cisneros^{2*}

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Av. San Juanito Itzicuaró s/n, col. Nueva Esperanza. C. P. 58337. Morelia, Michoacán, México.

²Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad. Antigua Carretera Pátzcuaro núm. 8701. C. P. 58190. Morelia, Michoacán, México.

³Tecnológico Nacional de México, Campus Morelia, Departamento de Ingeniería Bioquímica. Av. Tecnológico, núm. 1500, col. Lomas de Santiaguito. C. P. 58120. Morelia, Michoacán, México.

⁴Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. km 125.5 carretera federal México-Puebla (bulevar Forjadores de Puebla). C. P. 72760. San Pedro Cholula, Puebla, México.

⁵Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales. Av. San Juanito Itzicuaró s/n, col. Nueva Esperanza. C. P. 58337. Morelia, Michoacán, México.

*Corresponding author: rlindig@cieco.unam.mx; tel.: +52 443 121 2408.

Abstract

Introduction: A species' populations differ across its distribution due to selection pressure from the climate gradient.

Objective: To describe the phytochemical variation among 14 tree provenances in an altitudinal gradient of *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham. to determine if there are associations of chemical profiles among populations, expressed under a single environment.

Materials and methods: Seeds were collected from 165 trees from an altitudinal transect from 2850 to 3540 m in Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, Mexico. The plant was grown in a common garden trial; at 28 months, mature needles were collected per tree and analyzed by gas-mass chromatography. Data were analyzed with diversity indices, ANOVA and multivariate analysis (principal components, correspondences and cluster).

Results and discussion: Thirty-two compounds were identified, most of them terpenes. The populations showed differences in presence/absence of terpenes and in their concentration; above 3350 m, diversity was lower, but with higher concentration. Three altitude groups were found based on the chemical profile of the populations: low = 2850 to 3300 m and 3400 m; moderate = 3350, 3450 and 3500 m; and high = 3540 m.

Conclusions: The diversity and concentration of terpenes in *A. religiosa* varied depending on the altitude of populations. There are three chemical profiles that should be considered in the implementation of germplasm collection programs for reforestation and restoration.

Keywords: terpenes; secondary metabolites; chemical profile; diversity indices; multivariate analysis.

Resumen

Introducción: Las poblaciones de una especie son diferentes a lo largo de su distribución por la presión de selección del gradiente climático.

Objetivo: Describir la variación fitoquímica entre 14 procedencias en un gradiente altitudinal de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham., para determinar si existen asociaciones de perfiles químicos entre poblaciones, expresados bajo un solo ambiente.

Materiales y métodos: Se recolectaron semillas de 165 árboles de un transecto altitudinal de 2850 a 3540 m en el cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, México. La planta se produjo en ensayo de jardín común; a los 28 meses se recolectaron acículas maduras por individuo y se analizaron por cromatografía de gases-masas. Los datos se analizaron con índices de diversidad, análisis de varianza y multivariados (componentes principales, correspondencias y conglomerados).

Resultados y discusión: Se identificaron 32 compuestos, la mayoría terpenos. Las poblaciones presentaron diferencias en presencia/ausencia de terpenos y en su concentración; arriba de 3350 m, la diversidad fue más baja, pero con mayor concentración. Se encontraron tres grupos de altitud con base en el perfil químico de las poblaciones: baja = 2850 a 3300 m y 3400 m; intermedia = 3350, 3450 y 3500 m; y elevada = 3540 m.

Conclusiones: La diversidad y concentración de los terpenos en *A. religiosa* variaron en función de la altitud de las poblaciones. Existen tres perfiles químicos que deben considerarse en el establecimiento de programas de recolecta de germoplasma para reforestación y restauración.

Palabras clave: terpenos; metabolitos secundarios; perfil químico; índices de diversidad; análisis multivariados.

Introduction

Sacred fir (*Abies religiosa* [Kunth] Schltld. & Cham.) forests are distributed in conifer-dominated upland areas, mainly between 2400 and 3600 m altitude, between 19° and 20° north latitude, along the Transmexican Volcanic Belt (Sáenz-Romero, Rehfeldt, Duval, & Lindig-Cisneros, 2012). These forests are of great ecological importance due to the ecosystem services they provide such as carbon sequestration, water uptake, and protection against erosion (Hernández-Álvarez, Reyes-Ortiz, Villanueva-Díaz, & Sánchez-González, 2021); they are also a wintering site for the monarch butterfly, *Danaus plexippus* L. (Oberhauser, Nail, & Altizer, 2015).

Sacred fir is an evergreen monoecious tree up to 40 m tall, with thick bark with scaly patches in adult trees and smooth in young trees. Its leaves are alternate, linear, sessile, straight, somewhat leathery, 19 to 70 mm long, with acute or rounded apex and oblong buds protected with resin (Rodríguez Trejo, Aparicio Lechuga, Lara Bueno, Uribe Gómez, & Ramírez Castell, 2021).

One of the main threats to sacred fir forests is climate change, because it will induce a decoupling between their populations and the climate suitable for them (Gómez-Pineda et al., 2020; Sáenz-Romero et al., 2012), which in turn will lead to increasing incidence of bark beetles, as high temperatures provide favorable conditions for the development of these insects (Gómez-Pineda et al., 2022; López-Gómez, Arriola Padilla, & Pérez Miranda, 2015; Rubin-Aguirre et al., 2015; Sosa Díaz et al., 2018).

Populations of the same species with a wide range of distribution are found in a diverse variety of environmental conditions that can be reflected in phenotypic variation (Premoli, Acosta, Mathiasen, & Donoso, 2012). This can be explained because of differential selection of genotypes under the various environmental conditions in an environmental gradient (Ignazi, Mathiasen, & Premoli, 2019). Understanding altitudinal patterns of genetic differentiation among populations is essential for the design of forest management measures that facilitate the adaptation of forest populations to projected climates (Sáenz-Romero et al., 2016). In mountainous regions, the altitudinal gradient is especially important for understanding richness patterns at both community and population levels (Muenchow, Dieker, Kluge, Kessler, & von Wehrden, 2018).

Provenance or common garden trials under open field conditions allow expression of genetic differences by growing plants from different geographical origins (provenances) under the same environmental

Introducción

Los bosques de oyamel (*Abies religiosa* [Kunth] Schltld. & Cham.) se distribuyen en zonas altas dominadas por coníferas, principalmente entre 2400 y 3600 m de elevación, entre 19° y 20° de latitud norte, a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana (Sáenz-Romero, Rehfeldt, Duval, & Lindig-Cisneros, 2012). Estos bosques son de gran importancia ecológica debido a los servicios ecosistémicos que proporcionan como la captura de carbono, captación de agua y protección contra la erosión (Hernández-Álvarez, Reyes-Ortiz, Villanueva-Díaz, & Sánchez-González, 2021); además, son sitio de hibernación de la mariposa monarca *Danaus plexippus* L. (Oberhauser, Nail, & Altizer, 2015).

El oyamel es un árbol monoico siempre verde de hasta 40 m de altura, de corteza gruesa con placas escamosas en árboles adultos y lisa en árboles jóvenes. Sus hojas son alternas, lineares, sésiles, rectas, algo coriáceas de 19 a 70 mm de longitud, con ápice agudo o redondeado y yemas oblongas protegidas con resina (Rodríguez Trejo, Aparicio Lechuga, Lara Bueno, Uribe Gómez, & Ramírez Castell, 2021).

Una de las principales amenazas para los bosques de oyamel es el cambio climático, ya que inducirá un desacoplamiento entre sus poblaciones y el clima propicio para ellas (Gómez-Pineda et al., 2020; Sáenz-Romero et al., 2012), lo que a su vez provocará incidencia cada vez mayor de descortezadores, pues las temperaturas altas proveen condiciones favorables para el desarrollo de estos insectos (Gómez-Pineda et al., 2022; López-Gómez, Arriola Padilla, & Pérez Miranda, 2015; Rubin-Aguirre et al., 2015; Sosa Díaz et al., 2018).

Las poblaciones de una misma especie con un rango amplio de distribución se encuentran en una vasta gama de condiciones ambientales que se pueden reflejar en la variación fenotípica (Premoli, Acosta, Mathiasen, & Donoso, 2012). Esta puede explicarse como resultado de la selección diferencial de los genotipos bajo las diversas condiciones ambientales en un gradiente ambiental (Ignazi, Mathiasen, & Premoli, 2019). La comprensión de los patrones altitudinales de diferenciación genética entre poblaciones es fundamental para el diseño de medidas de manejo forestal que faciliten la adaptación de las poblaciones forestales a los climas proyectados (Sáenz-Romero et al., 2016). En las regiones montañosas, el gradiente altitudinal es de particular importancia para entender los patrones de riqueza tanto a nivel comunidades como poblaciones (Muenchow, Dieker, Kluge, Kessler, & von Wehrden, 2018).

Los ensayos de procedencias o jardín común en condiciones de campo permiten la expresión de las diferencias genéticas, mediante el cultivo de plantas

conditions. In this type of studies, it is expected that the provenance best coupled to the climate of the trial site will have the best performance and the others will show differences, in part, related to the magnitude of the weather differences between the site of origin and the trial site (Cruzado-Vargas et al., 2021; Sáenz-Romero et al., 2017). A variant of the above are the common garden trials where optimal conditions are provided (as far as possible) to the set of provenances to favor the expression of their growth potential, and with this, quantify whether or not there is genetic differentiation between them. This can be achieved by establishing trials in open field sites located within the optimal climate space of the species, or, as in the case of this study, by providing favorable artificial conditions using shade netting and irrigation during the dry season (Ortiz-Bibian et al., 2017).

Defense and resistance mechanisms in conifers depend on genetic, biotic and abiotic factors and interactions. These mechanisms include physical defense traits and chemical compounds (Zas Arregui & Sampredo Pérez, 2015). Chemical defenses often take the form of sets of substances that defend plants against herbivores (including bark beetles) (Taft, Najar, Godbout, Bousquet, & Erbilgin, 2015), pathogens (Kopaczyk, Warguła, & Jelonek, 2020) and certain types of abiotic stresses such as high temperature (Materić et al., 2015).

Plants synthesize a large number of compounds, including secondary metabolites, many are volatile compounds that vary in composition and concentration between species and from one individual to another within the same species (García-Rodríguez, Bravo-Monzón, Martínez-Díaz, Torres-Gurrola, & Espinosa-García, 2012). Such variation also depends on the plant part being analyzed, the season of the year, geographical origin and other environmental factors (Kopaczyk et al., 2020). Secondary metabolites are synthesized in small quantities and not in a generalized way (some are produced only by one species, genus or family) (Pichersky & Raguso, 2018); they play defense, attraction or competition functions, and their effectiveness depends on the concentration (López-Goldar et al., 2018) and metabolism of the consumer: herbivore or pathogenic (García-Rodríguez et al., 2012).

Terpenes constitute the largest and most diverse group of secondary metabolites in plants (Kopaczyk et al., 2020) comprising more than 40 000 individual compounds (Abbas et al., 2017) and, together with phenolic compounds, are the main chemical defenses in conifers (Lundborg, Fedderwitz, Björklund, Nordlander, & Borg-Karlson, 2016). The most abundant terpenes in the pine family are α -pinene, β -pinene, myrcene, limonene, camphene, and 3-carene (Kopaczyk et al., 2020; Pokorska et al., 2012; Taft et al., 2015).

de diversos orígenes geográficos (procedencias) bajo las mismas condiciones ambientales. En este tipo de estudios se espera que la procedencia mejor acoplada al clima del sitio de ensayo tenga el mejor desempeño y las demás muestren diferencias, en parte, relacionadas con la magnitud de la diferencia climática entre el sitio de origen y el de ensayo (Cruzado-Vargas et al., 2021; Sáenz-Romero et al., 2017). Una variante de lo anterior son los ensayos de jardín común donde se proveen condiciones óptimas (en la medida de lo posible) al conjunto de procedencias con la finalidad de favorecer la expresión de su potencial de crecimiento, y con ello, cuantificar si existe o no diferenciación genética entre ellas. Esto se puede lograr estableciendo los ensayos en sitios de campo ubicados dentro del espacio climático óptimo de la especie, o bien, como es el caso de este trabajo, proporcionando de condiciones favorables artificialmente, a través del uso de malla-sombra y riego en temporada de estiaje (Ortiz-Bibian et al., 2017).

Los mecanismos de defensa y resistencia en las coníferas dependen de factores genéticos, bióticos, abióticos, así como de sus interacciones. Estos mecanismos incluyen caracteres de defensa físicos y compuestos químicos (Zas Arregui & Sampredo Pérez, 2015). Las defensas químicas a menudo se presentan como conjuntos de sustancias que defienden a las plantas contra herbívoros (incluidos los escarabajos de la corteza) (Taft, Najar, Godbout, Bousquet, & Erbilgin, 2015), patógenos (Kopaczyk, Warguła, & Jelonek, 2020) y ciertos tipos de estrés abiótico como las temperaturas altas (Materić et al., 2015).

Las plantas sintetizan gran cantidad de compuestos, entre ellos están los metabolitos secundarios que son compuestos volátiles variantes en composición y concentración entre especies y de un individuo a otro dentro de una misma especie (García-Rodríguez, Bravo-Monzón, Martínez-Díaz, Torres-Gurrola, & Espinosa-García, 2012). Dicha variación también depende de la parte la planta que se analice, la estación del año, origen geográfico y otros factores medioambientales (Kopaczyk et al., 2020). Los metabolitos secundarios se sintetizan en cantidades pequeñas y no de forma generalizada (algunos son producidos solo por una especie, género o familia) (Pichersky & Raguso, 2018); cumplen funciones de defensa, atracción o competencia, y su efectividad depende de la concentración (López-Goldar et al., 2018) y del metabolismo del consumidor: herbívoro o patógeno (García-Rodríguez et al., 2012).

Los terpenos constituyen el grupo más grande y diverso de metabolitos secundarios en las plantas (Kopaczyk et al., 2020) abarcando más de 40 000 compuestos individuales (Abbas et al., 2017) y, junto con los compuestos fenólicos, son las principales defensas químicas de las coníferas (Lundborg, Fedderwitz,

The objective of this study was to determine whether the phytochemical diversity of *A. religiosa* varies among 14 populations from an altitudinal gradient (2850 to the 3550 m) established in a common garden trial. The hypothesis is that terpene diversity will be higher at lower altitudes, where there is higher herbivory and, therefore, greater selection pressure that would eventually favor terpene diversity as an adaptive response of forest populations (Pellissier et al., 2016).

Materials and Methods

Seed collection and plant production

Mature cones of *A. religiosa* were collected at 14 sites: 11 trees at each site separated by 50 m altitudinal difference in a transect from 2850 to 3550 m (Table 1) on Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, Mexico. Collection sites were well-preserved stands, dominated mainly by *A. religiosa* (89 % basal area) in the upper part of the mountain, combined with *Pinus hartwegii* Lindl. (*pino de las alturas*) and *Cupressus lindleyi* Klotzsch ex Endl. (cedar). In the intermediate part of the altitudinal transect, *A. religiosa* represents 60 % of the basal area of the tree stand in combination mainly with *Pinus pseudostrubus* Lindl. (*pino liso*), *C. lindleyi* and *Salix paradoxa* Kunth (*borreguito*). At the lowest part, *A. religiosa* represents 45 % in combination with *P. pseudostrubus*, *Pinus montezumae* Lamb (*pino blanco*), *Quercus obtusata* Bonpl. (white oak) and other leafy species such as *Arbutus*

Björklund, Nordlander, & Borg-Karlson, 2016). Los terpenos más abundantes en la familia de pinos son: α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, canfeno y 3-careno (Kopaczyk et al., 2020; Pokorska et al., 2012; Taft et al., 2015).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la diversidad fitoquímica de *A. religiosa* varía entre 14 poblaciones provenientes de un gradiente altitudinal (2850 a los 3550 m) establecidas en un ensayo de jardín común. La hipótesis es que la diversidad de terpenos será mayor a menor altitud, donde hay mayor herbivoría y, por lo tanto, una mayor presión de selección que eventualmente favorecería la diversidad de terpenos como una respuesta adaptativa de las poblaciones forestales (Pellissier et al., 2016).

Materiales y métodos

Recolecta de semilla y producción de planta

Se recolectaron conos maduros de *A. religiosa* en 14 sitios: 11 árboles en cada uno de los sitios separados entre sí por 50 m de diferencia altitudinal en un transecto de los 2850 a los 3550 m (Cuadro 1) en el cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, México. Los sitios de recolecta fueron rodales bien conservados, dominados principalmente por *A. religiosa* (89 % de área basal) en la parte alta de la montaña, combinado con *Pinus hartwegii* Lindl. (*pino de las alturas*) y *Cupressus lindleyi* Klotzsch ex

Table 1. Geographical location of the cone collection sites of 14 provenances of *Abies religiosa* on Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, Mexico.

Cuadro 1. Localización geográfica de los sitios de recolección de conos de 14 procedencias de *Abies religiosa* en el cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, México.

Altitude (m)/Altitud (m)	Latitude (N)/Latitud (N)	Longitude (W)/Longitud (O)
3540	19° 48' 01.0"	100° 36' 04.7"
3500	19° 48' 03.6"	100° 36' 06.8"
3450	19° 48' 06.3"	100° 36' 10.3"
3400	19° 48' 19.0"	100° 36' 13.5"
3350	19° 48' 20.2"	100° 36' 13.8"
3300	19° 48' 23.8"	100° 36' 18.6"
3250	19° 48' 36.1"	100° 36' 16.3"
3200	19° 48' 38.0"	100° 36' 20.6"
3150	19° 48' 40.9"	100° 36' 26.4"
3100	19° 48' 49.0"	100° 36' 31.2"
3050	19° 48' 58.7"	100° 36' 30.6"
3000	19° 49' 10.1"	100° 36' 28.4"
2950	19° 49' 15.0"	100° 36' 05.8"
2850	19° 49' 38.6"	100° 35' 35.0"

Source/Fuente: Ortiz-Bibian et al. (2017).



Figure 1. Common garden trial with 14 provenances of *Abies religiosa* in raised beds at the Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico.

Figura 1. Ensayo de jardín común con 14 procedencias de *Abies religiosa* en camas elevadas en el Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

xalapensis Kunth (*madroño*) and *S. paradoxa*. The detailed description of the sites can be found in the study by Ortiz-Bibian et al. (2017).

The cones were dried in the sun for 15 days to extract the seeds and, subsequently, germinate them in a peat moss seedbed. The seedlings were transplanted into 380 cm³ containers, where they developed for nine months. In March 2014, a provenance or common garden trial (Figure 1) was set up at the Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de San Nicolás de Hidalgo (INIRENA-UMSNH) located in Morelia, Michoacán. The experiment had a six randomized complete block design with six seedlings per provenance (Ortiz-Bibian et al., 2017).

Sample collection

When seedlings were 28 months old, 2 g samples of mature needles were collected from 10 trees randomly selected from each of the 14 *A. religiosa* provenances present in the common garden trial to evaluate the chemical profile. Twelve hours before harvesting,

Endl. (*cedro*). En la parte intermedia del transecto altitudinal, *A. religiosa* representa 60 % del área basal del arbolado en combinación principalmente con *Pinus pseudostrobus* Lindl. (*pino liso*), *C. lindleyi* y *Salix paradoxa* Kunth (*borreguito*). En la parte más baja, *A. religiosa* representa 45 % en combinación con *P. pseudostrobus*, *Pinus montezumae* Lamb. (*pino blanco*), *Quercus obtusata* Bonpl. (*encino blanco*) y demás especies de hojosas como *Arbutus xalapensis* Kunth (*madroño*) y *S. paradoxa*. La descripción detallada de los sitios se puede consultar en el estudio de Ortiz-Bibian et al. (2017).

Los conos se secaron al sol durante 15 días para extraer las semillas y, posteriormente, germinarlas en almacigo de turba de musgo. Las plántulas se trasplantaron en tubetes de 380 cm³, donde se desarrollaron durante nueve meses. En marzo de 2014 se montó un ensayo de procedencias o jardín común (Figura 1) en el Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (INIRENA-UMSNH) ubicado en Morelia, Michoacán. El experimento tuvo un diseño de seis bloques completos al azar con seis plántulas por procedencia (Ortiz-Bibian et al., 2017).

the trial was watered to field capacity. Samples were taken between 8 and 10 h in the morning in October 2016 with northern exposure and no signs of damage. Branches were taken from the middle part of the main stem.

From each sample, 1 g of needles was placed in a paper bag, kept in the drying oven at 80 °C for 24 h and weighed. The other gram was placed in an amber glass bottle containing 10 mL of reagent grade n-hexane, which remained at 5 °C in a refrigerator. Subsequently, the sample in n-hexane was ground in a porcelain mortar with 0.5 g of inert sand and 1 mL of tetradecane (C₁₄H₃₀) to a concentration of 1 mg·mL⁻¹ as an internal standard. The extract was filtered through a funnel with 11 µm pore opening filter paper containing 0.5 g of reagent grade anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄) and stored in an amber vial at 5 °C until chemical analysis.

Chemical Analysis

Samples were analyzed by injecting 1 µL into a gas chromatograph equipped with a mass detector (Agilent 6890, MSD 5973), flow split (60.3:1) at 250 °C on a HP-5MS nonpolar capillary column (30 m x 25 mm x 25 µm), using helium as carrier gas with a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The oven temperature program was initial ramp of 50-200 °C at 20 °C·min⁻¹, followed by another ramp of 200-280 °C at 15 °C·min⁻¹ and a final ramp of 280-300 °C at 20 °C·min⁻¹. The mass spectrometer was run in electric ionization mode, flow rate of 1 mL·min⁻¹, ionization voltage at 70 eV, interface temperature at 280 °C and SCAN mode with a mass range of 50 to 550 m/z (García-Rodríguez, Torres-Gurrola, Meléndez-González, & Espinosa-García, 2016).

The concentration of compounds was calculated by the internal standard method, relating the area of each compound to the area of the tetradecane, whose concentration is known. Subsequently, the concentration was related to the dry weight of the sample (mg·g⁻¹). These data were used to calculate the chemical diversity of the provenances.

Spectra obtained on MSD ChemStation (Agilent Technologies Inc., 2004) were compared with those of the NIST/EPA/NIH Mass Spectrometer library, version 2.0 (Stein, Mirokhin, Tchekhovskoi, & Mallard, 2012). The identity of the compounds was validated with experimental retention rates by injecting 1 µL of two series of alkanes (C₈-C₂₀ y C₂₁-C₄₀, Sigma Aldrich) with the same chromatographic method. The retention times of the alkanes were related to those of the compounds and compared with retention rates reported in the literature (Adams, 2007; Zenkevich, 2010).

Chromatograms were obtained for each sampled individual which, according to statistical analyses, were

Extracción de muestras

A los 28 meses de edad de las plántulas, se recolectaron muestras de 2 g de acículas maduras de 10 árboles seleccionados al azar en cada una de las 14 procedencias de *A. religiosa* presentes en el ensayo de jardín común, para evaluar el perfil químico. Doce horas antes de la recolección, el ensayo se regó a capacidad de campo. Las muestras se tomaron entre las 8 y 10 h de la mañana en octubre del 2016 con exposición norte y sin señales de daño. Las ramas se tomaron de la parte media del tallo principal.

De cada muestra, 1 g de acículas se introdujo en una bolsa de papel, se mantuvo en el horno de secado a 80 °C durante 24 h y se pesó. El otro gramo se colocó en un frasco de vidrio ámbar que contenía 10 mL de n-hexano grado reactivo, el cual permaneció a 5 °C en un refrigerador. Posteriormente, la muestra en n-hexano se molió en un mortero de porcelana con 0.5 g de arena inerte y 1 mL de tetradecano (C₁₄H₃₀) a una concentración de 1 mg·mL⁻¹ como estándar interno. El extracto se filtró a través de un embudo con papel filtro de apertura de poro de 11 µm, que contenía 0.5 g de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) grado reactivo y se guardó en un vial ámbar a 5 °C hasta su análisis químico.

Análisis químico

Las muestras se analizaron inyectando 1 µL en un cromatógrafo de gases equipado con un detector de masas (Agilent 6890, MSD 5973), con división de flujo (split 60.3:1) a 250 °C en una columna capilar no polar HP-5MS (30 m x 25 mm x 25 µm), usando helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL·min⁻¹. El programa de temperatura del horno fue: rampa inicial de 50-200 °C a 20 °C·min⁻¹, seguida de otra rampa de 200-280 °C a 15 °C·min⁻¹ y una última de 280-300 °C a 20 °C·min⁻¹. El espectrómetro de masas se operó en modo de ionización eléctrica, flujo de 1 mL·min⁻¹, voltaje de ionización a 70 eV, temperatura de la interfase a 280 °C y modo SCAN con un rango de masas de 50 a 550 m/z (García-Rodríguez, Torres-Gurrola, Meléndez-González, & Espinosa-García, 2016).

La concentración de compuestos se calculó por el método de estándar interno, relacionando el área de cada compuesto con el área del tetradecano, cuya concentración es conocida. Posteriormente, la concentración se relacionó con el peso seco de la muestra (mg·g⁻¹). Estos datos se utilizaron para calcular la diversidad química de las procedencias.

Los espectros obtenidos en MSD ChemStation (Agilent Technologies Inc., 2004) se compararon con los de la biblioteca de Espectros de Masas NIST/EPA/NIH, versión 2.0 (Stein, Mirokhin, Tchekhovskoi, & Mallard, 2012). La identidad de los compuestos se validó con los índices de

divided into three groups with an altitudinal interval of 200 m, so a chromatogram was selected from each altitudinal section to exemplify their phytochemical diversity (Figure 2).

Diversity indices

The alpha diversity, expressed through several diversity indices of the 14 provenances of *A. religiosa*, was estimated with the statistical analysis program PAST 4.03 (Hammer, Harper, & Ryan, 2001). Eleven diversity indices were obtained, of which the most informative (significant) were selected by ANOVA in the graphical interface of the free software R Rcmdr 4.0.2 (R Development Core Team, 2020). These were Fisher's alpha index and Menhinick's index which proved robust since it allows comparison of samples of different sizes.

Total diversity measured with the Menhinick index was based on the relationship between the total number

retención experimentales, inyectando 1 µL de dos series de alcanos (C_8 – C_{20} y C_{21} – C_{40} , Sigma Aldrich) con el mismo método cromatográfico. Los tiempos de retención de los alcanos se relacionaron con los de los compuestos y se compararon con los índices de retención reportados en la literatura (Adams, 2007; Zenkevich, 2010).

Se obtuvieron cromatogramas para cada individuo muestreado que, de acuerdo con los análisis estadísticos, se dividieron en tres grupos con intervalo altitudinal de 200 m, por lo que se seleccionó un cromatograma de cada sección altitudinal para ejemplificar su diversidad fitoquímica (Figura 2).

Índices de diversidad

La diversidad alfa, expresada a través de varios índices de diversidad de las 14 procedencias de *A. religiosa*, se estimó con el programa de análisis estadístico PAST 4.03 (Hammer, Harper, & Ryan, 2001). Se obtuvieron 11 índices de diversidad, de los cuales se seleccionaron

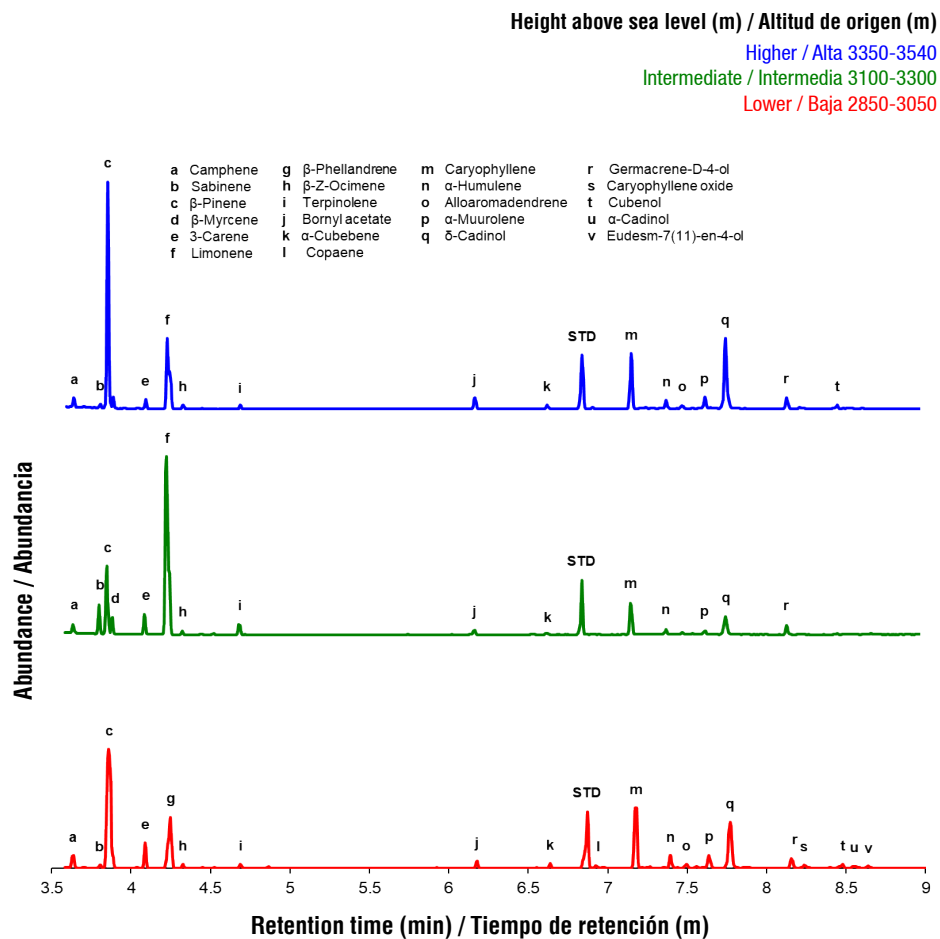


Figure 2. Representative chromatograms of the phytochemical diversity of *Abies religiosa* by height above sea level from Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, Mexico.

Figura 2. Cromatogramas representativos de la diversidad fitoquímica de *Abies religiosa* por altitud de origen del cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, México.

of terpenes and the total number of trees (samples). Fisher's alpha index was used for the most common terpenes in most conifers (α -pinene, camphene, β -pinene, β -myrcene, 3-carene, limonene), which allows comparison of the level of richness between provenances, which vary in the level of abundance and depend on the number of individuals sampled. In both indices, each terpene was considered as a 'species' and the provenances as 'communities'.

Statistical Analysis

ANOVA and multivariate analyses were carried out using the SAS 9.4 TS 1 M3 statistical package (SAS Institute Inc., 2015). PROC GLM was used for the ANOVA and PROC STEPDISC for the stepwise analysis to select statistically significant ($P < 0.05$) and informative variables. A correlation analysis was also performed with PROC CORR to remove highly correlated variables and avoid collinearity problems, with the exception for terpenes commonly found in conifers such as α -pinene, camphene, β -pinene, β -myrcene, 3-carene, limonene (Kopaczyk et al., 2020; Pokorska et al., 2012; Taft et al., 2015). Subsequently, a matrix of averages was obtained for multivariate principal component, correspondence and cluster analyses performed with PRINCOMP, CORRESP and CLUSTER procedures, respectively.

Results

Table 2 shows the 32 compounds and their retention indices (RI) found in the needles of the 14 provenances of *A. religiosa*: 17 monoterpenes (RI 932-1132), 10 sesquiterpenes (RI 1345, 1375-1700), one phenyl propanoid (RI 1196), one alkatetraene (RI 1237) and three esters (RI 1223, 1287, 1379).

Diversity indices

Figure 3 shows that provenances were significantly different from each other ($P \leq 0.0174$, $\alpha = 0.05$), according to the specific richness calculated with the Menhinick index. Simple linear regression reports a negative association between terpene diversity and height above sea level ($P = 0.0016$, $R^2 = 0.5788$); that is, the number of terpenoids decreased as altitude increased. Tukey's mean comparison test showed three groups according to the number of terpenes in each provenance: 1) the 2850 m provenance, different from the rest and where the highest terpene diversity is found; 2) the provenances between 2950 and 3300 m, including the highest altitude (3540 m), which together present intermediate diversity; and 3) the provenances from 3350 to 3500 m, where the lowest terpene diversity is found regarding the distribution range studied.

los más informativos (significativos) mediante un análisis de varianza en la interfaz gráfica del *software* libre R Rcmdr 4.0.2 (R Development Core Team, 2020). Estos fueron el índice alfa de Fisher y el índice de Menhinick que resultó robusto dado que permite la comparación de muestras de tamaños diferentes.

La diversidad total medida con el índice de Menhinick se basó en la relación entre el número total de terpenos y el número total de individuos (muestras). El índice alfa de Fisher se utilizó para los terpenos más comunes en la mayoría de las coníferas (α -pineno, canfeno, β -pineno, β -miraceno, 3-careno, limoneno), el cual permite la comparación del nivel de riqueza entre procedencias, que varían en el nivel de abundancia y depende del número de individuos muestreados. En ambos índices se consideró a cada terpeno como una 'especie' y a las procedencias como las 'comunidades'.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza y multivariados con el paquete estadístico SAS 9.4 TS 1 M3 (SAS Institute Inc., 2015). Para el análisis de varianza se usó el PROC GLM y para el análisis *stepwise* el PROC STEPDISC con el fin de seleccionar las variables estadísticamente significativas ($P < 0.05$) e informativas. También se hizo un análisis de correlaciones con PROC CORR, para eliminar las variables altamente correlacionadas y evitar problemas de colinealidad, a excepción de los terpenos encontrados comúnmente en las coníferas como α -pineno, canfeno, β -pineno, β -miraceno, 3-careno, limoneno (Kopaczyk et al., 2020; Pokorska et al., 2012; Taft et al., 2015). Posteriormente, se obtuvo una matriz de promedios para los análisis multivariados componentes principales, correspondencias y conglomerados realizados con los procedimientos PRINCOMP, CORRESP y CLUSTER, respectivamente.

Resultados

El Cuadro 2 presenta los 32 compuestos y sus índices de retención (IR) encontrados en las acículas de las 14 procedencias de *A. religiosa*: 17 monoterpenos (IR 932-1132), 10 sesquiterpenos (IR 1345, 1375-1700), un fenil propanoide (IR 1196), un alcatetraeno (IR 1237) y tres ésteres (IR 1223, 1287, 1379).

Índices de diversidad

La Figura 3 muestra que las procedencias fueron significativamente diferentes entre sí ($P \leq 0.0174$, $\alpha = 0.05$), de acuerdo con la riqueza específica calculada con el índice de Menhinick. La regresión lineal simple indica una asociación negativa entre la diversidad de terpenos y la altitud de origen ($P = 0.0016$, $R^2 = 0.5788$); es decir, el número de terpenoides disminuye cuando

Table 2. Secondary metabolites identified in 14 provenances of *Abies religiosa* from Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, Mexico, ordered by retention time and retention index.

Cuadro 2. Metabolitos secundarios identificados en 14 procedencias de *Abies religiosa* del cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, México, ordenados por tiempo de retención e índice de retención.

RT/TR	RI/IR	Rlexp/ IRexp	SM/MS	RT/TR	RI/IR	Rlexp/ IRexp	SM/MS
3.45	932	942	α -Pinene*/ α -Pineneno*	5.79	1237	1254	Pulegone/ Pulegona
3.57	946	959	Camphene*/ Canfeno*	6.10	1287	1298	Bornyl acetate/ Acetato de bornilo
3.74	969	981	Sabinene/ Sabineno	6.64	1345	1376	α -Cubebene/ α -Cubebeno
3.78	974	987	β -Pinene*/ β -Pineneno*	6.70	1379	1381	Geranyl acetate/ Acetato de geranilo
3.82	988	992	β -Myrcene*/ β -Mirceno*	6.78	1375	1397	Copaene/ Copaeno
4.02	1002	1019	α -Phellandrene/ α -Felandreno	7.10	1417	1446	Caryophyllene/ Cariofileno
4.09	1008	1027	3-Carene*/ 3-Careno*	7.33	1452	1482	α -Humulene/ α -Humuleno
4.13	1020	1032	o-Cymene/ o-Cimeno	7.49	1458	1506	Alloaromadendrene/ Aloaromadendreno
4.16	1024	1036	Limonene*/ Limoneno*	7.56	1484	1518	Germacrene D/ Germacreno D
4.24	1025	1047	β -Phellandrene/ β -Felandreno	7.57	1500	1519	α -Muurolene/ α -Muroleno
4.26	1044	1050	β -Z-Ocimene/ β -Z-Ocimeno	7.69	1522	1539	δ -Cadinol/ δ -Cadinol
4.39	1054	1096	γ -Terpinene/ γ -Terpineno	7.77	1574	1552	Germacrene D-4-ol/ Germacreno D-4-ol
4.62	1086	1096	Terpinolene/ Terpinoleno	8.18	1582	1619	Caryophyllene oxide/ Óxido de cariofileno
4.93	1132	1137	(E,E)-Cosmene/ (E,E)-Cosmeno	8.41	1645	1656	Cubenol/ Cubenol
5.46	1196	1209	Estragole/ Estragol	8.48	1652	1667	α -Cadinol/ α -Cadinol
5.63	1223	1232	Fenchyl acetate/ Acetato de fenchilo	8.65	1700	1695	Eudesm-7(11)-en-4-ol/ Eudesm-7(11)-en-4-ol

RT: retention time, RI: retention index, Rlexp: retention index experimental, SM: secondary metabolite. *SM most commonly found in conifers.

TR: tiempo de retención, IR: índice de retención, IRexp: índice de retención experimental, MS: metabolito secundario. *MS más comunes en coníferas.

On the other hand, according to Figure 4, the provenances also showed significant differences among themselves ($P \leq 0.0083$), according to Fisher's alpha index. Similar to Menhinick's index, it was shown by simple linear regression that terpenoid diversity decreases as elevation increases ($P = 0.0013$, $R^2 = 0.5919$). Moreover, Tukey's comparison of means established three sets according to the diversity of terpenoids analyzed: 1) the provenance at 2850 m having the highest diversity, 2) the provenances between 2950 to 3350 m, including the highest altitude provenance (3540 m) with intermediate diversity, and 3) the provenances between 3400 to 3500 m with lower terpenoid diversity.

la altitud aumenta. La prueba de comparación de medias de Tukey indicó tres agrupaciones de acuerdo con el número de terpenos en cada procedencia: 1) la procedencia de 2850 m, diferente del resto y en la cual se encuentra la mayor diversidad de terpenos; 2) las procedencias entre 2950 y 3300 m, incluyendo la de mayor altitud (3540 m), que en conjunto presentan diversidad intermedia; y 3) las procedencias de 3350 a 3500 m, donde se encuentra la menor diversidad de terpenos con respecto al rango de distribución estudiado.

Por otra parte, de acuerdo con la Figura 4, las procedencias también mostraron diferencias significativas entre sí ($P \leq 0.0083$), de acuerdo con el índice de alfa de Fisher.

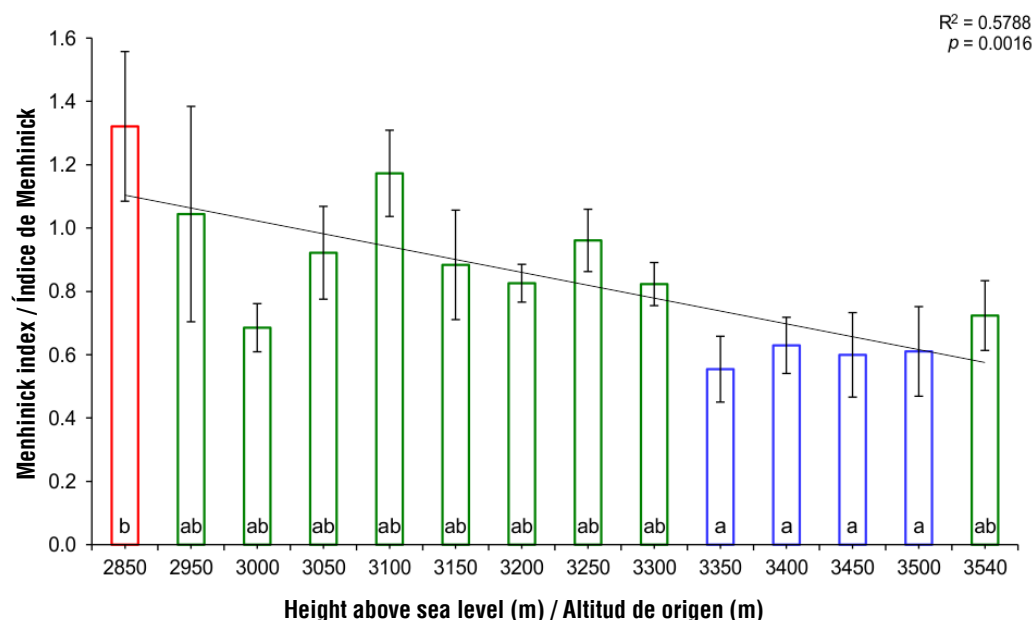


Figure 3. Variation of terpene diversity calculated with Menhinick's index for 14 provenances of *Abies religiosa* from Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, Mexico. The same color indicates belonging to a Tukey's mean clustering ($P = 0.05$).

Figura 3. Variación de la diversidad de terpenos calculada con el índice de Menhinick para 14 procedencias de *Abies religiosa* del cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, México. Un mismo color indica pertenencia a un agrupamiento de medias de Tukey ($P = 0.05$).

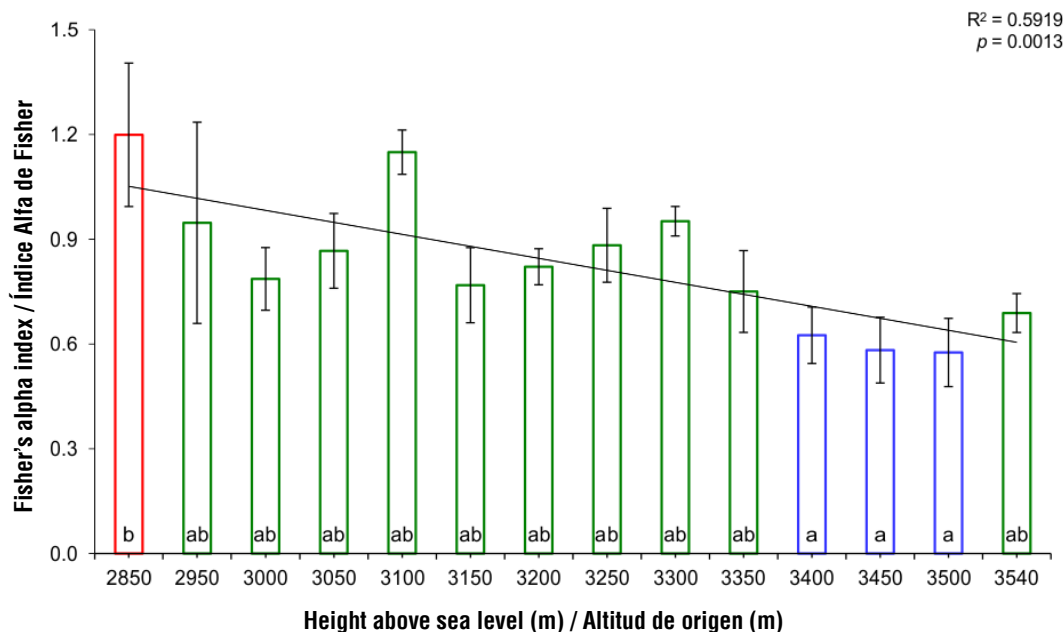


Figure 4. Variation of terpene diversity calculated with Fisher's alpha index for 14 provenances of *Abies religiosa* from Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, Mexico. The same color indicates belonging to a Tukey's mean clustering ($P = 0.05$).

Figura 4. Variación de la diversidad de terpenos calculada con índice alfa de Fisher para 14 procedencias de *Abies religiosa* del cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, México. Un mismo color indica pertenencia a un agrupamiento de medias de Tukey ($P = 0.05$).

Multivariate analysis

Significant differences between provenances were found by analysis of variance for sabinene, o-cymene, terpinolene and α -cubebene ($P < 0.05$) and highly significant differences for (*E,E*)-cosmene and eudesm-7(11)-en-4-ol ($P < 0.0001$). Stepwise analysis identified germacrene D, α -cubebene, germacrene D-4-ol and δ -cadinol ($P < 0.05$) and terpinolene ($P < 0.0001$) as more informative variables.

In addition to the terpenes selected with ANOVA and stepwise analyses, a correlation analysis was performed, removing terpenes highly correlated with each other, except for those commonly found in conifers. Thus, out of the 32 compounds identified, 22 were selected and principal component, correspondence and cluster analyses were performed. According to the principal component and correspondence analyses, three discrete groups were detected corresponding to altitudinal ranges of 200 m: 2 850 to 3 050 m, 3 100 to 3 300 m and 3 350 a 3 540 m.

Principal component analysis

The first five principal components had eigenvalues greater than 1.0 and explain 90 % of the total variance. The first component had an eigenvalue of 7.4 explaining 33.7 % of the total variance. Terpenes such as α -pinene, β -pinene, δ -cadinol and cubenol contributed strongly to the variance of this component, with eigenvectors greater than 0.3. The second component had an eigenvalue of 4.13 explaining 18.8 % of the total variation. The terpenes that contributed significantly to the variation were o-cymene, (*E,E*)-cosmene, pulegone and eudesm-7(11)-en-4-ol. The third component had an eigenvalue of 3.6 contributing 16.3 % of the total variance; the terpenes that had eigenvectors greater than 0.3 were limonene, β -phellandrene and eudesm-7(11)-en-4-ol. The fourth component had an eigenvalue of 2.85 which contributed 12.9 % of the variance; terpenes that had eigenvectors greater than 0.3 were camphene, sabinene and terpinolene. Finally, the fifth component had an eigenvalue of 1.88 contributing 8.5 % of the total variance; the terpenes α -phellandrene, germacrene D and cubenol contributed to this variation. Finally, the fifth component had an eigenvalue of 1.88 that contributed 8.5 % of the total variance; the terpenes α -phellandrene, germacrene D and cubenol contributed to this variation.

Figure 5 shows the distribution of the 14 provenances of *A. religiosa* according to the first three principal components (introduced with the prefix CP), which account for 68.6 % of the total variance explained. Populations below 3 300 m (green squares and red triangles) are more closely related to each other than to

Similar al índice de Menhinick, se demostró mediante una regresión lineal simple que la diversidad de terpenoides disminuye conforme la elevación aumenta ($P = 0.0013$, $R^2 = 0.5919$). Asimismo, la comparación de medias de Tukey estableció tres conjuntos de acuerdo con la diversidad de los terpenos analizados: 1) la procedencia a 2 850 m que es la de mayor diversidad, 2) las procedencias entre los 2 950 a los 3 350 m, incluyendo la procedencia de mayor altitud (3 540 m) con diversidad intermedia y 3) las procedencias entre los 3 400 a los 3 500 m con menor diversidad de terpenos.

Análisis multivariados

Mediante análisis de varianza se encontraron diferencias significativas entre procedencias para sabineno, o-cimeno, terpinoleno y α -cubebeno ($P < 0.05$) y diferencias altamente significativas para (*E,E*)-cosmeno y eudesm-7(11)-en-4-ol ($P < 0.0001$). El análisis *stepwise* identificó a germacreno D, α -cubebeno, germacreno D-4-ol y δ -cadinol ($P < 0.05$) y a terpinoleno ($P < 0.0001$) como variables más informativas.

Además de los terpenos seleccionados con los análisis de varianza y *stepwise*, se hizo un análisis de correlaciones, eliminando los terpenos altamente correlacionados entre sí, a excepción de los que son comúnmente encontrados en coníferas. De esta forma, de los 32 compuestos identificados, se seleccionaron 22 y con ellos se realizaron análisis de componentes principales, de correspondencias y de conglomerados. De acuerdo con los análisis de componentes principales y de correspondencias, se detectaron tres grupos discretos que corresponden a rangos altitudinales de 200 m: 2 850 a 3 050 m, 3 100 a 3 300 m y 3 350 a 3 540 m.

Análisis de componentes principales

Los cinco primeros componentes principales tuvieron valores propios mayores de 1.0 y explican 90 % de la varianza total. El primer componente tuvo un valor propio de 7.4 que explica 33.7 % de la varianza total. Terpenos como α -pineno, β -pineno, δ -cadinol y cubenol contribuyeron fuertemente a la variación de este componente, con autovectores superiores a 0.3. El segundo componente tuvo un valor propio de 4.13 que explica 18.8 % del total de la variación. Los terpenos que contribuyeron de manera importante a la variación fueron o-cimeno, (*E,E*)-cosmeno, pulegona y eudesm-7(11)-en-4-ol. El tercer componente tuvo un valor propio de 3.6 que contribuye con 16.3 % de la varianza total; los terpenos que tuvieron autovectores superiores a 0.3 fueron limoneno, β -felandreno y eudesm-7(11)-en-4-ol. El cuarto componente tuvo un valor propio de 2.85 que contribuyó con 12.9 % de la varianza; los terpenos que tuvieron autovectores mayores de 0.3 fueron canfeno, sabineno y terpinoleno. Para finalizar,

populations above that altitude (blue circles), according to the terpenes that define the first three components.

Correspondence analysis

The correspondence analysis showed a significant P -value (<0.0001) by means of the χ^2 statistic, where the sum of the first two dimensions is 61.4 % of the total variance explained. Figure 6 indicates the distribution of the colored provenances according to the altitudinal group they were assigned to against the first two dimensions yielded by the analysis. The graph shows that low and intermediate altitude sources are in the first quadrant (upper right quarter) and only two altitudes in the second (lower right quarter), which are associated with four of the compounds frequently found in conifers: β -pinene, limonene, camphene and 3-carene; terpenes that serve mostly for protection against pathogens. Higher altitude provenances are distributed in the second, third (lower left) and fourth quadrants (upper left) of the graph.

Cluster analysis

Figure 7 shows the dendrogram identified with cluster analysis according to Ward's clustering method, which statistically marks a cutoff at 0.1592 of semipartial R^2 based on the pseudo t^2 statistic. The dendrogram

el quinto componente tuvo valor propio de 1.88 que contribuyó con 8.5 % de la varianza total; los terpenos α -felandreno, germacreno D y cubenol contribuyeron a dicha variación.

La Figura 5 muestra la distribución de las 14 procedencias de *A. religiosa* en función de los tres primeros componentes principales (se presentan con el prefijo CP), los cuales representan 68.6 % de la varianza total explicada. Las poblaciones por debajo de los 3300 m (cuadrados verdes y triángulos rojos) presentan mayor relación entre sí que con las poblaciones por encima de esa altitud (círculos azules), de acuerdo con los terpenos que definen a los tres primeros componentes.

Análisis de correspondencias

Por medio del estadístico χ^2 se obtuvo que el análisis de correspondencias presenta un valor P significativo (<0.0001), donde la suma de las dos primeras dimensiones es de 61.4 % de la varianza total explicada. La Figura 6 presenta la distribución de las procedencias con colores de acuerdo con el grupo altitudinal al que fueron asignados contra las dos primeras dimensiones que arroja el análisis. En el gráfico se observa que las procedencias de las altitudes baja e intermedia se concentran en el primer cuadrante (cuarto superior derecho) y solo dos altitudes en el segundo (cuarto

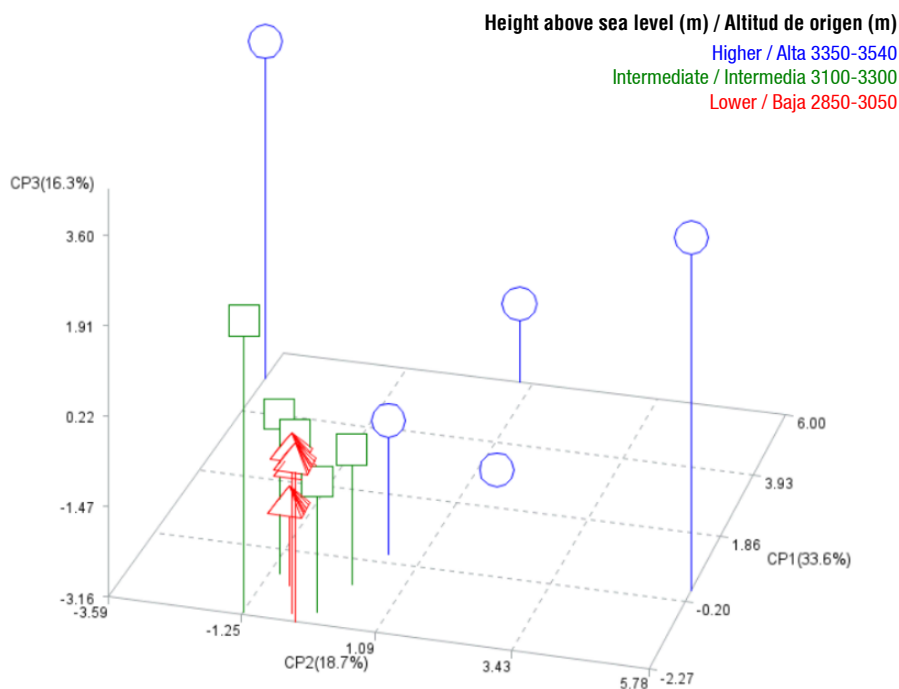


Figure 5. Dispersion of 14 provenances of *Abies religiosa* from Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, Mexico, according to terpenes defining the first three principal components (PC).

Figura 5. Dispersión de 14 procedencias de *Abies religiosa* del cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, México, en función de los terpenos que definen los tres primeros componentes principales (CP).

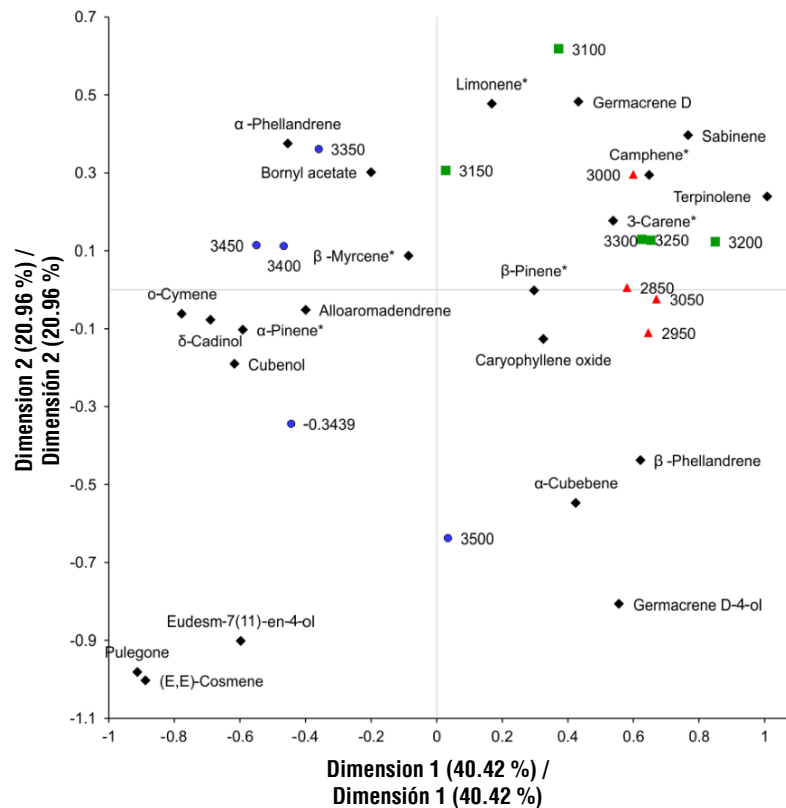


Figure 6. Distribution of *Abies religiosa* provenances according to the correspondence analysis. Red triangles correspond to low altitudes (2850 to 3050 m), green squares were assigned to intermediate altitudes (3100 to 3300 m) and blue circles represent high altitudes (3350 to 3540 m).

Figura 6. Distribución de las procedencias de *Abies religiosa* de acuerdo con el análisis de correspondencias. Triángulos rojos corresponden a las altitudes bajas (2850 a 3050 m), cuadrados verdes se asignaron a las altitudes intermedias (3100 a 3300 m) y los círculos azules representan altitudes elevadas (3350 a 3540 m).

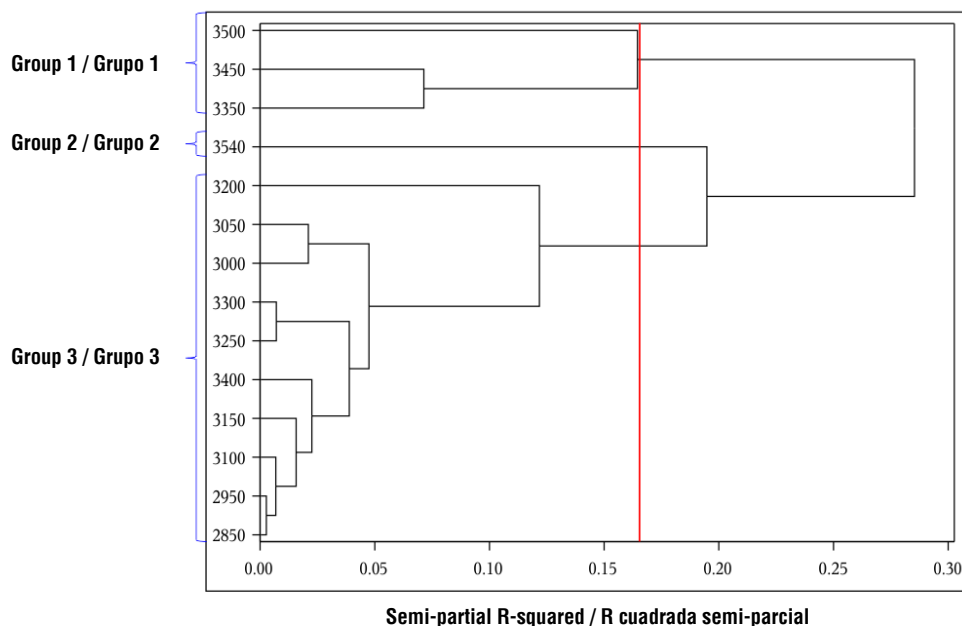


Figure 7. Cluster dendrogram of 14 provenances of *Abies religiosa* from Cerro San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, according to terpene diversity.

Figura 7. Dendrograma de agrupamiento de 14 procedencias de *Abies religiosa* del cerro de San Andrés, Municipio Libre de Hidalgo, Michoacán, en función de la diversidad de terpenos.

reflects an altitudinal clinal pattern; that is, the diversity and concentration of terpenes decrease as altitude increases. There are three groups formed: i) high altitude provenances (3500, 3450 and 3350 m), ii) higher altitude provenance (3540 m) and iii) low to intermediate altitude provenances (2850 to 3300 and 3400 m).

Discussion

The needles of the 14 provenances of *A. religiosa* had 32 compounds, mostly terpenes, specifically monoterpenes. In conifer-dominated sites, monoterpenes are the major compounds in the emission of biogenic volatile organics (Iñíguez et al., 2014; Trowbridge et al., 2021). These metabolites play an important role in tree-insect interactions, because they are a central element of constitutive and inducible defenses of conifers and are an essential component of defensive resins as they are toxic to many herbivores (Pezet et al., 2013; Whitehill et al., 2019); oleoresin secretion is the main form of chemical and mechanical defense (Heredia-Bobadilla et al., 2014).

Several studies have shown that altitudinal variation and chemical diversity of chemical compounds are closely related. Mullin et al. (2021) determined that concentrations of monoterpenes (limonene and 3-carene) and diterpenes increase as elevation increases in populations of *Pinus contorta* Douglas ex Loudon (Lodgepole pine) (western Alberta, Canada). In contrast, Večeřová et al. (2021) found that, in *Picea abies* (L.) Karsten (spruce), the content of β -pinene, α -pinene, sabinene, and α -terpineol decreased substantially at higher altitude, and that the only positively associated monoterpene was 3-carene.

The indices in the present study indicate greater terpene diversity in the provenance at lower altitudes (2850 m) and that as elevation increases, diversity decreases. This is probably because in the lower part of the species distribution, plants are more susceptible to pathogen attack (Rasmann, Pellissier, Defosse, Jactel, & Kunstler, 2014; Rodríguez-Castañeda et al., 2010); Moreira et al. (2014) indicate that altitude is a biotic driver of plant defense evolution. In this regard, several studies have shown that the incidence of herbivore damage, particularly bark beetles in conifers, is higher at lower altitudes when comparing both intraspecific and interspecific variability. For example, in intraspecific variability there is the case of the bark beetle *Ips confusus* Wood & Bright, that attacks *Pinus edulis* Engelm. (pinyon pine) (Santos & Whitham, 2010); in the interspecific, *P. contorta* is found on lower slopes and *Pinus albicaulis* Engelm (whitebark pine) on higher slopes, both continuously exposed to the complex formed by bark beetles and fungi, although

inferior derecho), las cuales se asocian a cuatro de los compuestos encontrados frecuentemente en coníferas: β -pineno, limoneno, canfeno y 3-careno; terpenos que sirven en mayor parte para la protección contra patógenos. Las procedencias de las altitudes más altas se distribuyen en el segundo, tercero (inferior izquierda) y cuarto cuadrantes (superior izquierda) del gráfico.

Análisis de conglomerados

La Figura 7 muestra el dendrograma generado con análisis de conglomerados de acuerdo con el método de agrupamiento de Ward, que estadísticamente marca un corte en 0.1592 de R^2 semiparcial con base en el estadístico pseudo t^2 . El dendrograma refleja un patrón clinal altitudinal; es decir, la diversidad y concentración de los terpenos disminuyen conforme la altitud aumenta. Los grupos formados son tres: i) procedencias de altitudes elevadas (3500, 3450 y 3350 m), ii) procedencia de mayor altitud (3540 m) y iii) procedencias de altitudes bajas a intermedias (2850 a 3300 y 3400 m).

Discusión

Las acículas de las 14 procedencias de *A. religiosa* tuvieron 32 compuestos en su mayoría terpenos, específicamente monoterpenos. En sitios donde predominan las coníferas, los monoterpenos son los compuestos mayoritarios en la emisión de orgánicos volátiles biogénicos (Iñíguez et al., 2014; Trowbridge et al., 2021). Dichos metabolitos juegan un rol importante en las interacciones árbol-insecto, ya que son un elemento central de las defensas constitutivas e inducibles de las coníferas y son un componente esencial de las resinas defensivas al ser tóxicos para muchos herbívoros (Pezet et al., 2013; Whitehill et al., 2019); la secreción de oleoresina es la principal forma de defensa química y mecánica (Heredia-Bobadilla et al., 2014).

Diversos estudios han demostrado que la variación altitudinal y la diversidad química de los compuestos químicos están muy relacionados. Mullin et al. (2021) determinaron que las concentraciones de monoterpenos (limoneno y 3-careno) y diterpenos incrementan a medida que la elevación aumenta en poblaciones de *Pinus contorta* Douglas ex Loudon (pino Lodgepole) (oeste de Alberta, Canadá). En contraste, Večeřová et al. (2021) encontraron que, en *Picea abies* (L.) Karsten (abeto rojo), el contenido de β -pineno, α -pineno, sabineno y α -terpineol se redujo sustancialmente a mayor altitud, y que el único monoterpene asociado positivamente fue 3-careno.

En el presente estudio, los índices indican que existe mayor diversidad de terpenos en la procedencia

in the past *P. albicaulis* was intermittently exposed. In this ecosystem, chemical defense syndromes associated with pine monoterpenes are related to exposure history and thus elevation (Raffa et al., 2017).

Consistent with the diversity indices, principal component and correspondence analyses showed that terpene diversity is higher in provenances below 3350 m and that they are mostly associated with limonene or 3-carene, which act as repellents for herbivore attack (Phillips & Croteau, 1999). Terpinolene, identified as part of a genotype of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. (Sitka spruce), confers resistance to white weevil (*Pissodes strobi* Peck) attack (Robert et al., 2010) and β -pinene found in *Pinus ponderosa* Douglas ex Lawson is synthesized in response to herbivory activity (Litvak & Monson, 1998).

On the other hand, the cluster analysis suggests association among provenances, except for group two, formed by the highest altitude provenance (3550 m), which could have greater similarity with the populations of the lower part. This apparently atypical behavior of the provenance near the peak is possible because it receives pollen from the Michoacán slope on the west side of Cerro San Andrés and from the east side (Estado de México). This is consistent with patterns observed for species of the genus *Betula*, where terpenes have a dominant maternal heritability component, but with influence of pollen (Isidorov Stocki, & Vetchnikova, 2019). Furthermore, this atypical behavior of higher altitudinal provenances has been observed in *Pinus hartwegii* Lindl. at the peak of Pico de Tancitaro, for the composition of isozyme allele frequencies (Viveros-Viveros et al., 2010). The altitudinal clinal pattern for the diversity and concentration of the terpenes found is similar to that of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. and its monoterpenes α -pinene, Δ -3-carene, β -phellandrene and limonene (Lockhart, 1990). Furthermore, the concentration of sesquiterpenes such as geranyl acetate and δ -cadinol decreased as altitude increased in *Pinus yunnanensis* Franch. (Yunnan pine, China) (Hengxiao et al., 1999).

It is important to consider that the results of the present study come from a common garden trial under optimal conditions for plant growth. Therefore, it is possible that terpene abundance could vary if the trial had been conducted under field conditions in the distribution area of *A. religiosa*, as a result of an interaction between genotype and environment; however, because all provenances grew under the same conditions, it is reasonable to assume that terpene diversity varied among populations as a consequence of genetic differences. Clinal patterns have been detected for height, diameter, and survival of this species (Castellanos-Acuña, Lindig-Cisneros,

originada a menor altitud (2850 m) y que conforme la elevación incrementa, la diversidad disminuye. Esto se debe probablemente a que en la parte baja de la distribución de la especie, las plantas son más susceptibles al ataque de patógenos (Rasmann, Pellissier, Defosse, Jactel, & Kunstler, 2014; Rodríguez-Castañeda et al., 2010); Moreira et al. (2014) indican que la altitud es un impulsor biótico de la evolución de la defensa de las plantas. Al respecto, diversos estudios han mostrado que la incidencia de daño por herbívoros, en particular descortezadores en coníferas, es mayor en altitudes menores cuando se compara tanto la variabilidad intraespecífica como la interespecífica. Por ejemplo, en la intraespecífica se encuentra el caso del descortezador *Ips confusus* Wood & Bright. que ataca a *Pinus edulis* Engelm. (piñón colorado) (Santos & Whitham, 2010); en la interespecífica, *P. contorta* se encuentra en las partes bajas de laderas y *Pinus albicaulis* Engelm (pino de corteza blanca) en las altas, ambas expuestas continuamente al complejo formado por escarabajos descortezadores y hongos, aunque en el pasado *P. albicaulis* estaba expuesta de forma intermitente. En este ecosistema, los síndromes de defensa química asociados a los monoterpenos de los pinos están relacionados con la historia de exposición y, por lo tanto, con la elevación (Raffa et al., 2017).

De forma congruente a los índices de diversidad, los análisis de componentes principales y el de correspondencias demostraron que la diversidad de terpenos es mayor en las procedencias menores de 3350 m y que están asociadas mayormente al limoneno o 3-careno que funcionan como repelentes para el ataque de herbívoros (Phillips & Croteau, 1999). En particular el terpinoleno, identificado como parte de un genotipo de *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. (abeto de Sitka), confiere resistencia al ataque del gorgojo blanco (*Pissodes strobi* Peck) (Robert et al., 2010) y β -pineno encontrado en *Pinus ponderosa* Douglas ex Lawson se sintetiza en respuesta a la actividad por herbivoría (Litvak & Monson, 1998).

Por otra parte, el análisis de conglomerados sugiere asociación entre las procedencias, a excepción del grupo dos, formado por la procedencia de mayor altitud (3550 m), que podría tener mayor similitud con las poblaciones de la parte baja. Este comportamiento aparentemente atípico de la procedencia cercana a la cumbre se debe posiblemente a que recibe polen de la vertiente de Michoacán del lado oeste del cerro de San Andrés y también del lado este (Estado de México). Esto es compatible con los patrones observados para especies del género *Betula*, donde los terpenos tienen un componente de heredabilidad materna dominante, pero con influencia de la fuente de polen (Isidorov Stocki, & Vetchnikova, 2019). Además, este comportamiento atípico de procedencias de mayor

Silva-Farias, & Sáenz-Romero, 2014; Ortiz-Bibian et al., 2017; Ortiz-Bibian et al., 2019), meaning that altitudinal variation should be considered in the management and conservation of forest species populations.

Conclusions

Diversity and concentration of terpenes in *Abies religiosa* varied according to the altitude of populations; above 3350 m, diversity was lower, but with higher concentration. The higher terpene diversity at lower altitudes, according to several studies, is a consequence of evolutionary pressures caused by herbivory. Both the diversity indices and the cluster analysis demonstrate the existence of three defined groups; that is, three differentiated chemical profiles that should be considered in the establishment of germplasm collection programs for reforestation and restoration, especially to adapt to the expected effects of climate change.

Acknowledgments

This document is an initiative of the Forest Genetic Resources Working Group of the North American Forestry Commission (FGRWG-NAFC), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Funding is gratefully acknowledged to Dr. Cuauhtémoc Sáenz-Romero of the Monarch Butterfly Fund (Madison, Wisconsin, EUA), of the FGRWG-NAFC and the Coordination of Scientific Research of the UMSNH; Dr. Arnulfo Blanco-García of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Fondo Ciencia Básica-2014-242985) and Dr. Roberto Lindig-Cisneros of PAPIIT-UNAM (AG 200221). To Gabriel Muñoz-Montoya (Queréndaro, Michoacán) and Miguel Ángel Silva-Farias (Servi-Ambiental El Bosque) for access and help in seed collection. To Nancy Izquierdo-Calderón for support in sample extraction and database processing. To Mariela Gómez-Romero, Leonel López-Toledo and Erick de la Barrera Montppellier for their comments on the manuscript. To CONACYT for granting a postgraduate scholarship (413133) and a mixed scholarship to the first author.

End of English version

References / Referencias

- Abbas, F., Ke, Y., Yu, R., Yue, Y., Amanullah, S., Jahangir, M. M., & Fan, Y. (2017). Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. *Planta*, 246(5), 803–816. doi: 10.1007/s00425-017-2749-x
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (4th ed.). Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.

altitud se ha observado en *Pinus hartwegii* Lindl. en la cumbre del Pico de Tancítaro, por la composición de frecuencias alélicas de isoenzimas (Viveros-Viveros et al., 2010). El patrón clinal altitudinal para la diversidad y concentración de los terpenos encontrados es similar al de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. y sus monoterpenos α -pineno, Δ -3-careno, β -felandreno y limoneno (Lockhart, 1990). Asimismo, en *Pinus yunnanensis* Franch. (pino de Yunnan, China), la concentración de sesquiterpenos como el acetato de geranilo y δ -cadinol disminuyeron a medida que la altitud aumentó (Hengxiao et al., 1999).

Es importante considerar que los resultados del presente estudio provienen de un ensayo de jardín común en condiciones propicias para el crecimiento de las plantas. Por ello, es posible que la abundancia de terpenos pudiera variar si el ensayo se hubiera realizado en condiciones de campo en el área de distribución de *A. religiosa*, como resultado de una interacción entre el genotipo y el medio ambiente; sin embargo, debido a que todas las procedencias crecieron bajo las mismas condiciones, es razonable suponer que la diversidad de terpenos varió entre poblaciones como consecuencia de diferencias genéticas. Patrones clinales se han detectado para la altura, diámetro y supervivencia de esta especie (Castellanos-Acuña, Lindig-Cisneros, Silva-Farias, & Sáenz-Romero, 2014; Ortiz-Bibian et al., 2017; Ortiz-Bibian et al., 2019), lo cual implica que la variación altitudinal debe considerarse en el manejo y conservación de las poblaciones de especies forestales.

Conclusiones

La diversidad y concentración de los terpenos en *Abies religiosa* variaron en función de la altitud de las poblaciones; arriba de 3350 m, la diversidad fue más baja, pero con mayor concentración. La mayor diversidad de terpenos a menor altitud, de acuerdo con diversos estudios es consecuencia de presiones evolutivas causadas por la herbivoría. Tanto los índices de diversidad como el análisis de conglomerados demuestran la existencia de tres grupos definidos; es decir, tres perfiles químicos diferenciados que deben considerarse en el establecimiento de programas de recolecta de germoplasma para reforestación y restauración, en particular para adaptarse a los efectos esperados del cambio climático.

Agradecimientos

Este documento es iniciativa del Grupo de Trabajo sobre Recursos Genéticos Forestales de la Comisión Forestal de América del Norte (FGRWG-NAFC, por sus siglas en inglés), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Se agradece el financiamiento al Dr. Cuauhtémoc Sáenz-Romero del

- Agilent Technologies Inc. (2004). MSD ChemStation D.01.02.16. Germany: Author.
- Castellanos-Acuña, D., Lindig-Cisneros, R. A., Silva-Farías, M. Á., & Sáenz-Romero, C. (2014). Provisional altitudinal zoning of *Abies religiosa* in an area near the Monarch Butterfly Biosphere Reserve, Michoacán. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(2), 215–225. doi: 10.5154/r.chscfa.2013.11.041
- Cruzado-Vargas, A. L., Blanco-García, A., Lindig-Cisneros, R., Gómez-Romero, M., Lopez-Toledo, L., de la Barrera, E., & Sáenz-Romero, C. (2021). Reciprocal common garden altitudinal transplants reveal potential negative impacts of climate change on *Abies religiosa* populations in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve overwintering sites. *Forests*, 12(1), 69. doi: 10.3390/f12010069
- García-Rodríguez, Y. M., Bravo-Monzón, Á., Martínez-Díaz, Y., Torres-Gurrola, G., & Espinosa-García, F. J. (2012). Variación fitoquímica defensiva en ecosistemas terrestres. In J. C. Rojas & E. A. Malo (Eds.), *Temas selectos en ecología química de insectos* (pp. 217–252). México: El Colegio de la Frontera Sur.
- García-Rodríguez, Y. M., Torres-Gurrola, G., Meléndez-González, C., & Espinosa-García, F. J. (2016). Phenotypic variations in the foliar chemical profile of *Persea americana* Mill. cv. Hass. *Chemistry & Biodiversity*, 13(12), 1767–1775. doi: 10.1002/cbdv.201600169
- Gómez-Pineda, E., Hammond, W. M., Trejo-Ramírez, O., Gil-Fernández, M., Allen, C. D., Blanco-García, A., & Sáenz-Romero, C. (2022). Drought years promote bark beetle outbreaks in Mexican forests of *Abies religiosa* and *Pinus pseudostrobus*. *Forest Ecology and Management*, 505, 119944. doi: 10.1016/j.foreco.2021.119944
- Gómez-Pineda, E., Sáenz-Romero, C., Ortega-Rodríguez, J. M., Blanco-García, A., Madrigal-Sánchez, X., Lindig-Cisneros, R., ...Rehfeldt, G. E. (2020). Suitable climatic habitat changes for Mexican conifers along altitudinal gradients under climatic change scenarios. *Ecological Applications*, 30(2), e02041. doi: 10.1002/eap.2041
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Retrieved from palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Hengxiao, G., McMillin, J. D., Wagner, M. R., Zhou, J., Zhou, Z., & Xu, X. (1999). Altitudinal variation in foliar chemistry and anatomy of yunnan pine, *Pinus yunnanensis*, and pine sawfly (Hym., Diprionidae) performance. *Journal of Applied Entomology*, 123(8), 465–471. doi: 10.1046/j.1439-0418.1999.00395.x
- Heredia-Bobadilla, R. L., Arzate-Fernández, A. M., Gutiérrez-González, G., Santillán-Benítez, J. G., Cibrián-Tovar, D., & Endara-Agramont, A. R. (2014). Genes de defensa en *Abies religiosa*. *Botanical Sciences*, 92(4), 623–628. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/bs/v92n4/v92n4a14.pdf>
- Hernández-Álvarez, A. G., Reyes-Ortiz, J. L., Villanueva-Díaz, J., & Sánchez-González, A. (2021). Variation in the *Abies religiosa* (Pinaceae) forest structure, at different management and disturbance conditions. *Acta Botánica Mexicana*, (128), e1752. doi: 10.21829/abm128.2021.1752
- Monarch Butterfly Fund (Madison, Wisconsin, EUA), del FGRWG-NAFC y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH; al Dr. Arnulfo Blanco-García del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Fondo Ciencia Básica-2014-242985) y al Dr. Roberto Lindig-Cisneros del PAPIIT-UNAM (AG 200221). A Gabriel Muñoz-Montoya (Queréndaro, Michoacán) y a Miguel Ángel Silva-Farías (Servi-Ambiental El Bosque) por las facilidades de acceso y ayuda en la colecta de semillas. A Nancy Izquierdo-Calderón por el apoyo en la extracción de muestras y procesamiento de base de datos. A Mariela Gómez-Romero, Leonel López-Toledo y Erick de la Barrera Montpellier por las observaciones al manuscrito. A CONACyT por otorgar beca de estudios de posgrado (413133) y beca mixta a la primera autora.

Fin de la versión en español

- Ignazi, G., Mathiasen, P., & Premoli, A. C. (2019). Climatic gradients model genetic diversity in widespread woody trees: the case of *Nothofagus pumilio* in the southern Andes. *Revista Ecosistemas*, 28(1), 35–47. doi: 10.7818/ECOS.1547
- Iñiguez Guillén, R. M., Esqueda Reyes, H. C., Escoto García, T., Guillermo Ochoa, H., Rodríguez Rivas, A., & Contreras Quiñonez, H. J. (2014). Chemical characterization of essential oils and wood extracts from two pine species of La Primavera forest. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 42–57. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v6n28/v6n28a4.pdf>
- Isidorov, V. A., Stocki, M., & Vetchinikova, L. (2019). Inheritance of specific secondary volatile metabolites in buds of white birch *Betula pendula* and *Betula pubescens* hybrids. *Trees*, 33(5), 1329–1344. doi: 10.1007/s00468-019-01861-2
- Kopaczyk, J. M., Warguła, J., & Jelonek, T. (2020). The variability of terpenes in conifers under developmental and environmental stimuli. *Environmental and Experimental Botany*, 104197. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104197
- Litvak, M. E., & Monson, R. K. (1998). Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory. *Oecologia*, 114(4), 531–540. doi: 10.1007/s004420050477
- Lockhart, L. A. (1990). Chemotaxonomic relationships within the Central American closed-cone pines. *Silvae Genetica*, 39(5-6), 173–184. Retrieved from <https://eurekamag.com/research/007/108/007108216.php>
- López-Goldar, X., Villari, C., Bonello, P., Borg-Karlson, A. K., Grivet, D., Zas, R., & Sampedro, L. (2018). Inducibility of plant secondary metabolites in the stem predicts genetic variation in resistance against a key insect herbivore in maritime pine. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1651. doi: 10.3389/fpls.2018.01651
- López-Gómez, V., Arriola Padilla, V. J., & Pérez Miranda, R. (2015). Damages from abiotic and biotic factors in fir (*Abies religiosa* (Kunth) Schldl. et Cham.) forests of the Monarch Butterfly Biosphere Reserve. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(29), 56–73. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v6n29/v6n29a5.pdf>

- Lundborg, L., Fedderwitz, F., Björklund, N., Nordlander, G., & Borg-Karlson, A. -K. (2016). Induced defences change the chemical composition of pine seedlings and influence meal properties of the pine weevil *Hylobius abietis*. *Phytochemistry*, 130, 99–105. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.06.002
- Materić, D., Bruhn, D., Turner, C., Morgan, G., Mason, N., & Gauci, V. (2015). Methods in plant foliar volatile organic compounds research. *Applications in Plant Sciences*, 3(12), 1500044. doi: 10.3732/apps.1500044
- Moreira, X., Mooney, K. A., Rasmann, S., Petry, W. K., Carrillo-Gavilán, A., Zas, R., & Sampedro, L. (2014). Trade-offs between constitutive and induced defences drive geographical and climatic clines in pine chemical defences. *Ecology Letters*, 17(5), 537–546. doi: 10.1111/ele.12253
- Muenchow, J., Dieker, P., Kluge, J., Kessler, M., & von Wehrden, H. (2018). A review of ecological gradient research in the Tropics: identifying research gaps, future directions, and conservation priorities. *Biodiversity and Conservation*, 27(2), 273–285. doi: 10.1007/s10531-017-1465-y
- Mullin, M., Klutsch, J., Cale, J., Hussain, A., Zhao, S., Whitehouse, C., & Erbilgin, N. (2021). Primary and secondary metabolite profiles of lodgepole pine trees change with elevation, but not with latitude. *Journal of Chemical Ecology*, 47(3), 280–293. doi: 10.1007/s10886-021-01249-y
- Oberhauser, K. S., Nail, K. R., & Altizer, S. (2015). *Monarchs in a changing world: biology and conservation of an iconic butterfly*. USA: Cornell University Press.
- Ortiz-Bibian, M. A., Blanco-García, A., Lindig-Cisneros, R. A., Gómez-Romero, M., Castellanos-Acuña, D., Herrerías-Diego, Y., ... Sáenz-Romero, C. (2017). Genetic variation in *Abies religiosa* for quantitative traits and delineation of elevational and climatic zoning for maintaining Monarch Butterfly overwintering sites in Mexico, considering climatic change. *Silvae Genetica*, 66(1), 14–23. doi: 10.1515/sg-2017-0003
- Ortiz-Bibian, M. A., Castellanos-Acuña, D., Gómez-Romero, M., Lindig-Cisneros, R., Silva-Farías, M. Á., & Sáenz-Romero, C. (2019). Variación entre poblaciones de *Abies religiosa* (HBK) Schl. et Cham a lo largo de un gradiente altitudinal. I. Capacidad germinativa de la semilla. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 42(3), 301–308. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v42n3/0187-7380-rfm-42-03-00301.pdf>
- Pellissier, L., Moreira, X., Danner, H., Serrano, M., Salamin, N., van Dam, N. M., & Rasmann, S. (2016). The simultaneous inducibility of phytochemicals related to plant direct and indirect defences against herbivores is stronger at low elevation. *Journal of Ecology*, 104(4), 1116–1125. doi: 10.1111/1365-2745.12580
- Pezet, J., Elkinton, J., Gomez, S., Mckenzie, E. A., Lavine, M., & Preisser, E. (2013). Hemlock woolly adelgid and elongate hemlock scale induce changes in foliar and twig volatiles of eastern hemlock. *Journal of Chemical Ecology*, 39(8), 1090–1100. doi: 10.1007/s10886-013-0300-5
- Phillips, M. A., & Croteau, R. B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*, 4(5), 184–190. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01401-6
- Pichersky, E., & Raguso, R. A. (2018). Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytologist*, 220(3), 692–702. doi: 10.1111/nph.14178
- Pokorska, O., Dewulf, J., Amelynck, C., Schoon, N., Šimpraga, M., Steppe, K., & Van Langenhove, H. (2012). Isoprene and terpenoid emissions from *Abies alba*: Identification and emission rates under ambient conditions. *Atmospheric Environment*, 59, 501–508. doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.04.061
- Premoli, A. C., Acosta, M. C., Mathiasen, P., & Donoso, C. (2012). Genetic variation in *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*). *Bosque (Valdivia)*, 33(2), 115–125. doi: 10.4067/S0717-92002012000200001
- R Development Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from R-project.org/
- Raffa, K. F., Mason, C. J., Bonello, P., Cook, S., Erbilgin, N., Keefover-Ring, K., ... Townsend, P. A. (2017). Defence syndromes in lodgepole-whitebark pine ecosystems relate to degree of historical exposure to mountain pine beetles. *Plant, Cell & Environment*, 40(9), 1791–1806. doi: 10.1111/pce.12985
- Rasmann, S., Pellissier, L., Defosse, E., Jactel, H., & Kunstler, G. (2014). Climate-driven change in plant-insect interactions along elevation gradients. *Functional Ecology*, 28(1), 46–54. doi: 10.1111/1365-2435.12135
- Robert, J. A., Madilao, L. L., White, R., Yanchuk, A., King, J., & Bohlmann, J. (2010). Terpenoid metabolite profiling in Sitka spruce identifies association of dehydroabietic acid,(+)-3-carene, and terpinolene with resistance against white pine weevil. *Botany*, 88(9), 810–820. doi: 10.1139/B10-049
- Rodríguez-Castañeda, G., Dyer, L. A., Brehm, G., Connahs, H., Forkner, R. E., & Walla, T. R. (2010). Tropical forests are not flat: how mountains affect herbivore diversity. *Ecology Letters*, 13(11), 1348–1357. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01525.x
- Rodríguez Trejo, D. A., Aparicio Lechuga, M., Lara Bueno, A., Uribe Gómez, M., & Ramírez Castell, P. (2021). *Abies* Mill. (Pinaceae). In D. A. Rodríguez Trejo (Ed.), *Semillas de especies forestales* (pp. 3–14). Estado de México, México: División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.
- Rubin-Aguirre, A., Saenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R., del-Rio-Mora, A., Tena-Morelos, C., Campos-Bolaños, R., & Del-Val, E. (2015). Bark beetle pests in an altitudinal gradient of a Mexican managed forest. *Forest Ecology and Management*, 343, 73–79. doi: 10.1016/j.foreco.2015.01.028
- Sáenz-Romero, C., Lamy, J. B., Ducousso, A., Musch, B., Ehrenmann, F., Delzon, S., ... Hansen, J. K. (2017). Adaptive and plastic responses of *Quercus petraea* populations to climate across Europe. *Global Change Biology*, 23(7), 2831–2847. doi: 10.1111/gcb.13576
- Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R. A., Joyce, D. G., Beaulieu, J., St Clair, J. B., & Jaquish, B. C. (2016). Assisted migration of forest populations for adapting trees to climate change. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 22(3), 303–323. doi: 10.5154/r.rchscfa.2014.10.052

- Sáenz-Romero, C., Rehfeldt, G. E., Duval, P., & Lindig-Cisneros, R. A. (2012). *Abies religiosa* habitat prediction in climatic change scenarios and implications for monarch butterfly conservation in Mexico. *Forest Ecology and Management*, 275, 98–106. doi: 10.1016/j.foreco.2012.03.004
- Santos, M. J., & Whitham, T. G. (2010). Predictors of *Ips confusus* outbreaks during a record drought in southwestern USA: implications for monitoring and management. *Environmental Management*, 45(2), 239–249. doi: 10.1007/s00267-009-9413-6
- SAS Institute Inc. (2015). SAS Institute (version 9.4.TS Level 1 M3). Cary, North Carolina, USA: Author.
- Sosa Díaz, L., Méndez González, J., García Aranda, M. A., Cambrón Sandoval, V. H., Villarreal Quintanilla, J. Á., Ruiz González, C. G., & Montoya Jiménez, J. C. (2018). Distribución potencial de barrenadores, defoliadores, descortezadores y muérdagos en bosques de coníferas de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(47), 187–208. doi: 10.29298/rmcf.v9i47.159
- Stein, S. E., Mirokhin, Y., Tchekhovskoi, D., & Mallard, G. (2012). NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (Version 2.0). Gaithersburg, USA: National Institute of Standards and Technology. Retrieved from <https://chemdata.nist.gov/>
- Taft, S., Najar, A., Godbout, J., Bousquet, J., & Erbilgin, N. (2015). Variations in foliar monoterpenes across the range of jack pine reveal three widespread chemotypes: implications to host expansion of invasive mountain pine beetle. *Frontiers in Plant Science*, 6, 342. doi: 10.3389/fpls.2015.00342
- Trowbridge, A. M., Adams, H. D., Collins, A., Dickman, L. T., Grossiord, C., Hofland, M., ...Stoy, P. C. (2021). Hotter droughts alter resource allocation to chemical defenses in piñon pine. *Oecologia*, 197(4), 921–938. doi:10.1007/s00442-021-05058-8
- Večeřová, K., Klem, K., Veselá, B., Holub, P., Grace, J., & Urban, O. (2021). Combined effect of altitude, season and light on the accumulation of extractable terpenes in Norway spruce needles. *Forests*, 12(12), 1737. doi: 10.3390/f12121737
- Viveros-Viveros, H., Tapia-Olivares, B. L., Sáenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., Santacruz-Varela, A., & Ramírez-Valverde, G. (2010). Isoenzymatic variation of *Pinus hartwegii* Lindl. along an altitudinal gradient in Michoacán, México. *Agrociencia*, 44(6), 723–733. Retrieved from www.scielo.org.mx/pdf/agro/v44n6/v44n6a11.pdf
- Whitehill, J. G., Yuen, M. M., Henderson, H., Madilao, L., Kshatriya, K., Bryan, J., ... Bohlmann, J. (2019). Functions of stone cells and oleoresin terpenes in the conifer defense syndrome. *New Phytologist*, 221(3), 1503–1517. doi: 10.1111/nph.15477
- Zas Arregui, R., & Sampedro Pérez, L. (2015). Resistencia de los pinos a plagas y enfermedades: nuevas oportunidades de control fitosanitario. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 39, 259–273. doi: 10.31167/csef.v0i39.17466
- Zenkevich, I. G. (2010). Kovats' retention index system. In J. Cazes (Ed.), *Encyclopedia of chromatography* (3rd ed., pp. 1304–1310). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.

