

# Ability of morphological traits from needles and cones to identify *Pinus pseudostrabus* Lindl. varieties

## Potencial de caracteres morfológicos de acículas y conos en la identificación de variedades de *Pinus pseudostrabus* Lindl.

Sebastián Escobar-Alonso; J. Jesús Vargas-Hernández\*; Javier López-Upton

Colegio de Postgraduados, Postgrado en Ciencias Forestales. km 36.5 carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

\*Corresponding author: [vargashj@colpos.mx](mailto:vargashj@colpos.mx); tel.: +52 595 114 9020.

### Abstract

**Introduction:** *Pinus pseudostrabus*, a species of ecological and economic importance in Mexico, has a wide distribution and intraspecific variation, which generates controversy regarding the identification of its operational taxonomic units (OTU).

**Objectives:** To evaluate morphological traits of cones and needles of *P. pseudostrabus* to distinguish varieties and identify traits with greater discriminatory capacity.

**Materials and methods:** Twelve traits in cones and 20 in needles were measured on samples from 153 trees identified in four putative OTU. Univariate and multivariate ANOVA, variance component estimation and canonical discrimination analysis (CDA) with cross-validation were carried out.

**Results and discussion:** Thirteen needle and 12 cone traits showed significant differences between OTU. The variance between OTU increased 6.8 %, on average, when considering the varieties *oaxacana* and *apulcensis* as distinct OTU. Multivariate analysis confirmed significant differences in foliage and cones between OTU. The variation explained by the CDA increased from 0.35 to 0.74 and 0.76 when using foliage, cones, and overall variables, respectively. Eight cone traits allowed discrimination among OTU with average error of 9.2 %.

**Conclusions:** Despite the wide intraspecific variation, it was possible to differentiate the main OTU of *P. pseudostrabus* with cone morphological markers, with important implications for a better management of genetic resources of this species. The present study shows evidence of morphoanatomical differences between *oaxacana* and *apulcensis* varieties.

**Keywords:** canonical discrimination; operational taxonomic unit; morphological variation; *oaxacana* variety; *apulcensis* variety.

### Resumen

**Introducción:** *Pinus pseudostrabus*, especie de importancia ecológica y económica en México, tiene amplia distribución y variación intraespecífica, lo que genera controversias en la identificación de sus unidades taxonómicas operativas (UTO).

**Objetivos:** Evaluar características morfológicas de conos y acículas de *P. pseudostrabus* para distinguir variedades e identificar caracteres con mayor capacidad de discriminación.

**Materiales y métodos:** Se midieron 12 caracteres en conos y 20 en acículas en muestras de 153 árboles identificados en cuatro UTO putativas. Se realizaron análisis de varianza univariada y multivariada, estimación de componentes de varianza y discriminación canónica (ADC) con validación cruzada.

**Resultados y discusión:** Trece características de acículas y 12 de conos mostraron diferencias significativas entre UTO. La varianza entre UTO aumentó 6.8 %, en promedio, al considerar las variedades *oaxacana* y *apulcensis* como UTO distintas. El análisis multivariado confirmó diferencias significativas en el follaje y conos entre UTO. La variación explicada por el ADC aumentó de 0.35 a 0.74 y 0.76 al utilizar variables de follaje, conos y en conjunto, respectivamente. Ocho caracteres de conos permitieron la discriminación entre UTO con error promedio de 9.2 %.

**Conclusiones:** A pesar de la amplia variación intraespecífica fue posible distinguir las principales UTO de *P. pseudostrabus* con marcadores morfológicos de conos, con implicaciones importantes hacia un mejor manejo de los recursos genéticos de la especie. El trabajo muestra evidencias de diferencias morfoanatómicas entre las variedades *oaxacana* y *apulcensis*.

**Palabras clave:** discriminación canónica; unidad taxonómica operativa; variación morfológica; variedad *oaxacana*; variedad *apulcensis*.

## Introduction

*Pinus pseudostrabus sensu lato* is one of the most important native species in Mexico due to its wide natural distribution, ecological conditions of its habitat, productivity, and wood quality (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, López-Upton, & Vargas-Hernández, 2005). Its distribution extends from the highlands of Honduras and Guatemala to the states of Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Mexico, Morelos, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, and Veracruz (Perry, 1991), with some populations in Durango and Nuevo León (Farjon & Styles, 1997) Mexico. A 250 km wide strip in the Isthmus of Tehuantepec (Oaxaca and Veracruz) divides the populations of Chiapas and Central America from those of central Mexico; the northern populations are separated from the central region by a similar gap (Farjon & Styles, 1997). Because of the extent and discontinuity of its natural distribution, the species has wide intraspecific variation (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, Vargas-Hernández, & López-Upton, 2006), an important issue for the management and use of its genetic resources (Des Roches et al., 2018).

*Pinus pseudostrabus* was described in 1839 by John Lindley with botanical samples collected in Angangueo, Michoacán (World Checklist of Vascular Plants [WCVP], 2020). Several varieties or operational taxonomic units (OTU) have been proposed, considering the wide intraspecific variation it harbors. Some of these OTUs are accepted by some authors and rejected by others, which has generated significant controversy. In 1839, Lindley also described *P. apulcensis*, which in 1909 George Shaw considered a variety of *P. pseudostrabus* (var. *apulcensis* Shaw), and which currently has several heterotypic synonyms such as *P. oaxacana*, *P. pseudostrabus* var. *oaxacana* and *P. oaxacana* var. *diversiformis* (WCVP, 2020). *Pinus pseudostrabus* var. *oaxacana* was classified as a species (*P. oaxacana*) due to its resin chemistry (Mirov, 1958). Maximino Martínez proposed it as a variety in 1948, believing that the pronounced apophysis distinguish the populations of Oaxaca and Veracruz from the samples used to describe var. *apulcensis*, originally from Apulco, Hidalgo (Farjon, 1995; Farjon & Styles, 1997). On the other hand, var. *coatepecensis* (Perry, 1991), also proposed by Martínez, was rejected by Farjon and Styles (1997) and is considered a synonymy of var. *pseudostrabus* (WCVP, 2020). Other authors claim that only var. *apulcensis* is worthy of being considered a variety of *P. pseudostrabus* and its main distinctive feature is the apophysis height (Farjon & Styles, 1997; Farjon & Filer, 2013).

There is uncertainty and controversy over the definition of the UTOs of this species, while, in the field, collectors and academics in Mexico use the varieties proposed by Martínez since 1948. Identification and characterization of intraspecific

## Introducción

*Pinus pseudostrabus sensu lato* es una de las especies nativas de México más importantes por la amplitud de su distribución natural, las condiciones ecológicas de su hábitat, productividad y calidad de madera (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, López-Upton, & Vargas-Hernández, 2005). Su distribución se extiende desde las tierras altas de Honduras y Guatemala hasta los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Jalisco, Michoacán, México, Morelos, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala y Veracruz (Perry, 1991), con algunas poblaciones en Durango y Nuevo León (Farjon & Styles, 1997) en México. Una franja de 250 km de ancho en el istmo de Tehuantepec (Oaxaca y Veracruz) separa a las poblaciones de Chiapas y Centroamérica de las del centro de México; las poblaciones del norte están separadas del centro por una brecha similar (Farjon & Styles, 1997). Por la extensión y discontinuidad de su distribución natural, la especie tiene amplia variación intraespecífica (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, Vargas-Hernández, & López-Upton, 2006), aspecto importante en el manejo y utilización de sus recursos genéticos (Des Roches et al., 2018).

*Pinus pseudostrabus* fue descrito en 1839 por John Lindley con muestras botánicas recolectadas en Angangueo, Michoacán (World Checklist of Vascular Plants [WCVP], 2020). Dada la amplia variación intraespecífica que alberga se han propuesto diversas variedades o unidades taxonómicas operativas (UTO). Algunas de estas UTO son aceptadas por ciertos autores y rechazadas por otros, lo que ha generado una controversia importante. En 1839, Lindley también describió la especie *P. apulcensis*, que en 1909 George Shaw consideró como una variedad de *P. pseudostrabus* (var. *apulcensis* Shaw), y que en la actualidad presenta varios sinónimos heterotípicos como *P. oaxacana*, *P. pseudostrabus* var. *oaxacana* y *P. oaxacana* var. *diversiformis* (WCVP, 2020). *Pinus pseudostrabus* var. *oaxacana* fue considerada como especie (*P. oaxacana*) debido a la química de su resina (Mirov, 1958). Maximino Martínez la propuso como variedad en 1948, al considerar que la apófisis pronunciada distingue a las poblaciones de Oaxaca y Veracruz de las muestras utilizadas para describir a la var. *apulcensis*, originarias de Apulco, Hidalgo (Farjon, 1995; Farjon & Styles, 1997). Por otro lado, la var. *coatepecensis* (Perry, 1991) también propuesta por Martínez fue rechazada por Farjon y Styles (1997) y se considera una sinonimia de la var. *pseudostrabus* (WCVP, 2020). Otros autores afirman que solo la var. *apulcensis* es digna de considerarse una variedad de *P. pseudostrabus* y su principal característica diferencial es la altura de la apófisis (Farjon & Styles, 1997; Farjon & Filer, 2013).

La incertidumbre y controversia sobre la definición de las UTO de la especie prevalecen, mientras que, en

OTUs of *P. pseudostrabus* is difficult in part due to their large variability in morphological traits (Stead, 1983; Stead & Styles, 1984; Farjon, 1995), associated with the extent and geographic discontinuity of their habitat and interaction of evolutionary forces influencing magnitude and structure of genetic variation, such as natural selection and genetic drift (Bussotti, Pollastrini, Holland, & Brüggemann, 2015; Caruso, Maherali, & Martin, 2020). In addition, the phylogenetic and reproductive proximity with other pines favors natural hybridization in overlapping areas of its geographic distribution (Delgado et al., 2007; Hernández-Velasco et al., 2021), which makes intraspecific OTUs difficult to characterize and describe; for example, introgressive hybridization has been detected with *Pinus montezumae* Lamb. (Delgado et al., 2007), *P. douglasiana* Martínez (López-Reyes, Pérez de la Rosa, Ortiz, & Gernandt, 2015) and possible hybridization with *P. arizonica* var. *stormiae* (Martínez) Silva (Gernandt, Hernández-León, Salgado-Hernández, & Pérez de la Rosa, 2009).

Over and above the taxonomic approach, it is important to identify morphological markers that facilitate the differentiation of the species' varieties because some of them may have adaptive value, useful for the more efficient management, use and conservation of genetic resources of the species and its congeners. By using multivariate analysis techniques, it is possible to integrate variations and interrelationships of these markers. Canonical discrimination analysis allows maximizing the variance between groups and minimizing the variance within groups with linear functions or canonical variables, which can increase the ability to discriminate between individuals belonging to different OTU (Faisal, Haq, & Iqbal, 2021). This approach has been used in studies for the analysis and interpretation of variation in cone and foliage traits in species such as *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Reyes-Hernández, Vargas-Hernández, López-Upton, & Vaquera-Huerta, 2005, 2006), species of the *Pseudotsuga* group (Stead, 1983; Stead & Styles, 1984), *Pinus hartwegii* Lindl. (Iglesias, Solís-Ramos, & Viveros-Viveros, 2012) and the *P. strobiformis*-*P. ayacahuite* complex (Leal-Sáenz et al., 2020).

The objectives of this study were (i) to evaluate the potential of morphological and anatomical traits of needles and cones to identify *P. pseudostrabus* varieties, especially between the varieties *oaxacana* and *apulcensis*; and (ii) to identify traits with greater capacity to discriminate the OTUs of this species in the south-central region of its natural range in Mexico. The hypotheses were: (i) the morphological traits of cones are more efficient than those of needles to discriminate the OTU of *P. pseudostrabus*, but the discrimination capacity increases when using both groups of traits; and (ii) in addition to apophysis height, there are other

campo, recolectores y académicos en México utilizan las variedades propuestas por Martínez desde 1948. La dificultad para la identificación y caracterización de las UTO intraespecíficas de *P. pseudostrabus* se debe en parte a su gran variabilidad en las características morfológicas (Stead, 1983; Stead & Styles, 1984; Farjon, 1995), asociada a la amplitud y discontinuidad geográfica de su hábitat y a la interacción de fuerzas evolutivas que influyen sobre la magnitud y estructura de la variación genética, como la selección natural y deriva genética (Bussotti, Pollastrini, Holland, & Brüggemann, 2015; Caruso, Maherali, & Martin, 2020). Además, la cercanía filogenética y reproductiva con otros pinos propicia hibridación de manera natural en áreas de traslape de su distribución geográfica (Delgado et al., 2007; Hernández-Velasco et al., 2021), lo que dificulta la caracterización y descripción de las UTO intraespecíficas; por ejemplo, se ha detectado hibridación introgresiva con *Pinus montezumae* Lamb. (Delgado et al., 2007), *P. douglasiana* Martínez (López-Reyes, Pérez de la Rosa, Ortiz, & Gernandt, 2015) y una posible hibridación con *P. arizonica* var. *stormiae* (Martínez) Silva (Gernandt, Hernández-León, Salgado-Hernández, & Pérez de la Rosa, 2009).

Más allá del enfoque taxonómico es importante la identificación de marcadores morfológicos que permitan la diferenciación de las variedades de la especie porque algunos de ellos pueden tener valor adaptativo, útiles para el manejo, aprovechamiento y conservación más eficientes de los recursos genéticos de la especie y sus congéneres. Con técnicas de análisis multivariado es posible integrar la variación y las interrelaciones de dichos marcadores. En particular, el análisis de discriminación canónica permite maximizar la varianza entre grupos y minimizar la varianza dentro de grupos con funciones lineales o variables canónicas, lo que puede aumentar la capacidad de discriminación entre individuos pertenecientes a diferentes UTO (Faisal, Haq, & Iqbal, 2021). Este enfoque se ha usado en estudios para el análisis e interpretación de la variación de características de conos y follaje en especies como *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Reyes-Hernández, Vargas-Hernández, López-Upton, & Vaquera-Huerta, 2005, 2006), especies del grupo *Pseudotsuga* (Stead, 1983; Stead & Styles, 1984), *Pinus hartwegii* Lindl. (Iglesias, Solís-Ramos, & Viveros-Viveros, 2012) y el complejo *P. strobiformis*-*P. ayacahuite* (Leal-Sáenz et al., 2020).

Los objetivos del estudio fueron (i) evaluar el potencial de las características morfológicas y anatómicas de acículas y conos para distinguir a las variedades de *P. pseudostrabus*, en particular entre las variedades *oaxacana* y *apulcensis*; e (ii) identificar variables con mayor capacidad de discriminación de las UTO de esta especie en la región centro-sur de su área de distribución natural en México. Las hipótesis fueron:

morphological and anatomical traits that facilitate discrimination between varieties of the species.

## Materials and methods

### Plant material

Samples of foliage and mature female strobili (cones) from the upper part of the crown were collected from 153 trees from various localities (Figure 1). We sampled 66 individuals of the typical variety *P. pseudostrabus* var. *pseudostrabus* (Chiapas, Mexico, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala, and Veracruz), 60 of *oaxacana* (Chiapas, Oaxaca, Puebla, and Veracruz), 17 of *coatepecensis* (Veracruz) and 10 of *apulcensis* (Hidalgo).

### Morphological and anatomical traits evaluated

Five healthy and developed fascicles (*i. e.*, formed the previous year) and five mature, well-developed cones without apparent defects or malformations were selected from each tree. Information on 20 needle and 12 cone traits was collected using the methodology described by Stead (1983).

In foliage, the number of needles per fascicle (NN), sheath length (SL, cm), length (NL, cm) and thickness (NT, mm) of the longest needle in the fascicle, needle

(i) las características morfológicas de conos son más eficientes que las de acículas para discriminar las UTO de *P. pseudostrabus*, pero la capacidad de discriminación aumenta al utilizar ambos grupos de características; y (ii) además de la altura de la apófisis, existen otros caracteres morfológicos y anatómicos que facilitan la discriminación entre variedades de la especie.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se recolectaron muestras de follaje y de estróbilos femeninos maduros (conos) de la parte superior de la copa en 153 árboles de varias localidades (Figura 1). Se muestrearon 66 individuos de la variedad típica *P. pseudostrabus* var. *pseudostrabus* (Chiapas, México, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala y Veracruz), 60 de *oaxacana* (Chiapas, Oaxaca, Puebla y Veracruz), 17 de *coatepecensis* (Veracruz) y 10 de *apulcensis* (Hidalgo).

### Características morfológicas y anatómicas analizadas

Cinco fascículos sanos y desarrollados (*i. e.*, formados el año anterior) y cinco conos maduros, bien desarrollados, sin defectos o malformaciones aparentes se seleccionaron de cada árbol. Se obtuvo información

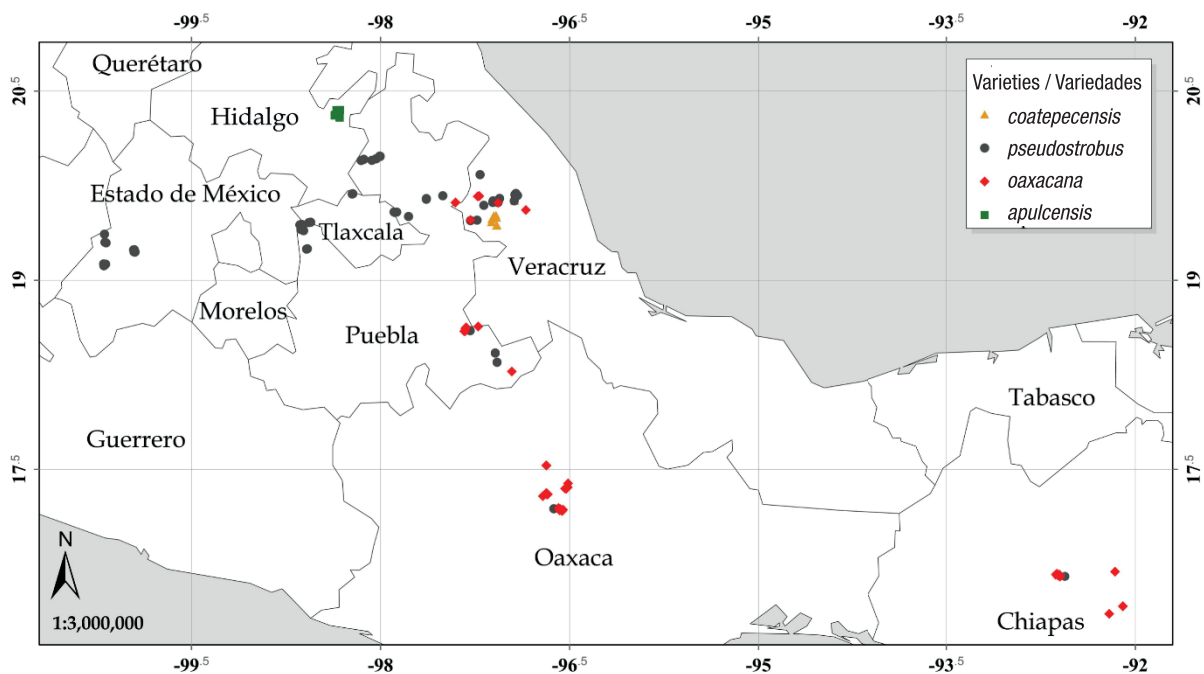


Figure 1. Geographical location of trees sampled for each variety of *Pinus pseudostrabus*.

Figura 1. Localización geográfica de los árboles muestreados en cada variedad de *Pinus pseudostrabus*.



shape coefficient ( $NSc = NT/NL$ ,  $\text{mm}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) and sheath/needle ratio ( $SR = SL/NL$ ) were measured. Also, number of 'teeth' (NT), lines with stomata (LS), number of stomata per line (NS), and total stomata ( $TS = LS \times NS$ ) were counted in the mid-section of the longest needle, 5 mm from the dorsal side. In cross sections of the middle section of the same needle, the total number of resin canals ( $RC_T$ ) with external ( $RC_E$ ), internal ( $RC_I$ ), middle ( $RC_M$ ) and septal ( $RC_S$ ) position was counted, and the proportion of resin canals with middle position was calculated ( $PRC_M = RC_M/RC_T$ ). Similarly, the number of intrusions of the hypodermis into the endoderm, number of hypodermal cells touching the endoderm ( $CH_E$ ), number of endodermal cells on the dorsal surface of the vascular bundle (EC) and the  $RC_H$  ratio ( $RC_H = CH_E/EC$ ) were counted.

In closed cones, the length of the peduncle (PL, mm), length ( $CL_C$ , mm) and maximum diameter ( $CD_C$ , mm) of the cone were measured and their shape coefficient was calculated ( $CS_C = CL_C/CD_C$ ); they were then dried at room temperature to open the scales and extract the seeds. Once the cones were opened, the maximum diameter ( $CD_O$ ) was measured, and their degree of openness was calculated ( $OD_C = CD_O/CD_C$ ). Three fertile scales were separated from the central part of each cone and the width ( $W_A$ , mm), depth ( $D_A$ , mm) and height ( $H_A$ , mm) of the apophysis were measured and the ratios between them were calculated ( $R_{WD} = W_A/D_A$ ,  $R_{WH} = W_A/H_A$  and  $R_{DH} = D_A/H_A$ ).

### Statistical analysis

Univariate and multivariate analysis of variance was performed to determine the magnitude of trait variation between and within the OTUs, and to evaluate their ability to discriminate the putative varieties of *P. pseudostrobus*. In the univariate analysis, the MIXED procedure of SAS® version 9.4 (Statistical Analysis Software Inc., 2015) was used to estimate mean values for each putative variety and, when there were significant differences ( $\alpha = 0.05$ ), comparisons between varieties were made with Tukey's test. The discrete variables were transformed with the square root function to meet the criteria of normality and homoscedasticity; however, the results were similar to those of the original variables, so it was decided to present the analyses of the non-transformed values. In the multivariate analysis, carried out with the GLM procedure of SAS, the statistical significance of the variety effect was determined and the *oaxacana* and *apulcensis* varieties were compared by a contrast, using needle and cone traits separately.

To evaluate the effect of considering the *oaxacana* and *apulcensis* varieties as different UTOs, variance components were estimated for the variables that were

de 20 características de acículas y 12 de conos con la metodología descrita por Stead (1983).

En follaje se midió el número de acículas por fascículo (NA), longitud de vaina (LV, cm), longitud (LA, cm) y grosor (GA, mm) de la acícula más larga del fascículo, coeficiente de forma de la acícula ( $CF_A = GA/LA$ ,  $\text{mm}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y la relación vaina-acícula ( $RV = LV/LA$ ). Asimismo, en la sección media de la acícula más larga, en 5 mm de la cara dorsal, se contaron las serraciones o 'dientes' (ND), líneas con estomas (LE), estomas por línea (NE) y estomas totales ( $ET = LE \times NE$ ). En cortes transversales de la sección media de la misma acícula se contó el número total de canales resiníferos ( $CR_T$ ) con posición externa ( $CR_E$ ), interna ( $CR_I$ ), media ( $CR_M$ ) y septal ( $CR_S$ ), y se calculó la proporción de canales resiníferos con posición media ( $PCR_M = CR_M/CR_T$ ). Del mismo modo se contó el número de intrusiones de la hipodermis en el endodermo, el número de células hipodérmicas que tocan el endodermo ( $CH_E$ ), el número de células endodérmicas en la superficie dorsal del haz vascular (CE) y la relación  $RC_H$  ( $CH_E/CE$ ).

En conos cerrados se midió la longitud del pedúnculo (mm), la longitud ( $LC_C$ , mm) y diámetro máximo ( $DC_C$ , mm) del cono y se calculó su coeficiente de forma ( $CF_C = LC_C/DC_C$ ); después se secaron a temperatura ambiente para abrir las escamas y extraer las semillas. Una vez abiertos los conos, se midió el diámetro máximo ( $DC_A$ ) y se calculó su grado de apertura ( $GA_C = DC_A/DC_C$ ). De la parte central de cada cono se separaron tres escamas fértiles a las cuales se midió el ancho ( $A_A$ , mm), profundidad ( $P_A$ , mm) y altura ( $Alt_A$ , mm) de la apófisis y con estos datos se calcularon las relaciones entre ellas ( $R_{AP} = A_A/P_A$ ,  $R_{AAlt} = A_A/Alt_A$  y  $R_{PAlt} = P_A/Alt_A$ ).

### Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza univariado y multivariado para determinar la magnitud de variación de las características entre y dentro de las UTO, y evaluar su capacidad para la discriminación de las variedades putativas de *P. pseudostrobus*. En el análisis univariado se utilizó el procedimiento MIXED de SAS® versión 9.4 (Statistical Analysis Software Inc., 2015) para estimar los valores promedio de cada variedad putativa y, en los casos donde hubo diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ), se hicieron comparaciones entre variedades con la prueba de Tukey. Las variables discretas se transformaron con la función raíz cuadrada para cumplir con los criterios de normalidad y homoscedasticidad; sin embargo, los resultados fueron similares a los de las variables originales, por lo que se decidió presentar los análisis de los valores sin transformación. En el análisis multivariado, realizado con el procedimiento GLM de SAS, se determinó la significancia estadística del efecto de la variedad y se compararon las variedades

significant in the univariate analysis. The VARCOMP procedure of SAS® (2015) was used with two alternative models: the first one considered the four putative OTU, while the second one grouped the samples of *oaxacana* and *apulcensis* in the same OTU.

The discriminatory ability of needle and cone traits was determined using a canonical discriminant analysis (CDA) with each group of variables separately and together. The 'candisc' function (Friendly, Fox, & Friendly, 2021) of the R software v. 3.6.1 (R Core Team, 2020) was used to estimate the canonical variables (CV) and the graphical representation of the canonical structure. Linear functions (discrimination criterion) and their cross-validation were calculated with the 'lda' and 'predict' functions of the MASS package with the same "a priori" probability (25 %) of membership (R Core Team, 2020; Ripley et al., 2021). Prior to CDA, the STEPDISC procedure (SAS, 2015) was used for the selection of variables from each group with significant contribution ( $P \leq 0.05$ ) to the discrimination model.

## Results and discussion

### Morphological differentiation for needles and cones

Table 1 shows that the four *P. pseudostrabus* OTUs under study were differentiated by needle morphology, as differences were found in 13 of the 20 traits evaluated ( $P \leq 0.05$ ); variables related to resin canals and hypodermal cells were not significant ( $P > 0.1617$ ). Although the coefficient of needle shape, sheath length, number of needles, number of intrusions of the hypodermis into the endoderm and the proportion of resin canals with middle position were significant ( $P \leq 0.05$ ), the mean comparison test showed no differences in the average values of varieties, probably due to the imbalance in the sample size of the varieties compared. In the case of stomata per line and total stomata, the values were higher for *apulcensis* variety compared to *oaxacana* variety.

Table 1 indicates that cone morphology also showed differences between the variants of the species. Variety had a significant effect on all variables evaluated for cones ( $P \leq 0.0110$ ). Except for closed cone length, in all cases significant differences were found between *oaxacana* and *apulcensis* with contrasting mean values for peduncle length, open cone diameter, cone shape coefficient, depth and height of the apophysis. Multivariate analysis on needles and cones showed significant differences between varieties according to Wilks' Lambda, Pillai's trace and Hotelling's trace statistics ( $P < 0.0001$ ), as well as the contrast between *oaxacana* and *apulcensis*, with a Wilks' Lambda of 0.0411 for needle traits and  $<0.0001$  for cone traits.

*oaxacana* y *apulcensis* por medio de un contraste y el uso de características de acículas y conos por separado.

Para evaluar el efecto de las variedades *oaxacana* y *apulcensis* como UTO distintas, se estimaron los componentes de varianza en las variables que resultaron significativas en el análisis univariado. Se utilizó el procedimiento VARCOMP de SAS® (2015) con dos modelos alternativos: el primero consideró las cuatro UTO putativas, mientras que el segundo agrupó las muestras de las var. *oaxacana* y *apulcensis* en la misma UTO.

La capacidad de discriminación de las características de acículas y conos se determinó con un análisis discriminante canónico (ADC) con cada grupo de variables por separado y en conjunto. Se utilizó la función 'candisc' (Friendly, Fox, & Friendly, 2021) del software R v. 3.6.1 (R Core Team, 2020) para estimar las variables canónicas (VC) y la representación gráfica de la estructura canónica. Las funciones lineales (criterio de discriminación) y su validación cruzada se calcularon con las funciones 'lda' y 'predict' del paquete MASS con la misma probabilidad (25 %) a priori de pertenencia (R Core Team, 2020; Ripley et al., 2021). Previamente al ADC se utilizó el procedimiento STEPDISC (SAS, 2015) para la selección de las variables de cada grupo con aportación significativa ( $P \leq 0.05$ ) al modelo de discriminación.

## Resultados y discusión

### Diferenciación morfológica en acículas y conos

El Cuadro 1 muestra que las cuatro UTO estudiadas de *P. pseudostrabus* se diferencian por la morfología de acículas, ya que en 13 de las 20 características evaluadas se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ); las variables relacionadas con canales resiníferos y células hipodérmicas no fueron significativas ( $P > 0.1617$ ). Aunque el coeficiente de forma de la acícula, longitud de vaina, número de acículas, número de intrusiones de la hipodermis en el endodermo y la proporción de canales resiníferos con posición media resultaron significativas ( $P \leq 0.05$ ), la prueba de comparación de medias no mostró diferencias en los valores promedio de las variedades, posiblemente debido al desbalance en el tamaño de muestra de las variedades comparadas. En el caso de estomas por línea y totales, los valores resultaron mayores para la variedad *apulcensis* en comparación con *oaxacana*.

El Cuadro 1 indica que la morfología en conos también mostró diferencias entre las variantes de la especie. La variedad tuvo efecto significativo en todas las variables evaluadas en conos ( $P \leq 0.0110$ ). Con excepción de

**Table 1. Statistical significance ( $P$ ) of the effect of varieties ( $F_{\text{var}}$ ) and average values of the morphological traits of needles and cones in *Pinus pseudostrobus* varieties.**

**Cuadro 1. Significancia estadística ( $P$ ) del efecto de variedades ( $F_{\text{var}}$ ) y valores promedio de las características morfológicas de acículas y conos en las variedades de *Pinus pseudostrobus*.**

Traits/Características	$P(F_{\text{var}})$	<i>coatepecensis</i>	<i>pseudostrobus</i>	<i>oaxacana</i>	<i>apulcensis</i>
<b>Needles/Acículas</b>					
Number of needles/ Número de acículas	0.0193	5.05 a	4.97 a	5.00 a	5.06 a
Length of needle (cm)/ Longitud de acícula (cm)	<0.0001	20.44 b	21.93 ab	24.88 a	24.92 a
Needle thickness (mm)/ Grosor de acícula (mm)	0.0003	0.87 c	0.92 bc	0.95 ab	1.04 a
Sheath length (cm)/ Longitud de vaina (cm)	0.0175	2.23 a	2.10 a	2.25 a	2.34 a
Needle shape coefficient (mm·cm <sup>-1</sup> )/ Coeficiente forma acícula (mm·cm <sup>-1</sup> )	0.0059	0.04 a	0.04 a	0.03 a	0.04 a
Ratio sheath length/needle length/ Relación longitud vaina/longitud acícula	0.0003	0.11 a	0.09 ab	0.09 b	0.09 ab
Number of teeth/ Número de dientes	0.0248	22.64 ab	23.00 a	21.08 b	22.51 ab
Stomata lines/ Líneas de estoma	<0.0001	3.38 c	4.46 ab	4.22 b	5.18 a
Stomata per line/ Estomas por línea	<0.0001	64.10 a	63.60 a	60.30 b	64.50 a
Total stomata/ Estomas totales	<0.0001	215.60 d	282.10 b	254.20 c	333.30 a
Total resin canals/ Canales resiníferos totales	0.2422	3.32	3.30	3.13	3.45
External resin canals/ Canales resiníferos externos	0.1854	0.18	0.17	0.09	0.24
Internal resin canals/ Canales resiníferos internos	0.1758	0.06	0.15	0.07	0.15
Middle resin canals/ Canales resiníferos medios	0.6839	3.09	2.98	2.96	3.06
Septal resin canals/ Canales resiníferos septales	0.4312	0.00	0.00	0.01	0.00
Hypodermal intrusions/ Intrusiones de hipodermis	0.0345	0.09 a	0.22 a	0.36 a	0.09 a
Hypodermal cells/ Células hipodérmicas	0.1686	0.11	0.34	0.50	0.14
Endodermal cells/ Células endodérmicas	0.0007	9.80 b	10.50 a	10.58 a	11.28 a
Middle resin canals ratio/ Relación canales resiníferos medios	0.0389	0.95 a	0.92 a	0.96 a	0.90 a
Ratio of hypodermal cells/ Relación células hipodérmicas	0.1617	0.01	0.03	0.05	0.01

**Table 1. Statistical significance (*P*) of the effect of varieties ( $F_{var}$ ) and average values of the morphological traits of needles and cones in *Pinus pseudostrabus* varieties. (cont.)****Cuadro 1. Significancia estadística (*P*) del efecto de variedades ( $F_{var}$ ) y valores promedio de las características morfológicas de acículas y conos en las variedades de *Pinus pseudostrabus*. (cont.)**

Traits/Características	$P(F_{var})$	<i>coatepecensis</i>	<i>pseudostrabus</i>	<i>oaxacana</i>	<i>apulcensis</i>
<b>Cones/Conos</b>					
Peduncle length (mm)/ Longitud pedúnculo (mm)	<0.0001	17.98 a	11.44 c	7.57 d	14.44 b
Closed cone length (mm)/ Longitud cono cerrado (mm)	0.0110	91.80 b	99.51 ab	99.59 ab	110.27 a
Closed cone diameter (mm)/ Diámetro cono cerrado (mm)	<0.0001	43.74 c	45.30 c	59.52 a	51.83 b
Open cone diameter (mm)/ Diámetro cono abierto (mm)	<0.0001	62.05 b	63.60 b	79.12 a	61.29 b
Cone shape coefficient/ Coeficiente forma cono	<0.0001	2.11 a	2.23 a	1.70 b	2.12 a
Cone opening degree/ Grado apertura de cono	<0.0001	1.42 a	1.41 a	1.34 a	1.18 b
Apophysis width (mm)/ Ancho apófisis (mm)	<0.0001	14.50 b	15.49 b	17.26 a	15.42 b
Apophysis depth (mm)/ Profundidad de apófisis (mm)	<0.0001	11.46 c	13.61 b	14.88 a	11.23 c
Apophysis height (mm)/ Altura apófisis (mm)	<0.0001	2.97 c	5.00 b	9.29 a	4.52 cb
Apophysis width/depth ratio/ Relación ancho/profundidad apófisis	0.0060	1.29 ab	1.17 b	1.19 b	1.37 a
Apophysis width/height ratio/ Relación ancho/altura apófisis	<0.0001	5.08 a	3.47 b	2.03 c	3.44 b
Apophysis depth/height ratio/ Relación profundidad/altura apófisis	<0.0001	4.03 a	3.00 b	1.72 c	2.51 b

Mean values ( $n = 153$ ) in the same row with different letters are significantly different between varieties according to the Tukey's test ( $P = 0.05$ ).

Valores promedio ( $n = 153$ ) en una misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes entre variedades de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P = 0.05$ ).

### Variance structure between and within varieties

The variance structure changed when differentiating var. *oaxacana* from *apulcensis*. According to Table 2, when considering the four varieties, the variance between OTU ( $\sigma^2_{var}$ ) increased between 0.1 and 14.7 % (average 6.8 %) with higher increases in the stomata per line and total needles variables, and in apophysis height, peduncle length and open cone diameter. The increase was most evident in traits with significant variation between varieties (Table 1). The increase in between-group variance and reduction in within-group variance ( $\sigma^2_{arb(var)}$ ) (*i. e.*, greater within-variety homogeneity) when subdividing one or more groups is interpreted as evidence of needle and cone morphological differentiation between the two OTUs that were separated in the model. Perry (1991) discriminated the varieties because *oaxacana* has a longer, more

la longitud de cono cerrado, en todos los casos se encontraron diferencias significativas entre *oaxacana* y *apulcensis* con valores promedio contrastantes en longitud del pedúnculo, diámetro de cono abierto, coeficiente de forma de cono, profundidad y altura de la apófisis. El análisis multivariado en acículas y conos mostró diferencias significativas entre variedades de acuerdo con los estadísticos de Lambda de Wilks, traza de Pillai y traza de Hotelling ( $P < 0.0001$ ), así como el contraste entre *oaxacana* y *apulcensis*, con una Lambda de Wilks de 0.0411 en los caracteres de acículas y  $<0.0001$  en los de conos.

### Estructura de variación entre y dentro de variedades

La estructura de la varianza cambió al distinguir a la var. *oaxacana* de *apulcensis*. De acuerdo con el Cuadro 2, al considerar las cuatro variedades, la varianza entre



**Table 2. Variance components between ( $\sigma^2_{\text{var}}$ ) and within varieties ( $\sigma^2_{\text{arb}(\text{var})}$ ) of needle and cone traits of *Pinus pseudostrobus* in the alternative models with three and four varieties.**

**Cuadro 2. Componentes de varianza entre ( $\sigma^2_{\text{var}}$ ) y dentro de variedades ( $\sigma^2_{\text{arb}(\text{var})}$ ) de características de acículas y conos de *Pinus pseudostrobus* en los modelos alternativos con tres y cuatro variedades.**

Traits / Características	Three varieties / Tres variedades		Four varieties / Cuatro variedades	
	$\sigma^2_{\text{var}}$ (%)	$\sigma^2_{\text{arb}(\text{var})}$ (%)	$\sigma^2_{\text{var}}$ (%)	$\sigma^2_{\text{arb}(\text{var})}$ (%)
<b>Needles / Acículas</b>				
Length / Longitud	22.5	77.5	20.8	79.2
Thickness / Grosor	8.4	91.6	5.5	94.5
Sheath length/needle length/ Longitud vaina/longitud acícula	8.8	91.2	8.9	91.1
Number of teeth / Número de dientes	8.2	91.8	9.6	90.4
Lines of stomata / Líneas de estomas	5.9	94.1	8.0	92.0
Stomata per line / Estomas por línea	13.0	87.0	18.5	81.5
Total stomata / Estomas totales	7.1	92.9	13.1	86.9
Endodermal cells / Células endodérmicas	3.0	97.0	3.3	96.7
<b>Cones / Conos</b>				
Peduncle length / Longitud pedúnculo	33.5	66.5	48.2	51.8
Closed cone length / Longitud cono cerrado	1.3	98.7	1.0	99.0
Closed cone diameter / Diámetro cono cerrado	62.9	37.1	69.1	30.9
Open cone diameter / Diámetro cono abierto	44.7	55.3	58.9	41.1
Cone shape coefficient / Coeficiente de forma	53.7	46.3	63.8	36.2
Cone opening degree / Grado apertura	14.9	85.1	11.0	89.0
Apophysis width / Ancho apófisis	23.1	76.9	29.1	70.9
Apophysis depth / Profundidad apófisis	9.4	90.6	21.5	78.5
Apophysis height / Altura apófisis	54.1	45.9	68.7	31.3
Apophysis width/depth ratio / Relación ancho/profundidad apófisis	1.7	98.3	3.4	96.6
Apophysis width/height ratio / Relación ancho/altura apófisis	48.0	52.0	57.0	43.0
Apophysis depth/height ratio / Relación profundidad/altura apófisis	57.2	42.8	62.7	37.3

prominent, and erect cone umbo than var. *apulcensis*; he also mentions that the needles are shorter and the cones longer in *apulcensis*, although no differences were found in this study (Table 1).

### Important traits for variety discrimination

According to Table 3, the STEPDISC analysis considered seven needle traits and eight cone traits as the most important for discriminating putative OTU. Among the selected cone traits, apophysis height stands out, which is important in the taxonomic identification of the OTU, especially for var. *oaxacana* (Farjon, Pérez de la Rosa, & Styles, 1997; Perry, 1991); however, peduncle length, cone shape coefficient and degree of opening, apophysis depth and depth/height ratio, length of closed cone and diameter of open cone were also important in differentiating varieties, which had not been reported in previous studies.

In the joint analysis, 11 variables were selected, all eight from cones and three from needles: total stomata, middle resin canals and endodermal cells, the latter was not selected in the separate analysis (Table 3). Although NL was not important in the joint analysis, this trait and those related to resin canals were useful in the study by Delgado et al. (2007) to differentiate between putative hybrids of *P. pseudostrabus*; also, needle number and length, and middle resin canals showed wide variation with a clinal pattern in *P. patula* (Dvorak, Jordan, Romero, Hodge, & Furman, 2001). The variance explained by unselected needle traits in the joint analysis, especially needle length, may be contained in the cone variables by the correlations observed with the apophysis depth/height ratio ( $r = -0.42$ ), apophysis height ( $r = 0.41$ ) and open cone diameter ( $r = 0.37$ ).

### Canonical discrimination analysis

According to Table 4, the canonical correlation ( $C_r$ ) was significant ( $P \leq 0.0271$  for all canonical variables (CV). In needle  $CV_1$  explained 58 % of the variance between varieties, while in cone  $CV_1$  explained 72 %, and 68 % in the joint analysis (Table 4; Figure 2). The  $c_r$  value between the canonical values of individuals and the first two canonical variables were higher ( $0.64 \leq c_r \leq 0.87$ ) in the cone and joint analysis compared to the needle analysis ( $0.48 \leq c_r \leq 0.59$ ). That is, needle traits showed lower ability to separate varieties (Figure 2a). In contrast, the first two CV of cone traits separate three of the varieties, but there is overlap between var. *pseudostrabus* and *apulcensis* (Figure 2b). Although the inclusion of needle traits does not add additional information to that of cones in discriminating the first three varieties, it does reduce the overlap between var. *pseudostrabus* and *apulcensis* (Figure 2c).

UTO ( $\sigma^2_{var}$ ) aumentó entre 0.1 y 14.7 % (promedio 6.8 %) con mayor incremento en las variables estomas por línea y totales en acícula, y en altura de la apófisis, longitud de pedúnculo y diámetro de cono abierto. El aumento fue más evidente en las características con variación significativa entre variedades (Cuadro 1). El aumento en la varianza entre grupos y la reducción de la varianza dentro de grupos ( $\sigma^2_{arb(var)}$ ) (i. e., mayor homogeneidad dentro de variedades) al subdividir uno o más grupos, se interpreta como una evidencia de la diferenciación morfológica de acículas y conos entre las dos UTO que se separaron en el modelo. Perry (1991) discriminó las variedades basado en que *oaxacana* tiene el umbo de los conos más largo, prominente y erecto que la var. *apulcensis*; además, menciona que las hojas son más cortas y los conos más largos en *apulcensis*, aunque en este estudio no se encontraron diferencias (Cuadro 1).

### Características importantes en la discriminación de variedades

De acuerdo con el Cuadro 3, el análisis STEPDISC consideró siete características de acículas y ocho de conos como las más importantes para la discriminación de las UTO putativas. En las características seleccionadas de conos resalta la altura de la apófisis, importante en la identificación taxonómica de las UTO, en especial para la var. *oaxacana* (Farjon, Pérez de la Rosa, & Styles, 1997; Perry, 1991); sin embargo, la longitud del pedúnculo, coeficiente de forma y grado de apertura de cono, profundidad y relación profundidad/altura de la apófisis, longitud de cono cerrado y diámetro de cono abierto también fueron importantes en la distinción de las variedades, las cuales no habían sido reportadas en otros estudios.

En el análisis conjunto, 11 variables se seleccionaron, las ocho de conos y tres de acículas: estomas totales, canales resiníferos medios y células endodérmicas, esta última no resultó seleccionada en el análisis por separado (Cuadro 3). A pesar de que LA no fue importante en el análisis conjunto, esta variable y las relacionadas con canales resiníferos fueron útiles en el estudio de Delgado et al. (2007) para distinguir entre híbridos putativos de *P. pseudostrabus*; de igual manera, el número y longitud de acícula y los canales resiníferos medios mostraron amplia variación con un patrón clinal en *P. patula* (Dvorak, Jordan, Romero, Hodge, & Furman, 2001). La varianza explicada por las características de acículas no seleccionadas en el análisis conjunto, en especial la longitud, puede estar contenida en las variables de conos por las correlaciones observadas con la relación profundidad/altura de la apófisis ( $r = -0.42$ ), altura de la apófisis ( $r = 0.41$ ) y diámetro de cono abierto ( $r = 0.37$ ).

**Table 3. Partial coefficient of determination ( $r^2$ ) and significance ( $\lambda$  = Lambda Wilks; CCC = Canonical correlation coefficient) of needle and cone traits selected with the STEPDISC procedure, separately and together, for discrimination of *Pinus pseudostrobus* varieties.**

**Cuadro 3. Coeficiente de determinación parcial ( $r^2$ ) y significancia ( $\lambda$  = Lambda Wilks; CCCP = Correlación canónica cuadrada promedio) de las características de acículas y conos seleccionadas con el procedimiento STEPDISC por separado y en conjunto para la discriminación de variedades de *Pinus pseudostrobus*.**

Order/ Orden	Characteristic/Característica	Partial $r^2$ / $r^2$ parcial	Significance indicators/ Indicadores de significancia		
			Pr > F	Pr < $\lambda$	Pr > CCC
<b>Needles/Acículas</b>					
1	Total stomata/Estomas totales	0.1962	<0.0001	<0.0001	<0.0001
2	Needle length/Longitud de acícula	0.1648	<0.0001	<0.0001	<0.0001
3	Middle resin canals/Canales resiníferos medios	0.0967	0.0018	<0.0001	<0.0001
4	Sheath length/needle length/ Longitud vaina/longitud acícula	0.0702	0.0137	<0.0001	<0.0001
5	Stomata per line/Estomas por línea	0.0684	0.0162	<0.0001	<0.0001
6	Number of needles/Número de acículas	0.0602	0.0296	<0.0001	<0.0001
7	Lines of stomata/Líneas de estomas	0.0606	0.0296	<0.0001	<0.0001
<b>Cones/Conos</b>					
1	Apophysis height/Altura apófisis	0.5760	<0.0001	<0.0001	<0.0001
2	Peduncle length/Longitud pedúnculo	0.3314	<0.0001	<0.0001	<0.0001
3	Cone shape coefficient/ Coeficiente forma cono	0.2200	<0.0001	<0.0001	<0.0001
4	Apophysis depth/height ratio/ Profundidad/altura apófisis	0.2117	<0.0001	<0.0001	<0.0001
5	Cone opening degree/Grado apertura cono	0.1392	<0.0001	<0.0001	<0.0001
6	Apophysis depth/Profundidad apófisis	0.1183	0.0004	<0.0001	<0.0001
7	Closed cone length/Longitud cono cerrado	0.1160	0.0005	<0.0001	<0.0001
8	Open cone diameter/Diámetro cono abierto	0.1141	0.0006	<0.0001	<0.0001
<b>Needles and cones/Acículas y conos</b>					
1	Apophysis height/Altura apófisis	0.5760	<0.0001	<0.0001	<0.0001
2	Peduncle length/Longitud pedúnculo	0.3314	<0.0001	<0.0001	<0.0001
3	Cone shape coefficient/ Coeficiente forma cono	0.2200	<0.0001	<0.0001	<0.0001
4	Apophysis depth/height ratio/ Profundidad/altura apófisis	0.2117	<0.0001	<0.0001	<0.0001
5	Cone opening degree/Grado apertura cono	0.1392	0.0002	<0.0001	<0.0001
6	Apophysis depth/Profundidad apófisis	0.1183	0.0004	<0.0001	<0.0001
7	Closed cone length/Longitud cono cerrado	0.1160	0.0014	<0.0001	<0.0001
8	Open cone diameter/Diámetro cono abierto	0.1141	0.0023	<0.0001	<0.0001
9	Total stomata/Estomas totales	0.0799	0.0088	<0.0001	<0.0001
10	Endodermal cells/Células endodérmicas	0.0746	0.0119	<0.0001	<0.0001
11	Middle resin canals/ Canales resiníferos medios	0.0616	0.0302	<0.0001	<0.0001

**Table 4. Summary of canonical variables (CV) for *Pinus pseudostrabus* variety discrimination based on needle and cone traits selected in the separate and joint analyses.****Cuadro 4. Resumen de variables canónicas (VC) para la discriminación de variedades de *Pinus pseudostrabus* con base en las características de acículas y conos seleccionadas en los análisis por separado y en conjunto.**

CV/VC	$r_c^*$	$r_c^{2**}$	Eigenvalue/ Autovalor	Proportion explained/ Proporción explicada	Cumulative proportion/ Proporción acumulada	Pr > F
Needles / Acículas						
1	0.59	0.35	0.53	0.58	0.58	<0.0001
2	0.48	0.23	0.29	0.32	0.90	<0.0001
3	0.29	0.08	0.09	0.10	1.00	0.0271
Cones / Conos						
1	0.86	0.74	2.97	0.72	0.72	<0.0001
2	0.64	0.41	0.68	0.17	0.89	<0.0001
3	0.55	0.31	0.44	0.11	1.00	<0.0001
Needles and cones / Acículas y conos						
1	0.87	0.76	3.08	0.68	0.68	<0.0001
2	0.70	0.49	0.94	0.21	0.89	<0.0001
3	0.59	0.34	0.52	0.11	1.00	<0.0001

 $r_c^*$  = canonical correlation.  $r_c^{2**}$  = squared canonical correlation. $r_c^*$  = correlación canónica.  $r_c^{2**}$  = correlación canónica cuadrada.

The canonical structure matrix shows the raw relationship between needle and cone traits with CV (Table 5). The coefficients represent the relative contribution of each trait to CV. In needles, the traits total stomata (TS) and lines with stomata (LS) are the most important associated with  $CV_1$ , and needle length (NL) and number of stomata (NS) with  $CV_2$ ; in cones, the traits apophysis height ( $H_A$ ) and depth ( $D_A$ ), as well as their ratio ( $R_{DH}$ ) are the most important associated with  $CV_1$ , while open cone diameter ( $CD_o$ ) and cone shape coefficient ( $CS_c$ ) are important in  $CV_1$  and  $CV_2$ . In the joint analysis, no needle trait is relevant for  $CV_1$ , but TS and endodermal cells (EC) are important in  $CV_2$  and contribute to the separation of var. *apulcensis* from the others (Figure 2c).

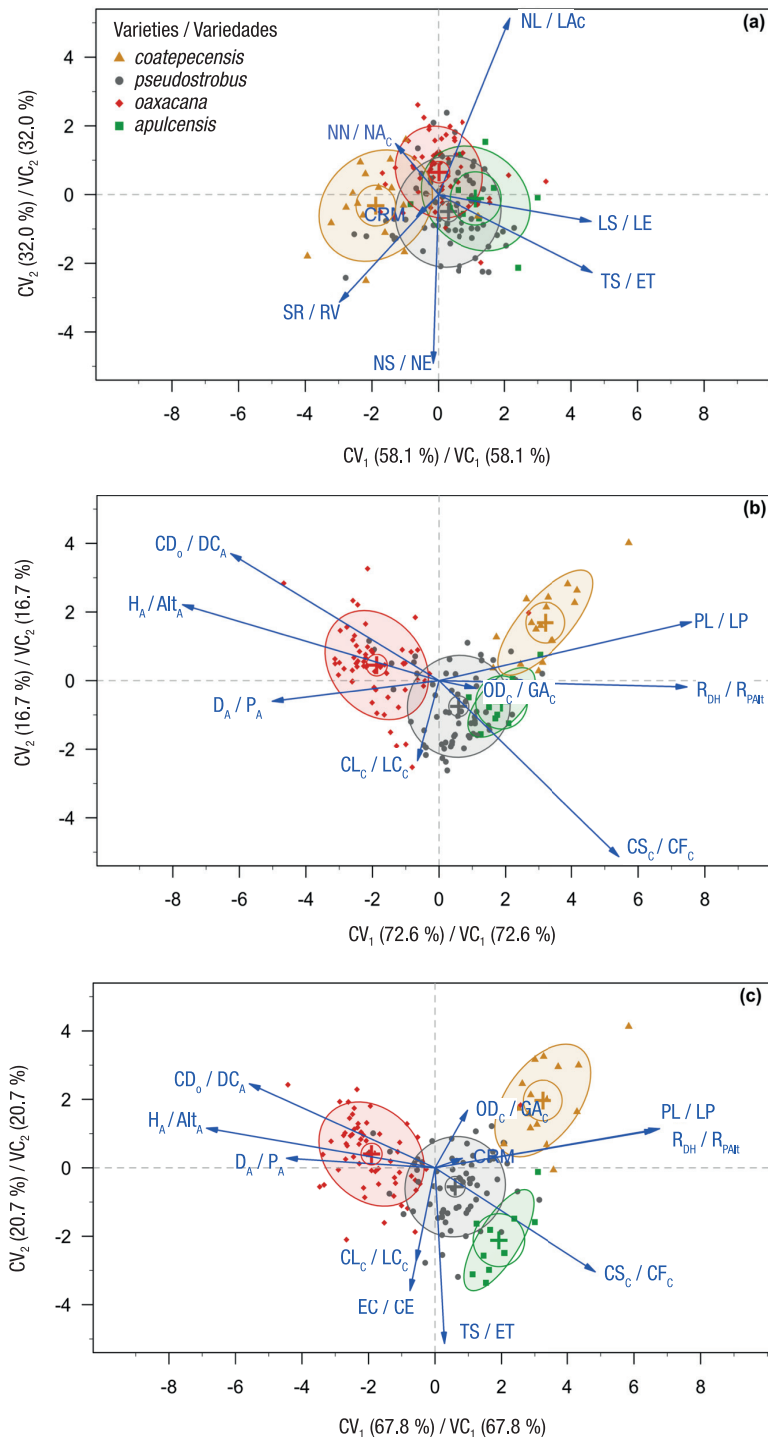
The morphological similarity of cones between var. *pseudostrabus* and *apulcensis* may be due to the semi-sympatric relationship they share (Carvajal & McVaugh, 1992) and the wide variability of the former, especially the apophysis height, which sometimes hinders its distinction (Farjon et al., 1997); however, when foliage traits are added, differentiation capacity increases (Figure 1c). It appears that the number of stomata and endodermal cells, associated with the size of the vascular bundle, are useful for distinguishing varieties.

### Análisis de discriminación canónica

Acorde con el Cuadro 4, la correlación canónica ( $r_c$ ) resultó significativa ( $P \leq 0.0271$  para todas las variables canónicas (VC). En las de acículas,  $VC_1$  explica 58 % de la varianza entre variedades, mientras que en las de conos  $VC_1$  explica 72 %, y 68 % en el análisis conjunto (Cuadro 4; Figura 2). El valor de  $r_c$  entre los valores canónicos de los individuos y las dos primeras variables canónicas fueron mayores ( $0.64 \leq r_c \leq 0.87$ ) en el análisis de conos y conjunto que en el de acículas ( $0.48 \leq r_c \leq 0.59$ ). Esto es, las características de acículas mostraron menor capacidad de discriminación entre variedades (Figura 2a). En cambio, las dos primeras VC de las características de conos separan tres de las variedades, pero existe traslape entre var. *pseudostrabus* y *apulcensis* (Figura 2b). Aunque la inclusión de las características de acículas en general no agrega información adicional a la de conos en la discriminación de las primeras tres variedades, sí reduce el traslape de var. *pseudostrabus* y *apulcensis* (Figura 2c).

La matriz de estructura canónica muestra la relación bruta entre las variables de acículas y conos con las VC (Cuadro 5). Los coeficientes representan la contribución relativa de cada característica a las VC. En acículas, las





**Figure 2.** Structure of canonical variables (CV<sub>1</sub> and CV<sub>2</sub>) of morphoanatomical traits of needles (a), cones (b) and as a whole (c) differentiating four putative varieties of *Pinus pseudostrobus*. Needles: LS = lines with stomata, TS = total stomata, SR = sheath /needle ratio, NS = number of stomata, NN = needles per fascicle, NL = needle length, EC = endodermal cells. Cones: CD<sub>o</sub> = open cone diameter, H<sub>A</sub> = apophysis height, D<sub>A</sub> = apophysis depth, CL<sub>C</sub> = closed cone length, CS<sub>C</sub> = cone shape coefficient, R<sub>DH</sub> = apophysis depth/height ratio, PL = peduncle length, OD<sub>C</sub> = openness degree.

**Figura 2.** Estructura de las variables canónicas (VC<sub>1</sub> y VC<sub>2</sub>) de características morfoanatómicas de acículas (a), conos (b) y en conjunto (c) en la discriminación de cuatro variedades putativas de *Pinus pseudostrobus*. Acículas: LE = líneas con estomas, ET = estomas totales, RV = relación longitud vaina-longitud acícula, NE = número de estomas, NAC = acículas por fascículo, LAC = longitud de la acícula, CE = células endodérmicas. Conos: DC<sub>A</sub> = diámetro de cono abierto, Alt<sub>A</sub> = altura de la apósis, P<sub>A</sub> = profundidad de la apósis, LC<sub>C</sub> = longitud de cono cerrado, CF<sub>C</sub> = coeficiente de forma, R<sub>PAit</sub> = relación profundidad/altura de la apósis, LP = longitud del pedúnculo, GA<sub>C</sub> = grado de apertura.

**Table 5. Within-class standardized canonical coefficients (SCC) and total canonical structure coefficients (TSC) associated with *Pinus pseudostrobus* needle and cone traits in the separate and joint analyses to estimate canonical variables (CV).**

**Cuadro 5. Coeficientes canónicos estandarizados (CCE) dentro de clase y coeficientes de estructura canónica total (CECT) asociados a características de acículas y conos de *Pinus pseudostrobus* en los análisis separados y conjunto para estimar las variables canónicas (VC).**

Characteristics/Característica	CCE			CECT		
	CV <sub>1</sub>	CV <sub>2</sub>	CV <sub>3</sub>	CV <sub>1</sub>	CV <sub>2</sub>	CV <sub>3</sub>
Needles/Acículas						
Total stomata/Estomas totales	5.705	2.734	-2.673	0.672	-0.329	-0.426
Needle length/Longitud de acícula	-0.134	0.699	-0.527	0.314	0.745	-0.221
Middle resin canals/Canales resiníferos medios	-0.632	-0.008	-0.055	-0.096	-0.093	-0.241
Sheath length/needle length/ Longitud vaina/longitud acícula	-0.527	0.066	-0.533	-0.432	-0.454	-0.263
Stomata per line/Estomas por línea	-1.808	-1.554	0.483	-0.023	-0.713	-0.384
Number of needles/Número de acículas	-0.296	0.138	-0.608	-0.188	0.215	-0.709
Lines of stomata/Líneas de estomas	-4.651	-3.108	2.502	0.668	-0.113	-0.279
Cones/Conos						
Apophysis height/Altura apófisis	0.143	0.933	-0.109	-0.852	0.244	-0.167
Peduncle length/Longitud pedúnculo	0.529	0.437	-0.129	0.840	0.189	-0.053
Cone shape coefficient/Coeficiente forma	-1.943	-1.117	2.599	0.599	-0.567	0.272
Apophysis depth/height/ Profundidad/altura apófisis	0.705	1.007	0.237	0.825	-0.020	0.443
Cone opening degree/Grado apertura cono	1.447	0.439	-1.225	0.122	-0.025	0.672
Apophysis depth/Profundidad apófisis	-0.569	-0.598	0.457	-0.554	-0.066	0.270
Closed cone length/Longitud cono cerrado	2.186	0.320	-2.945	-0.072	-0.258	-0.366
Open cone diameter/Diámetro cono abierto	-1.937	0.137	2.285	-0.692	0.409	-0.098
Needles and cones/Acículas y conos						
Apophysis height/Altura apófisis	0.223	0.506	-0.594	-0.848	0.143	-0.256
Peduncle length/Longitud pedúnculo	0.568	0.261	-0.330	0.836	0.141	-0.133
Cone shape coefficient/Coeficiente forma	-1.912	0.493	3.084	0.598	-0.375	0.495
Apophysis depth/height/Coeficiente forma cono	0.759	0.760	-0.319	0.821	0.136	0.388
Cone opening degree/Grado apertura cono	1.432	-0.404	-1.438	0.121	0.208	0.586
Apophysis depth/Profundidad apófisis	-0.614	-0.145	0.741	-0.552	0.035	0.262
Closed cone length/Longitud cono cerrado	2.111	-1.101	-2.952	-0.071	-0.337	-0.193
Open cone diameter/Diámetro cono abierto	-1.881	1.305	2.171	-0.690	0.303	-0.273
Total stomata/Estomas totales	0.203	-0.465	-0.169	0.035	-0.634	-0.039
Endodermal cells/Células endodérmicas	-0.156	-0.329	-0.097	-0.093	-0.443	-0.134
Middle resin canals/Canales resiníferos medios	-0.036	0.529	0.333	0.101	0.034	-0.068

On the one hand, stomata density is an important functional trait in the control of water balance and CO<sub>2</sub> capture per unit leaf area (Hetherington & Woodward, 2003); moreover, the size of the vascular bundle (xylem and phloem) affects water efficiency and safety, which is a fundamental basis for the regulation of gas exchange (Domec, Palmroth, & Oren, 2016). In this regard, the results support findings that var. *apulcensis* occupies

variables estomas totales (ET) y líneas con estomas (LE) son las más importantes asociadas a VC<sub>1</sub>, y longitud de acícula (LAc) y número de estomas (NE) a VC<sub>2</sub>; en conos, las características altura (Alt<sub>A</sub>) y profundidad de la apófisis (P<sub>A</sub>), así como su relación (R<sub>PAIT</sub>) son las más importantes asociadas a VC<sub>1</sub>, mientras que el diámetro de cono abierto (DC<sub>A</sub>) y coeficiente de forma de cono (CF<sub>C</sub>) son importantes en VC<sub>1</sub> y VC<sub>2</sub>. En el análisis

part of the natural habitat of the typical variety but is absent in more xeric environments (Farjon & Styles, 1997). Cone traits clearly separate var. *oaxacana* from *apulcensis*, so these two OTUs should not be considered synonyms.

Cross-validation results reflected the reduced contribution of needle traits to the discrimination between varieties. Table 6 shows that, when using both groups of traits, similar hit percentages were achieved to those obtained with cone traits alone, with average errors of 7 % and 9.2 %. Cone traits were more efficient in the identification and correct discrimination of the UTOs. The greater simplicity and lower cost of measuring cone traits, compared to foliage traits, compensates for the limitations and costs of cone collection, which is only possible at certain time of the year. Nevertheless, the usefulness of some functional traits of adaptive value in needles, such as total stomata and endodermal cells should not be excluded. This is the case of distinguishing *P. patula* var. *longipedunculata* in the Sierra Madre del Sur with morphological markers of adaptive value (Dvorak et al., 2001).

In the cross-validation analysis, var. *pseudostrobus* presented the lowest percentage of hits with the two groups of traits (Table 6). The difficulty in its differentiation is due to the high morphological variability because of the wide geographic distribution

conjunto ninguna variable de acículas es relevante para VC<sub>1</sub>, pero ET y células endodérmicas (CE) son importantes en VC<sub>2</sub> y contribuyen a la separación de la var. *apulcensis* de las otras (Figura 2c).

La similitud morfológica de conos entre var. *pseudostrobus* y *apulcensis* se puede deber a la relación semisimpátrica que comparten (Carvajal & McVaugh, 1992) y a la amplia variabilidad que posee la primera, en especial en la altura de apófisis que en ocasiones dificulta distinguirla (Farjon et al., 1997); sin embargo, cuando se agregan características del follaje aumenta la capacidad de discriminación (Figura 1c). Al parecer, el número de estomas y de células endodérmicas, asociado al tamaño del haz vascular, son útiles para distinguir las variedades. Por un lado, la densidad de estomas es un rasgo funcional importante en el control del balance hídrico y la captura de CO<sub>2</sub> por unidad de área foliar (Hetherington & Woodward, 2003); además, el tamaño del haz vascular (xilema y floema) influye en la eficiencia y seguridad hídrica, base en la regulación del intercambio de gases (Domec, Palmroth, & Oren, 2016). En este sentido, los resultados apoyan las observaciones de que la var. *apulcensis* ocupa una parte del hábitat natural de la variedad típica, pero está ausente en ambientes más xéricos (Farjon & Styles, 1997). Las características de conos separan con claridad a la var. *oaxacana* de *apulcensis*, por lo que estas dos UTO no deberían considerarse sinónimos.

**Table 6. Percentage of observations (n) classified for each variety with linear discriminant functions (LDF) from needle and cone traits of *Pinus pseudostrobus* used in separate and joint analyses.**

**Cuadro 6. Porcentaje de observaciones (n) clasificadas de cada variedad con las funciones discriminantes lineales (FDL) a partir de características de acículas y conos de *Pinus pseudostrobus* por separado y en conjunto.**

Putative variety / Variedad putativa	LDF/FDL	Percentage classified as: / Porcentaje clasificado como:			
		<i>coatepecensis</i>	<i>pseudostrobus</i>	<i>oaxacana</i>	<i>apulcensis</i>
<i>coatepecensis</i> (n = 17)	needles/acículas	88.2	5.9	5.9	0.0
	cones/conos	94.1	5.9	0.0	0.0
	joint/conjunto	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>pseudostrobus</i> (n = 66)	needles/acículas	13.6	39.4	27.3	19.7
	cones/conos	3.0	75.8	10.6	10.6
	joint/conjunto	1.5	81.8	9.1	7.6
<i>oaxacana</i> (n = 60)	needles/acículas	10.0	13.3	66.7	10.0
	cones/conos	1.7	5.0	93.3	0.0
	joint/conjunto	1.7	8.3	90.0	0.0
<i>apulcensis</i> (n = 10)	needles/acículas	10.0	10.0	20.0	60.0
	cones/conos	0.0	0.0	0.0	100.0
	joint/conjunto	0.0	0.0	0.0	100.0

and interaction with other processes such as diversification, followed by gene flow and low rates of evolution (Gernandt & Pérez-de la Rosa, 2014), which cause greater phenotypic variation compared to the other varieties and complicate its taxonomic delimitation (Figure 1). The wide overlap observed in the morphological variation of this variety compared to the others may be due to individuals in intertaxa transition zones or in the process of speciation, because of introgressive hybridization with other species of the same phylogenetic group (Gernandt et al., 2009). Delgado et al. (2007) were only able to classify 40 % of the putative hybrid individuals of *P. pseudostrabus*, due to the great variability of morphological traits caused by hybridization with other species

The results of the study confirm the wide intraspecific variation of *P. pseudostrabus*, coinciding with findings in other phenotypic traits such as seedling performance and survival in different growth environments (Villegas-Jiménez, Rodríguez-Ortiz, Chávez-Servia, Enríquez-del Valle, & Carrillo-Rodríguez, 2016; Viveros-Viveros et al., 2005; Viveros-Viveros et al., 2006), frost tolerance (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, López-Upton, & Vargas-Hernández, 2007) and isoenzyme variation (Viveros-Viveros, Tapia-Olivares, & Sáenz-Romero, 2014). The identification of *P. pseudostrabus* OTUs and the recognition of the extent of intraspecific variation in traits of adaptive value are indispensable requirements for the proper management and sustainable use of the genetic resources of the species.

## Conclusions

The study demonstrated the wide phenotypic variation in morphoanatomical traits of needles and cones in *P. pseudostrabus* and the feasibility of discriminating its varieties based on these characters; however, the complex interaction of evolutionary forces with intra- and interspecific hybridization processes makes precise identification difficult. Cone traits were more efficient than needle traits for discriminating the OTU of the species, but including both increases precision, especially for distinguishing the typical variety from var. *apulcensis*. Although apophysis height was important to distinguish the varieties, the inclusion of functional traits of adaptive value, especially those related to stomata density and vascular bundle size in needles, helps in the identification of OTU with a perspective to a better use of their genetic resources. This study shows evidence of morphoanatomical differences between *oaxacana* and *apulcensis* varieties.

## Acknowledgments

This work is part of the research project "Establishment of regional asexual seed orchards and progeny trials

La aportación reducida de las características de acículas a la discriminación entre variedades se reflejó en los resultados de validación cruzada. El Cuadro 6 muestra que, al utilizar los dos grupos de variables, se alcanzaron porcentajes de acierto similares a los que se obtuvieron con las características de conos, con errores promedio de 7 % y 9.2 %. Las características de conos fueron más eficientes en la identificación y discriminación correcta de las UTO. La mayor facilidad y menor costo de medición de características en conos, en comparación con las de follaje, compensa las limitaciones y costos de recolección de conos que solo es posible en una época del año. No obstante, no debe excluirse la utilidad de algunos rasgos funcionales de valor adaptativo en las acículas como estomas totales y células endodérmicas. Este es el caso de la distinción de *P. patula* var. *longipedunculata* en la Sierra Madre del Sur con marcadores morfológicos de valor adaptativo (Dvorak et al., 2001).

En el análisis de validación cruzada, la var. *pseudostrabus* presentó menor porcentaje de aciertos con los dos grupos de caracteres (Cuadro 6). La dificultad en su discriminación se debe a la variabilidad morfológica alta como resultado de la amplia distribución geográfica y de la interacción con otros procesos como la diversificación, seguida por flujo génico y tasas bajas de evolución (Gernandt & Pérez-de la Rosa, 2014), que ocasionan mayor variación fenotípica con respecto a las otras variedades y dificultan su delimitación taxonómica (Figura 1). El amplio traslape que se observa en la variación morfológica de esta variedad con respecto a las otras puede deberse a individuos en zonas de transición intertaxa o en proceso de especiación, producto de hibridación introgresiva con otras especies del mismo grupo filogenético (Gernandt et al., 2009). Delgado et al. (2007) solo lograron clasificar 40 % de los individuos híbridos putativos de *P. pseudostrabus*, debido a la gran variabilidad de las características morfológicas por hibridación con otras especies.

Los resultados del estudio confirman la amplia variación intraespecífica de *P. pseudostrabus*, coincidente con hallazgos en otras características fenotípicas como el desempeño y supervivencia de plantas en varios ambientes de crecimiento (Villegas-Jiménez, Rodríguez-Ortiz, Chávez-Servia, Enríquez-del Valle, & Carrillo-Rodríguez, 2016; Viveros-Viveros et al., 2005; Viveros-Viveros et al., 2006), resistencia a heladas (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, López-Upton, & Vargas-Hernández, 2007) y variación izoenzimática (Viveros-Viveros, Tapia-Olivares, & Sáenz-Romero, 2014). La identificación de las UTO de *P. pseudostrabus* y el reconocimiento de la amplitud de la variación intraespecífica en características de valor adaptativo son requisitos indispensables para el manejo adecuado y uso sostenible de los recursos genéticos de la especie.



of *Pinus pseudostrabus* for genetic evaluation of seed trees” (Code CONAFOR-2016-4-277784), financed by the Sectoral Fund for Research, Development and Technological Innovation in Forestry, CONAFOR-CONACYT. The authors thank the support provided by the collaborating researchers of the project for the collection of foliage and cone samples from natural populations of the species during the selection of the superior seed trees in the field.

#### End of English version

#### References / Referencias

- Bussotti, F., Pollastrini, M., Holland, V., & Brüggemann, W. (2015). Functional traits and adaptive capacity of European forests to climate change. *Environmental and Experimental Botany*, 111, 91–113. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.11.006
- Caruso, C. M., Maherali, H., & Martin, R. A. (2020). A meta-analysis of natural selection on plant functional traits. *International Journal of Plant Sciences*, 181(1), 44–55. doi: 10.1086/706199
- Carvajal, S., & McVaugh, R. (1992). *Pinus*. *Contributions from the University of Michigan Herbarium*, 17, 32–100.
- Delgado, P., Salas-Lizana, R., Vázquez-Lobo, A., Wegier, A., Anzidei, M., Alvarez-Buylla, E. R., ... Piñero, D. (2007). Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb. and *Pinus pseudostrabus* Lindl. (Pinaceae): Morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences*, 168(6), 861–875. doi: 10.1086/518260
- Des Roches, S., Post, D. M., Turley, N. E., Bailey, J. K., Hendry, A. P., Kinnison, M. T., ... Palkovacs, E. P. (2018). The ecological importance of intraspecific variation. *Nature Ecology and Evolution*, 2(1), 57–64. doi: 10.1038/s41559-017-0402-5
- Domec, J. C., Palmroth, S., & Oren, R. (2016). Effects of *Pinus taeda* leaf anatomy on vascular and extravascular leaf hydraulic conductance as influenced by N-fertilization and elevated CO<sub>2</sub>. *Journal of Plant Hydraulics*, 3, e007. doi: 10.20870/jph.2016.e007
- Dvorak, W. S., Jordan, A. P., Romero, J. L., Hodge, G. R., & Furman, B. J. (2001). Quantifying the geographic range of *Pinus patula* var. *longipedunculata* in Southern Mexico using morphologic and RAPD marker data. *Southern African Forestry Journal*, 192, 19–30. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/sfjfs/article/view/4275>
- Faisal, S., Haq, F., & Iqbal, Z. (2021). Statistical analysis for the classification and ordination of the vegetation of Chour valley. A multivariate approach. *Acta Ecologica Sinica*, 42(5), 446–452. doi: 10.1016/j.chnaes.2021.07.006
- Farjon, A. (1995). Typification of *Pinus apulcensis* Lindley (Pinaceae), a misinterpreted name for a Latin American pine. *Novon*, 5(3), 252–256. doi: 10.2307/3392259
- Farjon, A., & Filer, D. (2013). *An atlas of the world's conifers: an analysis of their distribution, biogeography, diversity, and conservation status*. Leiden-Boston: Brill.

#### Conclusiones

El estudio demostró la amplia variación fenotípica en características morfoanatómicas de acículas y conos en *P. pseudostrabus* y la factibilidad de discriminar sus variedades con base en estos caracteres; sin embargo, la interacción compleja de las fuerzas evolutivas con procesos de hibridación intra e interespecífica dificulta la identificación precisa. Las características de conos fueron más eficientes que las de acículas en el proceso de discriminación de las UTO de la especie, pero al incluir ambas aumenta la precisión, en especial para distinguir la variedad típica de la var. *apulcensis*. Aunque la altura de la apófisis fue importante para distinguir las variedades, la inclusión de rasgos funcionales de valor adaptativo, en especial los relacionados con la densidad de estomas y el tamaño del haz vascular en las hojas, ayuda a la identificación de UTO con miras hacia un mejor uso de sus recursos genéticos. El trabajo muestra evidencias de diferencias morfoanatómicas entre las variedades *oaxacana* y *apulcensis*.

#### Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación “Establecimiento de huertos semilleros asexuales regionales y ensayos de progenie de *Pinus pseudostrabus* para la evaluación genética de los progenitores” (clave conafor-2016-4-277784), financiado por el Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, CONAFOR-CONACYT. Los autores agradecen el apoyo proporcionado por los investigadores colaboradores del proyecto en la obtención de las muestras de follaje y conos en las poblaciones naturales de la especie durante la selección de los árboles superiores en campo.

#### Fin de la versión en español

- Farjon, A., & Styles, B. T. (1997). *Flora Neotropica. Monograph 75. Pinus (Pinaceae)*. New York, USA: New York Botanical Garden.
- Farjon, A., Pérez de la Rosa, J., & Styles, B. (1997). *Guía de campo de los pinos de México y América Central*. USA: The Royal Botanic Gardens, Kew Universidad de Oxford.
- Friendly, M., Fox, J., & Friendly, M. M. (2021). *Package ‘candisc.’ Visualizing generalized canonical discriminant and canonical correlation analysis*. CRAN Repository. Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/candisc/candisc.pdf>
- Gernandt, D. S., Hernández-León, S., Salgado-Hernández, E., & Pérez de la Rosa, J. A. (2009). Phylogenetic relationships of *Pinus* subsection *Ponderosae* inferred from rapidly evolving cpDNA regions. *Systematic Botany*, 34(3), 481–491. doi: 10.1600/036364409789271290

- Gernandt, D. S., & Pérez-de la Rosa, J. A. (2014). Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(Supplement 1), 126–133. doi: 10.7550/rmb.32195
- Hernández-Velasco, J., Hernández-Díaz, J. C., Vargas-Hernández, J. J., Hipkins, V., Prieto-Ruíz, J. Á., Pérez-Luna, A., & Wehenkel, C. (2021). Natural hybridization in seed stands of seven Mexican *Pinus* species. *New Forests*, 53, 487–509. doi: 10.1007/s11056-021-09868-9
- Hetherington, A. M., & Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424, 901–908. doi: 10.1038/nature01843
- Iglesias, L. G., Solís-Ramos, L. Y., & Viveros-Viveros, H. (2012). Variación morfológica en dos poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* Lindl. del estado de Veracruz. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 81, 239–246. Retrieved from <http://www.revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol81/35-IGLESIAS.pdf>
- Leal-Sáenz, A., Waring, K. M., Menon, M., Cushman, S. A., Eckert, A., Flores-Rentería, L., ... Wehenkel, C. (2020). Morphological differences in *Pinus strobiformis* across latitudinal and elevational gradients. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1600. doi: 10.3389/fpls.2020.559697
- López-Reyes, A., Pérez de la Rosa, J. A., Ortiz, E., & Gernandt, D. S. (2015). Morphological, molecular, and ecological divergence in *Pinus douglasiana* and *P. maximinoi*. *Systematic Botany*, 40(3), 658–670. doi: 10.1600/036364415X689384
- Mirov, N. T. (1958). *Pinus oaxacana*, a new species from Mexico. *Madroño*, 14(5), 145–150. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/41422927>
- Perry, J. P. (1991). *The pines of Mexico and Central America*. Portland, Oregon: Timber Press.
- R Core Team (R). (2020). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.rproject.org/>
- Reyes-Hernández, V. J., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., & Vaquera-Huerta, H. (2005). Variación morfológica y anatómica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Acta Botánica Mexicana*, 70, 47–67. doi: 10.21829/abm70.2005.987
- Reyes-Hernández, V. J., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., & Vaquera-Huerta, H. (2006). Similitud fenotípica de poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* Carr. *Agrociencia*, 40(4), 545–556. Retrieved from <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/487/487>
- Ripley, B., Venables, B., Bates, D. M., Hornik, K., Gebhardt, A., & Firth, D. (2021). Package “MASS.” CRAN Repository. Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/index.html>
- Statistical Analysis Software Inc. (SAS). (2015). SAS® 9.4. In database products: User's guide (6th ed.). Cary, NC, USA: Author. Retrieved from <https://support.sas.com/en/documentation.html>
- Stead, J. W. (1983). Studies of variation in Central American Pines V: a numerical study of variation in the *Pseudotsuga* group. *Silvae Genetica*, 32(3–4), 101–105. Retrieved from [https://www.thuenen.de/media/institute/fg/PDF/Silvae\\_Genetica/1983/Vol.\\_32\\_Heft\\_3-4/32\\_3-4\\_101.pdf](https://www.thuenen.de/media/institute/fg/PDF/Silvae_Genetica/1983/Vol._32_Heft_3-4/32_3-4_101.pdf)
- Stead, J. W., & Styles, B. T. (1984). Studies of Central American pines: a revision of the “pseudotsuga” group (Pinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 89(3), 249–275. doi: 10.1111/j.1095-8339.1984.tb02199.x
- Villegas-Jiménez, D. E., Rodríguez-Ortiz, G., Chávez-Servia, J. I., Enríquez-del Valle, J. R., & Carrillo-Rodríguez, J. C. (2016). Variación del crecimiento en vivero entre procedencias de *Pinus pseudostrabus* Lindl. *Gayana Botánica*, 73(1), 113–123. doi: 10.4067/s0717-66432016000100013
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., López-Upton, J., & Vargas-Hernández, J. J. (2005). Variación genética altitudinal en el crecimiento de plantas de *Pinus pseudostrabus* Lindl. en campo. *Agrociencia*, 39(5), 575–587. Retrieved from <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/421/421>
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., López-Upton, J., & Vargas-Hernández, J. J. (2007). Growth and frost damage variation among *Pinus pseudostrabus*, *P. montezumae* and *P. hartwegii* tested in Michoacán, México. *Forest Ecology and Management*, 253(1–3), 81–88. doi: 10.1016/j.foreco.2007.07.005
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J., & López-Upton, J. (2006). Variación entre procedencias de *Pinus pseudostrabus* establecidas en dos sitios en Michoacán, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(2), 121–126. Retrieved from <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/29-2/4a.pdf>
- Viveros-Viveros, H., Tapia-Olivares, B. L., & Sáenz-Romero, C. (2014). Variación isoenzimática de *Pinus pseudostrabus* Lindl. a lo largo de un gradiente altitudinal en Michoacán, México. *Agrociencia*, 48(7), 713–723. Retrieved from <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1114/1114>
- World Checklist of Vascular Plants (WCVP). (2020). World checklist of vascular plants, version 2.0. Retrieved from <https://wcvp.science.kew.org>