



Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.

**Tesis Doctoral**

**Luis Enrique Rodríguez de Francisco**

**2016**

TITULO: CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE POBLACIONES DE  
PINUS OCCIDENTALIS SWARTZ EN LA REPUBLICA DOMINICANA  
MEDIANTE EL EMPLEO DE TÉCNICAS MORFOANATOMICAS Y  
MOLECULARES

AUTOR: *Luis Enrique Rodríguez de Francisco*

---

© Edita: UCOPress. 2016  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---









**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**



**Departamento de Ingeniería Forestal**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones  
de *Pinus occidentalis* Swartz en la República  
Dominicana mediante el empleo de técnicas  
morfoanatómicas y moleculares.**

**Tesis Doctoral**

**Luis Enrique Rodríguez de Francisco**

**Rafael María Navarro Cerrillo  
Jesús V. Jorrín Novo**

**Córdoba, 2016**





**TÍTULO DE LA TESIS:** Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.

**DOCTORANDO/A:** D. Luis Enrique Rodríguez de Francisco

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El doctorando presenta y desarrolla un amplio estudio experimental a partir de poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* Swartz. en República Dominicana. La metodología empleada es correcta e incorpora técnicas novedosas de análisis estadístico y analítico, en particular orientadas a los estudios de ecología y variabilidad de una especie poco estudiada. La tesis aporta una visión aplicada de la selvicultura y la variabilidad del pino criollo en República Dominicana.

El resultado es original en el contexto de los estudios de selvicultura de especies de pinos del Caribe, al incorporar varios factores y las posibles relaciones en el éxito final de programas de domesticación de la especie. La tesis ha dado lugar a una publicación en revistas indexadas de alto impacto:

Rodríguez de Francisco, L., Romero-Rodríguez, M. C., Navarro-Cerrillo, R. M., Miniño, V., Perdomo, O., & Jorrín-Novo, J. V. (2016). Characterization of the orthodox *Pinus occidentalis* seed and pollen proteomes by using complementary gel-based and gel-free approaches. *Journal of proteomics*.

En la actualidad hay otros dos trabajos en revisión:

Rodríguez de Francisco, L., Jorrín-Novo, J., Duque Lazo, J., (2016). Distribución del hábitats de *Pinus occidentalis* Swartz, en República Dominicana bajo los efectos del cambio climático.

Rodríguez de Francisco, Navarro-Cerrillo, R. M., Carreras, R., Paulino Gervasio, L. Perdomo, O., Jorrín-Novo, J. V. (2016). Caracterización molecular mediante marcadores de microsatélites en poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz, en República Dominicana.

Por otro lado, se han presentado 6 comunicaciones orales y póster en Congresos Nacionales e Internacionales.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

En Còrdoba a 7 de Noviembre del 2016

El/los director/es de la tesis doctoral:

~~Rafael Urbano Alvarado~~  
Fdo.: ~~Rafael Urbano~~ Jesús V. Jiménez Navarro

Esta tesis ha sido realizada gracias a la beca otorgada por la Asociación de Universidades Iberoamericanas de Postgrado (AUIP), el proyecto “Caracterización de procedencias y empleo de técnicas de aproximación ómicas para el estudio fisiológico y molecular de cinco poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* Swart.”, financiado por el Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDOCYT) y los proyectos de Fondos Propios del Instituto Tecnológico de Santo Domingo (INTEC).



## Agradecimientos

Quisiera agradecer ante todo a Dios por ser mi soporte y mi guía en todo momento.

A mi esposa, quién siempre con amor, comprensión ha estado ahí, impulsando, apoyando y asumiendo muchas pero muchas cosas, para que yo pueda superarme profesional y personalmente, Mi amor gracias por ser como eres, A mis dos tesoros: Nana y Luisi, mis hijos, mis niños, aunque en ocasiones me perdí parte de su travesuras de infancia pero saben que los quiero y amo un montón.

A mis padres y a mi hermano, por sus enseñanzas, su guía y su comprensión.

A mis asesores, Jesús y Rafa, gracias por introducirme a este mundo de los árboles y la proteómica, muy desconocido para mí, pero me han acogido, enseñado y guiado en todo momento, no han sido sólo asesores, son amigos que han tenido una paciencia enorme conmigo, a los dos Muchas Gracias por todo, pues sin ustedes esto no hubiera llegado hasta aquí.

A mis colegas del Intec, Virgilio, Omar, Rosanna, Liz, Leticia, por siempre poder contar con ustedes, por esos viajes de campo, por esa discusiones con las muestras, de verdad que muchas gracias.

Ahora a mis amigos de acá, con quienes he aprendido mucho, me reido, por supuesto trabajado también, no voy a separar Áreas ni laboratorios, pues han sido una gran familia, Kitinita con Kitinito incluido, eres lo máximo siempre dispuesta a ayudar, enseñar y colaborar, hasta dejando lo tuyo por ayudar a los demás, Rosita sencilla, trabajadora y presta a ayudar, Sekvan (ese es muy peligroso), Muhitin, Irene, Cristina López, Emidio, Frank, Joaquin quién predijo mediante no sé que modelo que esto saldría, todos ustedes mis amigos de batalla, A Manolo, Anita, Mari Carmen quienes me han hecho sentir uno más del laboratorio. Muchas gracias.

Quiero agradecer también todo el apoyo que me ha brindado mi Instituto Tecnológico de Santo Domingo (Intec), pues me ha facilitado todo lo posible para el desarrollo de esta Tesis.

A la AUIP, al FONDOCYT, quienes han aportado financiamiento para la investigación y el desplazamiento, a la UCO por abrir sus instalaciones a la superación y capacitación de muchos.

Bueno no hablo ni escribo mucho, si realmente se me queda alguien, por favor que me disculpe.







## ÍNDICE

Resumen.....	vii
Summary .....	xi
Capítulo 1. Introducción General.....	1
1.1. Los bosques.....	2
1.2. Los bosques de coníferas tropicales.....	4
1.3. <i>Pinus occidentalis</i> Swartz.....	6
1.4. Variabilidad poblacional y genética de las coníferas del Caribe .....	9
1.5. Investigaciones en <i>P.occidentalis</i> .....	12
1.6. Objetivos y estructura de la tesis.....	13
1.7. Bibliografía .....	15
Capítulo 2 Modelos de predicción de hábitat actual y futuro de las poblaciones naturales de <i>Pinus occidentalis</i> Swartz., en la República Dominicana como base para los estudios de variabilidad de la especie.....	21
2.1. Introducción .....	23
2.2. Materiales y Métodos.....	26
2.2.1 Área de estudio.....	26
2.2.2. Localización de los datos y variables ambientales.....	29
2.2.3. Reducción de las variables .....	30
2.2.4. Modelos estadísticos .....	31
2.2.5. Selección y validación del modelo.....	31
2.2.6. Mapas de distribución .....	32
2.3. Resultados .....	33
2.3.1. Reducción de las variables .....	33
2.3.2. Selección y validación del modelo.....	35
2.3.3. Proyección futura del hábitat .....	40
2.4. Discusión.....	44
2.4.1 Hábitat potencial actual.....	44
2.4.2 Modelo de selección.....	45
2.4.3 Futuro hábitat de proyección.....	46
2.5. Bibliografía .....	48
Capítulo 3 Estructura del arbolado y variabilidad morfo anatómica de poblaciones de <i>Pinus occidentalis</i> en República Dominicana.....	57
3.1. Introducción .....	59
3.2. Material y métodos.....	63
3.2.1. Área de estudio.....	63
3.2.2. Inventario .....	65
3.2.3. Descripción del estado selvícola .....	67
3.2.4. Métodos dendrocronológicos .....	69
3.2.5. Variabilidad morfoanatómica.....	71
3.3. Resultados .....	72
3.3.1. Descripción selvícola .....	72
3.3.2. Estructura de clases diamétricas.....	72
3.3.3. Estructura de edad de poblaciones de <i>Pinus occidentalis</i> .....	73
3.3.4. Análisis de la variación morfoanatómica. ....	76

3.4. Discusión .....	83
3.4.1. Características de la estructura de la masa forestal .....	83
3.4.2. Estructura de la edad.....	87
3.4.3. Análisis de la variación morfoanatómica. ....	87
3.4.4. Implicaciones para la gestión y sugerencias para futuras investigaciones .....	90
3.5. Bibliografía.....	91
Capítulo 4. Estructura y diversidad genética, mediante marcadores moleculares de microsatélites en poblaciones naturales de <i>Pinus occidentalis</i> Swartz. de la República Dominicana. ....	97
4.1. Introducción.....	99
4.2. Materiales y métodos.....	102
4.2.1. Área de estudio .....	102
4.2.2. Extracción de DNA y selección de cebadores polimórficos .....	104
4.2.3. Amplificación del DNAc <sub>p</sub> mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	105
4.2.4. Análisis de datos.....	106
4.3. Resultados.....	107
4.4. Discusión .....	113
4.5. Bibliografía.....	116
Capítulo 5. Caracterización del proteoma de polen y semillas de <i>Pinus</i> <i>occidentalis</i> mediante el uso de las aproximaciones complementarias basadas en gel y gel-free.....	123
5.1. Introducción.....	125
5.2. Materiales y métodos.....	127
5.2.1. Material vegetal .....	127
5.2.2. Extracción de proteínas .....	128
5.2.3. Electroforesis en gel mono y bidimensional. ....	129
5.2.4. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF .....	130
5.2.5. nLC-LTQ Orbitrap MS/MS.....	132
5.2.6. Clasificación funcional de las proteínas .....	133
5.4. Discusión .....	136
5. 5. Bibliografía.....	143
Capítulo 6. Discusión General.....	163
6.1. Selección del Modelo .....	167
6.3 Proyección de hábitat futuro .....	168
6.4. Estructura de la masa forestal.....	169
6.5. Estructura de la edad.....	170
6.6 Variabilidad poblacional, mediante análisis morfoanatómicos, marcadores de DNA y proteómica.....	171
Conclusiones.....	179





## Resumen

La presente Tesis Doctoral está centrada en el estudio del pino criollo (*Pinus occidentalis* Swartz), la especie más importante y representativa del ecosistema forestal dominicano, tanto desde el punto de vista medioambiental como económico. Es una especie huérfana en cuanto al estudio de su biología y de la variabilidad poblacional, en especial a nivel molecular.

Se ha pretendido, mediante el uso de modelos predictivos, analizar su hábitat de distribución, y su situación futura teniendo en cuenta las condiciones de cambio climático. El estudio de la variabilidad poblacional se ha llevado a cabo mediante técnicas morfoanatómicas y moleculares, incluyendo las técnicas de marcadores de DNA, microsatélites. Por primera vez se ha utilizado la proteómica en la caracterización del proteoma de semillas y polen.

Se llevaron a cabo prospecciones, medidas y tomas de muestras (semillas y polen) en las siguientes Parques Nacionales (Sierra de Bahoruco, Sierra de Neiba, José del Carmen Ramírez, Armando Bermúdez y Valle Nuevo).

El manuscrito se ha estructurado en una introducción y discusión general y 4 capítulos adicionales en los que se han presentado y discutido los resultados relativos a los objetivos generales anteriormente indicados:

1. Determinación del impacto del cambio climático en la distribución potencial de *Pinus occidentalis* Swartz., en República Dominicana.
2. Determinación de la estructura del arbolado y variabilidad morfoanatómica de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en República Dominicana.
3. Estudio de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* Swartz., de la República Dominicana.
4. Optimización de protocolos para el análisis del proteoma de polen y semillas de *Pinus occidentalis* Swartz.

Para los modelos de predicción se emplearon las 19 variables bioclimáticas recogidas en la base de datos wordclim. Mediante pruebas de ajuste se eligieron las cinco que presentaron mayor correlación. Se utilizó el modelo de distribución de especies R biomod2, mediante el cual se analizaron las curvas de respuesta de las variables dependientes. Para la variable Bio 8, temperatura media del trimestre más lluvioso, la probabilidad de presencia de la especie disminuyó a medida que la temperatura fue superior a los 21,6 °C. Para Bio 7, rango anual de temperatura, la probabilidad de presencia aumentó a temperaturas por encima de 16 °C. Para Bio 13, precipitación del mes más lluvioso, la probabilidad fue mayor a valores superiores a los 307 mm. Para la variable Bio 18, precipitación del trimestre más cálido, la probabilidad fue mayor por debajo de los 213 mm. Por último, para Bio 19, precipitación del trimestre más frío, no hubo grandes variaciones en los valores de probabilidad.

Los mapas de distribución potencial actual de la especie indicaron que las áreas más favorables para la especie fueron algunas de las estudiadas, como las de montaña en la parte central y sur de la República Dominicana. Otras zonas potenciales, como la frontera con Haití, no se pudieron incluir en el estudio. El estudio de la evolución futura del área potencial de distribución, en un escenario de Cambio Climático, señaló una recesión generalizada del hábitat del pino criollo en toda su área de distribución actual, siendo más acusada para el sur de la Isla donde se encontró que la probabilidad de ocurrencia de la especie disminuirá más del 50% para el año 2050; y casi un 65% para el 2070 en el caso de las poblaciones de Sierra de Neiba y de José Armando Bermúdez. Se observó que hay zonas potenciales de presencia de la especie que en las condiciones más severas (RCP 85 para el año 2070) verán reducida su potencialidad a valores mínimos no significativos. No obstante, la especie encuentra un refugio climático en las zonas más altas de la isla donde incluso en las condiciones más extremas, la probabilidad de ocurrencia seguirá siendo próxima al 100%.

En el estudio de la estructura y caracterización morfológica de bosques de *Pinus occidentalis* en poblaciones naturales (Red de Parques Nacionales de la República Dominicana) se observó que la densidad de los individuos adultos de

*Pinus occidentalis* ( $Dn \geq 15$  cm) varió entre 1100 pies  $ha^{-1}$  (Sierra de Nieba) y 2531 pies  $ha^{-1}$  (José del Carmen Ramírez y Armando Bermúdez), existiendo diferencias significativas entre las diferentes localidades ( $F=24,27$ ;  $P<0,001$ ). Los valores de área basimétrica estuvieron comprendidos dentro del rango 151-385  $m^2 ha^{-1}$  ( $F=20,13$ ;  $P<0,001$ ). La presencia de individuos jóvenes en todas las poblaciones prospectadas fue muy baja, lo que es indicativo de una pobre regeneración natural de la especie.

Todas las variables morfométricas evaluadas presentaron diferencias intrapoblacionales significativas. Los patrones de variación morfológica encontrados en los análisis de componentes principales y de conglomerados convergieron en la existencia de variación continua en las características evaluadas. Esto no permitió una clara diferenciación fenotípica a nivel interpoblacional.

La variabilidad genética de las poblaciones se analizó mediante marcadores microsatélites de cloroplasto. Se emplearon trece marcadores, de los que solo ocho fueron polimórficos, siendo el número de haplotipos de 25, con 16 de ellos específicos de población. La población de Sierra de Bahoruco fue la más diferenciada y la que presentó los valores de distancia genética más altos. El análisis de varianza molecular (AMOVA) determinó que las localidades estudiadas se diferenciaron genéticamente en un 12% y la diferenciación intrapoblacional de un 88%. La diversidad genética total entre las zonas (diversidad genética intrapoblacional y la diferenciación de la diversidad), dio como resultado que la Sierra de Bahoruco presentó menor diversidad genética, por lo que requiere mayor grado de atención y de acciones que eviten la pérdida de individuos en esta localidad. Se identificaron dos grupos genéticos según los valores de distancia genética de Nei, el primero correspondió a la Sierra de Bahoruco y el otro a Sierra de Nieba y Cordillera Central.

Se llevó a cabo la optimización de protocolos de análisis proteómico de semillas y de polen mediante estrategias complementarias de “gel” y “gel-free”. Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se identificaron, a partir de geles un y bidimensionales, 42 especies proteicas en extractos de semilla y 94 en

extractos de polen. Mediante la aproximación *shotgun* se identificaron un total de 187 y 960 especies proteicas en semillas y polen, respectivamente. En las semillas, las proteínas de reserva fueron las más abundantes, y también se identificaron algunos alérgenos y proteasas. En el polen las proteínas relacionadas con el metabolismo fueron las más predominantes.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen una primera aproximación al estudio molecular de la diversidad genética del pino criollo y su integración con técnicas morfoanatómicas y de predicción de hábitat. Son estudios en los que hay que profundizar dada su importancia de cara al desarrollo de estrategias de manejo y conservación de la especie, en especial en condiciones del predicho cambio climático.

## Summary

This Doctoral Thesis has been focused on the study of the creole pine tree (*Pinus occidentalis* Swartz), the most important and representative species in the Dominican Republic forestry ecosystem, both from an environmental and an economic perspective. It is an orphan species in respect of the study of its biology and population variability, especially at a molecular level.

It has been aimed, by means of predictive models, to analyze its distribution habitat and its future situation, taking into account climate change conditions. The population variability study has been carried out by morphoanatomical and molecular techniques, including ADN microsatellite marker techniques. For the first time, proteomics has been employed in the characterization of seeds and pollen.

Prospections, measurements and sample taking (seeds and pollen) were performed in the following areas:(Sierra de Bahoruco, Sierra de Neiba, José del Carmen Ramírez, Armando Bermúdez y Valle Nuevo).

The manuscript has been structured as: an introduction and general discussion, and 4 additional chapters, in which the results relative to the general objectives previously indicated have been presented and discussed.

1. Determination of the impact of climate change on the potential distribution of *Pinus occidentalis* Swartz., in the Dominican Republic.
2. Determination of the structure of the forest and morphoanatomical variability of populations of *Pinus occidentalis* Swartz in the Dominican Republic.
3. Study of the genetic diversity in natural populations of *Pinus occidentalis* Swartz., in the Dominican Republic.
4. Optimization of protocols for the analysis of the proetome of pollen and seeds of *Pinus occidentalis* Swartz.

For the prediction models the 19 bioclimatic variables compiled in the wordclim database were used. By means of fit testing, the five variables presenting the highest correlation were selected. The species distribution model R biomod2 was employed to analyze the response curves of the dependent variables. For variable Bio 8 i.e. the mean temperature of the rainiest quarterly period, the probability of a species presence diminished as the temperature rose to over 21.6%. For Bio 7, the annual temperature range, that presence probability increased at temperatures of over 16°C. For Bio 13, the precipitation of the rainiest month, the probability was greater at values of over 307 mm. For variable Bio 18, the rainfall in the hottest quarterly period, the probability was greater at below 213 mm. Finally, for Bio 19, the rainfall in the coldest trimester, there were no great variations in the probability values.

The current distribution potential maps of the species indicated that the most favorable areas for the species were some of those studied, such as the mountainous ones in the centre, and areas in the south of the Dominican Republic. Other potential zones, like those of the border with Haiti, could not be included in the study. The future evolution of the potential distribution area in a Climate Change scenario pointed to a generalized recession in the habitat of the creole pine in the whole area of its current distribution, this being more marked for the south of the Island, where it was found that the species occurrence probability will decline by over 50% by 2050; and by nearly 65% by 2070 in the case of the Sierra de Neiba and José Armando Bermúdez populations. It was observed that there were some probable areas of species presence under the severest conditions (RCP 85 for 2070) whose potential will be reduced to non significant minimum values. However, the species does find climatic shelter in the highest areas of the island, where, even under the most extreme conditions, the occurrence probability will go on being close to 100%.

In the study of the structure and morphologic characterization of forests of *Pinus occidentalis* in natural populations (National Park Network of the Dominican Republic), it was observed that the density of the adult trees of *Pinus*

*occidentalis* ( $Dn \geq 15$  cm) varied between 1100 trees ha<sup>-1</sup> (Sierra de Nieba) y 2531 trees ha<sup>-1</sup> (José del Carmen Ramírez y Armando Bermúdez), with significant differences between the different places ( $F=24.27$ ;  $P<0.001$ ). The basal area values were comprised in the range 151-385 m<sup>2</sup> ha<sup>-1</sup> ( $F=20.13$ ;  $P<0.001$ ). The presence of young trees in all the populations prospected was scant, which is indicative of a poor natural regeneration of the species.

All the morphometric variables evaluated exhibited significant intrapopulation differences. The morphologic variation patterns found in the principal component and cluster analyses converged in the existence of a continuous variation in the characteristics evaluated. This did not permit a clear phenotypic differentiation at an INTER/INTRA? population level.

The genetic variability of the populations was analyzed by chloroplast microsatellite markers. Thirteen markers were deployed, only eight of which were polymorphic, and there were 25 haplotypes, 16 of which were specific to the population. The Sierra de Bahoruco population was the most differentiated one and that which presented the highest genetic distance values. The molecular analysis of variance (AMOVA) determined that the localities studied were differentiated genetically by 12% and that the intrapopulation differentiation was of 88%. The total genetic diversity between the areas (intrapopulation genetic diversity and differentiation in the diversity) resulted in Sierra de Bahoruco giving a lesser genetic diversity, so that it requires a higher degree of attention and of actions to prevent the loss of trees in this location. According to the Nei genetic distance values, two genetic groups were identified; one corresponded to the Sierra de Bahoruco, and the other to Sierra de Nieba and Cordillera Central.

Proteomic analysis protocols of seeds and pollen were optimized through complementary gel and gel-free strategies. By MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and from one- and two-dimensional gels, 42 protein species in seed extracts and 94 in pollen extracts were identified. With the shotgun approach, a total of 187 and 960 protein species in seeds and pollen, respectively, were determined. In the seeds, storage proteins were those most abundant, and some

allergens and proteases were also identified. In the pollen, proteins related to metabolism were those which predominated.

The results obtained in this work contribute to a first approach to a molecular study of the genetic diversity of the creole pine tree and its integration with morphoanatomical and habitat prediction techniques. It would be necessary to go deeper into these studies given their importance in the development of management and species conservation strategies, especially under the aforementioned climate change conditions.









# **Capítulo 1. Introducción General**

## ***1.1. Los bosques***

Los bosques proporcionan bienes y servicios tales como alimentos, agua, o diferentes servicios ambientales, así como contribuyen a ciclos básicos como los ciclos de nutrientes o el ciclo de C. Además juegan un papel fundamental en la conservación de la biodiversidad (Morales et al., 2015). En el 2005, el total de la **superficie forestal** cubría el 30% de las tierras emergidas, es decir casi 40 millones de km<sup>2</sup>, que contiene el 80 % de la biomasa terrestre, y proporciona hábitat a más de la mitad de las especies de plantas y animales terrestres que se conocen en el mundo. (Shvidenko et al, 2005; Aerts y Honnay, 2011; Keenan et al., 2015). Sin embargo, y de conformidad con la Evaluación de los recursos forestales mundiales de 2015 (FAO, 2015), la superficie forestal mundial se redujo 129 millones de hectáreas (un 3,1 %) en el período 1990-2015 hasta quedar por debajo de los 4.000 millones de hectáreas.

Se estima que aproximadamente 100.000 especies de árboles, representan el 25% de las plantas del planeta, la mayoría de los árboles crecen en las regiones tropicales del mundo y muchas de estas áreas aún no han sido lo suficientemente estudiadas (Abril et al., 2011). Los bosques, en particular los tropicales ocupan un lugar destacado en los esfuerzos encaminados a la conservación de la diversidad biológica. Se ha estimado que la mitad de la biodiversidad del mundo está contenida en los bosques y que más de 4/5 partes de muchos grupos de animales y plantas se encuentran en este tipo de formaciones (Toledo, 2004; García, 2006).

El balance entre lo que se planta y/o regenera de forma natural y las pérdidas es aún muy desfavorable (FAO 2010); planteándose como una necesidad imperiosa la ejecución de planes nacionales, regionales y globales de conservación y reforestación para, de esta forma, incrementar las plantaciones forestales a escala global. Estas acciones no solo conducirían a la recuperación de la superficie ocupada por árboles, sino que sus efectos indirectos tendrán una

amplia repercusión social en la conservación de los recursos naturales (Licea Moreno, 2016).

Se plantea que existen 4000 millones de hectáreas de árboles en el planeta, de los cuales se extrae anualmente más de 3500 millones de m<sup>3</sup> de madera, llegando a alcanzar en el 2013 un valor en el mercado de 250 000 millones de dólares, casi el doble de lo logrado en 1998 (Groutel y Alix 2015).

Uno de los grandes problemas ambientales de la actualidad es la gran demanda de recursos forestales y la creciente necesidad de tierras cultivables para satisfacer las necesidades de la agricultura en el mundo, lo cual lleva a una mayor presión sobre los recursos naturales del monte (Celestino et al., 2005; Boerjan, 2005; Whetten y Kellison, 2010). Esta demanda está causando un serio problema de deforestación, especialmente en bosques tropicales, donde se perdieron 17 millones de ha año<sup>-1</sup> durante el siglo pasado (Sasaki y Putz 2009; Blasco, 2013).

Una de las limitaciones a la hora de afrontar el problema de la degradación y la conservación de los recursos forestales es la falta de conocimiento científico sobre las bases que determinan a nivel funcional, genómico y molecular la diversidad intraespecífica y poblacional de especies forestales. La variabilidad molecular existente en poblaciones forestales naturales se relaciona con su amplia valencia ecológica y su capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas, y el efecto de éstas sobre la estructura genética de las poblaciones, el flujo o la diversidad genética, o la selección de determinados individuos frente a otros en programas de gestión y restauración (Alía et al., 2003; González-Rodríguez et al., 2011, Jorrín y Navarro-Cerrillo, 2015).

Aunque, es bien conocido que el estudio y la investigación pueden tener un impacto decisivo en el manejo forestal sostenible y en la producción, y a pesar de su relevancia económica y ecológica; los estudios moleculares de especies arbóreas son muy escasos si se compara con las especies de plantas modelo, y en otros organismos vivos tales como *Saccharomyces*, ratones o seres humanos (Abril et al., 2011). En una búsqueda en "ISI Web of Knowledge" referente al período de 1990 a 2015 (febrero), utilizando como cadena de búsqueda "árboles

forestales” generó 113.300 accesos (55.400 de *Pinus*, 25.300 de *Quercus*, y 18.700 de *Populus*), mientras que los valores de *Arabidopsis thaliana* y el arroz son 119.200 y más de 200.000, respectivamente (Romero-Rodriguez, 2015).

## ***1.2. Los bosques de coníferas tropicales***

Los bosques tropicales se encuentran entre los ecosistemas más frágiles y altamente amenazados. Estos bosques son muy importantes para la protección de cuencas hidrográficas, control de la erosión de los suelos, y conservación de la biodiversidad florística y faunística (Bruijnzeel 2001), siendo los bosques tropicales uno de los más importantes en términos de riqueza y concentración de especies endémicas (Brooks et al., 2006). Los bosques naturales tropicales brindan una amplia variedad de productos, servicios y oportunidades sociales y económicas, por lo que, requieren de planes de manejo y conservación adecuados y acordes a las problemáticas de cada país. El valor real y uso de los bosques ha sido apreciado desde la antigüedad. (Sabogal, et al., 2013).

La conservación y la utilización racional de los recursos forestales constituye un importante desafío de carácter global, por cuanto conseguir un adecuado equilibrio entre la utilización y conservación de estos recursos representa un aspecto crucial para el desarrollo (Gutiérrez, 2003; García, 2007)

Dentro de la región del Caribe, la mayor reservas de bosques se encuentran en las Antillas mayores, en particular en las Islas de Cuba y la Española (Haití y República Dominicana), siendo un rasgo distintivo la extensión e importancia de los bosques de coníferas (Sherman et al.,2005).

Las coníferas son un grupo de plantas superiores que engloba a los árboles y arbustos más antiguos del planeta. Aparecieron sobre la tierra hace unos 300 millones de años en el periodo Carbonífero y hoy en día existen aproximadamente 615 especies diferentes de coníferas (Farjon, 2010). Las coníferas se clasifican dentro de la clase Gymnospermae y del orden Coniferales. Su principal característica es que portan estructuras reproductivas llamadas conos y que, en su mayoría, son especies monoicas, es decir, presentan estructuras reproductivas de

ambos sexos en el mismo árbol. Los conos femeninos están formados por escamas dispuestas alrededor de un eje y contienen sobre las escamas exteriores una o varias escamas portadoras de óvulos que tras la fecundación se transforman en semillas. El polen se encuentra en los conos masculinos que nacen al final de las ramas jóvenes del año, generalmente en invierno y maduran durante los meses de primavera. Cada cono masculino contiene grandes cantidades de polen y la polinización es anemógama. Por regla general son plantas de hojas perennes con forma de aguja o escama (Farjon, 2010).

Tienen una gran importancia desde el punto de vista ecológico ya que son la especie principal de diversos ecosistemas conformando la estructura necesaria para albergar otras especies vegetales y animales, como aves, pequeños y medianos mamíferos y un gran número de insectos y hongos (Farjon, 2010). Las coníferas se dividen en seis familias, siendo la más extensa, la de las pináceas, con nueve géneros, de los cuales el género *Pinus* es el que más especies comprende (Farjon, 2010).

*Pinus* subsección Australes (*Pinaceae*) es un grupo mono filetico de pinos (Gernandt et al., 2005, 2008) que se encuentran al norte Estados Unidos, México, América Central y el oeste de las Islas del Caribe. Específicamente hay cuatro taxones de Australes que se distribuyen en zonas de montañas en la cuenca del Caribe: *P. caribaea* (Morelet), *P. cubensis* (Griseb), *P. occidentalis* (Swartz) y *P. maestrensis* (Farjon y Styles).

El oeste de la cuenca del Caribe está dominado por tres variedades de *P. caribaea*: *P. caribaea* var *hondurensis* está presente en América Central, *P. caribaea* var *caribaea* se encuentra en el occidente de Cuba y en la Isla de la Juventud, y *P. caribaea* var. *bahamensis* que habita en las Bahamas y en las Islas Turcos. Entre las tres variedades solo existen ligeras diferencias morfológicas que pudiera ser inducido por las condiciones edafoclimáticas pues cada una de ellas posee un ámbito de distribución y características fenológicas muy propias, ejemplo de ello es la diferencia entre el número y longitud de las acículas (García et al., 2009).

*P. cubensis* y *P. maestrensis*, se encuentran en las montañas orientales de Cuba. Algunos autores (Farjon y Estilos, 1997) han tratado *P. maestrensis* como sinónimo de *P. cubensis*, mientras que otros (López-Almirall, 1982) han considerado que son especies separadas. El análisis filogenético de DNA plastidial determinó que *P. cubensis* y *P. maestrensis* son del mismo grupo. Pero que existen diferencias entre ellas (Geadá-López et al., 2002. Según Gernandt et al., (2005). Por último, *P. occidentalis*, es una especie endémica de la montañas de La Española.

### **1.3. *Pinus occidentalis* Swartz**

En la República Dominicana, el 25,5% de la superficie está cubierta por bosques, y el 6,1% corresponde a bosques de coníferas. Sin embargo, la pérdida de superficie de bosques en el país es de más de 20.000 ha año<sup>-1</sup> y puede aumentar a 60.000 ha año<sup>-1</sup> si se consideran las zonas afectadas por el fuego y por la extracción de madera. Los ecosistemas forestales de República Dominicana están muy fragmentados, lo que afecta a la flora y la fauna endémica, por lo que urge realizar investigaciones para profundizar en el conocimiento de la biodiversidad genética de estas especies, y establecer normas para su conservación y manejo (Mejía et al., 2000; Rochelau et al., 2001; Mertens et al., 2002; Peña and Miren, 2005).

Entre las especies del género *Pinus*, en República Dominicana cabe destacar la presencia de bosques, constituidos por rodales puros y mixtos de *P. occidentalis*, que en la actualidad cubren un área de 1300 km<sup>2</sup> (Bueno et al., 2016). *P. occidentalis* es un árbol endémico de la isla La Española, donde es la especie predominante en los bosques de pino criollo de Haití y la República Dominicana.

*Pinus occidentalis* Swartz., pertenece a la Familia *Pinacea*, Orden *Pinales*, Clase *Pinopsida*, División *Pinophyta*, englobada en el Reino *Plantae*. Dentro de su género, hay que incluirlo en el grupo de los *Diploxylon* caracterizado por la presencia de dos haces vasculares por acícula.



mismas. Los conos son ovoides a cilíndricos de 5 a 8 cm de largo, de color marrón brillante, con un pequeño cosquilleo en cada escala apuntando hacia adelante; que maduran en unos 18 meses y se abren para liberar las semillas, que son de 4 a 5 mm de largo con unos 15 mm de ala (Miniño et al., 2014).

La madera es de color amarillo a dorado con bandas marrón oscuro, es moderadamente dura y pesada, su gravedad específica varía de 0.58 a 0.76 g cm<sup>-3</sup>. Tiene una textura mediana, es fácil de trabajar, preservar y secar.

Las relaciones simbióticas con micorrizas permiten al pino crecer en suelos poco profundos e infértiles.



Figura 2. Árbol de pino criollo (*Pinus occidentalis*) en la República Dominicana

En cuanto a su comportamiento ecológico, *P. occidentalis* muestra un rango ecológico extremadamente amplio. Su distribución natural, es decir sin impacto

humano, es difícil de reconstruir. Los pinares de la alta montaña, por encima de los 2500 msnm, son una comunidad clímax climático, causado por las temperaturas bajas. El pino a baja altitud es un elemento de la sucesión, que siempre estuvo presente en esta zona habitaba en áreas perturbadas por desprendimientos de tierras, huracanes e incendios (Bueno-López y Bevilacqua, 2009).

A pesar de tener un rango ecológico amplio por la gran variabilidad que poseen los pinos, el país ha perdido la mayor parte de su cubierta forestal debido a una gestión inadecuada en las áreas forestales, perdiendo en el proceso, la diversidad biológica, así como el potencial forestal (Bueno-López y Bevilacqua, 2009).

#### ***1.4. Variabilidad poblacional y genética de las coníferas del Caribe***

Diversas poblaciones de coníferas que crecen a lo largo de gradientes altitudinales se adaptan a las diversas condiciones ambientales, por lo que se diferencian genéticamente. Por ejemplo, las poblaciones de coníferas ubicadas a menor altitud sobre el nivel del mar, tienen un mayor potencial de crecimiento por estar genéticamente condicionadas a aprovechar al máximo las condiciones favorables de temperatura. En contraste, los individuos de poblaciones de mayor altitud están condicionados a tener un menor crecimiento, con lo que logran evadir los daños por heladas tardías en la primavera y heladas tempranas en el otoño (Viveros et al., 2013).

Se han realizado numerosos trabajos de variabilidad de poblaciones de *Pinus* del grupo Australes. Al evaluar poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite* en México como en Centroamérica se encontró una variación altamente significativa en la altura y el diámetro de los árboles, tanto a nivel de grupos como de familias dentro de grupos, en todas las edades evaluadas. Esto indica que existe un amplio nivel de variación entre árboles dentro de las familias, lo que permitiría hacer selección dentro ellas (Ramírez et al., 2002).

A nivel de especie existe una amplia diversidad genética en *Pinus greggii* Engelm., así como un alto grado de diferenciación genética entre las poblaciones, por lo que cada población representa sólo una pequeña muestra de la diversidad genética total. Ante esta situación y dado que la mayoría de las poblaciones de esta especie enfrentan problemas de fragmentación y aislamiento, es necesario implementar una estrategia que permita conservar la diversidad genética de la especie. Esta estrategia debe considerar incluir el mayor número posible de poblaciones ya que la diversidad genética se encuentra distribuida en todas ellas y no es posible conservar sólo un grupo de ellas sin correr el riesgo de perder parte de esa riqueza genética (Ramírez et al., 2002).

En Oaxaca, México se evaluó la variabilidad del *Pinus patula*, Schiede ex Schltdl. et Cham, a lo largo de un gradiente altitudinal y todas las variables mostraron diferencias significativas tanto entre poblaciones como entre árboles dentro de poblaciones. La contribución de las poblaciones a la varianza total varió del 4,4 al 32,5 %, mientras que la de los árboles dentro de poblaciones fue del 16,2 al 78,5 %. Las variables morfológicas que presentaron mayor variación atribuible a las poblaciones fueron la longitud de la vaina y la longitud del cono (32,5 % y 26,2 % respectivamente), mientras que la de menor variación atribuible a las poblaciones fue la longitud de la acícula más larga (Viveros et al., 2013).

En el caso de *Pinus hartwegii* Lindl., se realizaron estudios en dos poblaciones (Pico de Orizaba y Cofre de Perote en México) y los resultados proporcionaron evidencia congruente de la existencia de una heterogeneidad morfológica intraespecífica en las dos poblaciones en estudio. Como se sabe, la variación morfológica de una especie vegetal está íntimamente ligada a las condiciones medioambientales que prevalecen en el ciclo de vida de la misma. La estrecha relación planta-medio ambiente marca la importancia que las plantas posean una suficiente flexibilidad de desarrollo o resistencia a disturbios para existir en las condiciones donde se ubican. En este estudio se detectaron algunos ecotipos en la población del Pico de Orizaba con los mayores valores de características, como el largo del cono, que contrastaron con ciertos ecotipos

presentes en la población del Cofre de Perote que mostraron los menores valores para dicha característica (Iglesias et al, 2012) .

En *Pinus caribaea* var. *caribaea*, endémico del occidente de Cuba se realizó un estudio de caso en el ambiente de Viñales, Pinar del Río, a partir de nueve procedencias, encontrando diferencias significativas entre procedencias para las variables altura, diámetro y ramificación. El coeficiente de variación resultó alto (entre 29,51 y 44,80 %). Los parámetros altura y diámetro fueron los de mayor variabilidad, y facilitaron la selección sobre la base de estas características (García et al., 2006).

En *Pinus caribaea* var. *bahamensis* se determinó que a pesar del alto nivel de diversidad genética observada, existen riesgos de la rápida descomposición debido a la alta mortalidad de los árboles maduros y la baja regeneración (Sánchez et al., 2014).

Los estudios de genética de *Pinus occidentalis* son, por el contrario, más limitados, resalta el Programa de Mejora Genética, implementado en el año 1998 por el Plan Sierra, institución que ha dado énfasis a la conservación del bosque existente y a la reforestación. Para estos fines, obtuvo la cooperación del Instituto de Investigaciones Forestales de Cuba (Pérez et al., 2008), que inició un programa que estableció huertos semilleros clonales y de plántulas de pino criollo capaces de producir semilla mejorada para ser utilizadas en los programas de reforestación de esta especie. En el 2008 presentaron a manera de reporte preliminar todo lo acontecido durante este programa, con el título, Avances y Perspectiva en el Mejoramiento Genético de *Pinus occidentalis* Swartz (Pino Criollo). Documento en el que se describe las ganancias genéticas obtenidas desde 1998 hasta el 2008, en el que se refleja un mayor incremento en diámetro, altura y volumen de los árboles. (Pérez et al., 2008).

En los bosques de *P. occidentalis* de la Cordillera Central se pueden observar diferencias en calidad (forma de fuste, ramificación), y morfología (altura, cantidad de acículas por fascículos, tamaño del cono (Dobler, 1999).

Se ha sugerido al respecto que la alta variabilidad intrapoblacional en los árboles forestales puede constituir una respuesta adaptativa a la heterogeneidad espacial y temporal encontrada en las poblaciones. Como se sabe la variación morfológica de una especie vegetal se encuentra íntimamente ligada a las condiciones medioambientales que prevalecen en el ciclo de vida de la misma, de modo que la estrecha relación planta-medio ambiente marca la importante propiedad para la especie vegetal de poseer la suficiente flexibilidad de desarrollo o normas de reacción amplias para existir en las condiciones donde se ubican (Stebbins, 1950; Pérez, 1984 citados por Iglesias et al., 2006).

Miniño et al., (2014) realizaron un estudio sobre la anatomía de la semilla de *P. occidentalis*, donde se hace una primera descripción del embrión, el episperma, los tejidos de reserva, la germinación y sobre las estructuras morfológicas presentes en la semilla (alas, arilos, pelos) relacionados con la dispersión de la especie.

### ***1.5. Investigaciones en P.occidentalis.***

Específicamente los trabajos de investigación realizados con el *P. occidentalis* en República Dominicana, han estado orientados hacia su manejo como especie forestal, abarcando temas tales como el cálculo de volumen del árbol, predicciones y modelos de crecimiento, enfoques no lineales en el volumen de fuste, y estudio de crecimiento de la especie en diversas localidades, entre otros. Además, existen algunas publicaciones recalando la importancia social y el potencial económico de la especie, al ser el *P. occidentalis* una especie maderable (Amarante, 2010; Bueno-López y Bevilacqua, 2010).

Guerrero *et al.*, (2001), estimaron el volumen total con corteza de los árboles en pie de *Pinus occidentalis*, en el área de influencia del Plan Sierra, en la República Dominicana, donde utilizaron una curva ajustada.

Bueno-López y Bevilacqua (2012) emplearon modelos mixtos no lineales para la valoración de los productos maderables de la especie.

Bueno-López y Bevilacqua (2011) plantean que la distribución del diámetro de una masa forestal es un componente esencial para estudiar los bosques a escala de rodal, entender su dinámica bajo diferentes condiciones ecológicas, y planificar las prescripciones silvícolas apropiadas.

Bueno-López et al., (2015), estimaron que la calidad de sitios para la producción forestal normalmente se logra aprovechando la presencia de árboles que exhiben diferentes patrones de crecimiento en altura y desarrollando ecuaciones que relacionan su altura y edad. Sin embargo, hay lugares desprovistos de árboles donde la inversión en bosques productivos es factible; más aún si se puede estimar *a priori* la calidad potencial de regenerar determinadas especies forestales. Se desarrollaron modelos matemáticos para las principales regiones productivas de República Dominicana, estableciendo también la relación entre el índice de sitio y variables edáficas y fisiográficas, obteniéndose relaciones significativas entre los índices de sitio y la altitud y la exposición. Una correlación significativa fue también encontrada entre índice de sitio y el contenido de materia orgánica, sodio y potasio.

### ***1.6. Objetivos y estructura de la tesis.***

El objetivo general de esta tesis es caracterizar la variabilidad morfológica, y molecular de cinco poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* Swartz, en República Dominicana, mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.

Este objetivo general se ha dividido en los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el impacto del cambio climático en la distribución potencial de *Pinus occidentalis* Swartz., en República Dominicana.
2. Determinar la estructura del arbolado y variabilidad morfoanatómica de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en República Dominicana.

3. Estudiar la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* Swartz., de la República Dominicana.
4. Optimizar protocolos para el análisis del proteoma de polen y semillas de *Pinus occidentalis* Swartz.

Dichos objetivos se han estructurado en los siguientes capítulos de la Tesis:

En el **Capítulo I** se presenta la Introducción general, donde se aborda la problemática de los bosques a nivel mundial, de las coníferas tropicales, del Caribe, se describe el *Pinus occidentalis* y se evalúa la variabilidad de las coníferas del Caribe, así como un conjunto de investigaciones realizadas en *Pinus occidentalis*.

**Capítulo II** donde se analiza el impacto del cambio climático en la distribución potencial de *Pinus occidentalis* Swartz., en la República Dominicana, mediante el modelo de distribución de especies biomod2.

**Capítulo III** se determina la estructura del arbolado y variabilidad morfoanatómica de poblaciones naturales de *Pinus occidentalis*, mediante el inventario en las diversas zonas, la evaluación de caracteres morfométricos y una aproximación dendrocronológica en las distintas áreas de distribución

**Capítulo IV** se analiza mediante marcadores moleculares (microsatélites), la estructura y la diversidad genética en poblaciones naturales de *P. occidentalis* Swartz.

**Capítulo V** presenta un análisis de los proteomas de las semillas y polen de *Pinus occidentalis*, en el que se han utilizado dos aproximaciones gel-based y gel-free.

**Capítulo VI** realiza una síntesis y discusión general de los resultados obtenidos, analizando e integrando cada uno de los capítulos y en el **Capítulo VII** se exponen las principales conclusiones del trabajo.

## ***1.7. Bibliografía***

Abril, N., Gion, J.M., Kerner, R., Müller-Starck, G., Navarro-Cerrillo, R M., Plomion, C., Jorrin-Novo, J.V. (2011). Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Photochemistry*, 72(10), 1219-1242.

Aerts, R., Honnay, O. (2011). Forest restoration, biodiversity and ecosystem functioning. *BMC Ecology*, 11(1), 29.

Alía, R.; Agúndez, D.; Alba, N.; González Martínez, S.C.; Soto, A. (2003). Variabilidad genética y gestión forestal. *Ecosistemas*, XII (3):1-7.

Amarante J. (2010). Incremento de *Pinus occidentalis* Swartz, en el municipio de Restauración. Tesis para optar por el grado de Ingeniero Forestal. Escuela Nacional Forestal, ESNAFOR. R.D.

Blasco, M.C. (2013). Aplicaciones de la embriogénesis somática para la propagación y mejora de *Quercus ilex* L. y *Pinus* spp. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Valencia.

Boerjan W. (2005). Biotechnology and the domestication of forest trees. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2):159–166

Boshier, D.H, Young, A.G. (2000). Forest conservation genetics: limitations and future directions. En: Young, A., Boshier, D., Boyle, T. (eds.), *Forest conservation genetics: Principles and practice*, pp. 289-297. CABI Publishing, Reino Unido.

Bravo-Oviedo, A., H. Pretzsch, C. Ammer, E. Andenmatten, A. Barbati, S. Barreiro, P. Brang, F. Bravo, L. Coll, P. Corona, J. Den Ouden, M. J. Ducey, D. I. Forrester, C. O. Reilly, M. Pach, Q. Ponette, M. Rio, I. Short, J. P. Skovsgaard, M. Soliño, P. Spathelf, and H. Sterba. (2014). European Mixed Forests: definition and research perspectives. *Forest Systems*, 23, 518-533.

Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., da Fonseca, G. A. B. (2006). Global biodiversity conservation priorities. *Science*, 313, 58–61

Bruijnzeel, L. A. (2001). Hydrology of tropical montane cloud forests: a reassessment. *Land Use and Water Resources Research* 1(1):1-18.

Bueno, S., & Bevilacqua, E. (2010). Modeling Stem Diameter Increment in Individual *Pinus occidentalis* Sw. trees in La Sierra, Dominican Republic. *Forest Systems*, 19(2), 170-183.

- Bueno-Lopez, Bevilacqua E. (2009). *Silvicultural Tools for Managing Pinus occidentalis*, SW. Statistical modelling. Statistical Modelling. ISBN 978-3-659-12532-4. Lambert Academic Publishing. 86 p.
- Bueno-Lopez, Bevilacqua E. (2011). Desarrollando un sistema de predicción de distribuciones Diamétricas para *Pinus occidentalis*, Sw. En la Sierra, república Dominicana. Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 17 (1): 115-132.
- Bueno-Lopez, Bevilacqua E. (2012). Nonlinear mixed approaches to estimating merchantable bole volume for different utilization standards for *Pinus occidentalis* in “La Sierra”, Dominican Republic. *iForest – Biogeosciences and Forestry*. 5: 247-254
- Bueno-Lopez, Bevilacqua E. (2013). Diameter growth prediction for individual *Pinus occidentalis* Sw. trees. *iForest – Biogeosciences and Forestry*. 6, 154-167.
- Bueno-López, S.W., J.G Torres H. y M. García. (2015). Factores edáficos- fisiográficos y calidad de sitio del *Pinus occidentalis* Sw. *Madera y Bosques* 21(3):83-93.
- Celestino, C.; Hernández, I.; Carneros, E.; López Vela, D.; Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología Forestal. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. 14 (3): 345-357.
- Dobler, G. (1999). Manejo y Tablas de Rendimiento de *Pinus occidentalis*. Servicio Alemán de Cooperación Técnica (DED). Plan Sierra, San José de las Matas, Republica Dominicana. 154 p.
- FAO (2015). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015. Roma (disponible en: [www.fao.org/forest-resources-assessment/es](http://www.fao.org/forest-resources-assessment/es)).
- Farjon, A. (2010). *A handbook of the world's conifers*. The Netherlands. Brill Academic Publishers, Brill, Leiden.
- García, Q.Y.; Alvarez.B.A; Pérez, S.M. (2006). Variabilidad genética en *Pinus caribaea* var. *caribaea* a nivel de procedencias. *Revista Forestal Baracoa* 25(1):81-86.
- García, Quintana, Y. (2007). Estrategia de conservación intraespecífica para *Pinus caribaea* Morelet var, *caribea* Barret y Golfari. Tesis Doctoral en Ciencias Ecológicas. Departamento de Ecología, Universidad de Alicante, España.
- García-Quintana, Y., Flores, J., Geada-López, G., Escarré-Estévez, A., Castillo-Martínez, I., Medina Malagón, M. (2009). Relación entre atributos ecofisiológicos de la especie

vulnerable *Pinus caribaea* Morelet var. *Caribaea* y características ambientales de ocho localidades en Pinar del Río, Cuba. *Interciencia*, 34(5), 344-349.

González-Rodríguez, V., Villar, R., Navarro-Cerrillo, R.M. (2011). Maternal influences on seed mass effect and initial seedling growth in four *Quercus* species. *Acta Oecologica*, 1, 1-9.

Groutel E, Alix Y (2015) Le Temps du Bois. Note Estrategique and Prospective. Éditions Management & Societe, Vol 1, 80.

Guerrero, J. M., Gilberto Torres, J., Bueno López, S. (2001). Ecuación para el cálculo del volumen del árbol para *Pinus occidentalis* Sw., en el plan sierra, República Dominicana Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 7 (1):49-53.

Gutiérrez, B. (2003). Enfoque cooperativo para el mejoramiento genético y la conservación de los recursos forestales en Chile, Colombia y Costa Rica. *Investigación Agraria. Sistemas de Recursos Forestales*. 12(3), 111-122.

Hernández, A.J.C., Gutiérrez, G.G., Almeida, L.L. y Ordóñez, D.J.A.B. (2005). Análisis dendroclimático de *Pinus hartwegii* en el volcán nevado de Toluca. México. I Simposio Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México. Memorias. Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada. LABIOTECA. Xalapa, Veracruz, México. Noviembre 17 y 18, 102-103.

Iglesias, LG, Solís-Ramos, LY., Viveros-Viveros, H. (2012). Variación morfométrica en dos poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* Lindl., del estado de Veracruz. *Phyton*, 81(2), 239-247.

Jorrín Novo, J., Navarro Cerrillo, R. (2015). Variabilidad y respuesta a distintos estreses en poblaciones de encina (*Quercus ilex* L.) en Andalucía mediante una aproximación proteómica. *Ecosistemas*, 23(2), 99-107.

Keenan, R., Reams, G., Freitas, J., Lindquist, E., Achard, F., Grainger, A. (2015). Dynamics of global forest area: results from the 2015 Global Forest Resources Assessment. *Forest Ecology and Management*, 352, 9-20.

Licea Moreno, R.J. (2016). Biotecnología Forestal Aplicada a la Producción de Madera de Nogal. Tesis de Doctorado. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

- Magnussen, S. Y., C.W. (1990). Predictions of genetic gain from various selection methods in open pollinated *Pinus banksiana* progeny trials. . *Silvae Genetica* 39(3-4), 140-153.
- Mejía M., R. Gracia, F. Jiménez. (2000). Sub-Región Fitogeográfica Barbacoa-Casabito: riqueza florística y su importancia en la conservación de la flora de la Española. *Moscoso*, 11, 57-106.
- Mertens, B., R. Poccar-Chapuis, M. G. Piketty, A. E. Lacques, A. Venturieri. (2002). Crossing spatial analyses and livestock economics to understand deforestation processes in the Brazilian Amazon: the case of Sao Felix do Xingu in South. *Agriculture Economic*, 27, 269-294.
- Miniño Mejía, V Paulino, L; Paíno Perdomo, O; León, Y; A; Rodríguez de Francisco, L E; (2014). Caracterización de la morfología de la semilla de *Pinus occidentalis* Swartz. *Ciencia y Sociedad*, 39(4) 777-801.
- Morales-Hidalgo D., Oswalt S.N., Somanathan E. (2015). Status and trends in global primary forest, protected areas, and areas designated for conservation of biodiversity from the Global Forest Resources Assessment 2015. *Forest Ecology and Management*, 352, 68-77.
- Morgenstern, M. (2011). *Geographic variation in forest trees: genetic basis and application of knowledge in silviculture*. UBC Press, Vancouver, Canadá.
- Navrud, S. (2009). Valuing environmental goods and services derived from the forests. *Journal of Forest Economics*, 15(1), 1-14.
- Paredes, T. (2006). *Ensayo de procedencias en pináceas de la provincia Pinar del Rio*, Universidad de Pinar del Rio, 123 p.
- Peña Cornielle, A., Olalde M.O. (2005). Plant Diversity in Endemic Pine Forests of *Pinus occidentalis* Sw. in the Nizao Basin, Dominican Republic. *Caribbean Journal of Scie*, 41(4), 849-856.
- Pérez. S., Torres H, Jimenez G. (2008). *Avances y Perspectiva en el Mejoramiento Genético de Pinus occidentalis Swartz (Pino Criollo)*. Plan Sierra, San José de las Matas, Republica Dominicana. 59 p.
- Farfán Vázquez, E. D. G., Jasso Mata, J., López Upton, J., Ramírez Herrera, C., Vargas Hernández, J. J. (2002). Parámetros genéticos y eficiencia de la selección temprana en *Pinus ayacahuite* Ehren. var. *ayacahuite*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(3), 239-24.

- Ramírez, P., Parraguirre, C., Vargas, J., Azpíroz, H. S., Jasso, J. (2002). Estructura de la diversidad Genética en poblaciones naturales de pinus greggü Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(3), 279-287.
- Rocheleau, D., L. Ross, J. Malaret, L. Hernández, and T. Kominiak, T. (2001). Complex communities and emergent ecologies in the regional agroforest of Zambrana–Chacuey, Dominican Republic. *Ecu-mene*, 8, 465-492.
- Romero-Rodríguez M. C. (2015). Integrated “Omics” Approaches to Study Non-orthodox Seed Germination: The Case of Holm Oak (*Quercus ilex* Subsp. *Ballota* [Desf.] Samp.). Doctor of Philosophy, University of Cordoba.
- Sabogal, C., Guariguata, MR., Broadhead, J., Lescuyer, G., Savilaakso, S., Essoungou, N. (2013). Manejo forestal de uso múltiple en el trópico húmedo; oportunidades y desafíos para el manejo forestal sostenible. *FAO Forestry Paper No. 173*. Roma, Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Bogor, Indonesia, Centro Internacional de Investigación Forestal.
- Sanchez, M., Ingrouille, M. J., Cowan, R. S., Hamilton, M. A. and Fay, M. F. (2014), Spatial structure and genetic diversity of natural populations of the Caribbean Pine, *Pinus caribaea* var. *bahamensis* (Pinaceae), in the Bahaman archipelago. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 174, 359–383.
- Sasaki N., Putz F.E. (2009). Critical need for new definitions of “forest” and “forest degradation” in global climate change agreements. *Putz Cons Lett*, 2, 223-232.
- Sherman, R., Martin, P. Fahey, T. (2005). Vegetation-Environment Relationships in Forest Ecosystems of the Cordillera Central, Dominican Republic. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 132(2), 293-310.
- Shvidenko, A., Barber, C.V., Persson, R., Gonzalez, P., Hassan, R. (2005). Forest and woodland systems. In: *Millennium Ecosystem Assessment (Ed.), Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends*. Island Press, Washington, DC, pp. 585–622.
- Toledo, R. (2004). Grado de antropización y manejo forestal en relación con la diversidad y abundancia de las comunidades de aves en la cuenca del río Cuyaguaje. Tesis en opción al título de Master en Ciencias Forestales. Universidad de Pinar del Río, Cuba.
- Whetten RW., Kellison R. (2010). Research gap analysis for application of biotechnology to sustaining US forests. *Journal of Forestry*, 108, 193-201.



**Capítulo 2 Modelos de predicción de hábitat actual y futuro de las poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* Swartz., en la República Dominicana como base para los estudios de variabilidad de la especie**



## **2.1. Introducción**

El *Pinus occidentalis* Swartz., es una especie forestal endémica de la isla de La Española, y es la conífera predominante en los bosques de Haití y de la República Dominicana. El pino de La Española se encuentra en rodales puros entre los 2.100 y 3.087 m.s.n.m. (Pico Duarte); en rodales mixtos junto con árboles de hoja ancha entre 850 a 2.100 m.s.n.m., y en ocasiones se encuentra en zonas costeras en suelos pobres y ácidos. A pesar de su gran plasticidad, secundada por su presencia en un amplio rango altitudinal (Farjón, 2013), y de su catalogación dentro de la lista Roja de las especies en Peligro de extinción como especie “En Peligro” por la IUCN; estudios recientes demuestran la reducción de su hábitat natural (Ministerio de M.A y R.N, 2014). Entre los factores que influyen en su regresión dominan las causas antrópicas y climáticas. Las principales causas antrópicas son la deforestación, la expansión de la frontera agrícola, las nuevas construcciones de asentamientos humanos, la tala indiscriminada para carbón y madera y los incendios forestales (Bueno-López & Bevilacqua, 2009).

Por otro lado, las poblaciones naturales de *P. occidentalis* se ven afectadas por los pronósticos de escenarios de Cambio Climático (ONAMET, 2015). En República Dominicana se estima un aumento en los promedios de las temperaturas mínimas entre 2 - 3°C, y un aumento entre 1 - 3°C de la temperatura máximas. Además, las precipitaciones podrían disminuir hasta un 17%, por lo que se prevén periodos de sequía más intensos e incrementos súbitos de las precipitaciones durante la temporada de lluvias (ONAMET, 2015). La consideración de especie “En Peligro” otorgada por la UICN a *P. occidentalis* se ve agravada por las presiones antrópicas y climáticas mencionadas; sin embargo, el conocimiento de los factores que influyen en su distribución y su auto-ecología son escasos, lo que es un dilema para quienes tienen que tomar decisiones sobre la conservación y el manejo de estas poblaciones forestales (Myers et al. 2000).

Todas las especies responden a un conjunto de factores ambientales bióticos y abióticos, tanto actuales como históricos, que condicionan la presencia y por ende limitan la distribución de las mismas, afectando también las

condiciones geográficas y la distribución natural de las especies. Se plantea que ante la acelerada pérdida y degradación de las áreas naturales, el enfoque de estudios básicos encaminados exclusivamente a la búsqueda de factores que determinen la distribución de los organismos, deben ser acompañados por enfoques más prácticos dirigidos a la identificación de las áreas prioritarias para el manejo y protección de la diversidad genética de las especies. No obstante, el conocimiento que se tiene actualmente sobre la distribución de muchas especies dificulta la toma de decisiones en este sentido (Trigueros, 2012).

Gracias al avance de los Sistemas de Información Geográfica (SIG), es posible relacionar la presencia/ausencia de las especies con variables ambientales continuas en formato “raster” y obtener relaciones que pueden ser extrapoladas; en el espacio al resto de la región de estudio; y en el tiempo, mediante el uso de escenarios climáticos (Elith y Leathwick, 2009). Este conjunto de técnicas o modelos se ha denominado Modelos de Distribución de Especies (SDMs por sus siglas en inglés). Un SDM representa la distribución potencial de una especie en el área de estudio la cual puede ayudar a tomar decisiones de conservación a corto y largo plazo, además de dirigir el esfuerzo de la investigación en un área definida (Naoki et al. 2006; Guisan et al., 20013).

Los SDMs relacionan la presencia y/o ausencia registrada de especies con variables ambientales para predecir la distribución dentro del área de interés (Trigueros, 2012). Los modelos de distribución de especies son métodos basados en estadísticas de distinto grado de complejidad pero muy eficaces para determinar el rango ambiental de las especies y su proyección en el espacio y tiempo (Elith y Leathwick, 2009; Guillerá et al., 2015; Fithian et al., 2015; Elith y Leathwick, 2016), y han sido utilizado para muchos propósitos diferentes, incluyendo la gestión de la conservación (Navarro-Cerrillo et al., 2011; van Gils et al., 2012), los estudios biogeográficos (Thuiller et al., 2011), el efecto de las especies invasoras en los ecosistemas (Václavík et al., 2010), la ecología (Peroza et al. 2014), el manejo de especies (Zaval et al. 2015), y la evaluación del impacto del cambio climático (Guisan y Zimmermann 2000).

Las técnicas disponibles para realizar SDMs se pueden clasificar en 4 grupos: las técnicas relacionadas con modelos estadísticos basados en regresiones (Modelos Lineales Generalizados (GLM), Modelos Aditivos Generalizados (GAM)), los métodos de clasificación (Random Forest (RF), Boosted Regression Trees (BRT)), los modelos empíricos predictivos (BIOCLIM, ENFA, Surface Range Envelope; SRE), y aquellos basados en algoritmos específicos (GARP, MAXENT). Además, las técnicas mencionadas se pueden combinar usando métodos estadísticos de ensamblado como (biomod2, sdm), y obtener modelos de consenso, con esto se busca disminuir los sesgos y limitaciones propias del uso individual de las técnicas estadísticas mencionadas (Pliscoff, y Fuentes-Castillo, 2011).

Los modelos ensamblados combinan los resultados de varios modelos independientes, siendo superiores a los resultados de un solo algoritmo en modelos de predicción (Breiner et al. 2015; Zhang et al. 2015). En este contexto, el modelo biomod2 (Thuiller et al. 2013) combina 10 algoritmos diferentes: ANA, BRT, CART, FDA, GLM, GAM, MARS, MaxEnt, RF y SRE; y permite calcular su predicción ensamblada final (Thuiller 2003; Thuiller et al. 2009).

En la actualidad se están utilizando modelos de distribución de especies no sólo para determinar su distribución potencial sino también el efecto del cambio climático sobre el comportamiento y respuesta de la biodiversidad, las especies forestales y dentro de ellas las coníferas se han estudiado para realizar la modelación de su distribución potencial (Sánchez, 2008, García et al., 2012, Ávila et al., 2014), además del empleo de diferentes modelos como los utilizados por Villers y Trejo, (1998) quienes utilizaron dos modelos de circulación general para evaluar el impacto del cambio climático con (MCG) sobre áreas naturales protegidas (ANP) y observaron que 24 áreas naturales tendrán efectos negativos en la flora y la fauna, perdiendo gran parte de sus bosques, por su parte Monterroso et al., (2010) emplearon los modelos MCG (modelos de circulación general de la atmósfera) CCM (modelo de comunidades de sistemas climáticos), GFDL(modelo global), para *Abies religiosa* (Kunth) Schldl. et Cham, y *Pinus pseudostrobus* Lindl. en el Parque Nacional Nevado de Toluca, Gómez et al.

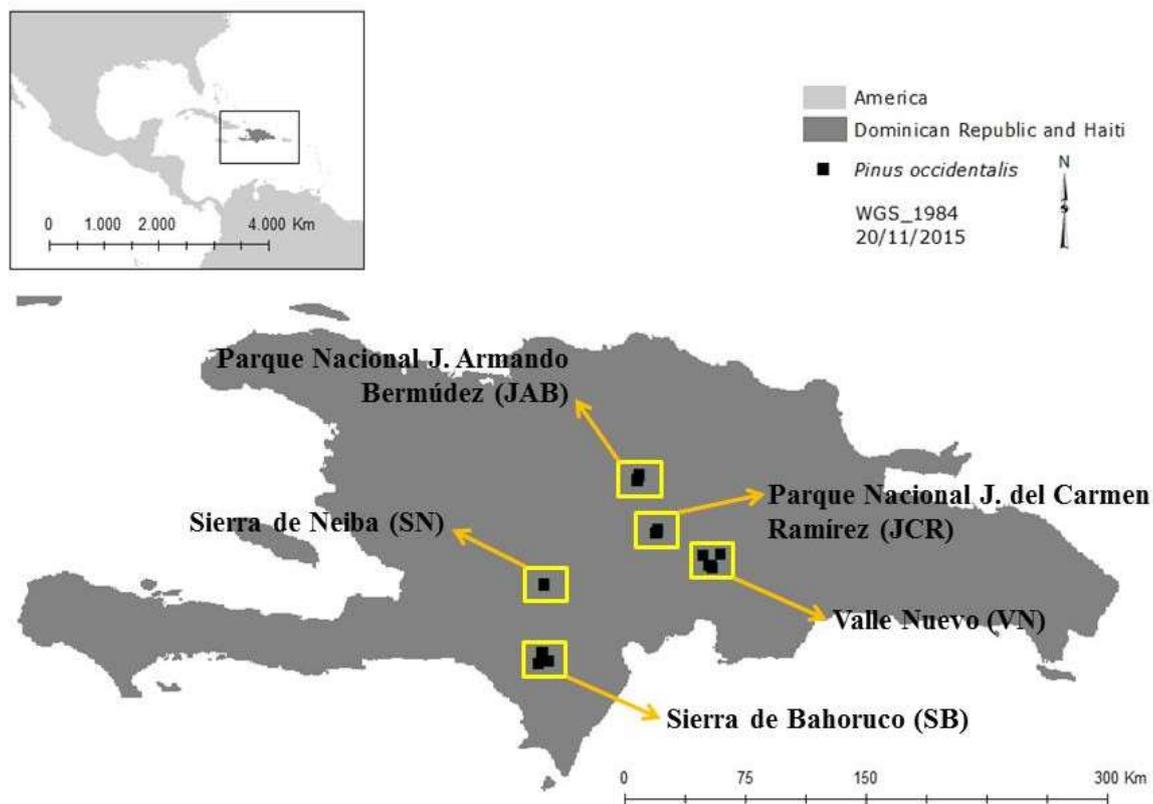
(2009) generaron modelos de cambio climático a escala regional al 2030 y 2050 para especies forestales como *Pinus patula* Schltdl. et Cham. y *Pinus pseudostrobus*, además, Miranda et al., (2016) georreferenciaron 1346 rodales naturales junto con 19 variables bioclimáticas para la modelación con MaxEnt (Máxima Entropía) generando el mapa de probabilidades de mejores hábitats para *Pinus tropicalis* en el occidente cubano.

En este trabajo, utilizamos un modelo ensamblado (biomod2; Thuiller et al, 2009) para describir el hábitat actual y futuro del *Pinus occidentalis* en la República Dominicana, como base para estudiar los posibles cambios de la distribución del hábitat adecuado de la especie bajo diferentes escenarios climáticos futuros previstos. La descripción de hábitat potencial actual y futuro permite seleccionar aquellas áreas con mayor valor para la conservación de los recursos genéticos de la especie y, por tanto, orientan en los estudios de variabilidad, descripción y catalogación de los materiales de base de la misma. En ese sentido, este capítulo es un paso preliminar al uso de diferentes aproximaciones morfoanatómicas y moleculares para describir la variabilidad de las poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* en la República Dominicana. Con el fin de hacer esto, se seleccionaron cinco variables ambientales en función de su valor predictivo y se asignan para los escenarios climáticos seleccionados para calcular los valores futuros previstos de las variables bioclimáticas utilizados en el modelado de distribución de la especie.

## **2.2. Materiales y Métodos**

### **2.2.1 Área de estudio**

El área de estudio es la República Dominicana, dentro de ella se prestó especial atención a cinco Parques nacionales en los que la conífera principal es el *Pinus occidentalis* (Figura. 1).



**Figura 1.** Distribución (señalizadas) de las áreas con bosques de pino criollo (*Pinus occidentalis*) en la República Dominicana.

**Parque Nacional Sierra de Neiba (SN):** Posee un área de ocupación de 18.700 ha y un rango altitudinal de 1.300-2.102 m, está ubicado ( $18^{\circ} 38' N 71^{\circ} 35' O$ ) al suroeste de la República Dominicana, en el sistema montañoso Sierra de Neiba, se ubica al norte del Lago Enriquillo, desde el pueblo Galván en el este, hasta la frontera con Haití en el oeste. En el inventario de vegetación de la SN se destacó que quedan pocas áreas de bosque virgen. El bosque de pino abierto se localiza en la vertiente norte de la SN y está compuesto principalmente poblaciones de *Pinus occidentalis* en estado poco alterado, pero ocupa apenas 1% de la superficie total del Parque (Perdomo, et al, 2010).

**Parque Nacional Valle Nuevo (VN):** Con una altitud de 1.000-2.842 m, está ubicado en la región norte o Cibao de la República Dominicana, entre las provincias Monseñor Nouel , La Vega, Azua y San José de Ocoa. Con un área de ocupación de 90.680 ha, entre las coordenadas  $18^{\circ} 47' N 70^{\circ} 38' O$ . Según Núñez

et al. (2006), la cobertura boscosa de Valle Nuevo es de alrededor de 39.000 ha, y está compuesto por bosque de pino que ocupa un rango de 24.445 ha.

**Parque Nacional José Armando Bermúdez (JAB):** Con una altitud de 900-3.080 m, comprende una vasta porción de la vertiente norte de la Cordillera Central, en la región norte de la República Dominicana. Con un área de ocupación de 78.957 ha, entre las coordenadas 19° 10'N 71° 05'O. Se extiende de este a oeste, desde el poblado de La Ciénaga de Manabao, en la provincia de La Vega, hasta el Parque Nacional Nalga de Maco, en la provincia de Elías Piñas. Al norte, el PNAB limita con las comunidades de Mata Grande, La Diferencia, Magua y La Cidrita. Al sur colinda con el Parque Nacional José del Carmen Ramírez. La vegetación predominante en un 58% está conformada por bosques de coníferas, donde dominan el *P. occidentalis* y la sabina *Juniperus gracilior* (Perdomo, et al, 2010.).

**Parque Nacional José del Carmen Ramírez (JCR):** Con una altitud de 3.000 msnm, posee el punto más alto en el Pico Duarte, que es la mayor elevación de las Antillas. Está localizado en la vertiente sur de la Cordillera Central. Limitado al sur con los municipios de Azua y San Juan de la Maguana, al Norte con el Parque Nacional Armando Bermúdez, al Oeste con los municipios de Jarabacoa y Constanza. Con un área de ocupación de 76.400 ha, entre las coordenadas 19° 17' N 71° 27'O. Las formaciones vegetales están estructuradas fundamentalmente por bosque de coníferas, mixtos, y latifoliados o de hojas anchas. Predomina *Pinus occidentalis* que ocupa el piso de vegetación superior.

**Parque Nacional Sierra de Bahoruco (SB):** con una altitud comprendida entre 300 y 2.367 m, está ubicada al suroeste de la República Dominicana, entre las provincias Pedernales, Independencia y Barahona. Con un área de ocupación de 112.448 ha, entre las coordenadas 18° 10' N 71° 31'O. De acuerdo al mapa de vegetación, usos y coberturas del suelo contenido en el Plan de Manejo del PNSB (SEMARENA, 2005), existen 19 formaciones vegetales, y dentro de estas, las formaciones presentes a mayor altitud corresponden a bosques de pino criollo (Perdomo, et al. 2010).

### 2.2.2. Localización de los datos y variables ambientales

Las presencias de *Pinus occidentalis* se obtuvieron en las cinco localizaciones descritas previamente identificando un total de n=357 árboles. Las pseudo-ausencias fueron generadas aleatoriamente dentro del área de estudio (La República Dominicana) utilizando un software SIG. Se realizó un análisis previo de la localización de los puntos de presencia y pseudo-ausencias y se eliminaron todos aquellos que estuvieran a una distancia menor que la equivalentes a la diagonal de resolución de píxeles (200 x 200 m) utilizada en las variables ambientales actuales. La modelización se realizó con el mismo número de pseudo-ausencias que de presencias para no desequilibrar el modelo (Barbet- Massin et al. 2012). La eliminación del exceso de pseudo-ausencias se realizó aleatoriamente utilizando en programa libre R utilizando la función “sample” del paquete “base”.

Se utilizaron 19 variables bioclimáticas similares a worldclim descargadas de (<http://biogeo.berkeley.edu/worldclim/worldclim.html>) con una resolución de ~ 1 Km (Hijmans et al. 2005) (Tabla 1). Las proyecciones de Cambio Climático también se obtuvieron a partir de la base de datos de WORLDCLIM (<http://biogeo.berkeley.edu/worldclim/worldclim.html>) (Tabla. 1). Se consideraron dos modelos de circulación global (GCM; CCSM4 y GISER2) cuatro trayectorias de concentración representativas (RCP; 2.5, 4.5, 6.0, 8.5) y dos proyecciones de futuro (2050 y 2070), para tener en cuenta la variabilidad en las proyecciones futuras.

**Tabla 1.** Variables ambientales utilizadas para la predicción del hábitat de *Pinus occidentalis* en República Dominicana. En color negro las variables seleccionadas para predecir la ocurrencia de *Pinus occidentalis*.

<b>Variable</b>	<b>Descripción</b>	
Bio1	Temperatura media anual	°C
Bio2	Rango promedio de temperaturas diarias (Tmax-Tmin)	°C
Bio3	Isotermalidad (bio2/bio7) × 100	°C
Bio4	Estacionalidad de la temperatura (Desviación estándar × 100)	
Bio5	Temperatura máxima del mes más cálido	°C
Bio6	Temperatura mínima del mes más frío	°C
<b>Bio7</b>	<b>Rango anual de la temperatura (bio5–bio6)</b>	<b>°C</b>
<b>Bio8</b>	<b>Temperatura media del trimestre más húmedo</b>	<b>°C</b>
Bio9	Temperatura media del trimestre más seco	°C
Bio10	Temperatura media del trimestre más cálido	°C
Bio11	Temperatura media del trimestre más frío	°C
Bio12	Precipitación anual	mm
<b>Bio13</b>	<b>Precipitación del mes más húmedo</b>	<b>mm</b>
Bio14	Precipitación del mes más seco	mm
Bio15	Estacionalidad de la precipitación	
Bio16	Precipitación del trimestre más húmedo	mm
Bio17	Precipitación del trimestre más seco	mm
<b>Bio18</b>	<b>Precipitación del trimestre más cálido</b>	<b>mm</b>
<b>Bio19</b>	<b>Precipitación del trimestre más frío</b>	<b>mm</b>

### 2.2.3. Reducción de las variables

La reducción de variables se realizó mediante la eliminación de las variables de elevada colinealidad mediante el Índice de Inflación de la Varianza (VIF), variables con VIF>10 fueron eliminadas (Duque-Lazo, et al. 2016). De las variables no colineales se tomaron aquellas de mayor importancia para predecir la distribución de las especies según el criterio de selección de variables que optimiza el área bajo la curva ROC (AUC) generada al ajustar los datos con el modelo “Random Forest (AUC-RF)” (Calle et al., 2011). La importancia de las variables se determinó mediante el cálculo de la correlación (r) entre las predicciones del modelo, incluyendo todas las variables ("modelo completo") y las predicciones realizadas con la estandarización de la variable objeto de estudio ("modelo reducido"). Si una variable contribuye poco a un modelo, ambas salidas,

o resultados, serán similares, y (1-r) será bajo, mientras que lo contrario será el caso para las variables importantes (Duque-Lazo, et al. 2016).

#### **2.2.4. Modelos estadísticos**

La selección del modelo se hizo usando el paquete de R biomod2 que permite ensamblar diez técnicas de SDM (Phillips y Dudík 2008; Thuiller et al. 2009), Biomod2 trabaja con la presencia y/o ausencia de datos e incluye Modelo Lineales Generalizados (GLM), Modelos Aditivos Generalizados (GAM), árboles de clasificación y regresión (CART), análisis discriminante flexible (FDA), redes neuronales artificiales (ANN), Estribas de Regresión Adaptiva Multivariada (MARS) y uno similar al BIOCLIM, Rango de Superficie de la envoltura (SER). El análisis se hizo usando el paquete de R (Equipo de Desarrollo Core R 2014) [http://r-forge.r-project.org/R/?group\\_id=302](http://r-forge.r-project.org/R/?group_id=302) (Thuiller 2003; Thuiller *et al.*, 2009).

El conjunto de modelos ensamblados disponibles en biomod2 se calcularon mediante la aplicación de técnicas estadísticas a la secuencia de proyecciones obtenidas individualmente por cada SDM. Los modelos ensamblados se obtuvieron como resultado de calcular la media, el coeficiente de variación, el intervalo de la confianza inferior y superior, el comité promedio y probabilidad promediada del valor del predictor (Thuiller *et al.* 2009).

#### **2.2.5. Selección y validación del modelo**

La validación y la evaluación de los modelos se realizaron mediante validación cruzada usando un 70% de los puntos para validar y un 30% para evaluar; se realizaron 100 repeticiones para cada técnica individual de SDM (Duque-Lazo, et al 2016). La validación cruzada propició la variación de los valores de los estadísticos de evolución de los modelos (K, AUC y TSS) por lo que los modelos con mayores valores medios y menor variación fueron considerados como más preciso.

La bondad del modelo fue evaluado usando los estadístico Área Bajo la Curva (AUC) del receptor (ROC), el coeficiente Kappa y la versión mejorada del coeficiente Kappa “True Skills Statistics”(TSS). AUC representa la capacidad

discriminativa del modelo mediante la representación gráfica de la comisión de errores (1 - especificidad; falsos positivos) en el eje horizontal, frente a error de omisión (sensibilidad; positivos reales que se han identificado correctamente como tal) en el eje vertical para la totalidad de los umbrales posibles. El valor de AUC oscila entre 0,5-1, donde 1 representa una perfecta discriminación entre presencias y ausencias y 0,5 representa un ajuste aleatorio. El valor del índice Kappa ( $\kappa$ ) se derivó de la matriz de confusión para medir la tasa de concordancia entre los valores reales y predichos en el espacio geográfico para variables categóricas; es dependiente del umbral. Los valores de  $\kappa$  cerca de 0,5 indican clasificación aleatoria, mientras que un índice kappa de 1 representa una perfecta clasificación (Cohen, 1960). El TSS considera los errores de omisión y comisión; es también independiente de la prevalencia y oscila entre valores de -1 y 1; donde 1 indica un acuerdo perfecto y  $<0$  indica un rendimiento aleatorio. El TSS mide la diferencia entre el acuerdo real y el acuerdo al azar esperado, y es particularmente útil para modelar especies con ubicaciones de punto limitadas, y se puede utilizar para comparar diferentes técnicas de modelo TSS, y se define como (Allouche *et al.*, 2006).

$$\text{TSS} = \text{sensibilidad} + \text{especificidad} - 1$$

Por último, Kappa y TSS fueron calculados y evaluados, teniendo en cuenta un umbral igual a la prevalencia (Liu *et al.*, 2005; Hanberry *et al.*, 2013). La selección de proyecciones elegidas para la realización de los modelos ensamblados viene regida por un umbral de precisión, en nuestro caso se seleccionaron todas las proyecciones con  $\text{TSS} > 0.90$ .

#### **2.2.6. Mapas de distribución**

Los modelos generan mapas probabilísticos continuos con valores entre 0 y 100 para cada celda de malla. Con el fin de ayudar a la interpretación visual de las predicciones del modelo, los valores de probabilidad se clasificaron en 4 categorías (25%; 50%, el 75% de 100%) de probabilidad de ocurrencia *P. occidentalis* (Figura.2) que representan probabilidad la distribución potencial presente o futura de *P. occidentalis* en la República Dominicana

Los mapas de probabilidad fueron reclasificados a valores 0 y 1 para el cálculo de variación de superficie ocupada por *P. occidentalis* para la distribución actual y futura (utilizando el mismo umbral que se utilizó para calcular TSS y Kappa).

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Reducción de las variables

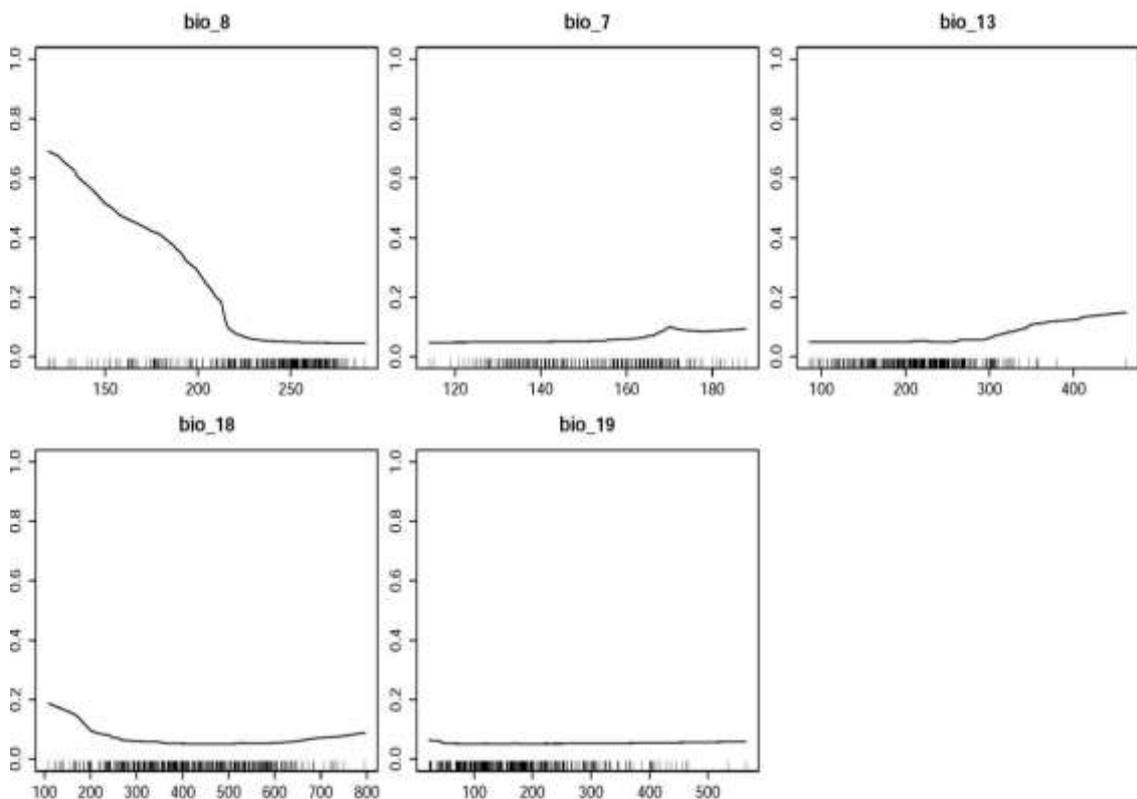
El análisis de colinealidad destacó once variables con  $VIF > 10$ , que fueron eliminadas para el posterior análisis por problemas de colinealidad. Las ocho variables restantes fueron clasificadas por índice de importancia de acuerdo con la función que calcula el valor de importancia de las variables del paquete de R AUCCRF mediante validación cruzada. De ellas se seleccionaron aquellas que maximizasen el valor de AUC ( $n=5$ ).

Cinco variables bioclimáticas poco correlacionados fueron utilizados como variables para la predicción de la distribución potencial: Bio7 (Rango anual de temperatura), Bio8 (Temperatura media del trimestre más lluvioso), Bio13 (Precipitación del mes más lluvioso), Bio18 (Precipitación del trimestre más cálido), Bio19 (Precipitación del trimestre más frío). (Tabla. 2). En la Tabla.2, se puede apreciar la importancia de cada variable según los diferentes modelos empleados, siendo la Bio 8 la variable más importante y estable en todos los modelos, seguida por la Bio 7 y la Bio 13 respectivamente.

**Tabla 2.** Análisis de la importancia de las variables seleccionadas.

Orden	Variables	Importancia	Probabilidad de Selección
1	Bio 8	8,36	1,00
2	Bio 7	3,69	0,99
3	Bio 13	3,52	0,96
4	Bio 18	3,25	0,91
5	Bio 19	3,24	0,67

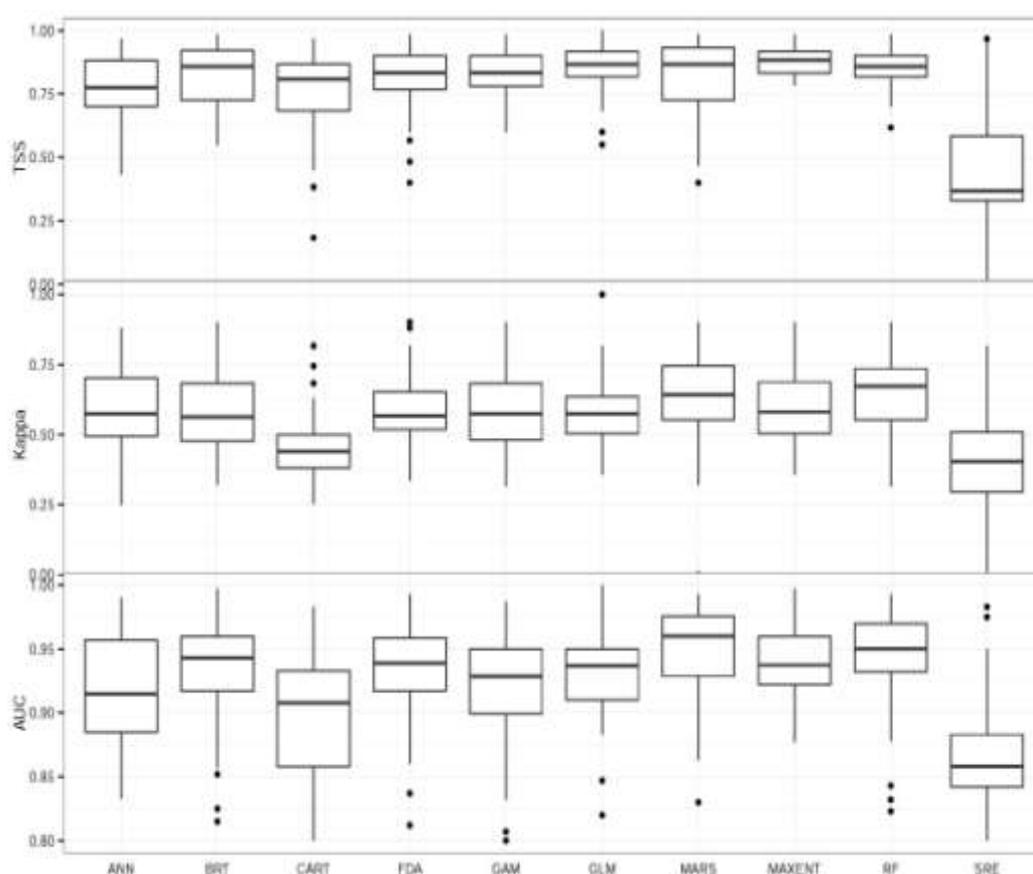
El análisis de las curvas de respuesta de las variables dependientes dio como resultado que para la variable Bio 8 (Temperatura media del trimestre más lluvioso) la probabilidad de presencia de la especie disminuye a medida que aumenta la temperatura (21,6 °C) del trimestre más lluvioso, En el caso de la variable Bio 7 (Rango anual de temperatura, la probabilidad de presencia del pino aumenta cuando la temperatura sobre pasa los 16 ° C. En el caso de las precipitaciones, la variable Bio 13 (Precipitación del mes más lluvioso) podemos apreciar que cuando aumenta la precipitación en el mes más húmedo, por encima de 307 mm, aumenta la probabilidad de presencia de la especie, El aumento de la probabilidad de ocurrencia con la variable Bio 18 (Precipitación del trimestre más cálido) se encuentra por debajo de los 213 mm de precipitación en el trimestre más cálido, mientras que la variable Bio 19 (Precipitación del trimestre más frío) se mantuvo estable con poca probabilidad de ocurrencia. (Figura 3).



**Figura 3.** Curvas de respuesta del modelo de probabilidad promediada del valor del predictor para el conjunto de las variables explicativas.

### 2.3.2. Selección y validación del modelo

Las bondades de las predicciones de los modelos individuales se evaluaron y compararon por los estadísticos TSS, Kappa y AUC. ANN; BRT and RF fueron los modelo que presentaron mayores valores de TSS (TSS=98,3), para Kappa los mayores valores se obtuvieron en ANN, BRT, MARS, FDA and RF (K=0,901) y para AUC fue RF (AUC = 0.997). SRE fue el modelo con valores más bajos en los tres estadísticos empleados (Figura 4).



**Figura 4.** Valores de ajuste obtenidos a diez modelos de distribución diferentes en República Dominicana, incluyendo Redes Neuronales Artificiales (ANN), Árboles de Regresión (BRT), Diagramas de Regresión (CART), Análisis Discriminante Flexibles (FDA), Modelos Aditivos (GAM), Modelos Lineales Generalizados (GLM), Regresión Adaptativa Multivariante (MARS), Máxima Entropía (MaxEnt), “Random Forest” (RF) y la superficie oscilatorias envolventes (SRE).

Por otra parte, se observó que los modelos que utilizan aproximaciones estadísticas similares presentaron elevadas correlaciones en sus proyecciones. Así, los métodos de clasificación (BRT, CART y RF), los métodos de regresión (GAM y GLM) y los métodos de aprendizaje automático de predicciones (ANN y MAXENT) están correlacionados entre sí (Tabla 3).

**Tabla 3.** Matriz de correlación de Pearson de los diferentes modelos de distribución analizados.

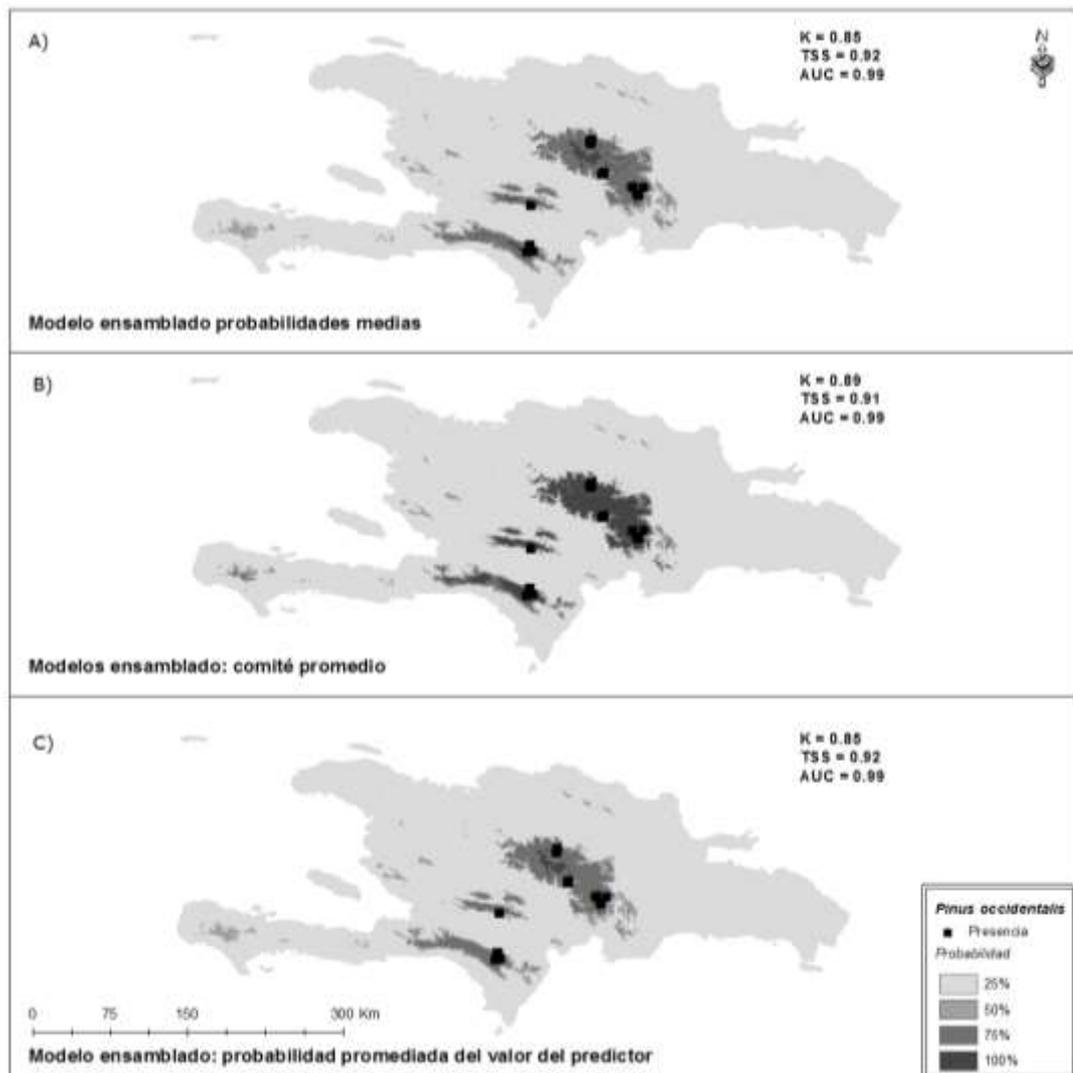
	<b>ANN</b>	<b>BRT</b>	<b>CART</b>	<b>FDA</b>	<b>GAM</b>	<b>GLM</b>	<b>MARS</b>	<b>MAXENT</b>	<b>RF</b>	<b>SRE</b>
<b>ANN</b>	1,000									
<b>BRT</b>	0,822	1,000								
<b>CART</b>	0,767	0,953	1,000							
<b>FDA</b>	0,846	0,933	0,836	1,000						
<b>GAM</b>	0,722	0,795	0,827	0,719	1,000					
<b>GLM</b>	0,899	0,889	0,826	0,874	0,732	1,000				
<b>MARS</b>	0,692	0,693	0,666	0,686	0,736	0,735	1,000			
<b>MAXENT</b>	0,851	0,883	0,814	0,926	0,708	0,911	0,690	1,000		
<b>RF</b>	0,754	0,825	0,784	0,818	0,770	0,817	0,843	0,788	1,000	
<b>SRE</b>	0,461	0,444	0,401	0,476	0,188	0,480	0,200	0,495	0,283	1,000

\*\*\*. Correlación fue significativa para el 0.001

Los mejores modelos ensamblados presentan valores de TSS > 0,90, Kappa > 0,79 y el AUC > 0,98, siendo el promediado de modelos simples (EM. mean) y el modelo ensamblado probabilidad promediada del valor del predictor (EM. PMWD) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Valores de ajuste obtenidos con los modelos conjuntos de predicción de hábitats de *Pinus occidentalis* en República Dominicana.

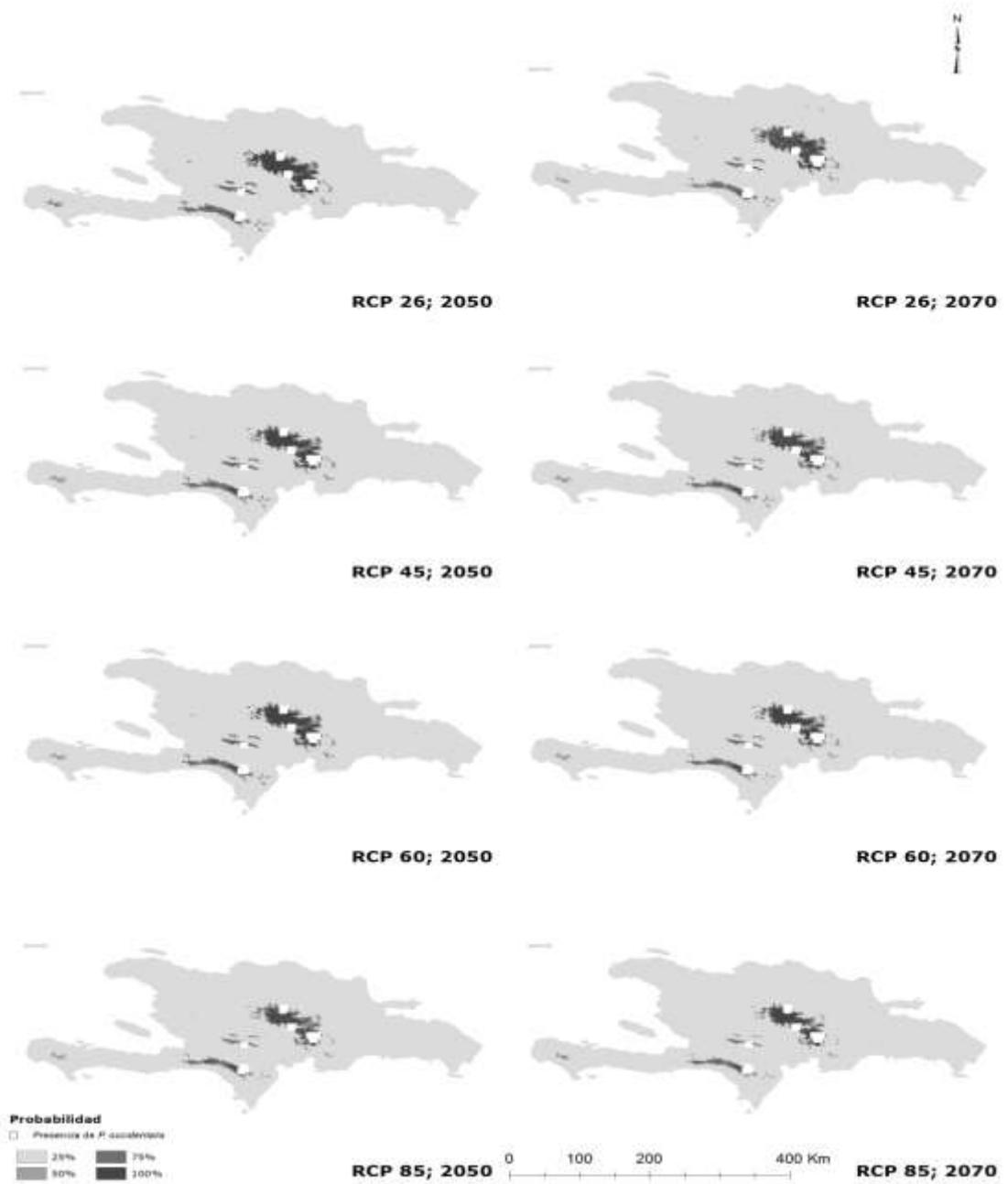
<b>Ensemble model</b>	<b>Kappa</b>	<b>TSS</b>	<b>AUC</b>	<b>Threshold</b>	<b>Sensitivity</b>	<b>Specificity</b>
<b>Mean</b>	0,852	0,920	0,989	0,531	1,000	0,920
<b>Confident interval Inferior</b>	0,852	0,925	0,990	0,482	1,000	0,925
<b>Confident interval Superior</b>	0,852	0,920	0,988	0,580	1,000	0,920
<b>Median</b>	0,793	0,902	0,986	0,478	1,000	0,903
<b>Committee averaging</b>	0,893	0,913	0,989	0,470	1,000	0,913
<b>Probability mean weight decay</b>	0,852	0,920	0,989	0,547	1,000	0,920



**Figura 5.** Probabilidad de presencia de *Pinus occidentalis* en República Dominicana según los modelos ensamblados de predicción A) promedio, B) comité promedio, y C) probabilidad promediada del valor del predictor

### **2.3.3. Proyección futura del hábitat**

Los mapas de distribución potencial actual de la especie indicaron que las áreas con mayor potencialidad para la especie coinciden con zonas de montaña en la parte central y sur de la República dominicana (Figura 5). Además, se aprecia que existen otras áreas potenciales que no han sido muestreadas. El estudio de la evolución del área potencial de distribución bajo los efectos del Cambio Climático indicó una recesión generalizada del hábitat del pino criollo en toda su área de distribución actual, siendo más acusada para el segundo periodo de tiempo estudiado (2070) donde se encontraron que el área potencial podría reducirse hasta el 37% de la superficie potencial actual. Se observa que hay zonas potenciales de presencia de la especie que en las condiciones más severas (RCP 85 para el año 2070) verán reducida su potencialidad para albergar a la especie a la mínima expresión. No obstante, la especie encuentra un refugio climático en las zonas más altas de la isla donde incluso en los escenarios extremos su probabilidad de ocurrencia sigue siendo cercana al 100% (Figura 6).



**Figura 6.** Modelos de distribución potencial futura para *Pinus occidentalis* extrapolados a los escenarios climáticos rep´s 26, 45, 60, y 85 del modelo de circulación CCSM4 para los años 2050 y 2070.

Los modelos ensamblados estudiados presentaron diferente tendencia con respecto a los distintos RCP. En el caso del modelo promedio de modelos simples (Mean) tiende a sobreestimar los RCP extremos (2.6 y 8.5), mientras que subestima los RCP centrales (4.5 y 6.0) en comparación con el modelo ensamblado promedio de pesos (WD). El GCM CCSM4 en comparación con el GISER2 sobre estima las predicciones futuras para los RCP extremos y subestima las predicciones para los RCP centrales. Solo se observó una proyección que predice una recuperación de la especie del año 2050 al 2070, en el modelo ensamblado WD para el GCM CCSM4 y el RCP 2.6 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Pérdida de la superficie de *Pinus occidentalis*, en área (ha) y porcentaje (%) en las proyecciones futuras (2050 y 2070) con diferentes escenarios (RCP 26, 45, 60 85) y dos modelos de circulación global (GCM): CCSM4 y GISER2; El área total se mantuvo por encima del área total presente en hectáreas y el porcentaje de *P. occidentalis* predicho por los modelos del promedio y probabilidad decaída de peso.

		Modelo								
		Modelo ensamblado comité promedio				Modelos ensamblado probabilidad promediada del valor del predictor				
Presente		Año	Area	%	Area	%	Area	%	Area	%
		2000	226,76	100	226,76	100	199,6	100	199,6	100
		rcp	CCSM4		GISER2		CCSM4		GISER2	
Futuro	2050	26	177,44	78,25	200,04	88,22	161,72	81,02	190,60	95,49
		45	150,12	66,20	171,36	75,57	125,92	63,09	160,72	80,52
		60	158,28	69,80	167,88	74,03	141,60	70,94	147,56	73,93
		85	120,36	53,08	162,80	71,79	81,64	40,90	153,92	77,11
Futuro	2070	26	163,92	72,29	192,16	84,74	175,72	88,04	178,72	89,54
		45	134,52	59,32	164,96	72,75	98,84	49,52	155,52	77,92
		60	133,88	59,04	151,56	66,84	106,20	53,21	139,08	69,68
		85	111,60	49,22	105,24	46,41	86,72	43,45	74,24	37,19

En el caso específico de los 5 Parques Nacionales estudiados, se evaluó la probabilidad de presencia de *Pinus occidentalis* en las cinco áreas seleccionadas en el periodo actual y se comparó con su potencialidad en escenarios futuros. Se

observó que las zonas del sur (Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco) la probabilidad de ocurrencia de la especie disminuye > 50% para el año 2050; y casi un 64% para el 2070 en el caso de las poblaciones de Sierra de Neiba y de José Armando Bermúdez (Tabla. 6).

**Tabla 6.** Variación de la probabilidad de ocurrencia de *P. occidentalis* dentro de los cinco espacios naturales seleccionados para los períodos (2050 y 2070), en dos modelos de circulación global (CCSM4 y GISE2R) y cuatro concentraciones representativas (rcp's). Señaladas las áreas con mayor probabilidad de disminución de las poblaciones en cada período de estudio.

	Presente	2050							
		CCSM4				GISE2R			
		rcp 2.6	rcp 4.5	rcp 6.0	rcp 8.5	rcp 2.6	rcp 4.5	rcp 6.0	rcp 8.5
Sierra de Bahoruco	82,10	43,15	46,85	44,75	41,60	50,80	40,80	42,85	42,10
Neiba	98,40	71,60	53,20	52,60	48,40	72,10	60,00	65,80	58,40
Valle Nuevo	98,30	84,86	85,02	81,16	70,52	90,52	86,22	84,18	92,94
José del Carmen Ramírez	99,20	85,55	86,30	81,85	71,85	92,40	92,10	86,80	95,25
José Armando Bermúdez	98,40	85,80	86,55	82,10	71,85	92,90	90,80	86,80	95,50
	Presente	2070							
		CCSM4				GISE2R			
		rcp 2.6	rcp 4.5	rcp 6.0	rcp 8.5	rcp 2.6	rcp 4.5	rcp 6.0	rcp 8.5
Sierra de Bahoruco	97,35	83,70	82,85	80,00	68,40	86,55	77,40	79,20	88,95
Neiba	98,40	60,50	48,40	50,50	36,80	77,90	52,10	53,70	36,30
Valle Nuevo	85,53	60,08	49,60	55,00	38,43	66,60	56,45	51,95	56,30
José del Carmen Ramírez	97,65	70,55	53,95	63,95	36,35	73,95	67,65	62,60	64,45
José Armando Bermúdez	72,90	38,95	27,60	29,20	14,20	54,25	36,30	30,50	35,50

## 2.4. *Discusión*

### 2.4.1 Hábitat potencial actual

En este trabajo se han usado variables climáticas para estudiar la distribución potencial de *Pinus occidentalis*. Se ha observado que las variables térmicas son aquellas que más influyen en la distribución de *P. occidentalis*. Dichas variables se han considerado fundamentales en la conformación de la distribución geográfica de *P. occidentalis* en la República Dominicana, pues la especie está ampliamente distribuida, siendo su hábitat predominante las zonas de altitud media y alta de las montañas de la Cordillera Central, Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco, donde a menudo comparte nichos ambientales con otras Gimnospermas (*Juniperus sp.* y *Podocarpus sp.*) y Angiospermas (*Prunus*, *Diospyros*, entre otras). Esta distribución geográfica tradicionalmente se ha relacionado con el período vegetativo, la alta humedad y el tipo de suelo (Bueno, 2009).

Aunque esta especie se encuentra distribuida desde los 100 metros sobre el nivel del mar (msnm) hasta cerca de los 3.080 msnm, su hábitat fundamental está desde los 800 msnm formando bosque mixto con especies de hojas anchas y a partir de los 2.100 msnm forma rodales puros. En tierras bajas esta especie se desarrolla en suelos lateríticos y clima húmedo y aunque puede crecer en suelos pobres y ácidos no tolera la salinidad, las bajas precipitaciones ni encharcamientos de agua (Bueno et al., 2015).

Las condiciones óptimas descritas para *P. occidentalis* implican precipitaciones anuales superiores a 950 mm, en ausencia de sequía, y un límite altitudinal superior de aproximadamente 1500 metros de altitud (Hagger y Zanoni, 1993). Bajo tales condiciones (clima de montaña a gran altitud), *P. occidentalis* es

una especie altamente competitiva y es una de las principales especies forestales en la República Dominicana.

#### **2.4.2 Modelo de selección**

El estudio realizado sobre el hábitat potencial y futuro de *P. occidentalis* en La República dominicana indicó una regresión en su área potencial actual de distribución, siendo este cambio más acusado en las poblaciones localizadas en el sur de la isla en aquellas localizadas en las áreas de montaña. Esto es debido, principalmente, a la estimación del aumento de las temperaturas anuales (Bio 8), que según se ha observado es la variable ambiental que más influye en la distribución potencial de la especie de estudio, por lo que se puede esperar una tendencia a una reducción progresiva del área de distribución también en las zonas de montaña. Además, dado que la especie es propia de zonas de montaña, no es sorprendente que la precipitación estacional haya mostrado un importante efecto sobre el modelo de distribución, medida por la precipitación del mes más lluvioso, así como por la precipitación del trimestre más cálido. Lamentablemente no existe en el país estudios relacionados para poder hacer comparaciones con otras especies.

Aunque *P. occidentalis* ha demostrado adaptarse a distintos rangos altitudinales, el análisis realizado en los cinco Parques Nacionales revela que las poblaciones de *P. occidentalis* posiblemente tiendan a desplazarse a las zonas más altas de la RD. Esto coincide con estudios realizados en otras especies de coníferas tropicales, las cuales debido a las presiones antrópicas y climáticas han visto reducida su área potencial y se han “desplazado” a zonas con condiciones climáticas más favorables para su persistencia (Iverson et al., 1999; Zolkos et al., 2015; Iverson et al., 2016).

Las predicciones realizadas con SDM simples y ensamblados, muestra que en casos excepcionales los SDM que usan una única técnica de predicción presentan mejores valores de los estadísticos de validación que los modelos

ensamblados. Esto es debido a la utilización de la validación cruzada para la validación y evaluación de los modelos, lo que supone que la secuencia de datos (presencias y pseudo-ausencia) seleccionados se pueden agrupar en algunas ocasiones de tal forma que el ajuste del modelo a los datos es superior (Merow et al. 2014). Por ello, basamos la bondad del modelo en el valor medio de la predicción y su varianza, los modelos ensamblados han demostrado su superioridad (Breiner et al., 2015).

Por otro lado, aunque MaxEnt ha demostrado un buen ajuste para la realización de SMD y es ampliamente utilizado (González y Badía, 2012); en nuestro caso, hay modelos como el BRT o el RF que presentan mejores resultados. Esto puede ser debido a la distribución de los datos, ya que las presencias se encuentran agrupadas en zonas específicas, lo que hace que las predicciones sean más fiables con técnicas de clasificación como (BRT y RF) que máquinas virtuales.

Los valores de TSS, K y AUC encontrados para los modelos seleccionados han mostrado valores de AUC  $>0.90$ , lo que supone una muy buena discriminación del modelos entre presencia y ausencias, lo cual es coincidente con los valores de TSS ( $>0.90$ ) y de  $\kappa$  ( $>0,79$ ), lo que verifica la calidad de la representación espacial de los mapas de distribución creados. La obtención de estos resultados pueden presentar un cierto sobreajuste de los modelos (Merow et al. 2014), lo que es debido a la discriminación de los datos de presencia y pseudo-ausencias y a la ocurrencia de la especie en zonas con unas condiciones climáticas (temperatura y precipitación) muy precisas.

### **2.4.3 Futuro hábitat de proyección**

Los GCM elegidos se seleccionaron para estimar proyecciones de calentamiento medio mundial para el año 2100 cerca de 2.5 °C. En estas condiciones, el patrón general de reducción del área de distribución de *P. occidentalis* también tiene implicaciones con respecto a un aumento general de la

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

amenaza de extinción local que se enfrentan algunas poblaciones, como consecuencia del aumento de la barrera agrícola, los incendios forestales, el uso irregular de la madera, los hornos de carbón, así como factores bióticos tales como la competencia interespecífica que tiene con *Pinus caribaea*.

*P. occidentalis* podría no tener la capacidad para extenderse a zonas geográficas climáticamente adecuados por varias razones, como: el aislamiento geográfico, sistema orográfico complejo, ecosistema restringido, limitadas capacidades de dispersión acoplados a la fragmentación del hábitat y el aislamiento de los parches de hábitat, especialmente en paisajes alterados en gran medida por factores antropogénicos, como ya prevalecen en gran parte de la isla.

Las proyecciones de las posibles distribuciones futuras también deben ser interpretadas con precaución. Si se utiliza cualquier modelo para proyectar fuera del rango en el que se han desarrollado, las proyecciones podrían ser menos fiables (Thuiller, 2014). Incluso si los modelos presentados en este estudio son bastante precisos y comúnmente utilizado para evaluar el impacto del cambio global (Sykes, 2001; Bakkenes *et al.*, 2002, Pearson *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2014), se debe tener especial atención para las especies en el borde de sus distribuciones del área de estudio y para los cuales los modelos no pueden capturar todo el gradiente ambiental adecuado.

No hay evidencias de poblaciones que estén migrando de altitudes bajas y colonizando mayores altitudes como una aparente respuesta al cambio global, esto se evidencia en el caso de la reserva José Armando Bermúdez donde se muestra que para la proyección del año 2070 la especie disminuye en casi hasta un 64% del área actual, siendo esta una de las zonas que en la actualidad presenta mejores condiciones de las poblaciones naturales de *P. occidentalis*.

El presente estudio proporciona información que puede utilizarse como una herramienta fundamental para la evaluación, manejo, conservación y gestión de las plantaciones naturales de *P. occidentalis*.

## **2.5. Bibliografía**

Allouche, O., Tsoar, A., Kadmon, R. (2006). Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS). *Journal of Applied Ecology*, 43, 1223-1232.

Araújo, M. B., New, M. (2007). Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 42-47.

Ávila, R., Villavicencio, R, y Ruiz, A. (2014). Distribución potencial de *Pinus herrerae*, en el occidente del estado de Jalisco. *Rev. Mex. Cien. For.* 5(24). 92-108.

Barbet-Massin, M., Jiguet, F., Albert, C.H., Thuiller, W. (2012). Selecting pseudo-absences for species distribution models: how, where and how many? *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 327-338.

Breiner, F. T., Guisan, A., Bergamini, A., Nobis, M.P. (2015). Overcoming limitations of modelling rare species by using ensembles of small models. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1210-1218.

Bueno, S.W. (2009). Understanding growth and yield of *Pinus occidentalis*, Sw. in La Sierra, Dominican Republic. Doctor of Philosophy Thesis. State University of New York. College of Environmental Science and Forestry. Syracuse. Nueva York. 256 p.

Bueno, S.W., Bevilacqua, E. (2009). *Silvicultural Tools for Managing Pinus occidentalis*, SW. Stastical modelling: Lambert Academic Publishing.

Bueno-López, S. W., Torres Herrera, J. G., García, M. (2015). Factores edáficos-fisiográficos y calidad de sitio del *Pinus occidentalis* Sw. *Madera y bosques*, 21(3), 83-93.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Cohen, J. (1960). A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20, 37-46.

Cubasch, U., G. A. Meehl, G. J. Boer, R. J. Stouffer, M. Dix, A. Noda, C. A. Senior, S. Raper, and K. S. Yap, Projections of future climate change, in *Climate Change. (2001): The Scientific Basis: Contribution of WGI to the Third Assessment Report of the IPCC*, edited by J. T. Houghton et al., pp. 525 – 582, Cambridge Univ. Press, New York.

Duque-Lazo, J., van Gils, H., Groen, T. A., Navarro-Cerrillo, R. M. (2016). Transferability of species distribution models: The case of *Phytophthora cinnamomi* in Southwest Spain and Southwest Australia. *Ecological Modelling*, 320, 62-70

Elith, J., Leathwick, J.R., 2009. Species Distribution Models: Ecological Explanation and Prediction Across Space and Time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40, 677-697.

Elith, J., Franklin, J. (2013). Species Distribution Modeling. In A. L. Simon (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*: Academic Press, Waltham, 692-705.

Elith, J., H. Graham, C., P. Anderson, R., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., J. Hijmans, R., Huettmann, F., R. Leathwick, J., Lehmann, A., Li, J., G. Lohmann, L., A. Loiselle, B., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., McC. M. Overton, J., Townsend Peterson, A., J. Phillips, S., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., E. Schapire, R., Soberón, J., Williams, S., S. Wisz, M. and E. Zimmermann, N. (2006). Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, 29, 129-151.

Elith, J., Leathwick, J. (2016). Boosted Regression Trees for ecological modeling.

Farjon, A. (2013). *Pinus occidentalis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013. doi:e.T34192A2850209. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T34192A2850209.en>

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Fithian, W., Elith, J., Hastie, T., Keith, D. A. (2015). Bias correction in species distribution models: pooling survey and collection data for multiple species. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(4), 424-438.

Franklin, J. 2009. *Mapping species distributions: spatial inference and prediction*. Cambridge, Cambridge University Press, New York (U.S.A).

Franklin, J. 2010. *Mapping species distributions: spatial inference and prediction*. Cambridge University Press, New York (U.S.A).

García, M., Cantú, C., Estrada, E., Pando, M., Moreno, A. (2012). Distribución actual y potencial de *Taxus glabosa* (TAXACEA) en México. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 6(2), 587-598).

Gómez D., J. D., A. I. Monterroso R., J. A. Tinoco R., M. L. Toledo R. (2009). Cuarta Comunicación Nacional de México ante la Convención Marco de Naciones Unidas sobre el Cambio Climático: Sector forestal. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México; Departamento

González, F. F., Badía, R. P. (2012). *Avances en el conocimiento de la vegetación* (Vol. 136). Univ de Castilla La Mancha.

Gordon C, C. C., Senior C.A, Banks H, Gregory J.M, Johns T.C, Mitchell J.F.B, Wood R.A. (2000). The simulation of SST, sea ice extents and ocean heat transports in a version of the Hadley Centre coupled model without flux adjustments. *Climate Dynamics*, 16, 147-168.

Guillera-Arroita, G., Lahoz-Monfort, J. J., Elith, J., Gordon, A., Kujala, H., Lentini, P. E., Wintle, B. A. (2015). Is my species distribution model fit for purpose? Matching data and models to applications. *Global Ecology and Biogeography*, 24(3), 276-292.

Guisan, A., Weiss, S.B., Weiss, A.D. (1999). GLMs versus CCA spatial modeling of plant species distribution. *Plant Ecology*, 143, 107-122.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Guisan, A., Zimmermann, N. E. (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling*, 135(2), 147-186.

Guisan, A., Thuiller, W. (2005). Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters*, 8, 993-1009.

Guisan, A., Tingley, R., Baumgartner, J.B., Naujokaitis-Lewis, I., Sutcliffe, P.R., Tulloch, A.I., Regan, T.J., Brotons, L., McDonald-Madden, E., Mantyka-Pringle, C., Martin, T.G., Rhodes, J.R., Maggini, R., Setterfield, S.A., Elith, J., Schwartz, M.W., Wintle, B.A., Broennimann, O., Austin, M., Ferrier, S., Kearney, M.R., Possingham, H.P., Buckley, Y.M., (2013). Predicting species distributions for conservation decisions. *Ecol Lett* 16, 1424-1435

Hager, J., T. Zanoni. 1993. La vegetación natural de la Republica Dominicana. Una nueva clasificación. *Moscosa* 7: 39-8

Hanberry, B., He, H. (2013). Prevalence, statistical thresholds, and accuracy assessment for species distribution models. *Web Ecology*, 13(1), 13-19.

Heikkinen, R. K., Marmion, M., Luoto, M. (2012). Does the interpolation accuracy of species distribution models come at the expense of transferability? *Ecography*, 35, 276-288.

Iverson, L. R., Prasad, A., Schwartz, M. W. (1999). Modeling potential future individual tree-species distributions in the eastern United States under a climate change scenario: a case study with *Pinus virginiana*. *Ecological Modelling*, 115(1), 77-93.

Iverson, L. R., Thompson, F. R., Matthews, S., Peters, M., Prasad, A., DiJak, W. D., Janowiak, M. (2016). Multi-model comparison on the effects of climate change on tree species in the eastern US: results from an enhanced niche model and process-based ecosystem and landscape models. *Landscape Ecology*, 1-20.

Hijmans, R.; Cameron, S.; Parra, J.; Jones, P., Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land area. *International Journal of Climatology*, 25: 1965-1978.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Knutson, T. R., T. L. Delworth., K. W. Dixon., R. J. Stouffer. (1999). Model assessment of regional surface temperature trends (1949–1997). *Journal of Geophysical Research*, 104(D24), 30981-30996.

Liu, C., Berry, P.M., Dawson, T.P., Pearson, R.G. (2005). Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography*, 28, 385-393.

Merow, C., Smith, M.J., Edwards, T.C., Guisan, A., McMahon, S.M., Normand, S., Thuiller, W., Wüest, R.O., Zimmermann, N.E., Elith, J. (2014). What do we gain from simplicity versus complexity in species distribution models? *Ecography* 37, 1267-1281.

Miranda, S.C.A., López,G.G., Sotolongo, R. (2016). Modelación de la distribución potencial de *Pinus tropicalis* en el occidente de Cuba. *Avances*. 18(1), 28-35.

Monterroso R, A. I., J. D. Gómez D., J. A. Tinoco R. (2010). Potential distribution of two dominant species in the National Park “Nevado de Toluca”, central México, current and future climate change scenarios. *Journal of Environmental Sciences* 1 (1):27-34.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.

Naoki, K., Gómez, M. Isabel, López, Ramiro P., Meneses, Rosa I., Vargas, J. (2006). Comparación de modelos de distribución de especies para predecir la distribución potencial de vida silvestre en Bolivia. *Ecología en Bolivia*, 41(1), 65-78.

Navarro-Cerrillo, R.M., Hernandez-Bermejo, J.E., Hernandez-Clemente, R., 2011. Evaluating models to assess the distribution of *Buxus balearica* in southern Spain. *Applied Vegetation Science*. 14, 256–267.

Navarro-Cerrillo, R. M., Sánchez-Salguero, R., Manzanedo, R. D., Camarero, J. J., Fernández-Cancio, Á. (2014). Site and age condition the growth responses to climate and drought of relict *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* populations in Southern Spain. *Tree-Ring Research*, 70(2), 145-155.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

- Perosa, M., Rojas, F., Villagra, P., Tognelli, M. F., Carrara, R., & Alvarez, J. A. (2014). Distribución potencial de los bosques de *Prosopis flexuosa* en la Provincia Biogeográfica del Monte (Argentina). *Ecología austral*, 24(2), 238-248.
- Peterson, A. T., Pape, M., Eaton, M. (2007). Transferability and model evaluation in ecological niche modeling: A comparison of GARP and Maxent. *Ecography*, 30, 550-560.
- Phillips, S. J., Anderson, R.P., Schapire, R.E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190, 231-259.
- Phillips, S. J., Dudík, M. (2008). Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, 31, 161-175.
- Pliscoff, P., Fuentes-Castillo, T. (2011). Modelación de la distribución de especies y ecosistemas en el tiempo y en el espacio: una revisión de las nuevas herramientas y enfoques disponibles. *Revista de Geografía Norte Grande*, (48), 61-79.
- Porfirio, L. L., Harris, R.M.B., Lefroy, E.C., Hugh, S., Gould, S.F., Lee, G., Bindoff, N.L., Mackey, B. (2014). Improving the Use of Species Distribution Models in Conservation Planning and Management under Climate Change. *Plos One*, 9: e113749.
- Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Sánchez, V., Galindo G., Díaz, F. (2008). *Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Universidad Veracruzana, Mundi Prensa México, S. A. de México, D. F., México. pp. 211-224.
- Soberón, J., Ceballos, G. (2011). Species richness and range size of the terrestrial mammals of the world: biological signal within mathematical constraints. *PLoS ONE*, 6:e19359.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Syphard, A. D., Franklin, J. (2009). Differences in spatial predictions among species distribution modeling methods vary with species traits and environmental predictors. *Ecography*, 32, 907-918.

Thuiller, W. (2003). BIOMOD - optimizing predictions of species distributions and projecting potential future shifts under global change. *Global Change Biology*, 9, 1353-1362.

Thuiller, W., Lafourcade, B., Engler, R. Araujo, M.B. (2009). BIOMOD - a platform for ensemble forecasting of species distributions. *Ecography*, 32, 369-373.

Thuiller, W., Lavergne, S., Roquet, C., Boulangeat, I., Lafourcade, B., Araujo, M.B., 2011. Consequences of climate change on the tree of life in Europe. *Nature* 470, 531-534.

Thuiller, W., Georges, D. & Engler, R. (2013). biomod2: Ensemble platform for species distribution modeling. In. R package version 2.0.3/r539.

Thuiller, W. (2014). Editorial commentary on “BIOMOD—optimizing predictions of species distributions and projecting potential future shifts under global change.”. *Global change biology*, 20(12), 3591-3592.

Trigueros, V. F. (2012). Evaluación de dos métodos de modelación para el cálculo de áreas de distribución potencial y sus implicaciones en la estimación del impacto producido por el cambio climático. (Tesis para obtener el título de licenciado en Biología), Universidad Veracruzana, México.

Václavík, T., Meentemeyer, R.K., (2009). Invasive species distribution modeling (iSDM): are absence data and dispersal constraints needed to predict actual distributions? *Ecol. Modell.* 220, 3248-3258.

van Gils, H., Conti, F., Ciaschetti, G., Westinga, E., (2012). Fine resolution distribution modelling of endemics in Majella National Park, Central Italy. *Plant Biosyst.* 146, 276-287.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

van Gils, H., Westinga, E., Carafa, M., Antonucci, A., Ciaschetti, G. (2014). Where the bears roam in Majella National Park, Italy. *Journal for Nature Conservation*, 22(1), 276-287.

Villers R., L., L. Trejo V. (1998). Climate change on Mexican forests and natural protected areas. *Global Environmental Change* 2 (8):141-157.

Zhang, L., Liu, S., Sun, P., Wang, T., Wang, G., Zhang, X. & Wang, L. (2015). Consensus Forecasting of Species Distributions: The Effects of Niche Model Performance and Niche Properties. *Plos One*, 10: e0120056.

Zimmermann, N. E., Edwards, T. C., Graham, C. H., Pearman, P. B., Svenning, J.-C. (2010). New trends in species distribution modelling. *Ecography*, 33, 985-989.

Zolkos, S. G., Jantz, P., Cormier, T., Iverson, L. R., McKenney, D. W., Goetz, S. J. (2015). Projected tree species redistribution under climate change: Implications for ecosystem vulnerability across protected areas in the eastern United States. *Ecosystems*, 18(2), 202-220.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

### **Capítulo 3 Estructura del arbolado y variabilidad morfo anatómica de poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

### ***3.1. Introducción***

El *Pinus occidentalis* es un árbol endémico de los bosques de la República Dominicana, propio de la montaña tropical. La especie tiene un temperamento de especie de luz, intolerante y capaz de soportar, desde el estado de plántula, condiciones de plena insolación. Crece en un clima con precipitaciones anuales comprendidas entre los 800 y los 2300 mm, y en un rango altitudinal entre los 200 y los 3100 m sobre el nivel del mar (Darrow y Zanoni, 1990). Es propio de climas tropicales secos a húmedos, y su óptimo está en el piso montano, aunque se distribuye desde condiciones subhúmedas (sur y este de la Cordillera Central) hasta zonas de transición a bosque seco (parte norte de la Sierra de Bahoruco), aunque en éste caso con problemas para su regeneración. En sus estaciones más secas, la humedad relativa del aire es habitualmente elevada, compensando en algunos casos la escasez de precipitación, y creando un microclima adecuado para el mantenimiento de sus poblaciones.

El paisaje forestal presente en las montañas de la zona central de la Isla de la Española está formado por un conjunto de ecosistemas forestales, en algunos de los cuales el pino criollo es la especie principal. La conservación de estos ecosistemas es necesaria ya que fomentan una gran diversidad ecológica y paisajística, por la complejidad estructural de las masas, y por la diversidad de especies vegetales y animales presentes. Sin embargo, en muchas localidades los pinares han sufrido un importante proceso de degradación, alterando sus funciones ecológicas (Bueno et al. 2015).

Los bosques de *Pinus occidentalis* presentan una clara tendencia a ser monoespecíficos en su estrato arbóreo, y conforma poblaciones casi relictas en la Red de Parques Nacionales de la República Dominicana. Estas poblaciones tienen un extraordinario valor ecológico y forestal, ya que representan los últimos restos de los bosques originales de esta especie en la Isla Española; así, como ser la

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

reserva de los recursos genéticos de la especie (Mateo, 2010). Según Dobler et al. (1995), el pino criollo puede llegar a vivir hasta 100 años de edad, aunque se han encontrado individuos que posiblemente superan esa edad, con una altura de más de 30 m, y un perímetro superior a los 2 m.

Las poblaciones presentan, en algunos casos, un bajo porcentaje de germinación (menor de un 10%) y el elevado número de semillas vacías (>50%) (Beauséjour y Lozier, 2008). Esto parece indicar un fenómeno de depresión endogámica a nivel embrional, bastante común en especies de coníferas (Remington y O'Malley, 2000). Todo ello está ocasionando una sensible disminución en la producción y en la calidad de las semillas de estas poblaciones (Geilfus, 1994). Además, *P. occidentalis* es una especie muy vulnerable al calentamiento global por su distribución altitudinal, y se espera que su área de distribución actual disminuya entre un 50 y 64%, y que se pierdan las poblaciones localizadas en las áreas más sensibles como Sierra de Neiba y el Parque Nacional José del Carmen Ramírez para el 2070 (Ver Capítulo 2).

Dentro del rango altitudinal, los pinares aparecen en tres tipos de formaciones (Dobler et al. 1995).

- En las zonas basales (200 -1.000 msnm): los árboles de pino por debajo de los 800 msnm son parte de la dispersión biológica provocada por incendios y deslizamientos de tierra, por encima de los 800 msnm se pueden encontrar pinares abiertos en conjunto con *Cedrela odorata*, *Petitia domingensis*, *Trichilia pallida*, entre otros.
- En la media montaña (1.000-2.000 msnm) forma masas puras de *Pinus occidentalis* pudiéndose encontrar también: *Brunellia comocladifolia*, *Ocotea leucoxydon*, *Podocarpus aristulatus*, *Schefflera tremula*, *Juniperus ekmanii*, *Juniperus gracilior*.
- En el límite altitudinal (2.000- 3.078), de 2.000 a 2.5000 msnm se encuentra el pino en mezcla con *Juniperus ekmanii*, *Juniperus gracilior* y otras especies arbustivas. A partir de los 2 500 msnm el pino es el árbol

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

dominante, aunque también en las partes más húmedas se observan arbustos tales como: *Ilex tuerckheimii*, *Garrya fadyeni*, *Baccharis myrsinites* y *Micromeria alpestris*

En cuanto a su estructura, se pueden identificar dos tipos de pinares:

*Pinares densos*: formados por masas densas de pino, con valores de fracción de cabida cubierta entre el 60 y 100%. El pino es la especie dominante, dada la gran altura que puede alcanzar (20-25 m). Debido a la densidad y al porte de las formaciones de pino en estado adulto, forma masas cerradas que no permiten la entrada de luz, limitando el establecimiento y el desarrollo de otras especies. La alta densidad de este tipo de bosque provoca, como efecto secundario, la "fosilización" y pérdida de biodiversidad, causando un empobrecimiento de los estratos arbustivo y herbáceo, una pérdida de la productividad, y el aumento progresivo de árboles muertos y patógenos.

*Pinares abiertos*: formados por dos estratos diferenciados, con una altura de más de 15 m para el estrato dominante, y de menos de 10 m para el subpiso. La cobertura arbórea en los pinares abiertos está en torno al 40 y 60%. A pesar de la importancia de la cubierta vegetal, el estrato arbustivo siempre está presente.

Actualmente la estructura de los bosques de pino está cambiando, y se está produciendo una disminución de los bosques, tanto en superficie como en densidad, causada por una gestión insuficiente, la incidencia de incendios y la corta ilegal de madera. En República Dominicana, las poblaciones forestales y pre forestales presentan, en todos partes, aspectos y signos de desaparición alarmantes. Todo ello necesita una mayor información sobre la dinámica natural de estos bosques.

*Pinus occidentalis* es actualmente es la única especie de la República Dominicana donde se ha desarrollado y se aplica, aunque de forma limitada, una silvicultura propia de la especie a escala forestal, debido a que es un especie que

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

se adapta bien a los tratamientos selvícolas propuestos para otras confieras (principalmente europeas), así como por los productos forestales que se obtienen de éste, principalmente la madera (Darrow y Zaroni, 1990; Dobler y Torres, 1999; Pérez et al., 2000; Guerrero et al., 2001; Bueno y Bevilacqua, 2011; 2012). El método selvícola utilizado en los pinares se inspira en los métodos propuestos en Europa para otras especies del género. Los tratamientos selvícolas principales aplicados dentro de estos métodos de corta son las cortas de regeneración, las claras (durante la fase de cortas preparatorias), y las claras selectivas, previa a las cortas de regeneración.

La caracterización forestal y morfo anatómica de las poblaciones naturales de *P. occidentalis* en República Dominicana es un paso previo para la conservación y gestión de la especie. Estudios previos realizados de manera independiente en estas poblaciones han mostrado la existencia de una amplia variabilidad morfológica y bioquímica (Klotz, 1991; Darrow y Zaroni, 1993; Rodriguez et al., 2016), así como en aspectos ecológicos, y de variedad morfológica (Martin et al., 2007; Kennedy y Horn, 2008; Miniño et al., 2014) entre las mismas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura forestal y la variabilidad morfo-anatómica de cinco poblaciones naturales: Parque Nacional Armando Bermúdez (PAB), Parque Nacional José del Carmen Ramírez (PJCR), Parque Nacional Sierra de Bahoruco (PSB), Parque Nacional Valle Nuevo (PNVN) y Parque Nacional Sierra de Neiba (PSN), de *Pinus occidentalis* en República Dominicana. La consecución de este objetivo general se llevó a cabo a través del desarrollo de los siguientes objetivos específicos: i) Inventariar áreas forestales dominadas por *Pinus occidentalis* que actualmente se encuentran en situaciones de no intervención para estudiar la estructura y dinámica de sus poblaciones, ii) Realizar una primera datación de muestras dendrocronológicas de *Pinus occidentalis* para conocer la edad del arbolado en las distintas áreas de distribución, y iii) Caracterizar morfo anatómicamente la acícula y los conos de *Pinus occidentalis* a partir de muestras colectadas en las cinco poblaciones, para

evaluar la variación fenotípica debido a diferencias entre poblaciones y entre árboles dentro de una misma población, Estos estudios contribuirían al desarrollo de estrategias apropiadas de conservación, manejo y uso de los recursos genéticos de la especie, que se estudian en capítulos posteriores.

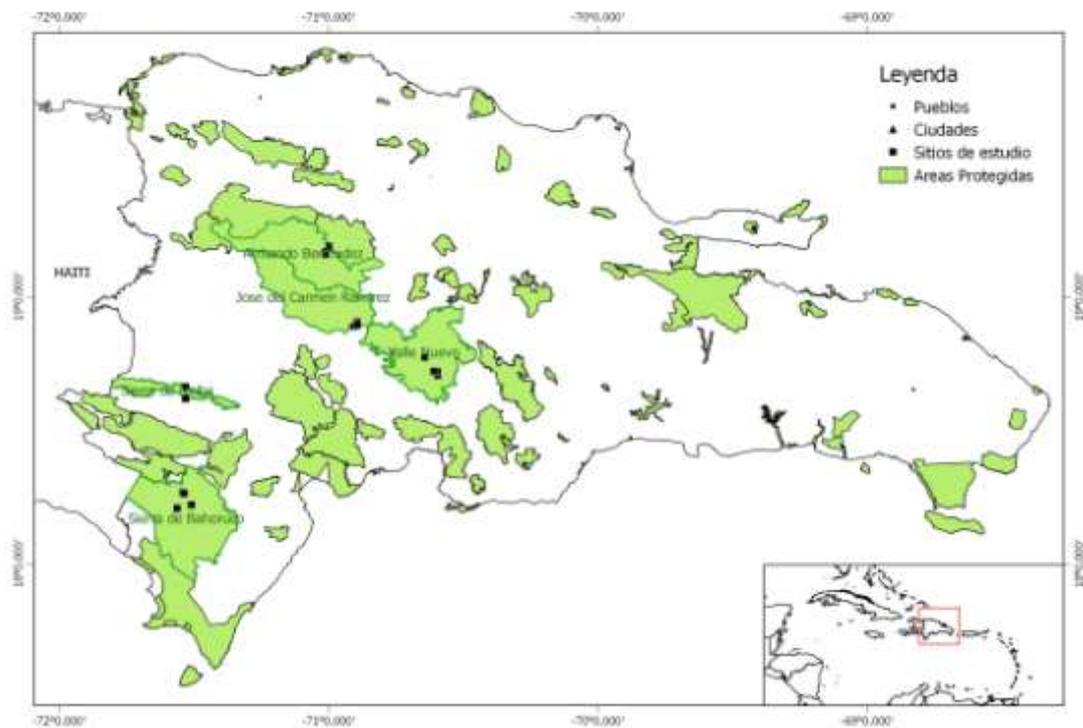
### **3.2. Material y métodos**

#### **3.2.1. Área de estudio**

Las áreas de estudio corresponden a poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* localizadas al interior de cinco Parques Nacionales (Parque Nacional Armando Bermúdez (JAB), Parque Nacional José del Carmen Ramírez (JCR), Parque Nacional Sierra de Bahoruco (PSB), Parque Nacional Valle Nuevo (PNVN) y Parque Nacional Sierra de Neiba (PSN) (**Fig. 1; Tabla 1**). Los Parques Nacionales ocupan una franja altitudinal comprendida entre los 300 msnm en PSB y los 3.087 msnm en el Pico Duarte (19° 1' 59" N, 71° 0' 19" W). Los datos e información de los parques se puede observar en el acápite 2.1 del Capítulo 2 de la Tesis.

La flora natural es muy diversa, está dominada por elementos de la región de las islas del Caribe (Liogier, 1981). También se observan algunos elementos de la región centro americana, junto con una gran cantidad de plantas endémicas. La flora existente en la red de parques cuenta con más de 1015 especies de plantas vasculares, aproximadamente el 22,56% de la flora vascular dominicana. Dichas plantas representan más de 250 taxones, de los cuales, 47 son familias endémicas. Actualmente, como consecuencia de la gestión inadecuada, gran parte de las formaciones vegetales han dado lugar a etapas degradadas que contribuyen a la pérdida de la biodiversidad en los ecosistemas dominicanos, siendo los bosques uno de los más afectados por condiciones ambientales y antrópicas.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 1.** Localización de las poblaciones estudiadas dentro de la red de Parques Nacionales de la República Dominicana

Tabla 1. Características ombrotérmicas de *Pinus occidentalis*. Fuente: Capítulo 2

Parques Nacionales	Latitud (N)	Límites altitudinales (msnm)	Precipitación anual (mm)	Temperaturas extremas	
				Máximas (°C)	Mínimas (°C)
Armando Bermúdez	19° 10' N	900-3.080	2.3	22	12
José del C. Ramírez	19° 17' N	850-3.080	2.5	20	12
Valle Nuevo	18° 47' N	1.000-2.842	2.3	19	9
Sierra de Bahoruco	18° 10' N	300-2.367	1.7	25	18
Sierra de Neiba	18° 38' N	500-2.252	1.5	25	20

### 3.2.2. Inventario

#### 3.2.2.1. Diseño del inventario

El inventario consistió en cuatro parcelas de estructura en cada uno de los cinco Parques Nacionales seleccionados para esta tesis (ver Capítulo 2). La localización final de las parcelas se hizo mediante reconocimiento de campo en el que se determinó la situación según criterios de representatividad.

Se realizó un inventario mediante un muestreo dirigido utilizando parcelas cuadradas de 20 x 20 m (400 m<sup>2</sup>). Las parcelas se ubicaron en el terreno mediante una cartografía generada previamente, y fueron localizadas utilizando GPS (GPS Garmin Etrex Vista con error de 3 metros), cuyas coordenadas U.T.M. se registraron en el formulario de terreno y en el equipo, incluyendo además la información geodésica y cartográfica del sector (posición de la parcela, exposición, huso, datum y m.s.n.m.).

Una vez identificada la ubicación exacta de la parcela, en el centro de la parcela se instaló un jalón de 1 m pintado de color azul en su parte superior, y se delimitaron los límites de la parcela con cinta de color amarillo. En cada parcela se hicieron las siguientes mediciones:

**Medición del diámetro de los ejemplares inventariables:** Se midió con una cinta  $\pi$  de la marca Suunto el diámetro normal de todos los árboles con  $D_n \geq 15$  cm.

**Medición de la altura de los ejemplares inventariables:** Se realizó la medición de la altura de cada árbol con un hipsómetro Vertex-Suunto. Esta medición se llevó a cabo por diferencia entre la obtenida en el vértice superior del árbol y la medición obtenida en la base a una distancia próxima al suelo. No se tuvo en

cuenta la pendiente en la medida de la altura, puesta que estas se han realizado por curvas de nivel para evitar correcciones.

**Conteo del regenerado:** Se contó el regenerado existente ( $D_n < 15$  cm pie a pie en todas las parcelas de muestreo, y se anotó en los estadillos de inventario las características de dicho regenerado, las condiciones donde se manifestó, el vigor y el estado sanitario del mismo.

La toma de datos se hizo utilizando un formulario de terreno diseñado en trabajos previos de inventario (Navarro-Cerrillo et al., 2013), debido a su funcionalidad específica y a las distintas caracterizaciones e información considerada.

Una vez finalizado el inventario, toda la información obtenida fue trasladada a un Sistema de Información Geográfica, ArcGis 9.3., donde quedan recogidos una serie de atributos de estación (cota, exposición, etc.) y de masa (nº de pies de cada clase diamétrica, regenerado, etc.) de cada parcela inventariada. Además, se añadió la cartografía complementaria para apoyar el trabajo de campo y la interpretación de los resultados (mapa de suelos, series de vegetación potencial, fitoclimas, etc), así como la cartografía de inventario propuesto en el presente proyecto.

#### **3.2.2.2. Colecta de acículas y conos.**

A partir de las parcelas seleccionadas, y del recorrido por cada una de las poblaciones de pinos en estudio, se seleccionó una muestra conformada por 175 árboles. El tamaño de la muestra se encuentra entre las cifras recomendadas por Callaham (1964) para cuando no se conoce la variación fenotípica de los árboles. Como criterio de selección se incluyeron en la muestra árboles sanos, que presentasen conos con apariencia sana, y de la parte media de cada copa de árbol se colectaron 30 conos cerrados, y se tomaron al azar una muestra de 30 fascículos.

**Caracterización de las acículas:** Se evaluaron el número de acículas por fascículo (NA, unidades), la longitud de cada acícula (LA, mm), y el grosor de las acículas (GA, mm).

**Caracteres del cono.** En cada cono se evaluaron el peso (PC, g), largo (LC, mm), ancho de la base (ABC, mm) y ancho del ápice (AAC, mm). El peso de los conos se determinó de manera individual con una balanza analítica (marca Ohaus) con una precisión de 0,01 g. La longitud y el ancho de los conos y las acículas se midieron con un vernier (marca Scala) con una precisión de 0,1 mm.

### **3.2.3. Descripción del estado selvícola**

El proceso de análisis de la información sobre el estado selvícola se hizo a partir de los datos procedentes de cada una de las poblaciones. El dato de partida fue el diámetro normal a 1,3 m (Dn) de cada árbol de  $Dn \geq 15$  cm. Las variables evaluadas fueron la Densidad ( $\text{pies ha}^{-1}$ ); área basimétrica ( $\text{m}^2 \text{ha}^{-1}$ ); diámetro normal (cm); y altura media total (m).

#### **3.2.3.1. Análisis estadístico**

La distribución de cada una de las variables se analizó con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, asimetría y Kurtosis. Una vez comprobada la distribución normal y la homocedasticidad se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para observar diferencias entre poblaciones en cuanto a los parámetros selvícolas (Dn, área basimétrica y altura). Las diferencias significativas se analizaron con las comparaciones múltiples de medias de Tukey y de rangos de Nemenyi. El nivel de significancia fue  $P \leq 0.05$  y se empleó el programa SPSS v. 15.

### 3.2.3.2. Estructura según clases diamétricas

Los diámetros se han clasificado según clases diamétricas de 5 cm, según la densidad media de las parcelas, y las distribuciones del diámetro frecuente generado para cada especie y para cada lugar. Para la modelización de las distribuciones diamétricas se ha utilizado la función de Weibull (ecuación 1) que es una de las funciones de distribución más utilizadas en el ámbito ecológico (Baker *et al.*, 2005). La expresión de la función de densidad de Weibull es la siguiente:

$$f(x) = \left(\frac{c}{b}\right) \left(\frac{x}{b}\right)^{c-1} \exp\left[-\left(\frac{x}{b}\right)^c\right]$$

En la que  $a$  es el parámetro que define el origen de la función,  $b$  es el parámetro de escala,  $c$  es el parámetro de forma y  $x$  la variable de observación, como el diámetro normal o la edad. En el estudio, se han tenido en cuenta 2 parámetros de la función de Weibull ( $a=0$ ) con el programa estadístico Sigmaplot, usando el método de mayor probabilidad.

Donde,

$x$  = Diámetro a 1,3 m (DAP)

$x_0 ; y_0$  = parámetros iniciales del modelo

$a$  = Parámetro de origen.

$b$  = Parámetro de escala.

$c$  = Parámetro de forma

La interpretación del ajuste de modo numérico viene determinado por el valor del parámetro de forma  $c$ . Siguiendo la interpretación recogida en Chinsu Lin *et al.* (2007):

## **Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

► Si  $0 < c < 1$ , la distribución estudiada se aproxima a una exponencial negativa, indicando abundancia de individuos jóvenes (buen estado del regenerado).

► Si  $1 < c < 2,6$ , la distribución de Weibull está positivamente sesgada (la cola positiva es mayor que la negativa). La distribución positivamente sesgada de las clases diamétricas puede indicar una baja presencia de regenerado joven frente a una clase mediana dominante. Posibles problemas de regenerado o bien regeneración por golpes.

► Si  $2,6 < c < 3,7$ , el sesgo es próximo a cero, por lo que la distribución se aproxima a una normal. Distribución típica de una masa coetánea, ya sea generada por una repoblación o por una alteración mayor.

► Si  $c > 3,7$  la distribución estará negativamente sesgada, indicando un estado pobre de regeneración. Valores muy elevados de  $c$  pueden indicar un pobre ajuste de la distribución diamétrica a la distribución de Weibull, esto puede deberse a ser masas con un número muy parecido de individuos por clase diamétrica o distribuciones bimodales, en esos casos debería ajustarse otra función ya sea tipo lineal o Weibull de 5 parámetros.

### **3.2.4. Métodos dendrocronológicos**

#### **3.2.4.1. Toma de muestras**

Con la finalidad de obtener cronologías para valorar la potencialidad dendrocronológica de los bosques de *Pinus occidentalis*, y estudiar su edad, se diseñó un muestreo dendrocronológico. Se obtuvieron cilindros de madera o cores de 5 mm de diámetro mediante una Barrena Pressler (Haglölf, Suecia) de 30 cm de longitud para árboles de pequeño diámetro y de 60 cm para árboles de mayor diámetro. En cada árbol se extrajeron 1 ó 2 cores a la altura del pecho (aproximadamente a 1,30 m del suelo). Los árboles que fueron seleccionados para

el estudio dendrocronológico se georreferenciaron y codificaron de forma correlativa siguiendo el orden natural del muestreo, obteniéndose un total de 172 cores, de 86 árboles diferentes.

Las muestras se transportaron en “portacores de campo” y posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente en el laboratorio. Una vez secos los cores, se montaron en portacores, pegando los cores con cola blanca. Una vez establecidas, los cores fueron lijados gradualmente, utilizando para ello una lijadora rotativa de grano de 60 y de 120  $\mu$ . Tras el lijado gradual, se realizó un lijado manual con lija de grano 240, 400 y 600  $\mu$  hasta conseguir tener una superficie lisa y continúa, en la que poder apreciar las traqueidas de la madera y así poder medir con exactitud los anillos de crecimiento.

#### **3.2.4.2. Datación cruzada o sincronización**

Se realizó el conteo de anillos desde la corteza hasta la médula o hasta el último anillo apreciable mediante una lupa de 20x aumentos (Nikon SMZ-1, Japón) para poder apreciar los anillos con precisión. El muestreo se realizó en los meses de marzo y septiembre de 2015, por lo que se databa como último año de crecimiento el 2014.

Para la medición del ancho del anillo se utilizó el equipo LINTAB 4<sup>TM</sup> (*Digital linear positionable table*, Rinntech, Alemania) , que consiste en una bandeja que se desplaza en milésimas de milímetros a lo largo del tornillo micrométrico por medio de una polea manual. Este elemento se conecta a un equipo informático que dispone del programa de medición TSAP<sup>TM</sup> (Rinntech, Alemania). Se procedió a medir la anchura total del anillo con una precisión de centésima de milímetro. Los archivos obtenidos por TSAP fueron de la medida para el ancho del anillo (RW, *ring width*) en el denominado como formato Tucson.

Como último paso se comprobaron los posibles errores de datación y/o medición mediante el programa estadístico COFECHA (Holmes, 1983, Grissino-Mayer, 2001), que emplea técnicas de correlación para optimizar la relación anual de los anillos de crecimiento.

### **3.2.5. Variabilidad morfoanatómica**

La caracterización de la variación morfoanatómica de conos y acículas, entre y dentro de las poblaciones, se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA), y el análisis de componentes de la varianza, entre las diversas características morfométricas (foliares y conos) evaluadas. Los análisis de varianza se ajustaron a un modelo anidado de efectos mixtos (donde la localidad es un efecto fijo y los demás factores son aleatorios).

La variación entre poblaciones se describió utilizaron métodos de ordenamiento multivariados, para lo cual se estandarizaron las variables mediante la transformación  $\log_{10}(x)$  previo a la realización del Análisis de Componentes Principales (ACP) sobre una matriz de correlaciones, con el fin de reducir el número de variables. Sobre esta base, se seleccionaron sólo aquellas variables que ejercieron una mayor contribución a la variación detectada para efectuar un análisis de conglomerado jerárquico y un análisis factorial discriminante. Para el análisis de conglomerado, se empleó como índice de similitud la distancia euclidiana y el algoritmo de ligamiento de Ward, que calcula la varianza dentro de los conglomerados y la minimiza. Se realizó un análisis discriminante con el fin de obtener un menor número de variables o de componentes de la variación total que pudiesen ayudar a discriminar a las cinco poblaciones en estudio, y ubicar a los nuevos individuos en el grupo correcto, con una probabilidad mínima de clasificación errónea.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Descripción selvícola

La densidad de los individuos de *Pinus occidentalis* de  $D_n \geq 15$  cm varió entre 1100 pies  $ha^{-1}$  (Sierra de Nieba) y 2531 pies  $ha^{-1}$  (PN JAB y JCR) (Tabla 2), existiendo diferencias significativas entre las diferentes localidades ( $F=24,27$ ;  $P<0,001$ ). El diámetro normal de *Pinus occidentalis* en las cinco zonas estudiadas mostró también diferencias significativas entre ellas, siendo los valores promedios desde 66,7 (S<sup>a</sup> de Neiba) y 31,3 (Valle Nuevo) ( $F=50,59$ ;  $P<0,001$ ). Es importante reseñar los valores de área basimétrica de *P. occidentalis* ya que se encuentra entre 151 y los 385  $m^2 ha^{-1}$  ( $F=20,13$ ;  $P<0,001$ ).

**Tabla 2.** Estado selvícola de cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana

Localidad	Densidad (pies $ha^{-1}$ )	Diámetro (cm)	Altura (m)	Área basimétrica ( $m^2 ha^{-1}$ )
Valle nuevo	1893 ± 54b	31,31±0,008c	19,79±0,27c	151,56± 12,7c
PN José Armando Bermúdez	2531±43 a	33,85±0,09cb	22,26±0,54cb	227,12± 7,4 b
Sierra de Neiba	1100±158c	66,77±0,02 a	23,11±1,28b	385,42 ±5,6 a
Sierra de Bahoruco	1675±209b	35,40±0,01bc	22,48± 0,55b	167,23±6,9 bc
P N José del Carmen Ramírez	2531±43a	38,45±0,008b	26,31± 0,44a	303,61 ±9,6 a

#### 3.3.2. Estructura de clases diamétricas

La tendencia de *Pinus occidentalis* en todas las zonas es presentar individuos desde la clase diamétrica con  $D_n \geq 15$ , pero en una proporción muy baja, se observa que la mayor cantidad de pies aparecen a partir de la clase diamétrica de 20-25, cm con un incremento en la mayoría de los parques hasta la clase diamétrica superior a los 25 cm (**Fig. 2**). La zona de Neiba presenta la mayor

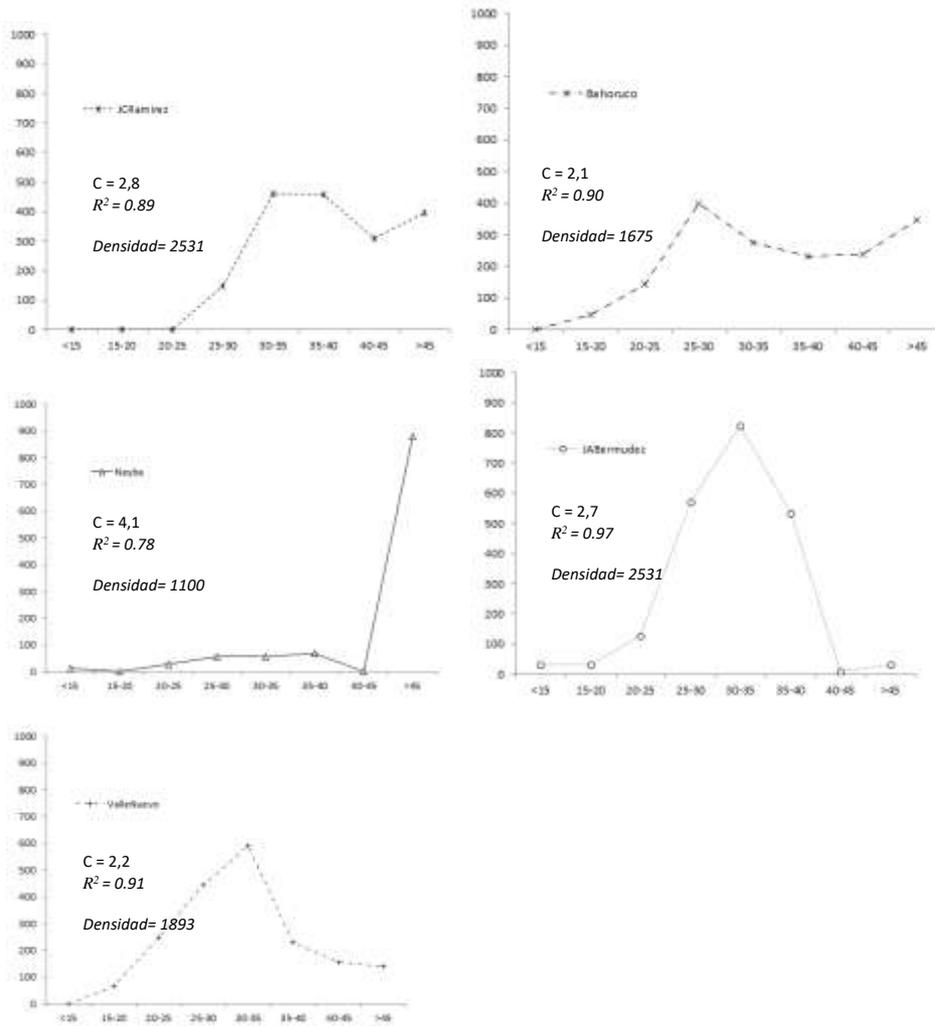
cantidad de individuos con  $D_n > 45$  cm, siendo PN Armando Bermúdez la que presenta menor cantidad de individuos en esta clase. En los PN José del Carmen Ramírez, Valle Nuevo y José del Carmen Ramírez se observa la mayor cantidad de individuos de la clase diamétrica de 30-35 cm, aunque existen un cierto número de pies de las clases diamétricas mayores (**Fig. 2**).

La escasa presencia de individuos jóvenes, y por tanto la ausencia de una buena regeneración de la especie, se confirma en los valores del coeficiente de forma de la distribución de Weibull. En tres de las cinco localidades estudiadas (PN JCR y JCN), el valor de  $c$  es ligeramente superior a 2,6, por lo que aparece una distribución de clases diamétricas con sesgo próximo a cero, por lo que la distribución se aproxima a una normal, lo que indica una tendencia a ser masas coetáneas. Por el contrario, la población de S<sup>a</sup> de Neiva, tiene un valor de  $c$  muy superior ( $c=4,1$ ), con lo que la distribución está muy sesgada negativamente, indicando un estado pobre de regeneración y un claro envejecimiento de la población. Solamente las poblaciones de S<sup>a</sup> de Bahoruco y Valle Nuevo presentan valores de  $c$  próximos a 2, lo que indica una mayor abundancia de individuos jóvenes, al menos en las clases juveniles.

### **3.3.3. Estructura de edad de poblaciones de *Pinus occidentalis***

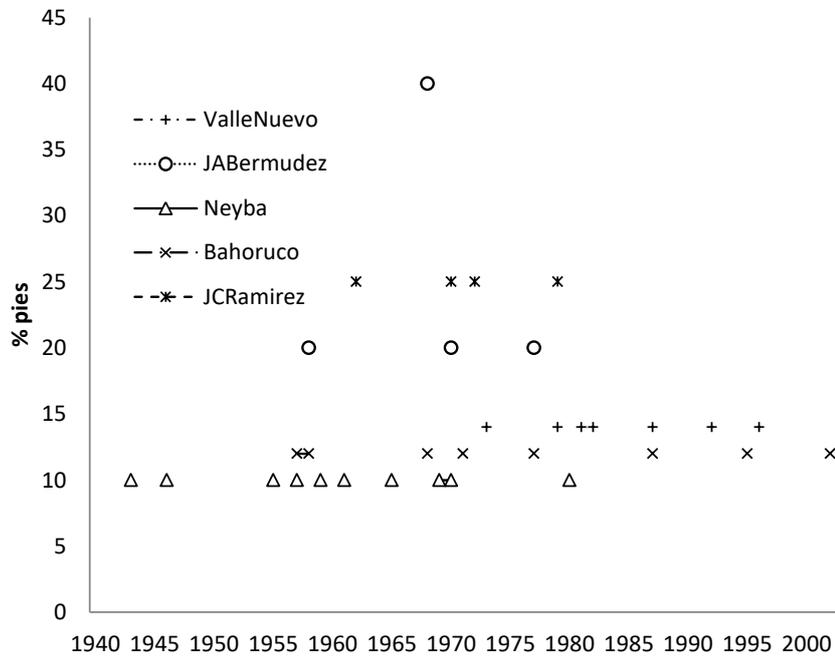
La datación de las muestras estudiadas ( $n=172$ ) y las observaciones realizadas en campo indican que existe una diferencia de edad dependiendo de la zona estudiada; con localizaciones con individuos viejos (**Fig. 3**, S<sup>a</sup> de Neiba), con áreas con individuos establecidos muy recientemente (Valle Nuevo). En la zona menos intervenida actualmente (S<sup>a</sup> de Neiba) los individuos se establecieron en la década de los 40 del siglo XX. Sin embargo, en la mayor parte de las localidades los árboles proceden de procesos de regeneración producidos en la década de los años 50. En la zona más antropizada (Valle Nuevo) la mayor parte de los pies se encuentran en las clases de edad 1970 en adelante. (**Fig. 3**).

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 2.** Distribución de Weibull de cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* de República Dominicana

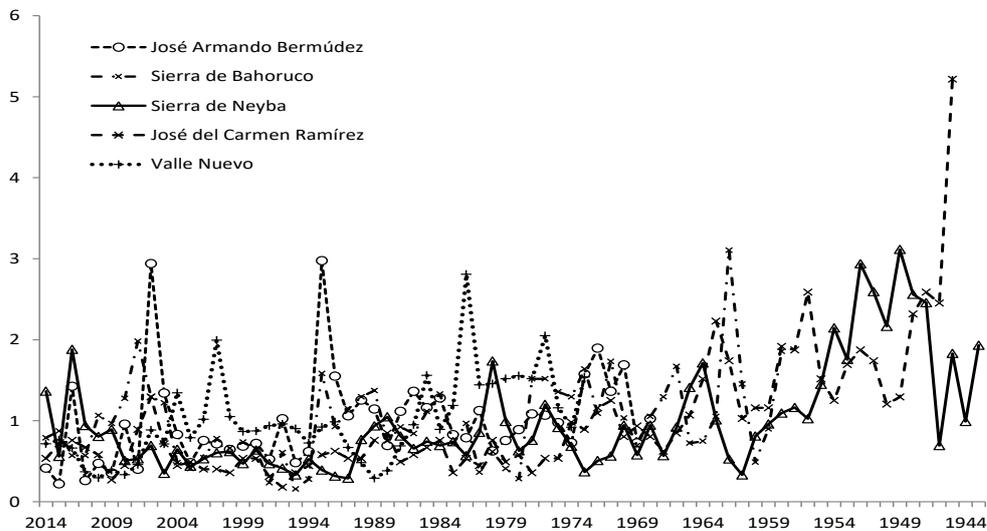
**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 3.** Distribución de individuos por edad de cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana

En la figura 4 se presenta la serie de crecimiento del pino de mayor edad de cada estación. En la localidad de Neiba se sitúa el individuo más antiguo de todos los estudiados, con una edad de 71 año (establecido en 1944).

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 4.** Anchura de la media de anillos (mm) del *Pinus occidentalis* más antiguos de cada localidad

**3.3.4. Análisis de la variación morfoanatómica.**

La longitud promedio de la acícula presentó resultados más elevados en Armando Bermúdez ( $171.11 \pm 1,72$  mm), Valle Nuevo ( $169.54 \pm 1,44$  mm) y Bahoruco ( $167.90 \pm 2,44$  mm), aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre ellos, pero sí con José del Carmen Ramírez ( $155.26 \pm 1,72$  mm) y Neiba ( $155.23 \pm 1,55$  mm) (Tabla 3). Por otra parte, las acículas de mayor grosor fue la de Valle Nuevo ( $0.70 \pm 0.032$  mm), sin diferencia significativa con la población de Neiba ( $0.62 \pm 0.007$  mm). Los valores más bajos se encontraron en Armando Bermúdez ( $0.30 \pm 0.003$  mm), José del Carmen Ramírez ( $0.25 \pm 0.002$  mm) y Bahoruco ( $0.27 \pm 0.007$  mm), no presentando diferencias significativas entre ellos (Tabla 3). El promedio del número de acículas por fascículos fue similar en todas las poblaciones, sin que hubiera diferencias significativas para cuatro zonas con valores entre 3.84 y 3.99, exceptuando a Bahoruco ( $3.32 \pm 0.06$ ) que presentó diferencias significativas con el resto de las áreas.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Existieron diferencias significativas para todos los caracteres de conos evaluados a nivel de población en los análisis de varianzas efectuados (Tabla 4). El peso del cono en las zona de Bahoruco ( $21.93 \pm 0.62$  g) presentó diferencias significativas con respecto al resto de las zonas, que tuvieron valores comprendidos entre 30.96 (S<sup>a</sup> de Neiba) hasta 32.23 (PN JAB). En la longitud de los conos se obtuvieron valores similares, sin diferencias significativas para las zonas de Armando Bermúdez ( $60.52 \pm 1.44$  mm), José del Carmen Ramírez ( $60.30 \pm 1.35$  mm) y Valle Nuevo ( $60.14 \pm 1.05$  mm), pero éstas a su vez tuvieron diferencias significativas con las zonas de Bahoruco ( $49.10 \pm 1.37$  mm) y Neiba ( $51.13 \pm 1.62$  mm). El diámetro de la base del cono fue la variable con mayor diferencia entre las zonas, Armando Bermúdez ( $28.67 \pm 0.45$  mm) presentó diferencias significativas con el resto de las zonas de estudio, siendo la de menor valor la zona de Neiba ( $22.80 \pm 0.45$  mm) quién a su vez presento diferencias significativas con las otras áreas. En el diámetro del ápice del cono fueron las zonas de Armando Bermúdez ( $15.83 \pm 0.39$  g) y José del Carmen Ramírez ( $14.80 \pm 0.30$  mm) las que obtuvieron mayores valores, presentando diferencias significativas con el resto de las áreas Valle Nuevo ( $13.06 \pm 0.32$  mm), Bahoruco ( $12.47 \pm 0.41$  mm) y Neiba ( $11.84 \pm 0.41$  mm). En particular, las variables longitud de los conos y diámetro de la base las variables que presentaron los mayores porcentajes de variación entre poblaciones (Tabla 4).

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Tabla 3.** Variación morfométrica y componentes de varianza de los caracteres foliares evaluados en cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana. Media  $\pm$  error estándar.

Localidad	Número de acículas	Longitud (mm)	Grosor (mm)
Parque Nacional Armando Bermúdez	3,85 $\pm$ 0,07 a	171,11 $\pm$ 1,72 a	0,30 $\pm$ 0,003 bc
Parque Nacional José del Carmen Ramírez	3,84 $\pm$ 0,07 a	155,26 $\pm$ 1,42 b	0,25 $\pm$ 0,002 c
Valle Nuevo	3,99 $\pm$ 0,07 a	155,23 $\pm$ 1,55 ba	0,62 $\pm$ 0,007 a
Sierra de Bahoruco	3,32 $\pm$ 0,06 b	167,90 $\pm$ 2,24 a	0,27 $\pm$ 0,007 c
Sierra de Neiba	3,86 $\pm$ 0,10 a	169,54 $\pm$ 1,44	0,70 $\pm$ 0,032 a b

**Tabla 4.** Variación morfométrica y componentes de varianza de los caracteres de los conos evaluados en cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana. Media  $\pm$  error estándar.

Localidad	Peso (g)	Longitud (mm)	Diámetro de la base (mm)	Diámetro del ápice (mm)
Parque Nacional Armando Bermúdez	32,23 $\pm$ 0,89 a	60,52 $\pm$ 1,44 a	28,67 $\pm$ 0,45 a	15,83 $\pm$ 0,39 a
Parque Nacional José del Carmen Ramírez	31,37 $\pm$ 1,11 a	60,30 $\pm$ 1,35 a	26,87 $\pm$ 0,40 b	14,80 $\pm$ 0,30 a
Valle Nuevo	31,20 $\pm$ 1,21 a	60,14 $\pm$ 1,05 a	25,81 $\pm$ 0,48 bc	13,06 $\pm$ 0,32 b
Sierra de Bahoruco	21,93 $\pm$ 0,62 b	49,10 $\pm$ 1,37 b	24,81 $\pm$ 0,46 c	12,47 $\pm$ 0,41 b
Sierra de Neiba	30,96 $\pm$ 0,87 a	51,13 $\pm$ 1,62 b	22,28 $\pm$ 0,45 d	11,84 $\pm$ 0,41 b

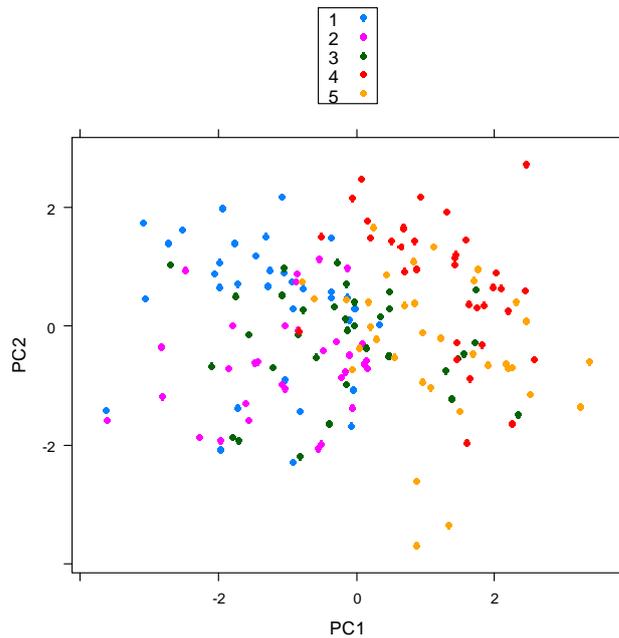
Los resultados del análisis de componentes principales efectuado a la matriz de datos, mostró que los dos primeros componentes explicaron el 80,9% de la variación en los datos, lo que indica que se trata de una ordenación confiable (Tabla 5, Fig. 5). La distribución espacial de los árboles de ambas poblaciones en base a dichos dos primeros componentes conformaron cuatro grupos (Fig. 5). Un

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

primero grupo diferenció, en los extremos de variación, al 61,7 y al 100% de los árboles pertenecientes a las poblaciones S<sup>a</sup> de Bahoruco y Valle Nuevo respectivamente. Un segundo grupo resultó más heterogéneo y estuvo conformado por el 80% y 91,7% de los individuos de las poblaciones JAB y JCR. Los árboles de los grupos 3, conformados en su mayoría por arboles de la población de S<sup>a</sup> de Neiba, se caracterizaron por presentar en general valores más elevados sobre todo para las características foliares y de cono evaluadas.

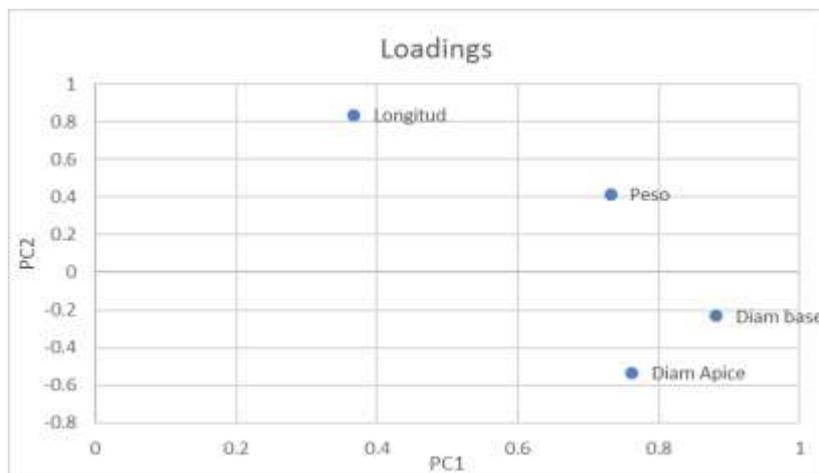
En la Figura 6 se puede apreciar la distribución espacial de las variables examinadas en el plano conformadas por los dos primeros componentes, que fueron las que explicaron el mayor porcentaje de la variación detectada. El análisis de la contribución de las variables evaluadas a la formación de los dos primeros componentes mostró que las variables asociadas con las características del cono (peso y diámetros) fueron las que más contribuyeron a la formación del primer componente. El segundo componente explicó el 30% de la varianza total. La variable con mayor peso a la formación del segundo componente fue la longitud de la acícula.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 5.** Distribución de los individuos analizados sobre la base de los dos primeros componentes principales (CP I y II) de cinco poblaciones de *P. occidentalis* en República Dominicana. Cada símbolo representa al menos un individuo.

Población 1=PN Armando Bermúdez, Población 2=PN José del Carmen Ramírez, Población 3=S<sup>a</sup> de Neiba; Población 4=S<sup>a</sup> de Bahoruco; Población 5=PN Valle Nuevo.



**Figura 6.** Distribución de las variables morfoanatómica principales sobre la base de los dos primeros componentes principales (CP I y II) de cinco poblaciones de *P. occidentalis* en República Dominicana.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Tabla 5.** Variación morfométrica y componentes de varianza de los caracteres de los conos evaluados en cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana.

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,028	50,702	50,702	2,028	50,702	50,702
2	1,208	30,204	80,906	1,208	30,204	80,906
3	,494	12,349	93,256			
4	,270	6,744	100,000			

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

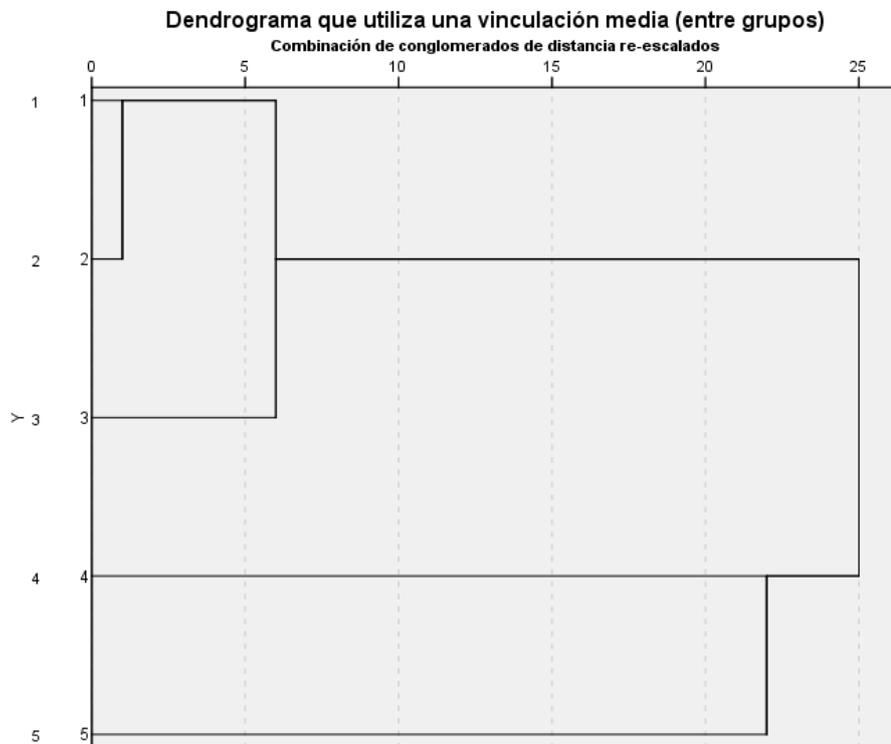
Población 1=PN Armando Bermúdez, Población 2=PN José del Carmen Ramírez, Población 3=S<sup>a</sup> de Neiba; Población 4=S<sup>a</sup> de Bahoruco; Población 5=PN Valle Nuevo.

**Tabla 6.** Matriz de componentes Variación morfométrica y componentes de varianza de los caracteres de los conos evaluados en cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana.

	Componente	
	1	2
Peso (gramos)	,732	,415
Longitud (mm)	,367	,835
Diámetro de la base (mm)	,882	-,232
Diámetro del ápice (mm)	,761	-,534

Estos resultados concordaron con lo obtenido del análisis de conglomerado efectuado con las variables que más contribuyeron a la formación de los dos primeros componentes principales. El dendrograma permitió clasificar a los individuos evaluados en tres grupos pero, al igual que lo obtenido en el análisis de componentes principales, no se apreció una clara diferenciación morfológica de los arboles evaluados por población (Fig. 7). El grupo I agrupó a los individuos de las poblaciones JAB, JCR y S<sup>a</sup> de Neiba, mientras que el grupo II, estuvo conformado por los individuos de la población de S<sup>a</sup> de Bahoruco y, por último, se diferenció un grupo III, correspondiente a la población de Valle Nuevo.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 7.** Dendrograma resultante del análisis conglomerado de cinco poblaciones de *P. occidentalis* en República Dominicana.

Población 1=PN Armando Bermúdez, Población 2=PN José del Carmen Ramírez, Población 3=S<sup>a</sup> de Neiba; Población 4=S<sup>a</sup> de Bahoruco; Población 5=PN Valle Nuevo.

De acuerdo con estos resultados la variable longitud del cono (LC) fue la más importante, por su mayor valor de lambda de Wilks. De acuerdo con estos resultados, los árboles de Armando Bermúdez presentaron valores relativamente más elevados para esta variable ( $60,52 \pm 1,44$ ). Sobre esta base se determinó que aproximadamente el 80% de los árboles evaluados fueron clasificados correctamente. Los patrones de variación morfológica encontrados en los análisis de componentes principales y de conglomerados convergieron en la existencia de variación continua en las características morfológicas evaluadas. Esto no permitió la clara diferenciación fenotípica entre las poblaciones, pero sí entre árboles dentro de las poblaciones.

### **3.4. Discusión**

En este trabajo se estudia la estructura y la dinámica de bosques de *Pinus occidentalis* en poblaciones naturales conservadas al interior de la Red de Parques Nacionales, lo que contribuye a describir la situación de las poblaciones, conocer los mecanismos ecológicos asociados a su dinámica natural y a identificar poblaciones con potencial para la caracterización, catalogación y conservación de los recursos genéticos de la especie en la República Dominicana (Oliver y Larson, 1990). El estudio realizado en este Capítulo muestra que la obtención de datos forestales y anatómicos sigue siendo una buena alternativa para poder entender la estructura y la variabilidad fenotípica de poblaciones naturales de especies de coníferas de montaña.

#### **3.4.1. Características de la estructura de la masa forestal**

El análisis de las masas forestales constituidas por poblaciones puras de *P. occidentalis* indica que ésta es la principal especie de los bosques de montaña de la República Dominicana. Granados et al. (2015) estudiaron la estructura poblacional de las comunidades de *Pinus cembroides* subsp. *orizabensis*, en situaciones ecológicas similares y realizaron el inventario florístico y estructural de los bosques de pino piñonero de la Cuenca Oriental, cuyo dosel domina el taxón antes referido y observaron los diversos factores que afectan el desarrollo de la especie, sugiriendo esto que probablemente *P. occidentalis* se establece como una densa cohorte, tras sufrir algún tipo de perturbación (por ejemplo la explotación forestal o un incendio), al favorecer los procesos de regeneración, dado el temperamento de luz de la especie. A la misma conclusión llegó Khatouri (1990), afirmando que los pinares tropicales poseen una estructura diversa e irregular provocada por las grandes presiones de cortas realizadas durante siglos, y que como consecuencia han hecho que el bosque constituido principalmente por

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

*P. occidentalis* como especie dominante disminuya, así como su área de distribución.

Actualmente, el número de individuos adultos de *P. occidentalis* en las zonas de altitud media o baja es aparentemente mayor que en la zona de mayor altitud. Las poblaciones localizadas al límite de distribución presentan menos individuos y muy envejecidos, los cuales tienen una regeneración muy pobre (muy poco árboles de  $D_n < 30$  cm). Por el contrario, las poblaciones basales muestran un mejor estado de regeneración, por lo que esta especie podría llegar a ser la especie dominante en estos bosques si no ocurrieran perturbaciones. Todo esto concuerda con lo estudiado para otros pinos caribeños y centro americanos, donde se afirma que las especies de este género presentan una disminución de las clases diamétricas pequeñas ( $< 15$  cm); pero con posible tendencias a su expansión en algunas localidades (Piedra, 2012).

La dinámica de las poblaciones de *P. occidentalis* es un tema prácticamente sin antecedentes científicos, así como el efecto de las medidas de conservación en los cambios estructurales. Sin embargo, hay muchos debates sobre el grado de perturbación necesario para mantener las poblaciones de especies del género *Pinus* en los bosques, así como de los mecanismos ecológicos implicados (Sánchez-González, 2008). Este estudio mostró que algunas especies mejicanas, de ecología afín al *P. occidentalis*, tienen algunas limitaciones para establecerse en zonas de alta montaña independientemente del modelo de gestión, aunque la densidad de individuos juveniles es más pequeña de la observadas en otro trabajos. Por el contrario, la mayor densidad de juveniles en las poblaciones basales puede reflejar la capacidad de *P. occidentalis* para expandir su área de distribución en bosques climáticamente más favorables. Sin embargo, todas las zonas de estudio presentan una baja densidad de juveniles, lo que podría indicar que *P. occidentalis* presenta problemas de regenerando en su área natural de distribución en República Dominicana.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

La poca capacidad de *P. occidentalis* para establecerse y crecer en los bosques no intervenidos sugiere que el fracaso de regeneración podría depender de factores que controlan el crecimiento de la especie, como son los recursos del suelo, la radiación, o la temperatura; o también el proceso de germinación y la mortalidad de semillas (Vilchis y Trejo, 2007). Dado que la densidad de individuos juveniles es baja, el establecimiento de la regeneración aparece ser un problema antiguo. El resultado puede ser un estrangulamiento del proceso de regeneración, ya que se dificulta la existencia de poblaciones adultas en estas zonas. Una de las causas puede ser la ausencia de semillas, e indirectamente la falta de reclutamiento de nuevas plántulas, lo cual ha sido observado en otros pinares (Aragón et al., 2010). La baja cantidad de semillas y plántulas en las masas estudiadas podrían reflejar una perturbación local como la erosión genética o de carácter regional como es el cambio climático. Actualmente las formaciones de pinar de la República Dominicana se encuentran muy degradadas, siendo esto una consecuencia del uso indiscriminado e irregular de los bosques, que como resultado ha reducido la superficie de bosques a zonas inaccesibles (Chardón, 1941; Guerrero et al., 2002). Lo anterior se une a una fuerte presión antrópica sobre los árboles a través de las prácticas abusivas de cortas ilegales, provocando la muerte de individuos *P. occidentalis*. El resultado de estos procesos es la existencia de pocos individuos jóvenes, y abundantes individuos de gran tamaño, a veces muy envejecidos, lo que justifica la tendencia de distribución del tamaño mostrada en otros pinares en la región del Caribe (Sánchez-González, 2008), y que está asociada a los cambios de la población durante el desarrollo de la masa, incluyendo una la mortalidad o desaparición de semillas y plántulas. Estos resultados coinciden con las estrategias de regeneración de *P. occidentalis*, y los modelos dinámicos propuestos para los bosques de coníferas de montaña (Pelt y Frankling, 2000; Souza, 2007).

El análisis de las distribuciones diamétricas permite inferir el estado demográfico de una población forestal, y de sus posibles problemas de

conservación. El estudio de los parámetros de forma de Weibull para *P. occidentalis* mostró que las poblaciones de esta especie presentan distribución sesgadas ( $c > 2.0$ ), y un mal estado de regeneración en todas las localidades. Los resultados obtenidos para los bosques de República Dominicana concuerdan con los observados por Sánchez-González (2008), donde la distribución diamétrica en bosques de *Pinus* sp presentaba una tendencia sesgada positiva respecto al tiempo y con una presencia reducida de las clases diamétricas inferiores como consecuencia de las dificultades que tiene *P. occidentalis* para regenerarse. Sin embargo, en el caso de otras poblaciones de *Pinus* centroamericanos, en masas relativamente bien conservadas y a una altitud superior a 1600 m, éstas presentaron una distribución con una mayor proporción (50%) de las clases diamétricas más pequeña (7-15 cm), una disminución paulatina de las siguientes clases y una ausencia casi absoluta de individuos con más de 50 cm de diámetro. Esta discrepancia puede ser razonable, ya que según Camacho y González-Espinosa (2002) estos pies representan formaciones jóvenes en fase de recuperación después de las talas intensivas que tuvieron lugar a mediados del último siglo. Los procesos de expansión de las formaciones de pinar en áreas sin perturbaciones graves es un proceso que se ha observado a partir de estudios de cambio de vegetación realizados mediante observaciones de satélite y de campo.

Es posible que las formaciones puras de *P. occidentalis* se caracterizan por mantener un equilibrio estable en ausencia de perturbaciones, tal y como ocurre con otras coníferas de montaña, sugiriendo así que los bosques con grandes individuos de *P. occidentalis* y con estructura de masa irregular son los mejores conservados, tal y como se observa también en este trabajo. Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir que las masas mejor conservadas de pino criollo presentan un buen estado de equilibrio a una densidad óptima entre los 1500-2000 pies ha<sup>-1</sup>.

### **3.4.2. Estructura de la edad**

El paso fundamental de la dendrocronología es la datación. De ella depende en gran medida la calidad de los resultados y es un proceso no exento de errores, debido a que carece de una metodología aplicable de forma sistemática. Investigaciones basadas en la dendrocronología han mostrado la utilidad del *P. occidentalis* para estudios dendrocronológicos, incluyendo el estudio de series temporales largas (Speer et al., 2004).

### **3.4.3. Análisis de la variación morfoanatómica.**

El largo promedio de la acícula mayor fue de 15 cm en todas las poblaciones. Estos valores resultan similares, e incluso un poco superiores, a lo reportado por Niniz (2005) para la especie en la población de pinos mejicanos. Este autor informó valores de 11 a 16 cm, similar a lo señalado por Martínez (1948) y Farjon y Styles (1997) para las especies centroamericanas de *Pinus* (de 5 a 22 cm).

El cuanto al peso del cono promedio fue de 30 g, valor cercano muy inferior a los 54,19 g que informaron Musálem y Solís (2000) para otras especies de pinos análogos. La longitud promedio de cono fue de 5,5 cm, también menor a los reportados por Niniz (2005) para pinos mejicanos (valores entre 8,3 y 11 cm). Sin embargo está más próximo al rango determinado para estas especies por Martínez (1948), Farjon y Styles (1997) y Perry (1991) (de 7 a 14 cm). El ancho de la base del cono promedio fue de 2,5 cm, y el ancho promedio del ápice del cono fue de 1,4 cm. Niniz (2005) informó un ancho de cono que varió entre 3,4 y 4,0 cm. De acuerdo con estos resultados se observó un mayor componente de variación entre árboles dentro de poblaciones para los caracteres morfoanatómicos. Se ha indicado que características como longitud de los conos se encuentran bajo un control genético relativamente elevado (Stoehr y Farmer,

1986). En particular, la variable longitud de los conos fue la que presentó el mayor porcentaje de variación entre poblaciones.

Los resultados del análisis de componentes principales efectuado a la matriz de datos morfológicos determinadas por las 7 variables morfométricas revelaron que los tres primeros componentes explicaron el 80% de la variación en los datos, lo que indica que se trata de una ordenación confiable. El análisis de la contribución de las variables evaluadas a la formación de los tres primeros componentes mostró que las variables asociadas con las características del cono (peso y diámetros) fueron las que más contribuyeron a la formación del primer componente. El segundo componente explicó el 30% de la varianza total. La variable con mayor peso a la formación del segundo componente fue la variable longitud de acícula.

La distribución espacial de los árboles de las poblaciones en base a dichos dos primeros componentes conformaron tres grupos. Un primero grupo diferenció, en los extremos de variación, al 61,7 y al 100% de los árboles pertenecientes a las poblaciones S<sup>a</sup> de Bahoruco y Valle Nuevo respectivamente. Un segundo grupo resultó más heterogéneo y estuvo conformado por el 80% y 91,7% de los individuos de las poblaciones JAB y JCR. Los árboles de los grupos 3, conformados en su mayoría por arboles de la población de S<sup>a</sup> de Neiba, se caracterizaron por presentar en general valores más elevados sobre todo para las características foliares y de cono evaluadas.

Estos resultados concordaron con lo obtenido del análisis de conglomerado efectuado con las variables que más contribuyeron a la formación de los dos primeros componentes principales. El dendrograma permitió clasificar a los individuos evaluados en tres grupos pero, muy similares a los obtenidos en el análisis de componentes principales. El dendrograma permitió clasificar a los individuos evaluados en tres grupos pero, al igual que lo obtenido en el análisis de componentes principales, no se apreció una clara diferenciación morfológica de los arboles evaluados por población (Fig. 7). El grupo I agrupó a los individuos de

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

las poblaciones JAB, JCR y S<sup>a</sup> de Neiba, mientras que el grupo II, estuvo conformado por los individuos de la población de S<sup>a</sup> de Bahoruco y, por último, se diferenció un grupo III, correspondiente a la población de Valle Nuevo.

Las mediciones morfométricas han sido ampliamente usadas en la discriminación de poblaciones de diferentes especies de coníferas. Los patrones de variación morfológica encontrados en los análisis de componentes principales y de conglomerados convergieron en la existencia de variación continua en las características morfológicas evaluadas. Esto permitió la clara diferenciación fenotípica de las poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana. Estos resultados concuerdan con lo indicado por diversos autores en cuanto a que una gran parte de la fracción de la variación fenotípica de los caracteres examinados en coníferas, se encuentra entre árboles dentro de las poblaciones (López et al., 1993; Beaulieu y Simon, 1994). Los pinos pueden presentar una amplia variación genética intrapoblacional, debido en parte a que presentan un largo ciclo de vida y un tipo de polinización anemógama (Ledig, 2000). Los resultados de los análisis univariados y multivariados proporcionaron evidencia congruente de la existencia de una heterogeneidad morfológica intraespecífica en las cinco poblaciones de *P. occidentalis* en estudio. Como se sabe, la variación morfológica de una especie vegetal está íntimamente ligada a las condiciones medioambientales que prevalecen en el ciclo de vida de la misma. La estrecha relación planta-medio ambiente marca la importancia que las plantas posean una suficiente flexibilidad de desarrollo o resistencia a disturbios para existir en las condiciones donde se ubican (Stebbins, 1950). En este estudio se muestra la posible existencia de ecotipos en las poblaciones naturales de *P. occidentalis* en República Dominicana basadas en los mayores valores de características morfológicas, como el peso o diámetro del cono.

El origen, el nivel y la estructura de la diversidad fenotípica observada es el resultado de diversos factores genético-ambientales. Es posible que la variación detectada en la forma de los conos de los árboles evaluados en las cinco

poblaciones estudiadas resulte de la expresión de la plasticidad fenotípica debido a las condiciones microambientales experimentadas por cada árbol. Sin embargo, también es posible que dicha variación sea el resultado de diferencias genotípicas entre individuos. Es muy posible además que la presencia de una sola variable discriminatoria significativa entre las cinco poblaciones analizadas pueda ser indicativa de la presencia de un aislamiento parcial entre las poblaciones. Al respecto, los resultados del análisis discriminante revelaron la existencia de diferenciación fenotípica de las cinco poblaciones analizadas lo que podría estar relacionado con las características ambientales de dichas poblaciones. Como en este trabajo no se incluyeron en el análisis datos ambientales de las poblaciones, no es posible confirmar si la variación detectada estuvo asociada con alguna condición ambiental en particular.

Las investigaciones realizadas en los Capítulos 4 y 5 de esta tesis, empleando marcadores moleculares servirán para sustentar estos hallazgos. El conocimiento de la variación fenotípica y genotípica de una especie es un prerrequisito para conservarla. Aunque *P. occidentalis* no se encuentra aun oficialmente en la condición de amenazado, se requieren de estudios que permitan establecer estrategias eficientes de conservación de esta especie.

#### **3.4.4. Implicaciones para la gestión y sugerencias para futuras investigaciones**

La situación actual de las poblaciones de *P. occidentalis* requiere de una adecuada planificación de las acciones de conservación y gestión que garanticen la persistencia de sus poblaciones en RD. En ese sentido, el estudio de los bosques de pino criollo en cinco Parques Nacionales ilustra que la situación poblaciones de cada localidad pueden provocar cambios en la estructura y en la dinámica del tamaño de la población, y en los procesos de la dinámica de regeneración de estas poblaciones. Este estudio muestra que *P. occidentalis* es capaz de prosperar en condiciones de baja presión antrópica, aunque la falta de juveniles parece indicar

un problema en la regeneración de ésta especie. Con el objetivo de investigar el posible mecanismo asociado a esta situación, sería interesante completar y ampliar los estudios ecológicos en más poblaciones de la especie, con diferentes niveles de gestión y con distintos niveles de perturbación. En los PN estudiados se ha mostrado que la ausencia de intervención por medio de áreas excluidas, con presencia de fuentes semilleras y de fustales altos de otras especies, podría dar lugar a una tendencia a la recuperación de las poblaciones.

El aprovechamiento histórico de la madera, el carbón, el sobrepastoreo y los cultivos han causado seguramente la extinción local de muchas poblaciones de la especie en RD, originando una pérdida de la diversidad genética de la especie.

Sin embargo, a pesar de la deforestación y de la sobreexplotación todavía se pueden valorar ciertas áreas a preservar, como son las poblaciones relictas existentes en los Parques Nacionales o en bosques propiedad del Estado.

Por ello, y para poder seguir valorando estos bosques naturales se debe conseguir una adecuada caracterización y catalogación de los materiales de base de la especie en la RD, lo cual supone el estudio de la variabilidad genética relacionada con varios factores ambientales, así como la propia biología reproductiva de la especie (fructificación, la diseminación, la germinación, y el establecimiento de la plántula). Se debe poner especial atención a las zonas más sensibles al cambio climático (Capítulo 2) y a las poblaciones presentes en áreas de mayor contraste ambiental (Capítulo 2).

### ***3.5. Bibliografía***

Arriaga, L. y Gómez, L. (2004). Posibles efectos del cambio climático en algunos componentes de la biodiversidad de México. En: Martínez, J. y Fernández-Bremauntz (comps.) pp. 255-265. Cambio Climático: una Visión desde México. Instituto Nacional de Ecología. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F. 525 p.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Beaulieu, J. y J.-P. Simon (1994). Genetic structure and variability in *Pinus strobus* in Quebec. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1726-1733.

Bueno López, Santiago W., Bevilacqua, Eddie. (2011). Desarrollando un sistema de predicción de distribuciones diamétricas para *Pinus occidentalis*, Sw. en la sierra, República Dominicana. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 17(1), 115-132.

Bueno-López, S.W. y Bevilacqua, E. (2012). Nonlinear mixed model approaches to estimating merchantable bole volume for *Pinus occidentalis*. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 5(5), 247.

Callaham, R.Z. (1964). Investigación de procedencias; estudio de la diversidad genética asociada a la Geografía. *UNASYLVA* 18: 40-50.

Darrow, W.K., Zanoni, T. (1990). Españolan pine (*Pinus occidentalis* Swartz) a little known sub-tropical pine of economic potential. *The Commonwealth Forestry Review*, 133-146.

Darrow, W.K. y Zanoni, T.A. (1993). El pino del La Espanola (*Pinus occidentalis* Swartz): un pino subtropical poco conocido de potencial economico. *Moscosoa*, 7, 15-37.

Farjon, A. y Styles, B.T. (1997). *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotrópica. Monograph* 75. New York Botanical Garden, N.Y. 291 p.

Guerrero, J. M., Bueno-López, S., Gilberto-Torres, J. (2001). Ecuación para el cálculo del volumen del árbol para *Pinus occidentalis* Sw., en el Plan Sierra, República Dominicana. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 7(1), 49-53.

Iglesias, A.L.G. y Tivo F. (2006). Variación morfométrica de la población de *P.hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México. *Ra-Ximhai* 2: 449-468.

Iglesias, A.L.G. y Luna M.R. (2008). Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México. *Ecosistemas* 17: 115-122.

Kennedy, L.M., Horn, S.P. (2008), Postfire Vegetation Recovery in Highland Pine Forests of the Dominican Republic. *Biotropica*, 40: 412-421.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

- Klotz, V.W. (1991). Comportamiento del Pinus Occidentalis SW. en la zona de Moncion, la Celestina y San Jose de las Matas (No. C023. 023). Plan Sierra. Servicio Aleman de Cooperación Social-Técnica.
- Lauer, W. (1978). Timberline studies in central Mexico. Arctic Alpine Research 10: 383-396.
- Ledig, F.T. (2000). Genetic variation in Pinus. En: Richardson, D.M. (ed.), pp. 251-280. Ecology and Biogeography of Pinus. Cambridge University Press. Cambridge. 527 p.
- López, U.J.J., Jasso, J.J. Vargas y Ayala, J.C. (1993). Variación de características morfológicas en conos y semillas de Pinus greggii. Agrociencia. Serie Recursos Naturales Renovables 3: 81-95.
- Martin, P.H., Sherman, R.E., Fahey, T.J. (2007), Tropical montane forest ecotones: climate gradients, natural disturbance, and vegetation zonation in the Cordillera Central, Dominican Republic. Journal of Biogeography, 34: 1792-1806.
- Martínez, M. (1948). Los Pinos Mexicanos. Ediciones Botas. México, D.F. 361 p.
- Navarro-Cerrillo, R.M., Agote, N., Pizarro, F., Ceacero C.J., Palacios, G. (2013). Elements for a non-detriment finding of Cedrela spp. in Bolivia—a CITES implementation case study. Journal for Nature Conservation, 21:241-252
- Pérez Santana, M.H., Jiménez, A. y Torres, J.G. (2000). Programa de mejoramiento genético: caso Pinus occidentalis Swartz. Memorias. In 2. Simposio sobre Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina (No. CATIE 634.9562063 S612m 1999). CATIE, Turrialba (Costa Rica).
- Perry, J.P. (1991). The Pine of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 221 p.
- Steel, R.G., Dickey, J.H. (1997). Pinciples and procedures of statistics a biometrical approach (No. 519.5 S8).
- Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. (1988). Bioestadística: Principios y Procedimientos. Primera edición. McGraw-Hill. México. 422 p.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Stoehr, M.U. y R.E. Farmer (1986). Genetic and environmental variance in cone size, seed yield, and germination properties of black spruce clones. *Canadian Journal of Forest Research* 16: 1149-1151.

Villers, L. y I. Trejo (2004). Evaluación de la vulnerabilidad en los ecosistemas forestales. En: Martínez, J. y Fernández-Bremauntz (comps.), pp. 239-254. *Cambio Climático: una Visión desde México*. Instituto Nacional de Ecología. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F. 525 p.

Viveros-Viveros, H., C. Saénz-Romero, J.J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, G. Ramírez-Valverde y A. Santacruz-Varela (2009). Altitudinal genetic variation in *Pinus hartwegii* Lindl.: I. Height growth, shoot phenology and cold damage in seedlings. *Forest Ecology and Management* 257: 836-842.

Viveros-Viveros, H., B.L. Tapia-Olivares, C. Saenz-Romero, J.J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, A. Santacruz-Varela y G. Ramírez-Valverde (2010). Variación isoenzimática de *Pinus hartwegii* Lindl. en un gradiente altitudinal en Michoacán, México. *Agrociencia* 44: 723-733.

Williams, C.G. y O. Savolainen (1996). Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. *Forest Science* 42: 102-117.

Granados Victorino, R. L., Granados Sánchez, D., Sánchez-González, A. (2015). Caracterización y ordenación de los bosques de pino piñonero (*Pinus cembroides* subsp. *orizabensis*) de la Cuenca Oriental (Puebla, Tlaxcala y Veracruz). *Madera y bosques*, 21(2), 23-43.

Liogier, A. H. (1981). *Flora of Española* (Vol. 3). HN Moldenke and AL Moldenke.

Piedra, T. E. (2012). Clima y distribución del género *Pinus* en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(38).

Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y bosques*, 14(1), 107-120.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Vilchis, V. V., Trejo, D. A. R. (2007). Supervivencia e incremento en altura de *Pinus hartwegii* a dos años de quemas prescritas e incendios experimentales. *Agrociencia*, 41(2), 219-230.

Aragón-Piña, E. E., Garza-Herrera, A., González-Elizondo, M. S., Luna-Vega, I. (2010). Composición y estructura de las comunidades vegetales del rancho El Duranguense, en la Sierra Madre Occidental, Durango, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 81(3), 771-787.

Chardón, C. E. (1941). Los pinares de la Republica Dominicana.

Guerrero, Á., Ramírez, N., Veloz, A., & Peguero, B. (2002). Vegetación y flora del Parque Nacional Juan Bautista Pérez Rancier (Valle Nuevo). Evaluación ecológica integrada: Parque Nacional Juan Bautista Pérez Rancier (Valle Nuevo), Republica Dominicana, 34-56.

Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y bosques*, 14(1), 107-120.

Camacho Cruz, A., & González Espinosa, M. (2002). Establecimiento temprano de árboles nativos en bosques perturbados de Los Altos de Chiapas, Méjico.

Speer, J. H., Orvis, K. H., Grissino-Mayer, H. D., Kennedy, L. M., & Horn, S. P. (2004). Assessing the dendrochronological potential of *Pinus occidentalis* Swartz in the Cordillera Central of the Dominican Republic. *The Holocene*, 14(4), 563-569.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Capítulo 4. Estructura y diversidad genética, mediante marcadores moleculares de microsatélites en poblaciones naturales de *Pinus occidentalis* Swartz. de la República Dominicana.**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

#### **4.1. Introducción.**

República Dominicana es un país con un extraordinario patrimonio forestal y faunístico, con una biodiversidad casi única en la región caribeña, tanto en términos cuantitativos como cualitativos. La superficie forestal abarca aproximadamente 1.6 millones de hectáreas, lo cual corresponde al 32.89% de la superficie nacional. Esta superficie se reparte de la siguiente manera: 478,100 ha de bosque nativo dentro de las áreas protegidas, aproximadamente 1.000,000 ha de bosque nativo fuera de las áreas protegidas y algo más de 100,000 ha de plantaciones artificiales. El bosque nativo se reparte en formaciones forestales muy diversas y diferenciadas: 9.6% de bosque latifoliado húmedo, 9.2% de bosque seco, 5.35% de bosque conífero denso y 0.75% de bosque conífero abierto, 4.5% de matorral latifoliado húmedo, 4.2% de bosque latifoliado semihúmedo, 3.3% de bosque latifoliado nublado. El Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SINAP) de la República Dominicana cuenta 29 Parques Nacionales, 8 Reservas Científicas y 15 Reservas Forestales. Solo algunas áreas protegidas han sido delimitadas y varias se administran bajo la modalidad de “co-manejo” con entidades privadas sin fines de lucro y con competencias en manejo de recursos naturales (Martínez et al., 2006).

En los bosques coníferas de la República Dominicana, la especie predominante es el pino criollo (*Pinus occidentalis* Swartz), especie endémica de la Española. El pino crece en forma natural desde los 800 msnm hasta los 3.078 msnm, pero se pueden encontrar poblaciones aisladas desde los 190 msnm. Por encima de los 2.100 msnm el pino es casi la única especie arbórea. La adaptación de esta especie es tal que, en áreas alteradas por el fuego u otros desastres naturales o inducidos, el pino es el único árbol pionero. Estos bosques de pinos corresponden a los más antiguos en el Caribe, lo que los hace aún más importantes, ocupando fundamentalmente tres sistemas montañosos de la República Dominicana: Cordillera Central, Sierra de Bahoruco y Sierra de Neiba.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

El *Pinus occidentalis* es la principal especie comercial en República Dominicana y su distribución se encuentra en las cuencas hidrográficas más importantes para la región, el manejo del *P. occidentalis* tiene un gran impacto en la calidad de vida de los habitantes de la República Dominicana. Esta especie se encuentra En Peligro según la Lista Roja de la IUCN (Farjon, 2013). Sin embargo, como en la mayoría de los países tropicales, el país ha perdido la mayor parte de su cubierta forestal debido a una gestión inadecuada en las áreas forestales, perdiendo en el proceso, la diversidad biológica, así como el potencial forestal, por lo que es de vital importancia el estudio de forma integral de los bosques naturales (López, 2009).

A pesar del avance en las investigaciones forestales, no se ha alcanzado el nivel de desarrollo óptimo que conjugue el conocimiento de la variabilidad genética con las características fenotípicas necesarios para un estudio en profundidad de la especie maderable de mayor demanda en el país, basándose la selección en criterios netamente fenotípicos y en la experiencia del productor, sin contarse con métodos moleculares desarrollados que permitan determinar la estructura genética, diversidad y flujo genético de las poblaciones de *P. occidentalis* en la República Dominicana, por lo que se hace necesario la aplicación de técnicas de marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares de DNA han sido propuestos como una herramienta básica para evaluar el efecto del manejo forestal sobre la variabilidad genética y sistemas reproductivos de especies forestales (Lee et al., 2002; du Cros, 2004; Degen et al., 2006; Alfonso et al., 2014). Dentro de las diferentes técnicas de marcadores moleculares de DNA utilizadas en especies vegetales, en general, y forestales, en particular, hay que destacar la de marcadores basados en microsatélites SSR (*Simple Sequence Repeats*). Presentan un alto polimorfismo por locus (multialelismo), superior al observado por otros marcadores; por esto son codominantes y genoma-específicos, lo que les hace idóneos para el perfilado

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

genético (Jones et al, 2010; Tijerino y Korpelainen, 2014). Otros atributos incluyen hipervariabilidad, reproducibilidad, relativa abundancia, cobertura extensiva del genoma, localización específica en los cromosomas, docilidad en la automatización y alto grado de rendimiento de genotipado (Kalia et al., 2011; González, 2011).

Los microsatélites fueron descritos por Tautz en 1989 y se basan en regiones muy variables constituidas por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 –6). El número de repeticiones puede variar, por lo que las diferencias o polimorfismos se detectan con una disparidad de tamaños y han ganado considerable importancia en la genética de la conservación de plantas debido a la gran cantidad de ventajas genéticas que poseen (Tautz, 1989; Engel et al., 1996).

En los ecosistemas tropicales han sido pocas las especies forestales que se han estudiado genética y molecularmente, específicamente con el empleo de microsatélites (Lee et al., 2002; Glaubitz et al., 2003; Degen et al., 2006; Barbará, 2007; Ortiz et al., 2008; Jardón Barbolla et al., 2011; Delgado et al., 2013; Alfonso, 2014).

La caracterización de la estructura genética de una especie y la evaluación de su comportamiento en diversos ecosistemas puede contribuir a que los diferentes actores políticos y sociales tomen las medidas necesarias para la conservación, manejo y gestión de los bosques (Fay et al., 1999; Fraser y Bernatchez 2001; Diniz Filho et al., 2008.; Kramer y Havens 2009; Alfonso et al., 2014; Jardón Barbolla et al., 2011).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el nivel de diversidad genética de tres poblaciones de *Pinus occientalis* Swartz a lo largo de su área de distribución natural, utilizando marcadores moleculares de microsatélites (SSR). Los objetivos específicos del estudio fueron: a) caracterizar la estructura de la diversidad genética en esta especie y el grado de diferenciación

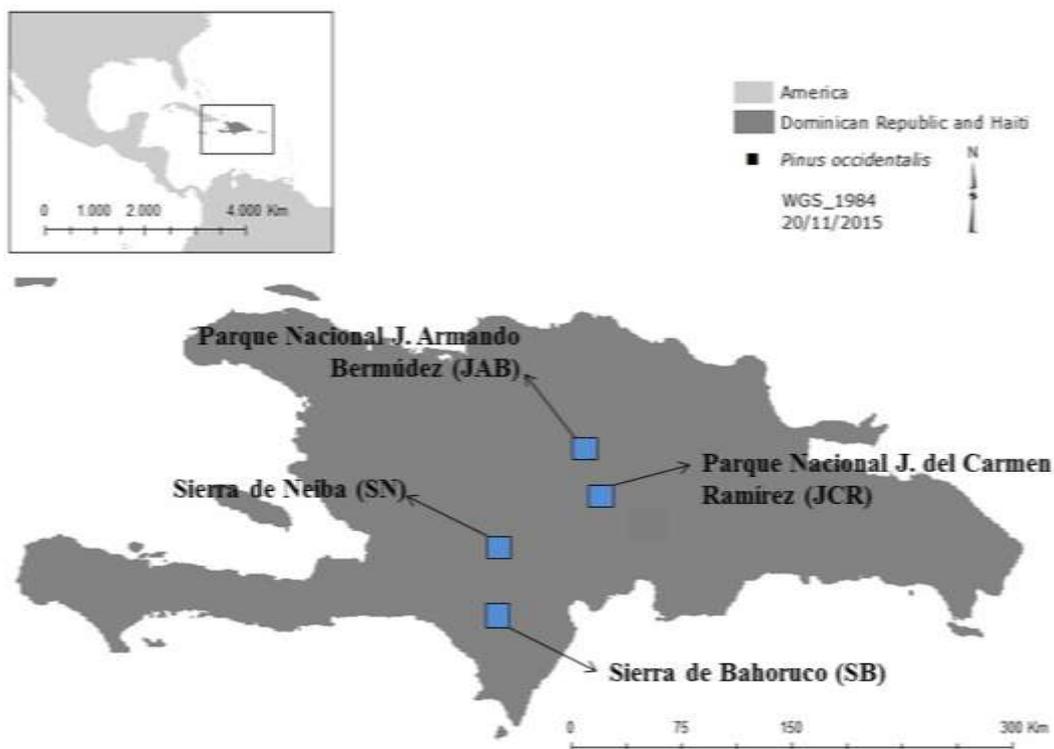
genética entre regiones geográficas, y b) determinar la distancia genética entre poblaciones.

## ***4.2. Materiales y métodos***

### **4.2.1. Área de estudio**

Se muestrearon los tres sistemas montañosos con áreas de crecimiento natural del *Pinus occidentalis* del país. Se colectaron un mínimo de 25 muestras por localidad. Las localidades incluidas en la Cordillera Central incluyeron los Parques Nacionales José del Carmen Ramírez y J. Armando Bermúdez. Además, se colectó en los Parques Nacionales Sierra de Bahoruco y Sierra de Neiba (Figura 1). Un total de 81 muestras fueron incluidas en este estudio. Se removieron las acículas (hojas) de los individuos y conservaron en silica gel hasta llegar al laboratorio donde se preservaron a -20 Celsius.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 1.** Área de estudio donde se muestran las 4 localidades muestreadas para *Pinus occidentalis* en cuadrados azules.

**Tabla 1.** Coordenadas geográficas en UTM (WGS84) para las localidades incluidas de *Pinus occidentalis* en la República Dominicana.

Parques Nacionales	Latitud (N)	Límites altitudinales (m)	Precipitación anual (mm)	Temperaturas extremas	
				Máximas (°C)	Mínimas (°C)
Armando Bermúdez (CC)	19° 10' N	900-3.080	2.300	22	12
José del C. Ramírez (CC)	19° 17' N	850-3.080	2.500	20	12
Sierra de Bahoruco (SB)	18° 10' N	300-2.367	1.700	25	18
Sierra de Neiba (SN)	18° 38' N	500-2.252	1.500	25	20

#### 4.2.2. Extracción de DNA y selección de cebadores polimórficos

Se extrajo DNA de acículas de 81 individuos empleando el protocolo DNeasy Plant Minikit de QIAGEN modificado. Se probaron 13 marcadores microsatélites plastidiales (Vendramin, 1996) (Tabla. 2). Un análisis genético preliminar realizado con 48 individuos de cada población, mostró cuatro microsatélites monomórficos, y uno no amplificó (Tabla 2).

**Tabla 2.** Marcadores microsatélites del DNA del cloroplasto para *Pinus occidentalis*. Ta – temperatura óptima de alineación Na – número de alelos.

ID	Locus	Producto PCR (pb)	Tag fluorescente	Ta (°C)	Na	Notas
P01	Pt1254	83-86	PET	57	4	
P02	Pt9383	107-109	PET	57	3	
P03	Pt15169	122-123	FAM	57	2	
P04	Pt26081	121-122	FAM	57	2	
P05	Pt30204	155-156	NED	57	2	
P06	Pt36480	161-162	NED	57	2	
P08	Pt45002	180	VIC	57	1	monomórfico
P10	Pt51873	99	PET	57	1	monomórfico
P11	Pt63718	106-107	VIC	57	2	
P16	Pt102584	143	NED	57	1	monomórfico
P17	Pt107148	135	FAM	57	1	monomórfico
P18	Pt107517	na	VIC	57	1	no amplificó
P20	Pt110048	104-105	VIC	57	2	

La visualización de la banda de DNA genómico se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Para esto, se usó un aparato de electroforesis (Electronyx Mini<sup>TM</sup> Horizontal Electrophoresis System) el cuál se

## **Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

dejó correr durante 45 minutos, a 120 V (voltios) y 400 A (amperes) con una solución amortiguadora (TAE buffer) de 1x. Los geles tenían ocho pocillos, el primero de los cuales se cargó con una escalera de DNA de 1 kb para determinar el tamaño deseado de la banda. Los demás pocillos fueron cargados con 3  $\mu$ l de DNA y 1  $\mu$ l de una solución para cargar el gel de Applied Biosystems a 10x (la cual contiene 40% de sacarosa, 0.17% de xylene cyanol y 0.17% de azul de bromofenol).

La visualización de las bandas de DNA, se realizó usando un aparato de rayos ultravioleta (Illuminix Dual™ 302/365 nm Transilluminator). Se tomaron fotografías de cada gel con un Photonyx Gel Documentation System que tenía el Illuminix Dual UVA/UVB 302/365nm Transilluminator.

La cuantificación del DNA genómico se llevó a cabo mediante el *dsDNA BR Assay Kit* de Qubit. Las concentraciones de DNA fueron normalizadas a 5 ng/ $\mu$ l.

### **4.2.3. Amplificación del DNAcP mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

En experimentos previos se identificaron ocho cebadores polimórficos (Tabla 2), los que fueron marcados con fluorocromos de arreglos de filtros G5 de Applied Biosystems (FAM; VIC; NED y PET, Forester City, CA).

Para cada muestra se llevó a cabo la técnica de 3-Primer PCR (Schuelke 2000) dónde se preparó 10  $\mu$ l de un producto PCR con 6.45  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada desionizada, 1.2  $\mu$ l de una mezcla conformada por: 1,000  $\mu$ l de 10X PCR buffer, 100  $\mu$ l de nucleótidos trifosfatados a una concentración de 10  $\mu$ M cada uno y 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada desionizada; 0.05  $\mu$ l del cebador para la cadena adelantada con la cola universal M13, 0.4  $\mu$ l del cebador de la cadena retardada, 0.4  $\mu$ l del fluoroforo asignado, 0.4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0.1  $\mu$ l de la polimerasa Taq y 1  $\mu$ l de DNA genómico.

## **Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Luego se colocaron las muestras en el termociclador y se implementó el siguiente protocolo: una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, luego 30 repeticiones de una desnaturalización a 94°C por 45 segundos, un alineamiento a  $T_a$  (temperatura de alineación óptima) °C por 45 segundos y una extensión a 72°C por 45 segundos. Por último, se llevó a cabo otra extensión a 72°C por 10 minutos.

Una vez terminado de correr el PCR, se prepararon geles de agarosa de 1% para determinar la presencia y el tamaño de cada banda. Los geles se prepararon con 3  $\mu$ l del producto PCR y 1  $\mu$ l de la solución para cargar el gel 10x. Se colocó el gel a correr durante 45 minutos a 120 V y 400 A.

El genotipado fue llevado a cabo por Nevada Genomics Center (genomics@cabnr.unr.edu) y los genotipos se determinaron manualmente por medio de Peak Scanner Software v.1.0 de Applied Biosystems 2006.

### **4.2.4. Análisis de datos.**

El cloroplasto tiene sólo un cromosoma haploide en forma de anillo que no experimenta recombinación (Provan et al., 2001), por lo que se puede asumir que la expresión de los ocho SSR's se considera como un locus sencillo. De esta manera cada individuo es portador de un haplotipo.

#### **4.2.4.1. Diversidad genética**

Para evaluar la diversidad genética de las poblaciones se determinó el número de haplotipos ( $A$ ), el número de haplotipos únicos para cada población ( $P$ ), el número efectivo de haplotipos ( $N_e$ ), la riqueza haplotípica ( $R_h$ ), la diversidad genética ( $H_e$ ), y la distancia genética ( $D^2$ ). Además se calculó la matriz de distancia poblacional de Nei, la diversidad genética intrapoblacional ( $H_s$ ), la diferenciación de la diversidad ( $D_{st}$ ), la diversidad genética total ( $H_t$ ) y

la proporción de diferenciación genética ( $F_{st}$ ). Estos análisis de los datos fue mediante Haplotype Analysis v.1.04 (Eliades y Eliades, 2009).

#### **4.2.4.2. Estructura genética**

Se realizó un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA), utilizando el programa GenAlex versión 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) para evaluar la variabilidad intra e intepoblacional.

### **4.3. Resultados**

Para el análisis de los datos se incluyeron 13 marcadores microsatélites y 81 individuos de tres localidades (Cordillera Central, Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco). Cinco cebadores fueron eliminados del estudio, ya que cuatro fueron monomórficos y uno de ellos no amplificó para la especie (**Tabla 1**).

Se identificaron 25 haplotipos en las tres localidades y para los ocho cebadores utilizados. En la frecuencia de los alelos se puede ver cómo en todos los loci aparece una distribución unimodal y los alelos difieren en 1 par de bases (pb) entre ellos, como corresponde con el modelo de mutación por pasos (SMM) supuesto en el cálculo de la  $D_2$  de Goldstein et al., (1995) (**Tabla. 3**).

De los 25 haplotipos identificados, se observaron nueve haplotipos compartidos y 16 haplotipos únicos para las localidades, siendo la Cordillera Central la que mayor cantidad posee con siete haplotipos únicos, le sigue Sierra de Neiba con cinco y Sierra de Bahoruco con cuatro (**Tabla 4**).

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Tabla 3.** Haplotipos detectados empleando 8 loci para las tres localidades incluidas de *P. occidentalis*.

Haplotipo No.	Variantes de primers utilizados							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P11	P20
1	83	108	123	121	155	161	106	104
2	84	107	123	121	155	161	106	104
3	84	107	123	122	155	161	106	105
4	84	108	122	121	155	161	106	104
5	84	108	123	121	155	161	106	104
6	84	108	123	121	155	161	106	105
7	84	108	123	121	155	161	107	104
8	84	109	122	121	155	161	106	104
9	84	109	123	121	155	161	106	104
10	85	107	123	121	155	161	106	104
11	85	107	123	121	155	161	106	105
12	85	107	123	121	155	162	106	104
13	85	108	122	121	155	161	106	104
14	85	108	123	121	155	161	106	104
15	85	108	123	121	155	161	106	105
16	85	108	123	121	155	162	106	104
17	85	108	123	121	156	161	106	104
18	85	108	123	121	156	161	106	105
19	85	109	122	121	155	161	106	104
20	85	109	123	121	155	161	106	104
21	85	109	123	121	155	161	107	104
22	85	109	123	121	155	161	106	104
23	86	107	123	121	155	161	106	105
24	86	108	123	121	155	161	106	104
25	86	109	123	121	155	161	107	104

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Tabla 4.** Haplotipos únicos por localidad. CC (Cordillera Central), SB (Sierra de Bahoruco), SN (Sierra de Neiba).

<b>Código de los haplotipos</b>	<b>Hapoltipos</b>	<b>Población</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>haplo-1</b>	83 108 123 121 155 161 106 104	CC	0.02
<b>haplo-2</b>	84 107 123 121 155 161 106 104	SB	0.07
<b>haplo-3</b>	84 107 123 122 155 161 106 105	CC	0.05
<b>haplo-6</b>	84 108 123 121 155 161 106 105	CC	0.02
<b>haplo-7</b>	84 108 123 121 155 161 107 104	CC	0.02
<b>haplo-8</b>	84 109 122 121 155 161 106 104	SN	0.04
<b>haplo-12</b>	85 107 123 121 155 162 106 104	SN	0.04
<b>haplo-15</b>	85 108 123 121 155 161 106 105	CC	0.05
<b>haplo-16</b>	85 108 123 121 155 162 106 104	SB	0.07
<b>haplo-17</b>	85 108 123 121 156 161 106 104	SN	0.08
<b>haplo-18</b>	85 108 123 121 156 161 106 105	SN	0.04
<b>haplo-19</b>	85 109 122 121 155 161 106 104	CC	0.02
<b>haplo-20</b>	85 109 123 121 155 161 106 104	SB	0.29
<b>haplo-22</b>	85 109 123 122 155 161 106 104	SB	0.07
<b>haplo-23</b>	86 107 123 121 155 161 106 105	SN	0.04
<b>haplo-25</b>	86 109 123 121 155 161 107 104	CC	0.02

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Tabla 5.** Frecuencia de haplotipos por localidad. CC (Cordillera Central), SB (Sierra de Bahoruco), SN (Sierra de Neiba).

<b>Frecuencia Total</b>	<b>Código</b>	<b>CC</b>	<b>SB</b>	<b>SN</b>
1	haplo-1	1	0	0
1	haplo-2	0	1	0
2	haplo-3	2	0	0
2	haplo-4	1	0	1
28	haplo-5	21	0	7
1	haplo-6	1	0	0
1	haplo-7	1	0	0
1	haplo-8	0	0	1
2	haplo-9	0	1	1
7	haplo-10	6	1	0
2	haplo-11	1	0	1
1	haplo-12	0	0	1
2	haplo-13	1	0	1
7	haplo-14	1	1	5
2	haplo-15	2	0	0
1	haplo-16	0	1	0
2	haplo-17	0	0	2
1	haplo-18	0	0	1
1	haplo-19	1	0	0
4	haplo-20	0	4	0
5	haplo-21	1	3	1
1	haplo-22	0	1	0
1	haplo-23	0	0	1
4	haplo-24	0	1	3
1	haplo-25	1	0	0

Los valores de diversidad haplotípica ( $H_e$ ) son elevados. La diversidad haplotípica promedio fue de 84% ( $H_e = 0.839$ ), obteniendo mayor diversidad genética Sierra de Bahoruco con 90%, la riqueza haplotípica fue mayor también en Sierra de Bahoruco El número efectivo de haplotipos varía entre tres y siete (Tabla 6).

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Tabla 6.** Tamaño de la muestra en cada localidad (N), número de haplotipos detectados en cada localidad (A), número de haplotipos únicos (P), número efectivo de haplotipos (Ne), riqueza haplotípica (Rh), diversidad genética (He), media de la distancia genética entre los individuos ( $D^2_{sh}$ ).

Localidad	N	A	P	Ne	Rh	He	$D^2_{sh}$
CC	41	14	7	3.396	5.493	0.723	0.579
SB	14	9	4	6.125	8.000	0.901	0.545
SN	26	13	5	7.042	7.545	0.892	0.671
<b>Media</b>	<b>27.000</b>	<b>12.000</b>	<b>5.333</b>	<b>5.521</b>	<b>7.013</b>	<b>0.839</b>	<b>0.598</b>

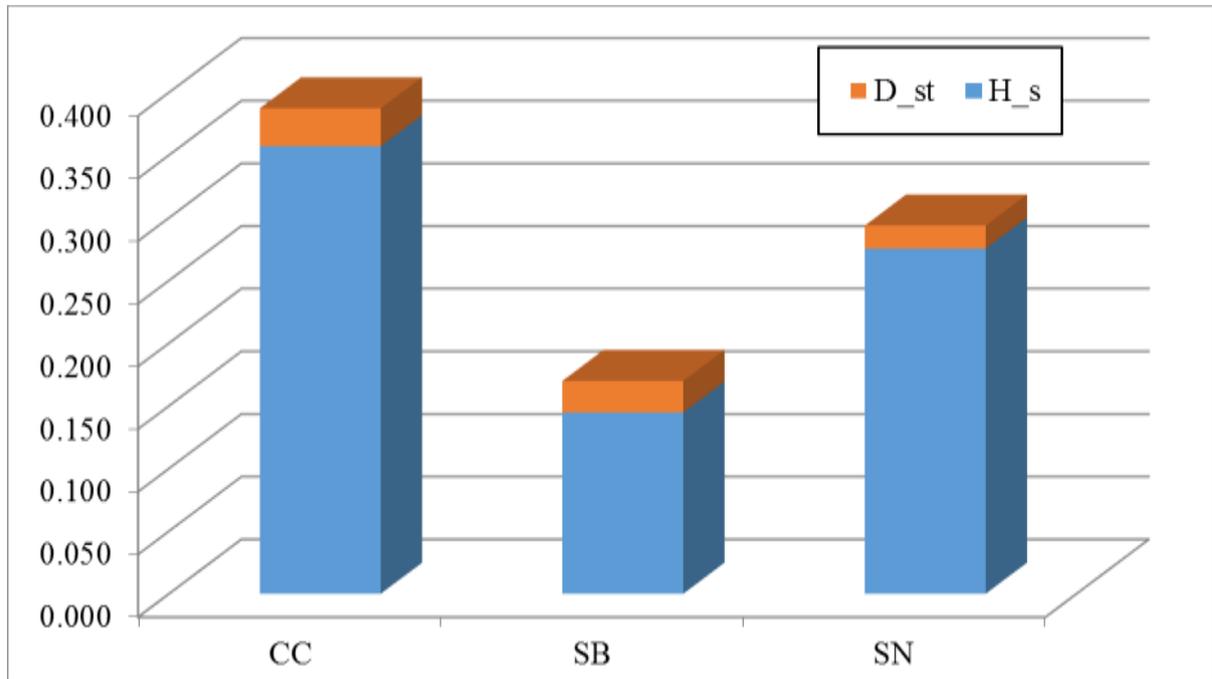
La localidad de Sierra de Bahoruco (SB) fue la más diferenciada y con la distancia genética más alta, según los valores de proporción de diferenciación genética total (Fst) (Fst = 0.384; NeiDG = 0.211) a diferencia de las localidades de Sierra de Neiba y Cordillera Central las cuales fueron más similares genéticamente (Fst = 0.198; NeiDG = 0.072) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Debajo de la diagonal se muestran los valores de Fst normalizados empleando la frecuencia haplotípica. Arriba de la diagonal se muestra la distancia genética (DG) de Nei (Haplotype Analysis v.1.04).

Población	CC	SB	SN
CC		0.211	0.072
SB	0.384		0.120
SN	0.198	0.166	

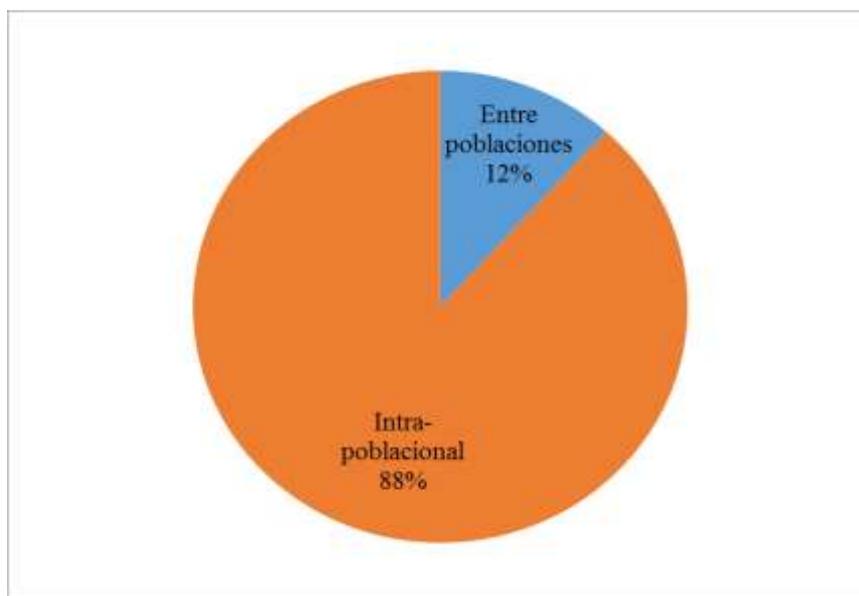
La diversidad genética total entre las zonas (diversidad genética intrapoblacional y la diferenciación de la diversidad), dio como resultado que la Sierra de Bahoruco posee menor diversidad genética (Hs=0.145; Dst= 0.025) y la de mayor diversidad genética total fue la Cordillera Central (Hs=0.357; Dst= 0.030) (Figura 2).

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 2.** Diversidad genética total por localidades. H<sub>s</sub> - diversidad genética intrapoblacional; D<sub>st</sub> - diferenciación de la diversidad (D<sub>st</sub>).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) determinó que las localidades muestreadas se diferencian genéticamente en un 12% y la diferenciación intrapoblacional de un 88% ( $\Phi_{IPT} = 0.117$ ;  $P \geq 0.001$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) con individuos de 4 localidades (JAB-JCR-SN-SB).

#### **4.4. Discusión**

El número de haplotipos identificados para las tres localidades estudiadas fue alto (25) en comparación con estudios realizados para otras especies, *P. caribaea* y *Pinus spp.* (Bucci et al., 2007; Williams et al., 2007; Vendramin et al., 2008; Jardón-Barbolla et al., 2011). En *Pinus caribea* var *bahamensis*, Sánchez et al. (2014) obtuvieron 12 haplotipos para toda la población de Bahamas. Esto indica una elevada diversidad haplotípica para la especie en el país. Gómez et al., (2002), obtuvieron un número menor de haplotipos, con 9 haplotipos distribuidos en 10 poblaciones (240 muestras) de *P. pinea* frente a los 28 presentes en 6 poblaciones (144 muestras) de *P. halepensis* (Gómez, 1998) o los 34 detectados en 10 poblaciones (240 muestras) de *P. pinaster* (Vendramin et al., 1998). Sin embargo, para *Pinus hartwegii* el número de alelos por locus fue similar (2 a 6) y el número de haplotipos fue mayor (138) que al reportado en otros trabajos con microsatélites plastidial en pinos (Robledo Arnuuncio et al., 2005; Ortiz Medrano et al., 2008; Rodríguez Banderas et al., 2009; Obregón Molina, 2010).

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

La diversidad haplotípica fue alta en las tres zonas (Cordillera Central un  $He=0.723$ , Sierra de Bahoruco,  $He=0.901$  y Sierra de Neiba con un  $He=0.892$ ), nuestros resultados son consistentes con los resultados de diversidad haplotípica obtenidos por Jardón-Barbolla et al., (2011) para dos localidades de la República Dominicana, Aguas Blancas ( $He = 0.889$ ) y Manabao ( $He = 0.846$ ), ambas ubicadas en la Cordillera Central, mostrando valores similares a los obtenidos en nuestra investigación

La distancia genética de Nei (H) estimado para las poblaciones de *Pinus occidentalis* resultaron en un rango de 0.072 a 0.211 (Tabla 7), muestra valores diferentes, lo que se debe al rango de distribución geográfica de la especie en República Dominicana, el mayor valor de distancia genética se observó entre la Cordillera Central y Sierra de Bahoruco (0.211), seguida de las poblaciones de Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco (0.120), el menor valor de distancia genética lo pudimos observar entre las poblaciones de Sierra de Neiba y Cordillera Central (0.072).

Al observar la Diversidad genética nos damos cuenta que la Sierra de Bahoruco presenta mayor variación, lo que pudiera deberse a que representa la única porción de ecosistemas de montaña bajo protección de la "Paleoisla del Sur", una de las dos islas que se unieron para conformar la actual isla de La Española hace unos diez millones de años, lo cual explica en gran medida el alto número de especies endémicas, raras y de hábitat restringido que allí se encuentran, constituyendo uno de los centros de endemismo más importantes La Española, además de la deriva génica ocasionada por los cambio climáticos. (Molina-Freaner et al., 2001).

Considerando todas las poblaciones este índice de distancia genética resultó más bajo (0.211) que los reportados para poblaciones de *P. brutia* (0.40), (Yusuf et al., 2011); *Larix gmelinii* (0.344), (Zang et al., 2013), *P. sylvestris* (0.216), (Cipriano et al., 2013). Las diferencias en los niveles de distancia genética entre estas localidades pueden ser explicadas por la distribución

geográfica, el número de poblaciones muestreadas, el tamaño de las poblaciones y el efecto de los cambios climáticos ocurridos en el pasado.

Los grados de divergencia genética entre localidades son consistentes a los modelos de aislamiento por distancia, ya que mientras más separadas geográficamente se encuentran dos localidades más diferenciadas genéticamente son. Múltiples factores influyen en los valores de divergencia observados, como es la dispersión de las semillas por el viento, el tipo de suelo, incendios, reforestaciones

El valor de variación interpoblacional en las zonas analizadas para el *Pinus occidentalis* muestra valores elevados (12%), resultados que difieren con algunos de los estudios con marcadores de microsátélites plastidiales en coníferas, donde la variación interpoblacional es baja (Gómez et al., 2002, Sánchez, et al., 2014). Las especies de pino presentan, debido a su sistema de reproducción, un alto nivel de diversidad genética intrapoblacional y un nivel bajo a intermedio entre poblaciones (Soto de Viana et al., 2010). Estas características tienen una gran influencia en los programas de conservación in situ y ex situ.

Podemos plantear que la distancia geográfica y los diferentes elementos de la biogeografía de la República Dominicana han determinado que la variación interpoblacional e intra poblacional sea alta. Además, la Sierra de Bahoruco es el parque más alejado de la Cordillera Central y su formación ha sido diferente al resto de los sistemas montañosos de la Española, pues el territorio donde está ubicado es producto de la emersión de territorios que formaban junto al Procurrente de Barahona y la Península de Tiburón de Haití una unidad que habría permanecido separada del resto de La Española hasta hace unos 10 millones de años. La Sierra de Bahoruco durante el final del Paleógeno (desde hace 34 millones de años hasta hace 23), constituía una superficie de karst tropical con mogotes, cúpulas y dolinas. Este karst estaría situado por encima de los 300 metros por encima del nivel del mar actual. A partir del Neógeno (hace 23 millones de años) el relieve experimentó una progresiva fracturación resultado del

empuje que del plateau oceánico contra el resto de la placa del Caribe. Esto hizo que el karst se levantara hasta los niveles actuales. También emergieron las calizas del Mioceno en la vertiente Sur, que posteriormente fueron modeladas en karst de plataforma durante el Plioceno. Por el Norte emergieron las calizas margosas de la formación Sombrerito (León, 2014).

Se ha demostrado con este trabajo la utilidad de los polimorfismos de los cpSSRs en el análisis de la diversidad del genoma del cloroplasto de *P. occidentalis*, además de lograr evaluar molecularmente por primera vez zonas de crecimiento y desarrollo natural de esta especie lo que permitirá apoyar los programas de conservación y mejoramiento genéticos de *Pinus occidentalis* en la Española.

#### **4.5. Bibliografía**

- Alfonso-Corrado, C., Campos-Contreras, J., Sánchez-García, G., Monsalvo-Reyes, A., & Clark-Tapia, R. (2014). Manejo forestal y diversidad genética de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl, & Cham, en Sierra Juárez, Oaxaca. *Madera y bosques*, 20(2), 11-22.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M.F., Lexer, C. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16 (18), 3759-3767.
- Bucci G., González-Martínez S.C., Le Provost G., Plomion C., Ribeiro M.M., Sebastiani F., Alia R., Vendramin G.G. (2007). Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology* 16, 2137-2153.
- Cipriano, J., Carvalho, A., Fernández, C., Gaspar, M.J., Pires, J., Bento, J., Lima-Brito, J. (2013). Evaluation of genetic diversity of Portuguese *Pinus sylvestris* L. populations based on molecular data and inferences about the future use of this germplasm. *Journal of Genetics*, 92, 41-48.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

- Degen, B., Blanc, L., Caron, H., Maggia, L., Kremer, A., Gour-let-Fleury, S. (2006). Impact of selective logging on genetic composition and demographic structure of four tropical tree species. *Biological Conservation* 131(3), 386-401.
- Delgado-Valerio, P., Núñez-Medrano, J., Rocha-Granados, M.; Muñoz-Flores, H.J. (2013). Variación genética de dos áreas semilleras de pino establecidas en el estado de Michoacán. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 4(18), 104-115.
- Diniz-Filho, J.A.F., De Campos Telles, M.P., Bonatto, S.L., Eizirik, E., De Freitas, T.R. O., De Marco, P., Santos, F.R., Sole-Cava, A., Soares, T.N. (2008). Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography*, 35 (5), 753-763.
- du Cros, E.T. (2004). Management and conservation of forest genetic resources: Roles of IUFRO a France on the international scene and need for long-term monitoring of genetic diversity in conservation networks. In: J. Beaulieu, ed. *Silviculture and the conservation of genetic resources for sustainable forest management. Proceedings of the Symposium of the North American Forest Commission. Forest Genetic Resources and Silviculture Working Groups, and the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO)*. Quebec, Canadá. p:3-8.
- Eliades N.G., Eliades D.G. (2009). HAPLOTYPE ANALYSIS: software for analysis of haplotypes data. Distributed by the authors. *Forest Genetics and Forest Tree Breeding*, Georg-August University Goettingen, Germany.
- Engel, S.R., Linn, R.A., Taylor, J.F., Davis, S.K. (1996). Conservation of Microsatellite Loci across Species of Artiodactyls: Implications for Population Studies. *Journal of Mammalogy* 77, 584-518.
- Farjon, A. (2013). *Pinus occidentalis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T34192A2850209. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T34192A2850209.en>.
- Fay, M.F., Qamaruz-Zaman, F., Cowan, R.S., Thornton, H. (1999). Molecular techniques for orchid conservation. In Clark, J., Elliott, W. M., Tingley, G., Biro, J. (eds.) *XVI World Orchid Conference*. Vancouver, British Columbia: Vancouver Orchid Society, pp. 152-157.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

- Garay, A.G., Aguiriano, E., Miranda, R.A., Bueno, M.A. (2002). Análisis de los recursos genéticos de " *Pinus pinea*" L. en España mediante microsatélites del cloroplasto. *Investigación Agraria. Sistemas y recursos forestales*, 11(1), 145-154.
- Gómez, A., Aguiriano, E., Alía, R., Bueno, M.A. (2002). Análisis de los recursos genéticos de *Pinus pinea* L. en España mediante microsatélites del cloroplasto. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. 11(1):145-154.
- González-González, E.A. (2011). Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp *lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). (Doctoral dissertation, PhD thesis, University of Las Palmas de Gran Canaria).
- Hoelzel, A.R. (1998). *Molecular Genetic Analysis of Populations: A practical approach*. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA.
- Jardón-Barbolla, L., Delgado-Valerio, P., Geada-López, G., Vázquez-Lobo, A., Piñero, D. (2011). Phylogeography of *Pinus* subsection *Australes* in the Caribbean basin. *Annals of botany*, 107(2), 229-241.
- Jiménez, J.F., Sánchez-Gómez, P., Martínez, J.F., Molins, A., Rosselló, J.A. (2005). Variabilidad genética de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* en la Región de Murcia mediante microsatélites cloroplásticos. *Anales de Biología* 27, 105-112.
- Jones, A.G., Small, C.M., Paczolt, K.A., Ratterman N.L. (2010). A Practical Guide to Methods of Parentage Analysis. *Molecular Ecology* 10, 6-30.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K. (2011) Microsatellite Markers: An overview of the recent progress. *Euphytica* 177, 309-334.
- Kramer, A.T., Ison, J.L., Ashley, M.V., Howe, H.F. (2008). The paradox of forest fragmentation genetics. *Conservation Biology*, 22 (4), 878-885.
- Lee, C.T., Wickneswari, R., Mahani, M.C., Zakri, A.H. (2002). Effect of selective logging on the genetic diversity of *Scaphium macropodum*. *Biological Conservation* 104(1),107-118.
- León Y.M. (2014). Parque Nacional Sierra de Bahoruco, República Dominicana. Propuesta para inclusión a la Lista de Áreas Especiales Protegidas del Protocolo de Áreas

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

y Vida Silvestre Especialmente Protegidas del Gran Caribe de la Convención para la Protección y el Desarrollo del Medio Marino de la Región del Gran Caribe (Convención de Cartagena). Documento borrador, Grupo Jaragua, Santo Domingo

Navascues, M., y Emerson, B. (2006). Diversidad y flujo genético en plantaciones de *Pinus canariensis*. In IV Jornadas Forestales de la Macaronesia.

Ortíz-Medrano, A., Moreno-Letelier, A., Piñero, D. (2008). Fragmentación y expansión demográfica en las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite*. Boletín de la Sociedad Botánica de México, (83), 25-36.

Peakall, R. y Smouse P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.

Ramel, C. (1997). Mini and Microsatellite. *Environmental Health Perspectives* 105, 781-789.

Robledo-Arnuncio, J., Collada, C., Alía, R., Gil, L. (2005). Genetic Structure of Montane Isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean Refugial Area. *Journal of Biogeography*, 32(4), 595-605.

Rodríguez-Banderas A., Vargas-Mendoza C.F., Buonamici A., Vendramin G.G. (2009). Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of Biogeography* 36,1807-1820.

Silvertown, J.W. y Charlesworth, D. (2001) *Introduction to Plant Population Biology*. Blackwell Science. London, UK.

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233-234.

Soto de Viana, A., Robledo-Arnuncio, J.J., González-Martínez, S.C., Smouse, P.E., Alía, R. (2010). Climatic niche and neutral genetic diversity of the six Iberian pine species: a retrospective and prospective view. *Molecular Ecology* 19, 1396-1409.

Tautz, D. (1989). Hipervariability of a Simple Sequence as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Researches* 7, 6463-6470.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Tijerino, A.; Korpelainen, H. (2014). Molecular characterization of Nicaraguan *Pinus tecunumanii* Schw. ex Eguluz et Perry populations for in situ conservation. *Trees*, 28(4), 1249-1253.

Vendramin, G.G., Fady ,B., González-Martínez, S.C., Hu, F.S., Scotti, I., Sebastiani, F., Soto, A., Petit, R.J. (2008). Genetically depauperate but widespread: the case of an emblematic Mediterranean pine. *Evolution* 62, 680-688.

Vendramin, G.G., Lelli, L., Rossi, P., Morgante, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5, 595-598.

Williams DA., Wang Y., Borchetta M., Gaines MS. (2007). Genetic diversity and spatial structure of a keystone species in fragmented pine rockland habitat. *Biological Conservation*. 138, 256–268.

Yusuf, K.U.R.T., Bilgen, B.B., Nuray, K.A.Y.A., Kani, I.S.I.K. (2011). Genetic comparison of *Pinus brutia* Ten. populations from different elevations by RAPD markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(2), 299.

Zhang, Z., Zhang, H., Du, J., Zhang, L. (2013). RAPD and SSR analysis of genetic diversity of natural *Larix gmelinii* populations. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(4), 3959-3965.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Capítulo 5. Caracterización del proteoma de polen y semillas de *Pinus occidentalis* mediante el uso de las aproximaciones complementarias basadas en gel y gel-free**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

## **5.1. Introducción**

*Pinus occidentalis* es una de las principales especies forestales endémicas de la isla “La Española”, presente en el 6,8% de la superficie total de sus bosques. Es una especie de gran importancia para la República Dominicana, tanto desde el punto de vista medioambiental como económico y social. Se utiliza como especie maderera (Ministerio de M.A y R.N, 2014), lo que ha generado la sobreexplotación, con la consiguiente degradación de su ecosistema, sin que se haya llevado a cabo un programa de manejo sostenible y reforestación.

La distribución de esta especie oscila entre 200 a 3000 metros sobre el nivel del mar. A pesar de ser la especie más abundante en los bosques dominicanos, hay una falta de información sobre la estructura genética de las poblaciones y sus características biológicas a nivel molecular. La información disponible se limita a estudios fenológicos y de productividad (Bueno y Bevilacqua, 2009; Guerrero et al., 2001). Sin embargo, los estudios moleculares son necesarios para la evaluación y caracterización de poblaciones como etapa previa a la selección de individuos con características fenotípicas de interés (crecimiento rápido, la producción de madera de calidad y la tolerancia o resistencia a estreses bióticos y abióticos) y desarrollo de programas de gestión, conservación y reforestación de la especie.

La investigación actual sobre las especies forestales se centra en el estudio de marcadores moleculares que pueden estar relacionados con el crecimiento, la productividad y las respuestas a los factores ambientales (Abril et al., 2011; Chagné et al., 2004; Valledor et al., 2010; Valero et al., 2011). Como complemento a esta estrategia, la proteómica se ha utilizado para estudiar varias especies forestales como: *Quercus ilex* (Valero et al., 2012; Valero, 2012), *Pinus pinaster* (Bahrman y Petit, 1995; Morel et al., 2014), con el fin de establecer diferencias y agrupamientos basados en el perfil proteico, asociar éste a características fenotípicas determinadas e identificar aquellas proteínas que

puedan ser utilizadas como marcadores fenotípicos, de población o de genotipos élite. El análisis proteómico para las especies forestales se inició evaluando la variabilidad genética de *Pinus pinaster* (Bahrman y Petit, 1995). Costa et al., (1998) utilizaron la proteómica para identificar las proteínas asociadas al estrés por sequía. Otros trabajos incluyeron el análisis de la respuesta al estrés biótico y abiótico en *Quercus* (Sghaier et al., 2013; Valero et al., 2013) y *Pinus* (Wang et al., 2013; Valledor et al., 2012), evaluación del proceso de germinación en *Araucaria* (Balbuena et al., 2011; Capocchi et al., 2011) y respuesta a exposición a metales pesados en *Populus* (Marmioli et al., 2013). La proteómica además fue utilizada con el fin de conocer las bases moleculares del desarrollo y la respuesta a los procesos de estrés biótico o abiótico para el posterior desarrollo de programas de restauración y reforestación (Abril et al., 2011; Valero, 2012; Jorrín y Navarro, 2014).

La proteómica como herramienta debe complementarse con otras herramientas como el análisis morfométrico, fenológico, ecofisiológico, genético, bioquímico y las modernas -ómicas (transcriptómica y metabolómica) con el fin de caracterizar en detalle la biodiversidad natural, conectar fenotipo con genotipo y seleccionar genotipos élite siendo esto la base de un programa actuación biotecnológica de mejora forestal.

En el presente trabajo y como primer paso, se ha caracterizado el proteoma de polen y semillas de *Pinus occidentalis* a través de dos aproximaciones proteómicas complementarias: 1) separación de proteínas en geles 1-DE y 2-DE seguidos de un análisis por MALDI TOF / TOF (metodología *gel-based*) y 2) separación de proteínas por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masa LTQ Orbitrap (metodología *gel free*). Se ha realizado la caracterización parcial de los proteomas de polen y semillas de *P. occidentalis*; mediante la aproximación *gel-based* se han identificado un total de 42 y 94 especies proteicas en semilla y polen respectivamente. Por otro lado mediante la

metodología *gel-free* se consiguió ampliar la cobertura del proteoma identificando 187 y 960 especies proteicas en semillas y polen respectivamente.

## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Material vegetal**

Las semillas y el polen se obtuvieron de conos femeninos y masculinos de *P. occidentalis*, respectivamente (Fig. 1). Los conos se recogieron de árboles situados en la población Central, Neiba y Bahoruco, durante el período septiembre a noviembre de 2014. Las semillas y el polen se agruparon en tres lotes (veinte conos por árbol a partir de cinco árboles por población, cada lote contenía conos de 5 árboles de cada procedencias, por lo que en total se analizaron 15 árboles). Cada lote se utilizó como una réplica biológica, de modo que se analizaran tres réplicas biológicas por tejido. Tras su recogida las muestra se transportó al laboratorio en donde los conos fueron secados, se retiraron las semillas del cono femenino y el polen del cono masculino, siendo posteriormente almacenadas a 4 °C hasta la extracción de proteínas.

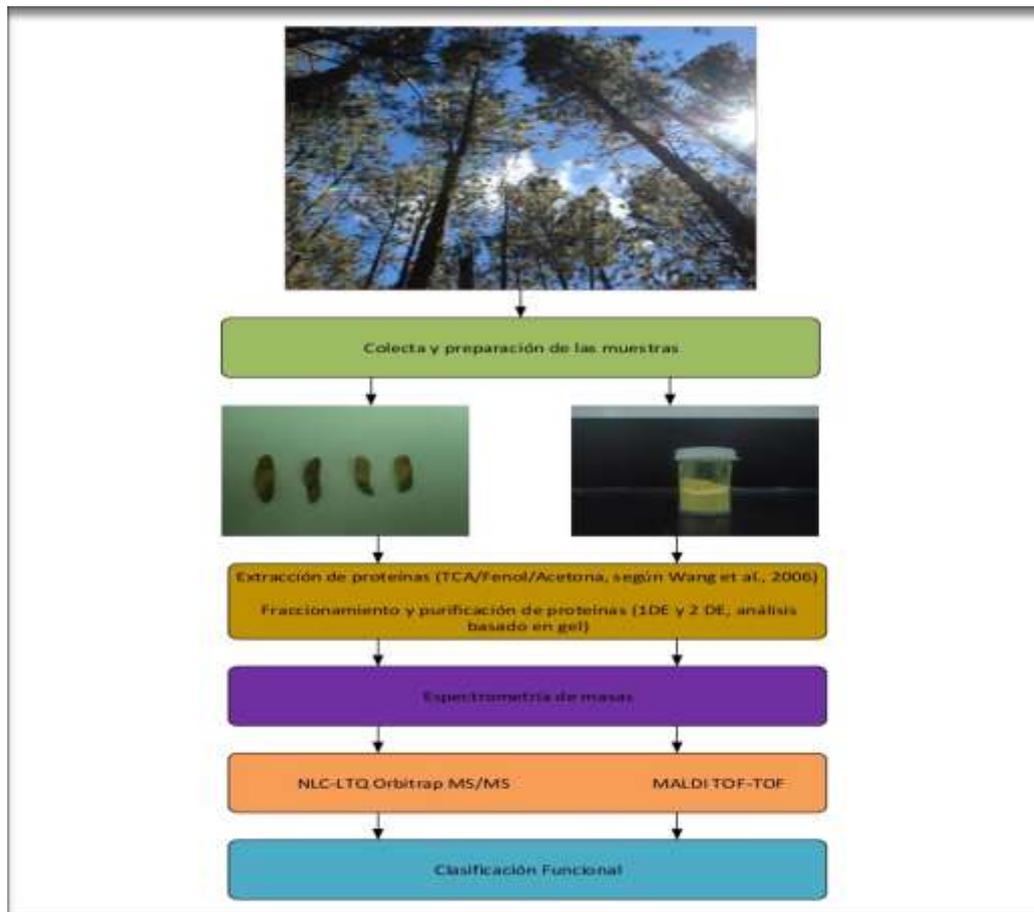


Figura 1. Flujo de trabajo en el análisis proteómico de muestras de semilla y polen.

### 5.2.2. Extracción de proteínas

Las semillas y el polen se maceraron con un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se llevó a cabo la extracción de proteínas a partir de 0,2 g de polvo. Se utilizó el método de precipitación TCA / acetona / fenol descrito por Wang et al., (2006). El precipitado proteico obtenido se resuspendió en una solución que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% [p/v], Triton X-100 0,5% [v/v] y DTT 100 mM. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 14000 g durante 15 min; y posteriormente se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante mediante el método de Bradford

(Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Las proteínas extraídas se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C hasta su análisis electroforético.

### **5.2.3. Electroforesis en gel mono y bidimensional.**

Para la electroforesis monodimensional (1-DE) en gel desnaturizante SDS-PAGE, se siguió el método de Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando geles de 17 cm con 12% de poliacrilamida y el equipo PROTEAN II (Bio-Rad, Hércules, EE.UU.). Fueron separados 70 µg de proteína mediante una corriente de 50 mA/gel hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel. Los geles se tiñeron con una suspensión coloidal de azul brillante de Coomassie (G-250) siguiendo el procedimiento descrito por (Mathesius et al., 2001).

Para la electroforesis bidimensional, se utilizaron tiras de gradiente de pH inmovilizado de 17 cm con gradiente lineal de pH en un rango de 5 a 8 (BioRad), (Görg et al., 1992). Las tiras se rehidrataron pasivamente con 250 µL de solución de rehidratación (urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS al 4 % [p/v]; solución IPG 5-8 0,2% [v/v], DTT 100 mM, y azul de bromofenol 0,01% [p/v]) conteniendo 300 µg de proteína durante 12 h. Las tiras se colocaron en el IEF Protean (Bio-Rad, Hercules, USA) para realizar el isoelectroenfoque de las proteínas; el voltaje fue incrementando gradualmente, según el siguiente protocolo: 0-250 V durante 20 min, 250-10.000 V durante 150 min y a 4.000 V/h hasta un voltaje máximo de 70.000 V (Valero et al., 2011).

Una vez terminado el isoelectroenfoque, las tiras se sumergieron en una solución de rehidratación que contenía DTT a 2 % (p/v) durante 15 min y posteriormente en solución de rehidratación con 2,5 % de Iodoacetamida durante 15 min para, respectivamente, la reducción y alquilación de las proteínas. Tras esta etapa la tira se dispuso sobre un gel de poliacrilamida (20 cm) del 12% llevándose a cabo la electroforesis SDS-PAGE en el PROTEAN Plus Dodeca Cell

(Bio-Rad, Hercules, EE.UU.) en las condiciones descritas anteriormente. Los geles resultantes se tiñeron con una suspensión coloidal de azul brillante de Coomassie (G-250) siguiendo el procedimiento descrito por (Mathesius et al., 2001).

Luego de la tinción de geles, las imágenes se capturaron y digitalizaron utilizando un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.). El análisis de imagen se llevó a cabo con los programas Quantity One para los geles 1-DE y PD-Quest V8.0 para los 2-DE, ambos comercializados por la casa Bio-Rad (Hercules, USA). La presencia de bandas o spots se consideró siempre y cuando su intensidad fuese al menos 10 veces superior a la del fondo del gel. Las bandas y spots en cada gel fueron validadas manualmente según lo recomendado por (Valledor y Jorrín, 2011).

#### **5.2.4. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF**

Las bandas de gel 1-DE se escindieron manualmente con la ayuda de un escalpelo y los spots del gel 2-DE de forma automática utilizando el equipo automático Investigator ProPic (Genomics Solutions). Las proteínas contenidas en las bandas y spots fueron digeridas con una solución de tripsina porcina modificada (grado de secuenciación; Promega) I en el equipo ProGest (Genomics Solutions) (Shevchenko et al., 1996). Las piezas de gel fueron desteñidas con una solución de bicarbonato de amonio 200 mM en acetonitrilo (ACN) 40% (v/v) mediante dos lavados a 37°C durante 30 min. Posteriormente las piezas de gel fueron lavadas dos veces con una solución de bicarbonato de amonio 25mM durante 5 min y luego con una solución de bicarbonato de amonio 25mM en ACN 50% (v/v) durante 15 min. Posteriormente las piezas fueron deshidratadas con ACN al 100% y finalmente se secaron a temperatura ambiente durante 10 min.

Las piezas de gel se rehidrataron con 20 µL de tripsina a una concentración final de 12,5 ng/ µL en bicarbonato de amonio, se llevó a cabo la digestión a 37°C durante toda la noche (aproximadamente 16 h). Transcurrido ese tiempo la

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

digestión fue detenida agregando 10  $\mu$ L de ácido trifluoroacético al 0,5% (v/v). Los péptidos resultantes de la digestión se extrajeron de la matriz del gel con una solución al 10 % (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) (15 min a temperatura ambiente). Las muestras fueron desaladas y concentradas con columnas  $\mu$ C-18 ZipTip (Millipore). Los péptidos fueron eluidos directamente en la placa MALDI con la solución de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-hidroxicinámico a 5 mg/mL en ACN 70% y TFA 0,1%) utilizando el método de goteo. El análisis por espectrometría de masas se realizó en el equipo 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer (Applied Biosystems), el rango de relación masa/carga (m/z) analizado fue de 800 a 4000, con un voltaje de aceleración de 20 kV en el modo reflectrón en un tiempo de 120 ns. Los espectros de masa fueron internamente calibrados utilizando péptidos derivados de la autólisis de tripsina ( $M + H + = 842.509$ ,  $M + H + = 2211,104$ ) con una precisión de  $\pm 20$  ppm para la relación m/z. Los péptidos más abundantes fueron seleccionados para realizar el análisis de fragmentación de masas, información que es utilizada para definir la secuencia del péptido analizada. La identificación de proteínas se realizó mediante comparación de los espectros de masas MS (huella peptídica) y MS/MS derivados del análisis de masas con los espectros resultantes de la fragmentación *in silico* de las secuencias de las proteínas depositadas en las bases de datos públicas (NCBI no redundante (descargado de octubre de 2015); UniProtKB / SwissProt (descargado de octubre de 2015), UniProtKB / TrEMBL (descargado de octubre de 2015)) y bases de datos específicas para *Pinus* construidas [2] utilizando el algoritmo MASCOT 2,0 (Matrix Science Ltd., Londres; <http://www.matrixscience.com>). Se emplearon los siguientes parámetros: restricción a la taxonomía *Viridiplantae* en bases de datos públicas, omisión de un punto de corte de tripsina, 100 ppm de tolerancia en los espectros de huella peptídica y 0,5 Da en MS/MS, carbamidometilación de cisteína como una modificación fija y la oxidación de metionina, fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina como modificaciones variables. El algoritmo consideró como identificación fiable aquellas con un valor de MOWSE *score* superior a 57 con la base de datos de

*Pinus* o 76 con la base de datos de públicas. Se tomaron como criterios de validación y confianza el número de péptidos, porcentaje de cobertura y valores de *pI* y *Mr*.

### **5.2.5. nLC-LTQ Orbitrap MS/MS**

El extracto proteico fue analizado mediante una estrategia de “*shotgun*” (“*gel-free label-free*”), en la que los péptidos resultantes de la digestión con tripsina de las proteínas fueron separados por cromatografía líquida y luego analizados por espectrometría de masas utilizando para ello el sistema nLC-LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA) y siguiendo la metodología descrita por Valledor et al., (2012).

Los extractos proteicos (100 µg) de semilla y polen se sometieron a electroforesis 1-D (SDS-PAGE) tal y como se describió en el apartado anterior. La electroforesis se detuvo una vez que la muestra había pasado al gel separador y desplazado unos 2-3 cm. El gel se tiñó tal y como se ha indicado anteriormente y la banda única de proteínas se escindió manualmente del gel con un escalpelo. Las proteínas se digirieron con tripsina (ver sección “Análisis MALDI-TOF”) y los péptidos resultantes se extrajeron con TFA , tras lo cual se les eliminó las sales con columnas µC-18 ZipTip (Millipore).

Tras el secado se suspendieron en 50 µL de solución de ACN al 4% en ácido fórmico al 0,1%, y transferidas posteriormente a un microvial para la inyección automática. Para el análisis de los péptidos, 5 µL de muestra que contenía aproximadamente 2 µg de péptidos se inyectó al sistema nLC acoplado al equipo LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific). Los péptidos fueron eluidos a través de una columna monolítica C18 Acclaim PepMap (Thermo Scientific) de 15 cm de longitud y 0,075 mm de diámetro interno durante 180 min con un gradiente de 5 a 35% de fase móvil B y flujo de 400 nL/min (Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1% y Fase móvil B: ACN al 90 % más ácido fórmico al 0,1%). El sistema de LC estaba acoplado a una fuente de ionización por electroespray (ESI) con un voltaje

## Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.

de 1,3 kV, en donde los péptidos eluidos de la cromatografía fueron ionizados, para su posterior análisis en el espectrómetro de masa.

Los parámetros de análisis por espectrometría de masa fueron: modo “full scan” en modo MS, selección de picos monoisotópicos en modo centroide, resolución de 30000 cubriendo un intervalo de relación m/z de los iones precursores 400 a 1500. Cada espectro resultante del “full scan” fue seguido de diez adquisiciones de espectros en modo MS/MS, en donde los diez iones precursores más abundantes fueron seleccionados durante 150 ms para su fragmentación. La fragmentación se realizó por el método de disociación inducida por colisión (CID). Los iones con carga no asignada, carga +1 y cargas superiores a +3 fueron excluidas de la fragmentación.

Para la identificación de proteínas se siguió el protocolo descrito por Valledor et al., (2008), según el cual los archivos resultantes del análisis de masas fueron procesados con el software Proteome Discoverer v. 1.4 (Thermo Scientific) utilizando las bases de datos públicas y la base de datos específica de *Pinus* (Romero et al. 2014) mediante el algoritmo SEQUEST integrado en el mencionado software. Fueron utilizados los siguientes parámetros: la tolerancia para los iones precursores fue de 10 ppm y para los iones fragmentados fue de 0,8 Da. Se consideraron como modificación variable la acetilación del N-terminal, la oxidación de la metionina y la carbamidometilación de la cisteína. No se consideraron modificaciones fijas. La confianza de la identificación fue filtrada por el FDR al 5%. El umbral para la identificación de proteínas fue el siguiente: al menos un péptido con X-Corr con un valor de 0,25 más la carga del ion (ejemplo: 2,25 para péptidos con carga +2). Para aquellos péptidos cuyas masas no coincidían con ninguno en la base de datos se realizó un BLASTp contra la base de datos nr-NCBI.

### 5.2.6. Clasificación funcional de las proteínas

Todas las proteínas identificadas por análisis de nLC LTQ Orbitrap y MALDI-TOF-TOF fueron clasificadas de acuerdo a su función utilizando a las bases de datos Kyoto *Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), mediante Blast2GO (Conesa et al., 2005) sobre la base de los resultados de BLASTp contra la base de datos nr-NCBI ( $e < 10^{-3}$ ), o de acuerdo con las anotaciones en la base de datos UniProtKB.

### **5.3. Resultados**

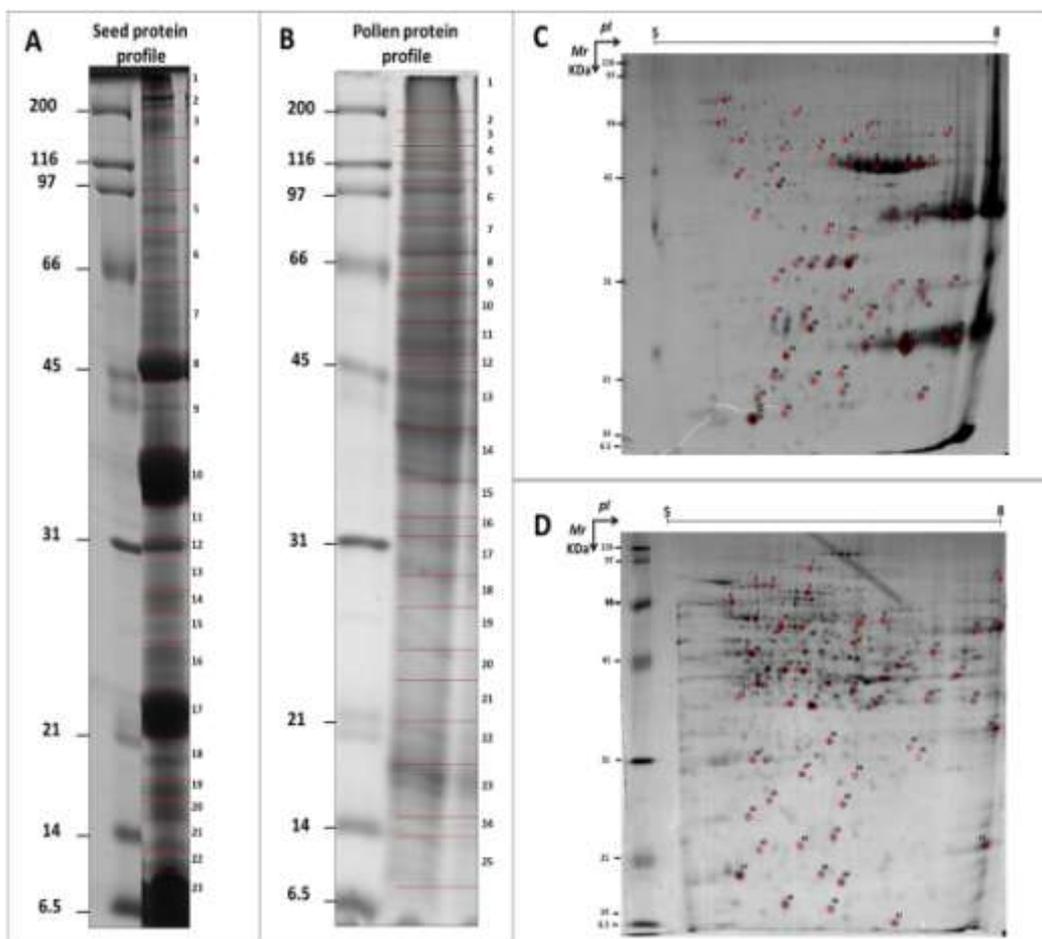
Se ha caracterizado el proteoma de semillas y polen de *P. occidentalis*, utilizando para ello dos estrategias complementarias, la basada en electroforesis en gel mono- y bidimensional y la de “shotgun” o “gel-free label-free”. El uso de ambas técnicas permitiría, a priori, una mayor cobertura del proteoma.

Mediante electroforesis monodimensional, SDS-PAGE, se resolvieron un total de 45 y 44 bandas en extractos proteicos de semillas y el polen, respectivamente, distribuidas en el rango de *Mr* 6-200 *kDa*.

Mediante electroforesis bidimensional se resolvieron 331 spots en extractos de semilla y 626 en extractos de polen. Los spots se distribuyeron en el rango de 6–200 *kDa Mr*, para ambas muestras de tejido.

Para el análisis MS se escindieron las bandas más intensas del gel 1-D, 23 de semillas y 25 de polen (Figura 2 A y B). En el caso de geles 2-DE se escindieron 51 y 52 spots respectivamente, de semillas y polen, correspondiendo a los de mayor intensidad (Figura 2 C y D). Tras la digestión con tripsina, para el análisis MALDI-TOF-TOF y búsqueda en bases de datos se logró identificar un total de 42 especies proteicas en extractos de semilla y 94 en extractos de polen (Anexo 1).

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**



**Figura 2:** Perfil de proteínas 1-DE y 2-DE de las semillas y polen de *P. occidentalis*. Perfil de proteínas de SDS-PAGE de extractos de proteínas de la semilla (A) y el polvo de polen (B). A la izquierda se indica, la posición de los marcadores de peso molecular y el punto isoeléctrico.

Mediante la aproximación *shotgun* se identificaron un total de 187 y 960 especies proteicas en semillas y polen, respectivamente.

Las proteínas identificadas se clasificaron en grupos funcionales. En el caso de proteínas identificadas por MALDI-TOF-TOF a partir de muestras de semilla (bandas de geles 1-D o spots de geles 2-D) la distribución, por funciones, fue: proteínas de reserva (13), respuesta a estrés (3), metabolismo de aminoácidos

(3), plegamiento / procesamiento / transporte / degradación de proteínas (2), rutas de glucólisis y glioxilato (2), procesos redox (1), síntesis de ATP (1), fotosíntesis (1) y citoesqueleto (1).

En el caso de la estrategia *shotgun*, para muestras de semilla, la distribución fue: metabolismo (85), incluyendo procesos catabólicos (40) y metabolismo de carbohidratos (39), respuesta a estrés (35), metabolismo de los lípidos (25), transporte (18) y expresión génica (15).

En el caso de muestras de polen, y mediante MALDI-TOF/TOF las proteínas identificadas se agruparon en: plegamiento / procesamiento / transporte / degradación de proteínas (14); rutas de glucólisis y glioxilato (12); respuesta a estrés (11); síntesis de proteínas (9), plegamiento de DNA (4), síntesis de ATP (3), metabolismo de aminoácidos (3), biosíntesis de la pared celular (3), factores de transcripción (2), proteínas de unión a RNA (2), citoesqueleto (2), metabolismo de carbohidratos (1), ciclo del ácido tricarboxílico (1), fermentación de etanol (1), señalización (1), rutas de piruvato y el ciclo del ácido tricarboxílico (1), la transferencia de electrones (1), procesos redox (1) y metabolismo lipídico (1) (Anexo2).

Las proteínas identificadas mediante *shotgun* fueron agrupadas de acuerdo a su proceso biológico y funciones moleculares (Fig. 4C y D) utilizando el algoritmo Blas2GO. El grupo predominante en este tejido fueron proteínas relacionadas con los procesos redox (200), seguido de la expresión de genes (140), transporte (90), fosforilación (89), proteólisis (70), el metabolismo de carbohidratos (69) y proceso glucolítico (60) (Fig. 4C y D).

#### **5.4. Discusión**

La especie en estudio está muy poco estudiada a nivel molecular. Se realizó una búsqueda en la base de datos *Web of Knowledge* y se encontró que existen pocos artículos publicados en los cuales se realizó un análisis proteómico de especies del género. Este estudio constituye la primera caracterización del

proteoma de semilla y polen de *P. occidentalis*. Se encontraron pocas publicaciones sobre proteoma de polen de *Pinus spp.*, y todas ellas abordaron el análisis mediante la metodología 2-DE (Fernando, 2005; Wu et al., 2008). Por lo tanto no hemos podido comparar el perfil proteico de extractos de polen obtenidos por SDS-PAGE con los existentes en la literatura. Sin embargo, el número de bandas resueltas fue similar a los obtenidos en el perfil de proteínas de polen *Q. ilex* perfil (Valero et al., 2011), en el que se resolvieron un total de 48 bandas y no se observaron proteínas mayoritarias, que si fueron observadas en el perfil proteico de semilla.

En el perfil de proteínas de semilla de *P. occidentalis* se visualizaron cuatro bandas abundantes (Fig. 2A), estos resultados fueron similares a los obtenidos por (Morel et al., 2014), en cotiledones durante la maduración de los embriones cigóticos *P. pinaster*. En análisis de las bandas mayoritarias (8, 10, 12 y 17) mediante MALDI-TOF/TOF no se obtuvieron identificaciones fiables de proteínas, las mismas son referidas en la literatura como proteínas de reserva. Por otro lado cinco *spots* de los geles bidimensionales con los mismos pesos moleculares (12, 13, 15, 41 y 42) fueron identificados como proteínas de reserva de semilla.

En el análisis 2-DE, hubo un menor número de *spots* resueltos en las semillas de *P. occidentalis* que los detectados en las semillas de otras especies forestales como el álamo (*Populus × canadensis* Moench) (1000 *spots*) (Zhang et al., 2015) y *P. pinaster* (976 *spots*) (Morel et al., 2014), pero similar a los detectados en las bellotas (*Q. ilex*)(288 puntos) (Valero et al., 2011). Los *spots* resueltos en polen fueron más numerosos que los obtenidos en el análisis de polen de *Q. ilex*(300 *spots*) (Valero et al., 2011 y *Populus deltoides* (403 *spots*) (Zhang et al., 2015) y similares a los obtenidos para el grano de polen del *Pinus strobus* (645 *spots*) (Fernando, 2005) . Estas diferencias pueden deberse a la metodología empleada, aunque las diferencias biológicas no pueden ser descartadas. A pesar de que los geles 2-DE contienen menos proteínas que los geles de 1-DE, su

resolución es mucho mayor debido a que el uso de dos dimensiones disminuye la posibilidad de co-migración de proteínas en el gel (Echevarría-Zomeño et al., 2009; Plomion et al., 2006). Una ventaja adicional de los geles 2-DE es que proporciona la visualización de diferentes isoformas de una proteína, así como la confirmación visual directa de los cambios en la abundancia de proteínas y en la de modificaciones post-traduccionales (PTMs).

En semillas se detectaron tres isoformas con diferentes *pI* de la *viciline*, proteína de reserva (*spots* 12, 13 y 14; Fig. 2C) que podrían ser de tres formas de PTMs de la proteína; tres isoformas de  $\beta$ -*coniferin* (*spots* 38, 41 y 42; Figura 2C) y tres isoformas de una proteína desconocida (*spots* 23, 24 y 34; Fig. 2C). En polen se detectaron tres isoformas de *3-cetoacil-CoA tiolase 2* (*spots* 16 y 17; la figura 2D), dos de *gluthation peroxidase* (*spots* 20 y 21; la figura 2D) y dos de histona 2A (puntos 22 y 24; Fig. 2D). Estos datos sobre las isoformas se pierden cuando se analizan por aproximaciones *gel-free*, especialmente cuando la especie estudiada es una especie no secuenciada (especies huérfanas) (Jorrín et al., 2015).

En el análisis de MALDI-TOF/TOF los porcentajes de proteínas identificadas en semillas (47% y 55% de 1DE y 2DE, respectivamente) y en polen (92% y 71% de 1DE y 2DE, respectivamente) fueron mayores que los obtenidos en otras especies huérfanas tales como *Q. ilex* (30% de identificación) (Valero et al., 2011), y la obtenida en una especie secuenciada como el álamo (80% de identificación) (Zhang et al., 2015). El alto porcentaje de identificaciones en una especie huérfana tal como *P. occidentalis*, subrepresentadas en las bases de datos públicas de proteínas fue posible debido al uso de una base de datos *Pinus\_DB* creada específicamente para esta especie (Romero et al., 2014).

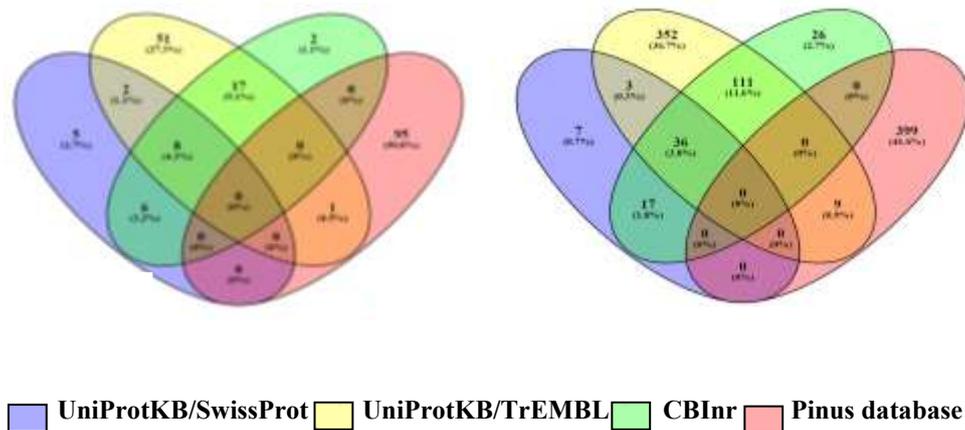
El número de proteínas identificadas por la metodología *gel-free* fue considerablemente mayor que los obtenidos por *gel-based*. Las aproximaciones *gel-free* rara vez se utilizan en el estudio de las especies forestales, es decir, al comparar nuestros resultados con un estudio de polen *Q. ilex* (273 especies proteicas) (Valero et al., 2011) hemos identificado tres veces más la cantidad de

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

proteínas. En las semillas, alrededor de 36 proteínas identificadas se detectaron por ambas aproximaciones, seis proteínas se identificaron exclusivamente por MALDI-TOF/TOF (bandas 13 y 23; *spots* 20, 1, 6, 38, 41 y 42) y 151 proteínas sólo se identificaron por LC-MS/MS. Por otro lado, en el polen, sólo dos proteínas se identificaron exclusivamente por análisis de MALDI-TOF/TOF, un factor de transcripción (banda 5) y proteína PCNT115 inducida por auxina (*spot* 24), las otras 958 proteínas identificadas por LC-MS/MS fueron comunes entre ambas aproximaciones proteómicas. Aunque por LC-MS/MS (*gel-free*) el número de proteínas identificadas fue mayor, se detectaron isoformas y PTM en aproximaciones *gel-based*, como se mencionó anteriormente. Así, ambas aproximaciones son complementarias y mejoran la cobertura de proteoma. Las aproximaciones proteómicas para especies huérfanas, como *P. occidentalis*, se encuentran actualmente limitadas debido a que la identificación de péptidos depende vitalmente de estar siempre disponible en una base de datos de secuencias. Con el fin de mejorar la identificación de proteínas, se usó una base de datos específica hecha a medida para la especie (Romero et al., 2014), y también se incluyó la base de datos pública de proteínas UniProtKB y NCBI. La combinación de dichas bases de datos en el análisis mejoró el número de proteínas identificadas y la base de datos específica aumentaron la confianza de identificación para cada proteína (Romero et al., 2014). Dos diagramas de Venn se construyeron utilizando proteínas identificadas en semillas (Fig 3A) y en polen (Fig. 3B). La base de datos específica para el *Pinus* mejoró el número de proteínas identificadas, es decir, 95 y 399 proteínas en las semillas y el polen, respectivamente, se identificaron solamente con esta base de datos. Sin embargo, es importante destacar que la base de datos pública que se utilizó también contribuyó a la identificación de proteínas específicas, y que estuvieron ausentes en la base de datos específica de la especie. La identificación de especies cruzadas utilizando la base de datos públicos de proteínas es la única opción para la identificación de proteínas cuando un genoma está mal caracterizado o ausente en un repositorio público [(Romero et al., 2014). Sin embargo, se recomienda una

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

base de datos personalizada para los géneros o especies para mejorar la calidad y cantidad de la identificación de proteínas.



**Figura 3: Proteínas identificadas por nLC LTQ Orbitrap utilizando algoritmos SEQUEST, mediante la búsqueda en bases de datos de proteínas combinadas que incluyen una base de datos género específica personalizada. Los diagramas de Venn representan el número de proteínas identificadas en las semillas (A) y el polen (B); los diagramas se representaron usando Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Las cuatro bases de datos utilizadas se indican en diferentes colores.**

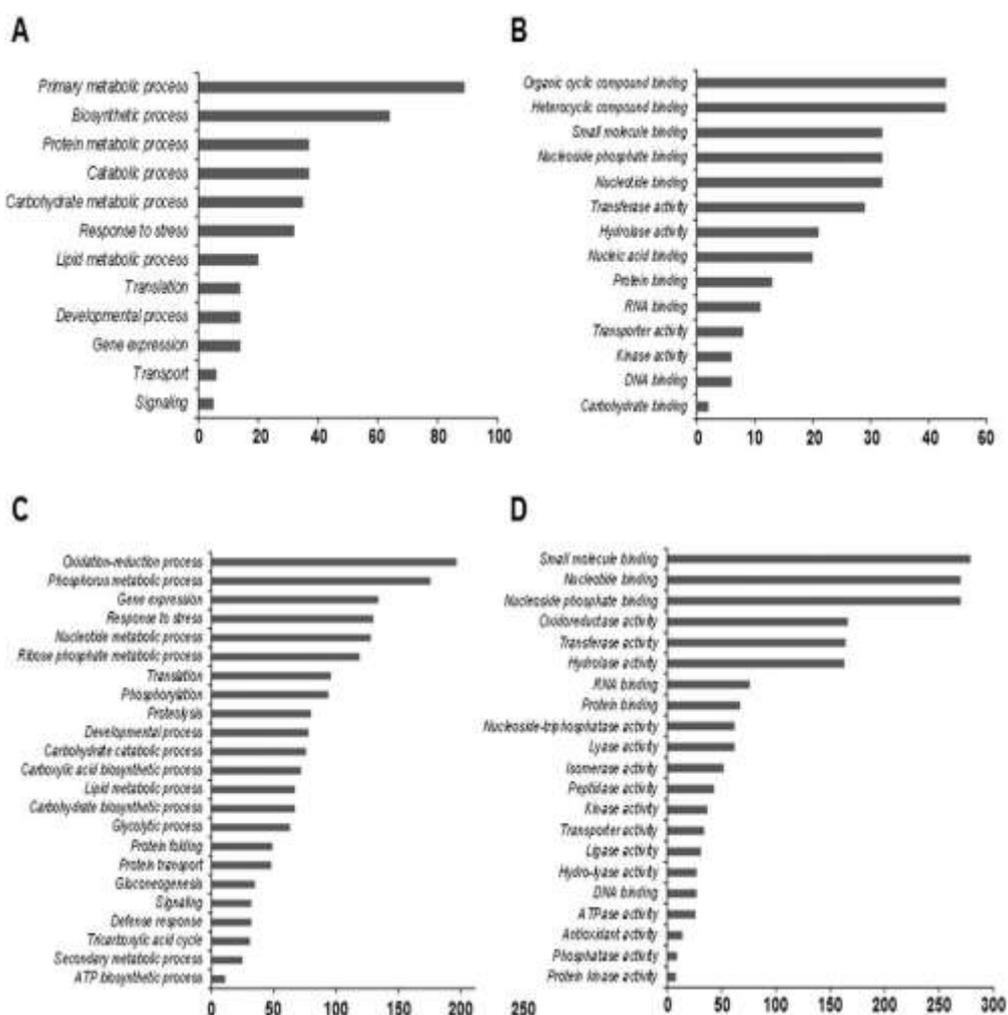
*P. occidentalis* presenta semillas ortodoxas (Bonner, 2008) y las proteínas identificadas fueron muy similares a los identificados en las semillas de álamo (Zhang et al., 2015), por lo que las proteínas de las dos especies se clasificaron como el metabolismo, el reserva, la respuesta a estrés y el crecimiento celular. Las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés (Figura 4A y B) son grupos importantes de las proteínas en las semillas ortodoxas porque protegen la semilla de los daños de oxidación y otros posibles estrés bióticos y abióticos.

Estos grupos de proteínas están generalmente ausentes o presentes en pequeñas cantidades en las semillas no ortodoxas, y este es uno de los factores de pérdida a corto plazo de la viabilidad de las semillas (Berjak y Pammenter, 2013). Sorprendentemente, bajo nuestras condiciones experimentales no se identificaron deshidrinas, un importante grupos de proteínas relacionadas con la tolerancia a la

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

deseccación en las semillas ortodoxas (Hanin et al., 2011). Pero dos tipos de proteínas LEA (LEA LEA 7-4 y 7-2) se identificaron en ambos tejidos.

En polen, los grupos predominantes fueron proteínas relacionadas con procesos redox, seguido de procesos metabólicos, expresión génica, respuesta a estrés y proteínas relacionadas con el metabolismo (Fig 4C y D). Las proteínas que pertenecen a proteínas similares que fueron identificadas en *Arabidopsis*, polen de arroz y *P. strobus*, y la mayoría de ellos estaban asociados con energía, respuesta al estrés y la síntesis y procesamiento de proteínas ( Fernando, 2005; Holmes et al., 2005; Dai et al., 2007).



**Figura 4: Categorización de las proteínas identificadas en las semillas y polen de *P. occidentalis* mediante análisis nLC-MS Orbitrap LTQ. Un total de 187 especies proteicas**

## **Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

en semillas se categorizaron de acuerdo a procesos biológicos (A) y el dominio de la función molecular (B); en polen, un total de 960 especies proteicas se categorizaron de acuerdo con el proceso biológico (C) y el dominio de la función molecular (D) utilizando la ontología de genes (GO) en el software Blast2GO.

El alto número de proteínas relacionadas con la glucólisis en polen fueron identificadas por ambas aproximaciones complementarias lo cual se puede explicar por la gran cantidad de carbohidratos contenidos en los granos de polen, que representan la mayor parte de su peso seco total (Pacini, 1996), y se utilizan como una fuente de energía para sostener el crecimiento del tubo polínico y el desarrollo cuando éste comienza a crecer (Tadege, 1997). Otra categoría funcional importante fueron las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés. Con la aproximación *gel-free* identificamos, reductasa implicada en la biosíntesis de fenilcumarina, que estuvo implicada en la biosíntesis de compuestos vegetales derivados de fenilpropanoides. Estas enzimas se determinaron previamente en el tubos polínico de *P. strobus*. (Fernando, 2005), quien propuso que la phenylcoumaran benzylic reductasa ether probablemente proporciona protección a los tubos polínicos en desarrollo contra el estrés oxidativo que ocurre durante los varios meses que están incrustados en el interior de los conos. Las proteínas identificadas en el polen están resumidas en las figuras 4D y C, fueron muy similares a las obtenidas por Ischebeck et al., (2014) en el que las proteínas más abundantes fueron los relacionados con la glucólisis, proteínas ribosomales, la organización celular, la síntesis de aminoácidos y ciclo TCA. En el trabajo actual las proteínas relacionadas a esas categorías funcionales también fueron detectadas. Sorprendentemente, no se identificaron proteínas alergénicas en el polen por ninguno de los dos enfoques proteómicos incluidos en este estudio.

Cuando se comparó las proteínas identificadas a partir de semillas y polen, un total de 73 proteínas identificadas fueron similares (Anexo 3). Entre estas se incluyen proteínas relacionadas con respuesta a estrés, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de los carbohidratos y expresión génica. Las proteínas

asociadas con la respuesta a estrés son importantes tanto en las semillas y como en el polen para protegerlos de un proceso de desecación que podría aumentar el contenido de especies reactivas al oxígeno y otros tipos de estrés biótico y abiótico.

## **5. 5. Bibliografía**

Abril, N., Gion, J. M., Kerner, R., Müller-Starck, G., Cerrillo, R.M.N., Plomion, C., Jorrin-Novo, J. V. (2011). Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Phytochemistry*, 72(10), 1219-1242.

Bahrman, N., Petit, R. J. (1995). Genetic polymorphism in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) assessed by two-dimensional gel electrophoresis of needle, bud, and pollen proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 41(2), 231-237.

Balbuena, T. S., Jo, L., Pieruzzi, F.P., Dias, L.L., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Floh, E. I. (2011). Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*, 72(4), 302-311.

Baldwin M,A. (2004). Protein Identification by Mass Spectrometry: Issues to be considered. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3, 1-9.

Berjak, P., Pammenter, N.W. (2013). Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science*, 4.

Bonner, F.T. (2008). The woody plant seed manual (No. 727). Government Printing Office.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bueno-Lopez., Bevilacqua, E. (2009). *Silvicultural Tools for Managing Pinus occidentalis*, SW. Statical modelling: Lambert Academic Publishing.

Canovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrin, J., Mock, H.P., Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*, 4(2), 285-298.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

- Capocchi, A., Muccilli, V., Casani, S., Foti, S., Galleschi, L., Fontanini, D. (2011). Proteolytic enzymes in storage protein mobilization and cell death of the megagametophyte of *Araucaria bidwillii* Hook. post-germinated seeds. *Planta*, 233(4), 817-830.
- Chagné, D., Le Dantec, L., Ramboer, A., Frigerio, J.M., Pot, D., Collada, C. (2004). Development of molecular marker in *Pinus pinaster* based on pine ESTs. *Plant Animal Genomes XII Conference*. San Diego, CA, W94.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.
- Costa, P., Bahrman, N., Frigerio, J.M., Kremer, A., Plomion, C. (1998). Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Molecular Biology*, 38(4), 587-596.
- Dai, S., Chen, T., Chong, K., Xue, Y., Liu, S., Wang, T. (2007). Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(2), 207-230.
- Echevarría-Zomeño, S., Ariza, D., Jorge, I., Lenz, C., Del Campo, A., Jorrín, J.V., Navarro, R.M. (2009). Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *Journal of Plant Physiology*, 166(3), 233-245.
- Fernando, D.D. (2005). Characterization of pollen tube development in *Pinus strobus* (Eastern white pine) through proteomic analysis of differentially expressed proteins. *Proteomics*, 5(18), 4917-4926.
- Görg, A., Postel, W., Baumer, M., Weiss, W. (1992). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, with immobilized pH gradients in the first dimension, of barley seed proteins: Discrimination of cultivars with different malting grades. *Electrophoresis*, 13(1), 192-203.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665-3685.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

- Guerrero, J.M., y Gilberto-Torres J. (2001). Ecuación para el cálculo del volumen del árbol para *Pinus occidentalis* Sw., en el Plan Sierra, República Dominicana. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 7, 49-53.
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. Plant Signaling Behavior, 6(10), 1503-1509.
- Holmes-Davis, R., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., McCormick, S. (2005). Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. Proteomics, 5(18), 4864-4884.
- Ischebeck, T., Valledor, L., Lyon, D., Gingl, S., Nagler, M., Meijón, M., Weckwerth, W. (2014). Comprehensive cell-specific protein analysis in early and late pollen development from diploid microsporocytes to pollen tube growth. Molecular and Cellular Proteomics, 13(1), 295-310.
- Jorrín, J. V., Maldonado, A. M., & Castillejo, M. A. (2007). Plant proteome analysis: a 2006 update. Proteomics, 7(16), 2947-2962.
- Jorrín-Novo, J.V., Maldonado, AM., Echevarría-Zomeño, S., Valledor, L., Castillejo, M. A., Curto, M., Redondo, I. (2009). Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. Journal of Proteomics, 72(3), 285-314.
- Jorrín-Novo, J.V., Navarro Cerrillo, R.M. (2014). Variabilidad y respuesta a distintos estreses en poblaciones de encina (*Quercus ilex* L.) en Andalucía mediante una aproximación proteómica. Revista Ecosistemas, 23(2), 99-107.
- Jorrín-Novo, JV., Pascual, J., Sánchez-Lucas, R., Romero-Rodríguez, M.C., Rodríguez-Ortega, M.J., Lenz, C., Valledor, L. (2015). Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. Proteomics, 15(5-6), 1089-1112.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Marmiroli, M., Imperiale, D., Maestri, E., Marmiroli, N. (2013). The response of *Populus* spp. to cadmium stress: Chemical, morphological and proteomics study. *Chemosphere*, 93(7), 1333-1344.

Mathesius, U., Keijzers, G., Natera, S.H., Weinman, J.J., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G. (2001). Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics*, 1(11), 1424-1440.

Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2014). Quinto Informe Nacional de Biodiversidad de la República Dominicana. Santo Domingo, República Dominicana. 80 pp.

Morel, A., Teyssier, C., Trontin, J.F., Eliášová, K., Pešek, B., Beaufour, M., Morabito, D., Boizot, N., Le Metté, C., Belal-Bessai, L., Reymond, I., Harvengt, L., Cadene, M., Corbineau, F., Vágner, M., Label, P. and Lelu-Walter, M.A. (2014). Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 152, 184-201.

Morel, A., Trontin, J. F., Corbineau, F., Lomenech, A. M., Beaufour, M., Reymond, I., Label, P. (2014). Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta*, 240(5), 1075-1095.

Pacini, E. (1996). Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9(6), 362-366.

Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Meddour, H., Kohler, A., Bogeat-Triboulot, M. B., Bastien, C. (2006). Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics*, 6(24), 6509-6527.

Ramagli, L. S., Rodriguez, L. V. (1985). Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis*, 6(11), 559-563.

Romero-Rodriguez M.C, Pascual, J., Valledor L, Jorrin-Novo J. (2014). Improving the quality of protein identification in non-model species. Characterization of *Quercus ilex*

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

seed and *Pinus radiata* needle proteomes by using SEQUEST and custom databases. *Journal of Proteomics*, 105, 85-91.

Sghaier-Hammami, B., Valero-Galván, J., Romero-Rodríguez, M.C., Navarro-Cerrillo, R.M., Abdelly, C., Jorrín-Novo, J. (2013). Physiological and proteomics analyses of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) responses to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant physiology and biochemistry*, 71, 191-202.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), 850-858.

Tadege, M., Kuhlemeier, C. (1997). Aerobic fermentation during tobacco pollen development. *Plant Molecular Biology*, 35(3), 343-354.

Valero Galván, J., Navarro-Cerrillo, R.M., Gil-Pelegrín, E., Jorrín-Novo, J.V. (2011). Studies of variability in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) through acorn protein profile analysis. *Journal of Proteomics*. 74, 1244-1255.

Valero Galván, J., González-Fernández, R., Navarro Cerrillo, R.M., Jorrín-Novo, J.V. (2012). Proteomic analysis of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) pollen. *Journal of Proteomics*, 75, 2736-2744.

Valero, J. (2012). Variabilidad poblacional en encina (*Quercus ilex* subsp. *Ballota* (Desf.) Samp.): morfometría, espectroscopía de infrarrojo cercano y proteómica. (Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias), Universidad de Córdoba.

Valero-Galván, J., González-Fernández, R., Navarro-Cerrillo, R.M., Gil-Pelegrín, E., Jorrín-Novo, J.V. (2013). Physiological and proteomic analyses of drought stress response in Holm oak provenances. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 5110-5123.

Valledor, L., Castillejo, M.A., Lenz, C., Rodríguez, R., Canal, M. J., Jorrín, J. (2008). Proteomic analysis of *Pinus radiata* needles: 2-DE map and protein identification by LC/MS/MS and substitution-tolerant database searching. *Journal of proteome research*, 7(7), 2616-2631.

Valledor, L., Jorrín-Novo, J., Rodríguez, J.L., Lenz, C., Meijón M., Rodríguez R. (2010). Combined proteomic and transcriptomic analysis identifies differentially

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

expressed pathways associated to *Pinus radiata* needle maturation. *Journal of Proteome Research*, 9, 3954-3979.

Valledor, L., Jorrín, J. (2011). Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *Journal of Proteomics*, 74(1), 1-18.

Valledor, L., Cañal, M. J., Pascual, J., Rodríguez, R., Meijón, M. (2012). Early induced protein 1 (PrELIP1) and other photosynthetic, stress and epigenetic regulation genes are involved in *Pinus radiata* D. don UV-B radiation response. *Physiologia Plantarum*, 146(3), 308-320.

Valledor, L., Recuenco-Munoz, L., Egelhofer, V., Wienkoop, S., Weckwerth, W. (2012). The different proteomes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Proteomics*, 75(18), 5883-5887.

Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 27, 2782-2786.

Wang, X., Liu, Z., Niu, L., Fu, B. (2013). Long-term effects of simulated acid rain stress on a staple forest plant, *Pinus massoniana* Lamb: a proteomic analysis. *Trees*, 27(1), 297-309.

Wu, ., Chen, T., heng, M., Chen, ., Teng, N., amaj, J., Lin, J. (2008). Integrative proteomic and cytological analysis of the effects of extracellular Ca<sup>2+</sup> influx on *Pinus bungeana* pollen tube development. *Journal of Proteome Research*, 7(10), 4299-4312.

Zhang, H., Wang, W. Q., Liu, S. J., Møller, I. M., Song, S. Q. (2015). Proteome Analysis of Poplar Seed Vigor. *PloS one*, 10(7), e0132509.

Zhang, J., Wu, L. S., Fan, W., Zhang, X. L., Jia, H. X., Li, Y., Lu, M. Z. (2015). Proteomic analysis and candidate allergenic proteins in *Populus deltoides* CL. "2KEN8" mature pollen. *Frontiers in plant science*, 6.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

ANEXOS

Anexo 1. Lista de las especies proteicas identificadas por MALDI-TOF / TOF MS en las semillas de *P. occidentalis*. Las posiciones de las bandas y los spots se muestran en la Fig. 2. La clasificación funcional se basó en la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) o el proceso biológico descrito en UniProtKB.

N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr kDa		MOWSE score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>PROTEIN IDENTIFIED IN SDS-PAGE</b>										
<b>Oxido reduction process</b>										
1	13	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit J	D4PBB4	<i>Phoenix dactylifera</i>	19	25	83	9	56	
<b>Storage proteins</b>										
2	7	Vicilin-like storage protein	Q40873	<i>Picea glauca</i>	50.3	50	95	7	16	GYIAYVHQNELVK(69)
3	20	Pine globulin-1	Q41017	<i>Pinus strobus</i>	54.9	16	106	5	9	LSTHEPSESESIR(101)
4	21	Pine globulin-2	Q41017	<i>Pinus strobus</i>	54.9	14	85	6	14	LSTHEPSESESIR(71)
<b>Protein folding/processing/transport/degradation</b>										
5	6	Predicted protein	A9U4N3	<i>Physcomitrella patens</i>	71.2	66	113	19	26	TTPSVVAFTDTER(16) NAVVTVPAYFNDSQR(24)
<b>Stress response</b>										
6	22	Pentatricopeptide repeat-containing protein, putative	B9RPX5	<i>Ricinus communis</i>	105.2	13	88	23	25	MQSALAVTKEMSAQNIPR(6)
<b>Unknown</b>										
7	4	Putative uncharacterized protein	77552067	<i>Oryza sativa</i>	212.3	97	83	26	28	LGEEADLHAVQR(2)
8	11	Predicted protein	B9N7U3	<i>Populus trichocarpa</i>	46.9	31	76	13	35	
9	13	OSJNBa0017P10.4	38344456	<i>Oryza sativa</i>	128.7	25	84	21	23	
10	16	Unknown protein	Pr004946_1	<i>Pinus radiata</i>	6.2	20	62	5	84	
11	23	Albumin 3 (Fragment)	Q40997	<i>Pinus strobus</i>	20.4	6	88	4	11	CCEELQR(26)
										GREEEEEEAVER(53)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Spot Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr kDa (pI)		MOWSE score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>f</sup>	Exp <sup>g</sup>				
<b>PROTEIN IDENTIFIED IN 2DE</b>										
<b>Glycolysis and glyoxylate bypass</b>										
12	2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Pp000148_4	<i>Pinus pinaster</i>	28.7(5.41)	76.1(6.3)	359	19	53	AFEYENFSAFDR(57) LPAHYLVSPDIDR(74) TSGEYLVHNGIR(65) FGHVTFWNGNR(43)
13	2	Putative uncharacterized protein	A9NUH9	<i>Picea sitchensis</i>	45.7(5.93)	76.1(6.3)	332	17	32	AHGPAVGLPTEDDMGNSEVGHNALGAGR(51) LDQLQLLLK(40) AFEYENFSAFDR(57) TSGEYLVHNGIR(65) FGHVTFWNGNR(43)
<b>Amino acid metabolism</b>										
14	20	Glutamine synthetase	Pp000021_3	<i>Pinus pinaster</i>	40.1(5.88)	53 (6.0)	139	8	23	HKEHIAAYGEGNER(101)
15	1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase-like protein (Fragment)	Q0WP70	<i>Arabidopsis thaliana</i>	66.1(6.24)	99 (6.2)	76	8	13	LLFAGVVDGR(14)
16	31	Cysteine synthase	Pr000095_1	<i>Pinus radiata</i>	36.4(5.51)	43 (6.1)	62	5	11	LILTMPSSMSIER(16) AFGAELVLTDPAR(35)
<b>ATP synthesis</b>										
17	7	ATP synthase subunit beta	Pp000014_2	<i>Pinus pinaster</i>	48.9(5.12)	60.8(5.8)	749	32	59	VLNTGSPITIPVGR(59) VDDLAPYQR(66) AHGGFSVFAGVGER(58) CALVYQMNPPGAR(33) FTQANSEVSALLGR(82) IPSAVGYQPTLATDLGGLQER(136) QISELGIYPAVDPLDSTSR(88) MLSPHILGEDHYNTAR(32)
<b>Photosynthesis</b>										
18	6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	Q58HY0	<i>Pinus echinata</i>	49.4(6.57)	60.9(6.7)	575	32	49	LTYTPEYQTK(52) TFQPPHGIQVER(104) YGRPLGCTIKPK(35) GGLDFTKDDENVNSQPFMR(67) FVFCAEAIYK(51) DNGLLLHIHR(70) IHGMHFR(1)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Spot Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr kDa (pI)		MOWSE score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>f</sup>	Exp <sup>g</sup>				
<b>Storage proteins</b>										
19	12	Vicilin-like storage protein	Q40873	<i>Picea glauca</i>	50.3(6.63)	49.9(6.7)	136	9	16	GYIAYVHQNELVK(110)
20	13	Vicilin-like storage protein	Q40873	<i>Picea glauca</i>	50.3(6.63)	49.5(7.3)	135	7	15	GYIAYVHQNELVK(110)
21	15	Vicilin-like storage protein	Q40844	<i>Picea glauca</i>	50.3(6.63)	49(7.0)	141	8	17	GYIAYVHQNELVK(106)
22	33	Legumin-like storage protein	Q40870	<i>Picea glauca</i>	57.7(7.09)	16.8(7.4)	78	12	15	ASCVPSWR(27)
										MNAHGIMYVTR(19)
23	35	Allergen gly M Bd 28 kDa protein	Pp017354_2	<i>Pinus pinaster</i>	22.4(9.10)	14.4(6.9)	102	6	30	GPPIYIEDR(71)
24	38	Beta-coniferin (Fragment)	Q40837	<i>Picea glauca</i>	20.2(8.11)	12.8(6.4)	178	14	28	YLGLGAER(63)
										MNAHGIMYVTR(38) GEGRIEVVGDEGR(21)
25	41	Beta-coniferin (Fragment)	Q40837	<i>Picea glauca</i>	20.2(8.11)	11.3(7.2)	181	10	31	YLGLGAER(47)
										MNAHGIMYVTR(88)
26	42	Beta-coniferin (Fragment)	Q40837	<i>Picea glauca</i>	20.2(8.11)	11.1(6.9)	200	15	25	YLGLGAER(62) MNAHGIMYVTR(32) GEGRIEVVGDEGR(22)
										MNAHGIMYVTR(67) MNAHGIMYVTR(24)
27	48	Pine globulin-1	Q41017	<i>Pinus strobus</i>	54.9(8.88)	7.4(7.4)	111	5	6	LSTHEPSESESIR(103)
28	51	Pine globulin-2	Q41018	<i>Pinus strobus</i>	54.9(8.88)	6.1(5.9)	93	5	10	LSTHEPSESESIR(86)
<b>Cytoskeleton</b>										
29	17	Actin	Q9SP17	<i>Picea rubens</i>	41.8(5.30)	45.3(5.7)	688	26	61	AVFPSIVGRPR(53) VAPEEHPVLLTEAPLNPK(106) GYSFTTTAER(53) SSSSIDKSYELPDGQVITIGAER(91) SYELPDGQVITIGAER(108) AEYDESGPSIVHR(105)
<b>Protein folding/processing/transport/degradation</b>										
30	1	Putative uncharacterized protein	A9NXU2	<i>Picea sitchensis</i>	71.8(5.17)	83.4(5.6)	483	35	33	TTPSYVAFTDTER(38) NAVVTVPAYFNDSQR(50) DAGLIAGLNVLRL(47) IINEPTAAAIAYGLDKK(107) MVNHFVQEFK(45) ARFEELNMDLFR(30) NSLENYAYNMR(3)
<b>Stress response</b>										
31	5	Catalase	Pp002276_2	<i>Pinus pinaster</i>	53.9(6.09)	64(7.6)	476	29	46	FAAFDRER(23) APGVQTPVIVR(68) FSTVIHER(53) EGNFDIVGNIPVFFTR(96) DAMQFPDVIR(43) TFAYGDTQR(21) VPIPADVISDQR(15)
										VLQISGER(26)
32	44	Heat-shock protein, putative	Pp005950_3	<i>Pinus pinaster</i>	12.9(7.05)	8.8(6.7)	228	12	56	FRLPENVK(17) ASMENGLTVTVPKQPEPQPQPK(64)
										QPEPQPQPK(52)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Spot Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr kDa (pI)		MOWSE score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>f</sup>	Exp <sup>g</sup>				
<b>Unknown</b>										
33	9	Unknown protein	Pr000900_3	<i>Pinus radiata</i>	34.3(7.16)	56.8(6.1)	527	26	61	KIPLYQHIANIAGNK(71) TLVMPVPAFNVINGGSHAGNK(50) LAMQEFMILPVGASSFR(26) YDLNFKKEENNGSQK(37) VQIVGDDLLVTNPK(94) VNQIGSVTESIEAVK(84) YNQLLR(18)
34	11	Unknown protein	P85944	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1.7(8.50)	50(7.4)	79	2	92	GYIAYVHQNELVK(66)
35	20	Uncharacterized protein	J3MFV9	<i>Oryza brachyantha</i>	31.4(9.60)	32.5(7.3)	79	13	40	NIELEGTFDQIK(3)
36	22	Putative epoxide hydrolase (Fragment)	B8RII5	<i>Pinus contorta</i>	12.6(6.92)	32.3(5.9)	152	5	50	SGFVFPMPQVPYLCSK(50) FFPEGSHFVQEQFPK(79)
37	23	Unknown protein 22 (Fragment)	P85944	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1.7(8.50)	28(6.5)	121	3	100	GYIAYVHQNELVK(100)
38	24	Unknown protein 22 (Fragment)	P85944	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1.7(8.50)	27.6(6.8)	131	3	100	GYIAYVHQNELVK(111)
39	34	Unknown protein 22 (Fragment)	P85944	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1.7(8.50)	16.5(6.7)	127	3	100	GYIAYVHQNELVK(106)
40	39	Putative uncharacterized protein integral component of membrane	Pp003163_1	<i>Pinus pinaster</i>	11.6(9.17)	12.1(7.7)	60	10	54	
41	40	Uncharacterized protein microtubule-based movement	K4DAY9	<i>Solanum lycopersicum</i>	118.(5.48)	12.0(7.6)	81	24	19	GGMDANQALR(6)
42	45	HSP20-like chaperones superfamily protein integral component of membrane	Pp000034_1	<i>Pinus pinaster</i>	23.2(6.51)	8.7(6.1)	82	10	27	NDQWHR(10) FRLPENTK(17)

<sup>a</sup> Band and spot number as given on the 1DE and 2-DE gel images in Fig 2A and C, respectively.

<sup>b</sup> Pinus\_DB, NCBI and Uniprot accessions numbers. The accession whose first letters were Pp or Pr correspond to Pinus\_DB accessions, the numeric accession correspond to NCBI accessions, the rest correspond to Uniprot\_KB.

<sup>c</sup> Molecular weight (kDa) of protein calculated for each database.

<sup>d</sup> Molecular weight (kDa) of protein calculated by using molecular weight standards and the Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, USA).

<sup>e</sup> Mascot score ( $S = -10 \times \log(P)$ ): where P is the probability that the observed match is a random event, peptide matched in MS analysis, percentage of sequence coverage (into the brackets), and ions sequence matched (ion score into the brackets) from MS/MS analysis.

<sup>f</sup> Molecular weight (kDa) and isoelectric point of protein calculated for each database.

<sup>g</sup> Molecular weight (kDa) and isoelectric point of protein calculated by using molecular weight standards and the PD-Quest Advance (8.01) software.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Anexo 2. Lista de las especies proteicas identificadas por MALDI-TOF/TOF MS en el polen de *P. occidentalis*. Las posiciones de las bandas y los spots se muestran en la Fig. 2. La clasificación funcional se basó en la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) o el proceso biológico descrito en UniProtKB.

PROTEINS IDENTIFIED IN 1DE GEL PIECES										
N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>Glycolysis and glyoxylate bypass</b>										
1	17	Triosephosphate isomerase	Pp003078_1	<i>Pinus pinaster</i>	30.1	30	123	3	17	FFVGGNWK(42) VATPAQAQEVHYELR(62)
2	13	Fructose-bisphosphate aldolase	Pp000367_2	<i>Pinus pinaster</i>	41.3	40	80	7	224	IGITEPSPLAIQENANGLAR(39) DENIPAAQAAALISR(16)
3	14	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	Pr000762_3	<i>Pinus radiata</i>	34.2	37	166	9	32	GILGYTEDAVVSTDFIGDSR(80) LVSWYDNEWGYSSR(43)
4	13	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	P34924	<i>Pinus sylvestris</i>	36.6	40	262	12	34	IGINGFGR(50) GILGYTEDAVVSTDFIGDSR(113) LVSWYDNEWGYSSR(42)
5	9	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Pp000148_4	<i>Pinus pinaster</i>	28.7	62	144	10	33	AFEYENFSAFDR(56) FGHVTFWNGNR(39)
6	9	Malate synthase	Pp000252_1	<i>Pinus pinaster</i>	66	62	119	12	21	EALQFVADLQR(27) EAALWNAVFER(57)
<b>Carbohydrate metabolism</b>										
7	5	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	Pp004505_2	<i>Pinus pinaster</i>	33	100	137	7	23	YNYTPLLDSLEGSEGYGR(107)
<b>Transcription factors</b>										
8	5	TUDOR protein with multiple SNe domain	Pr002320_2	<i>Pinus radiata</i>	19.8	100	63	5	20	SNFYDALLAAESR(48)
9	5	TUDOR protein with multiple SNe domains	Q0JRI	<i>Picea abis</i>	109	100	104	16	16	SNFYDALLAAESR(48) TVDGILLIQAEENAR(14)
<b>Tricarboxylic acid cycle</b>										
10	6	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Pp000097_3	<i>Pinus pinaster</i>	50.6	80	65	14	30	
<b>Ethanol fermentation</b>										
11	9	Pyruvate decarboxylase	Pp011442_1	<i>Pinus pinaster</i>	17.7	62	68	2	9	ILHHTIGLPDFSQEYR(63)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>ATP synthesis</b>										
12	10	ATP synthase subunit beta	Pr000826_1	<i>Pinus radiata</i>	32.5	55	450	18	57	VVDLLAPYQR(47) AHGGFSVFAGVGER(65) FTQANSEVSALLGR(84) IPSAVGYPPTLATDLGGLQER(116) QISELGIYPAVDPLDSTSR(49)
<b>Protein synthesis</b>										
13	15	60S ribosomal protein L37a	Pr010849_2	<i>Pinus radiata</i>	28.3	35	57	8	22	LRAEDVQGR(8) ATSSIYPLQNVFIR(27)
14	16	40S ribosomal protein S4	Pp000492_2	<i>Pinus pinaster</i>	30.3	33	93	11	28	EVIIVMQR(16) GIPYLNTYDGR(46)
15	19	60S ribosomal protein L13ab	Pp009717_1	<i>Pinus pinaster</i>	21.8	27	149	11	38	MNTKPSHGPIHFR(3) LRAFEGVPPPYDR(39) AFEGVPPPYDR(61)
16	20	60S ribosomal protein L18a	Pp000637_1	<i>Pinus pinaster</i>	23.3	25	83	10	39	FHQYQVVGR(41)
17	21	Ribosomal protein 5Bb	Pr010964_1	<i>Pinus radiata</i>	21.1	23	125	7	23	HATFVPHTAGR(35) VNQAIFLLT GAR(63)
18	25	60S ribosomal protein L37a	Pp005292_2	<i>Pinus pinaster</i>	13	13	59	4	31	AGGAYTLNTPSAVT VR(41)
19	11	Elongation factor 1-alpha	Pr010455_2	<i>Pinus radiata</i>	49.9	49	118	9	21	VETGVKPGMIVT FGPTGLTTEVK(36) MIPTKPMVVETFAEYPLGR(57)
20	12	Elongation factor 1-alpha	Pp012287_1	<i>Pinus pinaster</i>	11.2	45	66	6	54	MIPTKPMVVETFAEYPLGR(27)
<b>Protein folding/processing/transport/degradation</b>										
21	22	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Q5Y2E8	<i>Pinus halepensis</i>	18.3	21	158	12	51	VFFDMQVGGAPAGR(60) VIPGFMCGGDFTR(17) FADENFVKK(13)
22	18	Ras-related protein RABA1e	O49513	<i>Arabidopsis thaliana</i>	24.4	29	85	10	38	AQLWDTAGQER(33) AITSAYYR(4)
23	6	Exo70 exocyst complex subunit family protein	B6SWM6	<i>Zea mays</i>	62.6	70	78	13	26	LDSAVGAAASRMVEEFLR(6) GSLAGVSDLIAGLER(12)
24	7	Exo70 exocyst complex subunit family protein	B6SWM6	<i>Zea mays</i>	62.6	80	78	13	26	LDSAVGAAASRMVEEFLR(6) GSLAGVSDLIAGLER(12)
25	18	Proteasome subunit beta type	Pp016480_3	<i>Pinus pinaster</i>	12.9	29	64	7	44	SIYHATFR(22)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>c</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>d</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>Stress response</b>										
26	24	Glycine-rich RNA-binding protein	Pp000537_3	<i>Pinus pinaster</i>	21.3	14	120	7	30	SLQEAFSPYGEVVESK(69) GFGFVTFNDEQSMR(21)
27	8	Heat shock protein 70	B3GPH1	<i>Camellia sinensis</i>	75.5	66	202	19	24	TTPSYVAFTDTER(28) NAVVTVPAYFNDSQR(43) IINEPTAAAIAYGLDKK(62)
28	17	Ascorbate peroxidase	Pr010810_2	<i>Pinus radiata</i>	29.7	31	164	10	33	YAQDEDAFFADYAEHLK(109)
29	20	Glutathione peroxidase	EOZLM7	<i>Picea sitchensis</i>	18.1	25	134	9	37	FLVDKDGNNVER(78)
30	21	Glutathione peroxidase	Pp001154_3	<i>Pinus pinaster</i>	15.3	23	87	5	33	FLVDKDGNNVER(59)
<b>DNA binding</b>										
31	22	Histone H2A	Pp019477_1	<i>Pinus pinaster</i>	16.2	21	63	3	12	AGLQFPVGR(53)
32	23	Histone H3.2	Pp010833_2	<i>Pinus pinaster</i>	15.6	17	86	6	23	FRPGTVALR(26) EIAQDFKTDLR(46)
33	24	Histone H2A	Pp004797_2	<i>Pinus pinaster</i>	16.6	14	69	4	18	AGLQFPVGR(57)
34	25	Histone H4 (Fragment)	Q8L6T9	<i>Daucus carota</i>	7.4	13	92	8	69	ISGLIYEETR(36)
<b>Unknown</b>										
35	3	Putative uncharacterized protein	B8ATM1	<i>Oryza sativa subsp. indica</i>	117.6	118	83	24	22	
36	3	Uncharacterized protein	Pr009102_2	<i>Pinus radiata</i>	127	118	68	13	9	QKPIHSFPDATR(22) NTISPYKEFVGHSR(13) SLKYDYDGR(7)
37	4	Putative uncharacterized protein	Pr009995_2	<i>Pinus radiata</i>	67.8	116	87	10	14	MLEIIQEIK(16) NSTQLHVIPLASR(48)
38	11	Putative uncharacterized protein	B8LL07	<i>Picea sitchensis</i>	48.3	49	126	11	34	KIPLYQHIANIAGNK(60) LAMQEFMILPVGASSFR(14)
39	13	Putative uncharacterized protein	Pr000405_2	<i>Pinus radiata</i>	42.8	45	59	9	14	GFDYELYNRNDINR(38)
40	14	Unknown protein	Pr002248_3	<i>Pinus radiata</i>	24.7	37	108	3	19	IGTTEPSPLAIQENANGLAR(97)
41	14	Uncharacterized protein	Pr000922_3	<i>Pinus radiata</i>	28.4	37	102	6	24	VLDIASFQPIPR(73)
42	15	Uncharacterized protein	I1IUQ0	<i>Brachypodium distachyon</i>	201.1	35	75	24	14	
43	16	Uncharacterized proteinb	Pr010765_1	<i>Pinus radiata</i>	30	33	135	10	27	DLLNKDYNFDQK(50) AIFSFTVPDQR(22) AAALLQHEWRPK(20)
44	17	Putative uncharacterized protein	Pp002674_3	<i>Pinus pinaster</i>	29.9	30	92	10	29	VEPYVTYGYPNLK(57)
45	19	Putative uncharacterized protein	Pp003104_2	<i>Pinus pinaster</i>	27.4	27	72	9	29	AQIWDTAGQER(22) HVTFENVER(9)
46	23	Uncharacterized protein	Pp011594_3	<i>Pinus pinaster</i>	7.3	17	104	5	60	TSNYETAPGAEFDEAK(67)
47	25	Uncharacterized protein	I1MIJ9	<i>Glycine max</i>	142.8	8	90	22	19	TTSFIDKWDCK(3) CPQFESFPNEGLSAPR(11)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

PROTEINS IDENTIFIED IN 2DESPOT										
N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>c</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>Glycolysis and glyoxylate bypass</b>										
48	5	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Pp000148_4	<i>Pinus pinaster</i>	28.7(5.41)	84.5(6.3)	385	18	49	QGVDALIASGGGR(49) AFEYENFSAFDR(79) AFEYENFSAFDRVR(13) LPAHYLVSPDIDR(72) TSGEYLVHNGIR(71)
49	3	Phosphoglucomutase	Pp003452_2	<i>Pinus pinaster</i>	40.7(5.31)	88.4(5.7)	122	10	15	YLFEDGSR(20) LYIEQYEAADSTK(70)
50	15	Phosphoglycerate kinase	C0PRH2	<i>Picea sitchensis</i>	41.6(6.28)	66.4(7.8)	102	9	14	KIGGYLPNTR(32) IGGYLPNTR(42)
51	16	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal	Pp000315_1	<i>Pinus pinaster</i>	44.9(5.62)	63.0(6.7)	102	11	30	ALIDKTGLNPVEVGDIVVGTVLAPGSQR(15) MAAFYAGFPETVPVR(24) GLPILGVFR(17)
52	17	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal	Pp003463_1	<i>Pinus pinaster</i>	16.0(6.08)	58.7(7.4)	116	6	49	MASFYAGFPETVPVK(77)
53	17	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal	G7JUJ9	<i>Medicago truncatula</i>	46.2(8.44)	58.7(7.4)	106	7	17	GLPILGIFR(53) VNVNGAMAFGHPLGATGAR(33)
<b>Amino acid metabolism</b>										
54	20	Glutamine synthetase	Pp000021_3	<i>Pinus pinaster</i>	40.1(5.88)	53.2(6.0)	139	8	23	HKEHIAAYGEGNER(101)
55	1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase-like protein (Fragment)	Q0WP70	<i>Arabidopsis thaliana</i>	66.1(6.24)	99(6.2)	76	8	13	LLFAGVVDGR(14) YGAGIGPQVYDIHSPR(42)
56	31	Cysteine synthase	Pr000095_1	<i>Pinus radiata</i>	36.4(5.51)	43.7(6.1)	62	5	11	LILTMPSSMSIER(16) AFGAELVLTDPAR(35)
<b>ATP synthesis</b>										
57	7	ATP synthase subunit beta	Pp000014_2	<i>Pinus pinaster</i>	48.9(5.12)	72.3(5.8)	770	31	59	VLNTGSPITIPVGR(63) VVDLLAPYQR(67) AHGGFSVFAGVGER(75) CALVYQGMNEPPGAR(23) FTQANSEVSALLGR(76) IPSAVGYQPTLATDLGGLQER(148) QISELGIYPVDPDSTSR(87) MLSPHILGEDHYNTAR(26)
58	8	ATP synthase subunit alpha (Fragment)	Q9T672	<i>Pinus sp</i>	44.0(8.52)	72.3(6.9)	431	20	41	AVDSLVP1GR(36) DNGMHALIIYDDLK(97) EAFPGDVLYLHSR(115) LELAQYR(17) QPQYSP1PIEK(51)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>Signaling</b>										
59	24	Auxin-induced protein PCNT115	G7L1V6	<i>Medicago truncatula</i>	31.9(5.87)	51.1 (7.0)	118	7	20	IDTTVPIEDTMGELK(30) ELGIQIVPYSPLGR(63)
<b>RNA binding proteins</b>										
60	11	Polyadenylate-binding protein RBP47C	Pp000875_1	<i>Pinus pinaster</i>	49.1(6.36)	70.0 (6.7)	110	14	20	NKYTQQSEGYGFMEFISR(7) SKGYGFVR(8) KSAGVQQQYSGR(20) CCGFVQFANR(25)
61	49	Glycine-rich RNA-binding protein	Q9XEL4	<i>Picea glauca</i>	15.5(7.85)	13.2 (6.0)	248	11	45	SLQEAFFSPYGEVVESK(108) IISDRETGR(16) GFGFVTFNDEQSMR(32) SITVNPQSR(34)
<b>Cytoskeleton</b>										
62	18	Actin	Q9SP17	<i>Picea rubens</i>	41.8(5.30)	59.0 (5.7)	673	28	63	AGFAGDDAPR(26) AVFPSVGRPR(55) VAPEEHPVLLTEAPLNPK(121) GYSFTTTAER(39) SYELPDGQVITIGAER(88) AEYDESGPSIVHR(86) AEYDESGPSIVHRK(59)
63	29	Annexin	Pr000051_2	<i>Pinus radiata</i>	25.7(6.77)	43.6 (7.7)	448	25	65	LHEILGHR(30) QTYTQLYEEDFLKR(63) LLVQLVSSYR(69) AFGNEELIR(64)
<b>Protein synthesis</b>										
64	13	Elongation factor 1-alpha	Pr010455_2	<i>Pinus radiata</i>	49.9(9.12)	67.8 (6.8)	306	21	34	YYCTVIDAPGHR(36) EHALLAFTLGVR(29) IGGIGTVPVGR (38) MIPTKPMVVETFAEYPLGR (53) QTVAVGVK(59)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>Protein folding/processing/transport/degradation</b>										
65	3	Putative uncharacterized protein Sb10g026440	C5Z7B5	<i>Sorghum bicolor</i>	68.7(5.31)	88.4 (5.7)	130	17	18	LASFYER(7) NIHFNTLANQAVR(35) LYDDLTAGFR(32)
66	4	Putative uncharacterized protein Sb10g026440	C5Z7B5	<i>Sorghum bicolor</i>	68.7(5.31)	88.4 (5.9)	225	18	25	LAADTPLLGGQR (39) LAEMPADSGYPAYLAAR(42) LASFYER (10) NIHFNTLANQAVR (31) LYDDLTAGFR (37)
67	4	Putative uncharacterized protein	Pr002033_3	<i>Pinus pinaster</i>	20.5(5.08)	88.4 (5.9)	158	10	57	LVSQKFEDPAEGEPALVQK(33) NIHFNTLANQAVR(31) LYDDLTAGFR(37)
68	4	Putative uncharacterized protein	A9NUH	<i>Picea sitchensis</i>	45.7(5.93)	84.5 (6.3)	284	15	31	LDQLQLLK(49) AFEYENFSAFDR(79) AFEYENFSAFDRVR(13)
69	6	Putative uncharacterized protein	D8QSF2	<i>Selaginella moellendorffii</i>	64.4(5.84)	81.0 (5.6)	149	7	13	TNDLAGDGT T T SVVLAQGLINEGVK(100) VAAIKAPGFGER(32)
70	24	Putative uncharacterized protein	A9NPE7	<i>Picea sitchensis</i>	38.8(5.51)	51.1 (7.0)	132	8	13	ELGIGVYSPYPLGR(63) LIENLADDDFR(31) LIENLADDDFRK (22)
71	28	Predicted protein	A9T5S8	<i>Physcomitrella patens subsp</i>	32.4(5.57)	44.2 (7.3)	167	8	9	VAIVTGGDSGIGR(62) GLALQLVK(43) GLALQLVQR(44)
72	50	Outer envelope pore protein 16-2, chloroplastic	Pp018187_2	<i>Pinus pinaster</i>	16.7(7.98)	11.2 (6.2)	678	18	77	FDGPNVDVLDLGHPLLNR(65) VGGIGALNAASQDAYK(177) LVLQEEANK(51) ASFENMVQNMKG(73) NALVGGALAGAALSLTESNPR (82) VVQAAITGAIATAAEFLR(104)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>c</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>Stress response</b>										
73	30	Aldo-keto reductase, putative	Pp003093_3	<i>Pinus pinaster</i>	38.6(6.29)	44.4 (6.9)	65	5	14	HFDTASLYR(49)
74	45	Universal stress protein A-like protein	Pp002443_2	<i>Pinus pinaster</i>	19.5(5.65)	18.8 (5.8)	245	9	57	WALDNLADKGD(50) QYDLNPDAETLDDLDTASR(137)
75	47	Putative intracellular pathogenesis related type 10 protein	Pp001255_2	<i>Pinus pinaster</i>	18.1(5.37)	15.8 (5.6)	204	6	15	QLNFTPANKDFSYAK(100) KLSASNFEK(82)
76	47	Pathogenesis-related protein 10-3.3-like	Q313X5	<i>Picea abies</i>	17.8(5.02)	15.8 (5.6)	256	8	33	QLNFTPANKDFSYAK(100) VDEMDEEKMXFK(16) YTTIEGGLLGK(99)
77	48	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P24669	<i>Pinus sylvestris</i>	15.5(5.75)	15.6 (6.6)	116	2	11	GVVQFTQEGDPTT VT GK(110) ILIGATGYIGR(55)
78	32	Phenyleoumaran benzylic ether reductase	Pr000898_1	<i>Pinus radiata</i>	31.2(7.16)	43.3 (6.3)	474	18	49	ASVALGHP T FLLVR(104) FLPSEFGNDVNVHAVEPAK(130) VYVPEEQVLK(80)
<b>Cell wall biosynthesis</b>										
79	25	Unknown protein	Pr000922_3	<i>Pinus radiata</i>	28.5(5.34)	49.3 (6.5)	557	19	46	IVSTASTGKLDVFK(105) SHVVAKEEAK(62) VLDIASFQPIPR(84) VEFFLVTPSAHNLEK(86) LKPVIDPK(32)
80	32	Isoflavone reductase-like protein	Q3KN69	<i>Vitis vinifera</i>	34(5.5)	43.3 (6.3)	92	4	10	VYVPEEQVLK(80)
81	33	Putative uncharacterized protein	Pp002826_3	<i>Pinus pinaster</i>	29.1(9.15)	37.8 (7.9)	138	13	33	SVGSLAGSALDDQILMGR(22) EAAHIFRPFVGFK(33)
<b>Piruvate pathways and tricarboxylic acid cycle</b>										
82	32	Malate dehydrogenase	Pp003540_1	<i>Pinus pinaster</i>	31.9(9.56)	43.3 (6.3)	63	7	19	KLFGVTTLDVVR(30)
<b>Electron transfer</b>										
83	39	ATP synthase subunit delta, mitochondrial precursor	Pp003628_2	<i>Pinus pinaster</i>	23.0(7.19)	24.7 (5.9)	84	6	20	VAPNMEPPKTPLSFMK(7) ARPAVPGSIPTK(20) LTVNFVLPYQSELT SK(41)
<b>Redox maintenance</b>										
84	44	Type II peroxiredoxin	Pp000672_2	<i>Pinus pinaster</i>	9.6(5.62)	19.5 (6.2)	71	2	19	IILFGVPGAFPT CSMK(64)
<b>Lipid metabolism</b>										
85	51	Alcohol dehydrogenase (Fragment)	Q43300	<i>Pinus banksiana</i>	41.1(5.76)	10.1 (6.9)	769	32	72	GQTP LFPR(43) KGS TVAVFGLGAVGLGAAEGAR(218) IIGDLISER(51) IIGDLISERFEK(61) TLKGT FYGNYKPR(12) GT FYGNYKPR(62) AFDYMLKGESLR(46)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>c</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
<b>Unknown</b>										
86	9	Putative uncharacterized protein	DSACF4	<i>Picea sitchensis</i>	55.3(5.87)	70.8 (6.8)	151	14	19	SQYIGGDFR(19)
										ELLAVATPGQVTEVELNR(7)
										MVVTEDIQR(3) QILTYGQR(30)
										KPVEHFLK(46)
87	12	Putative uncharacterized protein	B8LL07	<i>Picea sitchensis</i>	48.3(5.78)	68.5 (6.2)	393	20	54	KIPLYQHIANIAGNK(73)
										TLVMPVPFNVINGGSHAGNK(56)
										EAMQMGEVYHHLK(14)
										YDLNFKEENNGSQK(9)
										VQIVGDDLLVTNPK(80)
										VNQIGSVTESIEAVK(54)
										YNQLLR(15)
88	14	Putative uncharacterized protein	DSACF4	<i>Picea sitchensis</i>	55.3(5.87)	68.5 (6.0)	172	6	10	LNGTILEEFVTENYTAAPR(104)
										ELLAVATPGQVTEVELNR(55)
89	19	Putative uncharacterized protein	Pr010502_1	<i>Pinus radiata</i>	42.5(6.77)	55.1 (7.1)	455	15	32	AKDDEGFPAFALVVK(88)
										ISPILGASQGVHPPR(68)
										GEQSSFYPPQANVEPQGHVVR(77)
										IHCANPEFFLAAR(67)
										VKDEAGFPAFALVVK(90)
90	20	Putative uncharacterized protein	Pr000405_2	<i>Pinus radiata</i>	42.9(5.63)	53.2 (6.0)	485	29	46	GFDYELYNR(35)
										GFDYELYNRNDINR(49)
										CFGYMVSK(41)
										GYPFSLR(29)
										ASNPFVNLR(47)
										ASNPFVNLR(49)
										VDPYFQK(36)

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

N°	Band Number <sup>a</sup>	Protein name	Accession number <sup>b</sup>	Species	Mr Kda		Mowse score <sup>e</sup>	Peptides match	Sequence coverage (%)	Fragmented ion (ion score)
					Theor <sup>c</sup>	Exp <sup>d</sup>				
Unknown										
91	21	Putative uncharacterized protein	Pr000405_2	<i>Pinus radiata</i>	42.9(5.63)	53.0 (6.2)	646	31	54	GFDYELYNR(39)
										GFDYELYNRNDINR(45)
										CFGYMVSK(43)
										GYPFSLR(32)
										TGLPYIWHSK(55)
										ASNPFVNLKK(48)
										ECTSVQQCYVELSK(95)
ESLGKVPDYFQK(75)										
92	33	Putative uncharacterized protein	Pp002826_3	<i>Pinus pinaster</i>	29.1(9.15)	37.8 (7.9)	138	13	33	SVGSLACGALDDQILMGR(22)
										EAAHIFRPFVGFK(33)
93	43	Unknown protein	Pr003378_1	<i>Pinus radiata</i>	14.6(5.91)	18.3 (7.8)	179	3	29	VANIEEGPNFEVSSAEILK(166)
94	46	Unknown protein	Pr002362_3	<i>Pinus radiata</i>	15.7(8.54)	16.5 (6.4)	340	12	57	VDEIDEKMFVK(75)
										YTTIEGGLLGGK(99)
										KLSASNFELK(82)

a Band and spot number as given on the 1DE and 2-DE gel images in Fig 2B and D, respectively.

bPinus\_DB, NCBI and Uniprot accessions numbers. The accession whose first letters were Pp or Pr correspond to Pinus\_DB accessions, the numeric accession correspond to NCBI accessions, the rest correspond to Uniprot\_KB.

c Molecular weight (kDa) of protein calculated for each database.

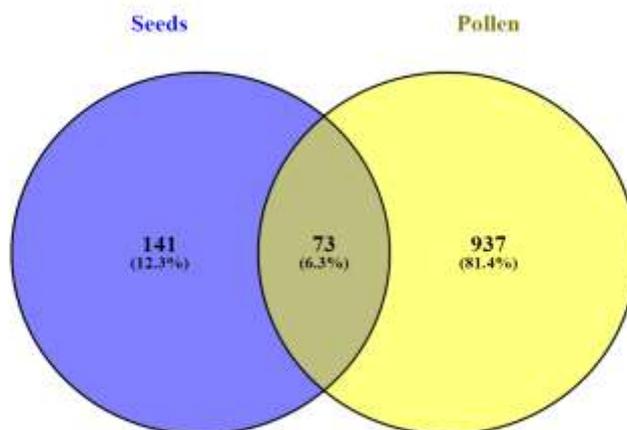
d Molecular weight (kDa) of protein calculated by using molecular weight standards and the Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, USA).

e Mascot score ( $S = -10 \times \log(P)$ ): where P is the probability that the observed match is a random event, peptide matched in MS analysis, percentage of sequence coverage (into the brackets), and ions sequence matched (ion score into the brackets) from MS/MS analysis.

f Molecular weight (kDa) and isoelectric point of protein calculated for each database.

g Molecular weight (kDa) and isoelectric point of protein calculated by using molecular weight standards and the PD-Quest Advance (8.01) software.

Anexo 3. Las proteínas comunes entre las semillas y el polen de *P. occidentalis*.



**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

## **Capítulo 6. Discusión General**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

La variabilidad genética y poblacional es una de las características comunes a muchas especies forestales, lo que les ha permitido adaptarse a condiciones ambientales, climáticas y edáficas, muy diversas, colonizar diferentes ecosistemas y presentar una amplia distribución geográfica (Salvador et al., 2000; Aila et al., 2003). A pesar de ello, hoy en día muchas especies y poblaciones están en clara regresión, siendo los factores antropogénicos, p.e. sobreexplotación, incendios, etc, uno de los motivos fundamentales de la pérdida de masa forestal. La situación puede ser dramática si tenemos en cuenta las condiciones de cambio climático previstas en un futuro próximo. *Pinus occidentalis* y otras coníferas no son una excepción a esta regla, siendo motivo de preocupación en países del entorno Caribeño, tales como México, Guatemala, Cuba y República Dominicana. En estos países se hace urgente una política de conservación, manejo y regeneración de los bosques como forma de riqueza tanto medioambiental como económica. Las actuaciones biotecnológicas en el ámbito forestal pasan necesariamente por el uso de la variabilidad natural y la selección de individuos élite para su posterior propagación. Las características biológicas de las especies forestales (ciclo biológico largo), su longevidad, carácter silvestre (no son especies domesticadas), entre otros factores, hacen inviables o imposibles otras actuaciones tales como los programas de mejora clásica o ingeniería genética.

La caracterización de la biodiversidad puede llevarse a cabo mediante características fenotípicas (morfoanatomía), fenología, y por técnicas moleculares. Los estudios de bioquímica y biología molecular contribuyen al conocimiento de las bases genéticas y ambientales de la diversidad, de la biología de la especie, y de la selección sobre una base más científica que empírica.

Dichos estudios son totalmente inexistentes para muchas de las especies forestales entre las que se incluye *Pinus occidentalis*, el pino criollo, objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Se ha planteado como objetivos concretos el estudio de predicción de hábitat en el momento actual y en un futuro cercano, la caracterización morfoanatómica de individuos de diferentes zonas geográficas dentro de la República Dominicana, la variabilidad genética existente mediante análisis de marcadores de DNA microsatélite y la puesta a punto de técnicas de proteómica para el análisis de semillas y polen.

La distribución actual y las predicciones futuras se analizaron con el algoritmo R biomod2 (Capítulo 2), mediante aproximaciones morfoanatómicas (Capítulo 3), de marcadores de DNA microsatélite (Capítulo 4) y Proteómica (Capítulo 5) se analizaron la estructura poblacional de la especie y la composición del proteoma de semillas y polen de *Pinus occidentalis*.

Las condiciones óptimas descritas para *P. occidentalis* implican precipitaciones anuales superiores a 950 mm, en ausencia de sequía, y un límite altitudinal superior de aproximadamente 1500 metros de altitud (Hagger y Zanoni, 1993). Bajo tales condiciones (clima de montaña a gran altitud), *P. occidentalis* es una especie altamente competitiva y es una de las principales especies forestales en la República Dominicana. El hábitat predominante del *P. occidentalis*, son las zonas de altitud media y alta de las montañas de la Cordillera Central, Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco,

Aunque la distribución habitual de la especie está desde los 100 metros sobre el nivel del mar (msnm) hasta cerca de los 3.080 msnm, su hábitat fundamental está desde los 800 msnm formando bosque mixto con especies de hojas anchas y a partir de los 2.100 msnm forma rodales puros, Bueno et al., (2015), plantea que entre 1.500 y 2.000 msnm es el crecimiento óptimo de la especie.

A partir de 19 variables ambientales incluidas en la base de datos wordclim se realizó una selección de aquellas que tuvieron una mayor influencia en el desarrollo de *P. occidentalis*, siendo estas las variables térmicas.

### 6.1. Selección del Modelo

*P. occidentalis* mostró una regresión en su área potencial actual, siendo este cambio más drástico en las localidades del sur (Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco), donde las temperaturas son más elevadas y la precipitación estacional mostró un importante efecto sobre el modelo de distribución, medida por la precipitación del mes más lluvioso, así como por la precipitación del trimestre más cálido.

Aunque *P. occidentalis* ha demostrado adaptarse a distintos rangos altitudinales, el análisis realizado en los cinco Parques Nacionales revela que las poblaciones de *P. occidentalis* posiblemente tiendan a desplazarse a las zonas más altas de la República Dominicana. Esto coincide los resultados obtenidos para otras coníferas (Iverson et al., 1999; Zolkos et al., 2015; Iverson et al., 2016).

Las predicciones realizadas con los modelos de distribución de especies (SDM) simples y ensamblados, muestra que en casos excepcionales los SDM que usan una única técnica de predicción presentan mejores valores de los estadísticos de validación que los modelos ensamblados. Esto es debido a la utilización de la validación cruzada para la validación y evaluación de los modelos, lo que supone que la secuencia de datos (presencias y pseudo-ausencia) seleccionados se pueden agrupar en algunas ocasiones de tal forma que el ajuste del modelo a los datos es superior (Merow et al. 2014). Por ello, basamos la bondad del modelo en el valor medio de la predicción y su varianza.

En nuestro caso, hay modelos como el BRT o el RF que presentan buenos resultados. Los valores de TSS, K y AUC encontrados para los modelos seleccionados han mostrado valores de AUC >0.90, lo que supone una muy buena discriminación del modelos entre presencia y ausencias, lo cual es coincidente con los valores de TSS (>0.90) y de  $\kappa$  (>0,79), lo que verifica la calidad de la representación espacial de los mapas de distribución creados.

### 6.3 Proyección de hábitat futuro

Los modelos de circulación global (GCM) elegidos se seleccionaron para estimar proyecciones de calentamiento medio mundial para el año 2100 cerca de 2.5 °C. De forma general se observa que al analizar los diferentes modelos y escenarios futuros para los años 2050 y 2070, el patrón general de reducción del área de distribución de *P. occidentalis* también tiene implicaciones con respecto a un aumento general de la amenaza de extinción local que se enfrentan algunas poblaciones, como consecuencia del aumento de la barrera agrícola, los incendios forestales, el uso irregular de la madera, los hornos de carbón, así como factores bióticos tales como la competencia interespecifica que tiene con *Pinus caribaea*.

Aunque se ha comprobado que en las condiciones edafoclimáticas actuales el *P. occidentalis* posee una amplia distribución, no tenemos la certeza que al cambiar estas condiciones con un incremento en las temperaturas y disminución de las precipitaciones, la especie tenga la capacidad para extenderse a zonas geográficas climáticamente adecuados por varias razones, como: el aislamiento geográfico, sistema orográfico complejo, ecosistema restringido, limitadas capacidades de dispersión acoplados a la fragmentación del hábitat y el aislamiento de los parches de hábitat, especialmente en paisajes alterados en gran medida por factores antropogénicos, como ya prevalecen en gran parte de la isla.

Las proyecciones de las posibles distribuciones futuras también deben ser interpretadas con precaución, pues al evaluar la probabilidad de presencia de *Pinus occidentalis* en las cinco áreas seleccionadas en el periodo actual y se comparó con su potencialidad en escenarios futuros, se observó que en las zonas del sur (Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco) la probabilidad de ocurrencia de la especie disminuye > 50% para el año 2050; y casi un 64% para el 2070 en el caso de las poblaciones de Sierra de Neiba y de José Armando Bermúdez, o sea las poblaciones que están en el sur de la isla y en la zona sur de la Cordillera Central. Si se utiliza cualquier modelo para proyectar fuera del rango en el que se han desarrollado, las proyecciones podrían ser menos fiables (Thuiller, 2014). Incluso

si los modelos presentados en este estudio son bastante precisos y comúnmente utilizado para evaluar el impacto del cambio global (Sykes, 2001; Bakkenes *et al.*, 2002, Pearson *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2014), se debe tener especial atención para las especies en el borde de sus distribuciones del área de estudio y para los cuales los modelos no pueden capturar todo el gradiente ambiental adecuado. Es por esto que debemos también determinar las características morfoanatómicas, la variabilidad fenotípica y genotípica de las especies.

El conocer la distribución potencial y futura de *P. occidentalis*, nos permite conocer parte de la posible disminución de la especie en diferentes escenarios, por lo que se debe complementar con estudios de aproximaciones morfoanatómicas y moleculares que permitan evaluar las condiciones y estado de las localidades.

#### ***6.4. Estructura de la masa forestal***

Actualmente, el número de individuos adultos de *P. occidentalis* en las zonas de altitud media o baja es aparentemente mayor que en la zona de mayor altitud. Las poblaciones localizadas al límite de distribución presentan menos individuos y muy envejecidos, los cuales tienen una regeneración muy pobre (muy poco árboles de  $D_n < 30$  cm). Por el contrario, las poblaciones basales muestran un mejor estado de regeneración, por lo que esta especie podría llegar a ser la especie dominante en estos bosques si no ocurrieran perturbaciones.

El *P. occidentalis* es la masa forestal fundamental a alturas superiores a los 2.100 msnm, según Darrow y Zaroni, (1993), estos árboles no llegan a alcanzar ni los 8 metros de altura, aunque formen masas densas y su regeneración no sea la adecuada por lo que la mayor densidad de juveniles en las poblaciones basales puede reflejar la capacidad de *P. occidentalis* para expandir su área de distribución en bosques climáticamente más favorables. Sin embargo, todas las zonas de estudio presentan una baja densidad de juveniles, lo que podría indicar que *P. occidentalis* presenta problemas de regenerando en su área natural de distribución en República Dominicana.

La poca capacidad de *P. occidentalis* para establecerse y crecer en los bosques no intervenidos sugiere que el fracaso de regeneración podría depender de factores que controlan el crecimiento de la especie, como son los recursos del suelo, la radiación, o la temperatura; o también el proceso de germinación (cuando no posee las condiciones de humedad y luz necesarias), la mortalidad de semillas (Vilchis y Trejo, 2007).

Actualmente las formaciones de pinar de la República Dominicana se encuentran muy degradadas, siendo esto una consecuencia del uso indiscriminado e irregular de los bosques, que como resultado ha reducido la superficie de bosques a zonas inaccesibles (Chardón, 1941; Guerrero et al., 2002).

Estos resultados inciden en la distribución sesgadas ( $c > 2.0$ ), y en el mal estado de regeneración en todas las localidades. Es posible que las formaciones puras de *P. occidentalis* se caracterizan por mantener un equilibrio estable en ausencia de perturbaciones, tal y como ocurre con otras coníferas de montaña, sugiriendo así que los bosques con grandes individuos de *P. occidentalis* y con estructura de masa irregular son los mejores conservados, tal y como se observa también en este trabajo. Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir que las masas mejor conservadas de pino criollo presentan un buen estado de equilibrio a una densidad óptima entre los 1500-2000 pies ha<sup>-1</sup>.

### **6.5. Estructura de la edad**

Investigaciones basadas en la dendrocronología han mostrado la utilidad del *P. occidentalis* para estudios dendrocronológicos, incluyendo el estudio de series temporales largas (Speer et al., 2004). Al analizar los anillos de crecimiento se determinó que la población más adulta fue la de Sierra de Neiba esto pudiera deberse a que en los años 1920 y 1930 era la zona de mayor explotación maderera, siendo suspendida está en el año 1941, luego de este período el pinar de la Sierra de Neiba quedó con pocos individuos y su regeneración natural muy pobre. La población más joven fue la de Valle Nuevo, población ésta que ha sido

reforestada con mucha frecuencia por los grandes incendios ocurridos en la zona (siendo el último en el 2014).

### ***6.6 Variabilidad poblacional, mediante análisis morfoanatómicos, marcadores de DNA y proteómica.***

Para estudiar la variabilidad morfoanatomica de la especie se evaluaron los principales indicadores morfológicos de la especie, en las cinco localidades.

El largo promedio de la acícula mayor fue de 15 cm en todas las poblaciones, presentado la de Armando Bermúdez el mayor valor con 17 cm y el menor Neiba con 15 cm; estos resultados se encuentran dentro del rango reportado para la especie que es de 11 a 18 cm . Estos valores resultaron similares, e incluso un poco superiores, a lo reportado por Niniz (2005) para la especie en la población de pinos mejicanos. Este autor informó valores de 11 a 16 cm, similar a lo señalado por Martínez (1948) y Farjon y Styles (1997) para las especies centroamericanas de *Pinus* (de 5 a 22 cm).

El cuanto a los parámetros medidos en el cono, el valor medio del peso fue de 30 g, la longitud media de 5,5 cm, siendo menores a los reportados por Niniz (2005) para pinos mejicanos (valores entre 8,3 y 11 cm). Sin embargo está más próximo al rango determinado para estas especies por Martínez (1948), Farjon y Styles (1997) y Perry (1991) (de 7 a 14 cm).

El ancho medio de la base del cono fue de 2,5 cm, y el del ápice de 1,4 cm. De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 4, del Capítulo 3) y tras el análisis estadístico, se concluyó que había una mayor variabilidad intra que interpoblacional. Para otros pinos, la longitud del cono, se ha tomado como parámetro de variabilidad, siendo su control genético complejo (Stoehr y Farmer, 1986). En el caso de *P. occidentalis*, fue el parámetro que dio mayor variabilidad interpoblacional, siendo el rango de medida encontrado de 5,5-8,0 cm. Los resultados del análisis de componentes principales efectuado a la matriz de datos morfológicos determinadas por las 7 variables morfométricas empleadas revelaron

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

que los tres primeros componentes explicaron el 80% de la variación en los datos, lo que indica que se trata de una ordenación confiable. Las variables asociadas con las características del cono (peso y diámetros) y longitud de las acículas fueron las que más contribuyeron a la variabilidad.

Las mediciones morfométricas han sido ampliamente usadas en la discriminación de poblaciones de diferentes especies de coníferas. Los patrones de variación morfológica encontrados en los análisis de componentes principales y de conglomerados convergieron en la existencia de variación continua en las características morfológicas evaluadas. Esto permitió la clara diferenciación fenotípica de las poblaciones de *Pinus occidentalis* en República Dominicana, existiendo una separación entre las poblaciones de Sierra Neiba, Armando Bermúdez y José del Carmen Ramírez en un grupo, otro grupo compuesto por la población de Valle Nuevo y un último grupo conformado por los individuos de Sierra de Bahoruco. Estos resultados concuerdan con lo indicado por diversos autores en cuanto a que una gran parte de la fracción de la variación fenotípica de los caracteres examinados en coníferas, se encuentra entre árboles dentro de las poblaciones (López et al., 1993; Beaulieu y Simon, 1994). Los pinos pueden presentar una amplia variación genética intrapoblacional, debido en parte a que presentan un largo ciclo de vida y un tipo de polinización anemógama (Ledig, 2000). Los resultados de los análisis univariados y multivariados proporcionaron evidencia congruente de la existencia de una heterogeneidad morfológica intraespecífica en las cinco poblaciones de *P. occidentalis* en estudio. Los resultados del análisis discriminante revelaron la existencia de diferenciación fenotípica de las cinco poblaciones analizadas lo que podría estar relacionado con las características ambientales de dichas poblaciones. Como en este trabajo no se incluyeron en el análisis datos ambientales de las poblaciones, no es posible confirmar si la variación detectada estuvo asociada con alguna condición ambiental en particular.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

Se evaluó además la posible variabilidad a nivel molecular, empleando marcadores moleculares de microsatélites, pero agrupando las poblaciones de la Cordillera Central (Armando Bermúdez y José del Carmen Ramírez), Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco.

El número de haplotipos identificados para las tres zonas estudiadas fue alto (25), de ellos 16 fueron únicos para las localidades (siete para la Cordillera Central, cinco para Sierra de Neiba y cuatro para Sierra de Bahoruco), resultados similares fueron obtenidos para *P. caribaea* y *Pinus spp.* (Bucci et al., 2007; Williams et al., 2007; Vendramin et al., 2008; Jardón-Barbolla et al., 2011). En *Pinus caribea* var *bahamensis* se obtuvieron 12 haplotipos solamente para toda la población de Bahamas (Sánchez et al., 2014).

El índice de Diversidad de Nei (H) estimado para las poblaciones de *Pinus occidentalis* resultaron en un rango de 0.072 a 0.211 (Tabla 6), muestra valores diferentes, lo que se debe al rango de distribución geográfica de la especie en República Dominicana, la población con el valor más alto fue Sierra de Bahoruco (0.211 y de 0.120) con respecto a la Cordillera Central y Sierra de Neiba).

Al observar la Diversidad genética nos damos cuenta que la Sierra de Bahoruco presenta mayor variación, lo que pudiera deberse a que representa la única porción de ecosistemas de montaña bajo protección de la "Paleoisla del Sur", una de las dos islas que se unieron para conformar la actual isla de La Española hace unos diez millones de años, lo cual explica en gran medida el alto número de especies endémicas, raras y de hábitat restringido que allí se encuentran, constituyendo uno de los centros de endemismo más importantes La Española, además de la deriva génica ocasionada por los cambio climáticos. (Molina-Freaner et al., 2001)

El valor de variación interpoblacional en las zonas analizadas para el *Pinus occidentalis* muestra valores elevados (12%), y además un alto nivel de diversidad genética intrapoblacional (88%), estos resultados son similares a los resultados

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

obtenidos en los análisis morfoanatómicos, en cuanto a los niveles de variación intra e interpoblacional elevados. Estas características tienen una gran influencia en los programas de conservación *in situ* y *ex situ*.

El análisis del dendograma separa dos posibles poblaciones en una zona la Sierra de Bahoruco que es diferente a la zona compuesta por las Cordillera Central y Sierra de Neiba.

Podemos plantear que la distancia geográfica y los diferentes elementos de la biogeografía de la República Dominicana han determinado que la variación interpoblacional e intra poblacional sea alta. Además, la Sierra de Bahoruco es el parque más alejado de la Cordillera Central y su formación ha sido diferente al resto de los sistemas montañosos de la Española, pues el territorio donde está ubicado es producto de la emersión de territorios que formaban junto al Procurrente de Barahona y la Península de Tiburón de Haití una unidad que habría permanecido separada del resto de La Española hasta hace unos 10 millones de años.

Con el objetivo de complementar los resultados de morfo anatomía y de microsátélites y para futuros trabajos de variabilidad poblacional a través del proteoma de *P. occidentalis*, se optimizó el protocolo de extracción de proteínas en semillas y polen, lográndose la caracterización de dichos proteomas mediante aproximaciones complementarias basadas en gel y gel-free.

En análisis 1-DE de proteínas de polen se resolvieron un total de 48 bandas y no se observaron proteínas mayoritarias, que si fueron observadas en el perfil proteico de semilla donde se visualizaron cuatro bandas abundantes, estos resultados fueron similares a los obtenidos por (Morel et al., 2014), en cotiledones durante la maduración de los embriones cigóticos *P. pinaster*. En análisis de las bandas mayoritarias (8, 10, 12 y 17) mediante MALDI-TOF/TOF no se obtuvieron identificaciones fiables de proteínas, las mismas son referidas en la literatura como proteínas de reserva. Por otro lado cinco *spots* de los geles

bidimensionales con los mismos pesos moleculares (12, 13, 15, 41 y 42) fueron identificados como proteínas de reserva de semilla.

En el análisis 2-DE, hubo un menor número de *spots* resueltos en las semillas de *P. occidentalis* que los detectados en las semillas de otras especies forestales como el álamo (*Populus × canadensis* Moench) (1000 *spots*) (Zhang et al., 2015) y *P. pinaster* (976 *spots*) (Morel et al., 2014), pero similar a los detectados en las bellotas (*Q. ilex*) (288 puntos) (Valero et al., 2011). Los *spots* resueltos en polen fueron más numerosos que los obtenidos en el análisis de polen de *Q. ilex* (300 *spots*) (Valero et al., 2011) y *Populus deltoides* (403 *spots*) (Zhang et al., 2015) y similares a los obtenidos para el grano de polen del *Pinus strobus* (645 *spots*) (Fernando, 2005) .

En semillas se detectaron tres isoformas con diferentes *pI* de la *vicilina* proteína de reserva (*spots* 12, 13 y 14; Fig. 2C) que podrían ser de tres formas de PTMs de la proteína; tres isoformas de  $\beta$ -*coniferin* (*spots* 38, 41 y 42; Figura 2C ) y tres isoformas de una proteína desconocida (*spots* 23, 24 y 34; Fig. 2C). En polen se detectaron tres isoformas de *3-cetoacil-CoA tiolase 2* (*spots* 16 y 17; la figura 2D), dos de *gluthation peroxidase* (*spots* 20 y 21; la figura 2D) y dos de histona 2A (puntos 22 y 24; Fig. 2D). Estos datos sobre las isoformas se pierden cuando se analizan por aproximaciones *gel-free*, especialmente cuando la especie estudiada es una especie no secuenciada (especies huérfanas) (Jorrín et al., 2015).

En el análisis de MALDI-TOF/TOF los porcentajes de proteínas identificadas en semillas (47% y 55% de 1DE y 2DE, respectivamente) y en polen (92% y 71% de 1DE y 2DE, respectivamente) fueron mayores que los obtenidos en otras especies huérfanas tales como *Q. ilex* (30% de identificación) (Valero et al., 2011), y la obtenida en una especie secuenciada como el álamo (80% de identificación) (Zhang et al., 2015). El alto porcentaje de identificaciones en una especie huérfana tal como *P. occidentalis*, subrepresentadas en las bases de datos públicas de proteínas fue posible debido al uso de una base de datos *Pinus\_DB* creada específicamente para esta especie (Romero et al., 2014).

El número de proteínas identificadas por la metodología *gel-free* fue considerablemente mayor que los obtenidos por *gel-based*. En las semillas, alrededor de 36 proteínas identificadas se detectaron por ambas aproximaciones, seis proteínas se identificaron exclusivamente por MALDI-TOF/TOF (bandas 13 y 23; *spots* 20, 1, 6, 38, 41 y 42) y 151 proteínas sólo se identificaron por LC-MS/MS. Por otro lado, en el polen, sólo dos proteínas se identificaron exclusivamente por análisis de MALDI-TOF/TOF, un factor de transcripción (banda 5) y proteína PCNT115 inducida por auxina (*spot* 24), las otras 958 proteínas identificadas por LC-MS/MS fueron comunes entre ambas aproximaciones proteómicas. Aunque por LC-MS/MS (*gel-free*) el número de proteínas identificadas fue mayor, se detectaron isoformas y PTM en aproximaciones *gel-based*, como se mencionó anteriormente. Así, ambas aproximaciones son complementarias y mejoran la cobertura de proteoma. Las aproximaciones proteómicas para especies huérfanas, como *P. occidentalis*, se encuentran actualmente limitadas debido a que la identificación de péptidos depende vitalmente de estar siempre disponible en una base de datos de secuencias. Con el fin de mejorar la identificación de proteínas, se usó una base de datos específica hecha a medida para la especie (Romero et al., 2014), y también se incluyó la base de datos pública de proteínas UniProtKB y NCBI. La combinación de dichas bases de datos en el análisis mejoró el número de proteínas identificadas y la base de datos específica aumentaron la confianza de identificación para cada proteína (Romero et al., 2014). La base de datos específica para el *Pinus* mejoró el número de proteínas identificadas, es decir, 95 y 399 proteínas en las semillas y el polen, respectivamente, se identificaron solamente con esta base de datos.

Sorprendentemente, bajo nuestras condiciones experimentales no se identificaron deshidrinas, un importante grupos de proteínas relacionadas con la tolerancia a la desecación en las semillas ortodoxas (Hanin et al., 2011). Pero dos tipos de proteínas LEA (LEA LEA 7-4 y 7-2) se identificaron en ambos tejidos.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

En polen, los grupos predominantes fueron proteínas relacionadas con procesos redox, seguido de procesos metabólicos, expresión génica, respuesta a estrés y proteínas relacionadas con el metabolismo.

El alto número de proteínas relacionadas con la glucólisis en polen fueron identificadas por ambas aproximaciones complementarias lo cual se puede explicar por la gran cantidad de carbohidratos contenidos en los granos de polen, que representan la mayor parte de su peso seco total (Pacini, 1996), y se utilizan como una fuente de energía para sostener el crecimiento del tubo polínico y el desarrollo cuando éste comienza a crecer (Tadege, 1997). Otra categoría funcional importante fueron las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés. Con la aproximación *gel-free* identificamos, reductasa implicada en la biosíntesis de fenilcumarina, que estuvo implicada en la biosíntesis de compuestos vegetales derivados de fenilpropanoides. Estas enzimas se determinaron previamente en el tubo polínico de *P. strobus*. (Fernando, 2005), quien propuso que la phenylcoumaran benzylic reductasa ether probablemente proporciona protección a los tubos polínicos en desarrollo contra el estrés oxidativo que ocurre durante los varios meses que están incrustados en el interior de los conos. Las proteínas identificadas en el polen fueron muy similares a las obtenidas por Ischebeck et al., (2014) en el que las proteínas más abundantes fueron los relacionados con la glucólisis, proteínas ribosomales, la organización celular, la síntesis de aminoácidos y ciclo TCA. En el trabajo actual las proteínas relacionadas a esas categorías funcionales también fueron detectadas. Sorprendentemente, no se identificaron proteínas alergénicas en el polen por ninguno de los dos enfoques proteómicos incluidos en este estudio.

Cuando se comparó las proteínas identificadas a partir de semillas y polen, un total de 73 proteínas identificadas fueron similares. Entre estas se incluyen proteínas relacionadas con respuesta a estrés, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de los carbohidratos y expresión génica. Las proteínas asociadas con la respuesta a estrés son importantes tanto en las semillas y como en el polen para

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

protegerlos de un proceso de desecación que podría aumentar el contenido de especies reactivas al oxígeno y otros tipos de estrés biótico y abiótico.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen una primera aproximación al estudio molecular de la diversidad genética del pino criollo y su integración con técnicas morfoanatómicas y de predicción de hábitat. Son estudios en los que hay que profundizar dada su importancia de cara al desarrollo de estrategias de manejo y conservación de la especie, en especial en condiciones del predicho cambio climático.

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

## **Conclusiones**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

**Caracterización de la variabilidad de poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz en la República Dominicana mediante el empleo de técnicas morfoanatómicas y moleculares.**

1. Según el modelo de distribución de especies la presencia de *Pinus occidentalis* en el sur de la Isla de la Española (Sierra de Neiba y Sierra de Bahoruco), ha sufrido una disminución significativa.
2. La validez de los modelos de distribución de especies empleados queda demostrada en el buen ajuste que se obtuvo al emplear modelos que utilizan aproximaciones estadísticas similares, logrando elevadas correlaciones en sus proyecciones, como los métodos basados en técnicas de clasificación (BRT, CART y RF).
3. A diferencia de lo descrito para otras especies, y con los modelos de predicción empleados, no se encontraron evidencias que indiquen una migración de *P. occidentalis* a altitudes mayores.
4. En un futuro escenario de cambio climático, los modelos prevén un descenso en la ocurrencia de *P. occidentalis* en Sierra de Neiba, Sierra de Bahoruco y Parque José del Carmen Ramírez, en torno al 50% para el año 2050, y 65% para el año 2070.
5. Las poblaciones de *P. occidentalis* presentaron densidades que variaron entre 1100 y 2531 pies ha<sup>-1</sup>, correspondientes a valores de Dn de entre 66 y 35 cm, correspondiendo el primero a poblaciones de mayor (Vallenuevo) y menor (José del Carmen Ramírez) altitud...
6. La regeneración natural de *P. occidentalis* La distribución de Weibull mostró que la estructura diamétrica de los individuos de *P. occidentalis* con diámetro mayor de 15 cm se ajustan a curvas sesgadas a la derecha ( $c > 2$ ) indicando la existencia de problemas de regeneración
7. Las dataciones realizadas en el estudio dendrocronológico indicaron que existe una diferencia en la edad de los individuos en las zonas muestreadas, con rango de valores de entre aproximadamente 50 y 70

años, siendo los individuos más jóvenes los encontrados en la zona de Vallenuovo.

8. Existió una mayor variabilidad intra- que inter-poblacional en las características morfométricas medidas: longitud de acícula (de 155 a 172 mm), peso del cono (de 21.9 a 32.2 g), longitud del cono (49 a 60 mm), ancho de la base del cono (22.2 a 28.6 mm) y del ápice del cono (11.8 a 15.8 mm). A partir de los datos morfométricos, se establecieron tres grupos de poblaciones, los formados por Sierra de Neiba, José del Carmen Ramírez y Armando Bermúdez, el primero, Valle Nuevo, el segundo, y Sierra de Bahoruco, el tercero.
9. El estudio de microsatélites permitió la separación de Sierra de Bahoruco, por un lado, y Cordillera Central y Sierra de Neiba, por el otro. Sierra de Bahoruco la zona de mayor diversidad haplotípica y distancia genética, respecto a la Cordillera Central y Sierra de Neiba, pero también la de menor diversidad genética total lo que presupone un mayor énfasis en los trabajos de conservación.
10. Mediante el empleo de aproximaciones proteómicas complementarias, MALDI-TOF/TOF (gel-based) y nLC-LTQ-Orbitrap (gel-free), se caracterizó el proteoma de semillas y polen de *P. occidentalis*, dando como resultado la identificación de 229 especies proteicas en semillas y 1054 en polen. Los proteomas de semillas mostraron un alto número de proteína de reserva, proteínas relacionadas con la respuesta a estrés, y un metabolismo primario típico en las semillas ortodoxas. Por otra parte, se encontró que el proteoma de polen fue complejo y contenía varias proteínas con funciones designadas en los mecanismos de defensa, el metabolismo energético, síntesis, procesamiento de proteínas y la formación de citoesqueleto.