

# Anatomía foliar comparada de *Pinus caribaea* var. *caribaea* y *P. tropicalis* (Pinaceae) en asociación simpátrica

## Comparative leaf anatomy of *Pinus caribaea* var. *caribaea* and *P. tropicalis* (Pinaceae) in sympatric association

Liutmila Pérez-del Valle<sup>1</sup>, Gretel Geada-López<sup>1,\*</sup> y Rogelio Sotolongo-Sospedra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Forestales, Facultad de Ciencias Forestales y Agropecuarias, Universidad de Pinar del Río "Hermanos Saíz Montes de Oca", Calle José Martí, N° 300, Barrio Segundo Sur, el 27 de Noviembre y González Alcorta, Pinar del Río, Cuba. C.P. 20100. \*Autor para correspondencia (e-mail: [gabriel@upr.edu.cu](mailto:gabriel@upr.edu.cu)).

### RESUMEN

Las variaciones en la anatomía foliar pueden ser respuestas adaptativas o de aclimatación interpoblacional al estrés edafoclimático, sobre todo de especies que se desarrollan en ambientes extremos. *Pinus caribaea* var. *caribaea* y *P. tropicalis* se distribuyen en el occidente de Cuba, principalmente en la provincia de Pinar del Río donde forman poblaciones puras o en simpatría. Es objetivo de este trabajo comparar las características anatómicas distintivas de las acículas de ambos taxones en diferentes localidades donde se asocian simpátricamente. Para ello se realizaron cortes transversales de las acículas y se evaluaron 14 variables anatómicas. Los análisis estadísticos empleados permitieron diferenciar claramente los dos taxones y ambos presentan variaciones propias para adaptarse a un mismo ambiente. El análisis de componentes principales mostró que dentro de cada taxón las poblaciones se segregan en relación al edatopo donde se desarrollan. Para *P. caribaea* var. *caribaea* las variables anatómicas que más contribuyeron a la variación y ordenación fueron el número de estomas, grosor y número de capas de células de la hipodermis; en *P. tropicalis* el grosor de la cutícula y el parénquima clorofílico, y para ambos taxones el tipo de canal fue inequívocamente endonales y marginal.

**Palabras clave:** acícula, adaptación, análisis multivariado, variación anatómica, canal de resina

### ABSTRACT

Variations in needle anatomy can be an adaptative or acclimatization response to the edaphoclimatic stress among population, particularly in those facing extreme environments. *Pinus caribaea* var. *caribaea* and *P. tropicalis* are distributed in western Cuba, mainly in Pinar del Río province, forming pure stands or in sympatric populations. The aim of this study is to compare distinctive anatomy characteristics of the needle of both taxa in the localities where they are sympatrically associated. Cross sections of the needles were done and 14 anatomical variables are assessed. The statistical analyses clearly differentiate both taxa, concluding that each have their own variations to adapt to the same environment. The principal component analysis showed that the populations of each taxon segregate according to the edatope where they grow. For *P. caribaea* var. *caribaea* the anatomical variables that most contributed the variation and classification were: the number of stomata, thickness and number of band of cells of the hypodermis; in *P. tropicalis* it was the thickness of the cuticle and the chlorophyllic parenchyma, and for each taxon the type of resin canal was unequivocally endonatal and marginal.

**Keywords:** needle, adaptation, multivariate analysis, anatomical variation, resin canal

**Citación:** Pérez-del Valle, L., Geada-López, G. & Sotolongo-Sospedra, R. 2020. Anatomía foliar comparada de *Pinus caribaea* var. *caribaea* y *P. tropicalis* (Pinaceae) en asociación simpátrica. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana* 41: 163-174.

**Recibido:** 14 de julio de 2020. **Aceptado:** 30 de septiembre de 2020. **Publicado en línea:** 28 de diciembre de 2020. **Editor encargado:** José Angel García-Beltrán.

### INTRODUCCIÓN

Los pinares constituyen una importante formación vegetal en el occidente de Cuba, que ocupa cerca del 50 % de la superficie forestal, la cual se presenta en Pinar del Río, Artemisa e Isla de la Juventud y representada por *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (pino macho) y *P. tropicalis* Morelet (pino hembra). *Pinus tropicalis* constituye un endémico cubano y relicto de *Pinus* L. subsect. *Pinus* en América (Geada-López & al. 2004, Gernandt & al. 2005), el cual forma pinares continuos monotípicos en Pinar del Río y el centro de la Isla de la Juventud sobre sustratos oligotróficos de pizarra, arenisca y arenas cuarcíticas (Samek & Del Risco-Rodríguez 1989). Por su parte, *P. caribaea* var. *caribaea* no forma bosques puros de forma natural, sino que ocupa áreas simpátricamente con *P. tropicalis*, excepto las masas puras en sustratos derivados de serpentina y ultrabásicos en la meseta de Cajalbana (López-Almirall 1982, Samek &

Del Risco-Rodríguez 1989, Farjon & Filer 2013). Desde el punto de vista evolutivo es más reciente, diferenciada de las otras variedades de la especie por caracteres morfológico y genéticos (Jardón-Barbolla & al. 2011, Rebolledo-Camacho & al. 2018), que en ocasiones posee un comportamiento invasor fuera de su área natural de distribución (Gallien & al. 2015).

La acícula es el órgano encargado de realizar la fotosíntesis y la transpiración en la planta, procesos que están influenciados por la estructura morfológica y anatómica de la misma. La variación en la estructura anatómica entre árboles y poblaciones obedece a diferencias en las condiciones ambientales como respuesta a la disponibilidad de luz, la temperatura y los regímenes de humedad en el hábitat donde crecen (López & al. 2010, Tiwari & al. 2013, Ghimire & al. 2014, Meng & al. 2018).

La estructura y anatomía de la acícula influye, por ejemplo, en la fijación de carbono, el potencial hídrico y la tolerancia al estrés, lo cual determina el crecimiento y la supervivencia de las poblaciones. Especies adaptadas a condiciones secas desarrollan una epidermis más gruesa, estomas hundidos y menos espacio intercelular en el mesofilo, mientras aquellas adaptadas a hábitats soleados puede tener tejido mesofílico más grueso y mayor densidad estomática para alcanzar mayores rendimientos fotosintéticos (Kivimäenpää & al. 2017). Por lo tanto, la morfología y anatomía de las acículas están, por lo general, genéticamente controladas (Zhang & al. 2017, Xing & al. 2014). Estos elementos pueden ser usados como un método confiable y eficientemente rápido para explorar la variación genética entre poblaciones (Zhang & al. 2017) y en los ensayos de pruebas de procedencias y progenies (López & al. 2010, 2016, Donnelly & al. 2016, Pardos & Calama 2018).

Los factores ambientales tienen una influencia directa en la estructura de los tejidos de la acícula, en el patrón y posición de los estomas, el número y tamaño de los conductos de resina, en especial para las especies de *Pinus* (Tiwari & al. 2013, Ghimire & al. 2014, Meng & al. 2018), el grosor de parénquima de transfusión y área del mesofilo (Meng & al. 2018, Köbölkuti & al. 2017, Huang & al. 2016). Por lo que, la anatomía puede variar entre poblaciones y especies, en especial, dentro de aquellas con amplios rangos de distribución continental (Jasińska & al. 2014, Boratyńska & al. 2015, Zhang & al. 2017). Pero estos reportes para especies insulares (*P. taiwanensis* Hayata [Sheue & al. 2014] y *P. canariensis* C. Sm. ex DC. [Grill & al. 2004, López & al. 2016]) sean o no coníferas, son insuficientes.

Hasta el momento, poco se ha estudiado de las variaciones y diferencias anatómicas de dos especies dentro de un género, en particular *Pinus*, que se desarrollen simpátricamente como respuestas al mismo ambiente sin que prime un enfoque filogenético. Estas aproximaciones se han concentrado en especies para detectar las zonas de hibridación o identificación de híbridos, por ejemplo: *P. sylvestris* L. – *P. uncinata* Ramond ex DC. – *P. uliginosa* G. E. Neuman (Boratyńska & al. 2003, 2011), *P. tabuliformis* Carrière – *P. yunnanensis* Franch. – *P. densata* Mast. (Xing & al. 2014), y en términos de variación morfológica entre *P. montezumae* Lamb. y *P. pseudostrobus* Brongn. por Delgado-Valerio & al. (2007). Gran parte de estos análisis se centran en pinos continentales y de amplia distribución.

En Cuba, los estudios de variación morfológica en especies de *Pinus* han sido limitados y estos se han desarrollado para diferenciar desde el punto de vista cladístico las cuatro especies cubanas (López-Almirall 1982, López-Almirall & Albert-Puente 1982) y, los mismos presentan limitaciones en el muestreo, en número de individuos y en localidades. Diferencias entre procedencias de estas especies han sido documentadas, aunque desde un enfoque silvícola, de aprovechamiento forestal y de mejoramiento genético (selección de árboles plus o su semilla) dentro de cada

especie. Mientras que estudios básicos que sustenten las diferencias en el diámetro, la altura y velocidad del crecimiento encontradas, y aquellas que existen en pinares naturales, aun por documentar, son una tarea pendiente en las ciencias forestales y biológicas.

Por otra parte, se ha referido gran diferenciación genética entre cinco poblaciones naturales de *P. tropicalis* con el uso de marcadores moleculares: RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), microsátélites del cloroplasto (cpDNA) y secuencias de intrones, la cual fue atribuida a la distribución geográfica de la especie (Geada-López 2003). Sin embargo, este estudio no analizó la existencia de variación morfo-anatómica en la especie.

Recientemente, Pérez-del Valle & al. (2019) registraron para *Pinus tropicalis* la existencia de diferencias en la anatomía de las acículas, especialmente en dos edátosos extremos (pizarra y arenas blancas) donde la especie crece en masas puras, pero no hay información disponible de esta especie en otros edátosos y localidades, así como su comportamiento anatómico cuando se desarrolla en simpatría con *P. caribaea* var. *caribaea*. Al respecto, en *P. caribaea* var. *caribaea* se encontró gran variabilidad morfológica entre localidades en comparación con *P. tropicalis* (López-Almirall 1982).

De ahí que la hipótesis de este estudio se centre en la idea de que bajo un mismo ecótopo, especies congéneres pudieran tener respuestas adaptativas similares en su anatomía foliar, sin tomar en consideración su habilidad para formar o no híbridos. Por lo que, el objetivo de la investigación fue comparar la anatomía de las acículas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* y *P. tropicalis* en localidades de pinares naturales donde se desarrollan en simpatría en la provincia de Pinar del Río. Esto es una contribución al manejo de las especies y sus procedencias. Este estudio también se centra en determinar cuáles de las variables anatómicas son efectivas para ser empleadas en investigaciones de ecología, genética forestal y biología de la conservación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron tomadas en pinares naturales donde se desarrollan en simpatría *Pinus caribaea* var. *caribaea* (en lo adelante se tratará como *P. caribaea*) y *P. tropicalis*, en tres localidades de la provincia de Pinar del Río, Cuba. En cada localidad se recolectaron acículas de 30 individuos al azar por taxón y se seleccionaron las acículas que se hallaban a las 2/3 parte inferior de la copa (Tabla I).

Para el estudio anatómico se realizaron cortes transversales de 10 acículas elegidas al azar para cada individuo, las que previamente se midieron en longitud y ancho con un pie de rey con un error de 0,1mm. Para comprobar la continuidad de los canales de resina y de las hileras de estomas se realizaron cortes transversales cada 1 cm a lo largo de la acícula, como estos fueron continuos, se escogió la parte media de estas para las mediciones. Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico NLCD-307B.

Las variables anatómicas medidas, con una lente de 40×, fueron: el grosor de la cutícula, el grosor de la epidermis, el grosor de la hipodermis y el número de capas de células de la hipodermis. Mientras que con la lente de 10× fueron medidas el número de estomas, el grosor del parénquima de transfusión, el número de canales, el grosor del parénquima clorofílico, la distancia del extremo exterior izquierdo al canal, la distancia del extremo exterior derecho al canal, el diámetro del canal izquierdo, el diámetro del canal derecho, la altura del haz vascular y el ancho del haz vascular (Figura 1). Además, se clasificó el tipo de canal resinífero de acuerdo a Sheue & al. (2014) por ser un carácter diagnóstico entre especies e híbridos.

**Análisis estadístico**

Para evaluar el efecto del factor taxón y localidad sobre el comportamiento de las variables anatómicas se consideraron,

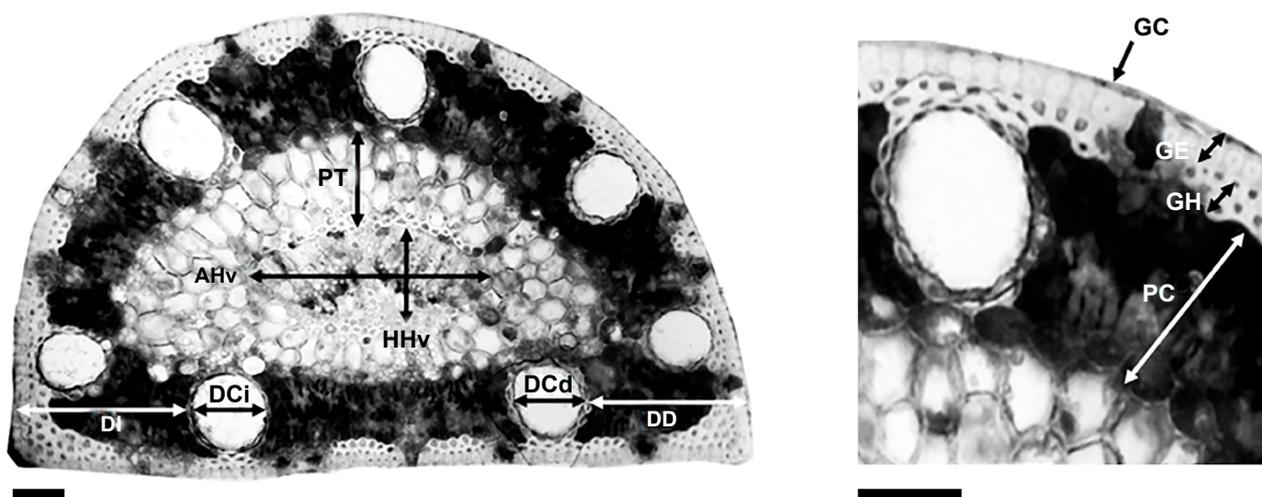
en el primer caso, dos niveles (dos taxones) y en el segundo, el factor localidad, tres niveles (Cayo Ratones, Sabanalamar y Valle Ancón). Estos análisis se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0,05$ ), ya que las variables analizadas no cumplieron con los supuestos matemáticos para la realización de pruebas paramétricas. Se empleó una prueba de comparación múltiple de pares entre las medias de los rangos de los tratamientos según lo descrito en Conover (1999).

Para el análisis de la influencia de factores edafo-climáticos propios de cada localidad, desde el punto de vista edáfico se consideraron la formación geológica y el sustrato (Pszczolkowski 1978), el piso altitudinal (Magaz-García & al. 2006) y clase de pendiente (Cabrera-Bermúdez 2002). Del clima se consideraron las variables que se identificaron como las que más influyen en la distribución de estos taxones

**TABLA I**  
**Georreferenciación de las localidades estudiadas de *Pinus caribaea* y *P. tropicalis***

**TABLE I**  
**Geographical location of the studied sites of *Pinus caribaea* and *P. tropicalis***

Localidades	Coordenadas		Formación	Sustrato	Piso altitudinal	Pendiente
	Latitud N	Longitud W				
Cayo Ratones	22°21'0,6"	83°55'37,57"	San Cayetano	Arenisca cuarzosa	Submontaña	Terreno fuertemente inclinado
Sabalamar	22°08'12"	83°58'34,99"	Siguanea	Arena cuarzosa	Llanuras bajas	Terreno ligeramente inclinado
Valle Ancón	22°39'57,7"	83°45'32,17"	San Cayetano	Pizarra	Llanuras medias	Terreno fuertemente inclinado



**Fig. 1.** Esquema de la estructura anatómica de la sección transversal de la acícula y las variables anatómicas medidas. Barras de escala: 100 µm. GC: Grosor de la cutícula, GE: Grosor de la epidermis, GH: Grosor de la hipodermis, PT: Grosor del parénquima de transfusión, PC: Grosor del parénquima clorofílico, DI: Distancia del extremo exterior izquierdo al canal, DD: Distancia del extremo exterior derecho al canal, DCi: Diámetro del canal izquierdo, DCd: Diámetro del canal derecho, HHv: Altura del haz vascular, AHv: Ancho del haz vascular.

**Fig. 1.** Schematic anatomical structure of a needle cross-section and the measured anatomical variable. Scale bars: 100 µm. GC: Thickness of cuticle, GE: Thickness of epidermis, GH: Thickness of hypodermis, NE: Number of stomata, PT: Thickness of transfusion parenchyma, NC: Number of canals, PC: Thickness of chlorophyllic parenchyma, DI: Distance of left outer to canal, DD: Distance of right outer to canal, DCi: Diameter of left canal, DCd: Diameter of right canal, HHv: Height of vascular bundle, AHv: Width of vascular bundle.

(Miranda-Sierra 2017) como: temperatura máxima del período cálido, temperatura media del trimestre más lluvioso, temperatura media del trimestre más seco, temperatura media del trimestre más cálido, precipitación anual, precipitación del período lluvioso y precipitación del período seco.

Para la interpretación de la variabilidad subyacente se realizó un Análisis de Componentes Principales sobre la matriz de correlación. Como variables de respuesta en un primer análisis solo se consideraron las que describen la anatomía de las acículas relacionadas con la regulación hídrica (NE, GH, CH, GC, GE y PT) y después fue incorporada la variable PC. En ambos análisis se emplearon como criterios de clasificación las combinaciones taxón-localidad, sustrato y precipitación anual, porque estas dos últimas son las que más contribuyen a la variabilidad del conjunto de datos.

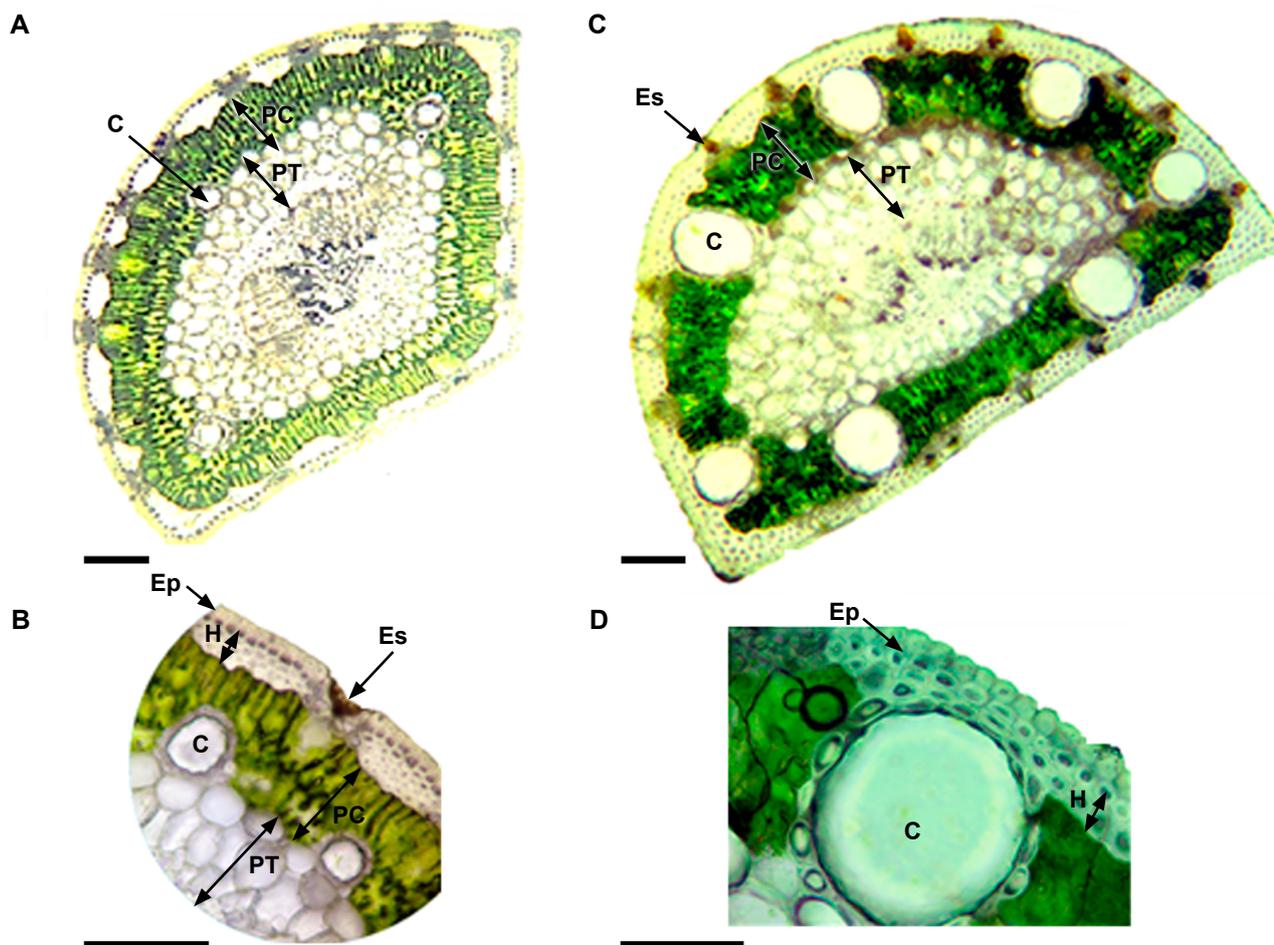
Para la clasificación se empleó el análisis de conglomerados jerárquico, con todas las variables. Se consideró como punto

de corte o línea de referencia para la definición de los conglomerados una distancia igual al 50 % de la distancia euclidiana máxima. Los análisis estadísticos fueron procesados con *Infostat ver. 15* (Di Rienzo & al. 2015).

## RESULTADOS

### Estructura anatómica

Las acículas de *Pinus caribaea* presentan  $13,6 \pm 1,0$  cm de largo y  $1,3 \pm 0,3$  mm de ancho. La estructura anatómica equifacial, en forma de abanico (Figura 2A), muestra la epidermis uniestratificada (Figura 2A). Los estomas se distribuyen en ambas superficies de la acícula (Figura 2A), el número promedio de hileras de estomas por acícula es 17 (Tabla II) y estos se encuentran hundidos en la hipodermis (Figura 2B). La hipodermis posee 3-5 capas de células, de tipo multiforme y con esclereidas. El parénquima clorofílico tiene como promedio tres capas de células de bordes replagados, seguido de varias capas de células del tejido parénquima de transfusión (Figura 2A-B). Todos los individuos



**Fig. 2.** Sección transversal de la acícula de *Pinus caribaea* (A) y *Pinus tropicalis* (C), con detalles del borde exterior de la acícula de cada taxón (B y D), respectivamente. Barras de escala: 100  $\mu$ m. Aumentos: 10 $\times$  (A y C), 40 $\times$  (B y D). GC: Grosor de la cutícula, Ep: Epidermis, H: Hipodermis, Es: Estoma, PT: Grosor del parénquima de transfusión, C: Canal, PC: Grosor del parénquima clorofílico.

**Fig. 2.** Transversal cross-section of the needle of *Pinus caribaea* (A) and *Pinus tropicalis* (C), with details of outer edge of the needle of each taxon (B and D), respectively. Scale bars: 100  $\mu$ m. Lens: 10 $\times$  (A and C), 40 $\times$  (B and D). GC: Thickness of cuticle, Ep: Epidermis, H: Hypodermis, Es: Stomata, PT: Thickness of transfusion parenchyma, C: Canal, PC: Thickness of chlorophyllous parenchyma.

del taxón tenían canales de tipo endonales dentro del parénquima clorofílico que llegó en ocasiones al parénquima de transfusión (Figura 2A-B).

Las acículas de *Pinus tropicalis* poseen  $18 \pm 1,4$  cm de largo y  $1,52 \pm 0,25$  mm de ancho. La estructura anatómica equifacial semeja un semicírculo (Figura 2C) y muestra una cutícula más gruesa que en el taxón anterior (Tabla II). Los estomas se hallan muy hundidos en la hipodermis, que limita su cámara subestomática a la hipodermis y al parénquima clorofílico, y en menor número de hileras que en *P. caribaea* (Tabla II y III). La epidermis es uniestratificada a continuación se presenta una hipodermis de 2-3 capas de células uniformes, con presencia de tejido mecánico (esclerenquima) en mayor cantidad que *P. caribaea* (Figura 2D). El parénquima clorofílico está muy bien definido, forma paquetes interrumpidos por grandes canales resiníferos (Figura 2C), hacia el interior se aprecia un tejido de transfusión y en el centro los dos haces vasculares bien separados por un tejido esclerenquimatoso (Figura 2C). El grosor del parénquima clorofílico es superior al de *P. caribaea*. Los canales son de tipo marginal (Figura 2D), más grandes y numerosos que el taxón anterior (Tabla II), ocupan en ocasiones el tejido hipodérmico y siempre hay dispuestos dos canales en la superficie adaxial (Figura 2C-D). *Pinus caribaea* y *P. tropicalis* difieren significativamente en la mayoría de sus características anatómicas, excepto en el ancho del haz vascular (Tabla II).

#### Caracterización anatómica por localidades

Existe un efecto significativo de las características de las localidades sobre el comportamiento de algunas variables

anatómicas evaluadas (Tabla III). No obstante, en *Pinus caribaea* no existen diferencias entre localidades respecto al número de estomas, de canales, el grosor de la hipodermis, la distancia del extremo exterior izquierdo al canal, así como la altura y el ancho del haz vascular. En *P. tropicalis* no difieren entre localidades el grosor de la cutícula, la epidermis, la hipodermis, las distancias del extremo exterior izquierdo y derecho al canal, el diámetro del canal derecho, la altura y el ancho haz vascular.

La Tabla IV presenta los resultados del Análisis de Componentes Principales. Como variables de clasificación se seleccionaron el taxón, el sustrato y la suma anual de precipitación por localidad. Se utilizó el sustrato por ser una variable que indirectamente tiene una gran influencia en el balance hídrico, sobre todo si se considera la textura arenosa de estos suelos. De las variables climáticas se seleccionó la precipitación anual por ser la de mayor variación entre localidades, el resto de los factores edafoclimáticos no tuvieron un efecto significativo.

De acuerdo a los autovalores, o la varianza total explicada, se seleccionaron los dos primeros ejes o componentes que explicaron el 90% de la variación total, válido para explicar las relaciones entre variables y localidades. Los autovectores mostraron que el grosor de la cutícula tiene el peso negativo más alto, mientras el grosor de la hipodermis tiene el positivo en el primer componente, aunque el número de capas de células de la hipodermis y el número de estomas tienen pesos positivos altos también. Este componente contrapone las localidades principalmente en cuanto a los valores de grosor de la cutícula con grosor de la hipodermis,

**TABLA II**

**Valores medios y desviación estándar de las variables anatómicas evaluadas de *Pinus caribaea* (n = 90) y *P. tropicalis* (n = 90)**

**TABLE II**

**Mean values and standard deviation of the anatomical variables for *Pinus caribaea* (n = 90) and *P. tropicalis* (n = 90)**

Variables anatómicas	<i>Pinus caribaea</i>	<i>Pinus tropicalis</i>	H	p
Número de estomas	17,31 ± 2,74	14,01 ± 2,19	57,05	0,00
Número de canales	3,19 ± 1	7,17 ± 1,31	127,12	0,00
Grosor de la cutícula (µm)	2,0 ± 1	3,0 ± 1	81,68	0,00
Grosor de la epidermis (µm)	12 ± 2	15 ± 3	33,23	0,00
Grosor de la hipodermis (µm)	43 ± 9	32 ± 6	66,86	0,00
Número de capas de células de la hipodermis	2,73 ± 0,54	2,07 ± 0,29	51,28	0,00
Grosor del Parénquima clorofílico (µm)	123 ± 23	142 ± 25	26,79	0,00
Grosor del Parénquima de transfusión (µm)	156 ± 63	153 ± 21	6,24	0,01
Distancia del extremo exterior izquierdo al canal (µm)	248 ± 32	304 ± 102	25,50	0,00
Distancia del extremo exterior derecho al canal (µm)	212 ± 53	287 ± 100	28,53	0,00
Diámetro del canal izquierdo (µm)	85 ± 32	107 ± 24	40,78	0,00
Diámetro del canal derecho (µm)	84 ± 22	105 ± 23	33,35	0,00
Altura del haz vascular (µm)	320 ± 50	309 ± 36	6,35	0,01
Ancho del haz vascular (µm)	491 ± 92	486 ± 66	0,88	0,35

TABLA III

**Valores promedio de las variables anatómicas evaluadas de *Pinus caribaea* y *P. tropicalis* en Cayo Ratones (n = 30), Sabanalamar (n = 30) y Valle Ancón (n = 30), Pinar del Río, Cuba**

Medias con letras desiguales fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). GC: Grosor de la cutícula, GE: Grosor de la epidermis, GH: Grosor de la hipodermis, CH: Número de capas de células de la hipodermis, NE: Número de estomas, PT: Grosor del parénquima de transfusión, NC: Número de canales, PC: Grosor del parénquima clorofílico, DI: Distancia del extremo exterior izquierdo al canal, DD: Distancia del extremo exterior derecho al canal, DCi: Diámetro del canal izquierdo, DCd: Diámetro del canal derecho, HHv: Altura del haz vascular, AHv: Ancho del haz vascular.

TABLE III

**Mean values of the anatomical variables for *Pinus caribaea* and *P. tropicalis* in Cayo Ratones (n = 30), Sabanalamar (n = 30) and Valle Ancón (n = 30), Pinar del Río, Cuba**

Means with different letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). GC: Thickness of cuticle, GE: Thickness of epidermis, GH: Thickness of hypodermis, CH: Number of band of cells of hypodermis, NE: Number of stomata, PT: Thickness of transfusion parenchyma, NC: Number of canals, PC: Thickness of chlorophyllic parenchyma, DI: Distance of left outer to canal, DD: Distance of right outer to canal, DCi: Diameter of left canal, DCd: Diameter of right canal, HHv: Height of vascular bundle, AHv: Width of vascular bundle.

Variables	Cayo Ratones	Sabalamar	Valle Ancón	H	p
<b><i>Pinus caribaea</i></b>					
NE	17,37 ± 2,17	16,43 ± 2,94	18,13 ± 2,85	5,41	0,06
NC	3,17 ± 1,05	3,13 ± 0,94	3,27 ± 1,05	0,16	0,91
GC (µm)	2 ± 0,25 <sup>A</sup>	2 ± 0,48 <sup>A</sup>	1 ± 1 <sup>B</sup>	18,25	0,00
GE (µm)	12 ± 2 <sup>B</sup>	13 ± 1 <sup>A</sup>	11 ± 2 <sup>B</sup>	26,15	0,00
GH (µm)	43 ± 10	41 ± 7	45 ± 10	2,28	0,32
CH	2,37 ± 0,49 <sup>A</sup>	3,03 ± 0,49 <sup>B</sup>	2,8 ± 0,48 <sup>B</sup>	16,86	0,00
PC (µm)	138 ± 27 <sup>A</sup>	115 ± 11 <sup>B</sup>	116 ± 20 <sup>B</sup>	25,45	0,00
PT (µm)	107 ± 21 <sup>A</sup>	124 ± 13 <sup>B</sup>	237 ± 33 <sup>C</sup>	67,22	0,00
DI (µm)	245 ± 29	253 ± 27	245 ± 39	1,38	0,50
DD (µm)	242 ± 23 <sup>B</sup>	249 ± 23 <sup>B</sup>	145 ± 23 <sup>A</sup>	60,23	0,00
DCi (µm)	88 ± 41 <sup>AB</sup>	74 ± 17 <sup>B</sup>	93 ± 32 <sup>A</sup>	7,49	0,02
DCd (µm)	88 ± 19 <sup>B</sup>	69 ± 12 <sup>A</sup>	95 ± 24 <sup>B</sup>	25,06	0,00
HHv (µm)	313 ± 49	321 ± 32	326 ± 65	1,49	0,48
AHv (µm)	475 ± 70	500 ± 55	498 ± 133	2,80	0,25
<b><i>Pinus tropicalis</i></b>					
NE	13,7 ± 1,86 <sup>AB</sup>	13,43 ± 2,11 <sup>A</sup>	14,90 ± 2,34 <sup>B</sup>	8,36	0,01
NC	6,63 ± 1,43 <sup>A</sup>	7,43 ± 1,36 <sup>B</sup>	7,43 ± 0,97 <sup>B</sup>	7,98	0,01
GC (µm)	3 ± 1	3 ± 0,34	2 ± 1	5,40	0,07
GE (µm)	14 ± 2	14 ± 2	15 ± 3	4,08	0,13
GH (µm)	30 ± 5	32 ± 5	33 ± 7	2,39	0,30
CH	1,97 ± 0,18 <sup>B</sup>	2,03 ± 0,18 <sup>B</sup>	2,20 ± 0,41 <sup>A</sup>	2,48	0,00
PC (µm)	136 ± 22 <sup>A</sup>	132 ± 16 <sup>A</sup>	158 ± 26 <sup>B</sup>	17,71	0,00
PT (µm)	160 ± 20 <sup>B</sup>	158 ± 17 <sup>B</sup>	140 ± 20 <sup>A</sup>	16,94	0,00
DI (µm)	318 ± 107	285 ± 106	308 ± 94	1,58	0,45
DD (µm)	313 ± 92	261 ± 101	286 ± 104	3,77	0,15
DCi (µm)	100 ± 19 <sup>A</sup>	103 ± 29 <sup>A</sup>	117 ± 20 <sup>B</sup>	11,28	0,00
DCd (µm)	103 ± 24	105 ± 27	106 ± 20	0,55	0,76
HHv (µm)	308 ± 30	317 ± 44	302 ± 32	2,03	0,36
AHv (µm)	469 ± 68	500 ± 71	490 ± 58	3,39	0,18

**TABLA IV**

**Resultado de los análisis de componentes principales (autovalores y autovectores), solamente con el empleo de las variables relacionadas con la regulación hídrica (arriba) y con la inclusión del parénquima clorofílico (debajo), de *Pinus caribaea* y *P. tropicalis* en Cayo Ratones (n = 30), Sabanalamar (n = 30) y Valle Ancón (n = 30), Pinar del Río, Cuba**

GC: Grosor de la cutícula, GH: Grosor de la hipodermis, CH: Número de capas de células de la hipodermis, NE: Número de estomas, PT: Grosor del parénquima de transfusión, GE: Grosor de la epidermis, PC: Grosor del parénquima clorofílico.

**TABLE IV**

**Result of principal component analysis (eigenvalues and eigenvectors), only using of variables related to water regulation (above) and with the inclusion of the chlorophyllic parenchyma (below), for *Pinus caribaea* and *P. tropicalis* in Cayo Ratones (n = 30), Sabanalamar (n = 30) and Valle Ancón (n = 30), Pinar del Río, Cuba**

GC: Thickness of cuticle, GH: Thickness of hypodermis, CH: Number of band of cells of hypodermis, NE: Number of stomata, PT: Thickness of transfusion parenchyma, GE: Thickness of epidermis, PC: Thickness of chlorophyllic parenchyma

Lambda	Valor	Autovalores		Autovectores		
		Proporción	Proporción acumulada	Variables	CP 1	CP 2
<i>Variables solamente relacionadas con la regulación hídrica</i>						
1	4,18	0,70	0,70	GC	-0,47	-0,19
2	1,25	0,21	0,90	GH	0,48	0,03
3	0,43	0,07	0,98	CH	0,45	-0,12
4	0,13	0,02	1,00	NE	0,46	0,08
				PT	0,11	0,82
				GE	-0,34	0,52
<i>Inclusión del parénquima clorofílico</i>						
1	4,71	0,67	0,67	GC	0,44	-0,19
2	1,25	1,18	0,85	GH	-0,44	0,03
3	0,87	0,12	0,98	CH	-0,43	-0,12
4	0,20	0,02	1,00	NE	-0,42	0,09
				PC	0,36	-0,02
				PT	0,12	0,82
				GE	-0,35	0,52

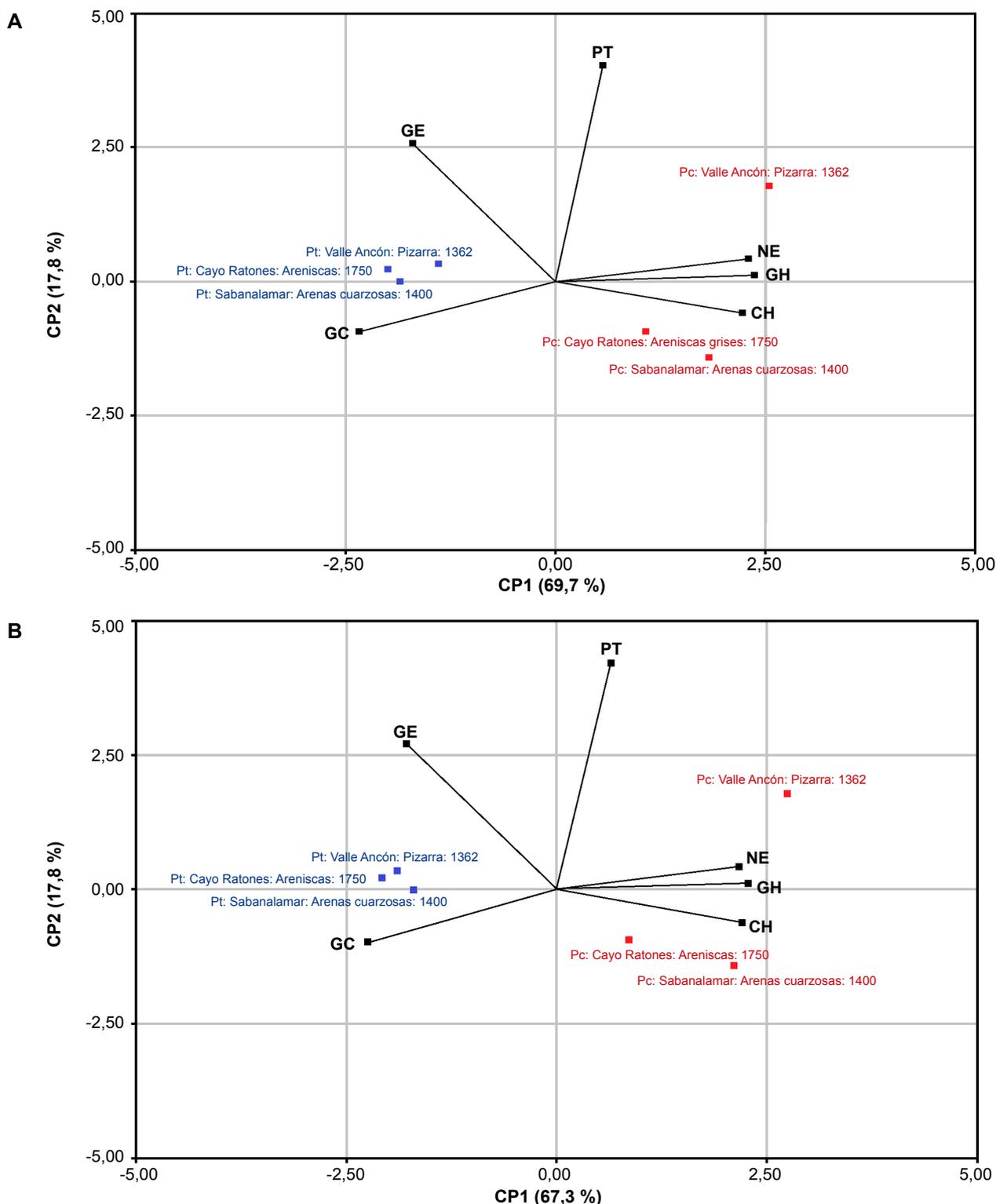
el número de capas de células de la hipodermis y número de estomas. El segundo componente contribuye fundamentalmente a separar las localidades en función del grosor del parénquima de transfusión y en segundo lugar el grosor de la epidermis.

El primer componente separa los dos taxones estudiados (Figura 3A): *Pinus caribaea* hacia la parte positiva y *P. tropicalis* hacia la parte negativa. Además, explica la variabilidad en cuanto a grosor de hipodermis, número de capas de células de la hipodermis y número de estomas. *Pinus caribaea* en las localidades Cayo Ratones y Sabanalamar está más correlacionada con el número de capas de células de la hipodermis y en Valle Ancón con el número de estomas. El grosor de la cutícula es la variable más correlacionada con *P. tropicalis* en las tres localidades. El segundo componente explica la variabilidad en cuanto a grosor de la epidermis y el grosor del parénquima de transfusión, sobre todo de *P. caribaea* en la localidad de Valle Ancón.

Las contribuciones de las variables y sus correlaciones no siguen un gradiente de precipitaciones (Figura 3), por lo que

se puede inferir que esta no es una variable que determine la ubicación de las localidades en el espacio cartesiano definido por los dos componentes. El sustrato, aunque más evidente en *Pinus caribaea*, parece tener una influencia en la ordenación de las localidades y ubica siempre a Sabanalamar y Cayo Ratones hacia la parte negativa del segundo componente. La ubicación de los taxones respecto al primer componente, revela que, aunque ocupen ecótopos iguales, presentan diferentes características anatómicas para enfrentar el déficit hídrico propio de estos.

De acuerdo a este análisis, el grosor de la cutícula es la adaptación más importante para *P. tropicalis* y el grosor de la hipodermis para *P. caribaea*. Cuando se incorporó el grosor del parénquima clorofílico al análisis, los dos primeros componentes explicaban el 85% de la varianza. A diferencia del primer análisis, al primer componente se le asocia además el grosor del parénquima clorofílico con un peso positivo, el resto de las variables grosor de la epidermis y grosor del parénquima de transfusión continúan asociadas al segundo componente con igual correlación (Tabla IV), y la ubicación de los taxones y sus localidades no cambiaron (Figura 3B).



**Fig. 3.** Ordenación de los taxones-localidades en los dos primeros componentes principales, solamente con el empleo de las variables relacionadas con la regulación hídrica (A) y con la inclusión del parénquima clorofílico (B). Para cada taxón-localidad se presenta el tipo de sustrato y la precipitación anual (en mm). Pc (rojo): *Pinus caribaea*, Pt (azul): *P. tropicalis*, GC: Grosor de la cutícula, GH: Grosor de la hipodermis, CH: Número de capas de células de la hipodermis, NE: Número de estomas, PT: Grosor del parénquima de transfusión, GE: Grosor de la epidermis, PC: Grosor del parénquima clorofílico.

**Fig. 3.** Ordination of taxa-localities in the first two main components, only using the variables related to water regulation (A), inclusion of the chlorophyll parenchyma (B). For each taxon-locality, the type of substrate and annual precipitation are presented (in mm). Pc (red): *Pinus caribaea*, Pt (blue): *P. tropicalis*, GC: Thickness of cuticle, GH: Thickness of hypodermis, CH: Number of band of cells of hypodermis, NE: Number of stomata, PT: Thickness of transfusion parenchyma, GE: Thickness of epidermis, PC: Thickness of chlorophyllous parenchyma.

El análisis de conglomerados permitió, de acuerdo a las características anatómicas analizadas, distinguir tres agrupaciones (Figura 4). La primera determinada por el comportamiento de estas variables en *Pinus tropicalis*, las restantes integradas por *P. caribaea*, la segunda en Valle Ancón y la tercera en las localidades Cayo Ratones y Sabanalamar. La anatomía de las acículas en Valle Ancón difiere significativamente respecto a las otras dos localidades en ambos taxones y llega a constituir un conglomerado aparte en *P. caribaea*.

### DISCUSIÓN

El estudio muestra claramente las diferencias anatómicas entre las dos especies bajo un mismo ambiente (Tablas II y III), es decir cada una ha desarrollado sus propios mecanismos anatómicos y funcionales para contrarrestar las condiciones de estrés. Dörken & Stützel (2012) y Grill & al. (2004) describen que las especies de *Pinus* que se desarrollan en ambientes extremos, generalmente desarrollan una cutícula prominente, gruesa y una hipodermis conformada por varias capas de células gruesas de forma circular. Sin embargo, *P. caribaea* desarrolla mayor número de capas y grosor de la hipodermis (tipo multiforme) como adaptación a iguales condiciones. Por otro lado, *P. tropicalis* desarrolla la cutícula algo más gruesa acompañada de mayor cantidad de tejido esclerenquimatoso, similar a lo reportado para especies de su subsección (*Pinus* subsect. *Pinus*): *P. tabuliformis* (Zhang & al. 2017), *P. thunbergii* Parl. (Ghimere & al. 2014), *P. taiwanensis* (Sheue & al. 2003), *P. roxburghii* Sarg. (Tiwari & al. 2013), o especies de su sección que habitan ambientes muy secos: *P. canariensis* (Grill & al. 2004), *P. heldreichii* Christ (Nicholić & al. 2016). A diferencia de estos resultados, en Cuba no existen gradientes de temperatura, precipitación, humedad, altitud o exposición, a excepción de los sustratos en que se desarrolla, que expliquen esta adaptación en la especie cubana.

La presencia de tejido mecánico (esclerenquima) en la hipodermis y de este entre los haces vasculares en *Pinus tropicalis*, contribuye a aumentar la resistencia a la sequía edáfica y a conferir rigidez a las largas acículas en la especie. Similares adaptaciones y disminución en el número de estomas, fueron reportadas en *P. canariensis* (Grill & al. 2004, López & al. 2008, 2010), *P. tabuliformis* (Meng & al. 2018) y *P. sylvestris* (Köbölkuti & al. 2017) para enfrentar ambientes muy secos. Un elemento que parece estar relacionado con la economía hídrica en especies ancestrales como *P. tropicalis* es la disminución del número de estomas y su densidad en comparación con especies de *Pinus* sect. *Trifoliae* como es el caso *P. caribaea* (Pérez-Olvera & Ceja-Romero 2019, Donnelly & al. 2016, Tiwari & al. 2013, Galdina & Khazova 2019).

En relación con los canales resiníferos, este es el primer estudio en clasificar el tipo de canal en *Pinus tropicalis*, los cuales fueron inequívocamente de tipo marginal, similares a los de sus congéneres de *Pinus* sect. *Pinus* y considerados los más primitivos entre los restantes tipos de canales del género (Sheue & al. 2014). Esta característica también demuestra la posición basal de esta especie en la filogenia (Geda-López & al. 2004, Gernandt & al. 2005). Los canales tuvieron variación en número entre las tres localidades y aumentan hacia lugares más secos desde el punto de vista edáfico (Tabla III). Esta respuesta se ha observado en algunas especies asociado a un gradiente de precipitación y humedad, tales como *P. sylvestris* (Donnelly & al. 2016, Köbölkuti & al. 2017, Galdina & Khazova 2019), *P. thunbergii* (Ghimire & al. 2014), *P. tabuliformis* (Zhang & al. 2017) y *P. yunnanensis* (Huang & al. 2016). Aunque no se comprende totalmente el rol de los canales de resina en la regulación del agua (Farrell & al. 1991, Krokene & Nagy 2012), se ha detectado que la mayor densidad de canales se asocia a áreas de menor disponibilidad de humedad (Donnelly & al. 2016, Jankowski & al. 2017)

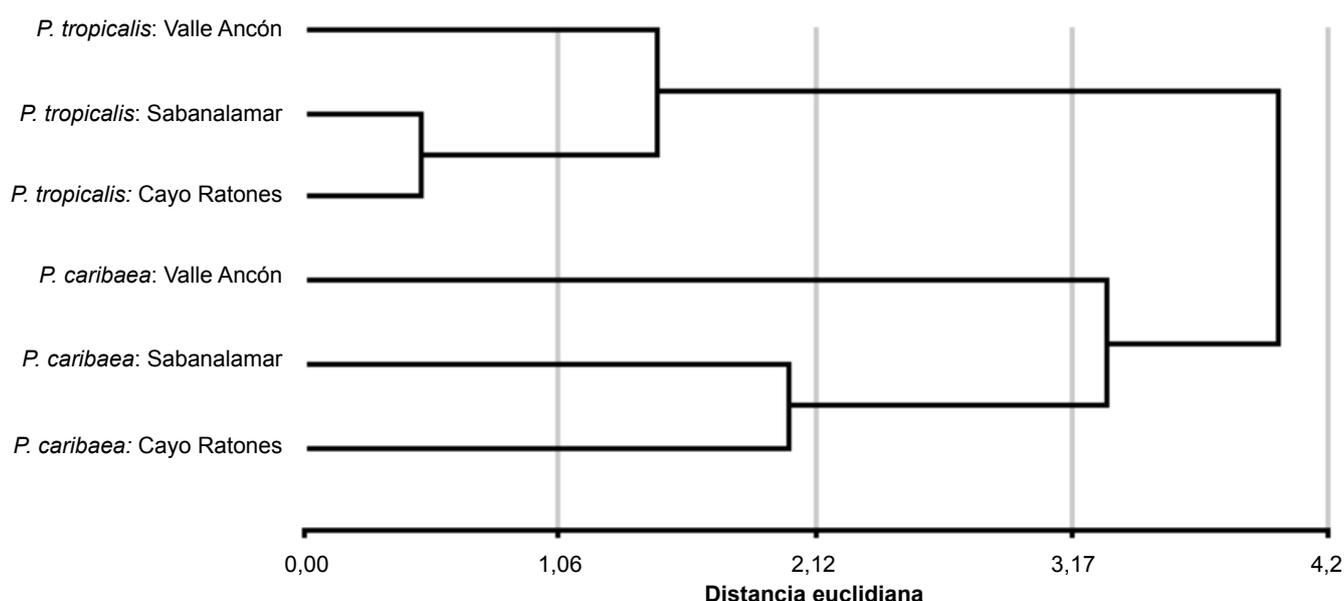


Fig. 4. Dendrograma de la clasificación por taxón-localidad de *Pinus* a partir de las distancias euclidianas (correlación cofenética: 0,943).

Fig. 4. Dendrogram of the classification by taxon-locality of *Pinus* based on euclidean distances (cophenetic correlation: 0.943).

y su incremento en número y tamaño está correlacionado, en *P. yunnanensis* con disminuciones de precipitación y aumento de la temperatura que contribuye a reducir la influencia a la extrema sequía y calor (Huang & al. 2016).

Adicionalmente, dada la variación desplegada por *Pinus tropicalis* en el número y ancho de los canales resiníferos, y el control genético sobre el número de canales y su tipo en pinos asiáticos filogenéticamente cercanos (Donnelly & al. 2016, Huang & al. 2016, Zhang & al. 2017), las localidades sobre sustratos de pizarra serían potencialmente deseables para la planificación de la resinación. Esta característica en la especie tiene gran importancia biológica debido a su endemismo, a la ancestralidad del taxón y su variación en número, lo que sugiere la mayor capacidad de la especie para la producción de resina y, por ende, su factibilidad en los planes de producción, pese a que comúnmente se prefiere *P. caribaea* en la actividad forestal (Álvarez-Brito & al. 1991b). Esta característica de amplios canales en comparación con *P. caribaea* y de su número fue documentada por López-Almirall & Albert-Puente (1982) en un estudio anatómico foliar para detectar diferencias entre las cuatro especies cubanas. No obstante, se necesita profundizar sobre la relación entre la producción de resina de estas zonas y el número de canales de los individuos en las poblaciones.

*Pinus caribaea* tiene canales de tipo endonal generalmente pequeños en comparación con *P. tropicalis* (ver Tabla II y III). Al respecto, Sheue & al. (2014) plantean que tanto los canales dentro del haz vascular como los endonales tienen un fuerte control genético y son menos susceptibles a variaciones ambientales, a no ser que estén asociados a verdaderas adaptaciones microclimáticas y las variaciones son generalmente relativas al número de estos. Otros autores refieren que la clasificación de los canales es un buen carácter interespecífico (Knopf & al. 2012, Eo & Hyun, 2013, Ghimire & al. 2014); sin embargo, han documentado que este puede variar dentro de una especie, especialmente si hay fenómenos de introgresión e hibridación asociados (Sheue & al. 2014, Boratynska & al. 2003). En este estudio nunca se encontraron muestras que suscitaban ambigüedad en la adscripción a cada especie. Este carácter aún es de gran valor diagnóstico a nivel intraseccional (Sheue & al. 2014), ya que el canal endonal predomina en *Pinus* sect. *Trifoliaea* (Pérez-Olivera & Ceja-Romero 2019) como es el caso de *P. caribaea*.

López-Almirall (1982) fue el primero en reconocer la gran variabilidad en las características morfológicas, reproductivas y algunas características anatómicas entre las poblaciones naturales de *Pinus caribaea*; sin embargo, su muestreo se concentró en rodales puros del taxón a excepción de uno en que ambos taxones se encontraban en simpatria. Dicho autor reconoció las discretas diferencias entre las poblaciones (localidades) de *P. tropicalis*, que consideró una especie altamente adaptada en relación con *P. caribaea*. En esta última son más notables las diferencias entre las localidades (Figuras 2-3, Tabla III), lo que demuestra su capacidad de ocupar varios ecótopos y una posible gran plasticidad

fenotípica, buena capacidad competitiva e invasividad (Badik & al. 2018, Rebolledo-Camacho & al. 2018). Estudios previos han referido una mayor variación a nivel de procedencias en *P. caribaea* (García-Quintana & al. 2007) que en *P. tropicalis*. Este es el primer estudio donde se encuentran diferencias en la anatomía foliar de estas localidades y que pudieran ser la causa de las diferencias entre procedencias en ambos taxones (Álvarez-Brito & al., 1991a, Mercadet-Portillo & al. 2001).

Tanto el método de ordenación como el de clasificación (Figuras 3-4) demuestran que el sustrato tiene una marcada influencia en la anatomía de las acículas al diferenciarse cada localidad dentro de cada taxón. Así, por ejemplo, Sabanalamar y Cayo Ratones que representan los ecótopos con suelos más extremos desde el punto de vista hídrico por su alta infiltración y muy baja retención de humedad, determinan un comportamiento más singular en la anatomía. Pérez-del Valle & al. (2019) encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de estomas entre tres localidades naturales de *Pinus tropicalis*: Petriles, San Ubaldo y Cayo la Mula, mientras en San Ubaldo, el número de canales de resina, el grosor de cutícula y de la hipodermis fue superior a los de las otras localidades y el grosor del parénquima clorofilico inferior, características que atribuye en esta localidad a ajustes anatómicos ante las condiciones edáficas secas de este ecótopo.

Por otro lado, en ambos taxones dentro de sus localidades, y en particular para *Pinus tropicalis*, la estabilidad en las características anatómicas sugiere la existencia de una adaptación en la especie, aspecto que fue considerado inicialmente por Lopez-Almirall (1982). El efecto de la localidad es más evidente en *P. caribaea*, donde la localidad de Valle Ancón (que representa sustratos de pizarras de la formación San Cayetano) se distancia de Sabanalamar y Cayo Ratones y la ubican en un conglomerado aparte (Figura 4).

Los escasos estudios dendrométricos (altura, diámetro, rectitud del fuste, incrementos medios anuales, entre otros) como parte de las pruebas de procedencias sostienen, para *P. caribaea*, la existencia de diferencias entre los orígenes geográficos (García-Quintana & al. 2007). Por otra parte, para *P. tropicalis* no se refirieron diferencias entre las seis procedencias evaluadas (Mercadet & al. 2001), todas ellas correspondientes a localidades sobre sustratos de pizarras. Este comportamiento de adaptaciones locales ha sido documentado en especies, aunque con mayores rangos de distribución y ambientes más contrastantes (Grill & al. 2004, Lopez & al. 2008, Donnelly & al. 2016, Galdina & Khazova 2019, Tyukavina & al. 2019); y comprobado al usar las pruebas de procedencias y progenies dentro de los programas de mejoramiento de *P. sylvestris* (Donnelly & al. 2016), *P. canariensis* (Lopez & al. 2008; Lopez & al. 2016) y *P. tabuliformis* (Meng & al. 2018).

Bajo la tesis de que especies con amplios rangos de distribución tienen mayor potencial para exhibir una gran variación intraespecífica en morfología, fisiología, fenología y

crecimiento (Zhang & al. 2017, Jankowski & al. 2017, Köbölkuti & al. 2017, Tyukavina & al. 2019), cabría esperar una pequeña variación anatómica en especies con una reducida área de distribución y sin grandes contrastes en clima y vegetación. Los resultados obtenidos reflejan que, en especies insulares, en especial las cubanas, las condiciones del sitio o su origen geológico hace que desplieguen una variación fenotípica, que determina su adaptación a edátopos diferentes.

## CONCLUSIONES

En poblaciones simpátricas cada taxón tiene una respuesta diferencial adaptativa en sus variables anatómicas. *Pinus caribaea* para contrarrestar el estrés hídrico aumenta el grosor de la hipodermis, el número de capas de células de esta y el número de estomas. *Pinus tropicalis*, por su parte, desarrolla mayor grosor de cutícula, una hipodermis muy esclerénquimata, estomas muy hundidos, canales resiníferos amplios y marginales. Existe variación en la anatomía dentro de ambas especies en función del sustrato.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación forma parte de los resultados del proyecto PE-44 de la Universidad de Pinar del Río y del proyecto de Doctorado en Ciencias Forestales de la primera autora. En especial agradecemos a los guías, los guardabosques que colaboraron en las recolectas y al equipo del Laboratorio de Botánica de la institución. A los árbitros y editores de la Revista del Jardín Botánico Nacional por sus sugerencias y comentarios durante el proceso editorial.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

L. Pérez-del Valle desarrolló el trabajo de laboratorio, así como la compilación y procesamiento de los datos. G. Geada-López concibió la idea original, diseñó la investigación y escribió la primera versión del manuscrito. R. Sotolongo-Sospedra realizó el análisis estadístico y revisión del documento. Todos los autores participaron en las recolectas del material en las localidades de estudio y en la redacción y revisión del manuscrito.

## CUMPLIMIENTO DE NORMAS ÉTICAS

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

**Aprobación de ética:** Todos los autores han llevado a cabo el trabajo de campo y la generación de datos de forma ética, incluida la obtención de permisos adecuados.

**Consentimiento para la publicación:** Todos los autores han dado su consentimiento para publicar este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez-Brito, A., Mercadet-Portillo, A., Echevarría, P., Hidalgo, E., Rodríguez, E. Martínez, J. & Suárez, E. 1991a. Estudio de interacción genotipo-ambiente en pruebas de procedencias de *Pinus caribaea* Morelet. *Bol. Tecn. Forest.* 9(2): 3-13.

Álvarez-Brito, A., Romero, A., Mesa, M. & Ramírez, P. 1991b. Variaciones mensuales de los rendimientos en las especies del género *Pinus* resinadas en Cuba. *Bol. Tecn. Forest.* 9(2): 45-53.

Badik, K.J., Jahner, J.P. & Wilson, J.S. 2018. A biogeographic perspective on the evolution of fire syndromes in pine trees (*Pinus: Pinaceae*). *R. Soc. Open Sci.* 5: 172412. <https://doi.org/10.1098/rsos.172412>.

Boratyńska, K., Boratyński, A. & Lewandowski, A. 2003. Morphology of *Pinus uliginosa* (*Pinaceae*) needles from populations exposed to and isolated from the direct influence of *Pinus sylvestris*. *Bot. J. Linn. Soc.* 142(1): 83-91. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00156.x>.

Boratyńska, K., Jasińska, A.K., Marcysiak, K. & Sobierajska, K. 2011. *Pinus uliginosa* from Czarne Bagno peat-bog (Sudetes) compared morphologically to related *Pinus* species. *Dendrobiology* 65: 17-28.

Boratyńska, K., Jasińska, A. K. & Boratyński, A. 2015. Taxonomic and geographic differentiation of *Pinus mugo* complex on the needle characteristics. *System. Biodivers.* 13: 581-595.

Cabrera-Bermúdez, J. 2002. Introducción al catastro ingenierogeológico y geoambiental de la provincia de Pinar del Río, aplicando tecnología SIG. Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias Geológicas. Universidad de Pinar del Río "Hermanos Saiz Montes de Oca", Cuba.

Conover W.J. 1999. Practical Nonparametric statistics. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

Delgado-Valerio, D., Salas-Lizana, R., Vázquez-Lobo, A., Wegier, A., Anzidei, M., Alvarez-Buylla, E.R., Vendramin, G.G. & Piñero-Dalmau, D. 2007. Introgressive Hybridization in *Pinus montezumae* Lamb and *Pinus pseudostrabus* Lindl. (*Pinaceae*): Morphological and Molecular (cpSSR) Evidence. *Int. J. Plant Sci.* 168(6): 861-875.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Donnelly, K., Cavers, S., Cottrell, J.E. & Ennos, R.A. 2016. Genetic variation for needle traits in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genet. Genomes* 12(3): 40-50. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1000-4>.

Dörken, V.M. & Stützel, T. 2012. Morphology, anatomy and vasculature of leaves in *Pinus* (*Pinaceae*) and its evolutionary meaning. *Flora* 207: 57-62.

Eo, J.K. & Hyun, J.O. 2013. Comparative anatomy of the needles of *Abies koreana* and its related species. *Turk. J. Bot.* 37: 553-560. <https://doi.org/10.3906/bot-1201-32>.

Farjon, A. & Filer, D. 2013. An atlas of the world's conifers: An analysis of their distribution, biogeography, diversity and conservation status. Brill, Leiden, Netherlands.

Farrell, B.D., Dussourd, D.E. & Mitter, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? *Am. Nat.* 138: 881-900.

Galdina, T. & Khazova, E. 2019. Adaptability of *Pinus sylvestris* L. to various environmental conditions. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 316: 012002. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/316/1/012002>.

Gallien, L., Saladin, B., Boucher, F.C., Richardson, D.M. & Zimmermann, N.E. 2015. Does the legacy of historical biogeography shape current invasiveness in pines? *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.13700>.

García-Quintana, Y., Álvarez-Brito, A. & Guízar-Nolazco, E. 2007. Ensayo de proedencias de *Pinus caribaea* var. *caribaea* en Alturas de pizarras, Viñales, Pinar del Río, Cuba. *Rev. Chapingo ser. Cienc. For. Ambient.* 13(2): 125-29.

Geada-López, G. 2003. Phylogenetic relationships of *Diploxylon* pines and genetic variation of *Pinus tropicalis*. Ph.D thesis in Forest Resource Biology, Ehime University, Japón. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34316.72325>.

Geada-López, G., Kamiya, K. & Harada, K. 2004. Phylogeny of *Diploxylon* pines (subgenus *Pinus*). *Forest Genetics* 11(3-4): 213-221.

Gernandt, D. S., Geada-López, G., Ortiz, S. & Liston, A. 2005. Phylogeny and Classification of *Pinus*. *Taxon* 54(1): 29-42.

Ghimire, B., Kim, M., Lee, J.H. & Heo, K. 2014. Leaf anatomy of *Pinus thunbergii* Parl. (*Pinaceae*) collected from different regions of Korea. *Korean J. Pl. Taxon* 44 (2): 91-99.

- Grill, D., Tausz, M., Pöllinger, U., Jiménez, M.S. & Morales, D. 2004. Effects of drought on needle anatomy of *Pinus canariensis*. *Flora* 199: 85-89. <https://doi.org/10.1078/0367-2530-00137>.
- Huang, Y., Mao J., Chen, Z., Meng, J., Xu, Y., Duan, A. & Li, Y. 2016. Genetic structure of needle morphological and anatomical traits of *Pinus yunnanensis*. *J. For. Res.* 27(1): 13-25.
- Jankowski, A., Wika, T.P., Żytkowiak, R., Nihlgård, B., Reich, P.B. & Oleksyn, J. 2017. Cold adaptation drives variability in needle structure and anatomy in *Pinus sylvestris* L. along a 1,900 km temperate-boreal transect. *Funct. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12946>.
- Jardón-Barbolla, L., Geada-López, G., Delgado-Valerio, P., Vázquez-Lobo, A. & Piñero, D. 2011. Phylogeography of Subsection *Australes* pines in the Caribbean basin. *Ann. Bot.* 107(2): 229-241. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq232>.
- Jasińska A.K., Boratyńska, K., Dering, M., Sobierajska, K.I., Ok, T., Romo, A. & Boratyński, A. 2014. Distance between South-European and South-West Asiatic refugial areas involved morphological differentiation – *Pinus sylvestris* case study. *Plant Syst. Evol.* 300: 1487-1502. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0976-6>.
- Kivimäenpää, M., Sutinen, S., Valolahti, H., Häikiö, E., Riikonen, J., Kasurinen, A., Ghimire, R.P., Holopainen, J.K. & Holopainen, T. 2017. Warming and elevated ozone differently modify needle anatomy of Norway spruce (*Picea abies*) and Scots pine *Pinus sylvestris*. *Can. J. For. Res.* 47(4): 488-499. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2016-0406>.
- Knopf, P., Schulz, C., Little, D.P., Stützel, T. & Stevenson, D.W. 2012. Relationships within Podocarpaceae based on DNA sequence, anatomical, morphological, and biogeographical data. *Cladistics* 28: 271-299.
- Köbölkuti, Z.A., Tóth, E.G., Ladányi, M. & Höhn, M. 2017. Morphological and anatomical differentiation in peripheral *Pinus sylvestris* L. populations from the Carpathian region. *Dendrobiology* 77: 105-117. <https://doi.org/10.12657/denbio.077.009>.
- Krokene, P. & Nagy, N.E. 2012. Anatomical aspects of resin-based defenses in pine. In: Pine Resin: Biology, Chemistry and Applications. (Ed.): Fett-Neto A. G. and Rodrigues-Corrêa, K. C. S. pp. 67-86 ISBN: 978-81-308-0493-4.
- López, R., Climent, J. & Gil, L. 2008. From desert to cloud forest: the nontrivial phenotypic variation of Canary Island pine needles. *Trees* 22: 843-849. <https://doi.org/10.1007/s00468-008-0245-4>.
- López, R., Climent, J. & Gil, L. 2010. Intraspecific variation and plasticity in growth and foliar morphology along a climate gradient in the Canary Island pine. *Trees* 24: 343-350. <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0404-2>.
- López, R., Cano, F.J., Choat, B., Cochard, H. & Gil, L. 2016. Plasticity in vulnerability to cavitation of *Pinus canariensis* occurs only at the driest end of an aridity gradient. *Front. Plant Sci.* 7: 769. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00769>.
- López-Almirall, A. & Albert-Puente, D. 1982. Características anatómicas de las agujas en especies cubanas de *Pinus*. *Ciencias Biológicas* 8: 3-15.
- López-Almirall, A. 1982. Variabilidad del género *Pinus* (*Coniferales: Pinaceae*) en Cuba. *Acta Bot. Cub.* 12: 1-32.
- Magaz-García, A.R., Hernández-Santana, J.R., Díaz-Díaz, J.L. & Hernández-Guerrero, I. 2006. Formación y consolidación de las morfoestructuras septentrionales de la región central del archipiélago cubano y su geodinámica reciente. *Invest. Geog.* 61: 7-23.
- Meng, J., Chen, X., Huang, Y., Wang, L., Xing, F. & Li, Y., 2018. Environmental contribution to needle variation among natural populations of *Pinus tabuliformis*. *J. For. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0722-6>.
- Mercadet-Portillo, A., Marquetti, J.R., Álvarez, A., Pérez, M., Echevarría, P., Hidalgo, E., Ortiz, O., Rodríguez, E., Romeu, P., Ávila, B., Parada, D., Yero, L., Sotolongo, P., Martínez, E., Maresma, H., González, A.,
- Hechavarría, O., Hernández, O. & Paredes, L. 2001. Introducción de especies y procedencias en Cuba: Resultados de la investigación y proyecciones. *Recursos Genéticos Forestales* 29: 15-18.
- Miranda-Sierra, C.A. 2017. Cambios en la distribución potencial de pinares del occidente de Cuba en diferentes escenarios de cambio climático. Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias Forestales. <https://rc.upr.edu.cu/jspui/handle/DICT/2459>.
- Nicholić, B., Bojović, S. & Marin, P.D. 2016. Morpho-anatomical properties of *Pinus heldreichii* needles from natural populations in Montenegro and Serbia. *Plant Biosystems* 150(2): 254-263. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.984008>.
- Pardos, M. & Calama, R. 2018. Responses of *Pinus pinea* seedlings to moderate drought and shade: is the provenance a differential factor? *Phytosynthetica* 56(3): 786-798. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0732-1>.
- Pérez-del Valle, L., Geada-López, G. & Sotolongo-Sospedra, R. 2019. Diferencias anatómicas en acículas de *Pinus tropicalis* Morelet en edótopos extremos de pizarras y arenas blancas en Pinar del Río. *CFORES* 7(2): 225-239.
- Pérez-Olvera, M.C. & Ceja-Romero, J. 2019. Anatomía de la hoja de seis especies de *Pinus* del estado de Durango, México. *Madera Bosques* 25(1): e2511698. <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2511698>.
- Pszczolkowski, A., 1978. Geosynclinal sequences of the Cordillera de Guaniguanico in western Cuba; their lithostratigraphy, facies development, and paleogeography. *Acta Geológica Polonica* 28(1): 1-96.
- Rebolledo-Camacho, V., Jardón-Barbolla, L., Ramírez-Morillo, I., Vázquez-Lobo, A., Piñero-Dalmau, D. & Delgado-Valerio, P. 2018. Genetic variation and dispersal patterns in three varieties of *Pinus caribaea* (*Pinaceae*) in the Caribbean Basin. *Plant Ecol. Evol.* 151(1): 61-76. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2018.1343>.
- Samek, V. & Del Risco-Rodríguez, E. 1989. Los pinares de la provincia de Pinar del Río, Cuba. Estudio sinecológico. Editorial. Academia. La Habana. Cuba
- Sheue, C.R., Chang, H.C., Yang, Y.P., Liu, H.Y., Chesson, P. & Hsu, F. 2014. A new classification of marginal resin ducts improves understanding of hard pine (*Pinaceae*) diversity in Taiwan. *Flora* 209: 414-425.
- Sheue, C.R., Yang, Y.P. & Kuo-Huang, L.L. 2003. Altitudinal variation of resin ducts in *Pinus taiwanensis* Hayata (*Pinaceae*) needles. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 44: 305-313.
- Tiwari, S.P., Kumar, P., Yadav, D. & Chauhan, D.K. 2013. Comparative morphological, epidermal, and anatomical studies of *Pinus roxburghii* needles at different altitudes in the North-West Indian Himalayas. *Turk. J. Bot.* 37: 65-73.
- Tyukavina, O.N., Neverov, N.A. & Klevtsov, D.N. 2019. Influence of growing conditions on morphological and anatomical characteristics of pine needles in the northern taiga. *J. For. Sci.* 65(1): 33-39. <https://doi.org/10.17221/126/2018-JFS>.
- Xing, F.Q., Mao, J.F., Meng, J.X., Dai, J.F., Zhao, W., Liu, H., Xing, Z., Zhang, H., Wang, X. & Li, Y. 2014. Needle morphological evidence of the homoploid hybrid origin of *Pinus densata* based on analysis of artificial hybrids and the putative parents, *Pinus tabuliformis* and *Pinus yunnanensis*. *Ecol. Evol.* 4(10): 1890-1902.
- Zhang, M., Meng, J.X., Zhang, Z.J., Song L.Z. & Li, Y. 2017. Genetic analysis of needle morphological and anatomical traits among nature populations of *Pinus tabuliformis*. *J. Plant Stud.* 6(1): 62-75. <https://doi.org/10.5539/jps.v6n1p62>.