

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE QUITO**

**CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**COMPARACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE TRES  
REGIONES DE ADN CLOROPLÁSTICO Y UNA NUCLEAR EN EL  
ISHPINGO (*O. quixos*) PROVENIENTE DE 5 PROVINCIAS DE LA  
AMAZONÍA ECUATORIANA**

**AUTORES:**

**PATRICIO ISRAEL RIVAS NAVARRETE**

**PAULA ELIZABETH SALAZAR COSTA**

**TUTORA:**

**GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIÉRREZ**

**Quito, mayo del 2017**

### Cesión de derechos de autor

Nosotros Patricio Israel Rivas Navarrete, con documento de identificación N° 131171125-1, y Paula Elizabeth Salazar Costa, con documento de identificación N° 171370601-6, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el Ishpingo (*O. quixos*) proveniente de 5 provincias de la Amazonía ecuatoriana”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero e Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Patricio Israel Rivas Navarrete  
Cédula: 131171125-1



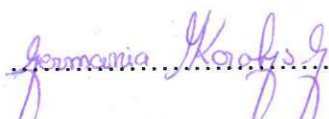
Nombre: Paula Elizabeth Salazar Costa  
Cédula: 1713701601-6

Quito, mayo de 2017

### **Declaratoria de coautoría del docente tutora**

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el Ishpingo (*O. quixos*), proveniente de 5 provincias de la Amazonía ecuatoriana” realizado por Patricio Israel Rivas Navarrete y Paula Elizabeth Salazar Costa, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, mayo de 2017

  
.....

Germanía Margarita Karolys Gutiérrez

C.I: 170849249-9

## **Dedicatoria**

A Dios,

Por guiar cada uno de mis pasos y por ayudarme a cumplir mis sueños.

A mis padres Galo Salazar y Lolita Costa,

Por siempre impulsarme a ser mejor cada día y ser mi ejemplo de vida.

A mi hermano y hermanas,

Galo Andrés, Bibiana y Gabriela por ser mi apoyo y mi motivación para ser mejor en mi vida.

A mi Lolita Amada,

Por quererme y por enseñarme qué es lo más importante en mi vida.

Con cariño,

Paula

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y enfrentar cualquier dificultad.

A mi familia quienes por ellos soy quien soy.

Para mis padres Randolph y Carolina por su apoyo, consejos, comprensión y ayuda en cada momento.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome para poder cumplir esta meta.

Con cariño,

Israel

## **Agradecimiento**

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana por brindarnos las herramientas necesarias para ser excelentes profesionales y buenos cristianos. Al Laboratorio de Ciencias de la Vida, ya que nos dieron la apertura para utilizar las instalaciones en la realización de nuestra tesis.

A la Fundación Hanss Seidel por estar siempre presente en mi carrera universitaria por brindarme su confianza, cariño y ser ese impulso para poder realizar mis sueños.

A nuestra apreciada Tutora Germania Karolys, por todos sus conocimientos, su persistencia, paciencia, cariño y motivación que han sido fundamentales para la realización de esta tesis.

A nuestros queridos profesores, Químico Christian Larenas MSc. por brindarnos su confianza y permitirnos ser parte del proyecto, al Biólogo Marco Cerna Ph. D. por ayudarnos a lo largo de la tesis.

A cada uno de nuestros profesores que a lo largo de nuestra carrera nos han brindado sus conocimientos y paciencia, gracias por inculcar en nosotros la seriedad, la responsabilidad y el rigor científico para crecer como profesionales.

## Índice

Introducción.....	1
<b>1. Marco conceptual.....</b>	<b>4</b>
1.1 Familia Lauraceae.....	4
1.2 Género <i>Ocotea</i> .....	4
1.3 Ishpingo ( <i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm.) Descripción botánica.....	5
1.3.1 Usos etnobotánicos.....	5
1.3.2 Estado Actual.....	6
1.3.3 Estudios moleculares en <i>Ocotea quixos</i> .....	6
1.4 Variabilidad genética.....	7
1.4.1 Fuentes de la variabilidad genética.....	8
1.4.1.1 Fuentes externas.....	9
1.4.1.2 Fuentes internas.....	9
1.4.2 Fuentes para la disminución de la variabilidad genética.....	10
1.4.3 Herramientas para analizar la variabilidad genética.....	10
1.4.3.1 Marcadores moleculares.....	11
1.4.3.2 Código de Barras de la Vida.....	13
1.5 Regiones de ADN.....	14
1.5.1 ADN ribosomal nuclear.....	15
1.5.2 ADN cloroplástico.....	16
1.5.3 ADN mitocondrial.....	19
1.5.4 Variación nucleotídica.....	19
1.5.5 Coeficiente de variabilidad genética.....	20
<b>2. Marco Metodológico.....</b>	<b>21</b>
2.1 Recolección de muestras.....	21

2.2	Extracción de ADN .....	21
2.3	Amplificación de regiones de ADN .....	23
2.4	Secuenciación de regiones de ADN .....	24
2.5	Análisis de secuencias .....	25
<b>3.</b>	<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>28</b>
3.1	Extracción de ADN .....	28
3.2	Amplificación de regiones de ADN .....	29
3.2.1	Región <i>matK</i> .....	29
3.2.2	Región <i>rbcLa</i> .....	31
3.2.3	Región <i>psbA-trnH</i> .....	32
3.2.4	Región <i>ITS</i> .....	33
3.3	Análisis de regiones de ADN .....	35
3.3.1	Región <i>matK</i> .....	36
3.3.2	Región <i>rbcLa</i> .....	37
3.3.3	Región <i>psbA-trnH</i> .....	39
3.3.4	Región <i>ITS</i> .....	41
3.4	Comparación de variabilidad nucleotídica entre las regiones <i>matK</i> , <i>rbcLa</i> , <i>psbA-trnH</i> e <i>ITS</i> .....	43
<b>4.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>48</b>

## **Índice de tablas**

Tabla 1 Tipos de marcadores moleculares utilizados para determinar variabilidad genética en poblaciones.....	12
Tabla 2 Primers para la amplificación de regiones de ADN.....	23
Tabla 3 Preparación de la mezcla PCR.....	24



## Índice de figuras

Figura 1	Regiones de ADN designadas para el sistema Barcode en plantas .....	15
Figura 2	Regiones <i>ITS</i> utilizadas en el sistema Barcode.....	16
Figura 3	Región <i>matK</i> .....	17
Figura 4	Extracción de ADN con lavados previos protocolo de Porebski, Bailey y Baum (1997) y el protocolo de extracción simple de ADN foliar Doyle y Doyle (1987) Gel de agarosa 1%. .....	29
Figura 5	Protocolos de amplificación de la región <i>matK</i> (>850pb).....	30
Figura 6	Protocolos de amplificación de la región <i>rbcLa</i> (>500 pb).....	31
Figura 7	Protocolos de amplificación de la región <i>psbA-trnH</i> (>450 pb).....	33
Figura 8	Protocolos de amplificación de la región <i>ITS</i> (>600) .....	34
Figura 9	Árbol de máxima verosimilitud región <i>matK</i> .....	37
Figura 10	Árbol de máxima verosimilitud región <i>rbcLa</i> .....	39
Figura 11	Árbol de máxima verosimilitud región <i>psbA-trnH</i> .....	41
Figura 12	Árbol de máxima verosimilitud región <i>ITS</i> .....	43

## Resumen

*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Ishpingo) es un árbol que crece en bosques húmedos tropicales de Sudamérica (310 - 1200 msnm) y se utiliza como medicina y condimento, ya que posee aceites esenciales con propiedades antiplaquetarias, antitrombóticas, entre otras.

En Ecuador, las poblaciones silvestres de Ishpingo, son reducidas por la transformación de ecosistemas, deforestación y cultivo clonal. Este estudio comparó la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico (*matK*, *rbcLa* y *psbA-trnH*) y una nuclear *ITS* de Ishpingo proveniente de 5 provincias de la Amazonía ecuatoriana. En base a los alineamientos obtenidos se realizó la filogenia utilizando el criterio de máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 réplicas y con Jukes-Cantor. La variabilidad genética se determinó mediante el coeficiente de conservación de ADN y el coeficiente de variabilidad nucleotídica de Nei ( $\pi$ ).

La variabilidad nucleotídica de las regiones *matK*, *rbcLa* y *psbA-trnH* fueron bajas ( $\pi \leq 0.005$ ), debido a su alto grado de conservación. La región *ITS* presentó una variabilidad superior ( $\pi = 0.11$ ), agrupando a los individuos analizados en dos clados. Los resultados de la región *ITS* pueden estar afectados por la homoplasia que presenta esta región.

Las regiones analizadas no fueron útiles para el estudio de variabilidad genética en Ishpingo. Por lo que se sugiere analizar nuevas regiones de ADN cloroplástico y nuclear, que permitan realizar estudios de genética poblacional de esta especie en el Ecuador.

**Palabras clave:** *Ocotea quixos*, variabilidad genética, *matK*, *rbcLa*, *psbA-trnH*, *ITS*

## Abstract

*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Ishpingo) is a tree that grows in humid tropical forests of South America (310-1200 msnm). It is used for food and medicine since it possesses essential oils with antiplatelet, antithrombotic properties, among others.

In Ecuador, the wild populations of Ishpingo has been reduced by ecosystem transformation, deforestation and clonal cultivation. This study compared the genetic variability of three regions of chloroplastic DNA (*matK*, *rbcLa* and *psbA-trnH*) and one nuclear region (*ITS*) in Ishpingo from 5 provinces of the Ecuadorian Amazon. Based on the obtained alignments, the phylogeny was performed using the maximum likelihood criterion, with a bootstrap of 1000 replicates and with Jukes-Cantor. The genetic variability was determined using the DNA conservation coefficient and the Nei ( $\pi$ ) nucleotide variability coefficient.

The nucleotide variability of *matK*, *rbcLa* and *psbA-trnH* regions was low ( $\pi \leq 0.005$ ) due to their high degree of conservation. The *ITS* region presented a superior variability ( $\pi = 0.11$ ), grouping the individuals analyzed in two clades. The results of the *ITS* region may be affected due to the homoplasy that it possesses.

The regions analyzed were not useful for the study of genetic variability in Ishpingo. Therefore, it is suggested that new chloroplastic and nuclear DNA regions be analyzed, that allow studies of population genetics of this species in Ecuador to be carried out.

**Key words:** *Ocotea quixos*, genetic variability, *matK*, *rbcLa*, *psbA-trnH*, *ITS*

## Introducción

Ecuador es uno de los 17 países megadiversos a nivel mundial, en 256 370 km<sup>2</sup> existen más de 17934 especies de plantas vasculares, de las cuales 8200 especies se encuentran en la Amazonía ecuatoriana (INEC, 2010; Terra Incognita, 2000). La mayoría de las especies vegetales se caracterizan por su importancia económica, ecológica y cultural (Santin, 2004).

La familia Lauraceae posee 55 géneros y más de 3600 especies. Se distribuyen en áreas tropicales y se encuentra conformada por árboles, arbustos y hierbas. En su mayoría posee maderas aromáticas y hojas con aceites esenciales (Suárez y Barrera, 2007). El género *Ocotea* se distingue por ser uno de los grupos más diversos de esta familia con más de 350 especies distribuidas desde México hasta Argentina, sus árboles se caracterizan por una alta producción de aceites esenciales (Palacios, 2016a).

*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. es conocido como Ishpingo, Ishpink o Canela Amazónica, es un árbol perenne de 2 a 25 m de altura, su tallo es rígido y leñoso, cilíndrico, voluble anchamente ramificado (Cazorla, 2013; Palacios, 2016b). Se encuentra distribuido desde una altura de 310 a 1200 msnm en el bosque húmedo tropical de la región amazónica de Sudamérica (Colombia, Ecuador, Perú y Brasil) (Ríos, *et al.*, 2007; Cárdenas, Castaño, Sua y Quintero, 2015). Se ha utilizado desde la época precolombina con fines alimenticios y medicinales, como el cálice de sus frutos sirve de condimento y se lo utiliza en la preparación de la Colada Morada (Cazorla, 2013). La corteza es utilizada en el tratamiento de la artritis, calambres y la hidropesía; las hojas y frutos se utilizan como analgésico, desinfectante, antidiarreico y relajante muscular, y por último el aceite esencial extraído de los cálices posee propiedades antiplaquetarias, antitrombóticas, antioxidantes, antimicrobianas y

antiinflamatorias (Noriega y Dacarro, 2008). Su madera se emplea en la construcción y en la fabricación de muebles y pisos (Baser y Buchbauer, 2015; Duarte y Rai, 2015; León, 2001; López y Salinas, 2007; Mejía y Pacheco, 2011).

En el 2007, *Ocotea quixos* se encontró en veda total durante seis meses, debido a la reducción significativa de sus poblaciones silvestres (Grijalva, Checa, Ramos y Barrera, 2012). Fue declarada en estado de amenaza en el Acuerdo Ministerial No. 167, publicado en el Registro Oficial No. 18 del 8 de febrero del 2007. Las principales causas de la reducción poblacional de *Ocotea quixos* fueron la ampliación de la red vial, la transformación de ecosistemas, la deforestación y el cultivo de clones de la especie (MAE, 2010). Estos antecedentes y la falta de estudios de genética de poblaciones de *Ocotea quixos* del Ecuador, sugieren que la variabilidad genética del Ishpingo puede estar disminuyendo, por lo que estos estudios son necesarios para determinar el estado actual de la especie y el establecimiento de medidas para su conservación.

La variabilidad genética confiere a las especies la capacidad de sobrevivir a lo largo del tiempo, si esta disminuye las especies no pueden adaptarse frente a cambios ambientales y a enfermedades que se presenten porque no poseen mecanismos de defensa frente a plagas por lo que se extinguen en el tiempo (Orfanno, 2011). La variabilidad genética se determina por el cálculo de la diversidad nucleotídica presente dentro de las secuencias de ADN, entre mayor sea esta variación, mayor será la variabilidad genética en la especie (Cruz, Hernández, Vázquez y González, 2013; Bahadur, Rajam, Sahijram y Krishnamurthy, 2015; Hernández *et al.*, 2017).

El análisis de la variación nucleotídica de las regiones de ADN es la base de estudios moleculares como la determinación de filogenia y evolución, la determinación de la variabilidad genética y la identificación de especies.

El objetivo del presente estudio es comparar la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico (*matK*, *rbcLa*, *psbA-trnH*) y una región de ADN nuclear *ITS* en la especie Ishpingo (*Ocotea quixos*) proveniente de 5 provincias de la Amazonía ecuatoriana; para establecer posibles marcadores para estudios futuros de la variabilidad genética de poblaciones en *Ocotea quixos*.

Para esta investigación se colectaron muestras botánicas de individuos de Ishpingo y se extrajo ADN foliar. Se amplificó cada una de las regiones de ADN (*matK*, *rbcLa*, *psbA-trnH* e *ITS*) por PCR, se secuenció con Sanger automatizado y se analizó la filogenia y variabilidad genética en MEGA7. La filogenia se realizó por máxima verosimilitud, con un bootstrap de 1000 réplicas y con Jukes-Cantor. La variabilidad genética se determinó mediante el coeficiente de conservación de ADN y el coeficiente variabilidad nucleotídica de Nei ( $\pi$ ).

Finalmente se estableció la región de ADN que presentó mayor variabilidad nucleotídica.

## **1. Marco conceptual**

### **1.1 Familia Lauraceae**

La familia Lauraceae agrupa alrededor de 54 géneros y más de 3000 especies, se encuentra distribuida principalmente en regiones tropicales y subtropicales, desde bosques bajos hasta montanos (Hernández, F, 2002; J. G. Rohwer, 1993). Lauraceae presenta una gran diversidad lo que dificulta la identificación de esta familia, por lo que se han realizado pocos estudios taxonómicos (Suárez y Barrera, 2007). La importancia de la familia es económica, porque las especies de esta familia son maderables y se las utiliza para la construcción y fabricación de muebles, sus hojas y frutos son utilizados como especias y alimento (Werff, 2013).

### **1.2 Género *Ocotea***

El género *Ocotea* se encuentra distribuido en los trópicos de África y en América desde México hasta Argentina, se caracteriza por ser uno de los más diversos géneros de la familia Lauraceae con 350 especies aproximadamente (Ortíz, Lorea, Pérez y Monro, 2012).

Posee estambres con cuatro esporangios arreglados en dos pares, estaminodios definidos, flores unisexuales, tépalos libres y erectos. La inflorescencia es paniculada-cimosa, ramas fistulosas. Las hojas tienen la base recurvada, con nervación pinnada y nervios secundarios (Palacios, 2016a).

Este género no posee características exclusivas por lo que es considerado como el basurero de especies difíciles de identificar porque no encajan en un género definido (Werff, 2013).

### **1.3 Ishpingo (*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.) Descripción botánica**

*Ocotea quixos* es un árbol de la familia Lauraceae, originario de las zonas tropicales húmedas de América del Sur, crece a 310 - 1200 msnm (Naranjo, Kijjoa, Giesbrecht, y Gottlieb, 1981).

Crece hasta 25 m de altura y 55 cm de DAP. Su corteza es lisa y sus hojas son enteras, simples, oblongadas, helicoidales, alternas, coriáceas y agudas en la base. Su inflorescencia es panícula axilar hasta de 8cm de largo. Sus flores son blancas con tépalos cóncavos y su fruto es una drupa de forma elipsoide de 1.5-2 cm de longitud que posee el cáliz semileñoso en forma de sombrero (Palacios, 2016b).

En Ecuador, el Ishpingo se cultiva tradicionalmente en huertos indígenas y ya no se encuentra presente en el bosque primario. También se lo encuentra en parques y avenidas de Archidona, Tena, Puyo y Macas, en la Amazonía ecuatoriana (Palacios, 2016a).

#### **1.3.1 Usos etnobotánicos**

Debido a que su madera es compacta y muy pesada, *Ocotea quixos* ha sido fuertemente explotada en la región amazónica (Baser y Buchbauer, 2015). Además de su madera, su corteza es utilizada como medicina para el tratamiento de la artritis, dolor de estómago y dientes, calambres, resfriados severos, hidropesía y también para extraer esencias (Duarte y Rai, 2015). El aceite esencial de los cálices causa una vasodilatación y una relajación vascular, poseen propiedades antiplaquetarias, antitrombóticas, antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias (López y Salinas, 2007). La decocción de la corteza se usa como estimulante digestivo, para disminuir



la tos, en la retención de líquidos, como sedante y para la anemia. (Berdonces, 1998). Las cápsulas molidas se usan localmente para dar sabor a los dulces y a comidas (León, 1987).

### **1.3.2 Estado Actual**

En el 2007 *Ocotea quixos* se encontró en veda total de corto plazo (6 meses), esto quiere decir que se prohibió la tala, el aprovechamiento, movilización y comercialización de sus productos maderables. En el Acuerdo Ministerial No. 167, publicado en el Registro Oficial No. 18 del 8 de febrero del 2007 se indicó que es una especie amenazada (Grijalva, Checa, Barrera y Limongi, 2012).

Actualmente las principales amenazas hacia las poblaciones de la *Ocotea quixos* son la ampliación de la red vial, la transformación de ecosistemas debido al crecimiento de la frontera agrícola y la deforestación, provocando así la disminución de poblaciones silvestres de *Ocotea quixos* (MAE, 2010). Todos estos factores sugieren que la variabilidad genética del Ishpingo puede estar disminuyendo. Hasta la actualidad no se cuenta con estudios de genética de poblaciones de *Ocotea quixos* del Ecuador (Cárdenas, Castaño, Sua y Quintero, 2015).

### **1.3.3 Estudios moleculares en *Ocotea quixos***

En el Ecuador no se han realizado estudios previos de genética poblacional en Ishpingo (*Ocotea quixos*). En Colombia, Cárdenas, Castaño, Sua y Quintero (2015) a través del Ministerio del Ambiente en el “Plan de Manejo para la Conservación de Abarco, Caoba, Cedro, Palorosa y 6 especies de Canelo de los Andaquíes”, hicieron una descripción botánica, características de la madera, distribución y hábitat natural, el

código de barra ADN y huella genética del Canelo de los Andaquíes (Ishpingo), para el estudio se evaluaron los marcadores *matK*, *rbcLa* e *ITS*. Los resultados indican que los marcadores *matK* y *rbcLa* no permitieron una discriminación de las especies determinaron porque son marcadores pocos variables y se sugirió el uso del marcador *ITS2*.

Un segundo trabajo fue presentado por Gonzalez (2009), el cual indicó la posibilidad de emplear regiones estándar del genoma utilizadas por el proyecto de código de barras genético de plantas de la familia Lauraceae usando los marcadores, *rbcLa*, *rpoC1*, *rpoB*, *matK*, *ycf5*, *trnL*, *psbA-trnH*, *ITS*. Dichos marcadores permitieron la discriminación de especies de la familia Lauraceae.

#### **1.4 Variabilidad genética**

La variabilidad genética es conocida como el polimorfismo genético ya que es una variación en la secuencia de ADN entre distintos individuos de la misma especie o de otra (Ellegren y Galtier, 2016).

Bahadur, Rajam, Sahijram y Krishnamurthy (2015) ratifican a la variabilidad genética como:

“La diversidad genética se refiere a la diversidad intraespecífica y se mide a menudo en términos de contenido total de ADN, tamaño del genoma en términos de número de pares de bases, número de genes y por algunos en el número, tamaño y morfología del cromosoma”.

La variabilidad genética dentro de poblaciones se mide por el número de alelos diferentes, de formas alternas de los genes y la frecuencia con la que estos se

encuentran dentro del genoma. La variabilidad genética aumenta cuando existen diferentes alelos en todos los genes y estos poseen varias combinaciones, una población con muchos alelos dentro de un mismo locus de un cromosoma tiene mayor cantidad de variabilidad. Esta variación puede ser causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones del material genético debido a las condiciones ambientales (Eng y Hayhurst, 2016).

La variabilidad genética es esencial para la selección natural (Boundless, 2016). Por lo cual, es una medida que sirve para evaluar el estado de una población, cuanto mayor sea, mejor probabilidad tendrá esta población a lo largo del tiempo para sobrevivir, ya que podrá adaptarse y evolucionar frente a cambios ambientales, plagas, enfermedades, especies invasoras, entre otras. Se han realizado estudios de variabilidad genética entre diversas poblaciones silvestres y domesticadas para determinar el estado de conservación de estas poblaciones, realizándose con mayor énfasis en poblaciones de especies cultivadas debido a su erosión genética. (Orfanno, 2011). La erosión genética de estos recursos constituye una grave amenaza para la seguridad alimentaria mundial a largo plazo (Bahadur *et al.*, 2015).

#### **1.4.1 Fuentes de la variabilidad genética**

Las fuentes para generar variabilidad genética se clasifican en internas y externas (Harper, 2010):

- Externas: Son causadas por el medio ambiente, estos son rasgos adaptativos de las poblaciones.
- Internas: Son las características heredables de una población, causadas por mutaciones, recombinación genética y migración de genes.

#### **1.4.1.1 Fuentes externas**

En especies vegetales cultivadas existen cuatro fuentes principales para inducir a la variabilidad genética en las poblaciones, que son: las evolutivas, geográficas, migración y la domesticación (Prina *et al.*, 2011).

- Evolutivas: se refiere a la variabilidad producida durante la especiación y esta puede ser por aislamiento reproductivo y las interacciones especie- ambiente.
- Geográficas: son variantes genéticas de adaptación creadas como respuesta a variaciones a los componentes ambientales propios de las regiones en las que se encuentran.
- Migración: Es el movimiento de las especies de un lugar a otro. Los individuos migratorios pueden aportar gametos alterando la proporción de la población no móvil.
- Domesticación: Es causada por el hombre, en donde él selecciona las características de las especies para satisfacer sus necesidades (Nature Education, 2015).

#### **1.4.1.2 Fuentes internas**

Existen tres causas para la variabilidad genética: mutación, recombinación y la migración de genes (Griffiths, Miller, Suzuki, Lewontin y Gelbart, 2010).

- Mutaciones: Se genera cuando existe alteraciones de un gen por duplicación, reemplazo o por la delección de pares de bases en la secuencia del ADN.
- Cruzamiento o recombinación entre cromátidas de cromosomas homólogos durante la meiosis, por el intercambio de ADN entre un par de cromosomas.

- Flujo génico: Intercambio de genes debido al cruzamiento o migración, dentro y entre poblaciones. Implica la dispersión de nuevas variantes genéticas entre poblaciones diferentes.
- Distorsión de la segregación: Separación de alelos de una forma desigual que es causado por un mecanismo meiótico aberrante (Boundless, 2016).

#### **1.4.2 Fuentes para la disminución de la variabilidad genética**

- **Selección natural**

Es el proceso por el cual las frecuencias génicas involucradas con determinados caracteres varían de generación en generación, dado que algunas variantes del carácter tienen mayor capacidad que otras de sobrevivir y producir descendencia (Fuentes, 2016).

- **Deriva genética**

Es el cambio aleatorio de las proporciones de los alelos en una población, en donde unos individuos dejan mayor descendencia que otros. Esto ocurre en pequeñas poblaciones aisladas.

Existe mayor probabilidad de pérdida de alelos ya que no todos se transmiten a la siguiente generación, por ende es la pérdida de variabilidad genética contrarrestando la variabilidad genética obtenida por mutaciones (Barbadilla, 2012; Eguiarte, Aguirre, Jardón, Aguirre y Souza, 2013; Harper, 2010).

#### **1.4.3 Herramientas para analizar la variabilidad genética**

Según Nahavandi, Hafezamini, Moeini, Jahromi y Shamsudin (2011) en las cuatro últimas épocas, el estudio de la evolución ha sido influenciada por el progreso de la

biología molecular. No se puede establecer un estudio de la evolución sin el análisis de caracteres morfológicos y moleculares.

Actualmente se ha multiplicado el uso de caracteres moleculares debido a que son universales y porque estos permiten el análisis de genes que se encuentran presentes en todos los genomas celulares, permitiendo una reconstrucción filogenética y evolutiva, que con estudios morfológicos no se podría lograr (Hernández *et al.*, 2017). Para el uso de estos caracteres moleculares se deben utilizar herramientas moleculares, que son un conjunto de técnicas que permiten identificar fracciones de un gen en una población, aislarlo y manipularlo. La información obtenida nos permite comparar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, también se puede caracterizar correctamente a cada especie (Tarazona y Duque, 2016).

#### **1.4.3.1 Marcadores moleculares**

Existen dos tipos de marcadores moleculares: tipo proteína y de ADN. Los primeros siguen un patrón isoenzimático, que analiza las variaciones dentro de la enzima, este tipo demostró tener una variabilidad baja por lo que fue reemplazado por el segundo tipo de marcadores moleculares los de ADN (Moreno, Sifuentes y Pereyra, 2009).

Los métodos para determinar las variaciones en la secuencia de ADN son: AFLP (polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados), RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción), SSR (secuencias simples repetidas), SNP (polimorfismo de nucleótido simple), Barcode (Código de barras de la vida) y la filogenómica (Eisen y Fraser, 2003).

**Tabla 1.****Tipos de marcadores moleculares utilizados para determinar variabilidad genética en poblaciones**

Tipo	Nombre del marcador	Polimorfismo	Método empleado	Nivel polimórfico	Modo de acción	Referencia
Proteína	Patrón isoenzimático	Variantes de la misma enzima	Electroforesis de proteínas	Bajo	C	Carleer <i>et al.</i> , 1978
ADN	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	Mutaciones y re-arreglos genéticos	Digestión con enzimas de restricción. Hibridización con sondas	Medio	C	Bostein <i>et al.</i> , 1980
	Polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD)	Mutaciones y re-arreglos genéticos	PCR con cebadores arbitrarios	Medio	C	Williams <i>et al.</i> , 1990
	Polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	Mutaciones y re-arreglos genéticos	Digestión enzimática Electroforesis en poliacrilamida	Medio	C	Zabeau y Vos, 1994
	cDNA-AFLP	Mutaciones y re-arreglos genéticos	RT-PCR, PCR, restricción y ligación enzimática	Alto	C	Breyne <i>et al.</i> , 2003
	Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)	Repeticiones en tándem	PCR	Alto	C	Litt y Luty, 1989 Tautz <i>et al.</i> , 1989
	Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)	Mutaciones puntuales, variación de un solo nucleótido	Secuenciación Hibridización en chip	Alto	C	Nelson <i>et al.</i> , 2004
	Barcode	Variaciones en genes conservados	Secuenciación	Alto nivel interespecífico	D	Hebert, Cywinska y Ball, 2003
	Filogenomas	Variaciones del genoma total	Secuenciación de nueva generación	Alto nivel interespecífico	D	Eisen y Fraser, 2003

\*C=Codominante D= Dominante

**Fuente:** (Aranguren, Machado y Montes, 2013)

Estos métodos se complementan con otras técnicas como son la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), electroforesis, hibridación, cromatografía, entre otras. Los

marcadores moleculares de ADN tienen como ventaja que no se ven alterados por variaciones ambientales ni el estado de desarrollo del organismo (Ferrada, 2011).

#### **1.4.3.2 Código de Barras de la Vida**

Es un sistema internacional que tiene como objetivo principal descubrir una o varias regiones de la secuencia de ADN y estandarizarlas, para identificar a todas las especies en el mundo (Puillandre, Lambert, Brouillet y Achaz, 2012).

El sistema Barcode permite la identificación de especies y el descubrimiento de otras de una forma rápida y eficaz por medio del análisis de regiones de ADN específicas que se encuentran presentes en el genoma de todas las especies, lo que permite su identificación y la realización de filogenia por medio del análisis de estas secuencias (Hollingsworth, 2011).

Las regiones de ADN analizadas se amplifican mediante primers específicos a través de la PCR, se secuencian por medio de la metodología de Sanger de primera generación, se analizan y por último se comparan en una biblioteca referencial de la vida. Existen regiones de ADN específicas para realizar el análisis Barcode en animales, plantas, hongos, entre otros (Hollingsworth, Graham y Little, 2011).

El Consorcio para el Grupo de trabajo del Código de Barras de la Vida (CBOL Plant, 2009) propuso para el estudio de dos regiones codificantes del genoma cloroplástico: *matK*, *rbcLa*. Estas regiones son llamadas “código de barras núcleo”, ya que son la base para la identificación de especies en plantas, aunque se están probando nuevas



regiones para la identificación intraespecífica de regiones de ADN cloroplástico como: *psbA-trnH*, *rpoC*, *rpoB*, entre otras y regiones de ADN nuclear son espaciadores intergénicos *nrITS* (Chen *et al.*, 2010).

### **1.5 Regiones de ADN**

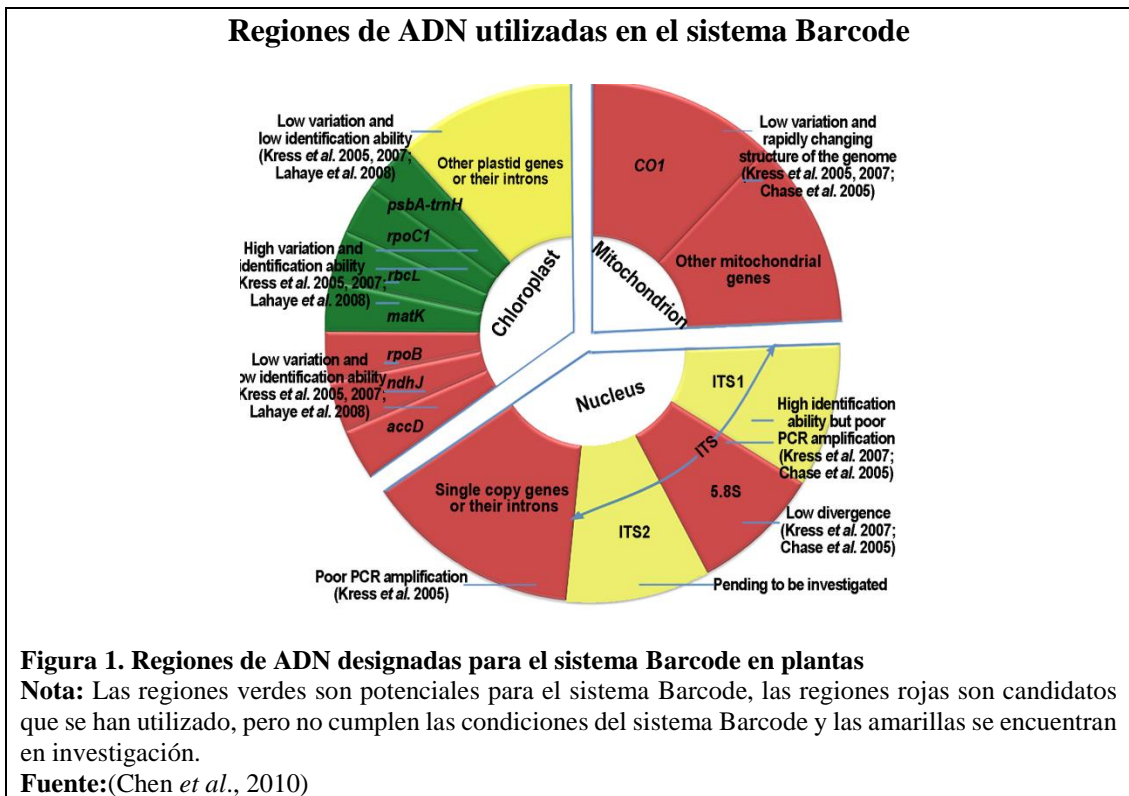
Son secuencias de nucleótidos fáciles de identificar dentro del genoma. Son utilizadas para la identificación, establecimiento de la diversidad genética y de relaciones evolutivas de especies por los siguientes criterios:

- Universales, se encuentran dentro de todos los genomas y también se los puede amplificar y secuenciar de una manera rápida y fácil.
- Calidad de las secuencias
- Discriminatorios, permiten diferenciar e identificar especies (Hollingsworth *et al.*, 2011).

Para los estudios de identificación, filogenia y determinación de la variabilidad molecular se han analizado diferentes regiones de ADN nuclear, cloroplástico y mitocondrial.

En plantas se han utilizado las regiones de ADN cloroplástico y ADN nuclear, el ADN mitocondrial no ha sido eficiente para discriminación e identificación de especies (Chen *et al.*, 2010).

El uso de marcadores genéticos bioquímicos y moleculares en especies forestales permitió un salto cualitativo en la confiabilidad de la información sobre la variación genética y la resolución en forma contundente de problemas de importancia práctica tanto en genética poblacional como en programas de mejora (Gallo, Marchelli, Azpilicueta y Crego, 2006).



### 1.5.1 ADN ribosomal nuclear

Los ribosomas son organelos localizados en el citoplasma, matriz mitocondrial y cloroplastos de organismos vivos, son importantes para la síntesis de proteínas. El ADN ribosomal se clasifica en dos grupos: el ADNr 5S, unidad de repetición de 120 pb de gen con un espaciador intergénico (IGS) de 100 a 900 pb en longitud y el ADNr 45S, formado por tres regiones codificantes, 18S, 5.8S y 25S/26S, dos espaciadores intergénicos que se transcriben y separan las tres zonas anteriores (*ITS1* e *ITS2*) y un espaciador (IGS) (Galián, 2014).

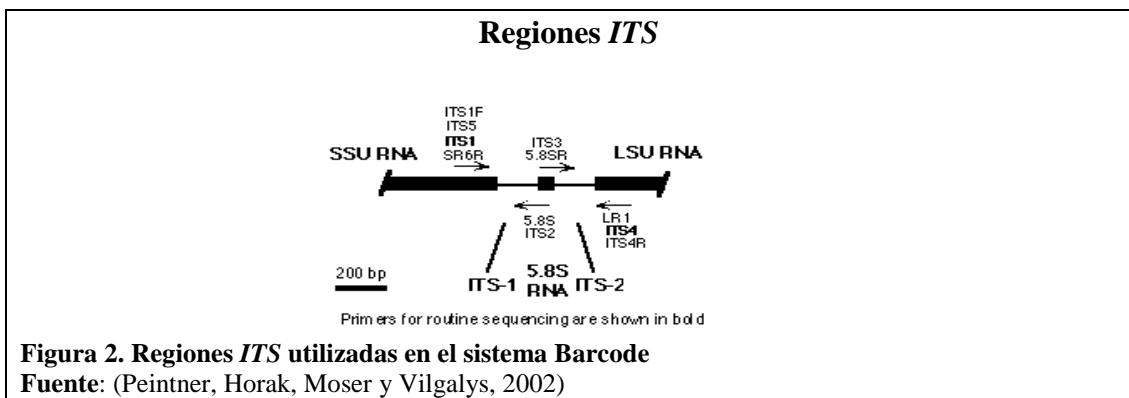
#### 1.5.1.1 Región nrITS

*nrITS* es un espaciador transcrito interno de ribosomas nucleares. Esta región se utiliza para el estudio y resolución de problemas taxonómicos a nivel de especie, debido a su gran variabilidad (Pang *et al.*, 2012). La región *ITS* está compuesta por tres

subunidades: *ITS1*, *5.8S* e *ITS2*, debido a que los espaciadores se encuentran flanqueando a la subunidad *5.8S*, la cual es muy conservada, facilita la alineación no ambigua de los espaciadores (Pallás, 2008).

La importancia del uso de esta región radica en la universalidad de sus cebadores, su alta variabilidad intragenómica ya que presenta múltiples copias de tamaño pequeño (en angiospermas una amplitud de 500 a 700 pb) y su fácil amplificación por PCR (García, 2014).

Estas características han permitido que esta región sea utilizada desde 1997 para la resolución de los problemas taxonómicos y se ha probado en familias como *Orchideaceae* y *Cyperaceae*; así como el esclarecimiento de relaciones filogenéticas entre taxa a niveles genérico e intraespecífico (CPBOL, 2011).



### 1.5.2 ADN cloroplástico

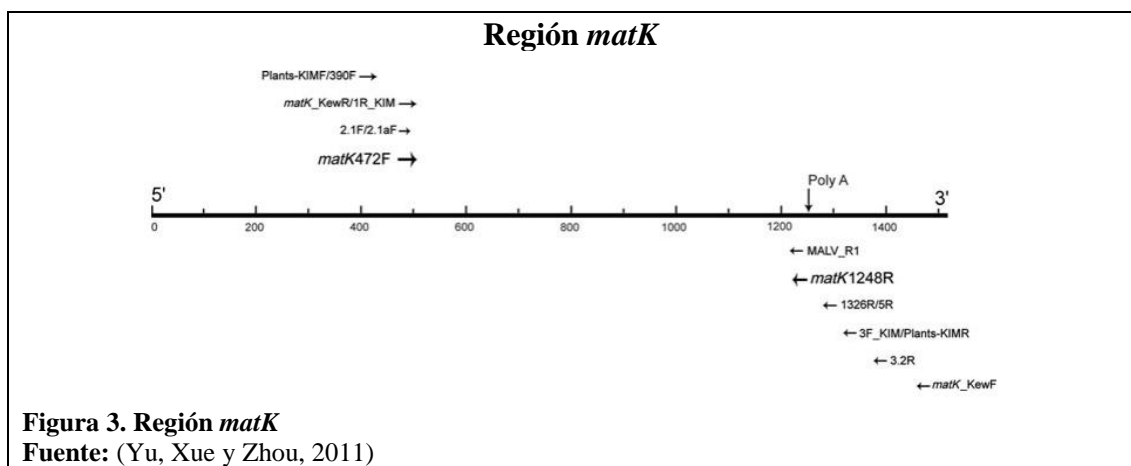
El ADN cloroplástico es una molécula circular, su tamaño se encuentra entre 120 kb, 9 kb y 217 kb. Su herencia es de clase clonal, uniparental, generalmente materna en angiospermas y paterna en gimnospermas. La evolución del ADN de cloroplasto es lenta, con una baja tasa en la sustitución de nucleótidos, con su estructura molecular altamente conservada y secuencia entre especies muy variadas (Lewin, 1993). Estas

características permiten que se utilice esta molécula para análisis filogenéticos y se utilice para investigaciones de procesos evolutivos dentro de una especie (Donoso, Premoli, Gallo y Ipinza, 2004).

### 1.5.2.1 Región *matK*

*MatK* es una región de ADN codificante, cuyo tamaño es de 1570 pb en longitud, y codifica para una proteína maturasa. Esta región está situada dentro de un intrón del gen cloroplástico *trnK*. *matK* es un fragmento situado entre los anexos 5' y 3' del gen *trnK*, su función es de madurasa del intrón, en el corte y empalme del mismo (Wojciechowski, Lavin y Sanderson, 2004).

Esta región fue designada para Barcode por Lahaye *et al.*, (2008) debido a que posee una tasa evolutiva rápida y proporciona una muy buena señal de filogenia para solucionar relaciones evolutivas entre plantas en todos los niveles taxonómicos. Para DNA Barcoding, es suficiente la utilización de un fragmento de 600-800 pb. El gen *matK* (Maturasa K) no posee inserciones o deleciones, lo que significa restricción evolutiva y conservación de la función, por lo tanto se las utiliza para filogenia, debido a que, en las plantas angiospermas, *matK* es el único gen plastídico que presenta el dominio putativo maturasa (Neuhaus y Link, 1987). Es eficiente cuando se aplica para efectuar el análisis filogenético en plantas (Ferrada, 2011).



### **1.5.2.2 Región *rbcLa***

La región de ADN *rbcLa* codifica a la subunidad larga de la enzima Ribulosa-Bifosfato-carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO), que es el más destacado aceptor de carbono en todos los organismos eucariontes fotosintéticos y cianobacterias. *rbcLa* es una de las regiones de ADN más usadas para elaborar filogenias en angiospermas debido a su baja tasa de sustitución de nucleótidos y a su baja tasa evolutiva, se le considera adecuado para el estudio de filogenia (Hasebe *et al.*, 1994; Martínez y Adrián, 2011). Es sencillo de amplificar, de secuenciar y alinear; sin embargo, tiene una discriminación restringida en estudios intraespecíficos (Kress y Erickson, 2007).

### **1.5.2.3 Región *psbA-trnH***

El gen *psbA-trnH* es una de las regiones no codificantes que presenta mayor variación en el cloroplasto. Se encuentra localizado entre los genes que codifican para la proteína D1 del fotosistema II (*psbA*) y para el RNAt His (GUG).

Es un espaciador intragénico que se utiliza para discriminar a nivel intraespecífico cuando las especies examinadas son muy semejantes. Presenta cierta dificultad en la amplificación al tener cierto aumento de secuencias y de variabilidad genética (Bruni *et al.*, 2012). Se utiliza en estudios de Barcode en plantas terrestres, por eso a pesar de las limitaciones por la baja calidad en las secuencias se considera un potencial para DNA Barcode en plantas (Sánchez, 2013). También ha sido usada en estudios de filogenia a nivel de especie en plantas de la familia Huperziaceae, Asteraceae y en complejos de especies de la familia Leguminosae (Bhamra, Heinrich, Howard, Johnson y Slater, 2015).

### **1.5.3 ADN mitocondrial**

La mitocondria se caracteriza por poseer un sistema genético propio y la maquinaria necesaria para sintetizar el ADN, ARN y las proteínas que codifica. Cada mitocondria tiene entre 2 y 10 copias de la molécula de ADN. El ADN mitocondrial es una molécula circular, cerrada y de doble cadena (Solari, 2004). Las dos cadenas complementarias tienen una proporción de Citosina y Guanina muy diferente, por lo que tienen un peso molecular muy distinto. El ADN mitocondrial presenta información compactada ya que sus genes no presentan intrones, se disponen uno a continuación de otro sin tramos intermedio no codificantes (Álvarez, 2008).

### **1.5.4 Variación nucleotídica**

La tasa de mutación es la probabilidad que un gen sufra mutación en una sola generación o en la formación de un solo gameto. La medición de la tasa de mutación es importante en la genética de poblaciones, en estudios de evolución, y en el análisis del efecto de los mutágenos ambientales (Hastings, 2013; Moreno, 2010). Las variaciones más utilizadas para el análisis de diversidad son las transversiones, translaciones y gaps que se encuentran dentro de la secuencia de ADN (Navarro, Barbadilla y Ruiz, 2010).

Las variaciones nucleotídicas nos permiten analizar la variabilidad dentro de las especies. Por lo cual para estudiar la biodiversidad se realiza un estudio filogenético de un grupo con regiones de ADN mitocondriales y nucleares, debido a que en muchos casos la interpretación de la evolución de un grupo taxonómico puede ser afectada más por la tasa evolutiva de la región de ADN analizado que por la evolución real de este grupo (Freeland, 2005).

### **1.5.5 Coeficiente de variabilidad genética**

La diferencia genética entre individuos se obtiene a partir de la comparación de varios loci del genoma de los individuos. Se utiliza el coeficiente de variabilidad nucleotídica, este índice estima el número de mutaciones nucleotídicas que se han acumulado en las regiones de ADN. Cuando el índice equivale a 1 quiere decir que la región es totalmente polimórfica, caso contrario si el coeficiente se aproxima a 0 la región se encuentra conservada (Nei, 1988).

## **2. Marco Metodológico**

### **2.1 Recolección de muestras**

Se recolectó muestras botánicas y tejido foliar de 38 individuos de la especie Ishpingo (*Ocotea quixos*). En cada punto de recolección se realizó la georreferenciación según lo estipulado en la guía para la recolección y preparación de muestras botánicas de Cascante (2008). Las muestras se obtuvieron de 11 localidades de 5 provincias de la Amazonía ecuatoriana, donde se cultiva tradicionalmente el Ishpingo: Archidona, Misahualli y Tena (Napo); Puerto Orellana, Coca y Cavernas del Coca (Orellana); Puyo (Pastaza); Macas, Upano y Quíloa (Morona Santiago); Palanda y La Canela (Zamora Chinchipe) (Anexo 1).

Las muestras botánicas fueron identificadas morfológicamente en el Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. El material foliar colectado se conservó en sílica gel, después fue pulverizado con un molino marca “Bistro-Bodum” y colocado en tubos de ensayo. Las muestras se almacenaron a -20 °C para preservar el material genético (Cadavid, Rosero y Uribe, 2013).

### **2.2 Extracción de ADN**

Se probaron diferentes protocolos de extracción de ADN como: Doyle y Doyle (1987); Healey, Furtado, Cooper y Henry (2014); Lade, Patil y Paikrao (2014). Debido a que las hojas de Ishpingo poseen una alta cantidad de polifenoles los protocolos mencionados presentaron problemas para la extracción de ADN en *Ocotea quixos* (Noriega y Dacarro, 2008b), por lo tanto, se realizaron lavados previos propuestos en el protocolo de separación de polifenoles y polisacáridos de Porebski, Bailey y Baum (1997).



Para realizar los lavados se obtuvieron 20mg de muestra pulverizada y se colocaron en un tubo eppendorf (1.5 mL), se añadió 1 mL del Buffer de Lavado (100mM HEPES (1M), 0.1% PVP, 4% B Mercaptoetanol). Se colocó en el vórtex por 5 minutos para eliminar los polifenoles. Se centrifugó a 12 000 g durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se repitió cinco veces el procedimiento. Al finalizar la última eliminación del sobrenadante, se colocó 1 mL de Buffer de Resuspensión (20 mM TrisCl (pH 8) y 10 mM EDTA (pH 8)), se colocó en el vórtex por 5 minutos, se centrifugó a 12 000 g durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante.

Posterior al lavado, se realizó el protocolo de extracción simple de ADN foliar de Doyle y Doyle (1987): Se colocó 600  $\mu$ L de Buffer de Lisis (100mM TrisCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8) y 500 mM NaCl) en la muestra sin polifenoles, se agitó hasta homogenizar la mezcla, después se añadió 94  $\mu$ L de SDS (10%) y se mezcló por inversión de 5 a 8 veces. Se calentó la solución durante 10 minutos a 65°C, se colocaron 118.5  $\mu$ L de acetato de potasio (5M), se mezcló por inversión de 5 a 8 veces y se colocó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf (1.5 mL) y se adicionó 600  $\mu$ L de fenol: cloroformo (1:1), se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se traspasó la fase superior a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregó 360  $\mu$ L ó (0.6 volúmenes) de isopropanol frío y se almacenó a -20°C por toda la noche. Se centrifugó la solución por 3 minutos a 13 000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se enjuagó con 400  $\mu$ L de etanol (70%) y se centrifugó por 3 minutos a 13000 rpm. Se repitió tres veces este proceso. En el último lavado, se eliminó el etanol y se resuspendió el pellet con 30  $\mu$ L de TE 1X (10mM TrisCl (pH 8) y 1 mM EDTA).

Para determinar la presencia de ADN se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Para la preparación de 50 mL de gel se colocó 0.5g de agarosa ultra pura de Invitrogen y 49.5 mL TBE, se calentó por 1 minuto en el microondas hasta que sea una mezcla homogénea. Cuando la temperatura de la agarosa alcanzó 38°C se colocó 6 µL de SybrSafe de Invitrogen. Se programó la electroforesis a 90 V por 45 minutos y se visualizó en el fotodocumentador. Se comparó cualitativamente el tamaño y la concentración de las bandas obtenidas con el inserto del TrackIt 100 bp DNA Ladder (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, 2016b).

### 2.3 Amplificación de regiones de ADN

Las regiones de ADN cloroplástico *matK*, *rbcLa*, *psbA-trnH* y la región nuclear *ITS*, definidas para el Sistema Barcode se amplificaron mediante cebadores específicos como se menciona en la Tabla 2.

**Tabla 2.**  
**Primers para la amplificación de regiones de ADN**

Primers	Secuencia (5'→3')	Referencias
<i>matK</i> -1RKIM (F)	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	(Lahaye <i>et al.</i> , 2008)
<i>matK</i> -3FKIM (R)	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	
<i>rbcLa</i> (F)	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	(CBOL Plant <i>et al.</i> , 2009)
<i>rbcLa</i> (R)	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	(Levin <i>et al.</i> , 2003)
<i>psbA</i> (F)	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	(Kress y Erickson, 2007)
<i>trnH</i> (R)	CGCGCATGGTGGATTACAAAATCC	
<i>ITS leu1</i> (F)	GTCCACTGAACCTTATCATTAG	(Bolson, Smidt, Brotto y Silva-Pereira, 2015)
<i>ITS 4</i> (R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White <i>et al.</i> , 1990)

**Nota:** (F) Secuencia Forward y (R) Secuencia Reverse

La preparación de la mezcla de PCR se realizó según el inserto de la taq polimerasa Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix como se detallada en la Tabla 3.

**Tabla 3.**  
**Preparación de la mezcla PCR**

Reactivo/Concentración	Volumen
Platinum™ SuperFi™ Master Mix (2X)	125 µL
Primer Forward (10 µM)	0.5 µL
Primer Reverse (10 µM)	0.5 µL
Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix	5 µL
ADN	1 µL
Agua libre de nucleasas	5.5 µL
<b>Total</b>	<b>25 µL</b>

**Nota:** Reactivos para la PCR

**Fuente:** Taq Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix, 2016

Se realizó la estandarización de la temperatura de hibridación siguiendo las especificaciones de temperatura (50°C - 55°C), que se encuentran en el inserto de la taq Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix para la realización de los protocolos de PCR.

Para las regiones *rbcLa*, *psbA-trnH* se probaron dos temperaturas: la más alta (55°C) y más baja (50°C). Para la región *matK* se experimentó con tres temperaturas: la temperatura más alta (55°C) y dos temperaturas intermedias (52 y 53°C). En la región *ITS* se emplearon dos temperaturas intermedias (51 y 53°C) como se indica en el Anexo 2 (Thermo Fisher Scientific, 2016a).

Para comprobar la amplificación de las regiones de ADN se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%.

#### **2.4 Secuenciación de regiones de ADN**

El secuenciamiento y purificación de las muestras se realizó en la empresa MacroGen (Corea del Sur) utilizando el método de secuenciación simple de Sanger automatizado, que se basa en la replicación de ADN con la adición de 4 didesoxinucleótidos con

fluorocromos que detienen la reacción. El marcaje fluorescente permite la detección del DNA durante la electroforesis y la identificación de los nucleótidos que nos proporcionarán cromatogramas de la secuencia de ADN obtenida (García-Sancho, 2010). Se enviaron 35 muestras de cada región del ADN, las muestras obtenidas tenían una concentración entre 20-100 ng/  $\mu$ L que fueron determinadas mediante comparación visual con el inserto del TrackIt 100 bp DNA Ladder (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, 2016b). El volumen enviado fue de 20  $\mu$ L/muestra y fueron secuenciados los segmentos Forward y el Reverse de cada muestra.

## **2.5 Análisis de secuencias**

Los cromatogramas generados por el secuenciador en formato “.abi”, fueron importados y modificados en el programa MEGA7 (Análisis de Genética Evolutiva Molecular Computacional). Se eligieron los cromatogramas que poseían una calidad de secuencia  $\geq 80\%$ , los que no cumplieron con este criterio fueron descartados del análisis (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Los cromatogramas se revisaron y editaron. Se eliminaron los extremos en los que existía la presencia de ruido o la pérdida de resolución del cromatograma (González, 2014).

Las secuencias consenso de cada muestra se desarrollaron con las secuencias editadas forward y reverse, cuando las secuencias poseían una baja calidad se realizó con sólo una secuencia (forward o reverse), en formato FastaQ (Ricker, 2013). La homología e identidad de las secuencias se comparó con el Banco de Genes (NCBI) mediante el programa Nucleotide BLASTn.

Para alinear las secuencias se utilizó el algoritmo MUSCLE que se emplea para generar alineamientos múltiples de ácidos nucleicos. Se determinó la cantidad de sitios

polimórficos en el alineamiento realizado y el tamaño promedio en pares de bases (pb) de las regiones de ADN. A partir del alineamiento de las secuencias de cada región de ADN se elaboró la reconstrucción filogenética y el cálculo de la variabilidad genética.

Para realizar la filogenia de cada región de ADN se utilizó el método estadístico de Máxima Verosimilitud sobre el modelo de datos específicos en el programa MEGA7 (Felsenstein, 1981). El test filogenético se realizó por el método de Bootstrap con 1000 réplicas. Las sustituciones evaluadas fueron de tipo nucleotídicas y el modelo de sustituciones fue de Jukes-Cantor (1969), el cual es un modelo sencillo que estima la distancia entre secuencias y asume la misma frecuencia para los cuatro nucleótidos, así como las probabilidades de sustitución de las cuatro bases (Guindon y Gascuel, 2003; Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Los árboles de máxima verosimilitud obtenidos fueron enraizados siguiendo el criterio de grupos externos u “outgroups”. Como outgroups se utilizaron secuencias de *Ocotea veraguensis* para las regiones *matK*, *rbcLa* e *ITS* y secuencias de *Ocotea porosa* para la región *psbA-trnH* obtenidas del GENBank. Se eligió a *Ocotea veraguensis* y *Ocotea porosa* debido a que son grupos hermanos de la especie en estudio, pertenecen al mismo género y poseen un estrecho parentesco con *Ocotea quixos*. Además permiten la comparación e identificación de los caracteres compartidos y de los caracteres individuales de cada especie (Campbell y Reece, 2007; Contreras, Cuevas, Goyonechea y Iturbe, 2007). La variabilidad genética se analizó con el coeficiente de conservación y el coeficiente de variabilidad nucleotídica de Nei. Para lo cual se realizó un alineamiento mediante el algoritmo MUSCLE excluyendo las secuencias obtenidas del GENBank, para evitar el aumento de la variabilidad genética.

Se obtuvo el coeficiente de conservación de las regiones, que permite conocer si las secuencias son polimórficas o no, cuando el coeficiente se aproxima a 1 las secuencias no presentan variaciones nucleotídicas como transversiones, transiciones, ni gaps, es decir son conservadas (Giraldo, Uribe y López, 2011) .

El coeficiente de variabilidad nucleotídica de Nei (1988) se determinó por el “análisis de estimación de diversidad con el modelo de datos específicos” y se estimó con el modelo de Tamura–Nei, que toma en cuenta tanto el sesgo en G+C como la proporción de transiciones/transversiones en la secuencia de ADN (Nei y Kumar, 2000). Se realizó la comparación de los coeficientes de variabilidad nucleotídica de cada región de ADN analizada (Kumar *et al.*, 2016; Riascos, Victoria y Angel, 2003).

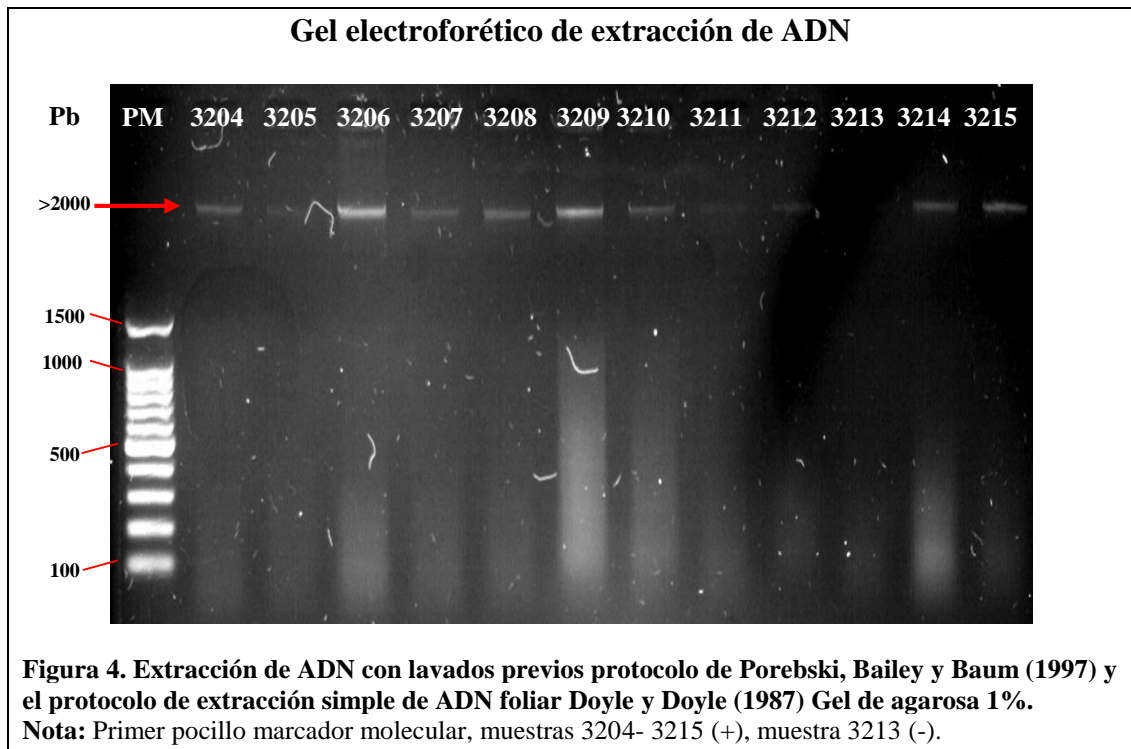
### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN de 35 muestras (Figura 4) después de los lavados realizados propuestos en el protocolo de separación de polifenoles y polisacáridos de Porebski, Bailey y Baum (1997). El ADN obtenido se encontró sin degradación y libre de contaminación, la banda obtenida correspondía al tamaño esperado: >2000 pb con una concentración de 40-100 ng/  $\mu$ L aproximadamente (Gómez *et al.*, 2012; Fraga, Nodarse, Rodríguez, Fuentes, Castex y Fernández-Calienes, 2004).

Los lavados fueron necesarios porque las hojas de Ishpingo contienen una alta concentración de polifenoles y polisacáridos (Noriega y Dacarro, 2008); estos pueden inhibir algunas enzimas que sirven para la extracción del ADN, y además poseen una solubilidad parecida al ADN por lo cual protocolos clásicos no pueden removerlos completamente durante la extracción, lo que provoca la inhibición de la extracción de ADN o su contaminación (Amaru, Peñaloza, Miguez, Torres y Cuevas, 2008; Sepúlveda, 2014).

Los protocolos de extracción de ADN: Doyle y Doyle (1987); Healey, Furtado, Cooper y Henry (2014) y Lade, Patil y Paikrao (2014), resultaron ineficientes para la obtención de ADN de *Ocotea quixos* ya que no se logró extraer ADN de las muestras. Al ser protocolos clásicos no lograron la remoción de los polifenoles y se inhibió la extracción de ADN (Gómez, Ruiz, Saavedra y Correa, 2012).



## 3.2 Amplificación de regiones de ADN

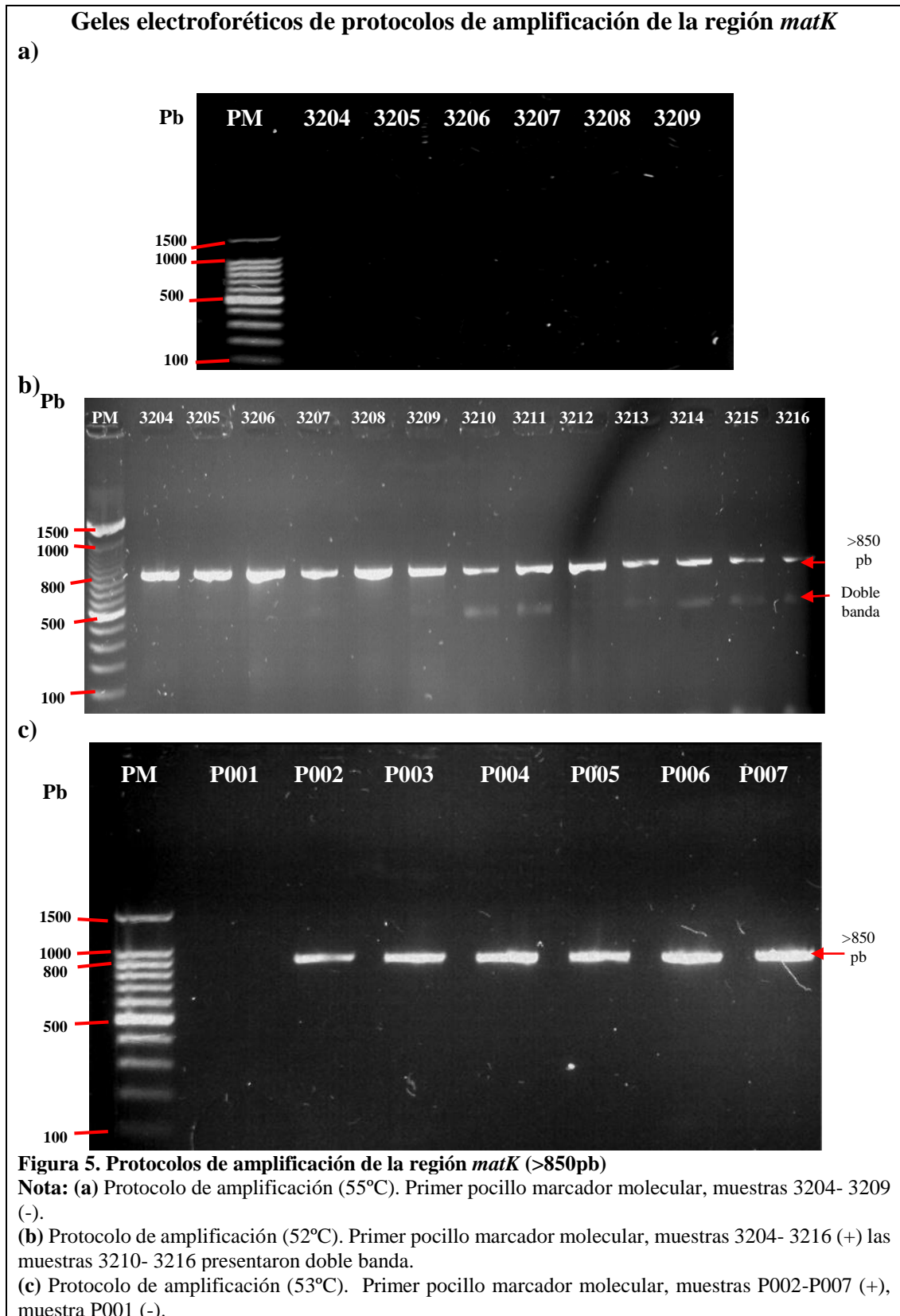
### 3.2.1 Región *matK*

La temperatura de hibridación de 53°C amplificó la región *matK* en todas las muestras como se observa en la Figura 5, no existió la presencia de doble banda en ninguna de las muestras. El incremento de la temperatura de hibridación, aumenta la especificidad de los cebadores y evita uniones incorrectas de los mismos (Schrader *et al.*, 2012). La banda de *matK* obtenida en cada muestra tuvo una concentración aproximada entre 20 - 100 ng/  $\mu$ L sin la presencia de contaminación (Sepúlveda, 2014; Thermo Fisher Scientific, 2016).

La temperatura de hibridación de 55°C inhibió la amplificación de la región por ser alta evitando la unión a los sitios específicos de los cebadores (Microbial Genetics, 2002; Schrader *et al.*, 2012) y de 52°C generó doble banda por la unión no específica



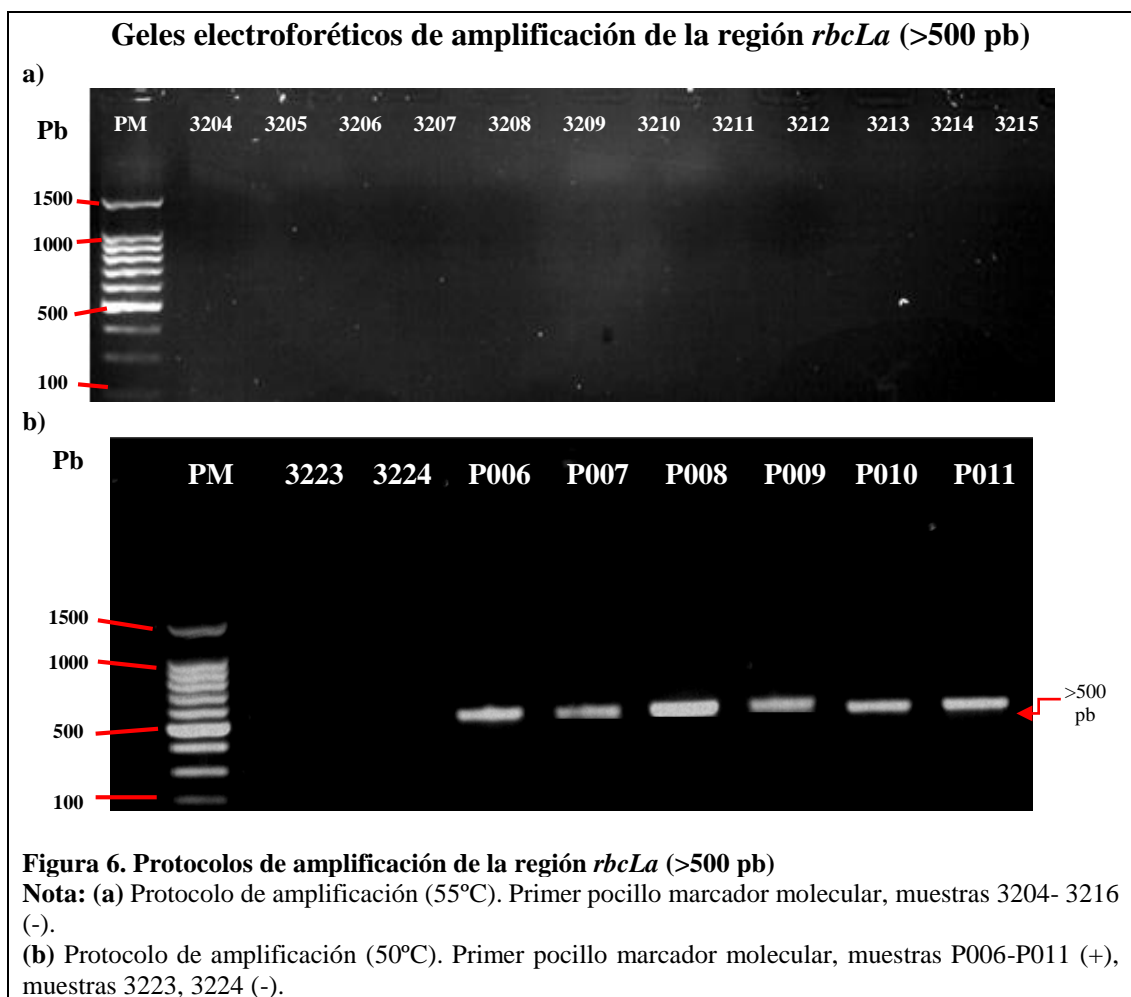
de los cebadores lo que produce la amplificación de otras regiones del ADN (Martín y Alvaro, 2001; Tallei y Kolondam, 2015).



### 3.2.2 Región *rbcLa*

La temperatura de hibridación de 50°C permitió la amplificación de la región *rbcLa* en todas las muestras (Figura 6), al mostrarse un solo amplicón demostró que la unión fue específica, la banda obtenida en cada muestra correspondió a un tamaño >500 pb y no hubo contaminación (Guevara, Garza y Cázares, 2004).

La temperatura de hibridación de 55°C fue muy alta provocando que la unión entre los oligonucleótidos y sus sitios complementarios fuera inestable e inhibió la síntesis de ADN (Espinosa, 2007).



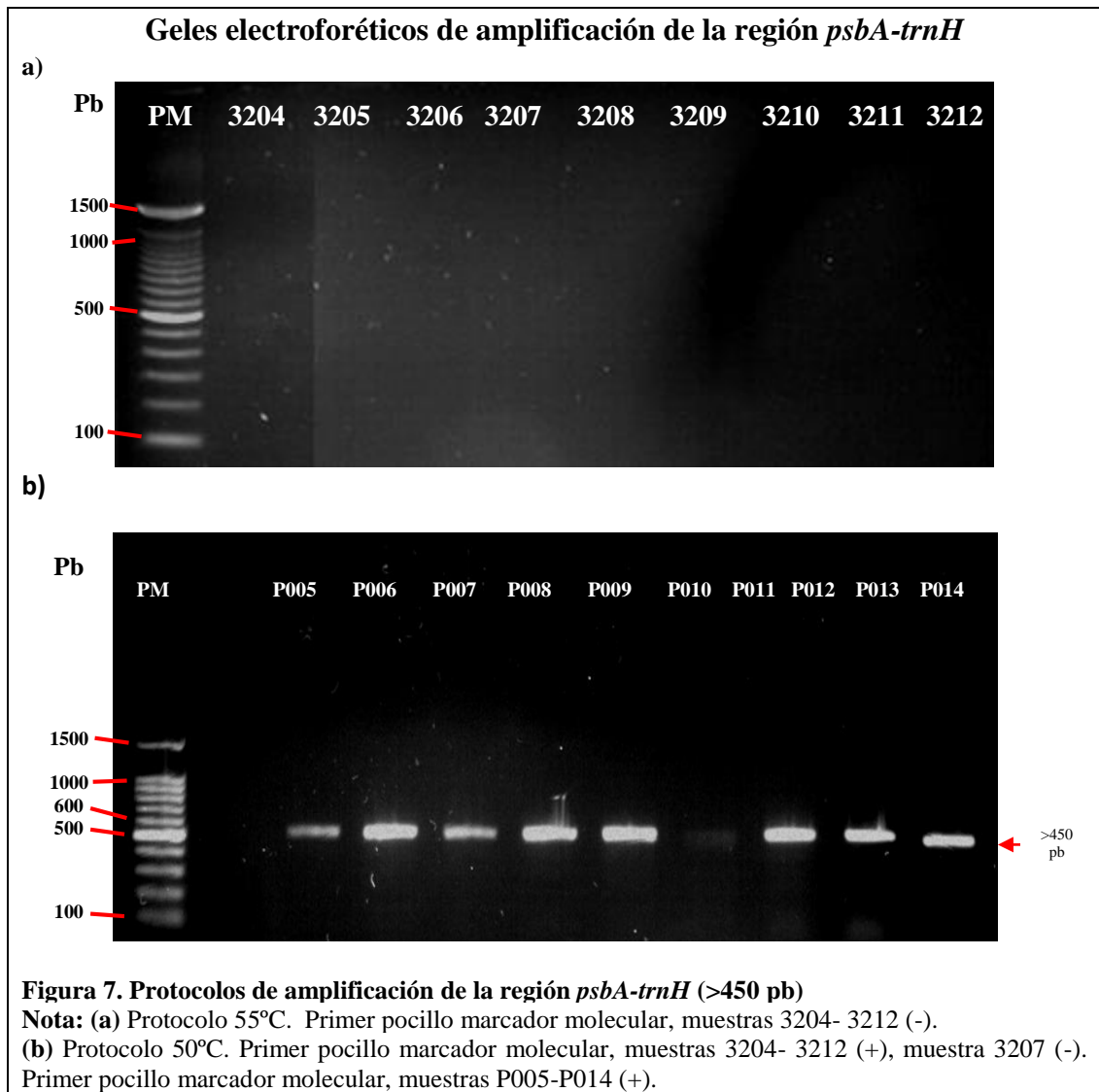
### 3.2.3 Región *psbA-trnH*

Se amplificó la región *psbA-trnH* en todas las muestras con la temperatura de hibridación de 50°C, con bandas específicas (>450 pb) de concentración aproximada entre 20 y 80 ng/ µL (Fraga *et al.*, 2004), libres de contaminación, presentan un rendimiento óptimo que indica que no existió la amplificación de productos falsos (Hecker y Roux, 1996) (Figura 7).

A diferencia de los otros marcadores la temperatura de hibridación óptima fue baja (50°C), esta región carece de estructuras secundarias (GC) en el primer *psbA*, lo que permite una óptima amplificación de la región a una menor temperatura (Tomar, 2010).

En el caso de las muestras que no amplificaron con esta temperatura, se debió a la alta concentración de ADN que evitó la unión de los cebadores a la cadena de ADN, en esas muestras se diluyó con TE (1X) y se amplificó nuevamente obteniendo resultados positivos (Pang *et al.*, 2012).

En cambio, la temperatura 55°C inhibió la amplificación de esta región para las muestras, ya que fue una temperatura muy alta, que impidió la unión de los cebadores a los sitios específicos para iniciar la síntesis de ADN (Parra, Castañeda y Moreno, 2007).



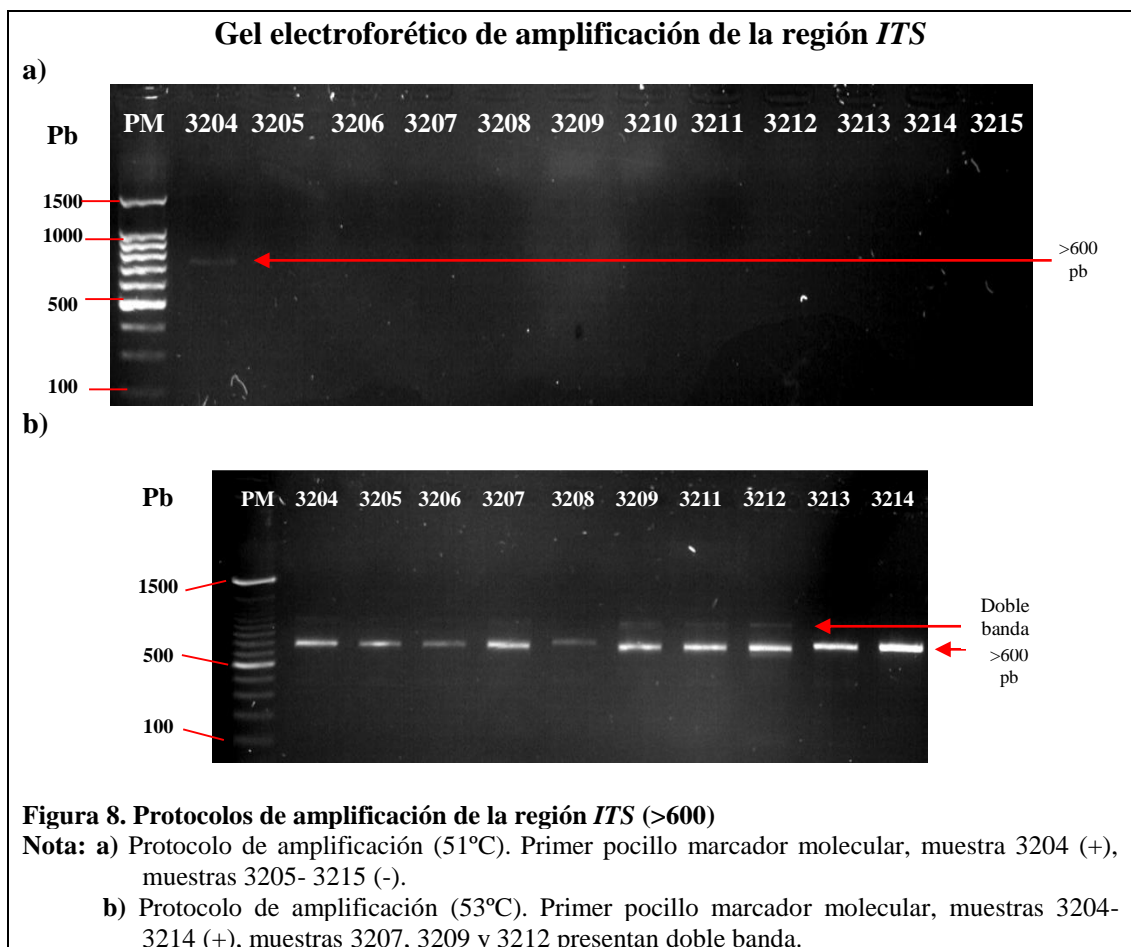
### 3.2.4 Región *ITS*

Se amplificó la región *ITS* en todas las muestras, la temperatura de hibridación 53°C fue adecuada para las muestras de *O. quixos*. Se presentó doble banda en 4 muestras. La producción de una doble banda ocurre por la unión no específica de los cebadores a la cadena de ADN (Tallei y Kolondam, 2015).

La temperatura de hibridación 51°C sólo amplificó la región *ITS* de una sola muestra, debido a que la estabilidad y especificidad del complejo no es eficiente a esa temperatura (Tamay, Ibarra y Velasquillo, 2013).

El ITS al ser un primer universal puede facilitar la amplificación de contaminantes durante la PCR. A pesar de que la mayoría de las copias de ITS por genoma son idénticas, se pueden presentar copias poco comunes en un individuo que no son amplificadas debido a la amplificación selectiva de una sola copia (Mort & Crawford, 2004).

Otra desventaja de la amplificación de esta región es el alto grado de contaminación que pueda darse en el proceso (especialmente por hongos), es decir que los primers para fragmentos de ITS no son específicos para plantas, la mayoría han sido diseñados para hongos. Como los hongos en algunos casos son simbiosntes con las plantas en ecosistemas naturales, es fácil obtener amplicones no específicos de fragmentos de ITS de plantas (Cheng, Chao y Li, 2015).



### 3.3 Análisis de regiones de ADN

El resultado del BLASTn determinó que la región de ADN *matK* identifica especies del género *Nectandra* (Query cover (QC) de 94-100% e Identidad 99-100%) como se observa en la Anexo 3. Algunos estudios mencionan que los géneros *Ocotea* y *Nectandra* se encuentran distribuidas geográficamente hasta los 3000 msnm, poseen características morfológicas y genéticas similares y en el pasado se los agrupaba en un solo género “*Porostema*” (Schreber, 1791). Actualmente algunos botánicos consideran estos géneros como sinónimos entre sí (Trofimov, Rudolph y Rohwer, 2016). También la región *matK* para la familia Lauraceae se encuentra conservada y no permite la identificación a nivel de género (Bolson, Smidt, Brotto y Silva-Pereira, 2015).

El resultado del BLASTn para la región de ADN *rbcLa* presentó dos especies del género *Ocotea* (*Ocotea quixos* y *Ocotea cymbarum*) con los mismos valores de QC  $\geq$  99% e identidad  $\geq$  99%. Estas especies se encuentran estrechamente relacionadas no sólo por su morfología sino también por su ubicación geográfica (Assis y de Mello-Silva, 2009); la región *rbcLa* al ser un gen constitutivo presenta un alto grado de conservación por lo que no permite la identificación de especies cercanas (Giovambattista *et al.*, 2001).

El resultado Blast para la región *psbA-trnH* fue QC e Identidad  $\geq$  95% para las especies: *Ocotea purpurea*, *Ocotea botrantha* y *Ocotea cuneata*. Estas tres especies se encuentran dentro del grupo de especies con flores unisexuales del género *Ocotea* distribuidas principalmente en la parte norte de Sudamérica (Werff, 2013). A pesar de que varios autores indiquen que esta región es variable, en el género *Ocotea* se encuentra conservada y no permite discriminar a nivel de especie (Kress y Erickson, 2007).

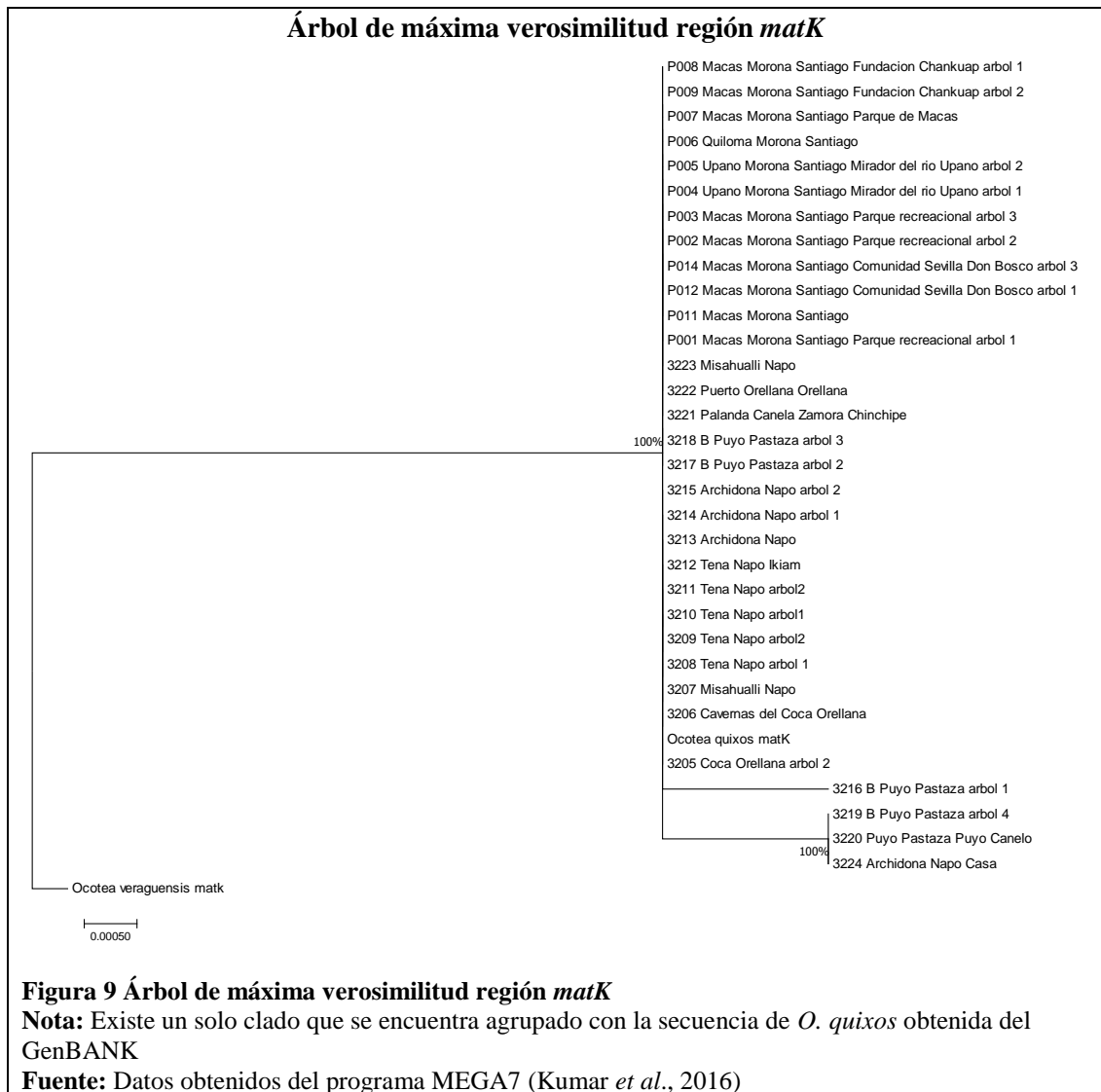
El resultado Blast para la región nuclear *ITS* fue QC  $\geq 61\%$  e Identidad  $\geq 94\%$  para las especies: *Ocotea quixos* y *Brassica oleraceae*. Es posible que este resultado se deba a la alta variabilidad intragenómica de la región ITS. Pese a su uso en estudios filogenéticos, en la familia Lauraceae presenta un alto índice de homoplasia, es decir que se puede amplificar la misma región en diferentes especies y no provenir de un ancestro común (Li, Christophel, Conran, & Li, 2004<sup>a</sup>; Mort & Crawford, 2004).

### 3.3.1 Región *matK*

De 35 secuencias analizadas de la región *matK* se obtuvieron 32 secuencias consenso de calidad mayor al 80%, la longitud media fue de 890 pb, que concuerda con el tamaño de 700-950 pb (Bolson *et al.*, 2015; Lahaye *et al.*, 2008). La región *matK* presentó un coeficiente de conservación de 0.99, 3 sitios polimórficos dentro del alineamiento y un coeficiente de variabilidad nucleotídica de 0.0003. Esta región posee una variabilidad nucleotídica baja, haciendo que su grado de conservación aumente (Dong, Liu, Yu, Wang y Zhou, 2012).

En el árbol de máxima verosimilitud los individuos se agrupan en un solo clado, con un soporte de bootstrap de 100%, siendo no discriminativo para *Ocotea quixos* (Figura 9).

En estudios realizados en Lauraceae, la región *matK* presenta bajas tasas de evolución, debido a que es un gen *housekeeping* o constitutivo que tiene niveles de expresión constante, impidiendo una discriminación intraespecífica (Liu, Chen, Song, Zhang y Chen, 2012). La divergencia en las secuencias en Lauraceae usando la región *matK* es baja, en algunos casos inclusive de cero (solo el 9.7% de caracteres informativos) lo que limita su utilidad para la clasificación de especies (Li, Christophel, Conran y Li, 2004; Rohwer, 2000).



**Figura 9** Árbol de máxima verosimilitud región *matK*

**Nota:** Existe un solo clado que se encuentra agrupado con la secuencia de *O. quixos* obtenida del GenBANK

**Fuente:** Datos obtenidos del programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016)

### 3.3.2 Región *rbcLa*

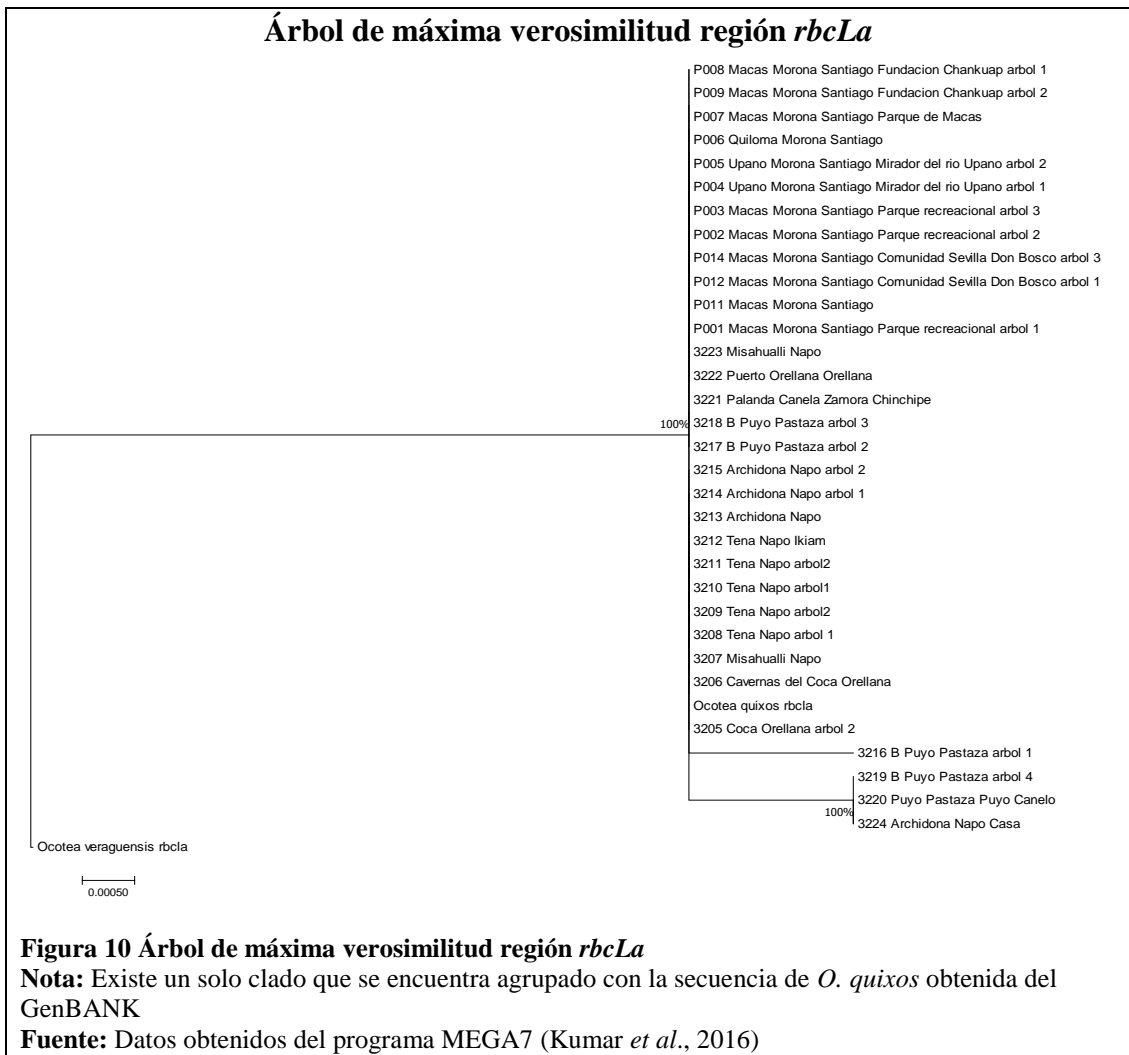
De las 35 secuencias de la región *rbcLa* analizadas se consiguieron 32 secuencias consenso con una calidad mayor 80%, la longitud media de las secuencias fue 613 pb (Nagy, Backeljau, Meyer y Jordaens, 2013).

La región *rbcLa* presentó un coeficiente de conservación de 0.99, 3 sitios polimórficos dentro del alineamiento y un coeficiente de variabilidad nucleotídica 0.0003.

Estudios realizados en el género *Ocotaea* y la región *rbcLa* mencionan que esta región posee un alto grado de conservación porque sus secuencias no poseen variabilidad nucleotídica (Dong, Liu, Yu, Wang y Zhou, 2012).



El árbol filogenético presentó un solo grupo con soporte de bootstrap de 100% (Figura 11). Para la familia Lauraceae la región *rbcLa* posee una tasa de sustitución nucleotídica lenta, lo que produce que esta región se encuentre conservada y no permita la discriminación a nivel de especies (Kress y Erickson, 2007).



### 3.3.3 Región *psbA-trnH*

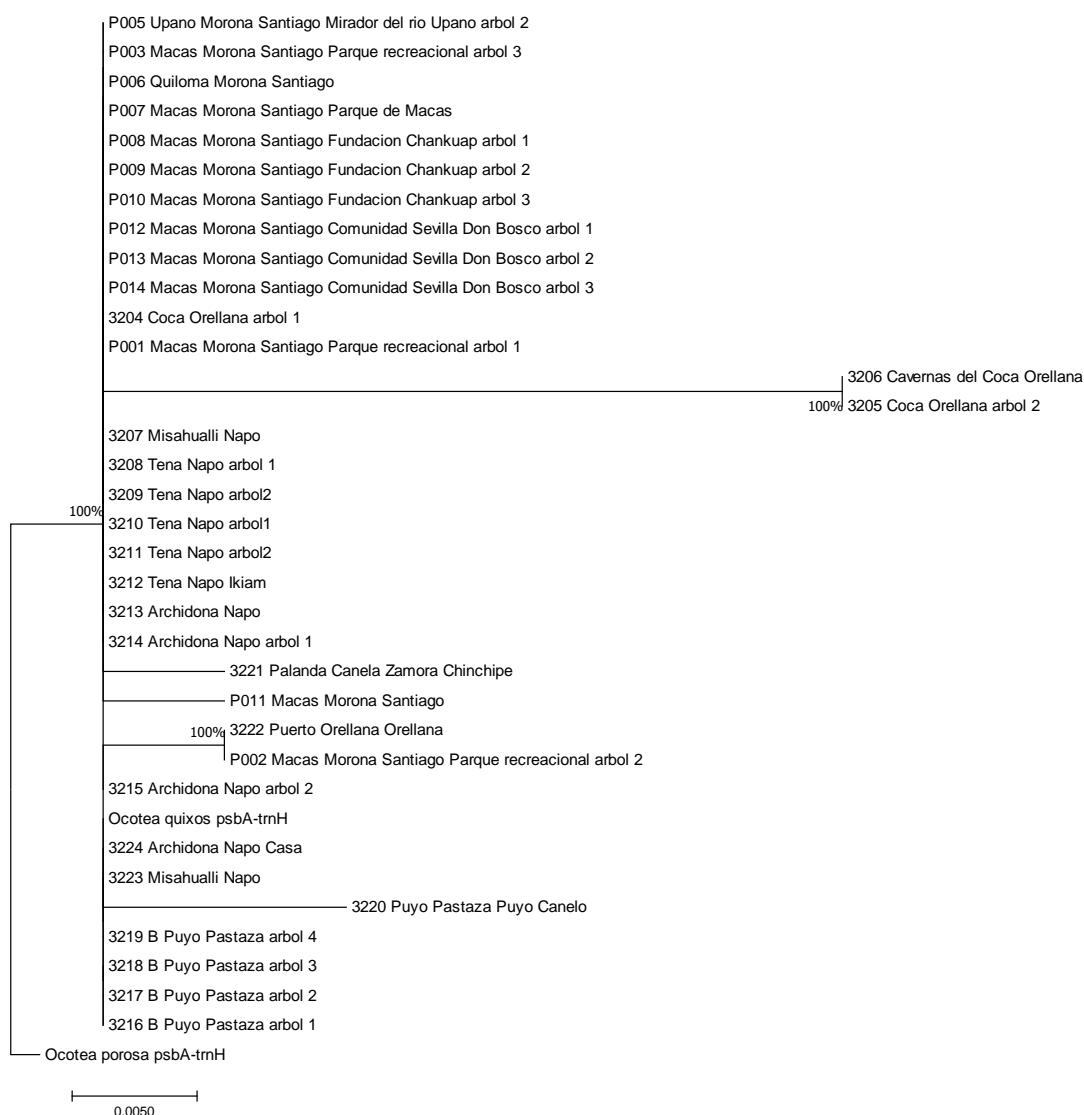
De las 35 secuencias analizadas de la región *psbA-trnH* se obtuvieron 34 secuencias consenso las cuales tenían una calidad mayor al 80%. La longitud media de esta región fue 535 pb (Pang *et al.*, 2012).

El coeficiente de conservación obtenido de la región *psbA-trnH* fue de 0.95 con 24 sitios polimórficos y un  $\pi = 0.0051$ , eso indica que esta región se encuentra conservada en *Ocotea quixos*. Esta región en el género *Ocotea* debido a su corta longitud, no proporciona altas tasas de sustitución nucleotídica lo que quiere decir que posee pocos sitios polimórficos (Liu *et al.*, 2012).

El árbol filogenético obtenido del agrupamiento no fue discriminativo para *Ocotea quixos*, debido que se formó un solo grupo con soporte de bootstrap de 100%, también se observa un subgrupo con las muestras 3206 y 3205 (Figura 11), esta separación puede sugerir que las muestras poseen regiones homólogas de secuencias que representan deleciones o inserciones (indeles) y por ende aumente su variabilidad separándolas de las demás (Kumar *et al.*, 2016).

Otros estudios mencionan que esta región posee repeticiones nucleotídicas que complican el alineamiento y es establecimiento de relaciones filogenéticas intraespecíficas en el género *Ocotea* (Kress y Erickson, 2007) .

### Árbol de máxima verosimilitud región *psbA-trnH*



**Figura 11**Árbol de máxima verosimilitud región *psbA-trnH*

**Nota:** Existe un solo clado que se encuentra agrupado con la secuencia de *O. quixos* obtenida del GenBANK

**Fuente:** Datos obtenidos del programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016)

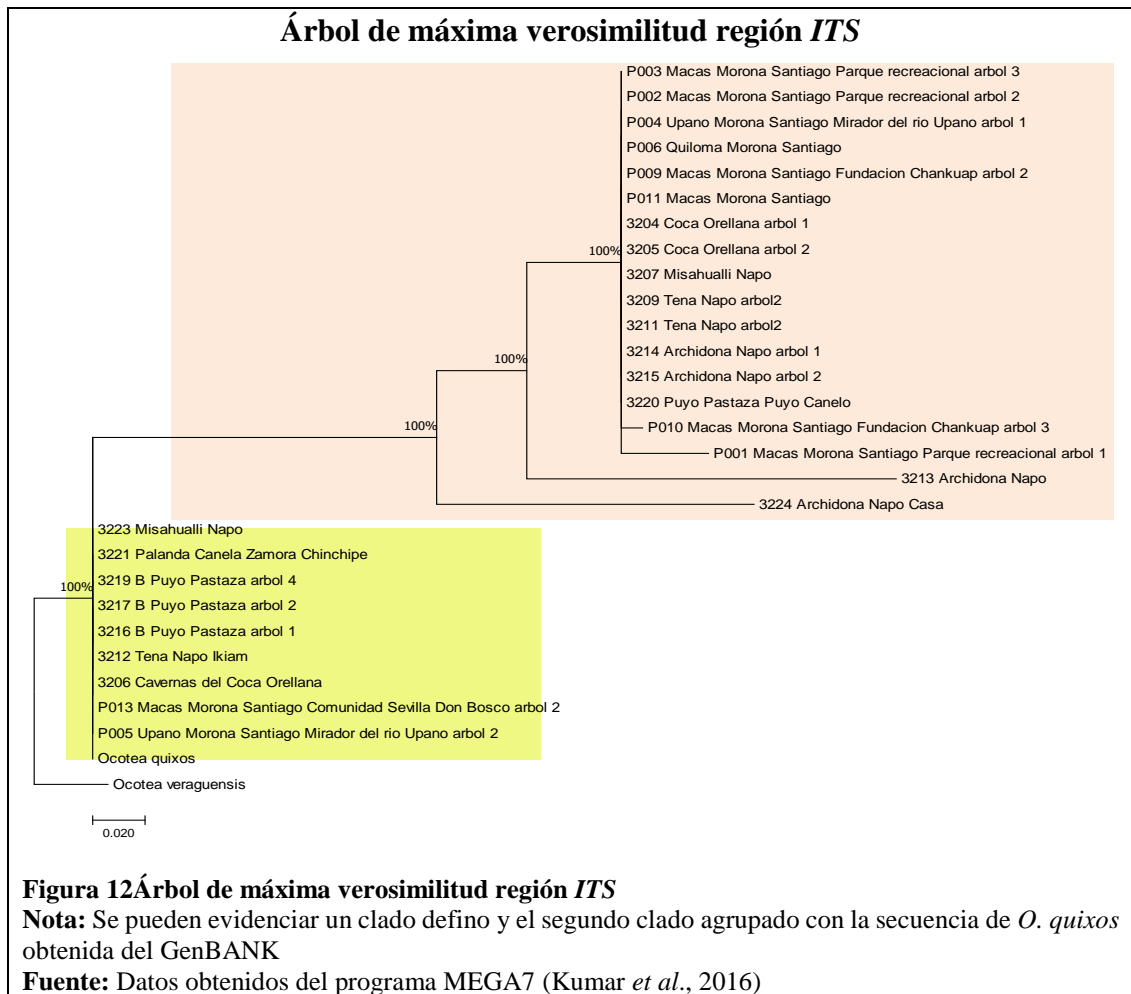
### 3.3.4 Región ITS

De las 35 secuencias de la región ITS obtenidas, se consiguieron 28 secuencias consenso. La longitud media de la secuencia fue de 777 pb (Álvarez, 2008).

La región presentó 428 sitios polimórficos, un coeficiente de conservación de la región de 0.298 y un coeficiente de variabilidad nucleotídica de 0.1137. ITS presenta una baja tasa de conservación debido a la gran variabilidad en longitud de la secuencia y a su

evolución concertada incompleta que conduce a la presencia de copias homólogas divergentes dentro de los individuos (CPBOL, 2011).

El árbol filogenético de la región *ITS* presentó dos clados, los individuos agrupados en el primer clado se encuentra asociado con la secuencia testigo de *Ocotea quixos* y en el segundo clado presentó un agrupamiento polifilético con un soporte de rama del 100% (Figura 12). La presencia de dos clados se puede deber a que el *ITS* presenta mayores niveles de discriminación y variabilidad interespecífica (Gao, Yao y Song, 2010), sin embargo, nuevos estudios han demostrado varias limitaciones asociadas con la región *ITS* especialmente en la inferencia filogenética, como por ejemplo en la existencia de variaciones extensivas en las secuencias de los genomas, determinadas por: eventos de formación de duplicaciones, el alojamiento genómico de pseudogenes y el incompleto arreglo de homogenización (Gardes y Bruns, 1993). Estos fenómenos crean una red de relaciones de secuencias parálogas que potencialmente confunden la precisión de la reconstrucción filogenética. La homoplasia es más alta en el *ITS* que en otras regiones de ADN, debido a la confusión ortólogo/parólogo, cambio compensatorio de bases, problemas en el alineamiento debido a la acumulación de indeles, errores en la secuencia (Grudinski, Pannell, Chase, Ahmad, y Muellner-Riehl, 2014). A pesar de ser una secuencia casi-universal usada en plantas para estudios filogenéticos, su comportamiento evolutivo complejo e impredecible reduce su utilidad en análisis filogenéticos. Se sugiere el uso de genes nucleares de una sola copia (Álvarez y Wendel, 2003).



### 3.4 Comparación de variabilidad nucleotídica entre las regiones *matK*, *rbcLa*, *psbA-trnH* e ITS

Los coeficientes de variabilidad genética obtenidos para la región *matK* y *rbcLa* fueron de  $\pi = 0.0003$ . En el género *Ocotea* las regiones *matK* y *rbcLa* se encuentran conservadas debido a que son regiones de genes constitutivos o *housekeeping*, los cuales se expresan constantemente en la célula y su tasa de variación nucleotídica es baja (Gruzdev *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012).

La región *psbA-trnH* posee un coeficiente de variabilidad de  $\pi = 0.0051$  mayor que las regiones *matK* y *rbcLa*. Esta región posee repeticiones mononucleotídicas lo que aumenta su variabilidad (Kress y Erickson, 2007). Pese a este aumento el coeficiente de variabilidad nucleotídica es bajo  $< 0,1$  como lo menciona (Jakobsson, Edge y

Rosenberg, 2013) y no proporciona altas tasas de sustitución nucleotídica debido a su corta longitud en el género *Ocotea*, por lo que su variabilidad nucleotídica es baja (Liu *et al.*, 2012).

La región *ITS* presentó el mayor coeficiente de variabilidad ( $\pi= 0.1137$ ) entre las cuatro regiones. Una de las principales razones de este aumento de variabilidad genética se debe al problema de homología de las secuencias que posee esta región, es decir, la aparición de copias divergentes dentro de los individuos, lo que puede conducir a un aumento de variabilidad genética (Hollingsworth *et al.*, 2011).

#### 4. Conclusiones

- La combinación de protocolos clásicos y modernos permiten una extracción de ADN libre de contaminantes en especies con alto contenido de polifenoles y polisacáridos.
- Los árboles obtenidos presentaron dos topologías, la primera no discriminativa en las regiones *matK*, *rbcLa* y *psbA-trnH*, indicando su alto grado de conservación en *Ocotea quixos* y no permitió establecer relaciones intraespecíficas dentro de la población. La segunda topología corresponde a la región *ITS* que presentó dos grupos de individuos, siendo discriminativa para *Ocotea quixos*.
- Las regiones de ADN *matK*, *rbcLa* y *psbA-trnH* en *Ocotea quixos* se encuentran muy conservadas (coeficiente de variación nucleotídica  $\pi \leq 0.005$ ) para el estudio de variabilidad genética en esta población.
- La región *ITS* presenta altas tasas de sustitución en los nucleótidos ( $\pi = 0.1137$ ) dentro de las secuencias de *Ocotea quixos*. Esta variabilidad está asociada a la cantidad de indeles dentro de la secuencia de ADN que aumentan la variabilidad nucleotídica.
- El coeficiente de la variabilidad genética obtenido en las regiones de ADN de *Ocotea quixos* es bajo ( $\pi = 0-0.1137$ ), lo que significa que la variabilidad genética de la especie se encuentra amenazada por la deforestación y el cultivo de clones de *Ocotea quixos*.
- A pesar que las regiones de ADN cloroplástico y nuclear empleadas en esta investigación, son utilizadas en el Sistema Barcode para los análisis de evolución, variabilidad genética y filogenia a nivel interespecífico e intraespecífico. En el presente estudio las regiones *matK*, *rbcLa*, *psbA-trnH* solo permitieron la identificación a nivel de género y familia debido a su alto grado de conservación,



mientras que la región *ITS* permitió una identificación confusa debido a la variabilidad generada por indeles propios de la región. Por lo cual se necesitan investigar otras regiones de ADN nuclear y cloroplástico para corroborar la variabilidad genética obtenida de *Ocotea quixos* y determinar el estado de la genética poblacional de la especie.

## 5. Recomendaciones

- Utilizar protocolos de lavado previo a la extracción de ADN en plantas con altas concentraciones de polifenoles y polisacáridos en sus hojas.
- Analizar nuevas regiones de ADN cloroplástico y nuclear que presenten mayor variabilidad en sus secuencias y menor grado de homoplasia para determinar la variabilidad genética de las poblaciones de *Ocotea quixos* en el Ecuador.
- Desarrollar programas de conservación en *Ocotea quixos*, debido a su baja variabilidad genética ( $\leq 0.11$ ) obtenida, lo que sugiere su amenaza.
- Analizar del genoma completo de la especie *Ocotea quixos* para realizar una mejor identificación a nivel intraespecífico.

## 6. Bibliografía

- Álvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Recuperado el 23 de enero de 2017, a partir de <http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/pubinv/IAF/17.pdf>
- Álvarez, V. (2008). *Estudio multidisciplinar de la variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones humanas*. Univ Santiago de Compostela.
- Amaru, R., Peñaloza, R., Miguez, H., Torres, G., & Cuevas, H. (2008). UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. *Cuadernos Hospital de Clínicas*, 38.
- Aranguren, Y., Machado, E., & Montes, V. D. (2013). Principales herramientas moleculares empleadas en la ciencia animal. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(2), 480–496.
- Assis, L. C. S., & de Mello-Silva, R. (2009). Three new species of *Ocotea* (Lauraceae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Rodriguésia*, 60(3), 641–649.
- Bahadur, B., Rajam, M. V., Sahijram, L., & Krishnamurthy, K. V. (2015). *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*. Springer.
- Barbadilla, A. (2012). La genética de poblaciones. Recuperado a partir de <http://bioinformatica.uab.es/divulgacio/la%20genetica%20de%20poblaciones.pdf>
- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2015). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition*. CRC Press.
- Berdonces, J. (1998). *Gran Enciclopedia de las Plantas Medicinales* (Teo Gómez). Editorial Oceano.

- Bhamra, S., Heinrich, M., Howard, C., Johnson, M., & Slater, A. (2015). DNA authentication of tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) using the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and the chloroplast intergenic spacer trnH-psbA. *Planta Medica*, *81*(16), PW\_20. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1565644>
- Bolson, M., Smidt, E. de C., Brotto, M. L., & Silva-Pereira, V. (2015). ITS and trnH-psbA as Efficient DNA Barcodes to Identify Threatened Commercial Woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests. *PLOS ONE*, *10*(12), e0143049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143049>
- Boundless. (2016). Genetic Variation (Versión Segunda). Estados Unidos: Boundless. Recuperado a partir de [/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/the-evolution-of-populations-19/population-genetics-131/genetic-variation-530-12943/](#)
- Bruni, I., Mattia, F. D., Martellos, S., Galimberti, A., Savadori, P., Casiraghi, M., ... Labra, M. (2012). DNA Barcoding as an Effective Tool in Improving a Digital Plant Identification System: A Case Study for the Area of Mt. Valerio, Trieste (NE Italy). *PLOS ONE*, *7*(9), e43256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043256>
- Cadavid, I., Rosero, D., & Uribe, S. (2013). Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemomum*. Recuperado el 11 de marzo de 2017, a partir de <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n2/v15n2a21.pdf>
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología*. Ed. Médica Panamericana.
- Cárdenas, D., Castaño, N., Sua, S., & Quintero, L. (2015). Planes de Manejo\_Digital.indd - Planes\_Manejo\_Arboles\_Amenazados.pdf.

Recuperado el 2 de enero de 2017, a partir de [http://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Programas-para-la-gestion-de-fauna-y-flora/Planes\\_Manejo\\_Arboles\\_Amenazados.pdf](http://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Programas-para-la-gestion-de-fauna-y-flora/Planes_Manejo_Arboles_Amenazados.pdf)

Cárdenas, D, Castaño, N, Sua, S, & Quintero, L. (2015). Planes de Manejo para la Conservación de Abarco, Caoba, Cedro, Palorosa, y Canelo de los Andaquíes. SINCHI. Recuperado a partir de [http://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Programas-para-la-gestion-de-fauna-y-flora/Planes\\_Manejo\\_Arboles\\_Amenazados.pdf](http://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Programas-para-la-gestion-de-fauna-y-flora/Planes_Manejo_Arboles_Amenazados.pdf)

Cazorla, M. (2013). Actividad Fotoprotectora; *Passiflora Edulis* (Maracuyá); Ishpingo (Ocotea quixos): Ocotea quixos (Ishpingo); protectores solares. Recuperado a partir de [dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2556](https://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2556)

CBOL Plant, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., & Zhu, Y. (2010). Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLOS ONE*, 5(1), e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>

Cheng, T., Chao, X., & Li, L. (2015). Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. Recuperado el 7 de mayo de 2017, a partir de <http://onlinelibrary.wiley.com/sci-hub.cc/doi/10.1111/1755-0998.12438/full>

- Contreras, A, Cuevas, C, Goyonechea, I, & Iturbe, U. (2007). *La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad* (1a ed., Vol. 1). México: UAEH.
- CPBOL, C. P. B. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19641–19646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104551108>
- Cruz, M. V. de la, Hernández, Y., Vázquez, A., & González, L. (2013). Diversidad genética de especies silvestres del Género *Nicotiana* II: Caracterización molecular mediante marcadores RAPD. *Revista de Protección Vegetal*, 25(3), 166.
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLOS ONE*, 7(4), e35071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035071>
- Donoso, C., Premoli, A., Gallo, L., & Ipinza, R. (2004). *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Editorial Universitaria.
- Doyle, J., & Doyle. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19, 11–15.
- Duarte, M. C. T., & Rai, M. (2015). *Therapeutic Medicinal Plants: From Lab to the Market*. CRC Press.
- Eguiarte, L, Aguirre, J, Jardón, L, Aguirre, E, & Souza, V. (2013). Genómica de Poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(1), 42–56.

- Eisen, J. A., & Fraser, C. M. (2003). Phylogenomics: intersection of evolution and genomics. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5626), 1706–1707. <https://doi.org/10.1126/science.1086292>
- Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, *17*(7), 422–433. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.58>
- Eng, K., & Hayhurst, R. (2016, noviembre 11). What is genetic diversity? - Biosciences for Farming in Africa. Recuperado el 27 de diciembre de 2016, a partir de <http://b4fa.org/bioscience-in-brief/plantbreeding/genetic-diversity/>
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, *17*(6), 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Ferrada, P. (2011). *Determinación de polimorfismo e identificación de haplotipos en Gevuina avellana y Embothrium coccineum (Magnoliópsida: Proteaceae), especies nativas de Chile, utilizando marcadores moleculares en cpDNA* (Tesis de Grado). Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Fraga Nodarse, J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., & Fernández-Calienes, A. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *56*(3), 203–207.
- Freeland, J. (2005). The evolution of population biology: past, present and future. *Journal of Biogeography*, *32*(11), 2039–2040. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01363.x>
- Fuentes, A. (2016). La evolución es importante, pero podría no ser lo que pensamos. *Cuicuilco*, *23*(65), 271–292.

- Galián, A. (2014). Estudio de la evolución del espaciador ribosomal intergénico 45S (IGS45S) y otras familias de ADN repetido en plantas, mediante técnicas moleculares y citogenéticas. *Proyecto de investigación*: Recuperado a partir de <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/39233>
- Gallo, L. A., Marchelli, P., Azpilicueta, M. M., & Crego, P. (2006). El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. *Bosque (Valdivia)*, 27(1), 3–15. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002006000100001>
- Gao, T., Yao, H., & Song, J. (2010). Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discrimination species of the large Asteraceae family. Recuperado el 26 de enero de 2017, a partir de [http://download.springer.com/static/pdf/962/art%253A10.1186%252F1471-2148-10-324.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fbmcevolbiol.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2F1471-2148-10-324&token2=exp=1485439006~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F962%2Fart%25253A10.1186%25252F1471-2148-10-324.pdf\\*~hmac=de1032c75641dc8a2f24e44b34a07f2fb5d281a0969c4dc19756f60f8b73742a](http://download.springer.com/static/pdf/962/art%253A10.1186%252F1471-2148-10-324.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fbmcevolbiol.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2F1471-2148-10-324&token2=exp=1485439006~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F962%2Fart%25253A10.1186%25252F1471-2148-10-324.pdf*~hmac=de1032c75641dc8a2f24e44b34a07f2fb5d281a0969c4dc19756f60f8b73742a)
- García, M. (2014). Variación genética de tres especies silvestres del género *Hylocereus* (Berger) Britton & Rose (Cactaceae) en México con base en secuencias de matK, rbcL, psbA, trnL-F e ITS. Recuperado a partir de <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/2417>



- García-Sancho, M. (2010). A New Insight into Sanger's Development of Sequencing: From Proteins to DNA, 1943–1977. *Journal of the History of Biology*, 43(2), 265–323. <https://doi.org/10.1007/s10739-009-9184-1>
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Giovambattista, G., Ripoli, M. V., Lirón, J. P., Castagnasso, E. V., Peral-García, P., & Lojo, M. M. (2001). DNA Typing in a Cattle Stealing Case. *Journal of Forensic Science*, 46(6), 1484–1486. <https://doi.org/10.1520/JFS15176J>
- Giraldo, P. H. A., Uribe, S. S. I., & López, R. A. (2011). Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae)/Analysis of mitochondrial DNA sequences (Cytb and ND1) in *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(2), 273.
- Gómez, J. C. C., Ruiz, M. C., Saavedra, R. R., & Correa, S. I. (2012). AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE *Myrciaria dubia* (HBK) “CAMU CAMU” APROPIADO PARA ANÁLISIS MOLECULARES. *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 2(1), 7–16.
- Gonzalez, M. (2009). Identification of Amazonian Trees with DNA barcodes. Recuperado el 2 de enero de 2017, a partir de <http://chave.upstlse.fr/chave/gonzalez-plosone09.pdf>
- Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2010). Sources of variation. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22012/>

- Grijalva, J., Checa, R., Barrera, P., & Limongi, R. (2012). *Situación de los Recursos Genéticos Forestales – Informe País Ecuador*. (Informe País No. 1) (p. 95). Quito: INIAP. Recuperado a partir de [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/informe\\_pas\\_rgf\\_ecuador\\_final\\_.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/informe_pas_rgf_ecuador_final_.pdf)
- Grudinski, M., Pannell, C. M., Chase, M. W., Ahmad, J. A., & Muellner-Riehl, A. N. (2014). An evaluation of taxonomic concepts of the widespread plant genus *Aglaia* and its allies across Wallace's Line (tribe Aglaieae, Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 73, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.025>
- Gruzdev, E. V., Mardanov, A. V., Beletsky, A. V., Kochieva, E. Z., Ravin, N. V., & Skryabin, K. G. (2016). The complete chloroplast genome of parasitic flowering plant *Monotropa hypopitys*: extensive gene losses and size reduction. *Mitochondrial DNA Part B*, 1(1), 212–213. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1155090>
- Guevara Guerrero, G., Garza Ocañas, F., & Cázares González, E. (2004). Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. *Ciencia UANL*, 7(3). Recuperado a partir de <http://eprints.uanl.mx/1459/>
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Harper, J. (2010). *Population Biology of Plants* (2 edición, Vol. 1). Blackburn Press.
- Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M., & Iwatsuki, K. (1994). rbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of

- leptosporangiate ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5730–5734.
- Hastings, A. (2013). *Population Biology: Concepts and Models*. Springer Science & Business Media.
- Healey, A, Furtado, A, Cooper, T, & Henry, R. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *10, 21*, 8.
- Hecker, K. H., & Roux, K. H. (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*, 20(3), 478–485.
- Hernández, M. A., Rodríguez, L. A., Guevara, F., de los Ángeles Rosales-Esquianca, M., Pinto, R., & Ortiz, R. (2017). Caracterización molecular de maíces locales de la reserva de la biosfera “La Sepultura”. México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 69–83.
- Hernández, F. (2002). La familia Lauraceae en el sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación. Recuperado el 31 de marzo de 2017, a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57707104>
- Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19451–19452. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116812108>
- Hollingsworth, P, Graham, S, & Little, D. (2011). Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLOS ONE*, 6(5), e19254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>

- INEC. (2010). Cifras de Biodiversidad en Ecuador. Recuperado el 28 de noviembre de 2016, a partir de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Sitios/pagina%20ambientales/>
- Jakobsson, M., Edge, M. D., & Rosenberg, N. A. (2013). The Relationship Between FST and the Frequency of the Most Frequent Allele. *Genetics*, *193*(2), 515–528. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144758>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLOS ONE*, *2*(6), e508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, msw054. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lade, B. D., Patil, A. S., & Paikrao, H. M. (2014). Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol. *SpringerPlus*, *3*(1), 457. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-457>
- Lahaye, R., Bank, M. van der, Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., ... Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(8), 2923–2928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709936105>
- León, J. (1987). *Botánica de los cultivos tropicales*. Bib. Orton IICA / CATIE.
- León, W. (2001). Anatomía de la madera de 15 especies del género *Ocotea* (Lauraceae). *Acta Botánica Venezolánica*, *24*(1), 13–36.
- Lewin, B. (1993). *Genes. Volumen 2*. Reverte.

- Li, J., Christophel, D. C., Conran, J. G., & Li, H.-W. (2004a). 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*, 246(1–2), 19–34. <https://doi.org/10.1007/s00606-003-0113-z>
- Li, J., Christophel, D. C., Conran, J. G., & Li, H.-W. (2004b). 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*, 246(1–2), 19–34. <https://doi.org/10.1007/s00606-003-0113-z>
- Liu, Z., Chen, S.-L., Song, J.-Y., Zhang, S.-J., & Chen, K.-L. (2012). Application of deoxyribonucleic acid barcoding in Lauraceae plants. *Pharmacognosy Magazine*, 8(29), 4. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.93301>
- López, D. C., & Salinas, N. (2007). *Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 4. Especies maderables amenazadas: Primera parte*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas “SINCHI”.
- MAE. (2010). *Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Biodiversidad*. (Ejecutivo No. 4) (pp. 1–287). Recuperado a partir de <https://www.cbd.int/doc/world/ec/ec-nr-04-es.pdf>
- Martín, M, M. P., & Alvaro, I, I. (2001). Notas preliminares sobre las técnicas de amplificación y variación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) en el género *Encalypta* (Encalyptaceae, Bryophyta). *Botanica Complutensis*, 25, 233.

- Martínez, C., & Adrián, M. (2011). *Código de barras genético de algunas orquídeas veracruzanas bajo riesgo de extinción*. (Thesis). Recuperado a partir de <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/29310>
- Mejía, E, & Pacheco, P. (2011). Aprovechamiento forestal y mercados de la madera en la Amazonía Ecuatoriana. *CIFOR, SAMIRI*, 56(1), 525–530.
- Moreno, V. (2010). *VARIACIONES NUCLEOTÍDICAS DEL GEN DE MIOSTATINA EN GANADO BOVINO DE PROPOSITO CARNICO*. Universidad Autónoma de Nueva León. Recuperado a partir de <http://eprints.uanl.mx/2204/1/1080190943.pdf>
- Moreno, V, Sifuentes, A, & Pereyra, B. (2009). Herramientas para el análisis de variación genética-molecular. *Universidad Autónoma de Nuevo León*, 12, 201–205.
- Mort, M. E., & Crawford, D. J. (2004). The Continuing Search: Low-Copy Nuclear Sequences for Lower-Level Plant Molecular Phylogenetic Studies. *Taxon*, 53(2), 257–261. <https://doi.org/10.2307/4135604>
- Nagy, Z. T., Backeljau, T., Meyer, M. D., & Jordaens, K. (2013). *DNA barcoding: a practical tool for fundamental and applied biodiversity research*. PenSoft Publishers LTD.
- Nahavandi, R., Hafezamini, P., Moeini, H., Jahromi, M. Z., & Shamsudin, M. N. (2011). Population of bottleneck and microsatellite: An Analysis Based on genetic diversity of Wild Tiger Shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius) in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 10(74), 16715–16719. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2216>

- Naranjo, P., Kijjoo, A., Giesbrecht, A. M., & Gottlieb, O. R. (1981). Ocotea quixos, American cinnamon. *Journal of Ethnopharmacology*, 4(2), 233–236.  
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(81\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(81)90038-6)
- Nature Education. (2015). The Genetic Variation in a Population Is Caused by Multiple Factors. Recuperado el 29 de diciembre de 2016, a partir de <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-genetic-variation-in-a-population-is-6526354>
- Navarro, A., Barbadilla, A., & Ruiz, A. (2010). Effect of Inversion Polymorphism on the Neutral Nucleotide Variability of Linked Chromosomal Regions in *Drosophila*. *Genetics*, 155(2), 685–698.
- Nei, M. (1988). Relative Roles of Mutation and Selection in the Maintenance of Genetic Variability. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 319(1196), 615–629.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0069>
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Neuhaus, H., & Link, G. (1987). The chloroplast tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Current Genetics*, 11(4), 251–257.  
<https://doi.org/10.1007/BF00355398>
- Noriega, P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 7(1). Recuperado a partir de <http://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/514>

- Orfanno, F. (2011, marzo 14). Definition of Genetic Variability. Recuperado el 26 de diciembre de 2016, a partir de <http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/110177.aspx>
- Ortíz, A., Lorea, F., Pérez, M., & Monro, A. (2012). Primer registro de *Pilea Ptetodophylla* A. K. Monro (Urticaciae) y *Ocotea Heribertoii* T. Wendt (Lauraceae) para la flora de Chiapas. Recuperado el 2 de enero de 2017, a partir de <http://scielo.unam.mx/pdf/bs/v90n2/v90n2a9.pdf>
- Palacios, W. (2016a). *Árboles de Ecuador Familias y Géneros*. Ibarra-Ecuador: Editorial UTN.
- Palacios, W. (2016b). *Árboles del Ecuador Especies Representativas*. Ibarra, Ecuador: Editorial UTN.
- Pallás, V. (2008). *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*. Mundi-Prensa Libros.
- Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H., ... Chen, S. (2012). Utility of the trnH-psbA Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 7(11), e48833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>
- Parra, E., Castañeda, E., & Moreno, J. (2007). Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* por reacción en cadena de la polimerasa. *Biomédica*, 27(3), 454–460.
- Peintner, U., Horak, E., Moser, M. M., & Vilgalys, R. (2002). Phylogeny of *Rozites*, *Cuphocybe* and *Rapacea* inferred from ITS and LSU rDNA sequences. *Mycologia*, 94(4), 620–629.
- Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol



- components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), 8–15.  
<https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Prina, A. R., Landau, A. M., Martínez, A. E., Pacheco, M. G., Arias, M. C., Etchart, V. J., ... Díaz, D. G. (2011). Fuentes primarias de variabilidad genética en plantas cultivadas: Mutaciones Inducidas y Genes Mutadores. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 22(1), 203–208.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Riascos, J., Victoria, J., & Angel, F. (2003). Diversidad genética en variedades de caña de azúcar (Saccharum spp.) usando marcadores moleculares. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), 6–15.
- Ricker, M. (2013). Determinación taxonómica de los ejemplares de herbario del remuestreo del Inventario Nacional Forestal y de Suelos 2009-2013 (año 2013) en México: Informe de métodos (PDF Download Available). Recuperado el 15 de marzo de 2017, a partir de [https://www.researchgate.net/publication/277276862\\_Determinacion\\_taxonomica\\_de\\_los\\_ejemplares\\_de\\_herbario\\_del\\_re-muestreo\\_del\\_Inventario\\_Nacional\\_Forestal\\_y\\_de\\_Suelos\\_2009-2013\\_ano\\_2013\\_en\\_Mexico\\_Informe\\_de\\_metodos](https://www.researchgate.net/publication/277276862_Determinacion_taxonomica_de_los_ejemplares_de_herbario_del_re-muestreo_del_Inventario_Nacional_Forestal_y_de_Suelos_2009-2013_ano_2013_en_Mexico_Informe_de_metodos)
- Rohwer, J. G. (1993). Lauraceae. En P. D. K. Kubitzki, D. J. G. Rohwer, & D. V. Bittrich (Eds.), *Flowering Plants · Dicotyledons* (pp. 366–391). Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-02899-5\\_46](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-02899-5_46)

- Rohwer, J. G. (2000). Toward a Phylogenetic Classification of the Lauraceae: Evidence from matK Sequences. *Systematic Botany*, 25(1), 60–71.  
<https://doi.org/10.2307/2666673>
- Santin, F. (2004). Ethnobotany of the communities of the upper Rio Nangaritza. *Lyonia*, 7(2), 105–122.
- Sepúlveda, C. P. (2014). Comparación de la inhibición de la reacción en cadena de la polimerasa según la extracción de DNA de *Cryptosporidium* spp. Recuperado a partir de <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/132082>
- Solari, A. J. (2004). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. Ed. Médica Panamericana.
- Suárez, L. E. C., & Barrera, E. D. C. (2007). Metabolitos con actividad biológica aislados de especies pertenecientes a la familia lauraceae. *Scientia et Technica*, 1(33), 363–364.
- Tallei, T, & Kolondam, B. (2015). DNA Barcoding of Sangihe Nutmeg (*Myristica fragrans*) using matK Gene. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(1), 41–47.  
<https://doi.org/10.4308/hjb.22.1.41>
- Tarazona, L., & Duque, J. D. (2016). Códigos de barras para el ADN: la herramienta que escanea la naturaleza. *Biodiversidad Colombia*, 0(6), 38–43.
- Terra Incognita. (2000). Diversidad del Ecuador [Diversidad del Ecuador]. Recuperado el 22 de febrero de 2017, a partir de [http://www.terraecuador.net/revista\\_6/6\\_diversidad.htm](http://www.terraecuador.net/revista_6/6_diversidad.htm)
- Thermo Fisher Scientific. (2016a). Platinum SuperFi PCR Master Mix -. Recuperado el 3 de enero de 2017, a partir de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12358250>

- Thermo Fisher Scientific. (2016b). TrackIt 100 bp DNA Ladder. Recuperado el 3 de enero de 2017, a partir de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10488058>
- Tomar, R. S. (2010). *Molecular Markers and Plant Biotechnology*. New India Publishing.
- Trofimov, D., Rudolph, B., & Rohwer, J. (2016). Phylogenetic study of the genus *Nectandra* (Lauraceae), and reinstatement of *Damburneya*. *65*, 5, 980–996. <https://doi.org/10.12705/655.3>
- Werff, H. V. D. (2013). A revision of the genus *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) in Madagascar and the Comoro Islands. *Adansonia*, 35(2), 235–279. <https://doi.org/10.5252/a2013n2a5>
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M., & Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846–1862. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1846>
- Yu, J., Xue, J.-H., & Zhou, S.-L. (2011). New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 176–181. <https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00134.x>

## Anexos

### Anexo 1

**Tabla de georreferenciación de muestras**

# MUESTRA	CÓDIGO HERBARIO	LUGAR	PROVINCIA	DESCRIPCIÓN	COORDENADAS UTM	FECHA DE RECOLECCIÓN
1	P001	Macas	Morona Santiago	Árbol maduro. Parque recreacional. A lado de la pileta, 1046 msnm	17M 0821178/ 9745766	31/08/2016
2	P002	Macas	Morona Santiago	Parque recreacional, árbol 2, árbol juvenil, 1047 msnm	17M 0821173/ 9745730	31/08/2016
3	P003	Macas	Morona Santiago	Parque recreacional, árbol 3 (4-5m de altura), árbol juvenil, 1045 msnm	17M 0821183/ 9745723	31/08/2016
4	P004	Upano	Morona Santiago	Árbol juvenil 2m de altura, mirador del río Upano. 1047 msnm	17M 0821214/ 9745961	31/08/2016
5	P005	Upano	Morona Santiago	Árbol2, 8m de altura, mirador del río Upano. 1050 msnm	17M 0821219/ 9745966	31/08/2016
6	P006	Quiloma	Morona Santiago	Árbol 8 m afuera de una casa	17M 0820925/ 9745844	31/08/2016
7	P007	Macas	Morona Santiago	Parque de Macas, árbol de 12 m, 1050 msnm	17M 0826895/ 9745299	31/08/2016
8	P008	Macas	Morona Santiago	Jardín Fundación Chankuap, árbol de 3 metros 8 años en sombra 1065 msnm	17 M 0820955 /9746084	31/08/2016
9	P009	Macas	Morona Santiago	Jardín Fundación Chankuap, árbol de 3 metros 8 años en sombra 1066 msnm	17 M 0820973 /9746080	31/08/2016
10	P010	Macas	Morona Santiago	Jardín Fundación Chankuap, árbol de 3 metros 8 años en sombra 1064 msnm	17 M 0820975 /9746082	31/08/2016

# MUESTRA	CÓDIGO HERBARIO	LUGAR	PROVINCIA	DESCRIPCIÓN	COORDENADAS UTM	FECHA DE RECOLECCIÓN
11	P011	Macas	Morona Santiago	Calle Soasti, Árbol en una esquina 13 m de altura 1064 msnm	17 M 0820870 /9745972	31/08/2016
12	P012	Macas	Morona Santiago	Comunidad Sevilla Don Bosco, misión Salesiana, árbol 1 Esquina 9m	17 M 0822427/9744485	31/08/2016
13	P013	Macas	Morona Santiago	Comunidad Sevilla Don Bosco, misión Salesiana, árbol 2, 997 msnm	17 M 0822395 /9744483	31/08/2016
14	P014	Macas	Morona Santiago	Comunidad Sevilla Don Bosco, misión Salesiana, árbol 3, 993 msnm	17 M 0822411/9744486	31/08/2016
15	3224	Archidona	Napo	Casa	18 M 187770 / 990077	30/06/2015
16	3223	Misahualli	Napo		18 M 293196/ 9886039	21/07/2015
17	3207	Misahualli	Napo		18 M 186588 9890288	24/03/2016
18	3208	Tena	Napo	Parque del Tena, 406 msnm	18 M 202802 9888611	24/03/2016
19	3209	Tena	Napo	Parque del Tena, Malecón occidental 406 msnm	18 M 202802 9888611	24/03/2016
20	3210	Tena	Napo	Puente Archidona- Tena árbol1	18 M 186746 9890347	24/03/2016
21	3211	Tena	Napo	Puente Archidona- Tena árbol2	18 M 186746 9890347	24/03/2016
22	3212	Tena	Napo	Ikiam	18 M 182970 9890648	24/03/2016
23	3213	Archidona	Napo	En una casa	18 M 187770 / 990077	24/03/2016
24	3214	Archidona	Napo	Parque central, árbol 1	18 M 187749 9900243	24/03/2016
25	3215	Archidona	Napo	Parque central, árbol 2	18 M 187743 9900255	24/03/2016

# MUESTRA	CÓDIGO HERBARIO	LUGAR	PROVINCIA	DESCRIPCIÓN	COORDENADAS UTM	FECHA DE RECOLECCIÓN
26	3222	Puerto Orellana	Orellana		18 M 297844 / 9448216	08/09/2015
27	3202	Coca	Orellana	árbol 1 (3 metros, plantado por semillero)	18 M 277721/ 9948213	23/03/2016
28	3203	Coca	Orellana	árbol 2 (3 metros, plantado por semillero)	18 M 277721/ 9948213	23/03/2016
29	3204	Coca	Orellana	Nuevo Parque Central del Coca, 261.5 msnm (árbol 1)	18 M 279237/ 9947804	23/03/2016
30	3205	Coca	Orellana	Nuevo Parque Central del Coca, 261.5 msnm (árbol 2)	18 M 279237/ 9947804	23/03/2016
31	3206	Cavernas del Coca	Orellana	Hojas traídas de la comunidad	18 M 260130 9935567	24/03/2016
32	3220	Puyo	Pastaza	Puyo Canelo	18 M 193309 / 9823423	04/08/2015
33	3216 B	Puyo	Pastaza	Parque central, árbol 1	18 M 166443 9835575	24/03/2016
34	3217 B	Puyo	Pastaza	Parque central, árbol 2	18 M 166492 9835550	24/03/2016
35	3218 B	Puyo	Pastaza	Parque central, árbol 3	18 M 166511 9835603	24/03/2016
36	3219 B	Puyo	Pastaza	Parque central, árbol 4	18 M 166446 9835636	24/03/2016
37	3221	Palanda Canela	Zamora Chinchipe		17 M 0727761 / 94889343	25/08/2015
38	P015	La Canela	Zamora Chinchipe	Árbol en una montaña de 7 metros de altura	17 M 0727761 / 94889343	01/09/2016

## Anexo 2

### Protocolo de amplificación de las regiones de ADN

<i>matK</i>						
	Desnaturalización	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Extensión Final	Conservación
	1 ciclo	35 ciclos			1	
Temperatura (°C)	94	94	55/ 53/52	72	72	4.0
Tiempo (minutos)	2:00	0:30	0:30	0:40	5:00	∞
<i>RbcLa</i>						
	Desnaturalización	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Extensión final	Conservación
	1 ciclo	35 ciclos			1	
Temperatura (°C)	94	94	55/50	72	72	4.0
Tiempo (minutos)	2:00	0:30	0:30	0:40	5:00	∞
<i>psbA-trnH</i>						
	Desnaturalización	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Extensión final	Conservación
	1 ciclo	35 ciclos			1	
Temperatura (°C)	94	94	55/ 50	72	72	4.0
Tiempo (minutos)	2:00	0:30	0:30	0:40	5:00	∞
<i>ITS leu1- ITS 4</i>						
	Desnaturalización	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Extensión final	Conservación
	1 ciclo	35 ciclos			1	
Temperatura (°C)	94	94	51/ 53	72	72	4.0
Tiempo (minutos)	2:00	0:30	0:30	0:40	5:00	∞

**Nota:** Protocolo de amplificación con temperatura y tiempo para PCR convencional

**Fuente:** ( Thermo Fisher Scientific, 2016a)

### Anexo 3

Tabla del Blastn de las muestras

#	Query Length	Description	Query cover	Identity	Reference
1D <i>matK</i>	895	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	94%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
2D <i>matK</i>	902	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	94%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3D <i>matK</i>	856	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
4D <i>matK</i>	859	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
5D <i>matK</i>	859	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
6D <i>matK</i>	845	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
7D <i>matK</i>	851	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
8D <i>matK</i>	845	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
9D <i>matK</i>	855	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
11D <i>matK</i>	857	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
12D <i>matK</i>	860	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
13D <i>matK</i>	847	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	96%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
14D <i>matK</i>	812	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
17A <i>matK</i>	813	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
18A <i>matK</i>	800	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; choloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>



19A <i>matK</i>	727	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
20A <i>matK</i>	850	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
21A <i>matK</i>	849	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
22A <i>matK</i>	782	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
23A <i>matK</i>	811	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
24A <i>matK</i>	821	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
25A <i>matK</i>	762	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
26A <i>matK</i>	820	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
27A <i>matK</i>	778	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
28A <i>matK</i>	807	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
29A <i>matK</i>	778	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
30A <i>matK</i>	852	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
31A <i>matK</i>	797	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
32A <i>matK</i>	793	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
33A <i>matK</i>	858	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
34A <i>matK</i>	809	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
35A <i>matK</i>	826	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_9931066">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_9931066</a>

36A <i>matK</i>	784	<i>Nectandra</i> sp. 1 AN410 maturase-like ( <i>matK</i> ) gene, partial sequence; chloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
1A <i>rbcLa</i>	564	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
2A <i>rbcLa</i>	572	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3A <i>rbcLa</i>	565	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81083 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
4A <i>rbcLa</i>	565	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81083 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
5A <i>rbcLa</i>	524	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81083 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
6A <i>rbcLa</i>	565	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81083 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
7A <i>rbcLa</i>	565	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81083 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
8A <i>rbcLa</i>	540	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	540	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
9A <i>rbcLa</i>	565	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	565	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81063 ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

10A <i>rbcLa</i>	563	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	563	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
11A <i>rbcLa</i>	521	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	521	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
13A <i>rbcLa</i>	566	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81063 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
14A <i>rbcLa</i>	567	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81083 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
16A <i>rbcLa</i>	389	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	389	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
17A <i>rbcLa</i>	563	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	563	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
18A <i>rbcLa</i>	504	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	504	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

19A <i>rbcLa</i>	564	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	564	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
20A <i>rbcLa</i>	519	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	519	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
21A <i>rbcLa</i>	510	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	510	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
22A <i>rbcLa</i>	556	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	556	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
23A <i>rbcLa</i>	564	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	564	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
24A <i>rbcLa</i>	507	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	507	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

25A <i>rbcLa</i>	559	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	559	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
26A <i>rbcLa</i>	562	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	562	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
27A <i>rbcLa</i>	564	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	564	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
28A <i>rbcLa</i>	507	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	98%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	507	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	98%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
30A <i>rbcLa</i>	567	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81083 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
31A <i>rbcLa</i>	559	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	559	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
33A <i>rbcLa</i>	560	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

	560	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
34A <i>rbcLa</i>	565	<i>Ocotea cymbarum</i> voucher COAH:66878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	565	<i>Ocotea quixos</i> voucher COAH:81063 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ( <i>rbcL</i> ) gene, partial cds; chloplast	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
1B <i>psbA-trnH</i>	488	<i>Ocotea purpurea</i> voucher Lundell 21170 <i>PsbA</i> ( <i>psbA</i> ) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His ( <i>trnH</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	99%	97%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
2B <i>psbA-trnH</i>	494	<i>Ocotea quixos</i> chloplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	96%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3B <i>psbA-trnH</i>	433	<i>Ocotea moschata</i> photosystem II protein D1 ( <i>psbA</i> ) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His ( <i>trnH</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
5B <i>psbA-trnH</i>	499	<i>Ocotea botrantha</i> voucher s.n. <i>PsbA</i> ( <i>psbA</i> ) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His ( <i>trnH</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	97%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
6B <i>psbA-trnH</i>	498	<i>Ocotea botrantha</i> voucher Wernisch s.n. <i>PsbA</i> ( <i>psbA</i> ) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His ( <i>trnH</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	97%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
7B <i>psbA-trnH</i>	498	<i>Ocotea botrantha</i> voucher Wernisch s.n. <i>PsbA</i> ( <i>psbA</i> ) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His ( <i>trnH</i> ) gene, partial sequence; chloroplast	97%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
8B <i>psbA-trnH</i>	441	<i>Ocotea cuneata</i> voucher 1079133346 <i>PsbA</i> ( <i>psbA</i> ) gene, partial cds; and <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; chloroplast	97%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
9B <i>psbA-trnH</i>	489	<i>Ocotea purpurea</i> voucher Lundell 21170 <i>PsbA</i> ( <i>psbA</i> ) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic	98%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

		spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast			
10B <i>psbA-trnH</i>	440	<i>Ocotea cuneata</i> voucher 1079133346 PsbA 9psbA) gene, partial cds; and <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; chloroplast	97%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
11B <i>psbA-trnH</i>	1078	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	44%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
12B <i>psbA-trnH</i>	573	<i>Ocotea quixos</i>	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
13B <i>psbA-trnH</i>	496	<i>Ocotea botrantha</i> voucher Wernisch s.n. PsbA (psbA) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	98%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
14B <i>psbA-trnH</i>	495	<i>Ocotea purpurea</i> voucher Lundell 21170 PsbA (psbA) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	97%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
16A <i>psbA-trnH</i>	506	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
17A <i>psbA-trnH</i>	500	<i>Ocotea purpurea</i> voucher Lundell 21170 PsbA (psbA) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	97%	97%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
18A <i>psbA-trnH</i>	504	<i>Ocotea botrantha</i> voucher Wernisch s.n. PsbA (psbA) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	96%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
19A <i>psbA-trnH</i>	497	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
20A <i>psbA-trnH</i>	494	<i>Ocotea purpurea</i> voucher Lundell 21170 PsbA (psbA) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	98%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
21A <i>psbA-trnH</i>	492	<i>Ocotea purpurea</i> voucher Lundell 21170 PsbA (psbA) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic	98%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

		spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast			
22A <i>psbA-trnH</i>	497	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
23A <i>psbA-trnH</i>	505	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
24A <i>psbA-trnH</i>	501	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
25A <i>psbA-trnH</i>	467	<i>Lindera benzoin</i> voucher SERC-1076419278 trnH-psbA intergenic spacer, partial sequence; chloroplast	96%	95%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
26A <i>psbA-trnH</i>	505	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
27A <i>psbA-trnH</i>	504	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
28A <i>psbA-trnH</i>	488	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	97%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
29A <i>psbA-trnH</i>	496	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
30A <i>psbA-trnH</i>	505	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
31A <i>psbA-trnH</i>	422	<i>Ocotea quixos</i> chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer region	98%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
32A <i>psbA-trnH</i>	401	<i>Ocotea cuneata</i> voucher 1079133346 PsbA (psbA) gene, partial cds; and <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; chloroplast	98%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
33A <i>psbA-trnH</i>	474	<i>Ocotea purpurea</i> voucher Lundell 21170 PsbA (psbA) gene, partial cds; <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	100%	97%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
34A <i>psbA-trnH</i>	402	Lauraceae sp. MAG2009 voucher NL 110192 PsbA (psbA) gene, partial cds; and <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, partial sequence chloroplast	99%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>



35A <i>psbA-trnH</i>	330	<i>Ocotea cuneata</i> voucher 1079133346 <i>PsbA</i> ( <i>psbA</i> ) gene, partial cds; and <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer, complete sequence; chloroplast	97%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
36A <i>psbA-trnH</i>	445	<i>Lindera benzoin</i> voucher SERC-1076419278 <i>trnH-psbA</i> intergenic spacer, partial sequence; chloroplast	99%	95%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
1C <i>ITS</i>	405	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	71%	96%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
2C <i>ITS</i>	734	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3C <i>ITS</i>	495	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
4C <i>ITS</i>	671	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	98%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
5C <i>ITS</i>	683	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	90%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
6C <i>ITS</i>	460	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

9C ITS	507	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
10C ITS	611	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	61%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
11C ITS	627	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
13C ITS	694	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	89%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3204 ITS	593	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3205 ITS	712	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3206 ITS	647	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	94%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

3207 ITS	559	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3209 ITS	709	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3211 ITS	620	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3212 ITS	513	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	86%	94%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3213 ITS	719	Uncultured eukaryote clone CMH360 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, partial sequence	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3214 ITS	709	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3215 ITS	701	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	100%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

3216 ITS	591	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	100%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3217 ITS	678	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	89%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3219 ITS	512	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3220 ITS	359	<i>Brassica oleraceae</i> var. capitata 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 45S rDNA intergenic spacer, complete sequence	99%	100%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3221 ITS	668	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	91%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3223 ITS	641	<i>Ocotea quixos</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	95%	99%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
3224 ITS	542	<i>Tripodanthus belmirensis</i> voucher Nickrent 5050 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA gene, and 26S rDNA intergenic spacer, partial sequence	99%	92%	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

**Anexo 4**  
**Regiones de ADN**

<b>Regiones de ADN</b>	<b>Muestras ADN</b>	<b>Número de muestras amplificadas</b>	<b>Número de Secuencias consenso obtenidas</b>	<b>Longitud media (pb)</b>	<b>Coefficiente de conservación de secuencias</b>	<b>Número de sitios polimórficos</b>
<i>matK</i>	38	35	32	890.3	0.99	3
<i>RbcLa</i>	38	35	32	613.45	0.99	3
<i>psbA-trnH</i>	38	35	34	535.48	0.952	24
<i>ITS</i>	38	35	28	777.00	0.298	428

**Nota:** Datos obtenidos del programa MEGA7