

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

ANÁLISIS FILOGENÉTICO PARA INDIVIDUOS DE *Ocotea*  
*monteverdensis* W. C. Burger (Lauraceae) EN DOS SITIOS DE  
COSTA RICA

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERA FORESTAL CON ÉNFASIS EN  
MANEJO Y PRODUCCIÓN FORESTAL CON EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIATURA

CRISTINA ESTRADA PORRAS

CARTAGO, COSTA RICA, 2024

**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL**

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO PARA INDIVIDUOS DE *Ocotea*  
*monteverdensis* W. C. Burger (Lauraceae) EN DOS SITIOS DE  
COSTA RICA**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERA FORESTAL CON ÉNFASIS  
EN MANEJO Y PRODUCCIÓN FORESTAL CON EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIATURA**

**CRISTINA ESTRADA PORRAS**

**CARTAGO, COSTA RICA, 2024**

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO PARA INDIVIDUOS DE *Ocotea monteverdensis* W. C.  
Burger (Lauraceae) EN DOS SITIOS DE COSTA RICA**

**PHYLOGENETIC ANALYSIS FOR INDIVIDUALS OF *Ocotea monteverdensis* W. C.  
Burger (Lauraceae) AT TWO SITES IN COSTA RICA**

Cristina Estrada Porras<sup>1</sup>

**RESUMEN**

*Ocotea monteverdensis* es una especie endémica poco estudiada de Costa Rica, catalogada como en peligro crítico de extinción debido a la fragmentación del bosque y su reducido tamaño poblacional. Aunque su distribución se concentra principalmente en la Vertiente del Pacífico de la Cordillera de Tilarán, se han registrado individuos en otras áreas del país. Los estudios filogenéticos son una herramienta fundamental en biología evolutiva y sistemática para entender la historia de evolución y las relaciones de parentesco entre especies. En este estudio, se realizó un análisis filogenético basado en el gen *matK* e *ITS* de individuos de *O. monteverdensis* recolectados en dos sitios de Costa Rica. Los resultados revelaron una topología poco discriminativa en los árboles filogenéticos del gen *matK*, pero permitieron establecer relaciones de parentesco con otras especies de la familia Lauracea y determinar relaciones filogenéticas estrechas entre los individuos de *O. monteverdensis* de ambos sitios; la secuenciación de las muestras amplificadas con *ITS* no fue exitosa. La variabilidad nucleotídica obtenida fue baja ( $\pi = 0,0415$ ), sugiriendo una escasa diferenciación genética entre las muestras, haciendo imperativo el desarrollar estrategias de conservación de la especie dada esta baja variabilidad genética. Asimismo, se demostró que su población sigue un modelo neutral de evolución. Se sugiere la exploración de otras regiones de ADN para mejorar la precisión de los análisis filogenéticos en la especie.

**Palabras clave:** *Ocotea monteverdensis*, Filogenia, *matK*, *ITS*, Diversidad genética.

---

<sup>1</sup> Estrada-Porras, C. 2024. Análisis filogenético para individuos de *Ocotea monteverdensis* W. C. Burger (Lauraceae) en dos sitios de Costa Rica. (Tesis de Licenciatura). Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

## ABSTRACT

*Ocotea montevertensis* is a little-studied endemic species of Costa Rica, classified as critically endangered due to forest fragmentation and its small population size. Although its distribution is mainly concentrated in the Pacific slope of the Cordillera de Tilarán, individuals have been recorded in other areas of the country. Phylogenetic studies are fundamental tools in evolutionary and systematic biology to understand the developmental history and kinship relationships between species. In this study, a phylogenetic analysis based on the *matK* and *ITS* gene was performed on individuals of *O. montevertensis* collected from two sites in Costa Rica. The results revealed a poorly discriminative topology in the phylogenetic trees of the *matK* gene but allowed establishing kinship relationships with other species of the Lauracea family and determining close phylogenetic relationships between individuals of *O. montevertensis* from both sites; the sequencing of the samples amplified with *ITS* was not successful. The nucleotide variability obtained was low ( $\pi = 0.0415$ ), suggesting little genetic differentiation between samples, making it imperative to develop conservation strategies for the species given this low genetic variability. Furthermore, it was shown that its population follows a neutral model of evolution. Exploration of other DNA regions is suggested to improve the accuracy of phylogenetic analyses.

**Keywords:** *Ocotea montevertensis*, Phylogeny, *matK*, *ITS*, Genetic diversity.

Análisis filogenético para individuos de *Ocotea montevertensis* W. C. Burger (Lauraceae) en dos sitios de Costa Rica © 2024 by [Cristina Estrada-Porras](#) is licensed under [CC BY-NC-ND](#)

[4.0](#)

## ACREDITACIÓN

### CONSTANCIA DE DEFENSA PÚBLICA DE PROYECTO DE GRADUACIÓN

Trabajo final de graduación defendido públicamente ante el Tribunal Evaluador, integrado por M.Sc. Dawa Méndez Álvarez, Ph.D. Olman Murillo Gamboa y Ph.D. Luis Guillermo Acosta Vargas como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Forestal, del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

---

Dawa Méndez Álvarez M.Sc.

Directora de tesis

---

Olman Murillo Gamboa Ph.D.

Profesor lector

---

Luis Acosta Vargas Ph.D.

Profesor lector

---

Dorian Carvajal Vanegas M.Sc.

Coordinador de Trabajos Finales de  
Graduación



---

Cristina Estrada Porras

Estudiante

## **DEDICATORIA**

A mi querido perro Scott,  
quien fue mi fiel compañero y mejor amigo durante trece años.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a mi familia, a mis padres Betina y Mauricio y a mis hermanas Eugenia, Pablo y Sofía, por su constante apoyo y amor, y por ser una fuente inagotable de motivación en mi vida, son los pilares sobre los cuales construyo mis sueños y avanzo con determinación. Asimismo, le agradezco a mi compañero de vida Orlando, y a su familia por el cariño y el gran apoyo que me han brindado durante esta maravillosa etapa.

A mis amigas y amigos que conocí durante mi carrera, han hecho de estos años universitarios momentos inolvidables y estrechamente divertidos. Un especial agradecimiento a mis cómplices y mejores amigas, Pau y Nicky, gracias por su sororidad, por siempre escucharme y por esta increíble amistad que hemos construido juntas.

Le expreso un profundo agradecimiento a mi tutora Dawa. Gracias por estar a mi lado durante todo el desarrollo de este trabajo, por ser mi compañera en la resiliencia y por enseñarme tanto con paciencia y dedicación, su guía y apoyo fueron fundamentales en este camino de aprendizaje y crecimiento.

A las personas del CIF por el compañerismo y los momentos compartidos. Y a mis profesores lectores por sus valiosas sugerencias.

Al Instituto de Monteverde por permitirme desarrollar este increíble tema de investigación. A mi equipo de trabajo de campo: Daniela por su acompañamiento y por compartir sus saberes; a don Dev por su gran apoyo y atención, les agradezco a ambos por haberme contagiado también este amor hacia el quizzarrá; a Miguel, Freddy y Moya por la valiosa ayuda brindada.

Agradezco a Nelson Zamora, Dorian Carvajal, Armando Estrada, Roberto Suárez, Sofía Jiménez, Roger Blanco, Hersson Ramírez, Alexander Smith, Catherine Hulshof, Isaac López y a las personas proveedoras: Harriet Morrow, Jean (QEPD) y Joseph Stuckey, Andrés Camacho, Judith Witt, Lindsay Stallcup, y James Wolfe. Sus contribuciones fueron fundamentales para el éxito de este trabajo.

A la VIE por su apoyo financiero.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
MATERIALES Y MÉTODOS .....	3
Áreas de estudio.....	3
Monteverde .....	3
Estación Biológica Cacao .....	3
Caracterización biofísica de los sitios de estudio .....	4
Material vegetal .....	4
Extracción, amplificación y secuenciación de ADN .....	7
Análisis filogenético .....	8
Índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	10
Características biofísicas de Monteverde y de la EBC .....	10
Características fenotípicas y genéticas de <i>Ocotea monteverdensis</i> .....	12
Características fenotípicas .....	12
Características genéticas .....	15
Análisis filogenético .....	18
Índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad.....	24
CONCLUSIONES .....	25
RECOMENDACIONES.....	26
REFERENCIAS .....	27
ANEXOS.....	34
APÉNDICES.....	35

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Componentes físicos de los sitios de estudio donde ocurre <i>O. monteverdensis</i> en Costa Rica.....	10
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación de los árboles muestreados para su identificación taxonómica y genética en Monteverde, Puntarenas, Costa Rica. ....	5
<b>Figura 2.</b> Ubicación de los árboles muestreados para su identificación taxonómica y genética en la Estación Biológica Cacao, Guanacaste, Costa Rica. ....	6
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas de <i>O. monteverdensis</i> ubicados en Monteverde.	13
<b>Figura 4.</b> Comparación y diferenciación entre lo que suponía ser <i>Ocotea hartshorniana</i> (A) y <i>Ocotea monteverdensis</i> (B). ....	14
<b>Figura 5.</b> Electroforesis de la extracción de ADN de <i>O. monteverdensis</i> utilizando la combinación de protocolos. ....	16
<b>Figura 6.</b> Electroforesis de la amplificación de las regiones <i>matK</i> e <i>ITS</i> de las muestras de ADN de <i>O. monteverdensis</i> . ....	17
<b>Figura 7.</b> Secuencia de ADN de <i>Ocotea monteverdensis</i> basada en el gen <i>matK</i> .....	18
<b>Figura 8.</b> Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud basado en el gen <i>matK</i> de <i>Ocotea monteverdensis</i> , 16 especies de Lauraceae y <i>E. cyclocarpum</i> como outgroup. ....	20
<b>Figura 9.</b> Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud basado en el gen <i>matK</i> de <i>Ocotea monteverdensis</i> , 8 especies del género <i>Ocotea</i> y <i>E. cyclocarpum</i> como outgroup. ....	22
<b>Figura 10.</b> Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud basado en el gen <i>matK</i> de <i>Ocotea monteverdensis</i> y <i>E. cyclocarpum</i> como outgroup.....	23

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Mapa de la distribución de <i>Ocotea monteverdensis</i> en Monteverde, Puntarenas, Costa Rica.....	34
--	----

## ÍNDICE DE APÉNDICES

<b>Apéndice A.</b> Protocolo de extracción de ADN de <i>Ocotea monteverdensis</i> mediante la combinación de métodos. ....	35
--	----

## INTRODUCCIÓN

La especie *Ocotea monteverdensis* W.C. Burger conocida como quizarrá blanco, quizarrá amarillo o aguacatillo, es un árbol endémico de Costa Rica, restringido principalmente a la Vertiente del Pacífico de la Cordillera de Tilarán. Esta especie poco estudiada pertenece a la familia Lauraceae, se caracteriza por ser un árbol que alcanza un gran tamaño, hasta un metro de diámetro y 35 m de altura, posee un rango de distribución de entre 800 y 1450 msnm [1, 2].

Asimismo, *O. monteverdensis* cumple un papel importante en la dinámica ecológica del bosque nuboso, ya que, sus frutos son fuente fundamental de alimento para aves como el pájaro campana (*Procnias tricarunculatus*) y el quetzal mesoamericano (*Pharomachrus mocinno*), las cuales son especies amenazadas [3, 4].

Estudios poblacionales estiman que, en el sector central de Monteverde de la Cordillera de Tilarán, donde se concentra la mayor parte de la población de la especie, existen alrededor de 770 árboles maduros remanentes, esto representa una disminución poblacional del 95% en los últimos 180 años [1, 2, 4]. No obstante, se han registrado individuos de *O. monteverdensis* en sitios fuera de la Cordillera de Tilarán, como en la Estación Biológica Cacao en la Cordillera Volcánica de Guanacaste, Costa Rica.

Debido al hábitat singular de este árbol en combinación con la fragmentación del bosque y el reducido tamaño de su población hasta ahora conocido hacen que, la especie sea ubicada en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), sugiriendo que se realicen estudios más exhaustivos en relación con *O. monteverdensis* para contribuir con su conservación [2].

En este contexto, la filogenia desempeña un papel crucial para estudiar las relaciones genealógicas entre seres vivos, analiza datos genéticos para inferir la historia evolutiva y construir árboles filogenéticos [5]. Estos diagramas representan el parentesco entre los seres vivos y su ancestro común más reciente, utilizándose para comprender la evolución de características biológicas como morfología, fisiología, comportamiento y distribución

geográfica [6, 7]. Su importancia se destaca aún más al considerar la falta de información genética sobre *O. monteverdensis* y la limitada inclusión, hasta el año 2020, de aproximadamente un 15% de las especies del complejo *Ocotea* en análisis filogenéticos [8].

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue realizar un análisis filogenético para mejorar la comprensión de la diversidad genética y las relaciones evolutivas entre los individuos de la especie *Ocotea monteverdensis* en dos sitios de Costa Rica: Monteverde y la Estación Biológica Cacao. Además, se complementó con una caracterización biofísica de los sitios de estudio, y una caracterización taxonómica y genética de la especie.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente proyecto de investigación cuenta con el permiso de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO), para el acceso a los recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad costarricense en el Área de Conservación Guanacaste (ACG), el Área de Conservación Arenal Tempisque (ACAT) y diferentes propiedades privadas de Costa Rica; mediante la resolución N°R-CM-ITCR-003-2024-OT-CONAGEBIO de la Oficina Técnica.

Asimismo, cuenta con los permisos de investigación y licencia de colecta para identificación taxonómica de los árboles, por parte del ACG y del ACAT; mediante la resolución de investigación científica N° R-SINAC-ACG-PI-016-2023 y N° M-P-SINAC-PNI-ACAT-0029-2023, respectivamente, de cada Área de Conservación.

### **Áreas de estudio**

#### Monteverde

Monteverde forma parte del Área de Conservación Arenal Tempisque (ACAT), en la Cordillera de Tilarán, Vertiente del Pacífico, Puntarenas, Costa Rica, entre las coordenadas (10°19'39.1"N, 10°17'17.3"N; 84°51'8.0"O, 84°47'58.0"O) [9]. El muestreo se llevó a cabo en la zona central de Monteverde, que alberga el núcleo de la población de *O. monteverdensis* [2], se muestreó en los sitios Santa Elena, Bajo del Tigre, Bosque Eterno de los Niños, La Cruz y San Luis, entre los 1300 y los 1400 msnm.

#### Estación Biológica Cacao

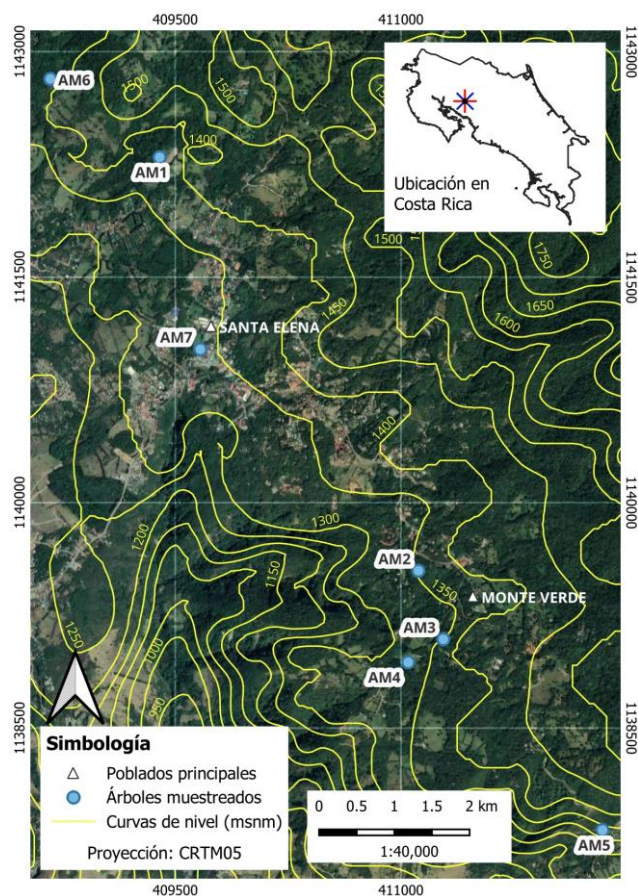
La Estación Biológica Cacao (EBC) pertenece al Área de Conservación Guanacaste (ACG), en la Cordillera Volcánica de Guanacaste, Vertiente del Pacífico, Guanacaste, Costa Rica, entre las coordenadas (10°55'41.6"N, 10°55' 25.7"N; 85°28'7.5"O, 85°27'55.7"O) [10], la toma de muestras se realizó entre los 1050 y los 1250 msnm.

## **Caracterización biofísica de los sitios de estudio**

Se realizó una revisión bibliográfica sobre el clima, y la composición edafológica y florística de cada sitio. En el caso de la EBC se entrevistó a personas científicas que actualmente llevan a cabo estudios en la Estación. Se recopiló y analizó los datos de precipitación, temperatura y tipo de suelo como componentes físicos, mientras que la composición florística se consideró como el componente biológico.

## **Material vegetal**

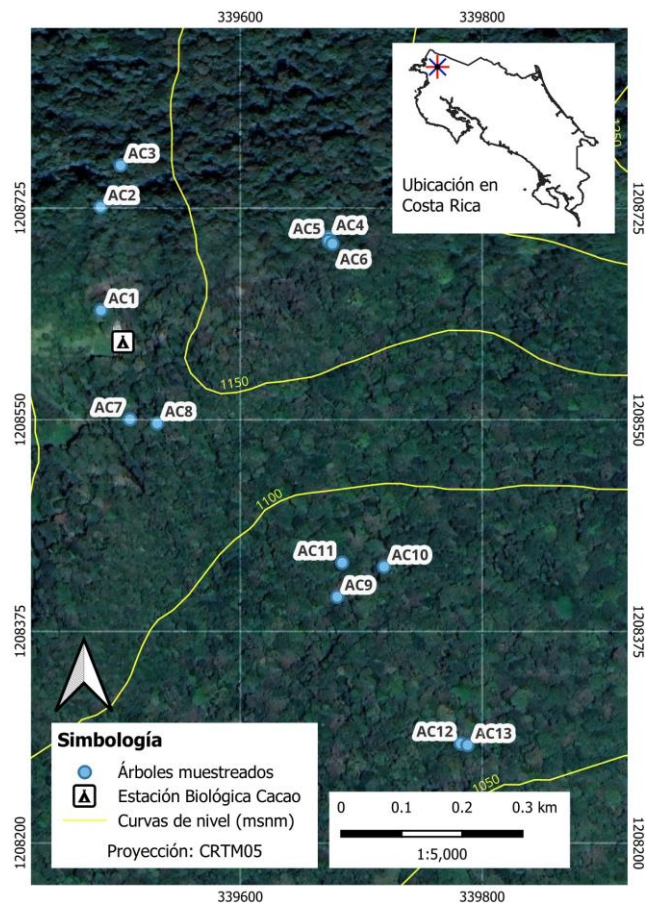
En el área de Monteverde, se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia. Con base en el estudio realizado por Joslin, Pucci y Chinchilla en 2016 [11] (Anexo A). Se seleccionó siete individuos para el muestreo ( $n=7$ ), considerando diversos factores, como la accesibilidad al árbol y la duración de la visita, cada individuo fue georreferenciado. Para fines de codificación, se asignó a cada individuo muestreado la nomenclatura AM (Árbol Monteverde) y un número de identificación consecutivo, tal como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Ubicación de los árboles muestreados para su identificación taxonómica y genética en Monteverde, Puntarenas, Costa Rica.

En la EBC se empleó un enfoque de muestreo mixto que combinó el muestreo no probabilístico por conveniencia y el muestreo por oportunidad. Se realizó una visita inicial en la cual se identificaron algunos individuos de *O. monteverdensis*, en una segunda visita se localizó los individuos y se decidió si muestrearlos o no, dependiendo de la dificultad para obtener las muestras.

Además, durante el recorrido por el bosque, se encontró individuos que no habían sido identificados en la visita previa, los cuales también fueron muestreados, dando un tamaño total de la muestra de trece árboles ( $n=13$ ). Cada individuo muestreado fue georreferenciado y codificado utilizando la nomenclatura AC (Árbol Cacao) y se les asignó un número de identificación consecutivo, tal como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Ubicación de los árboles muestreados para su identificación taxonómica y genética en la Estación Biológica Cacao, Guanacaste, Costa Rica.

Para la caracterización fenotípica e identificación taxonómica se tomaron muestras botánicas en duplas de cada individuo muestreado, estas muestras fueron recolectadas, preparadas y almacenadas siguiendo la “Guía para la recolecta y preparación de muestras botánicas” del Museo Nacional de Costa Rica [12]. Debido a la dificultad en la accesibilidad de los árboles y a las condiciones fenológicas de los mismos, al momento de la recolecta se tomó muestras de árboles maduros, juveniles o rebrotes de tamaño intermedio, sin frutos ni flores, pero algunos con yemas florales. Las muestras se trasladaron al Herbario del Museo para ser identificadas morfológicamente.

Para el muestreo genético se colectaron cinco hojas por individuo en duplas, las hojas se colocaron en bolsas herméticas de 16,5 x 14,5 cm, junto con 5-10 g de sílica. Cada bolsa fue

debidamente rotulada con la fecha de recolecta y su respectivo código, garantizando la trazabilidad de cada muestra. Las bolsas con las muestras fueron transportadas en un contenedor isotérmico, hasta el Laboratorio de Genética Molecular Forestal del Centro de Investigación en Innovación Forestal (CIF), situado en la sede Central del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, donde seguidamente se ejecutó la extracción y amplificación de ADN. Se seleccionaron las hojas más sanas y libres de signos de enfermedad o daño mecánico, evitando aquellas que presentaban descoloración, manchas, desnutrición o deformidades.

### **Extracción, amplificación y secuenciación de ADN**

Se implementó una combinación de protocolos que incluyó el protocolo de extracción de ADN de plantas propuesto por Doyle y Doyle (1990) [13], con algunas modificaciones, el uso de proteinasa K del enfoque para la separación de polifenoles y polisacáridos propuesto por Porebski, Grant Bailey y Baum (1997) [14], además, se llevó a cabo un lavado con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1), siguiendo la metodología de extracción de Pires da Silva (2014) [15]. El protocolo completo se puede observar en el Apéndice 1.

Se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con tampón TAE 1X, a un voltaje de 70V constantes durante 30 minutos, y posteriormente las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV (Molecular Imager® Gel Doc<sup>TM</sup> XR<sup>+</sup>), el ADN se cuantificó por medio del espectrofotómetro (NanoDrop<sup>TM</sup> Lite).

La amplificación se llevó a cabo utilizando dos genes: la región de ADN nuclear *ITS* (*ITS2F* e *ITS4R*) y la región de ADN cloroplástico *matK* (*matK-KIM1R* y *matK-KIM3F*).

Para la amplificación de *ITS*, se empleó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los siguientes componentes para 1 reacción: 2,5 µl de DreamTaq<sup>TM</sup> Buffer y MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTP, BSA y DMSO, 0,4 µl de DreamTaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase, imprimadores (0,25 µl de *forward* y 0,5 µl de *reverse*), 2,5 µl de ADN (40 ng/µl) y 14,85 µl de ddH<sub>2</sub>O, para un volumen final de 25 µl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo un termociclador (Eppendorf Mastercycler® egradient), con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificación con 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de

alineamiento a 53°C y 1 minuto de extensión a 72°C, además de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

En cuanto a la amplificación de *matK*, se utilizó la misma técnica con los siguientes reactivos para 1 reacción: 2,5 µl de DreamTaq™ Buffer y MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTP, BSA y DMSO, 0,4 µl de DreamTaq™ DNA Polymerase, imprimadores (0,25 µl de *forward* y *reverse*), 2,5 µl de ADN (40 ng/µl) y 15,1 µl de ddH<sub>2</sub>O, para un volumen final de 25 µl. Las reacciones de PCR también se realizaron en el mismo termociclador, con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificación con 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 35 segundos de alineamiento a 53°C y 40 segundos de extensión a 72°C, además de una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Se realizó una electroforesis con los productos de PCR en gel de agarosa al 1,2% con TAE 1X a 70V durante 1 hora y 15 minutos. Finalmente, las bandas se visualizaron en un transiluminador UV (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+).

La secuenciación de ADN se realizó mediante el método de Sanger en la empresa Macrogen, Inc. (Corea del Sur), siguiendo los protocolos estándar de la empresa. Se enviaron 20 muestras de cada región de ADN y ambos sentidos de la cadena de AND (*forward* y *reverse*), es decir, 80 secuencias en total.

### **Análisis filogenético**

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación se visualizaron y editaron en el software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.7. [1,6]. Se descartó los cromatogramas que presentaban una calidad de secuencia menor al 80% [17], los que presentaban una calidad igual o mayor se editaron manualmente eliminando los extremos y se generó las secuencias consenso de cada muestra con las secuencias previamente editadas *forward* y *reverse*, siguiendo la metodología propuesta por Suárez Hernández (2020) [18].

Se corrió el algoritmo Nucleotide BLASTn del National Center for Biotechnology Information (NCBI) [19] con las secuencias consenso, y seguidamente se seleccionó 16 especies que presentaban un porcentaje de identidad alto con *O. monteverdensis*, todas pertenecientes a la

familia Lauraceae. Además, se incluyeron dos secuencias adicionales para cada una de las 16 especies, esta medida contribuyó a una representación más completa en el árbol filogenético. Es importante señalar que la inclusión de estas secuencias adicionales dependió de su presencia en BLAST.

Con el uso del software MEGA v.11 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) [20], se alinearon todas las secuencias, incluidas las de *O. monteverdensis*, especies similares y el outgroup (*Enterolobium cyclocarpum* JQ587624) como raíz del árbol filogenético, usando el algoritmo ClustalW [21, 22]. Con este alineamiento se procedió a la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) [22], con los siguientes parámetros: replicas (bootstraps) = 1000, modelo Tamura 3-parameter [23], tasas uniformes entre sitios, eliminación parcial (95%), Neighbor-Join, BioNJ.

Se construyeron tres árboles filogenéticos: el primero utilizó todas las secuencias de las 16 especies similares, con *O. monteverdensis* y *E. cyclocarpum* como outgroup, como se muestra en la Figura 8; el segundo incluyó únicamente especies del género *Ocotea* junto con el outgroup, como se observa en la Figura 9; y el tercero mostró exclusivamente las secuencias de *O. monteverdensis* con el outgroup, representado en la Figura 10. Todos los árboles filogenéticos fueron editados con el software gráfico FigTree v.1.4.4 [24].

### **Índices de diversidad genética y prueba de neutralidad**

Se calculó los índices de diversidad genética molecular, que incluyen el número de haplotipos ( $n$ ), la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), junto con la prueba de neutralidad selectiva Fu's  $F_s$  [25], mediante el software Arlequin v.3.5 [26], en esta prueba los valores de (p-value) se generaron utilizando 1000 simulaciones. El alineamiento de las secuencias de *O. monteverdensis* utilizado en la construcción del árbol filogenético coincidió con el empleado para estos cálculos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características biofísicas de Monteverde y de la EBC

En el Cuadro 1 se puede observar la comparación física entre la EBC y el sector central de Monteverde, la cual ofrece una perspectiva valiosa para comprender las complejidades de los ecosistemas tropicales. Ambos entornos exhiben similitudes fundamentales, como una precipitación anual elevada y temperaturas cálidas, características inherentes a las regiones tropicales, la presencia de suelos de origen volcánico, predominantemente andisoles, subraya una conexión geológica compartida. Aunque ambos son bosques nubosos, la estacionalidad y la composición específica del suelo contribuyen a la singularidad de cada ecosistema.

**Cuadro 1.** Componentes físicos de los sitios de estudio donde ocurre *O. monteverdensis* en Costa Rica.

Sitio	Precipitación media anual	Temperatura media anual	Estación seca	Suelos	Zona de vida según Holdridge [27]
Monteverde	2519 mm [28]	18,8°C [28]	Enero-Abril [28]	Andisoles y ultisoles [29]	Bosque muy húmedo premontano (bmh-P) [9]
EBC	2125 mm [30]	19°C [30]	Diciembre-Abril [10, 31]	Andisoles [29]	Bosque pluvial premontano (bp-P) [32]

En cuanto a la composición biológica, el bosque nuboso de Monteverde representa un ecosistema tropical de montaña con características únicas, reconocido por su excepcional biodiversidad, este entorno se ve influenciado significativamente por su elevada altitud en las montañas y la constante presencia de neblina [9, 33].

En su libro Nadkarni y Wheelwright [9] destacan la abundancia de epífitas, como un aspecto distintivo de la vegetación del bosque nuboso, y mencionan algunas de las familias principales en Monteverde: Bromeliaceae, Lauraceae, Myrtaceae y Solanaceae, mientras que en especies están: *Werauhia werkleana*, *Pitcairnia brittoniana*, *Werauhia gladioliflora*, *Ocotea* sp., *Guarea glabra*, *Guarea kunthiana*, y *Eugenia haberi*.

La Cordillera de Tilarán, donde se ubica Monteverde, el mayor componente de vegetación es el bosque nuboso. Algunas de las familias de plantas más frecuentes que se pueden encontrar en los bosques nubosos de la cordillera son: Ericaceae, Lauraceae, Melastomataceae, Primulaceae, Orchidaceae y Rubiaceae, algunos géneros y especies más usuales son: *Alnus*, *Alzatea*, Araliaceae, *Brunellia*, *Cyathea*, *Drimys*, *Gunnera insignis*, *Hedyosmum*, *Ilex*, *Magnolia*, *Meliosma*, *Morella*, *Quercus*, *Saurauia*, *Symplocos*, *Ticodendron*, *Ulmus*, *Viola stipularis* y *Weinmannia*. En la Cordillera Volcánica de Guanacaste, algunas de estos taxones se presentan en menor medida o están ausentes [34].

Por otra parte, la EBC abarca un espectro único de ecosistemas, desde bosques de transición seco-húmedo en elevaciones bajas a intermedias hasta bosques nubosos en las altitudes cercanas al Volcán Cacao. Caracterizada por su excepcional biodiversidad y condiciones ambientales singulares, derivadas en gran parte de su ubicación estratégica en la zona de transición entre la falda media-alta de la Vertiente del Pacífico y la Cordillera Volcánica de Guanacaste [10, 31, 32].

En un estudio (C. Hulshof, datos no publicados) donde se identifica la vegetación del bosque de la EBC, se ha determinado que algunas de las familias más frecuentes son: Lauraceae, Myrtaceae, Meliaceae, Sapotaceae, Rubiaceae, Moraceae, Asteraceae, Anacardiaceae, y Euphorbiaceae, y algunas de las especies más frecuentes son: *Nectandra salicifolia*, *Eugenia* sp., *Guarea guatemalensis*, *Lonchocarpus guatemalensis*, *Sorocea affinis*, *Meliosma* sp., *Nectandra umbrosa*, *Pterocarpus rohrii* y *Clusia* sp.

La Cordillera Volcánica de Guanacaste, donde se sitúa la EBC, se encuentran algunas de las familias más abundantes en la banda de elevación de entre los 600 y los 1500 msnm, tales como: Euphorbiaceae y Rutaceae, mientras que de los taxones más abundantes están: *Euphorbia elata*, *Acidoton nicaraguensis*, *Actinostemon caribaeus*, *Peltostigma guatemalense*, *Pilocarpus racemosus*, *Amyris balsamiera*, *Angostura granulosa*, Sapotaceae, *Manilkara chicle*, *Pouteria exfoliata*, *P. lomerata*, *Sarcaulus brasiliensis* [35].

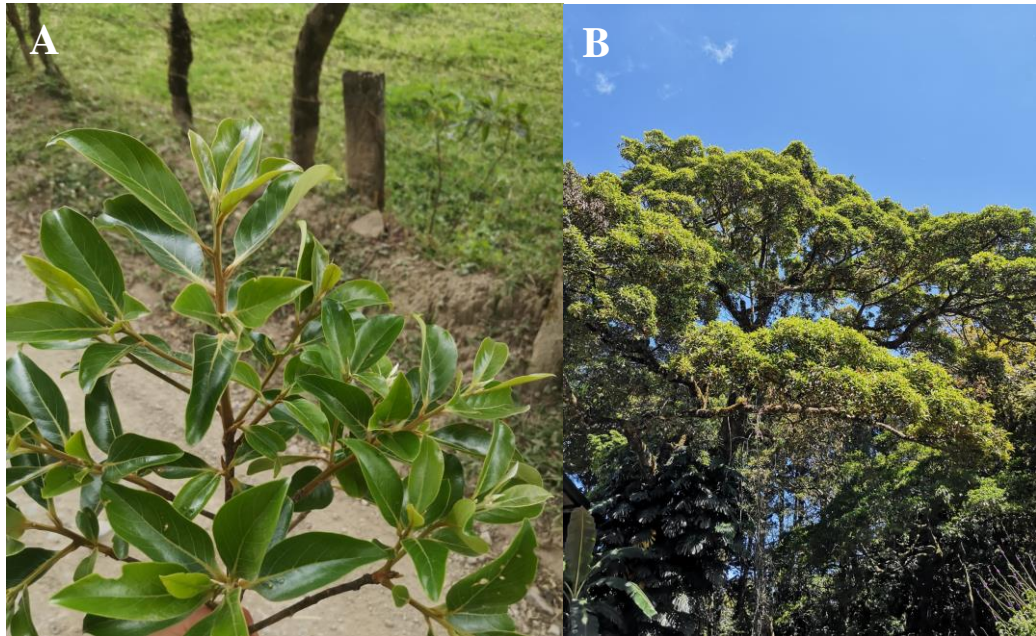
Ambos sitios comparten la designación de bosque nuboso y albergan familias comunes en este tipo de ecosistema, como Lauraceae y Myrtaceae. Sin embargo, las variaciones geográficas específicas también introducen diferencias significativas, con Monteverde destacando la presencia distintiva de Bromeliaceae y la EBC con Meliaceae y Rubiaceae, esta diversidad florística sugiere una combinación de elementos compartidos y exclusivos entre los dos sitios.

Es importante destacar que el cambio climático y la deforestación están impactando la formación de nubes en las regiones elevadas del país, como lo son Monteverde y la EBC, provocando una disminución en la cobertura nubosa y un aumento en la base de formación de nubes orográficas. Estos cambios tienen consecuencias adversas para la diversidad biológica endémica del bosque nuboso, como la especie *O. monteverdensis*. No obstante, también se ha observado un aumento temporal en la diversidad debido al desplazamiento de especies desde bosques de menor altitud [36].

### **Características fenotípicas y genéticas de *Ocotea monteverdensis***

#### Características fenotípicas

*Ocotea monteverdensis* se caracteriza por ser un árbol de entre 4 a 35 m, posee hojas simples, alternas, alargadas, y de color verde brillante en el haz y verde opaco en el envés, las láminas foliares son elíptico-oblongas de 5-13 cm, decurrentes en la base, con un ápice agudo ocasionalmente obtuso, un envés indumentado provisto de tricomas café amarillento o café anaranjado con dirección adpresa, sus nervios secundarios son notoriamente marcados y rectos, mientras que los terciarios son finos y subparalelos, a menudo evidentes en el haz de la hoja, sus flores son de color amarillo dorado y sus frutos son bayas de 3 a 5 cm de largo [37, 38].



**Figura 3.** Características morfológicas de *O. monteverdensis* ubicados en Monteverde.

Nota: (A) hojas de árbol maduro a orilla de calle, (B) árbol maduro en zona verde.

Tras analizar las muestras recolectadas, el Museo Nacional de Costa Rica identificó únicamente cuatro individuos de los 20 muestreados como *Ocotea monteverdensis* a nivel morfológico, estos cuatro individuos fueron localizados en Monteverde. Por otro lado, los restantes individuos fueron clasificados como *Ocotea hartshorniana*, específicamente, tres de los siete árboles muestreados en Monteverde y todos los árboles muestreados en la EBC fueron identificados como *O. hartshorniana*. Es importante mencionar que los árboles clasificados como *O. hartshorniana* en Monteverde eran árboles juveniles, mientras que, en la EBC todos los árboles fueron juveniles o rebrotes.

Las especies identificadas en cuestión comparten requisitos ambientales similares. *O. monteverdensis*, se encuentra en bosques muy húmedos, pluviales y nubosos, a altitudes que oscilan entre 750 y 1550 msnm, distribuyéndose en ambas vertientes de las Cordilleras de Guanacaste y de Tilarán, su período de floración abarca desde febrero hasta agosto [38]. Por su parte, *O. hartshorniana* habita en zonas similares como bosques muy húmedos y pluviales, a altitudes que varían entre 50 y 1000 msnm, específicamente en la vertiente del Caribe de las

Cordilleras de Guanacaste, de Tilarán y Central, así como en la Llanura de Tortuguero, esta especie presenta su período de floración entre abril y julio [39].

En cuanto a la morfología, *O. hartshorniana* se distingue por sus ramitas jóvenes densamente indumentadas con tricomas de tono café rojizo orientados de manera erecta o ascendente, sus láminas foliares tienen una longitud que oscila entre 7 y 21 cm y son más o menos decurrentes en la base, terminación cortamente acuminada a caudado-acuminada en el ápice, presentan una dispersa indumentación en el envés, compuesta por tricomas similares a los de las ramitas jóvenes [39].

Estas características fenotípicas de estas dos especies desempeñaron un papel crucial en el proceso de identificación morfológica, resaltando especialmente la diferenciación entre las especies a través de la observación de la dirección de los tricomas en el envés, así como la morfología de la base de las hojas. En la Figura 4 se puede observar estas diferencias en las bases de las hojas entre *O. monteverdensis* y lo que suponía ser *O. hartshorniana*.



**Figura 4.** Comparación y diferenciación entre lo que suponía ser *Ocotea hartshorniana* (A) y *Ocotea monteverdensis* (B).

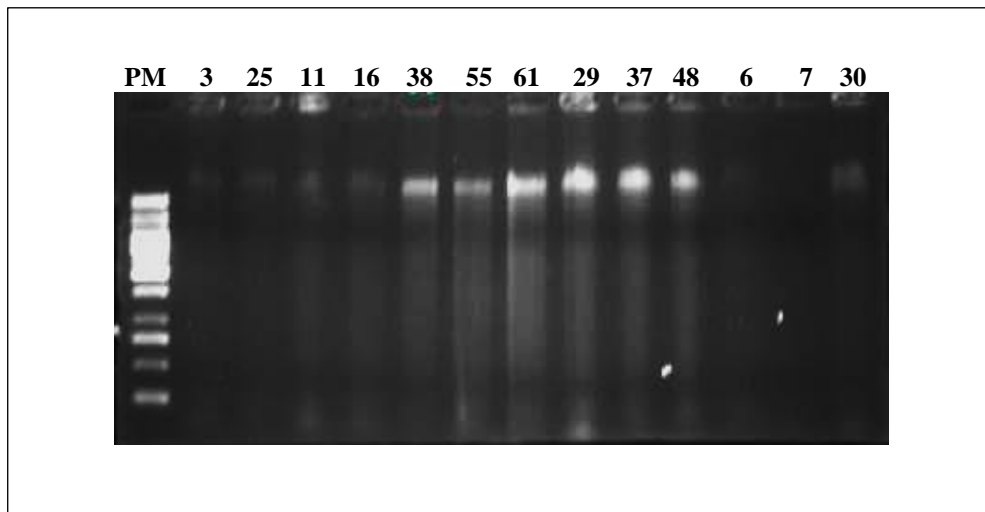
Nota: Los círculos rojos señalan las formas de las bases de las hojas. (A) con bases más o menos decurrentes, (B) con bases decurrentes.

Es importante mencionar que, la preponderancia de individuos identificados como *O. hartshorniana* plantea interrogantes acerca de la posible similitud morfológica con individuos juveniles de *O. monteverdensis*, ya que, los individuos identificados como *O. hartshorniana* eran individuos jóvenes. Surge la incertidumbre sobre si la apariencia observada en las hojas de estos individuos corresponde a características propias de *O. monteverdensis* en su fase juvenil o si, de hecho, se trata de individuos auténticos de *O. hartshorniana*.

#### Características genéticas

Se logró la extracción exitosa del ADN de todas las muestras (20) mediante la aplicación combinada de los protocolos de extracción de ADN propuestos por Doyle y Doyle (1990) [13], Porebski, Grant Bailey y Baum (1997) [14] y Pires da Silva (2014) [15]. Esta combinación de protocolos fue crucial debido a los altos niveles de polisacáridos y polifenoles en el tejido vegetal de la especie, estos compuestos, que poseen una solubilidad similar a la del ADN, pueden provocar contaminación durante el proceso de extracción o incluso inhibir la extracción del ADN [8, 17, 40].

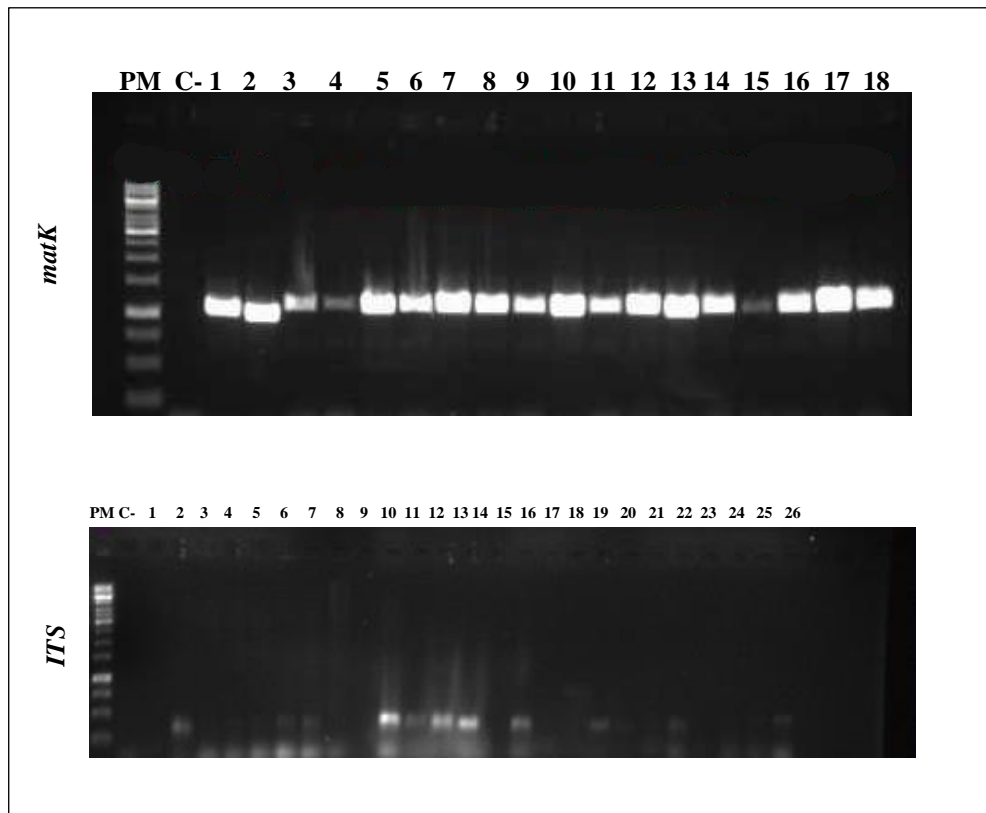
Algunas muestras mostraron una leve viscosidad residual final, aun así, presentaron una calidad adecuada y altas concentraciones de hasta 1700 ng/μl. El ADN sometido a electroforesis se encontró con poca degradación y con leve presencia de contaminantes (Figura 5), las bandas de ADN observadas coincidían con un tamaño de 5000 pares de bases (pb). En los casos en los que las muestras, como la muestra 7, no mostraban una banda visible, se procedía a realizar extracciones adicionales hasta lograr visualizar la banda en el gel.



**Figura 5.** Electroforesis de la extracción de ADN de *O. monteverdensis* utilizando la combinación de protocolos.

Nota: PM = marcador de peso molecular 1kb, C- = control negativo. Muestras Monteverde: 3, 25, 11, 16, 29, 6, 7 y 30, muestras EBC: 38, 55, 61, 37 y 48.

En la Figura 6, se observa la amplificación de las muestras de ADN para la región *matK* e *ITS*. Para la región *matK* todas las muestras amplificaron, con bandas bien definidas e intensas, de un tamaño superior a 800 pb, este resultado es consistente con un estudio previo sobre *Ocotea quixos* [17], donde la temperatura de alineamiento utilizada fue de 53°C, mientras que en este estudio fue de 52°C. Sin embargo, algunas muestras, como la muestra 4 y 15, mostraron una intensidad de banda menor en comparación con otras, ante esto, estas muestras fueron sometidas nuevamente a PCR para garantizar la fiabilidad de los resultados.



**Figura 6.** Electroforesis de la amplificación de las regiones *matK* e *ITS* de las muestras de ADN de *O. monteverdensis*.

Nota: PM = marcador de peso molecular 1kb, C- = control negativo. *MatK*, muestras Monteverde: 1-16, muestras EBC: 17 y 18. *ITS*, muestras Monteverde: 1-8 y 26, muestras EBC: 9-25.

Por otro lado, la amplificación de la región *ITS* mostró una eficiencia limitada, a pesar de utilizar un protocolo de amplificación similar al empleado con *O. quixos* [17]. Aunque se logró visualizar bandas de aproximadamente 200 pb, estas no fueron muy intensas ni definidas, lo que no favorece su idoneidad para la secuenciación. De hecho, ninguna muestra de la región *ITS* pudo ser secuenciada exitosamente.

Este resultado podría atribuirse a la naturaleza del *ITS* como un imprimador universal, lo que facilita la amplificación de contaminantes durante la PCR. Los imprimadores para esta región no son específicos para plantas, ya que la mayoría están diseñados para hongos, y dado que los hongos a menudo tienen una relación simbiótica con las plantas en los ecosistemas naturales, es

común obtener fragmentos de *ITS* de plantas que no son específicos. Aunque la mayoría de las copias de *ITS* en un genoma son equivalentes, ocasionalmente pueden existir copias menos comunes que no se amplifican debido a la preferencia de la PCR por una sola copia [41, 42].

En contraste, solamente dos muestras (la 14 y la 15) de la región *matK* no pudieron ser secuenciadas, mientras que otra muestra (la 16) presentó una calidad inferior al 80% en el cromatograma y fue excluida del análisis. Como resultado, se obtuvieron un total de 17 secuencias *matK* de buena calidad, con un orden de nucleótidos general que puede ser observado en la Figura 7.

```
-----  
TTGCATTTATTGCGATTCTCTCTACGAGTATTGGAATTCAAATAGTTTCATT  
ACTCCAAAAAATTCAATTTCCCTTTTTTCAAAGAGAATCAAAGATTCTTCTT  
GTTCCTCTCTAATTCTCATATATGAATGTGAATTCATATTCATTTTTCTCCG  
TAAACAACCCTTTCATTTACGATCAAAATCTTTTGGATCCTTTCTTGAGCGAA  
CACATTTCTATGCAAAAATAGAATATCTTGTAGTAGTGCTTTGTAACGATTTT  
CAGAAAACCCTATGGTTGTTCAAAGACCCTTTTATGCATTATGTCAGATATCA  
AGGAAAATCGATTCTGGCTTCAAGGGGGCTCGTCTTCTGATAAAGAAATGG  
AAATCTCACCTTGTCAACTTTTGGCAATGTCATTTTGGACTTGTGGTCTCAACCG  
GCCAGGATCCATATAAAGCAATTATATAATCATCCCTTCTATTTTCTGGGCTA  
TCTTTCAAGTGTACGACTAAACTCTTCGGTGATAAGGAGTCAAATGCTAGAGA  
ATTCGTTTGAATAGATACTGCTATTAAGAAATTCGAGACCGTAGTCCCAATT  
ATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCAAAATTTTGTAAATGTATCAGGGCA  
TCCCATTAGTAAGCCGTTTCGGGCCGATTTGTCAGATTCTGAGATTCTCAATC  
GATTTGGGCGGATATGCAGAAATCTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAA  
AAACAGAGTTTGTATCGTA-----
```

**Figura 7.** Secuencia de ADN de *Ocotea monteverdensis* basada en el gen *matK*.

Nota: Secuencia de la muestra 1 proveniente de Monteverde.

Las secuencias de *O. monteverdensis* se caracterizaron por tener una longitud media de 743 pb, lo que concuerda con el rango de tamaño de 700 a 950 pares de bases según lo documentado [43, 44]. Además, mostraron una composición nucleotídica con un contenido de 19,24% de citosina (C), 34,73% de timina (T), 29,31% de adenina (A) y 16,72% de guanina (G).

### **Análisis filogenético**

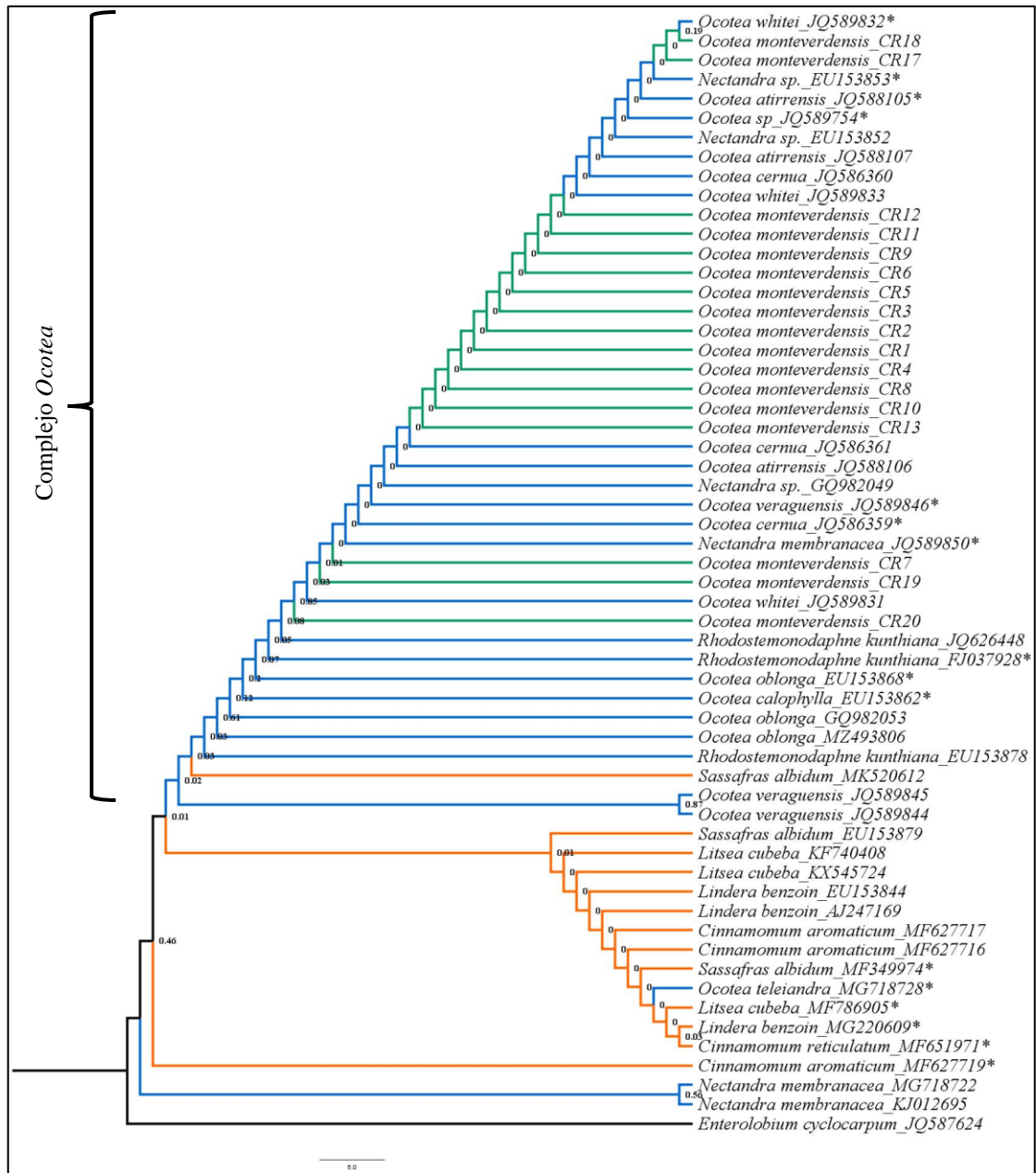
Tras realizar el análisis en el BLAST con las secuencias de *O. monteverdensis* de la región *matK* se identificaron similitudes significativas con secuencias de otras especies, todas pertenecientes a la familia Lauraceae. Las 16 especies seleccionadas mostraban una alta similitud con las

secuencias de *O. monteverdensis*, entre ellas están: *Ocotea cernua*, *Nectandra* sp., *Ocotea atirrensis*, *Ocotea oblonga*, *Ocotea calophylla*, *Cinnamomum aromaticum*, *Cinnamomum reticulatum*, *Lindera benzoin*, *Litsea cubeba*, *Nectandra membranacea*, *Ocotea* sp., *Ocotea teleiandra*, *Ocotea veranguesis*, *Ocotea whitei*, *Rhodostemonodaphne kunthiana* y *Sassafras albidum*.

Las relaciones filogenéticas de las 16 especies de Lauraceae, junto con las secuencias de *O. monteverdensis* presentadas en la Figura 8, muestran la formación de cuatro clados de manera general. En la parte superior del árbol filogenético se encuentra el primer clado (Praocotea/Diocotea), conformado por especies pertenecientes al complejo *Ocotea* (Supraocotea) [45], donde se observa todos los individuos de *O. monteverdensis*, junto con un grupo de especies dioicas de los géneros *Ocotea* y *Rhodostemonodaphne* (Diocotea), y otro grupo del género *Nectandra* (Praeocotea) [8], con la excepción de *Sassafras albidum*.

Las *Nectandra* que se agruparon junto con las Diocotea son especies no identificadas (sp.) y una *N. membranacea*, y aunque estos dos grupos (Praeocotea y Diocotea) son hermanos deberían ser clados separados, esta unión de ambos (Figura 8) podría explicarse por el hecho de que los estudios previos [8, 45] no se basaron en el gen *matK*. Asimismo, este primer clado parece ser monofilético, aunque el género *Ocotea* es conocido por ser principalmente parafilético, a diferencia de géneros como *Nectandra*, *Cinnamomum* y especies de *Ocotea* del grupo del Viejo Mundo, que son catalogados como monofiléticos [8, 45].

El segundo clado en el árbol filogenético es en efecto monofilético y pertenece al grupo de *Cinnamomum/Sassafras*, excluido del complejo *Ocotea* [45], este clado también incluye un individuo de *Ocotea teleiandra*. El tercer y cuarto clado están directamente relacionados con un solo individuo de *Cinnamomum aromaticum* y dos individuos de *Nectandra membranacea*, respectivamente. Sin embargo, estos deberían pertenecer al clado *Cinnamomum/Sassafras* y al clado del complejo *Ocotea*, respectivamente. Es importante resaltar que todos los clados presentan un soporte bootstrap pobre.



**Figura 8.** Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud basado en el gen *matK* de *Ocotea monteverdensis*, 16 especies de Lauraceae y *E. cyclocarpum* como outgroup.

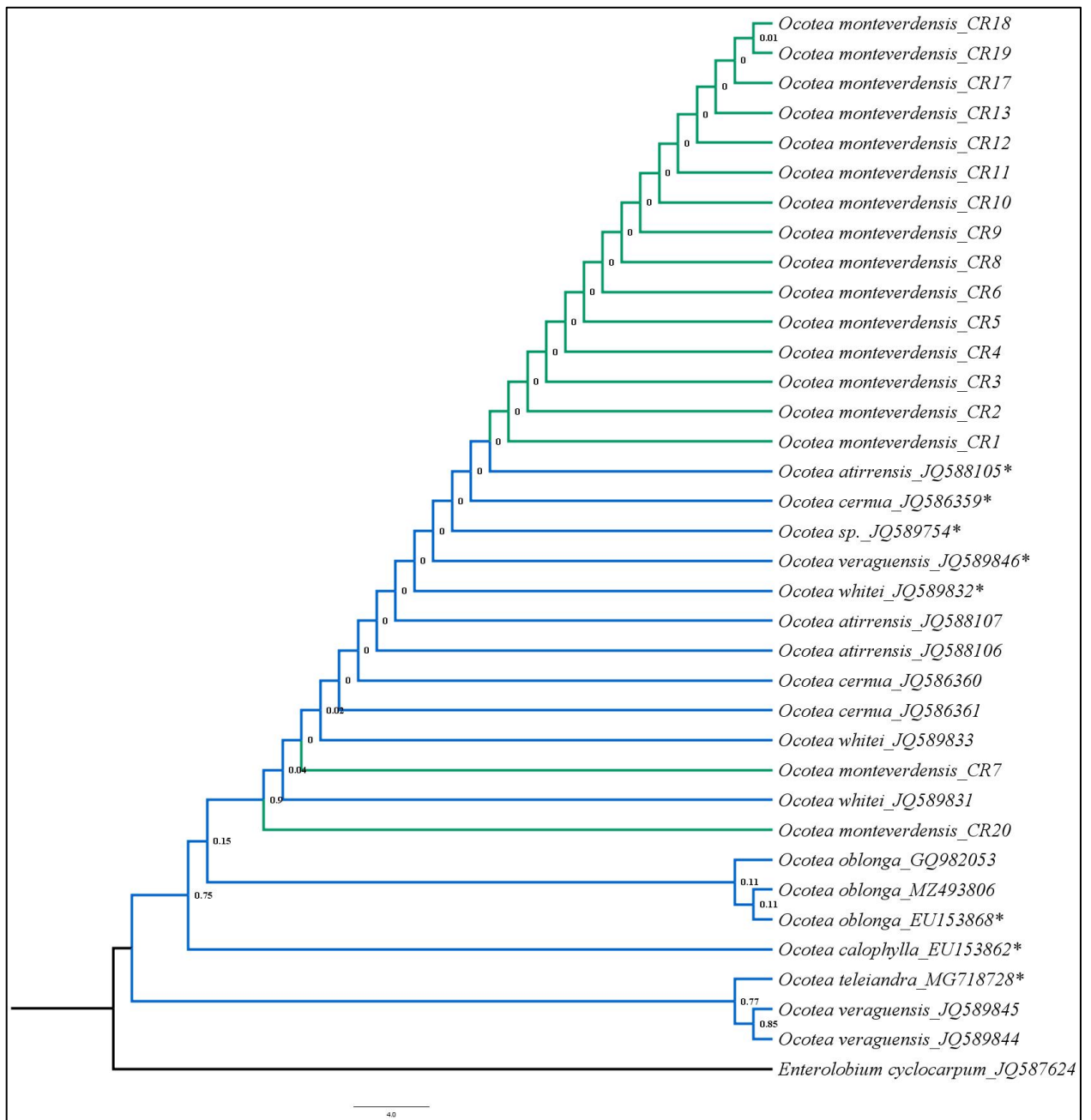
Nota: Los valores de soporte bootstrap de Máxima Verosimilitud se muestran junto a los nodos. Especies marcadas con asterisco (\*) representan las 16 especies más similares a *O. monteverdensis* según BLAST. Las ramas color verde corresponden a *O. monteverdensis*, las de color anaranjado al grupo *Cinnamomum/Sassafras*, y las de color azul al grupo *Praocotea/Diocotea* (complejo *Ocotea*).

Una de las causas de este monofiletismo en el primer clado y la poca divergencia entre especies presente en todo el cladograma puede ser el imprimador *matK*. Aunque esta región de los cloroplastos se ha utilizado exitosamente para la construcción de filogenias de plantas debido a su rápida evolución y su presencia generalizada en diferentes especies vegetales, se caracteriza por ser razonablemente útil en reconstrucciones filogenéticas a niveles taxonómicos altos (hasta el orden o la familia), pero muestra una menor fiabilidad a niveles taxonómicos más bajos de clasificación intraespecífica (hasta el género o la especie), al menos en el género *Ocotea* [46, 47].

La distancia genética más grande observada entre *O. monteverdensis* y otra especie de la familia Lauraceae fue de 0,0079, registrada con la especie *Sassafras albidum* (MK520612). En contraste, la menor distancia se encontró con *Rhodostemonodaphne kunthiana* (JQ626448), siendo de 0,0022. Esta baja divergencia entre las especies de la familia Lauraceae utilizando la región *matK* es común, llegando incluso a ser nula en algunos casos, lo que restringe su eficacia para la clasificación de especies [48, 49, 50].

Como se observa en la Figura 9, se identifican, asimismo, cuatro clados generales, los cuales muestran un mayor soporte de bootstrap en comparación con el árbol filogenético de la Figura 8, también se da una mejor división cladística, un poco más intraespecífica y discriminatoria. El primer clado, que abarca desde la muestra de *O. monteverdensis* 20 hasta la *O. monteverdensis* 18, el segundo clado se encuentra subdividido con los individuos de *O. oblonga*, el tercer clado incluye únicamente *O. calophylla*, y un cuarto clado subdividido por *O. teleiandra* y *O. veraguensis*.

Todos los individuos de *O. monteverdensis* se agrupan en el primer clado del árbol filogenético y la mayoría de estos individuos se encuentran al final del clado, exceptuando las muestras 7 y 20, que se ubican al inicio del mismo, esta disposición diferencial entre las muestras de *O. monteverdensis* también se observa en el primer árbol filogenético (Figura 8 y 9). Cuando ocurre esta separación podría indicar la presencia de regiones de secuencias de ADN homólogas entre ellas, las cuales podrían contener inserciones o deleciones (indeles), este fenómeno puede contribuir al aumento de la diversidad genética, lo que facilitaría su diferenciación de otras muestras [51].



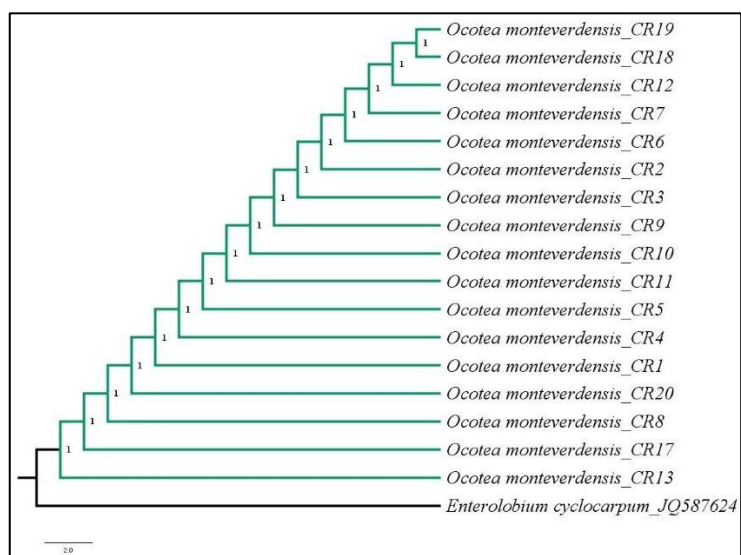
**Figura 9.** Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud basado en el gen *matK* de *Ocotea monteverdensis*, 8 especies del género *Ocotea* y *E. cyclocarpum* como outgroup.

Nota: Los valores de soporte bootstrap de Máxima Verosimilitud se muestran junto a los nodos. Especies marcadas con asterisco (\*) representan las especies de *Ocotea* más similares a *O. monteverdensis* según BLAST. Las ramas de color verde representan a *O. monteverdensis*, mientras que las azules corresponden a las demás especies de *Ocotea*.

En cuanto a las distancias genéticas, se observó que la mayor distancia de *O. monteverdensis* con otra especie del género se registró con *O. veraguensis* (JQ589844 y JQ589845), con un valor de 0,0042. Por otro lado, la menor distancia se encontró con *O. oblonga*, siendo de 0,0017.

La Figura 10, corresponde a la comparación filogenética entre todos los individuos de *O. monteverdensis* muestreados. Estos se agrupan en un único clado de manera monofilética, con un alto soporte de rama. Se observa que los individuos no siguen un orden consecutivo o jerárquico entre ellos, lo que indica que, independientemente de la distancia geográfica, evolutivamente se agrupan entre sí.

No se distingue una diferencia filogenética distintiva entre los individuos muestreados en Monteverde (individuos del 1 al 7) y los individuos muestreados en la EBC (individuos del 8 al 20), es decir, todos los individuos analizados son miembros del mismo taxón, correspondiente a la especie *Ocotea monteverdensis* [15, 17]. Es importante destacar que la distancia genética entre ellas es de 0,000 lo que indica una falta de divergencia genética.



**Figura 10.** Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud basado en el gen *matK* de *Ocotea monteverdensis* y *E. cyclocarpum* como outgroup.

Nota: Los valores de soporte bootstrap de Máxima Verosimilitud se muestran junto a los nodos. La especie outgroup se muestra junto con su número de acceso en BLAST. Las ramas color verde corresponden a *O. monteverdensis*.

## Índices de diversidad genética y prueba de neutralidad

El número de haplotipos ( $H_n$ ) fue de 17, la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) mostró un valor de  $0,0588 \pm 0,0202$ , mientras que la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue de  $0,0415 \pm 0,0213$ , para todos los individuos de *O. monteverdensis*.

El hecho de que se analizaron 17 individuos en el estudio filogenético, y se encontró que el número de haplotipos coincidió con el número de individuos (17), sugiere que, cada individuo tiene un haplotipo único. Sin embargo, la diversidad haplotípica resultó ser baja, indicando una escasa diferenciación genética entre los haplotipos o individuos [52]. Además, la diversidad nucleotídica también fue baja, con un valor inferior a 0,1 [53], lo que sugiere que, en promedio, hay aproximadamente 4,15 diferencias nucleotídicas por cada 100 sitios entre las secuencias, señalando una baja variabilidad genética entre las muestras.

La baja diversidad genética observada sugiere una estrecha relación filogenética entre las muestras; sin embargo, también, podría ser indicativa de una historia poblacional caracterizada por estabilidad, efectos de selección o fragmentación del hábitat [54]. Esta baja diversidad puede aumentar la vulnerabilidad de la población a enfermedades, cambios ambientales y otros factores estresantes [17].

En relación con la prueba de neutralidad,  $F_u$ 's  $F_s$  arrojó un valor de -3,64426 (p-value: 0,032), un valor negativo de la prueba es evidencia de un número excesivo de alelos, como se esperaría de una reciente expansión poblacional o de un autostop genético (“genetic hitchhiking”) [7, 55]. Esta posible expansión poblacional a nivel geográfico podría explicarse gracias a la presencia del pájaro campana; ya que, se cree que ha sido el responsable de distribuir las semillas del árbol a otros sitios del país alejados de la Cordillera de Tilarán, como Guanacaste y el Caribe, durante sus movimientos migratorios [2].

Sin embargo, la prueba de neutralidad no alcanza la significancia estadística, debido a que, el valor de p (p-value) es mayor a 0,02, esto sugiere que la premisa de que la distribución de alelos en la población sigue un modelo neutral de evolución es cierta [25, 56]. El valor negativo resultante de la prueba indica que hay un exceso de mutaciones raras en la población, pero el exceso no es estadísticamente significativo [57].

## CONCLUSIONES

Las áreas de estudio comparten características físicas similares como una precipitación elevada, temperaturas cálidas y suelos de origen volcánico, aunque ambos son bosques nubosos exhiben diferencias en composición florística, pero albergan familias comunes como Lauraceae y Myrtaceae.

*Ocotea monteverdensis* presenta heterofilia, durante su etapa juvenil las características de sus hojas pueden ser confundidas con las de *Ocotea hartshorniana*, como una base más o menos decurrente y tricomas en el envés orientados de manera erecta.

La integración de protocolos antiguos y modernos posibilita la obtención de ADN con una pureza mejorada en especies que presentan un elevado contenido de polifenoles y polisacáridos, tal como sucede en el caso de *O. monteverdensis*.

Los árboles filogenéticos obtenidos revelaron una topología poco discriminativa, atribuible al alto grado de conservación de la región *matK* en el género *Ocotea*, aunque con características que muestran una íntima afinidad con el complejo *Ocotea*. Esto permitió establecer relaciones filogenéticas estrechas entre los individuos de *O. monteverdensis*.

La especie *O. monteverdensis* exhibe baja diversidad genética, posiblemente relacionada con la fragmentación del hábitat, a la vez que su población sigue un modelo neutral de evolución.

## RECOMENDACIONES

La heterofilia presente en la especie resalta la importancia de considerar cuidadosamente las características morfológicas para una identificación precisa de especies dentro del género *Ocotea*.

Emplear protocolos que incluyan lavados previos al procesamiento de muestras de especies con altos contenidos de polifenoles y polisacáridos, o utilizar kits de extracción de ADN diseñados específicamente para este tipo de plantas. Asimismo, es crucial continuar refinando el protocolo propuesto en este estudio hasta lograr una extracción de ADN completamente limpia y libre de contaminantes de *Ocotea monteverdensis*. Se recomienda intentar la extracción con tejido fresco como lo mencionan otros protocolos.

Ensayar otros protocolos de amplificación con PCR en la región *ITS*. En esta región, se sugiere utilizar genes nucleares de una sola copia [58].

Estudiar la filogenia de *O. monteverdensis* mediante el análisis de otras regiones de ADN cloroplástico y nuclear. La exploración de diferentes regiones genómicas puede ofrecer una comprensión más completa de la diversidad genética y mejorar la precisión de los análisis filogenéticos específicos para esta especie.

Realizar una comparación filogenética entre individuos de *O. monteverdensis* con individuos de *O. hartshorniana*.

Crear estrategias de conservación para *O. monteverdensis* ante su baja variabilidad genética, indicativa de un riesgo potencial, especialmente considerando el estado de peligro crítico de extinción de la especie.

Se recomienda estudiar el genoma completo de *Ocotea monteverdensis* para mejorar la identificación a nivel intraespecífico.

Finalmente, para futuros análisis filogenéticos, se sugiere incrementar el tamaño de la muestra a un mínimo de 30 individuos.

## REFERENCIAS

- [1] N. Bennett, “Prevalence, effect, and cause of apical meristem termination in the endemic *Ocotea monteverdensis* (Lauraceae) in Monteverde”, 2018. [En línea]. Disponible en: [https://digitalcommons.usf.edu/tropical\\_ecology/660](https://digitalcommons.usf.edu/tropical_ecology/660)
- [2] J. D. Joslin, W. A. Haber, y D. A. & Hamilton, “*Ocotea monteverdensis*. The IUCN Red List of Threatened Species”, 2018, doi: 10.2305/IUCN.UK.2018.
- [3] J. Lindsay, “The effect of abundance of surrounding trees on the abundance of mycorrhizae in *Ocotea monteverdensis* (Lauraceae)”, 2016. [En línea]. Disponible en: [https://digitalcommons.usf.edu/tropical\\_ecology/175](https://digitalcommons.usf.edu/tropical_ecology/175)
- [4] Monteverde Institute, “Conservación de una especie en peligro crítico de extinción *Ocotea monteverdensis* y otras especies amenazadas en Costa Rica”, Monteverde Institute Blog. Consultado: el 9 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://monteverde-institute-blog.org/blog/2020/4/22/conservacion-de-una-especie-en-peligro-critico-de-extincion-ocotea-monteverdensis>
- [5] M. W. Cadotte, B. J. Cardinale, y T. H. Oakley, “Evolutionary history and the effect of biodiversity on plant productivity”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, núm. 44, pp. 17012–17017, nov. 2008, doi: 10.1073/pnas.0805962105.
- [6] X. Li, Y. Li, M. Zang, M. Li, y Y. Fang, “Complete Chloroplast Genome Sequence and Phylogenetic Analysis of *Quercus acutissima*”, *Int J Mol Sci*, vol. 19, núm. 8, p. 2443, ago. 2018, doi: 10.3390/ijms19082443.
- [7] M. Ichikawa-Seki et al., “Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola gigantica* from Nigeria”, *Parasitol Int*, vol. 66, núm. 1, pp. 893–897, feb. 2017, doi: 10.1016/j.parint.2016.10.010.
- [8] J. C. Penagos Zuluaga et al., “Resolved phylogenetic relationships in the *Ocotea* complex (Supraocotea) facilitate phylogenetic classification and studies of character evolution”, *Am J Bot*, vol. 108, núm. 4, pp. 664–679, abr. 2021, doi: 10.1002/ajb2.1632.

- [9] N. Nadkarni y N. Wheelwright, *Monteverde: Ecology and Conservation of a Tropical Cloud Forest. Book 3*. Bowdoin's Scholars' Bookshelf, 2014. doi: 10.1093/oso/9780195095609.001.0001.
- [10] ACG, “Estación Biológica Cacao”, Área de Conservación Guanacaste. Consultado: el 9 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: [https://www.acguanacaste.ac.cr/1999/centro\\_investigacion/estacion\\_cacao.html](https://www.acguanacaste.ac.cr/1999/centro_investigacion/estacion_cacao.html)
- [11] Monteverde Institute, “An exceptional tree and a symbol of Monteverde”, Monteverde Institute Blog. Consultado: el 9 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://monteverde-institute-blog.org/environmental/ocotea-monteverdensis>
- [12] A. Cascante Marín, “Guía para la recolecta y preparación de muestras botánicas”, San José, 2008.
- [13] J. J. Doyle y J. L. Doyle, “Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue”, *Focus (Madison)*, pp. 13–15, 1990.
- [14] S. Porebski, L. Grant Bailey, y B. R. Baum, “Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components”, *Plant Mol Biol Report*, vol. 15, pp. 8–15, 1997.
- [15] D. Pires da Silva, “Variabilidade e diversidade genética de populações de *Ocotea notata* (Nees & Mart.) mez (Lauracea)”, Bachillerato, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.
- [16] T. A. Hall, “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT”, *Nucleic Acids Symp Ser*, vol. 41, núm. 41, pp. 95–98, 1999.
- [17] P. E. Salazar, P. I. Rivas, y G. M. Karolys, “Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el Ishpingo (*Ocotea quixos*), proveniente de 5 provincias de la Amazonía ecuatoriana”, *Revista de Docencia Universitaria*, pp. 309–316, 2017.

- [18] R. Suárez Hernández, “Identificación y caracterización de bacterias aisladas de sedimento y agua de las costas de Isla Partida Norte, Golfo de California”, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, 2020.
- [19] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, y D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool”, *J Mol Biol*, vol. 215, núm. 3, pp. 403–410, oct. 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [20] K. Tamura, G. Stecher, y S. Kumar, “MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11”, *Mol Biol Evol*, vol. 38, núm. 7, pp. 3022–3027, jun. 2021, doi: 10.1093/molbev/msab120.
- [21] A. Cho, “Constructing Phylogenetic Trees using Maximum Likelihood”, Bachelor Thesis, Claremont Collage, Scripps Senior Theses, 2012.
- [22] J. Truszkowski y N. Goldman, “Maximum Likelihood Phylogenetic Inference is Consistent on Multiple Sequence Alignments, with or without Gaps”, *Syst Biol*, vol. 65, núm. 2, pp. 328–333, mar. 2016, doi: 10.1093/sysbio/syv089.
- [23] K. Tamura, “Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases”, *Mol Biol Evol*, vol. 9, pp. 678–687, 1992.
- [24] Tree Bio, “FigTree”. Tree Bio, el 25 de noviembre de 2018. Consultado: el 22 de febrero de 2024. [En línea]. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- [25] Y.-X. Fu, “Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection”, *Genetics*, vol. 147, núm. 2, pp. 915–925, oct. 1997, doi: 10.1093/genetics/147.2.915.
- [26] L. Excoffier y H. E. L. Lischer, “Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows”, *Mol Ecol Resour*, vol. 10, núm. 3, pp. 564–567, may 2010, doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- [27] L. Holdridge, “Life zone ecology”, Tropical Science Center, 1967.

- [28] G. E. Peralta Lobo, “Influencia de la variación morfológica y aerodinámica en las estrategias de forrajeo de los colibríes del Bosque Nuboso de Monteverde, Costa Rica”, Licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, 2014.
- [29] E. Ortiz-Malavasi, “Atlas de Costa Rica 2014”. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2014.
- [30] A. Smith, “Temperature, precipitation and soil characteristics of Volcán Cacao - Área de Conservación Guanacaste (ACG), Costa Rica”, University of Guelph Research Data Repositories, 2023. doi: <https://doi.org/10.5683/SP3/LQYQJZ>.
- [31] A. M. Sierra Parra, “Evaluación de estrategias de restauración ecológica en el Corredor Biológico Rincón Cacao, Costa Rica”, Maestría, CATIE, Turrialba, 2018.
- [32] ACG, “Estación Biológica Cacao”, Área de Conservación Guanacaste. Consultado: el 9 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.acguanacaste.ac.cr/biodesarrollo/centro-de-investigacion-y-estaciones-biologicas/estacion-biologica-cacao>
- [33] D. Rodríguez Arias, “Nuevos registros de alimentación del Periquito Listado (*Bolborhynchus lineola*) en Monteverde, Costa Rica”, *Zeledonia*, vol. 25, núm. 2, pp. 32–36, 2021.
- [34] N. Zamora, B. E. Hammel, y M. H. Grayum, “Vegetación/Vegetation”, en *Manual de Plantas de Costa Rica*, Introducción., vol. I, B. E. Hammel, M. H. Grayum, C. Herrera, y N. Zamora, Eds., Missouri: Missouri Botanical Garden Press, 2004, pp. 108–110.
- [35] N. Zamora, B. E. Hammel, y M. H. Grayum, “Vegetación/Vegetation”, en *Manual de Plantas de Costa Rica*, Introducción., vol. I, B. E. Hammel, M. H. Grayum, C. Herrera, y N. Zamora, Eds., Missouri: Missouri Botanical Garden Press, 2004, pp. 104–108.
- [36] M. A. Smith et al., “Communities of Small Terrestrial Arthropods Change Rapidly Along a Costa Rican Elevation Gradient”, en *Neotropical Gradients and Their Analysis*, Cham: Springer International Publishing, 2023, pp. 255–307. doi: 10.1007/978-3-031-22848-3\_10.

- [37] Y. Arias Nuñez y C. Loria Villalobos, “*Ocotea monteverdensis*”, San José, 2019.
- [38] Manual de Plantas de Costa Rica, “*Ocotea monteverdensis* W.C. Burger”, Manual de Plantas de Costa Rica. Consultado: el 31 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://legacy.tropicos.org/Name/17804917?projectid=66>
- [39] Manual de Plantas de Costa Rica, “*Ocotea hartshorniana* Hammel”, Manual de Plantas de Costa Rica. Consultado: el 31 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://legacy.tropicos.org/Name/17804949?projectid=66>
- [40] D. Costa Gontijo et al., “Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves”, *Food Chem*, vol. 230, pp. 618–626, mar. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.087.
- [41] M. E. Mort y D. J. Crawford, “The continuing search: low-copy nuclear sequences for lower-level plant molecular phylogenetic studies”, *Taxon*, vol. 53, núm. 2, pp. 257–261, may 2004, doi: 10.2307/4135604.
- [42] T. Cheng, C. Xu, L. Lei, C. Li, Y. Zhang, y S. Zhou, “Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for *ITS* regions of plants with improved universality and specificity”, *Mol Ecol Resour*, vol. 16, núm. 1, pp. 138–149, ene. 2016, doi: 10.1111/1755-0998.12438.
- [43] R. Lahaye et al., “DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, núm. 8, pp. 2923–2928, feb. 2008, doi: 10.1073/pnas.0709936105.
- [44] M. Bolson, E. de C. Smidt, M. L. Brotto, y V. Silva-Pereira, “*ITS* and *trnH-psbA* as Efficient DNA Barcodes to Identify Threatened Commercial Woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests”, *PLoS One*, vol. 10, núm. 12, p. e0143049, dic. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0143049.
- [45] D. Trofimov y J. G. Rohwer, “Towards a phylogenetic classification of the *Ocotea* complex (Lauraceae): an analysis with emphasis on the Old World taxa and description

- of the new genus *Kuloa*”, *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 192, núm. 3, pp. 510–535, 2020, doi: 10.1093/botlinnean/boz088.
- [46] J. da Silva et al., “Chemical Diversity, Biological Activity, and Genetic Aspects of Three *Ocotea* Species from the Amazon”, *Int J Mol Sci*, vol. 18, núm. 5, p. 1081, may 2017, doi: 10.3390/ijms18051081.
- [47] K.-L. Chen, S.-J. Zhang, Z. Liu, S.-L. Chen, y J.-Y. Song, “Application of deoxyribonucleic acid barcoding in Lauraceae plants”, *Pharmacogn Mag*, vol. 8, núm. 29, p. 4, 2012, doi: 10.4103/0973-1296.93301.
- [48] J. Li, D. C. Christophel, J. G. Conran, y H.-W. Li, “Phylogenetic relationships within the ‘core’ Laureae (*Litsea* complex, Lauraceae) inferred from sequences of the chloroplast gene *matK* and nuclear ribosomal DNA *ITS* regions”, *Plant Systematics and Evolution*, vol. 246, núm. 1–2, pp. 19–34, abr. 2004, doi: 10.1007/s00606-003-0113-z.
- [49] J. G. Rohwer, “Toward a Phylogenetic Classification of the Lauraceae: Evidence from *matK* Sequences”, *Syst Bot*, vol. 25, núm. 1, p. 60, ene. 2000, doi: 10.2307/2666673.
- [50] D. Trofimov, D. Cadar, J. Schmidt-Chanasit, P. L. Rodrigues de Moraes, y J. G. Rohwer, “A comparative analysis of complete chloroplast genomes of seven *Ocotea* species (Lauraceae) confirms low sequence divergence within the *Ocotea* complex”, *Sci Rep*, vol. 12, núm. 1, p. 1120, ene. 2022, doi: 10.1038/s41598-021-04635-4.
- [51] S. Kumar, G. Stecher, y K. Tamura, “MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets”, *Mol Biol Evol*, vol. 33, núm. 7, pp. 1870–1874, jul. 2016, doi: 10.1093/molbev/msw054.
- [52] A. Schrimpf, H. K. Schulz, K. Theissing, L. Pârvulescu, y R. Schulz, “The first large-scale genetic analysis of the vulnerable noble crayfish *Astacus astacus* reveals low haplotype diversity in central European populations”, *Knowl Manag Aquat Ecosyst*, núm. 401, p. 35, oct. 2011, doi: 10.1051/kmae/2011065.

- [53] M. Jakobsson, M. D. Edge, y N. A. Rosenberg, “The Relationship Between  $F_{ST}$  and the Frequency of the Most Frequent Allele”, *Genetics*, vol. 193, núm. 2, pp. 515–528, feb. 2013, doi: 10.1534/genetics.112.144758.
- [54] R. G. Collevatti, M. P. C. Telles, J. C. Nabout, L. J. Chaves, y T. N. Soares, “Demographic history and the low genetic diversity in *Dipteryx alata* (Fabaceae) from Brazilian Neotropical savannas”, *Heredity (Edinb)*, vol. 111, núm. 2, pp. 97–105, ago. 2013, doi: 10.1038/hdy.2013.23.
- [55] M. Ashfaq et al., “DNA barcoding of *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) reveals southerly expansion of the dominant whitefly species on cotton in Pakistan”, *PLoS One*, vol. 9, núm. 8, ago. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0104485.
- [56] IF. Lopes, CI. Miño, y SN. Del Lama, “Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal”, *Brazilian Journal of Biology*, vol. 67, núm. 4 suppl, pp. 849–857, dic. 2007, doi: 10.1590/S1519-69842007000500007.
- [57] J. Joshi, R. K. Salar, P. Banerjee, U. S, M. S. Tantia, y R. K. Vijn, “Genetic Variation and Phylogenetic Relationships of Indian Buffaloes of Uttar Pradesh”, *Asian-Australas J Anim Sci*, vol. 26, núm. 9, pp. 1229–1236, sep. 2013, doi: 10.5713/ajas.2012.12669.
- [58] I. Álvarez y J. F. Wendel, “Ribosomal *ITS* sequences and plant phylogenetic inference”, *Mol Phylogenet Evol*, vol. 29, núm. 3, pp. 417–434, dic. 2003, doi: 10.1016/S1055-7903(03)00208-2.



## APÉNDICES

**Apéndice A.** Protocolo de extracción de ADN de *Ocotea monteverdensis* mediante la combinación de métodos.

1. Pesar 50 mg de tejido vegetal seco y cortarlo en pequeños trozos con una tijera. Luego, se maceran en un mortero con pistilo, evitando llegar al punto de pulverización.
2. Añadir 900  $\mu$ l de buffer de extracción de ADN precalentado a 65°C al mortero y se mezcla suavemente con el pistilo.
3. Transferir la mezcla a un tubo de 2 ml, al cual se le añaden 50 mg de PVPP y 2  $\mu$ l de mercaptoetanol.
4. Agitar la mezcla en un vórtex.
5. Incubar los tubos en un bloque calentador a 65°C durante 45 min agitando cada 10 minutos.
6. Dejar enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos.
7. Agregar 3  $\mu$ l de proteinasa K y mezclar por vortex.
8. Incubar los tubos en un bloque calentador a 37°C durante 30 min.
9. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Agregar 750  $\mu$ l de cloroformo:octanol (24:1) y mezclar mediante inversión de los tubos hasta obtener una homogeneización completa.
11. Centrifugar los tubos por 10 min a 8000 rpm.
12. Extraer el sobrenadante cuidadosamente y transferirlo a otro tubo de 2 ml.
13. Añadir 1 vol de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) y mezclar por inversión hasta llegar a la homogenización.
14. Centrifugar los tubos a 12500 rpm durante 7 min.
15. Extraer 400  $\mu$ l del sobrenadante y transferirlo a un tubo de 1,5 ml.
16. Agregar ½ vol de 5M NaCl, mezclar invirtiendo, agregar 2 vol de etanol 96% a -20°C, mezclar por inversión.
17. Incubar a -20°C por 10 min.
18. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm.
19. Descartar el sobrenadante con cuidado de no desprender el pellet.
20. Añadir 500 $\mu$ l de etanol al 70% enfriado a -20°C.

21. Centrifugar a 13000 rpm por 2 min y descartar el etanol con cuidado de no desprender el pellet y dejando la menor cantidad de etanol en el tubo.
22. Secar el resto de etanol colocando los tubos en un bloque térmico a 40°C por 30 minutos.  
Inspeccionar los tubos para asegurarse de que se secó todo el etanol.
23. Resuspender el pellet con 50 µl de buffer TE con ARNasa.
24. Incubar los tubos en un bloque térmico a 37°C durante 30 min.
25. Resuspender con un ligero vortex, luego cuantificar en Nanodrop.
26. Diluir el ADN a 40 ng/µl.

**Buffer de extracción de ADN (100 ml):** la concentración final de los componentes del buffer de extracción son las siguientes: 100 mM Tris HCL, 1.4 M NaCl 1.4 M, 20 mM EDTA, 2% (m/v) CTAB, 2% (m/v) PVP, 2% (v/v) β-mercaptoetanol.

**Buffer TE con ARNasa:** por cada 50 µl de TE agregar 1 µl de ARNasa.