

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN EN LAS ESPECIES  
FORESTALES *SIDEROXYLON CAPIRI* E *HYERONIMA  
ALCHORNEOIDES* Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LOS  
FACTORES CLIMATOLÓGICOS DE LA REGIÓN DEL PACÍFICO  
EN COSTA RICA**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con Énfasis en Genética y Biología Molecular

CAROLINA MUÑOZ FLORES

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

## **DEDICATORIA**

*A mi familia y amigas por su apoyo incondicional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

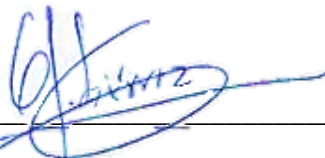
A la Vicerrectoría de Investigación por el financiamiento de esta investigación.

A la Escuela de Biología y al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM).

A mi Comité de Tesis por todas las observaciones y recomendaciones realizadas a esta investigación.

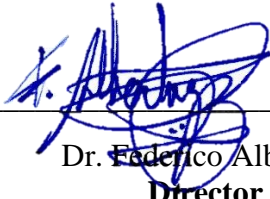
A mis compañeros de laboratorio en el CIBCM por todo su apoyo, consejos y motivación.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en **Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular**”



---

Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta  
**Representante del Decano del Sistema de Estudios de Posgrado**



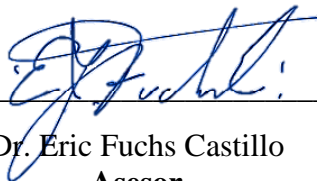
---

Dr. Federico Albertazzi Castro  
**Director de tesis**



---

Dr. Andrés Gatica Arias  
**Asesor**



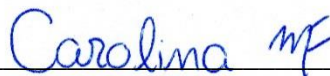
---

Dr. Eric Fuchs Castillo  
**Asesor**



---

Dra. Gabriela Chavarría Soley  
**Representante del Director del Programa de Posgrado en Biología**



---

Carolina Muñoz Flores  
**Sustentante**

## TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
TABLA DE CONTENIDOS .....	v
RESUMEN .....	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS .....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Efecto de la variación climatológica sobre los bosques tropicales .....	2
1.2 La metilación del ADN en plantas .....	4
1.3 La técnica MSAP (“Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism”) .....	6
1.4 Justificación .....	9
1.5 Objetivo general.....	11
1.5.1 Objetivos específicos.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Datos meteorológicos .....	12
2.2 Especies de estudio .....	12
2.2.1 <i>Sideroxylon capiri</i> .....	12
2.2.2 <i>Hyeronima alchorneoides</i> .....	13
2.3 Sitio de recolección del material vegetal .....	14
2.3.1 Recolección del material foliar .....	15
2.4 Procesamiento del tejido foliar.....	15
2.4.1 Aislamiento de ADN genómico total .....	15
2.4.2 Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN .....	16
2.5 Reacciones de amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación.....	16
2.5.1 Reacciones de digestión y ligación .....	16

2.5.2	Reacción de pre-amplificación y amplificación selectiva.....	17
2.5.3	Selección de imprimadores .....	18
2.5.4	Electroforesis capilar de los productos de amplificación.....	19
2.6	<i>Análisis de MSAP</i> .....	19
2.7	<i>Análisis estadístico</i> .....	20
3.	<b>RESULTADOS</b> .....	22
3.1	<i>Variación climatológica de la Región del Pacífico Norte y Sur</i> .....	22
3.2	<i>Protocolos de extracción de ADN genómico de plantas</i> .....	24
3.2.1	Selección de imprimadores selectivos.....	25
3.3	<i>Descripción epigenética poblacional en cada sitio de muestreo para las especies <i>S. capiri</i> y <i>H. alchorneoides</i></i> .....	26
3.3.1	Liberia .....	26
3.3.2	Jabilla .....	29
3.3.3	Mogos.....	31
3.3.4	Drake.....	33
3.4	<i>Perfil epigenético interpoblacional</i> .....	35
4.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	38
4.1	<i>Variación climatológica de la Región del Pacífico Norte y Sur</i> .....	38
4.2	<i>Evaluación de protocolos de extracción de ADN genómico</i> .....	40
4.3	<i>Estructura epigenética de las poblaciones naturales de <i>S. capiri</i> y <i>H. alchorneoides</i></i> .....	41
4.4	<i>Variación epigenética intraespecífica</i> .....	43
4.4.1	Variación epigenética en las poblaciones de <i>S. capiri</i> .....	44
4.4.2	Estabilidad epigenética en las poblaciones de <i>H. alchorneoides</i> .....	51
4.5	<i>Análisis interpoblacional de <i>S. capiri</i> y <i>H. alchorneoides</i></i> .....	53
4.6	<i>Diversidad epigenética de <i>S. capiri</i> y <i>H. alchorneoides</i></i> .....	55
5.	<b>LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b> .....	57
6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	58
7.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	60
8.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61
9.	<b>ANEXOS</b> .....	71

## RESUMEN

Las investigaciones sobre la metilación del ADN en plantas se han enfocado, hasta el momento, en cultivos anuales de gran importancia económica o en especies modelo cultivadas, en su mayoría, bajo condiciones artificiales o en zonas templadas. Esto ha generado un vacío informativo acerca del comportamiento epigenético de especies silvestres, especialmente aquellas bajo condiciones climatológicas dinámicas del trópico. Dada la importancia que tiene la metilación del ADN como un mecanismo de regulación epigenética de la fenología de las plantas, es de suma importancia su estudio en plantas silvestres de la región tropical, la cual, según el IPCC, es una de las zonas más vulnerables al cambio climático. Por lo tanto, en la presente investigación se analizó la metilación del ADN de las especies arbóreas *Hyeronima alchorneoides* del bosque tropical húmedo y de *Sideroxylon capiri* del bosque tropical seco en la región del Pacífico de Costa Rica y su posible relación con la variación climatológica de la zona. Para ello, se utilizó la técnica de la amplificación del polimorfismo sensible a la metilación (MSAP) con el fin de evaluar los perfiles de metilación global del ADN genómico foliar de dos poblaciones naturales: *S. capiri* (Liberia (n=9) y Jabilla (n=9)) y *H. alchorneoides* (Mogos (n=14) y Drake (n=9)) de la Región del Pacífico Norte y Sur respectivamente, en enero del 2005 y del 2015. En ambas poblaciones de *S. capiri* (Liberia y Jabilla) se obtuvo un aumento significativo en el porcentaje de metilación de la citosina interna del ADN en el 2015 en comparación con el 2005. De manera contraria, en las poblaciones de *H. alchorneoides* se dio una estabilidad epigenética entre los años de muestreo, a pesar de la variación climatológica en el Pacífico Sur. La correlación positiva y significativa entre la variación epigenética interpoblacional y la distancia geográfica sugiere que la variación epigenética de Mogos y Drake se encuentra espacialmente estructurada según el sitio de muestreo. Tanto en *S. capiri* como en *H. alchorneoides*, la mayoría de los eventos de metilación se llevaron a cabo en el dinucleótido CG en comparación con el contexto CHG y además ambas especies presentaron niveles de diversidad epigenética moderadamente altos. Esta investigación demuestra no sólo la eficacia de la técnica del MSAP en la detección de la variación epigenética de árboles tropicales; sino que también, proporciona los primeros resultados de índole epigenética en *S. capiri* y *H. alchorneoides*, ampliando así el rango filogenético de los estudios eco-epigenéticos en especies arbóreas del trópico.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Valores promedio de las variables climatológicas de: precipitación (mm), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) y humedad relativa (%) para el mes de enero según el año y estación automática cercana al sitio de muestreo. ....	23
<b>Cuadro 2.</b> Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN genómico según indicadores de concentración (ng/uL) y pureza ( $A_{260}/A_{280}$ y $A_{260}/A_{230}$ ). .....	25
<b>Cuadro 3.</b> Porcentaje promedio de cada uno de los eventos de metilación y demetilación según contexto entre el 2005 y 2015 para las poblaciones de Liberia, Jabilla, Mogos y Drake, según la metodología de Bednarek et al. (2017).....	37
<b>Cuadro 4.</b> Secuencias de los adaptadores e imprimadores utilizados en el MSAP para las reacciones de ligación y pre-amplificación. ....	72
<b>Cuadro 5.</b> Combinación de imprimadores selectivos analizados para el MSAP. ....	73



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Técnica de MSAP empleada en 5 secuencias de ADN genómico con diferentes estados de metilación en el tetranucleótido 5'-CCGG-3' .....	7
<b>Figura 2.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de las variables climáticas .....	24
<b>Figura 3.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de Liberia en el 2005 (rojo) y en el 2015 (azul).....	27
<b>Figura 4.</b> Porcentajes promedio de las condiciones de metilación: metilación en la citosina interna, hemimetilación, no metilado y no informativo a partir de los MSL de los individuos de Liberia en el 2005 y 2015 .....	28
<b>Figura 5.</b> Porcentajes promedio de las condiciones de metilación: metilación en la citosina interna, hemimetilación, no metilado y no informativo a partir de los MSL de los individuos de Jabilla en el 2005 y 2015 .....	29
<b>Figura 6.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de Jabilla en el 2005 (rojo) y en el 2015 (azul).....	30
<b>Figura 7.</b> Porcentajes promedio de las condiciones de metilación: metilación en la citosina interna, hemimetilación, no metilado y no informativo a partir de los MSL de los individuos de Mogos en el 2005 y 2015.....	31
<b>Figura 8.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de Mogos en el 2005 (rojo) y en el 2015 (azul) .....	32
<b>Figura 9.</b> Porcentajes promedio de las condiciones de metilación: metilación de la citosina interna, hemimetilación, no metilado y no informativo a partir de los MSL de los individuos de Drake en el 2005 y 2015.....	33
<b>Figura 10.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de Drake en el 2005 (rojo) y en el 2015 (azul).....	34
<b>Figura 11.</b> Resultados del análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de los individuos de tempisque recolectados en Jabilla y Liberia en los años 2005 y 2015.....	35

<b>Figura 12.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA) interpoblacional de pilón según año de muestreo.....	36
<b>Figura. 13.</b> Sitios de colecta del material foliar de <i>Sideroxylon capiri</i> (1 y 2) e <i>Hyeronima alchorneoides</i> (3 y 4).....	71
<b>Figura 14.</b> Electroforesis de las extracciones de ADN genómico de <i>H. alchorneoides</i> . 76	
<b>Figura 15.</b> Precipitación promedio (mm) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Liberia y Jabilla .....	77
<b>Figura 16.</b> Temperatura máxima promedio (°C) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Jabilla y Liberia Jabilla .....	77
<b>Figura 17.</b> Temperatura mínima promedio (°C) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Jabilla y Liberia Jabilla .....	78
<b>Figura 18.</b> Humedad relativa promedio (%) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Liberia y Jabilla.....	78
<b>Figura 19.</b> Relación entre la metilación en la citosina interna (%) de los individuos de Liberia y la humedad relativa (%) cercana al sitio de muestreo.....	79
<b>Figura 20.</b> Precipitación promedio diaria durante la estación seca (diciembre a abril) del 2004 al 2015 .....	79
<b>Figura 21.</b> Relación entre la metilación de la citosina interna (%) de los individuos de Jabilla y la precipitación diaria (mm) cercana al sitio de muestreo. ....	80
<b>Figura 22. a.</b> Precipitación promedio (mm), <b>b.</b> Temperatura máxima promedio (°C), <b>c.</b> Temperatura mínima promedio (°C) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Mogos y Drake.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

**BTS:** Bosque tropical seco

**CIBCM:** Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular

**CMNUCC:** Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático

**DAP:** Diámetro a la altura del pecho

**DM:** Demetilación

**DNM:** Metilación *de novo*

**EFE:** Estación Meteorológica automática Finca El Patio

**EHM:** Estación Meteorológica automática Hacienda Mojica

**ENOS:** El Niño-Oscilación del Sur o Fenómeno del Niño y la Niña

**ESE:** Estación Meteorológica automática Santa Elena

**IMN:** Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica

**IPCC:** Panel Intergubernamental del Cambio Climático

**MBD:** Por sus siglas en inglés “*methyl-CpG-binding domain*”

**MSAP:** Por sus siglas en inglés “*Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism*”

**MSL:** *Loci* sensibles a la metilación

**NML:** *Loci* no sensibles a la metilación

**PCA:** Análisis de componentes principales

**PCoA:** Análisis de coordenadas principales

**SAM:** S -adenosil-L-metionina

**SINAC:** Sistema Nacional de Áreas de Conservación



**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Carolina Muñoz Flores, con cédula de identidad 113520206, en mi condición de autor del TFG titulado ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN EN LAS ESPECIES FORESTALES SIDEROXYLON CAPIRI E HYERONIMA ALCHORNEOIDES Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LOS FACTORES CLIMATOLÓGICOS DE LA REGIÓN DEL PACÍFICO EN COSTA RICA

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Carolina Muñoz Flores

Número de Carné: A64038 Número de cédula: 113520206

Correo Electrónico: carolina.munoz@ucr.ac.cr

Fecha: 04/09/2020 Número de teléfono: 88372099

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Federico Albertazzi Castro

*Carolina MF*  
**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), en su artículo 1<sup>ro</sup>, define el cambio climático como: “cambio del clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera global y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante períodos de tiempo comparables” ([IPCC, 2014](#)).

Las características geográficas y topográficas de América Latina y el Caribe hacen que estas regiones sean particularmente vulnerables al cambio climático ya que se encuentran dentro de la franja de huracanes. Ambas regiones poseen numerosos estados insulares y zonas costeras bajas que están expuestas a inundaciones y deslizamientos de tierra por la precipitación extrema que se da ([CEPAL, 2009](#); [IPCC, 2014](#)). En Centroamérica, el aumento de los eventos meteorológicos extremos, junto con la conversión de los ecosistemas naturales (promotor del cambio climático antropogénico) son, de acuerdo con el [IPCC \(2014\)](#), la causa principal de pérdida de biodiversidad y ecosistemas. En Costa Rica, el Instituto Meteorológico Nacional ha realizado proyecciones sobre los distintos escenarios del cambio climático en las seis regiones climatológicas en las que se divide el país ([CRRH, 2008](#); [Alvarado, 2012](#)). Según estas proyecciones, se espera que la temperatura aumente de manera progresiva en todo el país, especialmente en la zona continental en comparación con la oceánica. Se prevé que la temperatura del 2020 se duplique para el 2050 alcanzando los valores máximos de temperatura en el 2099. La temperatura aumentaría 5° C por encima de lo normal en la provincia de Guanacaste y el sector occidental de la Zona Norte, mientras que en el resto del país incrementaría en promedio 3 °C por encima de lo normal ([CRRH, 2008](#); [Alvarado, 2012](#)). En el caso del Pacífico Norte, se espera una disminución en la cantidad de precipitación de alrededor de 30 mm en el segundo semestre del año, en comparación con la línea base (1958-1999) ([CRRH, 2008](#); [Alvarado, 2012](#)), y un aumento en la temperatura promedio de 5 °C para el 2020 ([CRRH, 2008](#); [Alvarado, 2012](#)). De igual manera, en la región del Pacífico Sur del país también se observarían escenarios más calurosos con

aumentos en la temperatura máxima de 2 °C a 4 °C y aumentos de 1 °C a 3 °C en la temperatura mínima ([CRRH, 2008](#); [Alvarado, 2012](#)). De acuerdo con el informe final del [CRRH \(2008\)](#), la bioregión del Pacífico Sur es la zona donde más aumentaría la temperatura mínima en Costa Rica. Sin embargo, contrario a la región del Pacífico Norte, en el Pacífico Sur se espera que para las próximas décadas se dé un aumento significativo en las precipitaciones anuales ([CRRH, 2008](#)).

El [IPCC \(2014\)](#), prevé un impacto significativo en la ecofisiología, distribución e interacciones de las plantas con otros organismos producto del elevado nivel atmosférico de CO<sub>2</sub>. El aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero, asociado con los cambios de temperatura y precipitación tendrán efectos negativos en todos los aspectos de la biología de las plantas en las próximas décadas ([Parmesan & Hanley, 2015](#)). En el caso de las especies arbóreas, [Anderegg et al. \(2015\)](#) sugieren que el cambio climático podría inducir un aumento en la mortalidad de estos organismos producto de las sequías, estrés calórico y herbivoría; lo que, a su vez, traería consecuencias negativas para la funcionalidad y biodiversidad de los ecosistemas terrestres. Además, el cambio climático no sólo representa una amenaza para los bosques sino también para millones de personas que dependen directa e indirectamente de ellos para su sustento ([Alfaro et al., 2014](#)).

### ***1.1 Efecto de la variación climatológica sobre los bosques tropicales***

Los bosques cubren aproximadamente el 30,6% de la superficie terrestre y de ese porcentaje, solamente el 7% corresponde a bosques tropicales ([FAO, 2015](#)). En Costa Rica el 54% del territorio nacional está cubierto por bosques distribuidos en Reservas Biológicas, Parques Nacionales, plantaciones forestales y programas de reforestación y manejo genético forestal, entre otros ([FAO, 2015](#)).

Los bosques tropicales son sumamente importantes a nivel global pues son los responsables de un tercio de la productividad primaria neta, albergan una cantidad importante de la biodiversidad mundial y son capaces de regular las condiciones climatológicas locales ([Huntingford et al., 2013](#)). Al mismo tiempo, los bosques tropicales

son esenciales en el control de los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico ya que son capaces de almacenar aproximadamente 470 billones de toneladas de carbono en su biomasa y suelo ([Huntingford et al., 2013](#)). Sin embargo, esta capacidad está determinada, en gran medida, por las condiciones climatológicas de la región, específicamente por las variables de precipitación, temperatura y CO<sub>2</sub> ([Clark et al., 2003](#); [Schippers et al., 2015](#); [Clark et al., 2013](#)). Por ello, los aumentos en la temperatura y concentración del CO<sub>2</sub>, y las alteraciones en los patrones de precipitación, que supone el cambio climático, pueden generar cambios importantes en la fenología de las plantas y por ende en el ciclo del carbón. Esto es especialmente relevante en especies arbóreas tropicales que experimentan cada vez, con más frecuencia, el fenómeno ENOS (El Niño-Oscilación del Sur o Fenómeno del Niño y la Niña).

La serie técnica de [BIOMARCC-SINAC-GIZ \(2013\)](#), revela que la distribución de las especies arbóreas de Costa Rica, se verá afectada producto del cambio climático; ejemplo de ello son las especies *Sideroxylon capiri* e *Hyeronima alchorneoides* del bosque tropical seco y húmedo, respectivamente. Según [BIOMARCC-SINAC-GIZ \(2013\)](#), se espera que para el 2020 *H. alchorneoides* pierda más del 53% de su hábitat actual, tanto en la zona del Pacífico Norte como la del Sur. Esta reducción corresponderá a ~3270km<sup>2</sup> de superficie en las áreas protegidas y a ~1991km<sup>2</sup> en los corredores biológicos producto del cambio climático. Según el Inventario Nacional Forestal del 2018 ([SINAC, 2018](#)) *H. alchorneoides* está clasificada como especie de *Preocupación mayor* con un 73% de los individuos registrados fuera de las áreas protegidas. Por otra parte, la especie *S. capiri* está catalogada como especie amenazada y [Jiménez \(1999\)](#) sugiere su veda pues un 57% de sus individuos se encuentra fuera de las áreas protegidas ([SINAC, 2018](#)).

Cuando las nuevas condiciones medioambientales se alejan del óptimo de tolerancia y supervivencia de los árboles, éstos incurren en una serie de alteraciones en las vías metabólicas y en modificaciones de la expresión génica para minimizar y contrarrestar los efectos negativos del factor estresante (biótico, abiótico o ambos) ([Grativol et al., 2012](#)). Publicaciones recientes como las de [Kovalchuk \(2018\)](#), [Sow et al.](#)

(2018), [Sudan et al. \(2018\)](#) y [Carbó et al. \(2019\)](#), revelan que parte de esa respuesta de las plantas se encuentra regulada por mecanismos epigenéticos; los cuales, junto con la diversidad genética le permiten a las plantas aclimatarse más rápidamente a entornos heterogéneos.

## ***1.2 La metilación del ADN en plantas***

En las plantas superiores, el mecanismo epigenético más estudiado hasta el momento es la metilación del ADN genómico ([Alonso et al., 2015](#); [Bräutigam & Cronk, 2018](#); [Kovalchuk, 2018](#); [Zhang et al., 2018](#)). Este mecanismo es un proceso reversible y dinámico conformado por eventos de metilación y demetilación en el ADN. Durante la metilación, un grupo metilo se une covalentemente al quinto carbono del anillo de pirimidina de la citosina (5-mC), sin alterar la secuencia nucleotídica de la planta ([Elhamamsy, 2016](#)). Este proceso es catalizado por las ADN metiltransferasas (DNMTs), las cuales utilizan la S-adenosil-L-metionina ( $C_{15}H_{23}N_6O_5S^+$ ; abbr. SAM) como donador del grupo metilo. Por otra parte, la demetilación se refiere al proceso pasivo o activo en el que las 5-metilcitocinas son reemplazadas por citosinas ([Liu & Lang, 2020](#)). La demetilación activa es mediada por las glicosilasas REPRESSOR OF SILENCING (*ROS1*), DEMETER (*DME*) y DEMETER-LIKE (*DML2*) y (*DML3*) ([Viejo et al., 2012](#); [Secco et al., 2015](#); [Elhamamsy, 2016](#); [Bräutigam & Cronk, 2018](#); [Zhang et al., 2018](#)).

La metilación del ADN ha estado presente en el linaje Viridiplantae desde hace más de 400 millones de años. Actualmente, esta marca epigenética se encuentra en todos los grupos taxonómicos principales, incluidas las algas verdes, hepáticas, musgos, helechos, gimnospermas y angiospermas ([Takuno et al., 2016](#); [Bräutigam & Cronk, 2018](#)). A diferencia de los animales, en los cuales la metilación del ADN se encuentra restringida a las citosinas del dinucleótido CG ([Elhamamsy, 2016](#)), las plantas poseen contextos adicionales de metilación; los cuales corresponden a los trinucleótidos CHG y CHH, (en los que H = A, T o C) ([Zhang et al., 2010](#); [Viejo et al., 2012](#); [Du et al., 2015](#); [Zhang et al., 2018](#)). También, el grado de metilación es mayor en las plantas que en los animales, pues puede llegar a tener hasta un 40% de sus citosinas metiladas, mientras que en los



animales es del 8% ([Elhamamsy, 2016](#)). De manera conjunta, estas características evidencian que los beneficios asociados a la retención de esta marca epigenética exceden el costo metabólico que implica su presencia ([Moler et al., 2018](#)).

La metilación del ADN genómico es un rasgo conservado en las angiospermas ([Niederhuth et al., 2016](#)), sin embargo, el porcentaje de las metilcitosinas varía entre los diferentes contextos de secuencia (CG, CHG y CHH) según la especie, el tejido y la etapa del ciclo de vida en la que se encuentre la planta ([Niederhuth et al., 2016](#); [How-Kit et al., 2017](#); [Bartels et al., 2018](#)).

En las plantas, la distribución de la metilación no ocurre de manera aleatoria en el genoma, sino que se concentra en regiones no codificantes como la heterocromatina centromérica, los telómeros y los elementos transponibles ([Zhang et al., 2018](#)). Sin embargo, la metilación del ADN también puede ocurrir en el cuerpo génico (gbM, por sus siglas en inglés) ([Bewick & Schmitz, 2017](#); [Huang & Ecker, 2018](#)). El gbM hace referencia a genes que poseen un enriquecimiento de citosinas metiladas, especialmente el contexto CG, dentro de las regiones transcritas y una ausencia o disminución marcada de mC cerca de los sitios de inicio y final de la transcripción ([Bewick & Schmitz, 2017](#); [Huang & Ecker, 2018](#)). Los genes que presentan gbM generalmente poseen una mayor cantidad de exones en relación con genes sin gbM y tienen una tasa de transcripcional moderadamente alta ([Huang & Ecker, 2018](#), [Zhang et al., 2018](#) y [Seymour & Gaut, 2020](#)).

La metilación del ADN en plantas está involucrada en una serie de procesos biológicos que incluyen: la organización de la cromatina, la integridad genómica, la regulación de la expresión de elementos genéticos codificantes y no codificantes, la diferenciación celular, la regulación del desarrollo y crecimiento de la planta en general y la capacidad de respuesta y aclimatación bajo condiciones de estrés ([Zhang et al., 2010](#); [Bräutigam et al., 2013](#); [Kumar et al., 2013](#); [Alonso et al., 2015](#); [Secco et al., 2015](#); [Elhamamsy, 2016](#); [Keller et al., 2016](#); [Bräutigam & Cronk, 2018](#); [Kovalchuk, 2018](#); [Sow et al., 2018](#); [Sudan et al., 2018](#); [Zhang et al., 2018](#); [Carbó et al., 2019](#)). Dada la amplia gama de funciones y procesos que son regulados por la metilación del ADN es que investigaciones como las de [Downen et al. \(2012\)](#), [Viejo et al. \(2012\)](#), [Correia et al. \(2013\)](#),

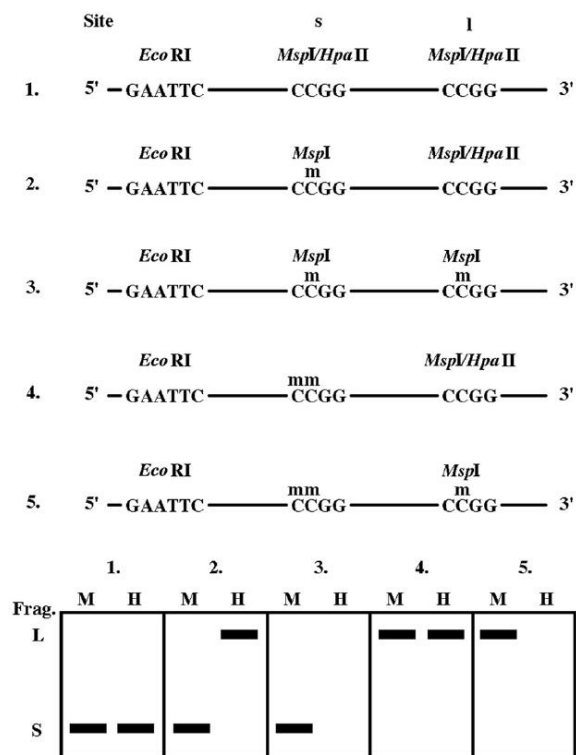
[Walter et al. \(2013\)](#), [Yu et al. \(2013\)](#) y [Schulz et al. \(2014\)](#) proponen que la exposición de las plantas a condiciones medioambientales adversas tendrá un impacto significativo sobre el epigenotipo de los individuos; específicamente sobre los perfiles de metilación global del ADN. Según estos autores, el estrés a/biótico sobre las plantas, tales como los generados por el cambio climático, podrían ocasionar cambios dinámicos sobre la metilación del ADN en secuencias repetitivas o en transposones; los cuales a menudo se encuentran asociados a cambios transcripcionales de genes cercanos.

Los árboles, como organismos longevos están expuestos a múltiples estímulos ambientales a lo largo de su amplio ciclo de vida, esta condición requiere, según [Perrone & Martinelli \(2020\)](#), de dinamismo en la presencia y ausencia de marcas epigenéticas sobre *loci* asociados con la capacidad de percibir el medio y responder apropiadamente al mismo. Es por ello que, [Angers et al. \(2020\)](#) proponen que los mecanismos de detección de cambios en el epigenotipo de los individuos de una población, permitirían evaluar el impacto epigenético que experimentan estas poblaciones ante diferentes condiciones medioambientales.

### ***1.3 La técnica MSAP (“Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism”)***

Actualmente, las técnicas empleadas en la detección de la metilación global del ADN genómico en las plantas se dividen en tres categorías: la modificación química del ADN con bisulfito de sodio, el aislamiento por afinidad del ADN metilado (anticuerpos 5-mC o con proteínas MBD) y la digestión del ADN con enzimas de restricción sensibles a la metilación (MSAP, por sus siglas en inglés). Sin embargo, las primeras dos técnicas son muy onerosas, en comparación con la técnica de MSAP; además requieren de un conocimiento previo de la secuencia genómica de la planta ([Fulneček & Kovařík, 2014](#); [Yaish et al., 2014](#)). Por el contrario, la técnica de MSAP se caracteriza por presentar una alta sensibilidad a un bajo costo y no requiere de un genoma de referencia secuenciado. De acuerdo con [Alonso et al. \(2016\)](#), el uso de esta técnica le permite al usuario obtener información acerca del estado de metilación de múltiples *loci* anónimos distribuidos en

todo el genoma. El método MSAP se basa en la digestión en paralelo de una misma muestra de ADN genómico con las enzimas de restricción *EcoRI/MspI* y *EcoRI/HpaII*, las cuales poseen distintas sensibilidades a la metilación de las citosinas del tetranucleótido 5'-CCGG-3' (Fig.1; BRENDA). La enzima *HpaII* es sensible a la metilación de la citosina interna en ambas cadenas, mientras que la enzima *MspI* es sensible a la metilación de la citosina externa en cualquier cadena (Fig.1); es decir, la enzima *HpaII* cortará el tetranucleótido 5'-CCGG-3' siempre y cuando una de las citosinas internas no presente un grupo metilo asociado, y la enzima *MspI* realizará el corte únicamente si las citosinas externas no están metiladas (Pérez-Figueroa, 2013) De acuerdo con Fulneček & Kovařík (2014) y Yaish et al. (2014), la amplificación de los fragmentos formados por estas enzimas permite investigar la variación epigenética de los organismos a nivel intra e interpoblacional.



**Figura 1.** Técnica de MSAP empleada en 5 secuencias de ADN genómico con diferentes estados de metilación en el tetranucleótido 5'-CCGG-3'. En el recuadro se muestran los patrones de banda esperados según el corte de las enzimas *EcoRI/MspI* y *EcoRI/HpaII*. Las letras L y S hacen referencia a fragmentos largos (alto peso molecular) y cortos (bajo peso molecular), respectivamente (Fulneček & Kovařík, 2014).

Es importante recalcar que, aunque la MSAP es una técnica confiable que se utiliza sin importar el tamaño y complejidad del genoma de las especies, los métodos basados en la digestión enzimática poseen varias limitaciones. Una de esas limitaciones es la subestimación del nivel total de la metilación presente en la molécula de ADN ([Yaish et al., 2014](#)). Esta condición se da porque que las enzimas *EcoRI/MspI* y *EcoRI/HpaII* solamente reconocen el fragmento 5'-CCGG-3', dejando por fuera así otros contextos de metilación. Otra de las limitaciones de la técnica MSAP es la imposibilidad de distinguir entre un estado hipermetilado y las mutaciones en el sitio de restricción ([Schrey et al., 2013](#); [Rico et al., 2014](#)). Sin embargo, la principal limitante de esta técnica es que no proporciona información sobre la identidad de las secuencias en las que se produce la metilación (*loci* anónimos), ni las posiciones genómicas en donde ocurren ([Schrey et al., 2013](#)). No obstante, a pesar de estas limitaciones, la técnica MSAP sigue siendo la técnica más ampliamente utilizada en estudios ecológicos en los que se desea analizar el componente epigenético de especies no modelo cuyos genomas aún no se encuentran disponibles ([Alonso et al., 2015](#)).

## ***1.4 Justificación***

Actualmente, la gran mayoría de las investigaciones en el campo de la epigenética en plantas ha estado enfocada en el estudio de las variaciones en los patrones y niveles de metilación del ADN, bajo las siguientes condiciones: en especies modelo o en cultivos anuales, en plantas con bajos niveles de diversidad genética y bajo condiciones controladas de laboratorio ([Richards et al., 2017](#); [Sow et al., 2018](#)). Sin embargo, cuando se restringen los estudios epigenéticos a este tipo de especies y condiciones, se genera un sesgo sobre el comportamiento epigenético de las plantas ([Herrera et al., 2018](#)), ya que, se generalizan los mecanismos de regulación epigenética a partir de un limitado espectro filogenético. [Richards et al. \(2017\)](#) también argumentan que aunque la mayoría del conocimiento epigenético actual proviene de investigaciones en donde las plantas se encuentran bajo condiciones bióticas y abióticas controladas, esas investigaciones carecen de realismo ecológico. Esto es especialmente evidente cuando se analiza solamente el efecto de una variable y se omite el entorno ecológico en el que se desenvuelve la planta. La investigación de [Rathore et al. \(2015\)](#), demuestra que los porcentajes de metilación del ADN de cinco especies de plantas es significativamente diferente cuando éstas crecen bajo condiciones *in vivo* a cuando se cultivan bajo condiciones *in vitro* aunque las plantas utilizadas sean genéticamente idénticas.

Por otra parte, las investigaciones epigenéticas en las que sí se han analizado especies no modelo bajo condiciones naturales, han estado enfocadas en especies de regiones templadas con baja diversidad genética ([Sow et al., 2018](#)). Por consiguiente, existe un vacío de conocimiento en el comportamiento epigenético de las poblaciones naturales de especies silvestres nativas del trópico, incluyendo las dos especies analizadas en la presente investigación: *Sideroxylon capiri* e *Hyeronima alchorneoides*. Los trabajos sobre el tempisque y el pilón que se llevaron a cabo previo a la presente investigación, se concentraron en descripciones a nivel fenológico ([Di Stéfano & García, 2000](#); [Clark et al., 2003](#); [García & Di Stéfano, 2005](#); [Clark et al., 2013](#)) y genético ([Villalobos, 2000](#); [Villalobos et al., 2015](#)). Para llenar ese vacío, se planteó el objetivo de investigar el

comportamiento epigenético de las especies forestales del trópico, específicamente de las especies arbóreas *Sideroxylon capiri* e *Hyeronima alchorneoides*, bajo el contexto climatológico dinámico y contrastante de las Regiones del Pacífico Norte y Sur de Costa Rica, respectivamente. La caracterización de la metilación del ADN del tempisque y el pilón, mediante la técnica MSAP, es pionera en especies arbóreas de Centroamérica y servirá como material complementario de referencia en la toma de decisiones en materia de conservación de especies arbóreas, frente al escenario de cambio climático.

### ***1.5 Objetivo general***

Analizar la metilación del ADN de 2 poblaciones naturales de *Sideroxylon capiri* del bosque tropical seco e *Hyeronima alchorneoides* del bosque tropical húmedo en la región del Pacífico de Costa Rica, en dos períodos de muestreo (2005 y 2015) mediante la técnica del MSAP.

#### ***1.5.1 Objetivos específicos***

- ❖ Comparar las condiciones meteorológicas de las variables: precipitación, temperatura (máxima y mínima) y humedad relativa de la Región del Pacífico Norte y Pacífico Sur para los años 2005 y 2015.
- ❖ Estandarizar un protocolo de extracción de ADN genómico foliar y optimizar la metodología de MSAP para las especies *Sideroxylon capiri* e *Hyeronima alchorneoides*.
- ❖ Estimar y comparar los niveles de metilación del ADN genómico de individuos conspecíficos de 2 poblaciones naturales de *Sideroxylon capiri* e *Hyeronima alchorneoides* según el sitio de colecta para los años 2005 y 2015.
- ❖ Cuantificar los porcentajes de todos los posibles eventos de la metilación y/o demetilación en el ADN genómico de las especies *Sideroxylon capiri* e *Hyeronima alchorneoides*, a partir de las muestras colectadas en el 2005 y el 2015.
- ❖ Estimar la diversidad epigenética de cada uno de los sitios de colecta para las especies *Sideroxylon capiri* e *Hyeronima alchorneoides*.
- ❖ Analizar el perfil epigenético de cada una de las poblaciones de estudio en relación con el registro meteorológico de la zona de muestreo para el 2005 y el 2015.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Datos meteorológicos

Para caracterizar el entorno climatológico de los árboles en el sitio de colecta, se utilizó el promedio del valor diario de las variables meteorológicas: precipitación (mm), temperatura (mínima y máxima, °C) y humedad relativa (%) reportados por las estaciones meteorológicas automáticas del IMN más cercanas al sitio de muestreo, en el mes de enero del 2005 y el 2015. En representación de la Región del Pacífico Norte se usaron los datos de las estaciones de Santa Elena en La Cruz (ESE; 10°55'12"N, 85°36'38"W) y la Hacienda Mojica en Bagaces-Guanacaste (EHM; 10°27'09"N, 85°09'54"W). Para la Región del Pacífico Sur se emplearon los datos de la estación de la Finca El Patio en Puerto Jiménez (EFP; 08°36'02"N, 83°25'51"W).

La representación de la varianza de todas las variables climatológicas según el año de muestreo y estación automática se llevó a cabo mediante un análisis de componentes principales (PCA). La comparación de los promedios mensuales del 2005 y el 2015 de cada una de las variables meteorológicas se realizó con la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Asimismo, se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) o en su defecto, una prueba de Kruskal-Wallis, entre los datos de una misma variable según el año de muestreo, con el paquete estadístico R.

### 2.2 Especies de estudio

#### 2.2.1 *Sideroxylon capiri*

La especie *Sideroxylon capiri* (A.DC.) Pittier es un árbol maderable conocido en Costa Rica como danto amarillo o tempisque ([Jiménez, 1999](#)). Este árbol del dosel pertenece a la familia Sapotaceae y tiene un comportamiento siempre verde ([Jiménez, 1999](#)). El tempisque presenta una distribución desde México (Veracruz y Jalisco) y América Central (excepto Belice) hasta Panamá, Trinidad y Tobago y Granada. En Costa



Rica esta especie se distribuye a lo largo de la vertiente Pacífica, desde Guanacaste hasta las cercanías del Valle Central y Palmar Norte, en la zona sur. También está presente en la Zona Norte y Atlántica en forma escasa ([Jiménez et al., 2011](#)). Según el [SINAC \(2018\)](#) el tempisque está presente en 516 582 ha de zonas forestales con una abundancia (N/ha) de 0,27 con un DAP >10cm y un valor poblacional estimado de 16,574 individuos (con un DAP>30 cm).

*S. capiri* forma parte importante de los bosques tropicales caducifolios y semi-caducifolios y se desarrolla en climas secos a húmedos con temperaturas que oscilan entre los 22°C y 30°C ([Jiménez, 1999](#)). Esta especie crece en hábitats con precipitaciones anuales que van desde los 1500 a los 2500mm en elevaciones que van desde los 0 a 900 m.s.n.m. ([Jiménez et al., 2011](#)). Los frutos del tempisque son fuente de alimento de monos, murciélagos, venados, saínos y guatusas, mientras que la madera, amarilla y de alta durabilidad, es utilizada en la elaboración de artesanados y corrales ([Jiménez, 1999](#)).

### **2.2.2 *Hyeronima alchorneoides***

Una de las especies nativas de árbol, que ha sido sujeto de un amplio estudio en el país ([Villalobos, 2000](#); [Montero et al., 2007](#); [Valverde-Cerdas et al., 2013](#); [Alvarado, 2016](#)) por su gran potencial adaptativo es la especie arbórea *Hyeronima alchorneoides* *Allemão*; conocida en Costa Rica como pilón ([Montero et al., 2007](#)). Esta especie pertenece a la familia Euphorbiaceae y presenta una distribución natural que va desde el sur de México y Belice, a lo largo de la costa del Atlántico hasta Panamá. También está presente en las islas del Caribe y en el continente suramericano, desde Colombia hasta Brasil y Perú ([Montero et al., 2007](#)). De acuerdo con [Montero et al. \(2007\)](#), en Costa Rica esta especie se encuentra en ambas vertientes del país especialmente en los bosques tropicales húmedos y muy húmedos de las zonas bajas del Norte y del Atlántico sin embargo, es capaz de adaptarse a las zonas del Pacífico Central y Sur de Costa Rica ([Solís & Moya, 2004](#)). Según el [SINAC \(2018\)](#) el pilón se encuentra presente en una extensión de área forestal de 1, 239,866ha con una abundancia (N/ha) de 0,86 con un DAP>10cm y

un valor estimado de población (con DAP>30 cm) de 54,576 individuos. Esta especie se encuentra en altitudes de 0 a 800 m.s.n.m., con rangos de precipitación anual de 2000 a 5000mm y temperaturas de 24°C a 32°C ([SINAC, 2018](#)).

En Costa Rica *H. alchorneoides* es una especie forestal nativa importante por su alto valor ecológico y económico ([Valverde-Cerdas et al., 2013](#)). A nivel ecológico, el pilón es refugio y fuente de alimento de aves y mamíferos ([Montero et al., 2007](#)) y a la vez es capaz de fijar una gran cantidad de CO<sub>2</sub> en forma de biomasa. De acuerdo con [Fonseca et al. \(2008\)](#) en un año, una hectárea de pilón es capaz de fijar hasta 8,6 toneladas de carbón. Por otra parte, a nivel económico la madera madura, de color marrón-rojizo, es de gran valor y tiene una alta demanda debido a su versatilidad, densidad y durabilidad para la elaboración de productos de ebanistería ([Montero et al., 2007](#)). Según el Reporte Estadístico Forestal 2014-2015 elaborado por el [SIREFOR \(2017\)](#), el valor agregado del pilón para el año 2014 en los aserraderos ascendió a 2999 millones de colones.

### ***2.3 Sitio de recolección del material vegetal***

Se llevó a cabo una colecta de muestras del tejido foliar de individuos de 2 poblaciones naturales de las especies maderables *S. capiri* y *H. alchorneoides*. El tejido foliar de *S. capiri* se recolectó en la región del Pacífico Norte en la zona de Jabilla de Cañas (n=9; 10° 24.019'N, 85° 04.323'W) y en Tempisquito de Liberia (n=9; 10° 50.072'N, 85° 33.446'W) ([Anexo 1](#)). Las muestras de *H. alchorneoides* se recolectaron en la región del Pacífico Sur del país en la localidad de Mogos de Osa (n=14; 08° 45.789'N, 83° 22.399'W) y en Drake (n=9; 08° 42.516'N, 83° 37.446'W). Para ambas especies, la colecta del material foliar se llevó a cabo durante la época seca en la última semana del mes de enero en los años 2005 y 2015. Los sitios de colecta de cada individuo se georreferenciaron utilizando un GPS (Garmin GPSMAP 62 en el 2005 y Montana 650 en el 2015).

### **2.3.1 Recolección del material foliar**

Para uniformar el proceso de recolección del material vegetal de *H. alchorneoides*, se siguieron los lineamientos establecidos por [Villalobos \(2000\)](#). Se recolectaron 4 hojas en la misma etapa fenológica (hojas completamente expandidas) para cada individuo, con un tamaño de lámina foliar promedio de 15 cm (desde la base foliar hasta el ápice) y de color verde. No se consideraron aquellas hojas que presentaban una coloración anaranjada-rojiza, típico del pilón. De igual forma, para la especie *S. capiri* se recolectaron hojas desarrolladas con un tamaño de lámina foliar promedio de 11 cm (desde la base foliar hasta el ápice) y de color verde. En ninguna de las colectas se tomaron en cuenta hojas con necrosis ni clorosis visibles, ni con daños por herbivoría. Las muestras de tejido foliar del 2015 se obtuvieron a partir de los mismos individuos georreferenciados en el 2005.

Las muestras del tejido foliar se almacenaron en bolsas individuales, rotuladas con la fecha y coordenadas de colecta. Luego se transportaron en hielo hasta el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, en donde fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

## **2.4 Procesamiento del tejido foliar**

### **2.4.1 Aislamiento de ADN genómico total**

Con la finalidad de determinar el protocolo de extracción óptimo para llevar a cabo la MSAP se evaluaron tres protocolos de extracción de ácidos nucleicos totales con la metodología de: [Villalobos \(2000\)](#), [Araya et al. \(2005\)](#) y [Sahu et al. \(2012\)](#), para las especies *H. alchorneoides* y *S. capiri*.

Todas las extracciones de ácidos nucleicos totales se llevaron a cabo a partir de 500mg (peso fresco) de tejido foliar (sin tomar la vena principal ni venas secundarias) y en presencia de nitrógeno líquido. Posterior a la extracción de ácidos nucleicos totales se

realizó una digestión con RNasa A (Sigma-Aldrich) y una purificación con fenol:cloroformo: alcoholisoamílico (25:24:1) según el protocolo de purificación del ADN de Thermo Scientific. Luego, las muestras se resuspendieron en TE (1X, pH 8.0) hasta obtener una concentración final de 100ng/uL.

#### **2.4.2 Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN**

La concentración y pureza del ADN se midió espectrofotométricamente utilizando el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) del CIBCM, en el cual el rango de los valores de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  (1.8-2.0) y  $A_{260}/A_{230}$  (1.8-2.2) son utilizados como indicadores de pureza del ADN. Asimismo, para corroborar la concentración de ADN presente en cada muestra se utilizó un fluorómetro Quantus (Promega) con el kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega).

La integridad del ADN extraído de cada muestra se verificó mediante una corrida en un gel de agarosa de 0.8% m/v (Top Vision LE GQ, Fermentas) en solución de TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) y GelRed® (Biotium 10.000X) a 95 voltios durante 40 min en una cámara de electroforesis (Owl™ EasyCast™ B1 Mini Gel Electrophoresis) y una fuente de poder Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, Inc). En cada pozo se cargaron 5 uL del ADN (50ng/uL) y 1,5 uL de amortiguador de carga (6x DNA Loading Dye, Fermentas).

### ***2.5 Reacciones de amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación***

#### **2.5.1 Reacciones de digestión y ligación**

Las reacciones enzimáticas de digestión del ADN genómico necesarias para llevar a cabo la MSAP se basaron en el protocolo modificado de [Reyna-Lopez et al. \(1997\)](#) adaptado para plantas; en el cual, se reemplaza la enzima *MseI* por las enzimas sensibles a metilación: *HpaII* y *MspI*.

Para esta investigación, se llevaron a cabo dos digestiones enzimáticas en paralelo (*EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI*) a partir de una misma muestra de ADN genómico, para cada una de las especies de estudio de la siguiente manera: En la primera digestión, en un tubo de 0,5 mL, se agregaron 6 uL de 10X Tango Buffer (Thermo Scientific), 5 U de *EcoRI* (Thermo Scientific), 10 U de *MspI* o de *HpaII* (Thermo Scientific) y 500 ng de ADN para un volumen final de 30 uL. Esta primera digestión se incubó por 3 horas a 37°C. Seguidamente, se llevó a cabo una segunda digestión junto con la ligación de los adaptadores de la siguiente manera: A la primera digestión se le agregó una solución de 10 uL que contenía: 6 uL de 5X buffer (250 mM KAc, 50 mM Tris-HAc, pH: 7.5, 50 mM MgAc, 250 µg/mL BSA y 25 mM DTT), 5 U de *EcoRI*, 10 U de *MspI* o de *HpaII*, 5 pmol/µL del adaptador-EcoRI, 50 pmol/µL del adaptador H/M, 10 mM ATP y 400 U/µL de ligasaT4 DNA (1000 U) (Thermo Scientific) para un volumen final de 40 uL. Las reacciones de digestión/ligación se incubaron a 37°C por 3 horas, luego a 16°C por 2 horas y por último a 4°C durante toda la noche. Todas las reacciones de digestión y ligación se llevaron a cabo en el termociclador Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler. Posteriormente la eficacia de las reacciones se verificó con un gel de agarosa al 1,2% m/v en una solución de TBE 1X y GelRed® a 95 voltios durante 45 min.

### **2.5.2 Reacción de pre-amplificación y amplificación selectiva**

Las reacciones de pre-amplificación se realizaron de la siguiente manera: 3 uL de 10X Buffer PCR+MgCl<sub>2</sub>, 0,6 uL de dNTPs (10 mM), 1,5 uL de Eco+0 (10 µM), H/M+0 (10 µM), 0,2 uL de Taq polimerasa (5 U/uL) y 10 uL de una dilución de 1/30 del ADN previamente digerido/ligado para un volumen final de 30 uL. El perfil térmico para la pre-amplificación fue de 94°C por 5min seguido por 28 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 1min y 72°C por 1min con una extensión final de 72°C por 15min. Las pre-amplificaciones se verificaron en un gel de agarosa al 1,2% m/v previo a ser utilizadas en la amplificación selectiva.

Los productos de PCR de la pre-amplificación se diluyeron en agua desionizada sin DNAsas a una concentración de 1/30 y se utilizaron como moldes para la PCR de amplificación selectiva de la siguiente manera: 2 uL de 10X Buffer PCR+MgCl<sub>2</sub>, 0,4 uL de dNTPs (10 mM), 1,5 uL de Eco+3 (10 μM), 1,5 uL de H/M+3 (10 μM) ([Anexo 2](#)) y 0,2 uL de Taq polimerasa (5 U/uL). El perfil térmico para la PCR selectiva fue de una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min seguido por 13 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 30 s (con una disminución de 0,7°C por ciclo), 72°C por 1 min, seguido por 23 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 1 min con una extensión final de 72°C por 15 min y 37°C por 3 min.

Para reducir la variación experimental, todas las muestras de una misma población se digirieron/ligaron y amplificaron de manera conjunta. Las pre-amplificaciones y las amplificaciones selectivas se realizaron utilizando el termociclador Applied Biosystems Thermal Cycler 2720 (Versión 2.08).

### 2.5.3 Selección de imprimadores

Se analizaron un total de 20 combinaciones de imprimadores selectivos *EcoRI*+3 y *H/M*+3 (cada uno con tres nucleótidos específicos en el extremo 3' ([Anexo 3](#)) con la finalidad de determinar las 3 combinaciones en las que se observara la mayor intensidad y reproducibilidad de las bandas amplificadas, así como también el mayor grado de polimorfismo de bandas para ambas especies de estudio.

Los criterios de selección para la escogencia de los 3 pares de imprimadores se basaron en la combinación de imprimadores para AFLP/MSAP más utilizadas en plantas de la misma familia de *S. capiri* y *H. alchorneoides* ([Araya et al., 2005](#); [Mastan et al., 2012](#) y [Rathore et al., 2015](#)). Asimismo se seleccionaron aquellas combinaciones de imprimadores MSAP previamente usadas en especies arbóreas ([Rathore et al., 2015](#); [Rico et al., 2014](#); [Inácio et al., 2017](#)) y las combinaciones de imprimadores más comunes en especies tropicales ([Portis et al., 2004](#); [Jia et al., 2017](#)). Otro criterio de selección fue el uso de combinaciones que dieran fragmentos entre los 100 pb y 500 pb para reducir un potencial efecto de homoplasia de tamaño ([Vekemans, 2002](#)).

#### 2.5.4 Electroforesis capilar de los productos de amplificación

Los productos de PCR de las amplificaciones selectivas, se separaron y detectaron mediante una electroforesis capilar automatizada de alta resolución con el equipo QIAxcel Advanced System del CIBCM. La presencia/ausencia de cada fragmento amplificado se anotó con base en la imagen del gel y los electroferogramas generados con el programa QIAxcel ScreenGel del CIBCM. Cada uno de los individuos muestreados se sometió a una electroforesis capilar con las 3 combinaciones de imprimadores *EcoRIHpaII* y *EcoRIMspI* seleccionados ([Anexo 3](#)).

Para determinar la tasa de error del MSAP y evaluar la reproducibilidad de cada combinación de imprimadores seleccionados, se hicieron 2 réplicas técnicas en 6 individuos (3 individuos de cada especie). La tasa de error se calculó de la siguiente manera:  $100 * (\text{número de puntajes discordantes entre 2 análisis independientes}) / (\text{número de marcadores obtenidos por imprimador} * \text{número total de individuos muestreados})$ .

#### 2.6 Análisis de MSAP

Las variaciones entre las bandas de los productos de PCR obtenidas con *EcoRI/HpaII* (carril H) y *EcoRI/MspI* (carril M), en cada muestra, permiten la identificación de 4 estados de metilación, según la presencia “+” o ausencia “-” de banda en el gel.

El primer patrón (I, +, +) hace referencia a la presencia de un fragmento en ambos carriles H y M, lo que indica un estado de *loci* no metilado en el tetranucleótido 5'-CCGG-3'. El segundo patrón (II, +, -) hace referencia a un estado hemimetilado, pues representa la metilación de la citosina externa en sólo una de las hebras del ADN. El tercer patrón (III, -, +) que representa la presencia de un fragmento en el carril M, pero no en el H, corresponde a la metilación de las citosinas internas en ambas hebras del ADN; mientras que el cuarto patrón (IV, -, -) es, por el contrario, considerado un estado no informativo ([Pérez-Figueroa, 2013](#)); ya que, podría deberse a un sitio mCmCGG hipermetilado, un

sitio mutado o bien representar la ausencia del tetranucleótido ([Fulneček & Kovařík, 2014](#)). Seguidamente, los patrones de banda de los fragmentos obtenidos con la PCR selectiva se transformaron en una matriz de código binario. Se asignaron los numerales “0” y “1” para denotar la ausencia y presencia de banda, respectivamente.

## 2.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos mediante la técnica del MSAP se analizaron utilizando la librería *msap* del paquete estadístico R, según lo descrito por ([Pérez-Figueroa, 2013](#)). La librería *msap* permite evaluar las diferencias epigenéticas y genéticas entre grupos de muestras a partir de una matriz de datos binarios; los cuales, hacen referencia al patrón de bandas de los fragmentos formado al digerir el ADN con las endonucleasas *MspI* y *HpaII*. La librería *msap* compara cada uno de los fragmentos obtenidos y los clasifica como fragmentos susceptibles a la metilación (MSL, representativo de la variación epigenética) o no susceptibles a la metilación (NML, representativo de la variación genética) ([Pérez-Figueroa, 2013](#); [Alonso et al., 2016](#)). Los fragmentos son clasificados como MSL si la proporción observada de estados metilados en todas las muestras excede el 5% (tasa de error); de lo contrario, el fragmento se clasifica como NML. Asimismo, un *loci* es considerado como polimórfico si presenta tanto estados metilados como no metilados en al menos dos ocasiones entre muestras ([Pérez-Figueroa, 2013](#)). También se llevó a cabo una prueba de Mantel entre los MSL y NML para examinar cuánta de la variación epigenética está correlacionada con la variación genética entre las muestras. En el análisis del MSAP se utilizaron los parámetros predeterminados de la librería *msap*, excepto el parámetro “*loci.per.primer*”, el cual es específico para cada especie de estudio.

La matriz de datos binarios de MSL se utilizó para cuantificar el porcentaje de metilación (metilación de citosina interna y hemimetilación) obtenido en el ADN foliar de *S. capiri* y *H. alchorneoides* en los años 2005 y el 2015. La relación entre la frecuencia de metilación y no metilación según el año de muestreo se evaluó mediante un chi-cuadrado para cada una de las especies. Asimismo, los porcentajes promedio de cada una



de las condiciones de metilación (según el año de muestreo) se compararon mediante una prueba de Wilcoxon y sus varianzas se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis.

Para detectar y cuantificar los cambios epigenéticos de la metilación *de novo* y la demetilación entre los MSL, según contexto (CG/CHG) entre el 2005 y el 2015, se empleó la metodología propuesta por [Bednarek et al. \(2017\)](#). Para ello, la matriz de datos de MSL se expresó como un código de 4 dígitos (sistema binario de “0” y “1”), los cuales representan los cambios en el patrón de metilación de las citosinas al comparar los años 2005 y 2015. Teóricamente son posibles 16 permutaciones, las cuales se clasificaron en 8 eventos de metilación, demetilación y de mantenimiento de la siguiente manera: la metilación *de novo* (DNM), la metilación *de novo* en el contexto CG (DNM-CG) y en el contexto CHG (DNM-CHG), la demetilación (DM), la demetilación en el contexto CG (DM-CG) y en el contexto CHG (DM-CHG), la preservación de sitios metilados (MSP) y la preservación de sitios no metilados (NMSP).

La varianza epigenética poblacional de los MSL entre los años 2005 y 2015, se evaluó mediante un análisis molecular de varianza (AMOVA) para cada uno de los sitios de muestreo a través la librería *pegas* en R ([Pérez-Figueroa, 2013](#)). Asimismo, para visualizar la varianza epigenética entre individuos conspecíficos según el año y sitio de muestreo se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales (PCoA) para cada especie de estudio. También, para estimar una posible correlación entre la distancia epigenética y la distancia geográfica interpoblacional, según el año de muestreo, se llevó a cabo una prueba de Mantel con 9999 permutaciones con la librería *poppr* de R.

La diversidad epigenética y genética de cada uno de los sitios de colecta de *S. capiri* (Jabilla y Tempisquito de Liberia) y *H. alchorneoides* (Mogos y Drake), se analizó mediante el índice de diversidad de Shannon ( $S = -\sum P_i \log_e(P_i)$ ), donde  $P_i$  es la frecuencia de la ausencia o presencia de bandas *EcoRI/MspI* y *EcoRI/HpaII* ( $i = 0, 1$ )), para cada año y sitio de colecta de individuos conspecíficos ([Pérez-Figueroa, 2013](#)). Para comparar las diversidades genéticas y epigenéticas según el sitio de colecta, se realizaron pruebas de Mann-Whitney-Wilcoxon.

### 3. RESULTADOS

#### *3.1 Variación climatológica de la Región del Pacífico Norte y Sur*

En la Región del Pacífico Norte, las condiciones climatológicas reportadas en las estaciones automáticas de Santa Elena y la Hacienda Mojica, difieren significativamente entre enero del 2005 y el 2015 ([Cuadro 1](#)). En el caso de Hacienda Mojica se observa un aumento significativo en los promedios mensuales de precipitación (W,  $p < 0,05$ ; KW =  $p < 0,05$ ), temperatura máxima (W,  $p = 0,03$ ; F,  $p = 0,039$ ) y temperatura mínima (W,  $p = 0,01$ ; F,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, a pesar de que también se observa un aumento en el promedio mensual de la humedad relativa, no se obtienen diferencias significativas entre el 2005 y el 2015 (W,  $p = 0,11$ ; KW,  $p = 0,11$ ). Por otra parte, en el registro de la estación automática de Santa Elena, se aprecia que la humedad relativa (%) es la única variable que presenta diferencias significativas entre el valor promedio mensual del 2005 ( $70,42\% \pm 7,12$ ) y el 2015 ( $60,90\% \pm 5,40$ ) (W,  $p < 0,05$ ; F,  $p < 0,05$ ; [Cuadro 1](#)).

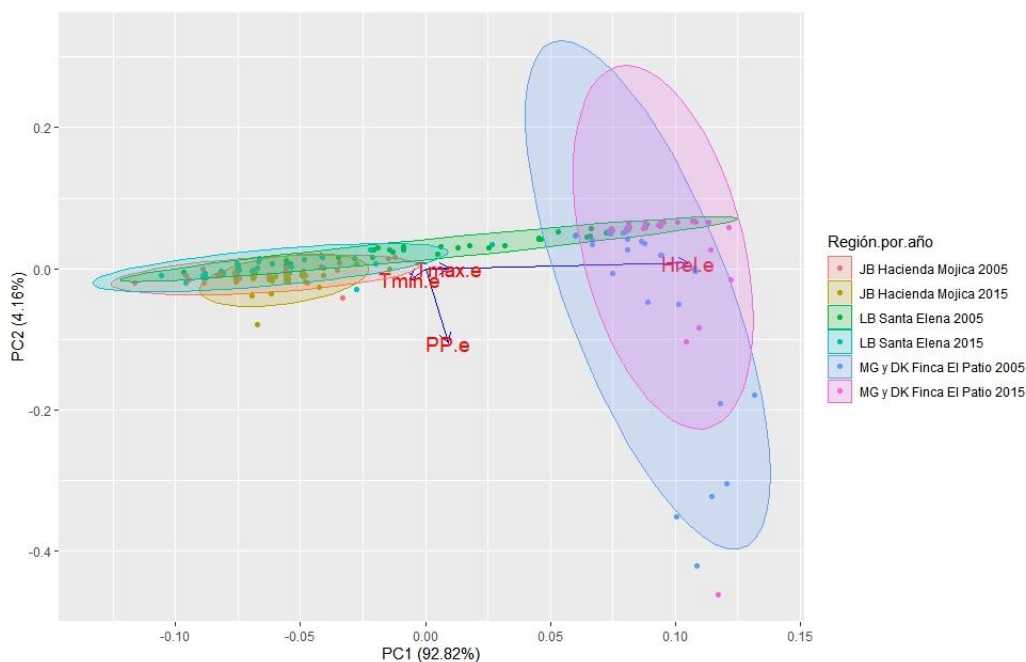
En el informe de la estación de Finca el Patio del Pacífico Sur, se aprecia que la precipitación diaria disminuyó significativamente entre el 2005 y el 2015 (W,  $p < 0,05$ ; KW,  $p < 0,05$ ), al igual que la temperatura mínima (W,  $p < 0,05$ ; F,  $p < 0,05$ ; [Cuadro 1](#)). De manera contraria, la temperatura máxima diaria aumentó de manera significativa entre el 2005 y el 2015 (W,  $p < 0,05$ ; F,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, el promedio mensual de humedad relativa reportado en la Finca el Patio, no cambió de manera significativa entre el 2005 y el 2015 (W,  $p = 0,06$ ; KW,  $p = 0,06$ ; [Cuadro 1](#)).

**Cuadro 1.** Valores promedio de las variables climatológicas de: precipitación (mm), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) y humedad relativa (%) para el mes de enero según el año y estación automática cercana al sitio de muestreo.

Variables climatológicas en enero	Región del Pacífico Norte		Región Pacífico Sur
	Santa Elena (Liberia)	Hacienda Mojica (Jabilla)	Finca el Patio (Mogos y Drake)
PP 2005 (mm)	0,02 ± 0,14	0,09 ± 0,28	2,97 ± 4,47
PP 2015 (mm)	0,05 ± 0,23	0,28 ± 0,43 *	1,01 ± 3,20 *
T. máx 2005 (°C)	30,14 ± 1,62	30,66 ± 1,55	32,48 ± 0,48
T. máx 2015 (°C)	30,53 ± 1,43	31,40 ± 1,16 *	33,20 ± 0,72 *
T. min 2005 (°C)	21,95 ± 1,02	24,30 ± 1,27	22,65 ± 0,79
T. min 2015 (°C)	22,46 ± 1,30	25,13 ± 1,14 *	21,90 ± 0,57 *
H. rel 2005 (%)	70,42% ± 7,12	60,67 ± 3,50	83,03 ± 2,55
H. rel 2015 (%)	60,90% ± 5,40 *	61,77 ± 1,93	84,03 ± 2,02

<sup>a</sup>Significado de los acrónimos: **PP**: precipitación promedio (mm), **T. máx**: Temperatura máxima promedio (°C), **T. min**: Temperatura mínima promedio (°C) y **H. rel.**: Humedad relativa promedio (%). (\*): **Diferencias significativa (p<0,05).**

El análisis de componentes principales de las variables meteorológicas ([Fig. 2](#)) revela que la humedad es la variable climatológica que tiene el mayor efecto sobre la varianza de los datos recopilados por la estación de Santa Elena (Liberia) para enero del 2005, específicamente en el componente 1 (C1, explica el 92,8% de la varianza) ([Fig. 2](#)). En el caso de la estación de la Finca El Patio, en la Región del Pacífico Sur, se observa que la precipitación es la variable que mayor influencia tiene sobre la varianza de los datos en el componente 2 (C2, explica el 4,16% de la varianza). Por el contrario, las temperaturas máximas y mínimas tienen poco efecto sobre la varianza de los datos. Con excepción del registro de Santa Elena del 2005, los datos recogidos en las estaciones del Pacífico Norte se agrupan entre ellos y de manera separada con respecto a los datos de la estación del Pacífico Norte ([Fig. 2](#)).



**Figura 2.** Análisis de componentes principales (PCA) de las variables climáticas de: precipitación (mm), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) y humedad relativa (%) del mes de enero del 2005 y 2015 en las estaciones automáticas de la Hacienda Mojica (JB, Jabilla), Santa Elena (LB, Liberia) y Finca El Patio (MG y DK, Mogos y Drake, respectivamente). Cada punto representa la variación climatológica de un día del mes de enero. **PP.e** = precipitación (mm) de enero, **T.min.e** = Temperatura mínima (°C) de enero, **T.máx.e** = Temperatura máxima (°C) de enero y **H.rel.e** = Humedad relativa (%) de enero.

### 3.2 Protocolos de extracción de ADN genómico de plantas

Al aislar el ADN genómico utilizando las metodologías de [Villalobos \(2000\)](#), [Araya et al. 2005](#) y [Sahu et al. \(2012\)](#), se observó que solamente con el protocolo modificado de [Sahu et al. \(2012\)](#), ([Anexo 4](#)) las muestras de ADN presentaban valores de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  dentro del rango esperado (1.8-2.2) ([Cuadro 2](#)). De igual manera, al evaluar la integridad del ADN extraído con los tres protocolos, anteriormente mencionados, en geles de agarosa al 0.8%, únicamente con el protocolo modificado de [Sahu et al. \(2012\)](#) se observaron bandas claras de alto peso molecular sin degradación ([Anexo 5](#)); por lo cual, se decide emplear esta metodología para obtener ADN de calidad para ser utilizado en las reacciones de MSAP.

**Cuadro 2.** Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN genómico según indicadores de concentración (ng/uL) y pureza ( $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ ).

Protocolo de extracción	Concentración de ADN (ng/uL)*	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
<a href="#">Villalobos (2000)</a>	~ 250	1.6-1.8	1.1-1.6
<a href="#">Araya et al. (2005)</a>	~ 350	1.2-1.7	0.5-1.2
<a href="#">Sahu et al. (2012)</a> modificado	~ 250	1.8-2.0	1.8-2.2

\*Muestra resuspendida en 300uL de TBE.

### 3.2.1 Selección de imprimadores selectivos

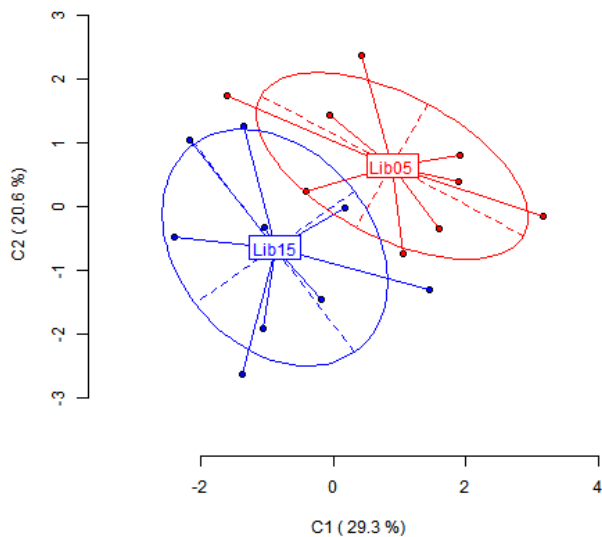
De las 20 combinaciones de imprimadores selectivos analizados ([Anexo 3](#)), se escogieron las combinaciones A (E+ACA y H/M+CAC), B (E+AAC y H/M+TCA) y C (E+ACA y H/M+TCA) pues, cumplían con los parámetros de selección de polimorfismo y reproducibilidad de banda. Las tres combinaciones de imprimadores presentaron niveles variables en la detección de cambios de metilación en las muestras. La combinación C presentó el mayor grado de detección de MSL (35,77%), seguido por las combinaciones B (32,31%) y A (31,92%) respectivamente. Para cada combinación de imprimadores se obtuvo una tasa de error promedio de 4,8% (A) 4,45% (B), y 2,6% (C). Estos valores se encuentran por debajo de la tasa de error técnico (5%) propuesto por [Pérez-Figueroa \(2013\)](#) para la técnica de MSAP.

### ***3.3 Descripción epigenética poblacional en cada sitio de muestreo para las especies S. capiri y H. alchorneoides***

#### **3.3.1 Liberia**

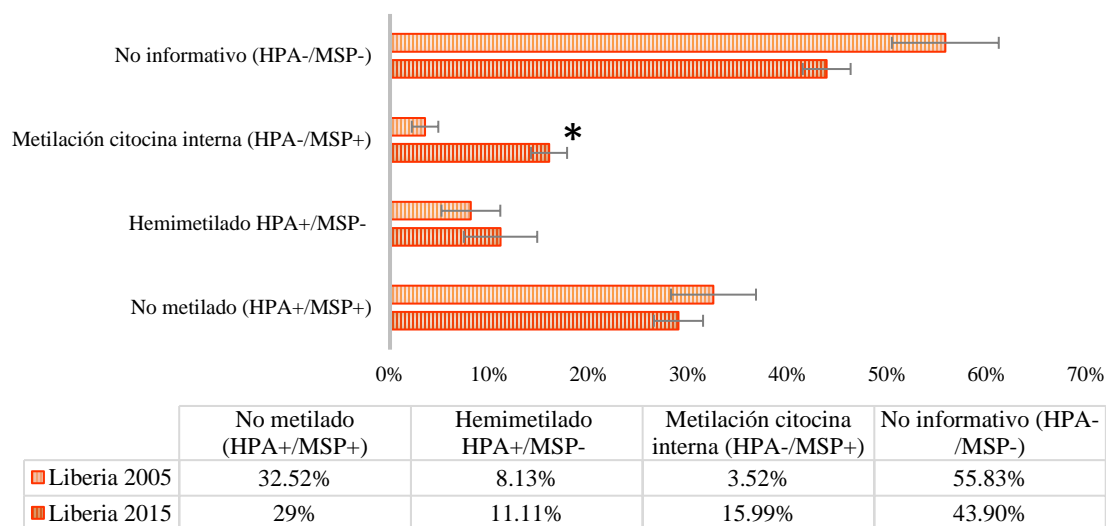
A partir de la matriz de datos binarios generados por el *msap* de los individuos de Liberia, se obtuvo un total de 101 *loci* (A: 37, B: 29 y C: 35); de los cuales, un 40,6% se catalogaron como *loci* sensibles a la metilación (MSL) y un 59,4%, como no sensible (NML). Los *loci* de ambas categorías exhibieron un 98% de polimorfismo. Con base en la prueba de Mantel entre las matrices de MSL y los NML, la variación epigenética (MSL) no se relacionó estadísticamente con la variación genética (NML) entre los individuos muestreados ( $r_M = 0,0475$ ,  $p = 0,3103$ ).

Con respecto a los *loci* que se clasificaron como MSL se observó una relación estadísticamente significativa entre la condición de metilación (metilación/no metilación) y el año en que se llevó a cabo la colecta y ( $\chi^2 = 15,9$ ,  $df = 1$ ,  $p = 6,65e-05$ ). Según el análisis molecular de varianza (AMOVA) el 21% de la variación epigenética total se explica por el año en el que se realizaron las colectas del material vegetal ( $\phi_{ST_{MSL}} = 0,21$ ,  $p = 0,0022$ ), tal y como se observa en el PCoA de la [Fig.3](#).



**Figura 3.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de Liberia en el 2005 (rojo) y en el 2015 (azul). Se muestran las principales coordenadas (C1 y C2) y entre paréntesis el porcentaje de varianza. Los puntos representan muestras individuales (árboles de tempisque) agrupados según año. Las etiquetas indican los centroides de cada año de colecta para cada nube de puntos. Las elipses denotan la dispersión promedio asociada con cada valor. El eje largo dentro de la nube de puntos muestra la dirección de la máxima dispersión, mientras que el eje corto la dirección de la mínima dispersión.

La categoría de eventos de metilación en la que se observó el mayor cambio entre el 2005 y 2015 fue la de la metilación de la citosina interna, la cual aumentó del  $3,5\% \pm 1,33$  en el 2005 al  $16\% \pm 1,81$  en el 2015 ( $W=0,5$ ,  $p=0,0003$ ) (Fig. 4). En ninguna otra categoría de los MSL se apreciaron diferencias significativas entre el 2005 y 2015 ( $p>0,05$ ).



**Figura 4.** Porcentajes promedio de las condiciones de metilación: metilación en la citosina interna, hemimetilación, no metilado y no informativo a partir de los MSL de los individuos de Liberia en el 2005 y 2015. \* Cambio significativo entre los valores obtenidos para el 2015 con respecto al 2005.

La cuantificación relativa de los diferentes estados de metilación según [Bednarek et al. \(2017\)](#) reveló que el mayor porcentaje de eventos de metilación *de novo* se dio en el dinucleótido CG (DNM-CG, 5,43%  $\pm$  0,5) en comparación con el contexto CHG (DNM-CHG, 2,99%  $\pm$  1,0) (W,  $p < 0,05$ ; F=43,41,  $p < 0,05$ ) ([Cuadro 3](#)). De manera contraria, en la demetilación, el mayor porcentaje se obtuvo en el motivo CHG (DM-CHG, 5,41%  $\pm$  2,1) en comparación con el contexto CG (DM-CG, 4,32%  $\pm$  0,6); sin embargo, ambos porcentajes no son significativamente distintos entre sí (W,  $p = 0,49$ ; KW,  $p = 0,45$ ) ([Cuadro 3](#)).

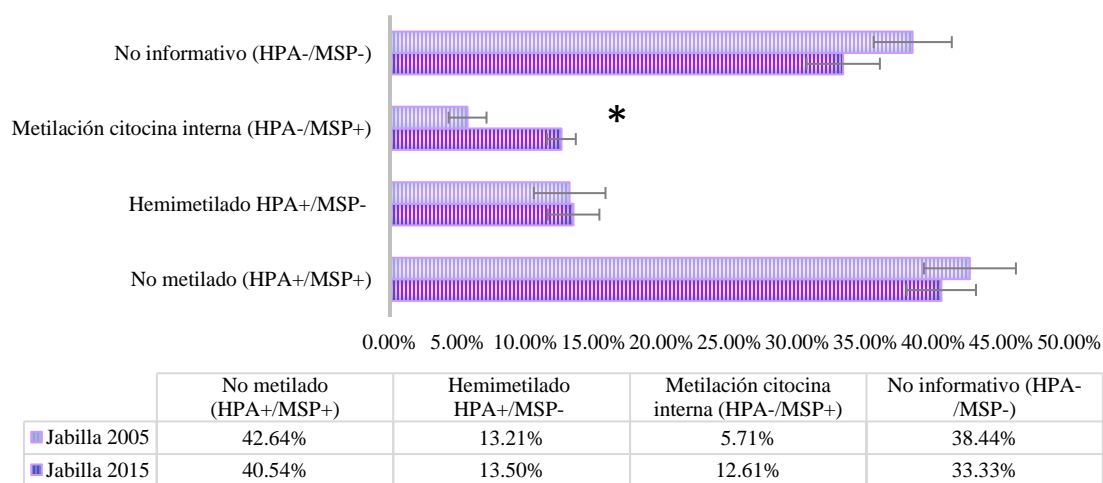
El índice de diversidad epigenética estimado con el índice de diversidad de Shannon fue de  $I_E = 0,5766$  ( $SD_E = 0,095$ ) para el 2005 y de  $I_E = 0,5953$  ( $SD_E = 0,1101$ ) para el 2015. Además, el índice de diversidad genética estimado para esta población fue de  $I_G = 0,4962$  ( $SD_G = 0,1331$ ). Los índices de diversidad epigenética (MSL) y genética (NML) estimados para la población de Liberia resultaron ser significativamente distintos entre sí (W= 1780,  $p < 0,0001$ ).



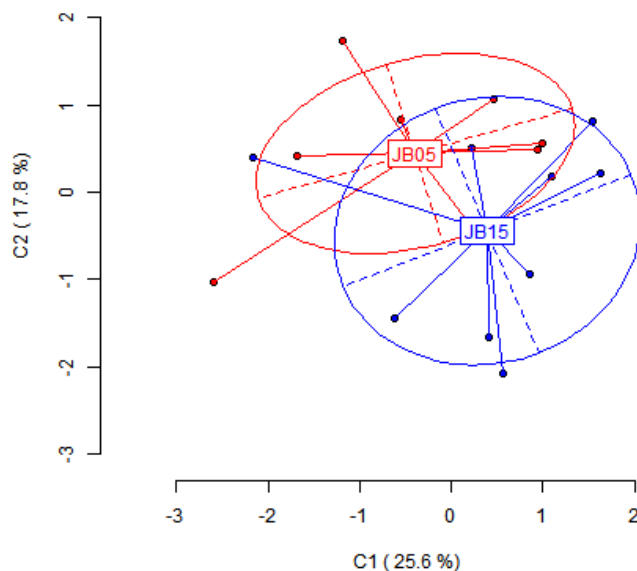
### 3.3.2 Jabilla

Del análisis de los individuos de la localidad de Jabilla se obtuvo un total de 96 *loci* con los tres pares de imprimadores seleccionados (A: 36, B: 31 y C: 29). Del total de *loci* un 38,5% se clasificaron como sensibles a la metilación (MSL), mientras que la mayoría (61,4%) como no sensibles a la metilación (NML). De los *loci* MSL, el 95% son polimórficos y de los *loci* NML solamente el 68% son polimórficos.

Con base en el análisis de los *loci* MSL, se obtuvo una diferencia significativa (W,  $p < 0,005$ ) entre el porcentaje de *loci* con metilación en la citosina interna según el año de muestreo ( $\chi^2 = 8,24$ ,  $df=1$ ,  $p = 0,004$ ). En el 2005 el valor fue de  $5,7\% \pm 1,39$  y en el 2015 del  $12,61\% \pm 1,05$ . Por el contrario, no se observaron diferencias significativas para las condiciones de hemimetilación, no metilado y no informativo (W,  $p > 0,5$ ) (Fig. 5). En general no se obtuvo una relación estadística significativa entre el año de colecta y la condición de metilación basada en los MSL ( $\chi^2 = 2,74$ ,  $df=1$ ,  $p = 0,09$ ). Asimismo, al realizar el AMOVA no se obtuvieron diferencias epigenéticas significativas entre los individuos del 2005 y el 2015 ( $\phi_{ST_{MSL}} = 0,07$ ,  $p = 0,06$ ), tal y como se observa en el PCoA de la Fig. 6.



**Figura 5.** Porcentajes promedio de las condiciones de metilación: metilación en la citosina interna, hemimetilación, no metilado y no informativo a partir de los MSL de los individuos de Jabilla en el 2005 y 2015. \* Cambio significativo entre los valores obtenidos para el 2015 con respecto al 2005.



**Figura 6.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de Jabilla en el 2005 (rojo) y en el 2015 (azul). Se muestran las principales coordenadas (C1 y C2) y entre paréntesis el porcentaje de varianza. Los puntos representan muestras individuales (árboles de tempisque) agrupados según año. Las etiquetas indican los centroides de cada año de colecta para cada nube de puntos. Las elipses denotan la dispersión promedio asociada con cada valor. El eje largo dentro de la nube de puntos muestra la dirección de la máxima dispersión, mientras que el eje corto la dirección de la mínima dispersión.

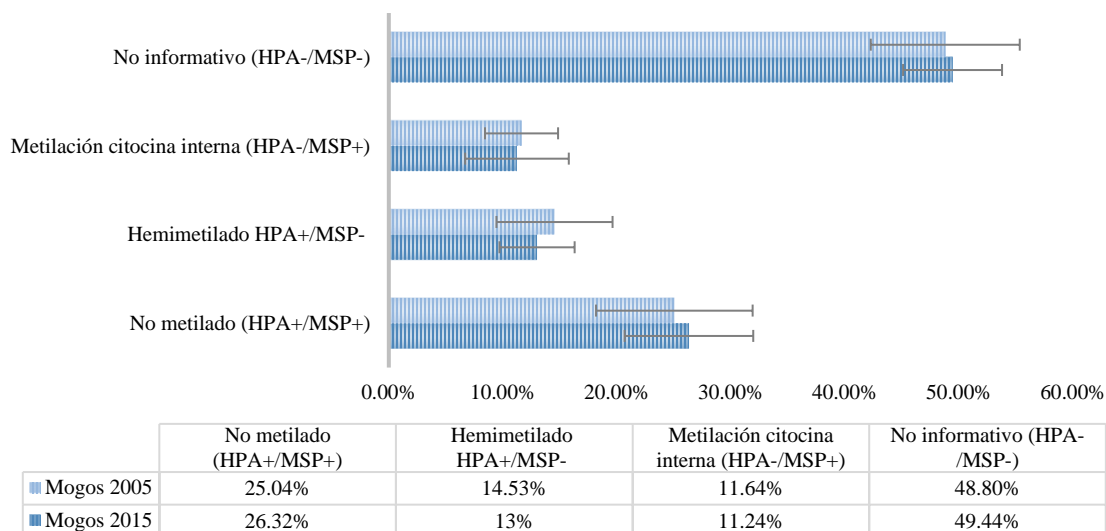
Con respecto a la cuantificación de todos los eventos de metilación, según la metodología de [Bednarek et al. \(2017\)](#) ([Cuadro 3](#)), se obtuvieron diferencias significativas entre la metilación *de novo* (W,  $p < 0,05$ ; KW,  $p < 0,05$ ) con un promedio de  $2,36\% \pm 0,94$  en el contexto DNM-CHG y un  $4,7\% \pm 0,62$  en el contexto DNM-CG. Por otra parte, a diferencia de la metilación *de novo*, no se observaron diferencias significativas (W,  $p = 0,54$ ; KW,  $p = 0,50$ ) entre la demetilación en el contexto DM-CG ( $3,76\% \pm 1,31$ ) y la demetilación en el contexto DM-CHG ( $4,0\% \pm 0,83$ )

El índice de diversidad epigenético estimado a partir del índice de Shannon fue de  $I_E = 0,5517$  ( $SD_E = 0,1237$ ) para el 2005 y de  $I_E = 0,549$  ( $SD_E = 0,118$ ) para el 2015. Por otra parte, el índice de diversidad genética de Shannon se estimó en  $I_G = 0,4015$  ( $SD_G = 0,1723$ ). Ambos índices de diversidad son significativamente distintos entre sí (W=1025,  $p < 0,0005$ ).

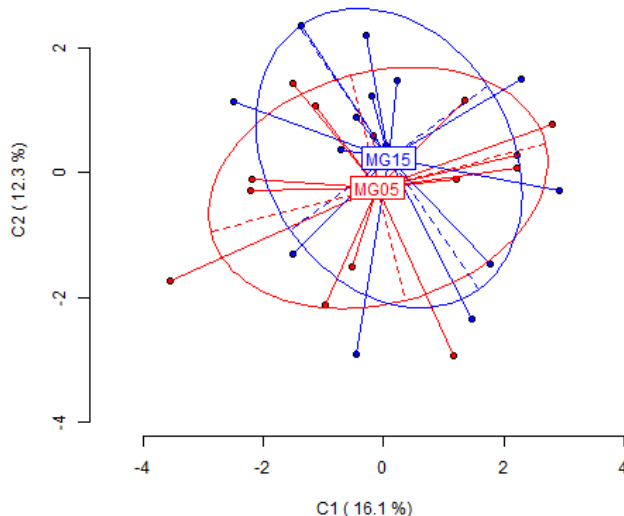
### 3.3.3 Mogos

Al analizar la matriz de datos binarios de Mogos con la librería *msap* de R, se obtuvo un total de 106 *loci* con las tres combinaciones de imprimadores seleccionados (A: 36, B: 37 y C: 33). Del total de *loci* obtenidos el 84% se clasificó como sensible a la metilación (MSL) y el 16% restante como no sensible a la metilación (NML). Ambos *loci* presentaron un porcentaje de polimorfismo del 91% y 96%, respectivamente. Al realizar una prueba de Mantel entre las matrices de MSL y NML no se obtuvo una correlación significativa entre ambos grupos de *loci* ( $r_M=0,075$ ,  $p=0,1576$ ).

La categorización de los *loci* sensibles a metilación (MSL) muestra que los porcentajes de las diferentes condiciones de metilación son similares entre el 2005 y 2015 (Fig. 7). Asimismo, la prueba de chi-cuadrado demostró que no existe una relación estadística significativa entre la condición de metilación (metilación y no metilación) obtenida y los años en que se llevó a cabo el muestreo ( $\chi^2=1,08$ ,  $df=1$ ,  $p=0,30$ ). Además, el análisis molecular de varianza (AMOVA) reveló que no existen diferencias epigenéticas (MSL) ( $\Phi_{ST_{MSL}}=0,0045$ ,  $p=0,3864$ ) significativas entre los individuos muestreados entre el 2005 y el 2015 (Fig. 8).



**Figura 7.** Porcentajes promedio de las condiciones de metilación: metilación en la citosina interna, hemimetilación, no metilado y no informativo a partir de los MSL de los individuos de Mogos en el 2005 y 2015.



**Figura 8.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de Mogos en el 2005 (rojo) y en el 2015 (azul). Se muestran las principales coordenadas (C1 y C2) y entre paréntesis el porcentaje de varianza. Los puntos representan muestras individuales (árboles de pilón) agrupados según año. Las etiquetas indican los centroides de cada año de colecta para cada nube de puntos. Las elipses denotan la dispersión promedio asociada con cada valor. El eje largo dentro de la nube de puntos muestra la dirección de la máxima dispersión, mientras que el eje corto la dirección de la mínima dispersión.

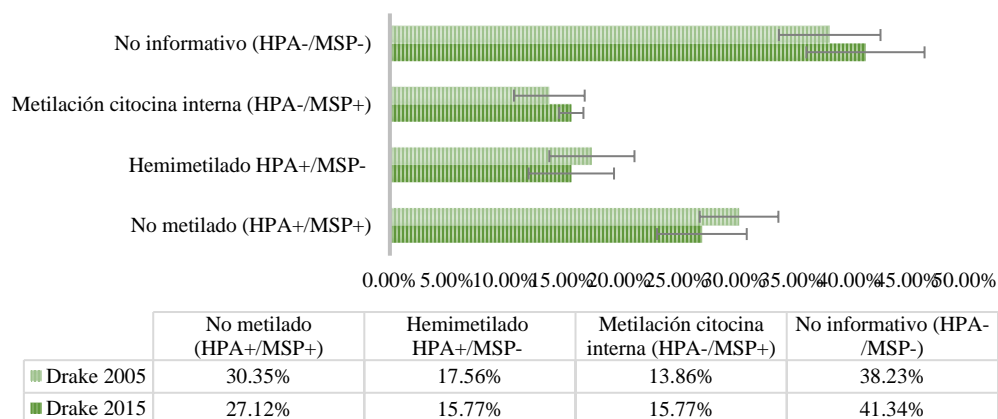
Al cuantificar y comparar los diferentes eventos de metilación del 2005 con los del 2015, según la metodología de [Bednarek et al. \(2017\)](#), se observaron diferencias significativas ([Cuadro 3](#)). Dichas diferencias se dieron en los eventos de metilación *de novo* y demetilación según el contexto (CG o CHG) ([Cuadro 3](#)). El porcentaje promedio de la metilación *de novo* fue mayor en el contexto CG (DNM-CG, 4,80%  $\pm$  0,5) que en el contexto CHG (DNM-CHG, 3,08%  $\pm$  0,9) (W,  $p < 0,005$ ; F,  $p < 0,005$ ). Lo mismo sucedió cuando se compararon los eventos de demetilación en el contexto CG (DM-CG, 4,80%  $\pm$  0,5) y CHG (DM-CHG, 3,09%  $\pm$  1,4) (W,  $p < 0,05$ ; F,  $p < 0,005$ ).

La diversidad epigenética (MSL) de Mogos, estimada a partir del índice de diversidad de Shannon, para el año 2005 fue de  $I_E = 0,6172$  ( $SD_E = 0,09$ ) y de  $I_E = 0,6299$  ( $SD_E = 0,07$ ) para el año 2015; mientras que la diversidad genética estimada para este sitio de muestreo fue de  $I_G = 0,4207$  ( $SD_G = 0,1778$ ). Al realizar una prueba de Wilcoxon se determinó que los índices de diversidad epigenética y genética son significativamente distintos entre sí (W=1136,  $p < 0,0001$ ).

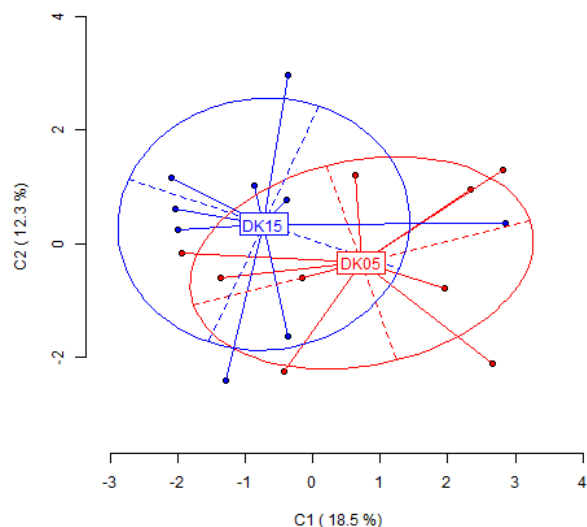
### 3.3.4 Drake

Al analizar la matriz de datos binario de los individuos del sitio de muestreo de Drake, se obtuvo un total de 122 *loci* (A: 43, B: 39 y C: 40) de los cuales un 76,2% se clasificaron como sensibles a la metilación (MSL) y un 23,7% como no sensibles a la metilación (NML); con un porcentaje de polimorfismo del 92% y 55%, respectivamente. La correlación entre las matrices de MSL y NML resultó significativa ( $r_M=0,33$ ,  $p< 0,05$ ) al realizar la prueba de Mantel.

El análisis de los MSL reveló que para los años 2005 y 2015 el porcentaje de metilación y no metilación de la población de Drake fue del 31,5% y 28%, respectivamente (Fig. 9); sin embargo, no se obtuvo una relación estadística significativa entre estas categorías y el año de colecta ( $\chi^2 =1,34$ ,  $df=1$ ,  $p=0,25$ ). Además, el AMOVA reveló que no existen diferencias epigenéticas significativas entre los individuos muestreados en el 2005 y los del 2015 ( $\phi_{ST_{MSL}}=0,048$ ;  $p=0,07$ ), tal y como se observa en el PCoA de la Fig. 10.



**Figura 9.** Porcentajes promedio de las condiciones de metilación: metilación de la citosina interna, hemimetilación, no metilado y no informativo a partir de los MSL de los individuos de Drake en el 2005 y 2015.



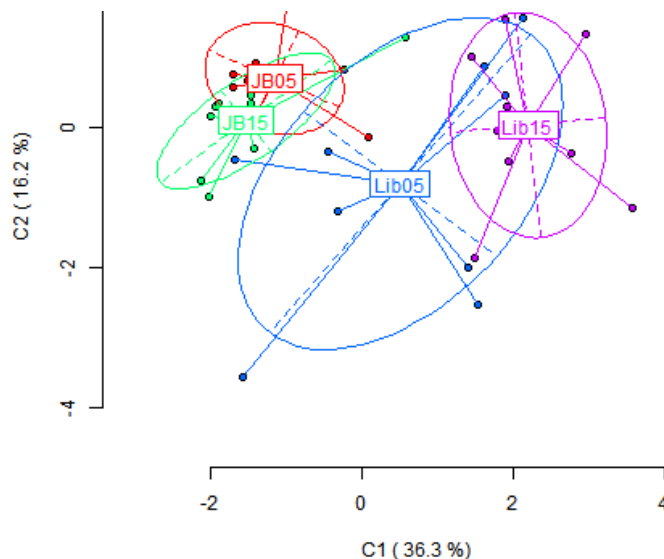
**Figura 10.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de Drake en el 2005 (rojo) y en el 2015 (azul). Se muestran las principales coordenadas (C1 y C2) y entre paréntesis el porcentaje de varianza. Los puntos representan muestras individuales (árboles de pílón) agrupados según año. Las etiquetas indican los centroides de cada año de colecta para cada nube de puntos. Las elipses denotan la dispersión promedio asociada con cada valor. El eje largo dentro de la nube de puntos muestra la dirección de la máxima dispersión, mientras que el eje corto la dirección de la mínima dispersión

Se analizaron los MSL utilizando la metodología de [Bednarek et al. \(2017\)](#) y se obtuvieron diferencias significativas entre los promedios ( $W$ ,  $p < 0,05$ ) y varianza ( $F$ ,  $p < 0,05$ ) de los porcentajes de metilación *de novo* según contexto, con una DNM-CHG del  $2,65\% \pm 1,2$  y un DNM-CG del  $4,77\% \pm 0,38$  ([Cuadro 3](#)). También, se obtuvieron diferencias significativas entre los promedios ( $p < 0,05$ ) y varianza ( $F$ ,  $p < 0,05$ ) de los porcentajes de demetilación según contexto, con una DM-CHG del  $2,66\% \pm 0,9$  y una DM-CG del  $4,30\% \pm 0,2$  ([Cuadro 3](#)).

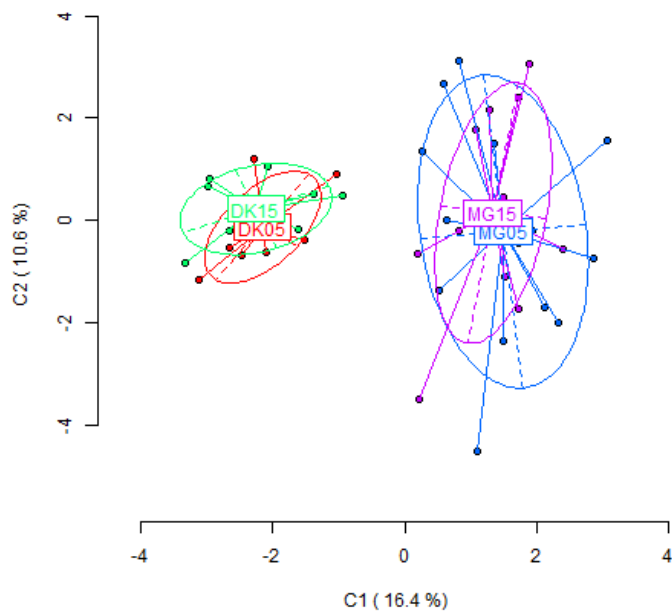
Por otra parte, la diversidad epigenética (MSL) de la población de Drake, estimada a partir del índice de diversidad de Shannon, para el año 2005 fue de  $I_E = 0,579$  ( $SD_E = 0,109$ ) y de  $I_E = 0,562$  ( $SD_E = 0,121$ ) para el año 2015; por otra parte, la diversidad genética estimada fue de  $I_G = 0,53$  ( $SD_G = 0,13$ ). Al realizar una prueba de Wilcoxon se determinó que los índices de diversidad epigenética y genética no son significativamente distintos entre sí ( $W$ ,  $p = 0,11$ ).

### 3.4 Perfil epigenético interpoblacional

A nivel interpoblacional, el AMOVA reveló diferencias epigenéticas (MSL) significativas entre las poblaciones de tempisque entre Jabilla y Liberia para los años 2005 ( $\phi_{ST_{MSL}} = 0,25$ ;  $p=0,002$ ) y 2015 ( $\phi_{ST_{MSL}} = 0,51$ ,  $p<0,001$ ) tal y como se observa en el PCoA de la [Fig. 11](#). Lo mismo sucede entre las poblaciones de Mogos y Drake tanto para el año 2005 ( $\phi_{ST_{MSL}}=0,25$ ,  $p<0,0001$ ) como para el 2015 ( $\phi_{ST_{MSL}} = 0,21$ ,  $p<0,0001$ ) ([Fig. 12](#)). También, al realizar la prueba de Mantel entre las distancias epigenéticas y geográficas se obtuvieron correlaciones positivas y significativas entre las poblaciones de tempisque en el 2005 ( $r_M=0,698$ ;  $p<0,001$ ) y el 2015 ( $r_M=0,914$ ;  $p<0,001$ ). Lo mismo sucede para las poblaciones de pilón en el 2005 ( $r_M=0,58$   $p<0,001$ ) y en el 2015 ( $r_M =0,658$ ;  $p<0,001$ ).



**Figura 11.** Resultados del análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles epigenéticos de los individuos de tempisque recolectados en Jabilla y Liberia en los años 2005 y 2015. En paréntesis a la par de cada coordenada se muestran los porcentajes de varianza. Cada uno de los puntos representa muestras individuales (rojo: Jabilla 2005, verde: Jabilla 2015, azul: Liberia 2005 y lila: Liberia 2015). Las etiquetas indican el centroide de la nube de puntos para cada localidad. Las elipses representan la dispersión promedio asociada a cada valor. El eje largo muestra la dirección de la máxima dispersión, mientras que el eje corto muestra la dirección de la mínima dispersión.



**Figura 12.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) interpoblacional de pilón según año de muestreo. En paréntesis a la par de cada coordenada se muestran los porcentajes de varianza. Cada uno de los puntos representa muestras individuales (rojo: Drake 2005, verde: Drake 2015, azul: Mogos 2005, lila: Mogos 2015). Las etiquetas indican el centroide de la nube de puntos para cada localidad y año. Las elipses representan la dispersión promedio asociada a cada valor. El eje largo muestra la dirección de la máxima dispersión, mientras que el eje corto muestra la dirección de la mínima dispersión.



**Cuadro 3.** Porcentaje promedio de cada uno de los eventos de metilación y demetilación según contexto entre el 2005 y 2015 para las poblaciones de Liberia, Jabilla, Mogos y Drake, según la metodología de [Bednarek et al. \(2017\)](#).

	Región del Pacífico Norte		Región del Pacífico Sur	
	Liberia	Jabilla	Mogos	Drake
<b><i>Metilación de novo</i></b>				
<b>DNM</b>	8,43% ± 1,20	7,15% ± 1,33	7,98% ± 1,2	7,62% ± 1,3
<b>DNM-CG</b>	5,43% ± 0,5	4,70% ± 0,62	4,80% ± 0,5	4,77% ± 0,38
<b>DNM-CHG</b>	2,99% ± 1,0	2,37% ± 0,94	3,08% ± 0,9	2,65% ± 1,2
<b><i>Demetilación</i></b>				
<b>DM</b>	9,73% ± 2,4	7,83% ± 1,52	7,89% ± 1,5	6,95% ± 0,9
<b>DM-CG</b>	4,32% ± 0,6	4,08% ± 0,8	4,80% ± 0,5	4,30% ± 0,2
<b>DM-CHG</b>	5,41% ± 2,1	3,75% ± 1,3	3,09% ± 1,4	2,66% ± 0,9

**DNM:** Metilación *de novo*, **DNM-CG:** Metilación *de novo* en el contexto CG, **DNM-CHG:** Metilación *de novo* en el contexto CHG, **DM:** Demetilación, **DM-CHG:** Demetilación en el sitio CHG, **DM-CG:** Demetilación en el sitio CG.

## 4. DISCUSIÓN

### *4.1 Variación climatológica de la Región del Pacífico Norte y Sur*

La Región del Pacífico Norte (RPN) se caracteriza por tener bajos niveles de precipitación (mm) y altas temperaturas durante la época seca (diciembre-abril) ([IMN](#)). Los escenarios de cambio climático regionalizados para Costa Rica a corto y mediano plazo ([Alvarado, 2012](#)), presentan reducciones graduales en la precipitación para esta región; sin embargo, el registro climatológico de la estación La Hacienda Mojica (EHM) y la estación de Santa Elena (ESE), muestran que el grado de precipitación promedio en el mes de enero, se mantuvo relativamente estable a lo largo de 10 años (2005 a 2015) ([Anexo 6](#)). No obstante, si se comparan los valores de precipitación obtenidos en la EHM entre el 2005 y el 2015, se observa que el promedio de precipitación de enero del 2015 no solamente fue 3 veces más alto (0,28mm) que el valor reportado para enero del 2005 (0,09mm), sino que también, fue el más alto en comparación con los demás años durante la década del 2005 al 2015. De acuerdo con el Boletín Meteorológico de enero del 2015 ([Solano, 2015](#)), las precipitaciones aisladas que se registraron en la EHM podrían estar relacionados con el efecto del anticiclón de las Islas Azores; lo cual, explicaría por qué el valor reportado de lluvia en la EHM en enero del 2015 se sale del rango esperado para la estación seca.

Con respecto a la temperatura, al comparar las predicciones del IMN ([Alvarado, 2012](#)) para la Región del Pacífico Norte con los valores obtenidos de las EHM (Jabilla) y ESE (Liberia) se observa que se cumplen las predicciones de un aumento gradual de las temperaturas máximas y mínimas cerca de la zona de muestreo de Jabilla y en menor medida en la temperatura mínima de la zona de muestreo de Liberia. Esta afirmación se cumple no sólo al comparar los valores de temperatura, máxima y mínima, entre enero del 2005 y 2015 sino también cuando se compara cada mes de enero entre el 2005 y 2015 ([Anexo 6](#)). Además, los valores obtenidos de temperatura (máxima y mínima) registrados para el 2005 y el 2015 se ajustan a los valores de temperatura esperados en la Fase Cálida del ENOS o el Fenómeno del Niño. De acuerdo con el [IMN](#) el mes de enero del 2005 y

enero del 2015 se clasifican como años del Niño débil; ya que, la variación en la temperatura promedio del país aumentó entre un 0,3°C y 0,8°C. Según el Boletín Meteorológico de enero del 2005 ([Sánchez, 2005](#)), en toda la Región del Pacífico se dieron aumentos significativos en la temperatura máxima que oscilaron entre los 0,5°C y 1,2°C. En conjunto con la fase cálida del ENOS, desde noviembre del 2004, se han reportado, en el océano Atlántico tropical, los valores de temperatura más altos desde 1970 [IMN](#). Por otra parte, en enero del 2015 las condiciones cálidas del Fenómeno del Niño explican el aumento en las temperaturas máximas en toda la Región del Pacífico, con anomalías menores a 0,5°C en la mayoría de estaciones analizadas en todo el país ([Solano, 2015](#)).

En cuanto al nivel de humedad del 2005 y el 2015 se observa una disminución significativa en el 2015 tal y como se esperaba según las proyecciones del IMN ([Alvarado, 2012](#)); especialmente en el caso de la ESE. De acuerdo con los datos suministrados por el IMN, el valor de humedad relativa promedio de enero del 2005 ( $70,42\% \pm 7,12$ ) es el segundo valor más alto registrado en la ESE después del 2006, en la década del 2005 y 2015 ([Anexo 6](#)).

Con respecto a las predicciones del modelo climatológico para la Región del Pacífico Sur ([Alvarado, 2012](#)), se esperaba un aumento gradual en la temperatura y la precipitación; sin embargo, según los datos reportados en la estación Finca el Patio (EFP), dichas variables se mantienen relativamente estables desde el 2005 hasta el 2015 ([Anexo 7](#)); especialmente la temperatura máxima y mínima. Sin embargo, si se analizan de manera aislada los valores de precipitación promedio y temperatura mínima obtenidos en el 2005 y el 2015 se obtiene una disminución significativa de estas variables. Con respecto a la precipitación, el Boletín Meteorológico de enero del 2005 ([Sánchez, 2005](#)), revela que los altos niveles de lluvia en el Caribe influenciaron positivamente el nivel de lluvia en la Región del Pacífico Sur y, por tanto, los niveles registrados en el 2005 son más elevados que los de enero del 2015. Además, del 2 al 10 y del 14 al 19 de enero ocurrieron 2 temporales en la zona del Caribe en los que se registraron 3 eventos extremos con más de 80 mm de lluvia por día. En el octavo día se dio una precipitación de 345 mm, es decir,

en 24 horas llovió el equivalente al promedio mensual más alto desde 1970. Estas condiciones de lluvia, junto con el aumento de temperatura en la zona y un mayor calentamiento en el Atlántico tropical (por el Fenómeno del Niño) generaron una mayor tasa de evaporación y por ende una mayor humedad atmosférica. Los vientos alisios arrastraron la humedad hacia la Región del Pacífico Norte lo que pudo haber incidido en los altos valores de humedad relativa reportados en la ESE (Liberia) del 12 al 15 de enero del 2005.

La temperatura máxima de la Región del Pacífico Sur aumentó significativamente entre los años 2005 y 2015; no así la temperatura mínima. El aumento en la temperatura máxima era el esperado según las proyecciones del IMN ([Alvarado, 2012](#)), dado que en enero del 2005 y enero del 2015 se da el Fenómeno del Niño ([IMN](#)).

#### ***4.2 Evaluación de protocolos de extracción de ADN genómico***

La extracción de ácidos nucleicos totales de la especie *H. alchorneoides* es sumamente compleja dada la alta cantidad de polisacáridos y polifenoles que co-precipitan con el ADN ([Villalobos, 2000](#); [Araya et al., 2005](#)). Estos metabolitos secundarios comprometen la pureza de la muestra de ADN y le confieren un alto grado de viscosidad que dificulta su paso a través de los geles de agarosa cuando se evalúa su integridad. De igual forma, la presencia de estos compuestos pueden tener efectos inhibitorios sobre las reacciones enzimáticas necesarias para llevar a cabo la MSAP ([Villalobos, 2000](#); [Araya et al., 2005](#); [Sahu et al., 2012](#)); es por ello que, la implementación de la metodología modificada de [Sahu et al. \(2012\)](#), resulta indispensable para realizar con éxito las reacciones de digestión, ligación y amplificación del ADN necesarias para la MSAP. Las principales diferencias que tiene el protocolo de extracción de [Sahu et al. \(2012\)](#) con respecto a los otros protocolos evaluados, es el aumento en la concentración de sal (NaCl), detergentes (CTAB y Tritón X-100),  $\beta$ -mercaptoeanol y PVPP (10.000 MW) en la solución tampón de lisis. El incremento de estos reactivos no sólo ayuda en la rotura de la membrana celular (CTAB, Tritón X-100 y NaCl), sino que inhibe la co-precipitación de polisacáridos (NaCl), polifenoles y proteínas (PVPP y  $\beta$ -mercaptoeanol) con el ADN.

### 4.3 Estructura epigenética de las poblaciones naturales de *S. capiri* y *H. alchorneoides*

Investigaciones recientes como la de [Niederhuth et al. \(2016\)](#) y [Alonso et al. \(2019\)](#) revelan que entre las angiospermas existe una variación interespecífica entre los niveles de metilación global del ADN. Esta variación ha sido atribuida a las variaciones en el tamaño del genoma de la especie, el contexto en el que se lleva a cabo la metilación (CG, CHG y CHH), la cantidad, posición y tipo de elementos transposonibles presentes, la ploidía, la distribución geográfica de la planta y su historia evolutiva ([Alonso et al., 2015](#); [Vidalis et al., 2016](#); [How-Kit et al., 2017](#); [Niederhuth & Schmitz, 2017](#)).

En esta investigación, se observa que los valores de metilación global del ADN del tempisque (~15.2 - 27.0%) y el pilón (~24.2 - 31.5%) se asemejan a los reportados en otras especies leñosas de poblaciones naturales tales como: *Laguncularia racemosa* (~14.6–32.1%; [Lira-Medeiros et al., 2010](#)), *Populus tomentosa* (~26,57%; [Ma et al., 2013](#)), *Quercus ilex* (~22.6%; [Rico et al., 2014](#)), *Populus simonii* (~26.61%; [Ci et al., 2015](#)), *Cupressus sempervirens* (~28%; [Avramidou et al., 2015a](#)), *Prunus mume* (~29.80%; [Ma et al., 2018](#)), pero son menores a los reportados en *Pistacia lentiscus* (~34.0%; [Albaladejo et al., 2019](#)), *Prunus avium* (~49.7%; [Avramidou et al., 2015b](#)) y *Pinus pinea* (~64.4%; [Sáez-Laguna et al., 2014](#)). En todas estas especies se empleó la técnica MSAP para evaluar los niveles globales de metilación del ADN.

De acuerdo con [Alonso et al. \(2019\)](#), las especies tropicales como el pilón y el tempisque presentan, en promedio, un genoma menos metilado en comparación con las especies de origen Mediterráneo. Lo mismo sucede al comparar plantas leñosas con herbáceas y plantas con una distribución geográfica amplia versus una restringida. Asimismo [Alonso et al. \(2019\)](#) argumentan también, que la variación en los niveles de metilación está estructurada filogenéticamente; es decir, que las especies que comparten un ancestro común reciente tienden a tener niveles de metilación similares entre sí en comparación con parientes distantes. Esto se observa al comparar los porcentajes de metilación obtenidos para el pilón en los sitios de muestreo de Mogos y Drake (~25-31%, respectivamente) con los de otras especies de la familia Euphorbiaceae. En este caso, el

rango de metilación exhibido por el pilón es similar a los porcentajes de metilación, obtenidos mediante la técnica HPLC, de las poblaciones naturales de *Croton arboreus* (~24,10%), *Croton chichenensis* (~29,15%) y *Croton punctatus* (~26,89%) de la Península de Yucatán en México ([Alonso et al., 2019](#)).

Según [Vidalis et al. \(2016\)](#), [Bartels et al. \(2018\)](#) y [Pei et al. \(2019\)](#) otra posible explicación de la variación interespecífica en los patrones de metilación de las plantas puede ser el resultado de la divergencia genética en los genes involucrados en la regulación de la metilación. Además, los autores proponen que las diferencias en el número de copias y tipos de ADN metiltransferasas (MET1, CMT2, CMT3, DRM1 y DRM2) y demetilinasas (DME, ROS1, DML2 y DML3) codificadas en el genoma también pueden influir en la diferenciación interespecífica. A su vez, [Bräutigam & Cronk \(2018\)](#) y [Miryeganeh & Saze \(2019\)](#) proponen que estas variaciones interespecíficas en los niveles de metilación propician una regulación epigenética diferencial sobre la actividad génica, lo que de acuerdo a los autores, podría explicar, en parte, el alto grado de complejidad de las plantas.

El efecto de la metilación de la planta sobre la expresión génica está sujeto al contexto (CG/CHG/CHH) y a la posición del genoma en el que se lleven a cabo los procesos de metilación y demetilación ([Bewick & Schmitz, 2017](#); [Niederhuth & Schmitz, 2017](#); [Tirnaz & Batley, 2019](#)). A nivel de contexto, la cuantificación relativa de los eventos de de/metilación, obtenida con la metodología de [Bednarek et al. \(2017\)](#), en cada uno de los sitios de muestreo ([Cuadro 3](#)), reveló que los eventos de metilación *de novo* (DNM) y demetilación (DM) ocurren con mayor frecuencia en el contexto CG que en el CHG. Este resultado era el esperado ya que, en las angiospermas, el nivel de metilación en el contexto CG es mayor que el de los contextos CHG y CHH. Según [Takuno et al. \(2016\)](#), en la mayoría de los metilomas analizados hasta la fecha, los porcentajes de metilación en los contextos CHG y CHH no superan a los de GC sin importar la región del genoma en que se encuentren. Otra explicación por la cual se observan variaciones en los porcentajes de metilación de las citosinas (5-mdC) según el contexto, podría deberse a que cada contexto requiere de diferentes vías de metilación, las cuales son más comunes en el contexto CG

que en el CHG y CHH ([Takuno et al., 2016](#)). De acuerdo con ([Zoldoš et al., 2018](#)), el polimorfismo de la metilación en los sitios CG y CHG afecta no sólo la estructura epigenética de la población, sino que también su agrupación. Esta afirmación podría explicar, en parte, los resultados obtenidos en los PCoA de la [Fig. 11](#) y [Fig. 12](#).

En el caso de *S. capiri* y *H. alchorneoides*, el cambio observado en los porcentajes de eventos de de/metilación según contexto (CG/CHG/CHH), podría afectar la transcripción génica, según la posición del genoma en donde se lleven a cabo estos procesos. De acuerdo con ([Zhang et al., 2018](#)), en la mayoría de los casos, los eventos de metilación en los sitios de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés) se correlacionan negativamente con la expresión del gen. Por el contrario, si la metilación se lleva a cabo en el contexto CG del cuerpo génico (gbM), pero no en el TSS, se obtiene una expresión elevada ([Bewick & Schmitz, 2017](#); [Niederhuth & Schmitz, 2017](#)). Las investigaciones de [Schulz et al. \(2014\)](#), [Gugger et al. \(2016\)](#), [Huang et al. \(2017\)](#) y [Vanden Broeck et al. \(2018\)](#) han propuesto que la regulación génica mediada por la de/metilación del contexto CG es sumamente importante pues podría estar involucrada en una rápida adaptación ambiental de las poblaciones. Por otra parte, los eventos de de/metilación en los contextos CHG y CHH, se encuentran principalmente asociados con el control de la movilidad de los elementos transponibles y el silenciamiento de secuencias repetidas y de transgenes ([Bräutigam & Cronk, 2018](#); [Huang & Ecker, 2018](#); [Yadav et al., 2018](#); [Tirnaz & Batley, 2019](#)).

#### ***4.4 Variación epigenética intraespecífica***

La diferenciación epigenética observada en los PCoA intrapoblacionales revela que cada uno de los individuos de la población responde de manera diferenciada al entorno en el que se encuentra a pesar de que comparten un mismo hábitat. Al comparar la variación epigenética observada entre el 2005 y el 2015 se obtiene que unos epigenotipos son más estables que otros. Este resultado ha sido previamente observado en poblaciones silvestres como la de *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae), en la cual los niveles

intrapoblacionales de la metilación de las citosinas oscilaban entre el 26 y 36% ([Alonso et al., 2014](#)). Otro caso similar ha sido el de *Lavandula latifolia* (Lamiaceae), en la que el rango de metilación se encontraba entre el 22 y 37% ([Herrera et al., 2018](#)). De acuerdo con [Herrera et al. \(2018\)](#), la variación intraespecífica en la metilación global de las citosinas del ADN puede ser tan amplia como las diferencias interespecíficas; ya que, según [Richards \(2006\)](#) parte de la variación epigenética se encuentra asociada no sólo a cambios en el medioambiente sino que también a eventos azarosos y a la variación genotípica que presentan los individuos dentro de la población.

En el caso de la Región del Pacífico Sur (sitios Mogos y Drake), la relativa estabilidad climática que se dio durante la década de estudio (2005-2015) no fue suficiente para uniformar los niveles de metilación a un perfil común; ya que, la dispersión epigenética intrapoblacional mantuvo la misma dispersión distintiva que tenían desde el inicio del estudio (PCoA; [Fig. 8](#) y [Fig. 10](#)). En contraposición con lo que se observa en los individuos de Mogos y Drake, en las poblaciones de tempisque se obtiene una variación epigenética ligeramente mayor en el 2005 con respecto al 2015, específicamente entre los individuos de Liberia muestreados en el 2005.

#### **4.4.1 Variación epigenética en las poblaciones de *S. capiri***

Actualmente existe una gran cantidad de evidencia experimental que demuestra una relación entre el polimorfismo de la metilación del ADN y las condiciones ambientales en las que se desarrollan las plantas ([Lira-Medeiros et al., 2010](#); [Herrera & Bazaga, 2011](#); [Correia et al., 2013](#); [Medrano et al., 2014](#); [Rico et al., 2014](#); [Foust et al., 2016](#); [Gugger et al., 2016](#); [Keller et al., 2016](#); [Lafon-Placette et al., 2017](#)). La presente investigación sugiere que la variación significativa que se da entre los niveles de metilación de la citosina interna del 2005 y el 2015 ([Fig. 4](#) y [Fig. 5](#)) podría explicarse como una respuesta epigenética de los individuos de *S. capiri* ante variaciones climatológicas y bióticas en la zona de muestreo.



## ***Liberia***

En enero del 2005, los individuos de Liberia estuvieron expuestos a una humedad relativa promedio mensual alta ( $70,42\% \pm 7,12$ ); esto si se compara con los valores obtenidos en la década del 2005 al 2015. De manera conjunta con esta condición temporal, durante el primer muestreo se observó que la mayoría de los individuos presentaba no sólo pérdida de follaje, sino que muchas de las hojas remanentes mostraban una sintomatología asociada a una infección fúngica (F. Albertazzi, com. pers., 2019), probablemente propiciada por los altos niveles de humedad en la zona. Las hojas infectadas presentaban lesiones redondeadas de color negro entre las venas secundarias y en los bordes, las cuales según [Rodríguez \(2001\)](#) es un cuadro característico de la infección del patógeno fungoso foliar *Colletotrichum gloeosporioides*. Según el trabajo realizado por [Rodríguez \(2001\)](#) es común que *C. gloeosporioides* infecte a los árboles de *S. capiri* y cause lesiones en sus hojas, tal y como se observó en los individuos muestreados en el Parque Nacional Barra Honda, Guanacaste, en febrero del 2000. En esos árboles se observó una infección foliar del 14,02% bajo condiciones naturales.

En el segundo muestreo del 2015, los valores de humedad relativa ( $60,90\% \pm 5,40$ ) disminuyeron significativamente con respecto a los del 2005 y los árboles de tempisque ya no presentaban la infección foliar que se observó en el 2005. Es por ello que, en este trabajo se sugiere que la presencia de patógenos junto con valores de humedad relativa promedio altos, en enero del 2005, pudieron haber influido en la variación de los niveles de metilación de la citosina interna de *S. capiri* ([Anexo 6.1](#)). De ser éste el caso, los árboles de tempisque de Liberia pudieron haber incurrido en un proceso de demetilación como respuesta ante condiciones de estrés biótico y abiótico. Los autores [Moradi et al. \(2019\)](#) y [Tirnaz & Batley \(2019\)](#) proponen que la infección por patógenos puede inducir alteraciones en la metilación del ADN de las plantas, tales como la hipometilación de genes de resistencia como parte de la respuesta del sistema inmune de las plantas.

Por otra parte, el cambio significativo en el porcentaje promedio de humedad relativa en la ESE, también pudo haber influido en el aumento de los niveles de metilación

del tempisque entre el 2005 y el 2015. Un ejemplo de ello, se observa en las plantas de *Arabidopsis* cuando son sometidas a condiciones de baja humedad relativa ([Tricker et al., 2012](#)). Bajo este parámetro ambiental, las plantas incurren en un aumento en los niveles de metilación; específicamente, del gen *SPEECHLESS* (*SPCH*), el cual forma parte de la vía de desarrollo estomático. La metilación de este gen se correlacionó con una reducción en la expresión génica y por ende un menor índice estomático ([Tricker et al., 2012](#)).

El porcentaje de humedad relativa registrado en enero es especialmente relevante en el tempisque puesto que entre los meses de diciembre y mayo, el tempisque se encuentra en la etapa de floración ([García & Di Stéfano, 2005](#)). De acuerdo con estos autores se observa una tendencia inversa entre la humedad relativa y la floración y presencia de follaje. Según [Begcy & Dresselhaus \(2018\)](#), aunque las plantas están expuestas al estrés abiótico a lo largo de su ciclo de vida, durante la etapa reproductiva, la planta es más vulnerable a variaciones en los factores abióticos en comparación con la etapa de desarrollo vegetativo.

### ***Jabilla***

Los resultados obtenidos en la población de Jabilla revelan que, al igual que en la población de Liberia, existe una relación estadística significativa entre los niveles de metilación de la citosina interna de los individuos y el año de muestreo. Sin embargo, a diferencia de los individuos muestreados en Liberia, las hojas de tempisque en Jabilla no presentaban ningún tipo de patología (F. Albertazzi, com. pers., 2019). En este caso el cambio epigenético observado podría deberse a una variación significativa en las condiciones climatológicas; específicamente, en el promedio mensual de precipitación en enero del 2015.

Tal y como se explicó anteriormente, el valor promedio de lluvia reportado por la EHM en enero del 2015 fue considerablemente alto, superando todos los valores mensuales promedio reportados en los meses de enero en la década del 2005 al 2015. Otro factor importante a considerar es la diferencia significativa entre los niveles de

precipitación de la estación seca en los meses y años anteriores a los años de muestreo; es decir, antes del 2005 y 2015. A nivel mensual se observó que la lluvia promedio de diciembre del 2004 ( $0,38\text{mm} \pm 1,38$ ) disminuyó 4,2 veces en enero del 2005 ( $0,09\text{mm} \pm 0,28$ ). De manera inversa, en diciembre del 2014 ( $0,06\text{mm}, \pm 0,24$ ), la precipitación aumentó 4,6 veces para enero del 2015 con un valor promedio de  $0,28\text{mm} (\pm 0,43)$ . Diciembre del 2004 y diciembre del 2014 están catalogados por el [IMN](#) como meses “climatológicamente normales”, es decir, no se dio el fenómeno ENOS; consecuentemente, los modelos climatológicos del IMN proyectaban bajos niveles de precipitación acorde con la época seca; sin embargo, como se mencionó anteriormente, en diciembre del 2004 se reportaron niveles de precipitación significativamente más elevados que los del 2014.

A nivel anual también se observa un cambio importante en los niveles de precipitación en la EHM durante la estación seca (diciembre a abril) de años anteriores al muestreo ([Anexo 6.2](#)). Durante la estación seca del 2004 se obtuvieron precipitaciones totales de  $29,2\text{ mm} (\pm 1,13)$  mientras que en la estación seca del 2013 y 2014 se registraron precipitaciones totales de  $6,3\text{mm} (\pm 0,3)$  y  $19\text{ mm} (\pm 1,05)$  mm, respectivamente ([IMN](#)). Es decir, durante dos años consecutivos previos a la colecta del 2015 no sólo llueve menos que durante toda la estación seca del 2004 sino que también constituyen los valores más bajos de lluvia registrados entre el 2005 y el 2015.

La revisión bibliográfica de [Stan & Sánchez-Azofeifa \(2019\)](#) revela que, de todas las variables climáticas, la precipitación es la que explica la mayoría de la variación entre las diferentes áreas de los bosques tropicales secos, seguida por las variaciones en la temperatura. Según estos autores, la precipitación afecta la fenología, la biomasa y la estructura de los bosques tropicales secos (BTS). También, la investigación realizada por [Xu et al. \(2018\)](#) propone que los árboles del Trópico son altamente sensibles a la precipitación extemporánea durante la época seca, especialmente cuando los árboles se encuentran bajo condiciones de radiación solar intensa. Además, la alteración en las condiciones hidrológicas puede tener un efecto positivo sobre los árboles, tal y como se

registró para los árboles de las tierras secas de Senegal ([Brandt et al., 2019](#)), los de la sabana tropical ([Zhang et al., 2019](#)) y en seis especies arbóreas del bosque templado ([Dietrich & Kahmen, 2019](#)). En Costa Rica, la investigación de [Castro et al. \(2018\)](#) reveló que las precipitaciones atemporales pueden afectar el ciclo fenológico de los árboles de un bosque tropical seco en el Parque Nacional Santa Rosa, particularmente durante los eventos de sequía de la fase cálida del ENOS. De acuerdo con [Castro et al. \(2018\)](#), durante la estación seca del 2014 llovió un 30% menos de lo que normalmente llueve en la zona y esta reducción en la precipitación representó una reducción en la productividad primaria bruta del 13%. Por otra parte, la investigación de [Waring & Powers \(2016\)](#) en un bosque tropical seco de Costa Rica, demuestra que cambios relativamente moderados en la cantidad o en el momento de la precipitación pueden tener impactos desproporcionadamente grandes en el equilibrio del carbono del ecosistema, principalmente cuando la rehidratación del suelo se da luego de un periodo de sequía.

Al igual que la mayoría de las especies del bosque tropical seco, *S. capiri* presenta un alto grado de resistencia a los periodos de sequía; inclusive es capaz de retener sus hojas durante los meses más calientes de la estación seca (marzo y abril) ([García & Di Stéfano, 2005](#)). Sin embargo, sustituye sus hojas durante la época lluviosa o al final de ésta ([García & Di Stéfano, 2005](#)). Los autores también revelaron que el sistema radical del tempisque presenta una profundidad promedio menor comparada con otras especies arbóreas del BTS, principalmente por el lugar y tipo de suelo en que se encuentra y por la poca disponibilidad de agua subterránea. Esta característica del tempisque le permite al árbol aprovechar el agua de precipitaciones aisladas durante la época seca. Por lo tanto, en esta investigación se propone que, cuando las condiciones de baja disponibilidad de agua que se observan de manera consecutiva en las estaciones secas del 2013 y 2014 y en diciembre del 2014 cambian repentinamente con un aumento significativo en la lluvia reportada en enero del 2015, el tempisque podría incurrir en un aumento en la metilación de la citosina interna del ADN; es decir, el tempisque podría ser epigenéticamente sensible a la variación en el momento y cantidad de lluvia que se da durante la época seca ([Anexo 6.3](#)).

Las especies arbóreas pueden ser sensibles a cambios en la disponibilidad de agua, tal y como se observa en la publicación de [Liang et al. \(2014\)](#). En esta investigación se obtienen cambios en los niveles de metilación de las citosinas después de que *Populus trichocarpa* experimentara condiciones de estrés hídrico. De igual manera los autores [Correia et al. \(2016\)](#) demostraron que en las hojas de *Eucalyptus globulus* se dan numerosos cambios en la metilación cuando éstas están sometidas a condiciones de poca disponibilidad de agua. Además, la investigación de [Lafon-Placette et al. \(2017\)](#) demuestra que las variaciones en la disponibilidad de agua en el suelo inducen cambios en los niveles de metilación del ADN de *Populus × euramericana*; especialmente en genes involucrados en las vías de señalización del metabolismo de fitohormonas.

Con respecto a la variable temperatura, es importante notar que, a pesar de que se obtuvieron cambios significativos entre las temperaturas máximas y mínimas del 2005 y el 2015, los valores registrados por la EHM se encuentran dentro del rango óptimo fotosintético en el que los árboles del BTS llevan a cabo la fotosíntesis (29-32°C) ([Stan & Sanchez-Azofeifa, 2019](#)). Este hecho hace improbable que la variación epigenética observada en la población de Jabilla haya sido el resultado del cambio de temperatura en la zona. Sin embargo, como no es posible determinar una relación de causalidad entre el cambio epigenético y la fenología del tempisque y dado que el registro de los datos climatológicos de las estaciones automáticas data desde el 2004; no es posible descartar la posibilidad de que los porcentajes de metilación obtenidos en el 2005 estuvieran correlacionados con un cambio abiótico y/o biótico en años anteriores al muestreo.

Por otra parte, cabe resaltar que, en enero del 2015, las poblaciones de Liberia y Jabilla presentaron porcentajes de metilación de la citosina interna de más del doble al reportado en enero del 2005; lo que demuestra, que de manera sincrónica los individuos de tempisque incurrieron en una misma respuesta epigenética en el 2015 (aumento significativo en la metilación de la citosina interna) a pesar de tener una edad y trasfondo genético relativamente distintos. Asimismo, la magnitud de este cambio epigenético sugiere que el aumento en la metilación de la citosina interna no ocurrió por eventos

estocásticos, sino de manera dirigida. De acuerdo con [Bräutigam & Cronk \(2018\)](#), las plantas mantienen sus niveles de metilación del ADN relativamente estables a través de un sistema de monitoreo regulado por la glicosilasa ROS1. Mediante este sistema, la metilación global del ADN se encuentra vinculada con el nivel de metilación de la secuencia de monitoreo de la metilación del ADN (MEMS, por sus siglas en inglés), ubicada en el promotor del gen *ROS1*. La metilación del ADN se propaga hacia la secuencia MEMS cuando aumenta por encima de los niveles predeterminados por la célula. La presencia de esta marca epigenética sobre MEMS contribuye en la expresión de la demetilasa (ROS1) para restablecer los niveles de metilación del ADN celular previos al aumento ([Bräutigam & Cronk, 2018](#)). Por consiguiente, el aumento significativo en los niveles de metilación del ADN de *S. capiri* evidencia que el incremento no fue contenido por el sistema de monitoreo tipo MEMS ([Bräutigam & Cronk, 2018](#)); probablemente porque la magnitud de la señal (ambiental o genética) induce una respuesta epigenética que supera los niveles celulares de metilación preestablecidos en la célula. Otro factor a tomar en consideración es que la metilación es un proceso epigenético energéticamente costoso, pues las ADN metiltransferasas utilizan la S-adenosil-L-metionina (SAM) como donador del grupo metilo, como se indicó anteriormente ([Vriet et al., 2015](#)). La síntesis del SAM tiene un costo metabólico equivalente a 12 ATP por átomo de carbono. Esto lo hace uno de los componentes metabólicamente más costosos producidos por las plantas; especialmente si se compara con los 6 ATP necesarios para sintetizar una molécula de glucosa ([Moler et al., 2018](#)). El alto costo metabólico del SAM supone un escenario en el que en enero del 2015 debió haber existido una presión selectiva importante sobre el tempisque para que éste redirigiera el cofactor SAM a la adición de los grupos metilo a las citosinas del genoma. Por lo tanto, cuando se dan variaciones significativas en los niveles de metilación, como es el caso del tempisque, se puede suponer, con cierto grado de certeza, que el cambio no ocurrió de manera aleatoria, sino dirigida. En esta investigación, se sugiere que el cambio en los niveles de metilación de *S. capiri* es congruente con un mecanismo de respuesta del árbol ante las variaciones bióticas y climatológicas del entorno en que se desarrolla.

#### 4.4.2 Estabilidad epigenética en las poblaciones de *H. alchorneoides*

El análisis estadístico de las poblaciones de pilón reveló que no existen diferencias significativas entre los niveles globales de metilación del ADN obtenidos en el 2005 en comparación con los del 2015. Estos resultados evidencian que los cambios significativos en las variables climatológicas de precipitación y temperaturas máxima y mínima, de la Región del Pacífico Sur, no inducen una respuesta epigenética en el pilón.

[Zhang et al. \(2018\)](#), [Dhar et al. \(2019\)](#) y [Perrone & Martinelli \(2020\)](#) sugieren que la respuesta epigenética ante un cambio ambiental o estrés está determinada por el grado de sensibilidad y tolerancia de la planta a dichas variables y a la duración e intensidad del estímulo ambiental. A su vez, [Schulz et al. \(2014\)](#) proponen que cuando las condiciones temporales y espaciales del área permanecen relativamente estables, el componente epigenético de las poblaciones variará muy poco.

Contrario a las proyecciones realizadas por el IMN sobre los escenarios del cambio climático en Costa Rica ([Alvarado, 2012](#)), las condiciones climatológicas de las zonas muestreadas de la Región del Pacífico Sur se mantuvieron relativamente estables en la década del 2005 al 2015. Es muy probable, entonces, que los resultados obtenidos en las poblaciones de pilón de Mogos y Drake se deban a la escasa variación climatológica experimentada en enero del 2005 y 2015; es decir, las condiciones del tiempo parecen no haber sido lo suficientemente contrastantes para generar una respuesta epigenética en el pilón.

Los resultados obtenidos en la investigación de [Clark et al. \(2003\)](#), en los que se demuestra una relación negativa y significativa entre la temperatura mínima de la estación seca y la biomasa de 6 especies del bosque tropical húmedo en Costa Rica, propiciaron el análisis del registro de temperatura mínima diaria de los años anteriores a los años de colecta; sin embargo, los datos meteorológicos de la EFP revelan que la temperatura mínima de la zona no sólo tiende a disminuir entre el 2005 y el 2015 ([Anexo 7](#)) sino que la temperatura mínima diaria anual de los años anteriores al muestreo, es decir del 2004 y

del 2014, es igual ([IMN](#)). Por otra parte, al evaluar las temperaturas a las que estuvieron expuestos los individuos de pilón (21°C a 33°C) fueron muy cercanas al rango teórico que el pilón es capaz de tolerar (24°C a 32°C) ([Solís & Moya, 2004](#)) y se encuentran dentro del rango óptimo fotosintético (26-34°C) ([Clark, 2004](#)).

Otro factor a considerar es la diversidad genética que ha sido reportada para el pilón ([Villalobos, 2000](#)); la cual podría actuar de manera sinérgica con la diversidad epigenética como respuesta ante una perturbación ambiental. De acuerdo con las publicaciones de [Herrera & Bazaga \(2010\)](#), [Herrera & Bazaga \(2013\)](#), [Alfaro et al. \(2014\)](#) y [Medrano et al. \(2014\)](#), los altos niveles de diversidad genética, en conjunto con la diversidad epigenética, le permiten a las plantas explorar una amplia gama de nichos ecológicos, sin incurrir en cambios en los patrones globales de metilación del ADN.



#### **4.5 Análisis interpoblacional de *S. capiri* y *H. alchorneoides***

Los resultados obtenidos con el AMOVA revelan diferencias epigenéticas significativas entre cada una de las poblaciones de estudio tanto para el 2005 como para el 2015. En el caso del tempisque, al comparar la variación epigenética (MSL) de los individuos de Liberia y Jabilla, no se observa una clara separación interpoblacional, como sí ocurre en las poblaciones de pilón. Esto se evidencia en el alto grado de varianza en el componente epigenético de los individuos de Liberia muestreados en el 2005, en comparación con los del 2015. Como se mencionó anteriormente, este trabajo propone que la varianza epigenética observada entre los individuos de Liberia podría estar relacionada con la infección patogénica y los valores altos de humedad relativa promedio reportados por la ESE en el 2005. Esta propuesta está sustentada no sólo en la relación significativa entre el año de muestreo y la condición de metilación ( $\chi^2 = 15,9$ ,  $df=1$ ,  $p= 6,65e-05$ ); sino también en que el grado de correlación entre la distancia epigenética y geográfica cambia y es menor en el 2005 ( $r_M=0,70$ ,  $p<0,01$ ), en comparación con el 2015 ( $r_M=0,91$ ,  $p<0,01$ ). Estas observaciones indican que, no sólo la posición de la planta influye en el perfil epigenético del tempisque, sino que posiblemente también las condiciones ambientales a las que están expuestos los individuos. Según [Herrera et al. \(2017\)](#), las diferencias en las características ambientales de un lugar pueden llegar a ser igual o inclusive más importantes que el aislamiento por distancia para predecir la variación epigenética entre poblaciones conspecíficas. De acuerdo con [Schulz et al. \(2014\)](#), las condiciones climáticas pueden generar variaciones en el estado de metilación del ADN que impulsan los mecanismos de convergencia y / o divergencia de las poblaciones cuando éstas experimentan hábitats similares y diferentes, respectivamente.

En el caso de las poblaciones de la Región del Pacífico Sur, los PCoA de las distancias epigenéticas (MSL), entre los individuos de Mogos y Drake ([Fig.12](#)), muestran una clara separación según el sitio de muestreo a lo largo de ambas coordenadas (C1 y C2). Este hallazgo junto con la correlación positiva y significativa entre la distancia epigenética y la geográfica sugieren que la diversidad epigenética del pilón se encuentra

espacialmente estructurada según el sitio de muestreo. Tal y como afirma [Herrera & Bazaga \(2016b\)](#) es de esperar que el perfil epigenético de los individuos que se encuentran espacialmente más cercanos entre sí sea similar, en comparación con las plantas que se encuentran más alejadas; ya que, experimentan entornos semejantes.

Es importante recalcar, que no es posible descartar una posible correlación entre la distancia espacial y genética entre las plantas muestreadas, tal y como lo demostraron [Villalobos et al. \(2015\)](#). En esta investigación, los autores encontraron una correlación positiva y significativa entre la distancia geográfica de las poblaciones de tempisque de la zona de La Cruz (cercana al sitio de muestreo de Liberia) y Palo Verde (cercana al sitio de muestreo de Jabilla) y la diferenciación genética de estas poblaciones ( $r_M=0,76$ ;  $p=0,04$ ). De ser este el caso en las poblaciones analizadas en esta investigación, las diferencias observadas en la metilación a nivel interpoblacional podrían ser, en parte, consecuencia de diferentes genotipos reaccionando a su ambiente en diferentes formas epigenéticas ([Herrera & Bazaga, 2016a](#)).

#### 4.6 Diversidad epigenética de *S. capiri* y *H. alchorneoides*

Los índices de diversidad epigenética de Shannon, estimados para cada una de las poblaciones de *S. capiri* y *H. alchorneoides*, revelan que ésta es moderadamente alta ( $I_G \sim 0,58$ ) y que se mantiene relativamente estable, independientemente del año de muestreo. También, se observa que la diversidad epigenética del pilón es ligeramente mayor a la obtenida en las poblaciones de tempisque; especialmente si se compara con la obtenida en la población de Mogos. De acuerdo con [Carbó et al. \(2019\)](#), la importancia del valor estimado de la diversidad epigenética es relativo y depende, principalmente, del nivel de diversidad genética que posea una población. Estos autores argumentan que la diversidad epigenética es importante en poblaciones con bajos niveles de diversidad genética, pues la variación epigenética podría actuar de manera sinérgica con la variación genética natural y contribuir así en la plasticidad fenotípica y potencial adaptativo de las poblaciones ([Medrano et al., 2014](#); [Ma et al., 2018](#); [Carbó et al., 2019](#); [Miryeganeh & Saze, 2019](#)). En la investigación realizada por [Latzel et al. \(2013\)](#) y la revisión de literatura de [Richards et al. \(2017\)](#), se observa que las poblaciones que son epigenéticamente más diversas son más productivas y presentan una mayor capacidad de colonización que aquellas epigenéticamente uniformes.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la diversidad epigenética de ambas especies en estudio (pilón y tempisque) es mayor que su diversidad genética estimada. Este rasgo ( $I_E > I_G$ ) es característico de poblaciones naturales de plantas de especies no modelo ([Richards et al., 2017](#)) y se acentúa cuando el polimorfismo genético poblacional es bajo ([Medrano et al., 2020](#)) y dichas poblaciones se encuentran en hábitats con condiciones medioambientales contrastantes, por ejemplo: *Prunus mume* ( $I_E=0,57 > I_G=0,48$ ; [Ma et al., 2018](#)), *V. cazorlensis* ( $I_E=0,45 > I_G=0,20$ ; [Herrera & Bazaga, 2010](#)), *L. racemosa* ( $I_E=0,084 > I_G=0,013$ ;  $I_E=0,024 > I_G=0,008$ ; [Lira-Medeiros et al., 2010](#)), *Hordeum brevisubulatum* ( $I_E=0,47 > I_G=0,44$ ; [Guo et al., 2018](#)), *V. elatior* ( $I_E=0,23 > I_G=0,19$ ; [Schulz et al., 2014](#)). No obstante, es importante recalcar que los resultados obtenidos para el pilón y el tempisque deben ser analizados cuidadosamente ya

que, los valores estimados de diversidad genética se obtienen a partir de los NML y este valor es específico para cada población. Asimismo, tal y como ha sido previamente publicado por [Guo et al. \(2018\)](#), no es posible descartar la posibilidad de que algunos de los polimorfismos obtenidos puedan tener una base genética; es decir, que la diversidad epigenética observada esté siendo influenciada por la diversidad genética de cada especie. Esto es especialmente relevante en el caso de la población de Drake en la que se obtiene una correlación positiva y significativa entre los NML (diversidad genética) y los MLS (diversidad epigenética). Además, otro factor que podría estar influyendo, en menor medida, sobre los valores de la diversidad epigenética es la epimutación ([Vidalis et al., 2016](#)). En *A. thaliana*, la tasa de epimutación en el dinucleótido CG, por generación, es 5 órdenes de magnitud mayor ( $2,56 \times 10^{-4}$ ) que la tasa de mutación genética ( $7 \times 10^{-9}$ ) ([Van der Graaf et al., 2015](#)), lo que hace que los metilomas diverjan más rápidamente y en escalas de tiempo más cortas que los genomas.

La presente es la primera investigación de carácter epigenético en las poblaciones naturales de *S. capiri* y *H. alchorneoides* de las Regiones del Pacífico Norte y Sur de Costa Rica, respectivamente. Esta investigación amplía, por tanto, el rango filogenético en el que se han llevado a cabo hasta ahora la mayoría de las investigaciones en el campo epigenético/ecológico. Asimismo, es un punto de partida para futuras investigaciones sobre la diversidad epigenética de plantas tropicales.

## 5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- A Debido a que los individuos analizados en esta investigación pertenecen a poblaciones naturales, en donde no se controlan las variables medioambientales y genéticas, no es posible establecer una relación causal entre las variables climatológicas de la región y la variación en los niveles de metilación obtenidos.
- B El sesgo que presenta la metodología de MSAP, al sólo detectar los cambios en la metilación del tetranucleótido CCGG, hace que se subestime el nivel de metilación del ADN, pues no contempla la metilación en el contexto CHH.

## 6. CONCLUSIONES

- Las variables climatológicas de precipitación, temperatura (máxima y mínima) y de humedad relativa, de las Región del Pacífico Norte y Sur experimentaron cambios estadísticamente significativos entre enero del 2005 y enero del 2015; sin embargo, estos cambios no son de la magnitud esperada, según las proyecciones de cambio climático del IMN.
- El protocolo de extracción de ADN, modificado de [Sahu et al. \(2012\)](#), es idóneo para obtener ADN genómico con altos valores de pureza e integridad para llevar a cabo las reacciones de MSAP en las especies *S. capiri* y *H. alchorneoides*.
- Las combinaciones de imprimadores selectivos A (E+ACA y H/M+CAC), B (E+AAC y H/M+TCA) y C (E+ACA y H/M+TCA) permiten la detección de polimorfismos de metilación del ADN en pilón y tempisque.
- Al igual que en otras angiospermas, las poblaciones naturales de *S. capiri* e *H. alchorneoides* presentan una mayor regulación epigenética en el contexto CG en comparación con el contexto CHG.
- Las poblaciones de *H. alchorneoides* presentan un alto grado de estabilidad en la estructura epigenética, al comparar los años 2005 y 2015, a pesar de la intensidad y duración del cambio ambiental e independientemente del año de muestreo (2005-2015); probablemente porque el estímulo ambiental se encuentra dentro del rango de tolerancia de la planta.
- Las poblaciones de Liberia y Jabilla (tempisque) exhiben un aumento significativo en los niveles de metilación del ADN en la citosina interna entre el 2005 y el 2015;

posiblemente por niveles de humedad relativa (%) anormalmente bajos y valores de precipitación bajos, respectivamente, en enero del 2005.

- Es sumamente complejo determinar la contribución del factor ambiental sobre la variación de la metilación del ADN en poblaciones naturales de especies silvestres dada la naturaleza dinámica de la metilación del ADN y la relación de ésta con la variación genética.

## 7. RECOMENDACIONES

- ❖ Para determinar, de manera concluyente, si la variación en los factores climatológicos incide sobre la variación epigenética de los árboles, se recomienda llevar a cabo experimentos en cámaras de crecimiento o en invernaderos con control de las variables genéticas y ambientales.
  
- ❖ Se sugiere realizar investigaciones enfocadas en la caracterización de los fragmentos MSL polimórficos obtenidos mediante la técnica del MSAP. Estos fragmentos podrían revelar secuencias genómicas involucradas en el mantenimiento de la regulación homeostática de los árboles, bajo distintas condiciones climatológicas.
  
- ❖ Se recomienda determinar si la variación epigenética altera la expresión génica de *S. capiri* y *H. alchorneoides* y de ser así, analizar si esta variación se relaciona con la regulación de los rasgos fenotípicos de los árboles.

Las recomendaciones anteriores están dirigidas a descifrar el grado de contribución que tiene la metilación del ADN en la respuesta adaptativa de las plantas; específicamente bajo condiciones climatológicamente cambiantes. Esta recomendación es de especial importancia para investigar las especies del Trópico que son las más afectadas por el cambio climático.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albaladejo, R. G., Parejo-Farnés, C., Rubio-Pérez, E., Nora, S., & Aparicio, A. (2019). Linking DNA methylation with performance in a woody plant species. *Tree Genetics & Genomes*, *15*(2), 15. doi: 10.1007/s11295-019-1325-x.
- Alfaro, R. I., Fady, B., Vendramin, G. G., Dawson, I. K., Fleming, R. A., Sáenz-Romero, C., ... & Skrøppa, T. (2014). The role of forest genetic resources in responding to biotic and abiotic factors in the context of anthropogenic climate change. *Forest Ecology and Management*, *333*, 76-87. doi: 10.1016/j.foreco.2014.04.006.
- Alonso, C., Medrano, M., Pérez, R., Canto, A., Parra-Tabla, V., & Herrera, C. M. (2019). Interspecific variation across angiosperms in global DNA methylation: phylogeny, ecology and plant features in tropical and Mediterranean communities. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.16046.
- Alonso, C., Pérez, R., Bazaga, P., & Herrera, C. M. (2015). Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms. *Frontiers in Genetics*, *6*, 4. doi:10.3389/fgene.2015.00004.
- Alonso, C., Pérez, R., Bazaga, P., Medrano, M., & Herrera, C. M. (2014). Individual variation in size and fecundity is correlated with differences in global DNA cytosine methylation in the perennial herb *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae). *American journal of botany*, *101*(8), 1309-1313. doi: 10.3732/ajb.1400126.
- Alonso, C., Pérez, R., Bazaga, P., Medrano, M., & Herrera, C. M. (2016). MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. *Molecular ecology resources*, *16*(1), 80-90. doi: 10.1111/1755-0998.12426.
- Alvarado Cerdas, A. (2016). *Evaluación de ensayos clonales de Hieronyma alchorneoides, en la Zona Norte de Costa Rica*. (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago.
- Alvarado, L. F., Contreras, W., Alfaro, M., & Jiménez, E. (2012). *Escenarios de cambio climático regionalizados para Costa Rica*. San José, CR: Instituto Meteorológico Nacional.
- Anderegg, W. R., Hicke, J. A., Fisher, R. A., Allen, C. D., Aukema, J., Bentz, B., ... & Pan, Y. (2015). Tree mortality from drought, insects, and their interactions in a changing climate. *New Phytologist*, *208*(3), 674-683. doi: 10.1111/nph.13477.
- Angers, B., Perez, M., Menicucci, T., & Leung, C. (2020). Sources of epigenetic variation and their applications in natural populations. *Evolutionary Applications*. 00:1–17 doi: 10.1111/eva.12946.
- Araya, E., Murillo, O., Aguilar, G., & Rocha, O. (2005). A DNA extraction protocol and initial primers screening in *Hieronima alchorneoides* Fr. All. for AFLP applications. *Foresta Veracruzana*, *7*(1).
- Avramidou, E. V., Doulis, A. G., & Aravanopoulos, F. A. (2015a). Determination of epigenetic inheritance, genetic inheritance, and estimation of genome DNA methylation in a full-sib family of *Cupressus sempervirens* L. *Gene*, *562*(2), 180-187. doi: 10.1016/j.gene.2015.02.068.
- Avramidou, E. V., Ganopoulos, I. V., Doulis, A. G., Tsaftaris, A. S., & Aravanopoulos, F. A. (2015b). Beyond population genetics: natural epigenetic variation in wild cherry (*Prunus avium*). *Tree genetics & genomes*, *11*(5), 95. doi: 10.1007/s11295-015-0921-7.

- Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., ... & Xiao, W. (2018). Dynamic DNA methylation in plant growth and development. *International journal of molecular sciences*, *19*(7), 2144. doi: 10.3390/ijms19072144.
- Bednarek, P. T., Orłowska, R., & Niedziela, A. (2017). A relative quantitative Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) method for the analysis of abiotic stress. *BMC plant biology*, *17*(1), 79. doi: 10.1186/s12870-017-1028-0.
- Begcy, K., & Dresselhaus, T. (2018). Epigenetic responses to abiotic stresses during reproductive development in cereals. *Plant reproduction*, *31*(4), 343-355. doi: 10.1007/s00497-018-0343-4.
- Bewick, A. J., & Schmitz, R. J. (2017). Gene body DNA methylation in plants. *Current opinion in plant biology*, *36*, 103-110. doi: doi.org/10.1016/j.pbi.2016.12.007.
- BIOMARCC-SINAC-GIZ. 2013. *Estimación de los posibles cambios en la distribución de especies de flora arbórea en el Pacífico Norte y Sur de Costa Rica en respuesta a los efectos del cambio climático*. San José, Costa Rica. 48 págs.
- Brandt, M., Hiernaux, P., Rasmussen, K., Tucker, C. J., Wigneron, J. P., Diouf, A. A., ... & Abel, C. (2019). Changes in rainfall distribution promote woody foliage production in the Sahel. *Communications biology*, *2*(1), 133. doi: 10.1038/s42003-019-0383-9.
- Bräutigam, K., & Cronk, Q. (2018). DNA methylation and the evolution of developmental complexity in plants. *Frontiers in Plant Science*, *9*:1447. doi: 10.3389/fpls.2018.01447.
- Bräutigam, K., Vining, K. J., Lafon-Placette, C., Fossdal, C. G., Mirouze, M., Marcos, J. G., ... & Johnsen, Ø. (2013). Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution*, *3*(2), 399-415. doi: 10.1002/ece3.461.
- Carbó, M., Iturra, C., Correia, B., Colina, F. J., Meijón, M., Álvarez, J. M., ... & Valledor, L. (2019). Epigenetics in Forest Trees: Keep Calm and Carry On. In *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications* (pp. 381-403). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-030-14760-0\_15.
- Castro, S. M., Sanchez-Azofeifa, G. A., & Sato, H. (2018). Effect of drought on productivity in a Costa Rican tropical dry forest. *Environmental Research Letters*, *13*(4), 045001. doi: 10.1088/1748-9326/aaacbc.
- Chavarría-Espinoza, M.I. (2017). *Reporte Estadístico Forestal 2014-2015*. (Sistema de Información de los Recursos Forestales, SIREFOR). San José: Costa Rica. Recuperado de: [http://www.sirefor.go.cr/?wpfb\\_dl=15](http://www.sirefor.go.cr/?wpfb_dl=15).
- Ci, D., Song, Y., Du, Q., Tian, M., Han, S., & Zhang, D. (2015). Variation in genomic methylation in natural populations of *Populus simonii* is associated with leaf shape and photosynthetic traits. *Journal of experimental botany*, *67*(3), 723-737. doi: 10.1093/jxb/erv485.
- Clark, D. A. (2004). Sources or sinks? The responses of tropical forests to current and future climate and atmospheric composition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *359*(1443), 477-491. doi: 10.1098/rstb.2003.1426.
- Clark, D. A., Clark, D. B., & Oberbauer, S. F. (2013). Field-quantified responses of tropical rainforest aboveground productivity to increasing CO<sub>2</sub> and climatic stress, 1997–2009. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, *118*(2), 783-794. doi:10.1002/jgrg.20067.

- Clark, D. A., Piper, S. C., Keeling, C. D., & Clark, D. B. (2003). Tropical rain forest tree growth and atmospheric carbon dynamics linked to interannual temperature variation during 1984–2000. *Proceedings of the national academy of sciences*, *100*(10), 5852-5857. doi:10.1073/pnas.0935903100.
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). (2009). *Cambio climático y desarrollo en América Latina y el Caribe*. Naciones Unidas, Santiago de Chile, Chile. Recuperado de: [https://www.unicef.org/lac/cambio\\_climatico\\_y\\_desarrollo\\_en\\_ALC.pdf](https://www.unicef.org/lac/cambio_climatico_y_desarrollo_en_ALC.pdf).
- Comité Regional de Recursos Hidráulicos (CRRH). (2008). Proyecto Segunda Comunicación sobre Cambio Climático en Costa Rica: El clima, su variabilidad y cambio climático en Costa Rica. San José, CR.
- Correia, B., Valledor, L., Hancock, R. D., Jesus, C., Amaral, J., Meijón, M., & Pinto, G. (2016). Depicting how *Eucalyptus globulus* survives drought: involvement of redox and DNA methylation events. *Functional Plant Biology*, *43*(9), 838-850. doi: /10.1071/FP16064.
- Correia, B., Valledor, L., Meijón, M., Rodríguez, J. L., Dias, M. C., Santos, C., ... & Pinto, G. (2013). Is the interplay between epigenetic markers related to the acclimation of cork oak plants to high temperatures?. *PLoS One*, *8*(1), e53543. doi: doi:10.1371/journal.pone.0053543.
- Dhar, M. K., Sharma, R., Vishal, P., & Kaul, S. (2019). Epigenetic Response of Plants to Abiotic Stress: Nature, Consequences and Applications in Breeding. In *Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches, Vol. I* (pp. 53-72). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-91956-0\_3.
- Di Stéfano, J. F., & García, E. (2000). Germinación y desarrollo radicular de tempisque (*Sideroxylon capiri*) a diferentes temperaturas. *Agronomía Costarricense*, *24*(1), 93-97.
- Dietrich, L., & Kahmen, A. (2019). Water relations of drought-stressed temperate trees benefit from short drought-intermittent rainfall events. *Agricultural and forest meteorology*, *265*, 70-77. doi: 10.1016/j.agrformet.2018.11.012.
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., ... & Ecker, J. R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(32), E2183-E2191. doi: 10.1073/pnas.1209329109.
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., & Patel, D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature reviews molecular cell biology*, *16*(9), 519-532. doi: 10.1038/nrm4043.
- Elhamamsy, A. R. (2016). DNA methylation dynamics in plants and mammals: overview of regulation and dysregulation. *Cell biochemistry and function*, *34*(5), 289-298. doi: 10.1002/cbf.3183.
- FAO, 2015. Global Forest Resources Assessment 2015, Desk reference. Rome, Italy.
- Fonseca, W., Alice, F. E., Montero, J., Toruño, H., & Leblanc, H. (2008). Acumulación de biomasa y carbono en bosques secundarios y plantaciones forestales de *Vochysia guatemalensis* e *Hieronyma alchorneoides* en el Caribe de Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*, *46*, 57-64. Foust, C. M., Preite, V., Schrey, A. W., Alvarez, M., Robertson, M. H., Verhoeven, K. J. F., & Richards, C. L. (2016). Genetic and epigenetic differences associated with environmental gradients in replicate populations of two salt marsh perennials. *Molecular ecology*, *25*(8), 1639-1652. doi: 10.1111/mec.13522.

- Fulneček, J., & Kovařík, A. (2014). How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles?. *BMC genetics*, *15*(1), 2. doi: 10.1186/1471-2156-15-2.
- García, E. G., & Di Stéfano, J. F. (2005). Fenología de árbol *Sideroxylon capiri* (Sapotaceae) en el bosque seco tropical de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, *53*(1-2), 05-14.
- Grativol, C., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2012). Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(2), 176-185. doi: 10.1016/j.bbagrm.2011.08.010.
- Gugger, P. F., Fitz-Gibbon, S., PellEgrini, M., & Sork, V. L. (2016). Species-wide patterns of DNA methylation variation in *Quercus lobata* and their association with climate gradients. *Molecular Ecology*, *25*(8), 1665-1680. doi: 10.1111/mec.13563.
- Guo, W. A. N. L. I., Hussain, N. A. Z. I. M., Wu, R. U. I., & Liu, B. A. O. (2018). High hypomethylation and epigenetic variation in fragmented populations of wild barley (*Hordeum brevisubulatum*). *Pak J Bot*, *50*, 1379-1386.
- Herrera, C. M., & Bazaga, P. (2010). Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. *New Phytologist*, *187*(3), 867-876. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03298.x.
- Herrera, C. M., & Bazaga, P. (2011). Untangling individual variation in natural populations: ecological, genetic and epigenetic correlates of long-term inequality in herbivory. *Molecular ecology*, *20*(8), 1675-1688. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05026.x.
- Herrera, C. M., & Bazaga, P. (2013). Epigenetic correlates of plant phenotypic plasticity: DNA methylation differs between prickly and nonprickly leaves in heterophyllous *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae) trees. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *171*(3), 441-452. doi:10.1111/boj.12007.
- Herrera, C. M., & Bazaga, P. (2016a). Genetic and epigenetic divergence between disturbed and undisturbed subpopulations of a Mediterranean shrub: A 20-year field experiment. *Ecology and evolution*, *6*(11), 3832-3847. doi: 10.1002/ece3.2161.
- Herrera, C. M., Alonso, C., Medrano, M., Pérez, R., & Bazaga, P. (2018). Transgenerational epigenetics: Inheritance of global cytosine methylation and methylation-related epigenetic markers in the shrub *Lavandula latifolia*. *American journal of botany*, *105*(4), 741-748. doi: 10.1002/ajb2.1074.
- Herrera, C. M., Medrano, M., & Bazaga, P. (2016b). Comparative spatial genetics and epigenetics of plant populations: heuristic value and a proof of concept. *Molecular ecology*, *25*(8), 1653-1664.
- Herrera, C. M., Medrano, M., & Bazaga, P. (2017). Comparative epigenetic and genetic spatial structure of the perennial herb *Helleborus foetidus*: Isolation by environment, isolation by distance, and functional trait divergence. *American Journal of Botany*. doi: 10.3732/ajb.1700162.
- How-Kit, A., Teyssier, E., Deleuze, J. F., & Gallusci, P. (2017). Locus-Specific DNA Methylation Analysis and Applications to Plants. In *Plant Epigenetics* (pp. 303-327). Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-55520-1\_16.

- Huang, S. S. C., & Ecker, J. R. (2018). Piecing together cis-regulatory networks: insights from epigenomics studies in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 10(3), e1411. doi: 10.1002/wsbm.1411.
- Huang, X., Li, S., Ni, P., Gao, Y., Jiang, B., Zhou, Z., & Zhan, A. (2017). Rapid response to changing environments during biological invasions: DNA methylation perspectives. *Molecular ecology*, 26(23), 6621-6633. doi: 10.1111/mec.14382.
- Huntingford, C., Zelazowski, P., Galbraith, D., Mercado, L. M., Sitch, S., Fisher, R., ... & Malhi, Y. (2013). Simulated resilience of tropical rainforests to CO<sub>2</sub>-induced climate change. *Nature Geoscience*, 6(4), 268-273. doi: 10.1038/ngeo1741.
- Inácio, V., Barros, P. M., Costa, A., Roussado, C., Gonçalves, E., Costa, R., ... & Morais-Cecílio, L. (2017). Differential DNA Methylation Patterns Are Related to Phellogen Origin and Quality of *Quercus suber* Cork. *PLoS one*, 12(1), e0169018. doi: 10.1371/journal.pone.0169018.
- Instituto Meteorológico Nacional (IMN). Página de internet consultada: <https://www.imn.ac.cr/publicaciones>.
- IPCC, 2014. *Cambio climático 2014: Impactos, adaptación y vulnerabilidad. Resúmenes, preguntas frecuentes y recuadros multicapítulos*. Contribución del Grupo de trabajo II al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea y L.L. White (eds.)]. Organización Meteorológica Mundial, Ginebra (Suiza), 200 pp.
- Jia, L. C., Hong, Z. H. A. I., He, S. Z., Yang, Y. F., & Liu, Q. C. (2017). Analysis of drought tolerance and genetic and epigenetic variations in a somatic hybrid between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and *I. triloba* L. *Journal of integrative agriculture*, 16(1), 36-46. doi: 10.1016/S2095-3119(16)61359-X.
- Jiménez, Q. 1999. *Árboles maderables en peligro de extinción en Costa Rica*. Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).
- Jiménez, Q., Rojas, F.E., Rojas, V., & Rodríguez, L. (2011). *Árboles maderables de Costa Rica: Ecología y silvicultura*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).
- Keller, T. E., Lasky, J. R., & Yi, S. V. (2016). The multivariate association between genome-wide DNA methylation and climate across the range of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular ecology*. doi: 10.1111/mec.13573.
- Kovalchuk, I. (2018). Role of Epigenetics in Transgenerational Changes: Genome Stability in Response to Plant Stress. In *Memory and Learning in Plants* (pp. 79-109). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-75596-0\_5.
- Kumar, S., Kumari, R., Sharma, V., & Sharma, V. (2013). Roles, and establishment, maintenance and erasing of the epigenetic cytosine methylation marks in plants. *Journal of genetics*, 92(3), 629-666. doi: 10.1007/s12041-013-0273-8.

- Lafon-Placette, C., Le Gac, A. L., Chauveau, D., Segura, V., Delaunay, A., Lesage-Descauses, M. C., ... & Bogeat-Triboulot, M. B. (2017). Changes in the epigenome and transcriptome of the poplar shoot apical meristem in response to water availability affect preferentially hormone pathways. *Journal of experimental botany*, *69*(3), 537-551. doi: 10.1093/jxb/erx409.
- Latzel, V. I. T., Allan, E., Silveira, A. B., Colot, V., Fischer, M., & Bossdorf, O. (2013). Epigenetic diversity increases the productivity and stability of plant populations. *Nature communications*, *4*, 2875.
- Liang, D., Zhang, Z., Wu, H., Huang, C., Shuai, P., Ye, C. Y., ... & Yin, W. (2014, December). Single-base-resolution methylomes of *Populus trichocarpa* reveal the association between DNA methylation and drought stress. In *BMC genetics* (Vol. 15, No. 1, p. S9). BioMed Central. doi:10.1186/1471-2156-15-S1-S9.
- Lira-Medeiros, C. F., Parisod, C., Fernandes, R. A., Mata, C. S., Cardoso, M. A., & Ferreira, P. C. G. (2010). Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment. *PLoS One*, *5*(4), e10326. doi: 10.1371/journal.pone.0010326.
- Liu, R., & Lang, Z. (2020). The mechanism and function of active DNA demethylation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *62*(1), 148-159. doi: 10.1111/jipb.12879.
- Ma, K., Song, Y., Yang, X., Zhang, Z., & Zhang, D. (2013). Variation in genomic methylation in natural populations of Chinese white poplar. *PLoS one*, *8*(5), e63977. doi:10.1371/journal.pone.0063977.
- Ma, K., Sun, L., Cheng, T., Pan, H., Wang, J., & Zhang, Q. (2018). Epigenetic variance, performing cooperative structure with genetics, is associated with leaf shape traits in widely distributed populations of ornamental tree *Prunus mume*. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 41. doi: 10.3389/fpls.2018.00041.
- Mastan, S. G., Rathore, M. S., Bhatt, V. D., Yadav, P., & Chikara, J. (2012). Assessment of changes in DNA methylation by methylation-sensitive amplification polymorphism in *Jatropha curcas L.* subjected to salinity stress. *Gene*, *508*(1), 125-129. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.063.
- Medrano, M., Alonso, C., Bazaga, P., López, E., & Herrera, C. M. (2020). Comparative genetic and epigenetic diversity in pairs of sympatric, closely-related plants with contrasting distribution ranges in southeastern Iberian mountains. *AOB PLANTS*, plaa013. doi:10.1093/aobpla/plaa013.
- Medrano, M., Herrera, C. M., & Bazaga, P. (2014). Epigenetic variation predicts regional and local intraspecific functional diversity in a perennial herb. *Molecular ecology*, *23*(20), 4926-4938. doi: 10.1111/mec.12911.
- Miryeganeh, M., & Saze, H. (2019). Epigenetic inheritance and plant evolution. *Population Ecology*. doi: 10.1002/1438-390X.12018.
- Moler, E. R., Abakir, A., Eleftheriou, M., Johnson, J. S., Krutovsky, K. V., Lewis, L. C., ... & Rajora, O. P. (2018). Population Epigenomics: Advancing Understanding of Phenotypic Plasticity, Acclimation, Adaptation and Diseases. In *Population Genomics* (pp. 179-260). Springer, Cham. doi: 10.1007/13836\_2018\_59.
- Montero, M., De los Santos, H. & Kanninen, M. (2007) *Hyeronima alchorneoides: Ecología y silvicultura en Costa Rica*. Turrialba: CATIE. pp. 6-13.
- Moradi, N., Rezaei, A., Bahramnejad, B., & Goodwin, P. H. (2019). Methylation-sensitive amplified polymorphism analysis of resistant and susceptible interactions of cucumber with *Podosphaera xanthii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *106*, 64-73. doi: 10.1016/j.pmp.2018.12.006.

- Niederhuth, C. E., & Schmitz, R. J. (2017). Putting DNA methylation in context: from genomes to gene expression in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(1), 149-156. doi: 10.1016/j.bbagrm.2016.08.009.
- Niederhuth, C. E., Bewick, A. J., Ji, L., Alabady, M. S., Do Kim, K., Li, Q., ... & Egesi, C. (2016). Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. *Genome biology*, 17(1), 194. doi: 10.1186/s13059-016-1059-0.
- Parmesan, C., & Hanley, M. E. (2015). Plants and climate change: complexities and surprises. *Annals of botany*, 116(6), 849-864. doi: 10.1093/aob/mcv169.
- Pei, L., Zhang, L., Li, J., Shen, C., Qiu, P., Tu, L., ... & Wang, M. (2019). Tracing the origin and evolution history of methylation-related genes in plants. *BMC plant biology*, 19(1), 307. doi: 10.1186/s12870-019-1923-7.
- Pérez-Figueroa, A. (2013). msap: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. *Molecular ecology resources*, 13(3), 522-527. doi: 10.1111/1755-0998.12064.
- Perrone, A., & Martinelli, F. (2020). Plant stress biology in epigenomic era. *Plant Science*, 294, 110376. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110376.
- Portis, E., Acquadro, A., Comino, C., & Lanteri, S. (2004). Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science*, 166(1), 169-178. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.09.004.
- Rathore, M. S., Mastan, S. G., & Agarwal, P. K. (2015). Evaluation of DNA methylation using methylation-sensitive amplification polymorphism in plant tissues grown *in vivo* and *in vitro*. *Plant growth regulation*, 75(1), 11-19. doi: 10.1007/s10725-014-9926-8.
- Reyna-Lopez, G. E., Simpson, J., & Ruiz-Herrera, J. (1997). Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and General Genetics MGG*, 253(6), 703-710. doi: 10.1007/s004380050374.
- Richards, C. L., Alonso, C., Becker, C., Bossdorf, O., Bucher, E., Colomé-Tatché, M., ... & Grosse, I. (2017). Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. *Ecology Letters*, 20(12), 1576-1590. doi: 10.1111/ele.12858.
- Richards, E. J. (2006). Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7(5), 395. doi:10.1038/nrg1834.
- Rico, L., Ogaya, R., Barbeta, A., & Penuelas, J. (2014). Changes in DNA methylation fingerprint of *Quercus ilex* trees in response to experimental field drought simulating projected climate change. *Plant Biology*, 16(2), 419-427. doi:10.1111/plb.12049.
- Rodríguez Justavino, D. (2001). *Identificación y determinación de un patógeno fungoso foliar en Sideroxylon capiri subsp. tempisque (Tempisque-Sapotaceae), en el Parque Nacional Barra Honda, provincia de Guanacaste, Costa Rica.* (Tesis inédita de Maestría). Universidad de Costa Rica, San Pedro Montes de Oca, C.R.
- Sáez-Laguna, E., Guevara, M. Á., Díaz, L. M., Sánchez-Gómez, D., Collada, C., Aranda, I., & Cervera, M. T. (2014). Epigenetic variability in the genetically uniform forest tree species *Pinus pinea* L. *PLOS one*, 9(8), e103145. doi: 10.1371/journal.pone.0103145.

- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012. doi:10.5402/2012/205049.
- Sánchez, M. A. (2005). Boletín Meteorológico Mensual Enero 2005. Recuperado de: <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/14621/ENERO>.
- Schippers, P., Sterck, F., Vlam, M., & Zuidema, P. A. (2015). Tree growth variation in the tropical forest: understanding effects of temperature, rainfall and CO<sub>2</sub>. *Global change biology*, 21(7), 2749-276. doi: 10.1111/gcb.12877.
- Schrey, A. W., Alvarez, M., Foust, C. M., Kilvitis, H. J., Lee, J. D., Liebl, A. L., ... & Robertson, M. (2013). Ecological epigenetics: beyond MS-AFLP. *Integrative & Comparative Biology*, 53 (2), 340-350. doi: 10.1093/icb/ict012.
- Schulz, B., Eckstein, R. L., & Durka, W. (2014). Epigenetic variation reflects dynamic habitat conditions in a rare floodplain herb. *Molecular ecology*, 23(14), 3523-3537. doi:10.1111/mec.12835.
- Secco, D., Wang, C., Shou, H., Schultz, M. D., Chiarenza, S., Nussaume, L., ... & Lister, R. (2015). Stress induced gene expression drives transient DNA methylation changes at adjacent repetitive elements. *Elife*, 4, e09343. doi: 10.5061/dryad.40gd6.
- Seymour, D. K., & Gaut, B. S. (2020). Phylogenetic shifts in gene body methylation correlate with gene expression and reflect trait conservation. *Molecular Biology and Evolution*, 37(1), 31-43. doi: 10.1093/molbev/msz195.
- SINAC. 2018. *Zonificación forestal de Costa Rica y estado Poblacional de especies forestales, basado en el Inventario Nacional Forestal e instrumentos de monitoreo y manejo de bosques naturales*. San José, Costa Rica, 277 págs.
- Solano, E. (2015). Boletín Meteorológico Mensual Enero 2015. Recuperado de: <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/14641/ENERO>.
- Solís, M., & R. Moya. 2004. *Hyeronima alchorneoides* en Costa Rica. Fondo Nacional de Financiamiento Forestal. Ministerio de Energía y Minas. Gobierno de Costa Rica. 106 p.
- Sow, M. D., Allona, I., Ambroise, C., Conde, D., Fichot, R., Gribkova, S., ... & Salse, J. (2018). Epigenetics in forest trees: state of the art and potential implications for breeding and management in a context of climate change. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 88, pp. 387-453). Academic Press. doi: 10.1016/bs.abr.2018.09.003.
- Stan, K., & Sanchez-Azofeifa, A. (2019). Tropical Dry Forest Diversity, Climatic Response, and Resilience in a Changing Climate. *Forests*, 10(5), 443. doi :10.3390/f10050443.
- Sudan, J., Raina, M., & Singh, R. (2018). Plant epigenetic mechanisms: role in abiotic stress and their generational heritability. *3 Biotech*, 8(3), 172. doi: 10.1007/s13205-018-1202-6.
- Takuno, S., Ran, J. H., & Gaut, B. S. (2016). Evolutionary patterns of genic DNA methylation vary across land plants. *Nature Plants*, 2(2), 15222. doi: 10.1038/NPLANTS.2015.222.
- The Comprehensive Enzyme Information System (BRENDA; <http://www.brenda-enzymes.org/>).
- Tirnaz, S., & Batley, J. (2019). DNA Methylation: Toward crop disease resistance improvement. *Trends in plant science*. 24 (12), 1137-1150. doi: 10.1016/j.tplants.2019.08.007.



- Tricker, P. J., Gibbings, J. G., Rodríguez López, C. M., Hadley, P., & Wilkinson, M. J. (2012). Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *Journal of experimental botany*, *63*(10), 3799-3813. doi: 10.1093/jxb/ers076.
- Valverde-Cerdas, L., Rojas-Vargas, A., Hine-Gómez, A., & Azofeifa-Bolaños, J. (2013). Formación de embriones somáticos en *Hyeronima alchorneoides* Allemao a partir de embriones cigóticos. *Biotechnología Vegetal*, *13*(4).
- Van Der Graaf, A., Wardenaar, R., Neumann, D. A., Taudt, A., Shaw, R. G., Jansen, R. C., ... & Johannes, F. (2015). Rate, spectrum, and evolutionary dynamics of spontaneous epimutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(21), 6676-6681. doi: 10.1073/pnas.1424254112.
- Vanden Broeck, A., Cox, K., Brys, R., Castiglione, S., Ciatelli, A., Guarino, F., ... & Vander Mijnsbrugge, K. (2018). Variability in DNA methylation and generational plasticity in the Lombardy poplar, a single genotype worldwide distributed since the 18th century. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1635. doi: 10.3389/fpls.2018.01635.
- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M., & Roldan-Ruiz, I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasmy and of a relationship between degree of homoplasmy and fragment size. *Molecular ecology*, *11*(1), 139-151. doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01415.x.
- Vidalis, A., Živković, D., Wardenaar, R., Roquis, D., Tellier, A., & Johannes, F. (2016). Methylome evolution in plants. *Genome Biology*, *17*(1), 264. doi: 10.1186/s13059-016-1127-5.
- Viejo, M., Santamaría, M. E., Rodríguez, J. L., Valledor, L., Meijón, M., Pérez, M., ... & Toorop, P. E. (2012). Epigenetics, the role of DNA methylation in tree development. *Plant Cell Culture Protocols*, 277-301. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4\_22.
- Villalobos-Barrantes, H. M. (2000). *Análisis genético molecular de tres valiosas especies nativas maderables de Costa Rica*. (Tesis de Maestría). Universidad de Costa Rica, San José.
- Villalobos-Barrantes, H. M., García, E. G., Lowe, A. J., & Albertazzi, F. J. (2015). Genetic analysis of the dry forest timber tree *Sideroxylon capiri* in Costa Rica using AFLP. *Plant systematics and evolution*, *301*(1), 15-23. doi: 10.1007/s00606-014-1049-1.
- Vriet, C., Hennig, L., & Laloi, C. (2015). Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement. *Cellular and molecular life sciences*, *72*(7), 1261-1273. doi: 10.1007/s00018-014-1792-z.
- Walter, J., Jentsch, A., Beierkuhnlein, C., & Kreyling, J. (2013). Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. *Environmental and Experimental Botany*, *94*, 3-8. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.02.009.
- Waring, B. G., & Powers, J. S. (2016). Unraveling the mechanisms underlying pulse dynamics of soil respiration in tropical dry forests. *Environmental Research Letters*, *11*(10). doi:10.1088/1748-9326/11/10/105005.

- Xu, X., Medvigy, D., Trugman, A. T., Guan, K., Good, S. P., & Rodriguez-Iturbe, I. (2018). Tree cover shows strong sensitivity to precipitation variability across the global tropics. *Global ecology and biogeography*, 27(4), 450-460. doi: 10.1111/geb.12707.
- Yadav, C. B., Pandey, G., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2018). Epigenetics and epigenomics of plants. In *Plant Genetics and Molecular Biology* (pp. 237-261). Springer, Cham. doi: 10.1007/10\_2017\_51.
- Yaish, M. W., Peng, M., & Rothstein, S. J. (2014). Global DNA methylation analysis using methyl-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Arabidopsis protocols*, 285-298. doi: 10.1007/978-1-62703-580-4\_16.
- Yu, Y., Yang, X., Wang, H., Shi, F., Liu, Y., Liu, J., ... & Liu, B. (2013). Cytosine methylation alteration in natural populations of *Leymus chinensis* induced by multiple abiotic stresses. *PloS one*, 8(2). doi: 10.1371/journal.pone.0055772.
- Zhang, H., Lang, Z., & Zhu, J. K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 489. doi: 10.1038/s41580-018-0016-z.
- Zhang, M., Kimatu, J. N., Xu, K., & Liu, B. (2010). DNA cytosine methylation in plant development. *Journal of Genetics and Genomics*, 37(1), 1-12. doi: 10.1016/S1673-8527(09)60020-5.
- Zhang, W., Brandt, M., Penuelas, J., Guichard, F., Tong, X., Tian, F., & Fensholt, R. (2019). Ecosystem structural changes controlled by altered rainfall climatology in tropical savannas. *Nature communications*, 10(1), 671. doi: 10.1038/s41467-019-08602-6.
- Zoldoš, V., Biruš, I., Muratović, E., Šatović, Z., Vojta, A., Robin, O., ... & Siljak-Yakovlev, S. (2018). Epigenetic differentiation of natural populations of *Lilium bosniacum* associated with contrasting habitat conditions. *Genome biology and evolution*, 10(1), 291-303. doi: 10.1093/gbe/evy010.

## 9. ANEXOS



**Figura. 13.** Sitios de colecta del material foliar de *Sideroxylon capiri* (1 y 2) e *Hyeronima alchorneoides* (3 y 4). El número 1 corresponde al sitio de colecta de Liberia (n=9), el número 2 a Jabilla (n=9), el número 3 a Drake (n=9) y el número 4 a Mogos (n=14).

**Cuadro 4.** Secuencias de los adaptadores e imprimadores utilizados en el MSAP para las reacciones de ligación y pre-amplificación.

<b>Tipo de secuencia</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>
<i>Adaptadores</i>	
<i>EcoRI</i> -adaptadorI	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>EcoRI</i> -adaptadorII	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
<i>H/M</i> -adaptadorI	5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'
<i>H/M</i> -adaptadorII	5'-CGAGCAGGACTCATGA-3'
<i>Imprimadores</i>	
<i>EcoRI</i> +0	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>H/M</i> +0	5'-TCATGAGTCCTGCTCGG-3'

**Cuadro 5.** Combinación de imprimadores selectivos analizados para el MSAP.

<b>Imprimador <i>EcoRI</i></b>	<b>Imprimador <i>Hpa II/Msp I</i></b>	<b>Polimorfismo en <i>H. a.</i></b>	<b>Polimorfismo en <i>S. c.</i></b>
	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGCAC-3'	+/-	+/-
5'-	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTAG-3'	-/-	+/-
GACTGCGTACCAATT	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTCA-3'	+/+	+/+
CAAC-3'	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTGG-3'	-/-	-/-
	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTTC-3'	+/+	+/-
	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGCAC-3'	+/+	+/+
5'-	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTCA-3'	+/+	+/+
GACTGCGTACCAATT	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTTA-3'	-/-	-/-
CACA-3'	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTGG-3'	-/-	-/-
	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGCAC-3'	+/-	+/-
5'-	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTAG-3'	+/-	+/-
GACTGCGTACCAATT	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTTC-3'	+/-	+/-
CACG-3'			
	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGCAC-3'	+/-	+/-
5'-	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTCT-3'	+/+	+/-
GACTGCGTACCAATT	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTTA-3'	+/-	+/-
CACT-3'			
	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTCT-3'	+/+	+/-
5'-	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTGG-3'	-/-	-/-
GACTGCGTACCAATT	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTTC-3'	-/-	+/-
CAGC-3'			
	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTCA-3'	-/-	-/-
5'-	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTGG-3'	-/-	-/-
GACTGCGTACCAATT			
CAGG-3'			

*H.a.*: *Hyeronima alchomeoides*, *S.c.*: *Sideroxylon capiri*. Nivel de polimorfismo: -/-: bajo, +/-: intermedio, +/+ : alto

**A. Optimización del protocolo de extracción de ADN descrito por de [Sahu et al. \(2012\)](#) para la extracción de ADN de *H. alchorneoides*.**

*Buffer de suspensión* (Preparar fresco):

- 50mM EDTA
- 20mM Tris-HCl (pH=8)
- 1M NaCl
- 0,5M Sacarosa
- 2% Tritón-X 100
- 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol (agregar justo antes de usar)

*Buffer de extracción:*

- 20mM EDTA
- 100mM Tris-HCl
- 1,5M NaCl
- 2% CTAB
- 1%  $\beta$ -mercaptoetanol (agregar justo antes de usar)

**Procedimiento:**

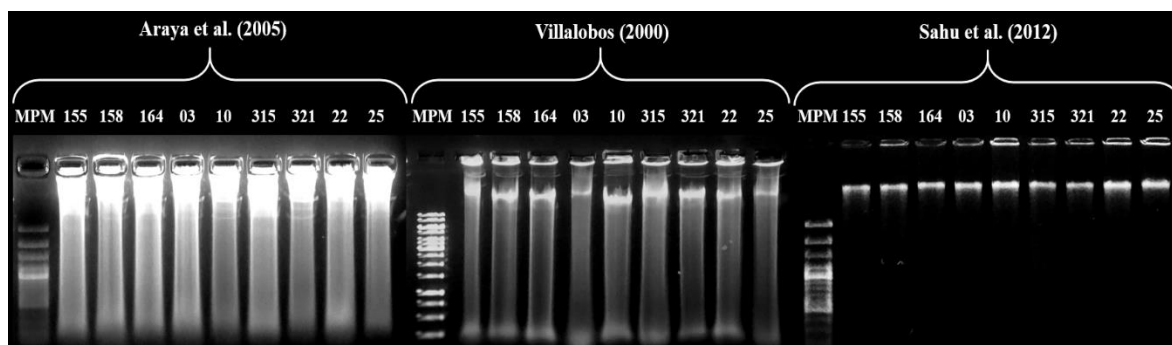
1. Se maceran 500mg de tejido foliar de pión con N<sub>2</sub> líquido en un mortero con pistilo hasta formar un polvo fino.
2. Se agregan 25mg de PVPP (Sigma-Aldrich) junto con 1,5 mL del buffer de suspensión y 4,5mL del buffer de extracción. Se procede a macerar el tejido con ambos buffers y luego se coloca en un tubo de teflón de 50mL.
3. Se incuban durante 25min a 60°C, con inversión cada 10min.
4. Se centrifuga a 9.000rpm durante 15 min y se extrae el sobrenadante. En un nuevo tubo de teflón se coloca el sobrenadante y un mismo volumen de cloroformo:octanol (24:1) y se agita vigorosamente por 2min.
5. Se centrifuga a 9.000rpm por 15min y se extrae el sobrenadante y se coloca en un nuevo tubo de teflón. Al sobrenadante se le agregan 3mL de cloroformo:octanol (24:1) y se agita vigorosamente por 2min.

6. Se centrifuga a 9.000rpm por 15min y el sobrenadante se coloca en nuevo tubo de 15mL.
7. Se agregan 1/10 de NaCl 5M y 2/3 de isopropanol (-20°C). Lo que precipita de inmediato se centrifuga por 15 min a 12.000rpm. El resto se deja en hielo por 1 hora y luego se centrifuga por 30min a 4000rpm a 4°C.
8. Se hacen 2 lavados con 500uL de etanol al 76% con acetato de amonio (pH=5, -20°C) y uno con etanol a 70% (Entre cada lavado se centrifuga por 5min a 8000rpm y el último 15min a 12000rpm).
9. Se deja secar a 37°C y se resuspende con 300uL de TE de alta salinidad (0,5M NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH=8)) o más, según el tamaño del botón.

#### ***Tratamiento con RNasa***

1. Se toma una alícuota de 200uL de ácidos nucleicos totales y se le agregan 2uL de RNasa (10µg/mL) y se incuba a 37°C durante 30min.
2. Se agrega 1 volumen de PCI (fenol:cloroformo:alcoholisoamílico, 25:24:1), se agita durante 20s y se centrifuga durante 5min a 16.000g.
3. Se toma el sobrenadante y se le agregan 0,5 volúmenes de cloroformo:alcoholisoamílico (24:1) y se agita durante 20seg. Luego se centrifuga durante 5min a 16.000g.
4. Se toma el sobrenadante y se agrega 0,5 volúmenes de acetato de amonio (pH=5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
5. Se incuba durante 1 hora a -20°C y luego se centrifuga por 30min a 16.000g.
6. El botón se lava con 150uL de etanol de 70% y se centrifuga por 2 min a 16.000g. Este paso se repite nuevamente, removiendo el sobrenadante con cuidado entre cada lavado.
7. Se seca el botón utilizando la SpeedVac® por 2min a 37°C por 5-10min.
8. El botón se resuspende con 50uL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8).

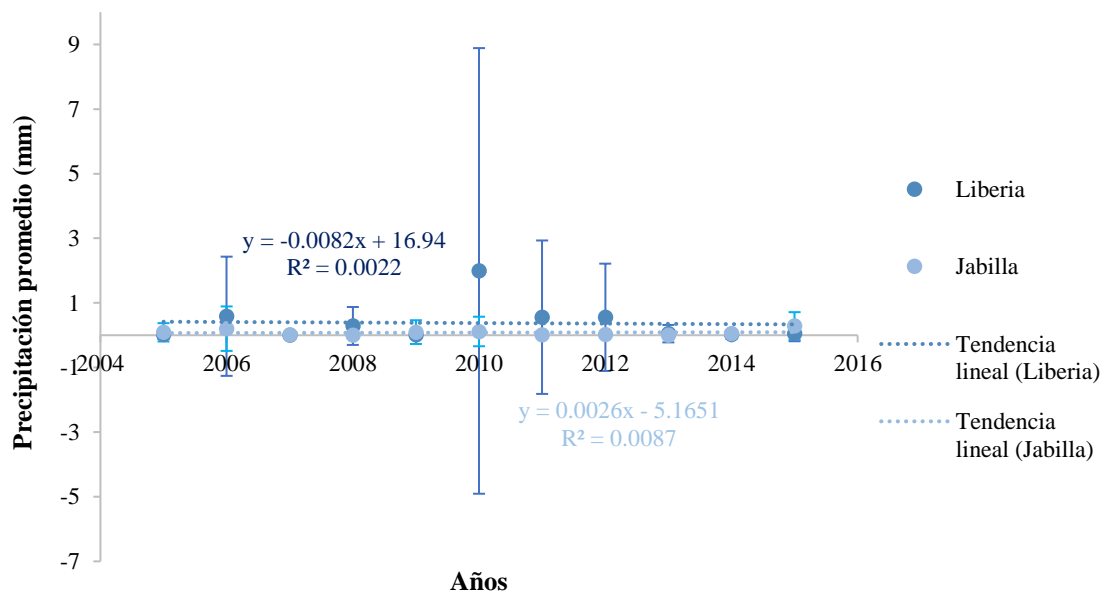
## B. Electroforesis de extracción de ADN genómico de *H. alchorneoides*



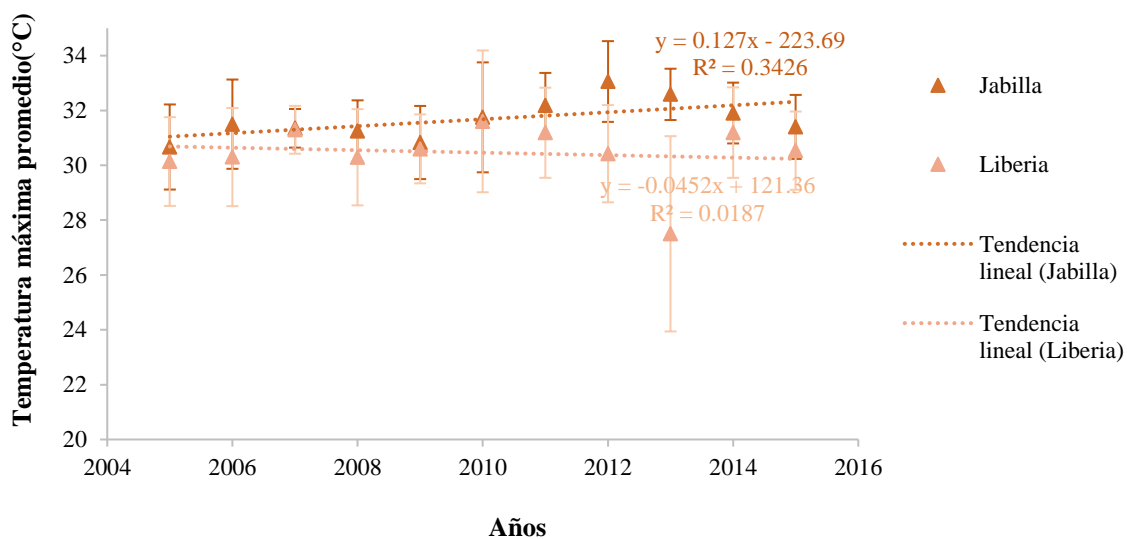
**Figura 14.** Electroforesis de las extracciones de ADN genómico de *H. alchorneoides* según el protocolo de extracción de [Araya et al. \(2005\)](#), [Villalobos \(2000\)](#) y [Sahu et al. \(2012\)](#). La numeración de cada carril corresponde al código asignado a cada muestra foliar de *H. alchorneoides* recolectada en el 2005 y en el 2015. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular (MPM) seguido por las muestras recolectadas en Mogos en el 2005 (155, 158 y 164), en Mogos en el 2015 (03 y 10), en Drake en el 2005 (315 y 321) y en Drake en el 2015 (22 y 25).



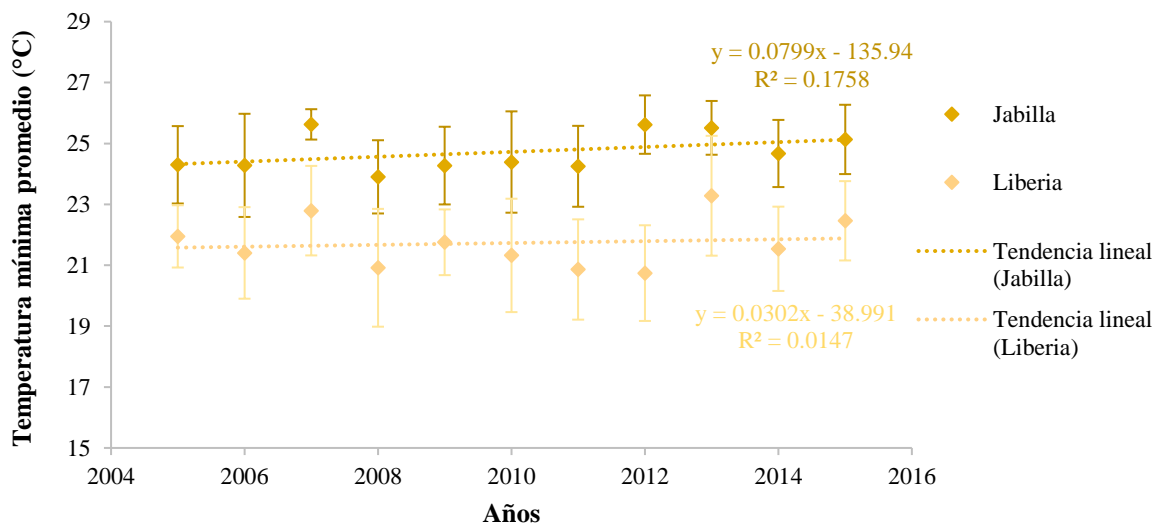
### C. Variables climatológicas de la Región del Pacífico Norte



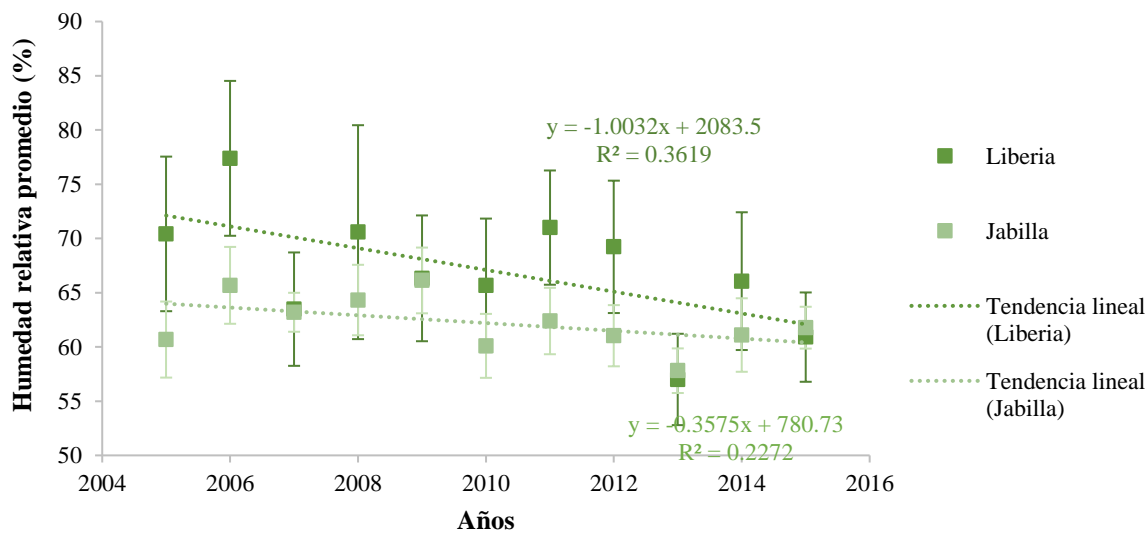
**Figura 15.** Precipitación promedio (mm) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Liberia y Jabilla (Estación de Santa Elena (ESE), Estación Hacienda Mojica (EHM), respectivamente).



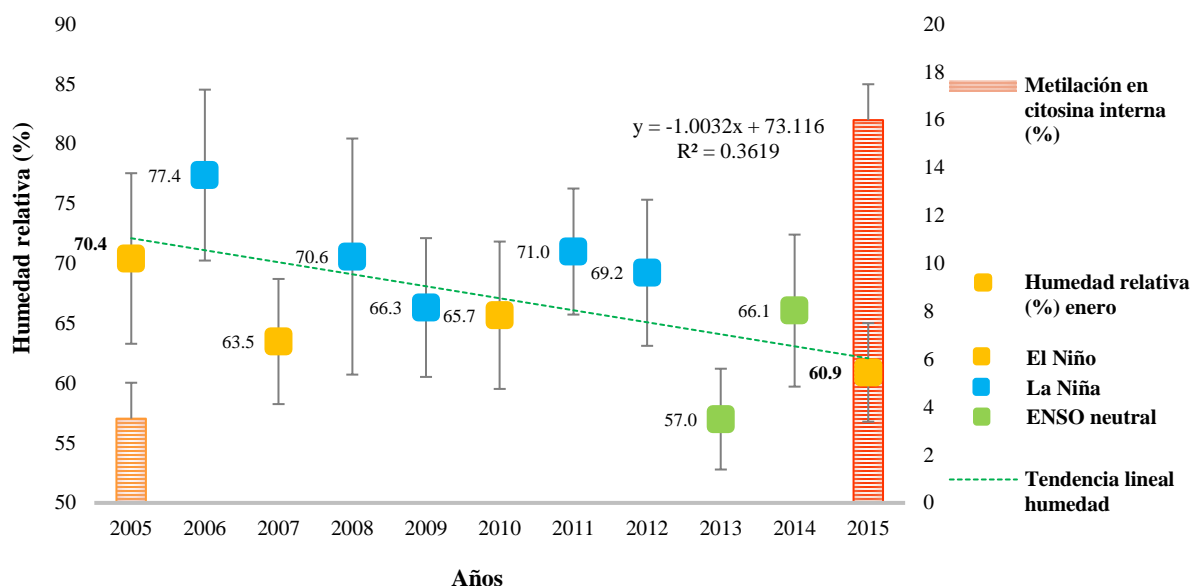
**Figura 16.** Temperatura máxima promedio (°C) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Jabilla y Liberia Jabilla (Estación Hacienda Mojica (EHM), Estación de Santa Elena (ESE) respectivamente).



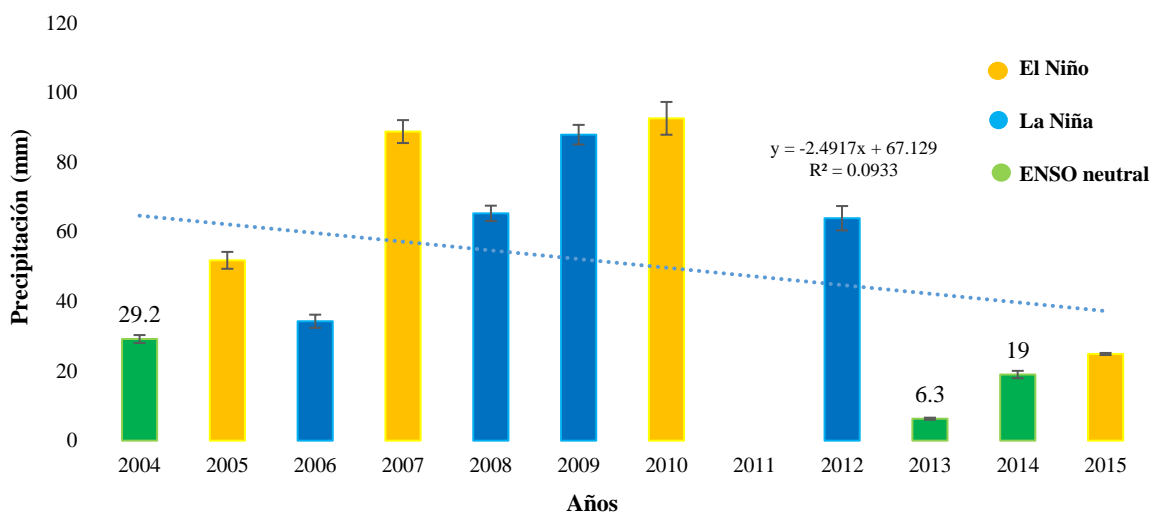
**Figura 17.** Temperatura mínima promedio (°C) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Jabilla y Liberia (Estación Hacienda Mojica (EHM), Estación de Santa Elena (ESE) respectivamente).



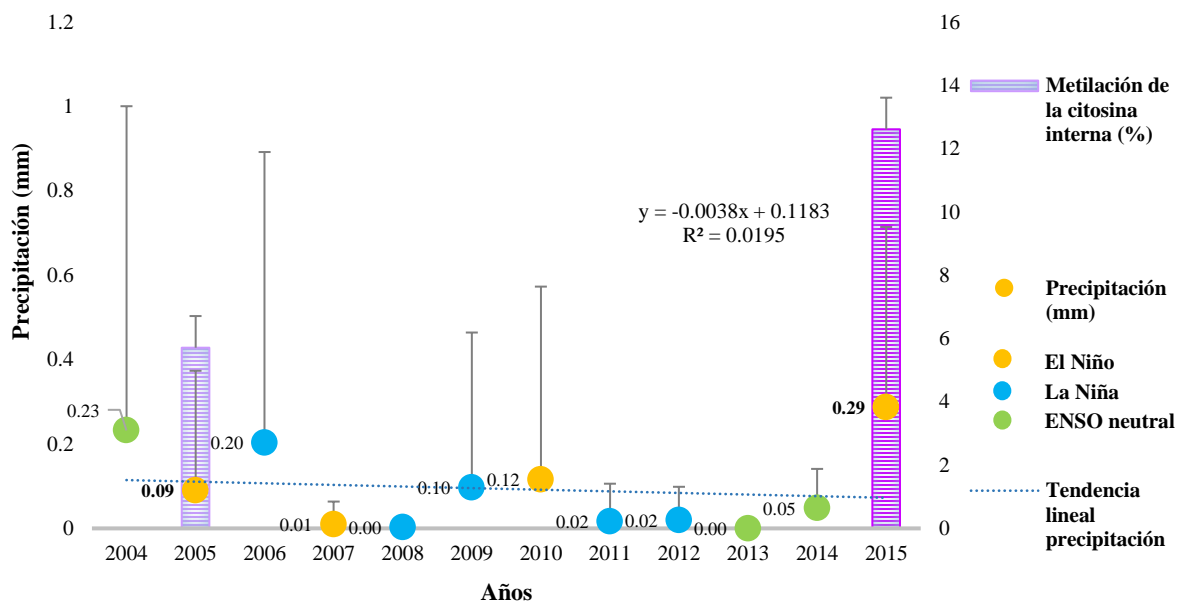
**Figura 18.** Humedad relativa promedio (%) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Liberia y Jabilla (Estación de Santa Elena (ESE), Estación Hacienda Mojica (EHM), respectivamente).



**Figura 19.** Relación entre la metilación en la citosina interna (%) de los individuos de Liberia y la humedad relativa (%) cercana al sitio de muestreo. Eje principal: Porcentaje promedio de humedad relativa (%) de enero del 2005 al 2015, reportado por la estación automática de Santa Elena en Liberia, Guanacaste. Color amarillo: fase cálida del ENOS; celeste: fase fría del ENOS y verde: climatológicamente normal. Eje secundario: Porcentaje promedio de metilación en la citosina interna de los individuos de Liberia.

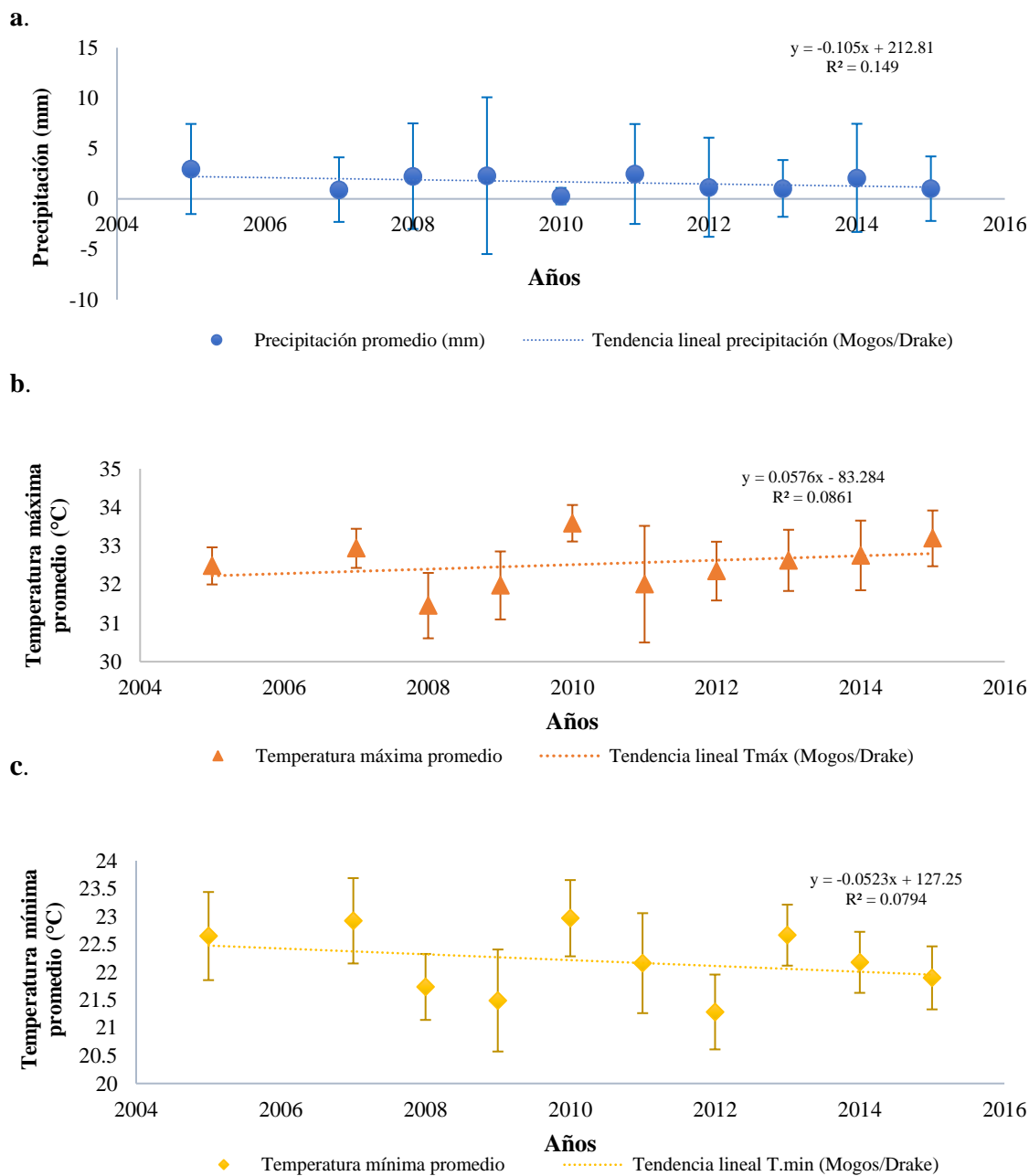


**Figura 20.** Precipitación promedio diaria durante la estación seca (diciembre a abril) del 2004 al 2015, reportada por la estación automática de la Hacienda Mojica (EHM), Guanacaste. Color amarillo: fase cálida del ENOS; celeste: fase fría del ENOS y verde: climatológicamente normal. El IMN no posee un registro de la precipitación durante la estación seca del 2011.



**Figura 21.** Relación entre la metilación de la citosina interna (%) de los individuos de Jabilla y la precipitación diaria (mm) cercana al sitio de muestreo. Eje principal: Porcentaje promedio de precipitación (mm) de enero del 2004 al 2015, reportado por la estación automática de la Hacienda Mojica, Guanacaste. Color amarillo: fase cálida del ENOS; celeste: fase fría del ENOS y verde: climatológicamente normal. Eje secundario: Porcentaje promedio de metilación en la citosina interna de los individuos de Jabilla.

## D. Variables climatológicas de la Región del Pacífico Sur



**Figura 22.** a. Precipitación promedio (mm), b. Temperatura máxima promedio (°C), c. Temperatura mínima promedio (°C) del mes de enero desde el 2005 al 2015 para los sitios de muestreo de Mogos y Drake (Estación Finca el Patio, EFP).