

**UNIVERSIDAD
DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ORIENTACION
EN BIOLOGÍA VEGETAL**

**UN ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA BIOLOGÍA MOLECULAR DE
ESPECIES DE *ZAMIA* L. (CYCADALES ZAMIACEAE) EN PANAMÁ**

RUBY E CABALLERO V

**PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMA
2014**



Título de la Tesis: **"UN ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA BIOLOGÍA MOLECULAR DE ESPECIES DE ZAMIAS L. (CYCADALES: ZAMIACEAE) EN PANAMÁ"**

TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas,
Opción Biología Vegetal

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:

Doctor Alberto Taylor
Presidente

Doctora Cristina Garibaldi
Miembro

Profesora Olga Chen
Miembro

REFRENDADO POR:

REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FECHA:

4 de Junio 2014

19 AUG 2014

OK

57

DEDICATORIA

Al Creador del Universo "Dios" por haberme dado luz y fortaleza para alcanzar mis metas, a mi familia, profesores y amigos

AGRADECIMIENTO

En primera instancia deseo agradecer al Doctor Alberto Taylor asesor principal, investigador de las zamias en Panamá, por haber dado pleno apoyo al uso de las plantas del Jardín de Cícadas de la Universidad de Panamá, cuya consecución y siembra ha sido labor de más de una década y por aceptar la sugerencia de proyecto alterno de tesis por parte del equipo del Instituto Smithsonian de Investigación Tropical liderado por la Doctora Oris Sanjur a la SENACYT por el apoyo económico brindado para hacer real la presente investigación, así como también agradezco a los co asesores, Doctor Carlos Ramos y profesor Jorge Mendieta por sus atinadas sugerencias y por el tiempo dedicado a la revisión del presente escrito A los Profesores del Departamento de Botánica Mireya Correa, Gerardo Cáceres Carmen Vergara, Cristina Garibaldi Alfredo Soler y Luis Carrasquilla, por estar pendientes de mis pininos en la biología molecular

Además deseo agradecer el apoyo brindado incondicionalmente por el personal del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Tropicales Smithsonian, algunos de los cuales ya no laboran allí por estar en otros ámbitos moleculares espero no olvidar ningun nombre Eyda Gómez, Débora Doens, Ruth Gisela Reina, Melissa Castillo Marta Vargas a las Doctoras Ivania Cedron, Eloisa Lasso, al Dr Luis Mejía, mi exalumno a quien volví a ver en el momento indicado “gracias Luis y principalmente a mis exalumnas Maribel González por sacar tiempo del tiempo y convertirse en mi guía, a Graciela Valdespino por las lindas fotos y Vielka Murillo por el empuje espiritual y el ánimo transmitido en cada momento

INDICE GENERAL

	Página
Hoja de Presentación	i
Hoja de Aprobación	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Resumen	1
Introducción	2
Revisión de la literatura	6
Aspectos Metodológicos	21
Resultado y Discusión	24
Conclusiones y Recomendaciones	28
Bibliografía citada	29
Anexos	34

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro I Listados de especies de <i>Zamia</i> de Panamá y lugar de colecta	15
Cuadro II Clave artificial para separar especies de <i>Zamia</i> de Panamá	16
Cuadro III Especies utilizadas en el estudio longitud de la secuencia, pares de bases porcentajes de bases Guanina (G) y Citosina (C) para cada especie	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig 1 Diagrama de la disposición del ADNr eucariótico 18S 5 8S 28S en tandém	9
Fig 2 Especies de <i>Zamia</i> del estudio	17
Fig 3 Especies de <i>Zamia</i> del estudio (continuación)	18
Fig 4 Especies de <i>Zamia</i> del estudio (continuación)	19
Fig 5 Especies de <i>Zamia</i> del estudio (continuación)	20
Fig 6 Distribución de especies de <i>Zamia</i> de Panamá	20
Fig 7 Cladograma del árbol filogenético de las especies de <i>Zamia</i> de Panamá del gen nuclear ITS2 ADN ribosomal	24

ANEXOS

	Página
Anexo 1 Preparación de reactivos	35
Anexo 2 Metodología de extracción de ADN y secuenciación	36
Anexo 3 Secuencias En Base Al Espaciador Transcrito Interno 2 (ITS2)	43
Anexo 4 Electroferograma Mostrando una parte de la secuencia de <i>Z. elegantissima</i> desde la posición 257 a la 309 Pb	52
Anexo 5 Listas de especies de <i>Zamia</i>, tomadas del genbank, usadas como referencia en el alineamiento de las especies de <i>Zamia</i> de Panamá (ITS2)	53
Anexo 6 Visualización del ADN genómico	54
Anexo 7 Visualización de la PCR en agarosa normal	55
Anexo 8 Visualización en agarosa low melting para cortar bandas	56

I RESUMEN

La identificación taxonómica de las especies descritas de *Zamia* de Panamá está basada principalmente en la morfología de las hojas y en algunas características reproductivas. Con el propósito de utilizar criterios adicionales se secuenció la región ITS₂ comprendidas entre los genes de rDNA 18S, 5.8S y 26S. Los resultados preliminares de la taxonomía molecular de las especies descritas de *Zamia* de Panamá, basados en la secuencia ITS₂ del ADN ribosomal nuclear muestran 3 cladogramas pobremente resueltos. El más parsimonioso señala dos clados: Un clado basal que contiene 3 especies de la región este del Istmo "Clado Panamá Este" y el otro que incluye el resto de las especies con distribución desde el centro hacia al oeste del área canalera "Clado Panamá Oeste" exceptuando las provincias de Herrera y Los Santos en las cuales quizás por motivo de deforestación de larga data, no se han encontrado hasta la fecha cícadas. Además los resultados indican que este gen por sí sólo no es el más indicado para establecer diferencias filogenéticas interespecífica para la mayoría de las especies, no así para las especies *Z. dressleri*, *Z. pseudoparasitica*, *Z. obliqua*, *Z. lindleyi* y *Z. skinneri*, las cuales se encuentran en ramas resueltas. Es importante señalar que *Z. obliqua* se ubica en el clado Panamá Este pero por su amplia distribución, se refleja en ambos clados. Como se ha visto en trabajos similares previos (Caputo et al. 2004, Taylor et al. 2012) el patrón de relaciones filogenéticas en *Zamia* es altamente congruente con su distribución su geográfica y no con semejanzas morfológicas.

I ABSTRACT

The taxonomical identification of described Panamanian *Zamia* species is mostly through leaf morphology and a few reproductive characteristics. With intent to apply additional criteria, regions ITS₁ and ITS₂ within the genes for rRNA 18S, 5.8S and 26S were sequenced. The preliminary results of our molecular taxonomy based on the sequence of ITS₂ of the nuclear ribosomal DNA show 3 poorly resolved cladograms. The most parsimonious gives two clades: A basal clade of 3 species from the eastern region of the Isthmus "East Panama Clade" and the other includes the rest of the species with distribution from central Panama towards the west of the Canal Area "West Panama Clade" excepting the provinces of Herrera and Los Santos in which, perhaps due to long lasting deforestation, no cycad has been found to date. Additionally the results show that this gene per se is not the most reliable to establish interspecific phylogenetic differences for most of the species however not so for species *Zamia dressleri*, *Z. pseudoparasitica*, *Z. obliqua*, *Z. lindleyi* and *Z. skinneri*, which are found on resolved branches. It is important to note that *Z. obliqua* is put in East Panama Clade but due to its extended distribution it is found in both clades. As appear in previous similar research (Caputo et al. 2004, Taylor et al. 2012) the pattern of phylogenetic relationships in *Zamia* is highly congruent with geographic distribution and not with morphological similarities.

II INTRODUCCIÓN

El orden Cycadales consta de tres familias Cycadaceae Stangeriaceae y Zamiaceae (Stevenson, 1992) La familia Zamiaceae posee el mayor número de géneros descritos en el neotrópico con cuatro géneros y 113 especies (Osborne et al. 2012) de la cual el género *Zamia* constituye el de mayor polimorfismo y distribución ecológica. Este género está distribuido a través del trópico y sub trópico de América, así como también, en el Caribe con excepción de Las Antillas Menores y comprende unas 72 especies

Panamá, con una extensión territorial un poco menos de 26 veces la de México cuenta con 17 especies descritas de *Zamia* cantidad que iguala el número de especies descritas para México de las cuales 12 son endémicas Sin embargo México país con el mayor número descrito de cícadas americanas tiene un total de 66 especies incluidas 23 especies de *Dioon* y 26 especies de *Ceratozamia*.

La identificación taxonómica de las especies descritas de *Zamia* del Istmo de Panamá está basada principalmente en caracteres morfológicos El presente estudio contempla aspectos de la biología molecular considerando la nueva herramienta conocida como "código de barras" propuesta por Hebert en el 2003 El gen utilizado para tal propósito es el intergen nuclear ribosomal ITS2

1 Planteamiento del Problema

El único criterio para la clasificación utilizado hasta el momento de las especies de *Zamia* descritas para Panamá es la información que se ha generado sobre algunos

caracteres morfológicos de órganos vegetativos y reproductivos. Se tiene información de secuencias de ADN con la utilización de ITS2 en conjunto con características morfológicas en número plural de especies americanas incluyendo nueve de Panamá. Sin embargo se presentan nombres conflictivos de las de Panamá y el origen de algunas no queda bien establecido. Las especies incluidas en estos estudios (Caputo et al. 2004 Taylor et al. 2012) son *Z. acuminata* (está se ignora si fue la de Panamá, ya cambiada a *Z. nana* (Lindström et al. 2013) o la de Costa Rica, *Z. dressleri*, *Z. ipetiensis*, *Z. neurophyllidia*, *Z. obliqua*, *Z. pseudomonticola*, *Z. pseudoparasitica*, *Z. skinneri* (no se ha podido obtener datos sobre procedencia verdadera) y *Z. manicata*. Estos estudios han realizado para esclarecer la filogenia del género en varias poblaciones. Existen caracteres morfológicos utilizados en la clasificación tradicional que no son muy informativos para los propósitos de clasificación y determinación de la variación interespecífica y como consecuencia en algunos casos la identificación se dificulta. En base a la escasez de datos moleculares que contribuyan a la identificación y clasificación de las especies descritas de *Zamia* del país, se hace necesario obtener y evaluar la utilidad de estas secuencias en todas estas especies. Se han efectuado por lo menos dos trabajos sobre biología molecular de *Zamia* en los cuales se adicionó una matriz morfológica. En un primer caso se obtuvo un cladograma de consenso (Caputo et al. 2004) y en el segundo un cladograma resuelto (Taylor et al. 2012a). Sin embargo en estos trabajos no se analizaron las diecisiete especies del Istmo y probablemente algunas de las especies señaladas no corresponden a la nomenclatura actual (e.g. *Z. acuminata*, *Z. ipetiensis/cunaria*, *Z. skinneri*).

2 Importancia del Estudio

En virtud de la poca información relativa de datos moleculares que contribuyan a la identificación y clasificación de las especies descritas de *Zamia* de Panamá, se hace necesario obtener la secuencia de genes que pudieran ser utilizados como código de barras y evaluar su utilidad en la filogenia e identificación de estas especies. Es importante tener una idea de la filogenia de cícadas porque en cualquier estudio de evolución de plantas superiores sale a relucir la evolución de estas especies por su estructura de larga data de más de 250 millones de años por su producción de sustancias tóxicas cancerígenas y aminoácidos no esenciales por el peligro de su extinción debido a extracción ilegal y eliminación de hábitat, su gran demanda de uso medicinal y ornamental en el folklore de pueblos americanos y del sur este de Asia. Se espera que la información obtenida a partir de esta investigación contribuya a esclarecer las relaciones filogenéticas entre las especies descritas de Panamá y especialmente la situación de especies morfológicamente muy similares.

Se espera que situaciones como la similitud en la morfología entre *Z. cunaria* y *Z. ipetiensis* que se pueden confundir fácilmente en el campo y entre las especies del complejo "*skinneri*" formado por *Z. hamani*, *Z. imperialis*, *Z. skinneri*, *Z. nesophila* y *Z. neurophylidia* (Taylor et al 2012c) todas con folíolos plegados, pudieran resolverse introduciendo datos moleculares. Los resultados obtenidos no sólo servirán de base a futuras investigaciones sino que además proporcionarán información relevante sobre las secuencias de ITS₂ de las especies descritas de *Zamia* de Panamá.

Objetivos

Objetivo general

- **Establecer la filogema de las especies de *Zamia* de Panamá, basada en cladogramas generados a partir de las secuencias del ITS₂**

Objetivos específicos

- **Elaborar un cladograma del árbol filogenético con las secuencias obtenidas para la región nuclear ITS₂.**
- **Determinar la asociación filogenética de las diecisiete especies de *Zamia* secuenciadas**
- **Evaluar la utilidad del ITS₂ como código de barra para las especies de *Zamia* de Panamá.**

Hipótesis de Trabajo

La Hipótesis científica

El ITS₂ es útil para describir la taxonomía de las especies descritas de *Zamia* de Panamá.

Hipótesis nula

El ITS₂ no es útil para describir la taxonomía de las especies descritas de *Zamia* de Panamá.

III REVISIÓN DE LITERATURA

Estudios con implicaciones filogenéticas en las cícadas se han venido realizando en diferentes épocas y latitudes debido a su importancia dentro de las plantas con semilla, como lo es su sobrevivencia a través de los tiempos contenido químico y explotación actual de las poblaciones Cabe mencionar las investigaciones de Moret (1990) sobre *Zamiaceae* (Cycadales) de Norte y América Central basadas en el número de cromosomas y cariotipo de *Zamia*, *Microcycas*, *Ceratozamia* y *Dioon*. Los resultados muestran la relación cariológica entre *Zamia*, *Microcycas* y *Ceratozamia* mientras que *Dioon* aparece distante esto se explica debido a que difiere en características vegetativas y reproductivas de otras cícadas americanas (Stevenson, 1989). Además cladogramas propuestos para las cícadas neotropicales basados en caracteres morfológicos, estructurales y fitoquímicos presentados por Crane (1988b) y Stevenson (1989) confirman la relación filogenética entre los tres géneros y proponen que *Dioon* podría tener un origen distinto a los otros géneros.

En otras latitudes como en Australia, se han realizados estudios sobre la biología y sistemática de las cícadas del género *Bowenia* específicamente donde se consideraron características morfológicas reproductivas y asociación con insectos (Wilson, 2004).

Con el propósito de establecer las relaciones filogenéticas y la identidad de las especies, en el año 2003 Paul Hebert, un biólogo de la Universidad de Guelph en Canadá presentó a los investigadores de la Institución Smithsonian del Museo de Historia Natural (NMNH) en Washington, DC los resultados de un estudio piloto que discrimina las especies animales utilizando sólo una pequeña parte variable del ADN lo denominó

“código de barras”. Hebert hizo un llamamiento para un esfuerzo similar para encontrar un identificador único en las plantas. John W. Kress, y sus colegas botánicos de NMNH, al igual que Ki-Jong Kim un botánico de la Universidad de Corea en Seúl, comenzaron lo que se ha convertido en una búsqueda de un código de barras botánico (Pennisi, 2007).

El código de barras genético puede definirse como “el empleo de la variabilidad nucleótida existente en regiones cortas y estandarizadas del genoma, como auxiliar en la identificación y descubrimiento de especies biológicas en los grandes grupos taxonómicos de organismos” (Hebert et al. 2003; Ratnasingham et al. 2007). El código de barras consiste en emplear una secuencia corta de nucleótidos (15 nucleótidos, con 4 opciones en cada posición, crea la posibilidad de 1 billón de códigos). <http://www.btek.org/blog/wpcontent/uploads/2012/10/gu%C3%ADa-taller-%C3%A1rboles.pdf>) de un gen o región como marcador para la identificación de un espécimen hasta nivel de especie.

En plantas, el consorcio que trabaja en el código de barras (Consortium for the Barcoding of Life Plant Working Group “CBoL” o Grupo de Trabajo sobre Plantas del Consorcio para el Código de Barras de la Vida) sugiere la utilización de ciertas regiones del ADN del cloroplasto como código de barra o alternativamente la región espaciadora entre los genes *psbA-trnH* del cloroplasto o las regiones espaciadoras transcritas internas de los genes de rRNA nuclear (Sass et al. 2007). Los espaciadores transcritos internos ITS₁ e ITS₂, por sus siglas en inglés, “internal transcribed spacer”, se convirtieron en uno de los primeros candidatos para el “código de barras” de plantas. Para Stoeckle (2003), esta región ha demostrado amplia utilidad en eucariotas fotosintéticos y hongos y se ha sugerido como un posible código de barras de las plantas. De acuerdo a Baldwin et al.

1995 y Andreasen et al 1999 las secuencias del ITS se consideran adecuados para inferir filogenia a nivel de género o especie de plantas

Los ITS constituyen las regiones más secuenciadas del genoma (Alvarez et al 2003) Una ventaja de esta región es que puede ser amplificada en dos fragmentos más pequeños el ITS₁ e ITS₂ (Cullings et al 1998) El segundo ITS₂ puede ser en principio utilizado como un código de barras estándar para identificar especies de plantas medicinales estrechamente relacionadas y como código de barras universal para la identificación de una amplia gama de taxones vegetales, incluyendo angiospermas (Baldwin et al 1995 Moller y Cronk, 1997 Soltis 1998 Dick, et al. 2003 Gustafsson et al 2003) y gimnospermas (Liston et al 1996 Cheng et al 2000 y Chen et al 2010) La región ITS₂ fue descrito por primera vez por Chiou et al 2007)

Además la región ITS evoluciona rápidamente en las plantas de manera que generalmente y en muchos casos, las especies se pueden distinguir fácilmente por la variación de la secuencia (Baldwin et al. 1995)

Los ITS son regiones no codificantes que separan los componentes individuales de las unidades de ADN ribosómico del núcleo (rADN) El rDNA contiene la información para el ARN que conforman los ribosomas por lo que es información que se transcribe pero no se traduce El rDNA se presenta en repeticiones tándem, en los eucariotas Está formada por tres subunidades (18S 5.8S y 28S) separadas por dos espaciadores internos con elevadas tasas de sustitución el ITS₁ e ITS₂, de 250 a 300 nucleótidos que son regiones no codificantes Cada unidad de rDNA se encuentra separado por un espaciador intergénico IGS (por sus siglas en inglés Inter Genic Spacer) que incluye el espaciador

no transcrito (NTS) y el Espaciador Transcrito Externo (ETS), además, incluye el Espaciador Transcrito Interno (ITS), que incluye el ITS₁ e ITS₂). (Fig.1).

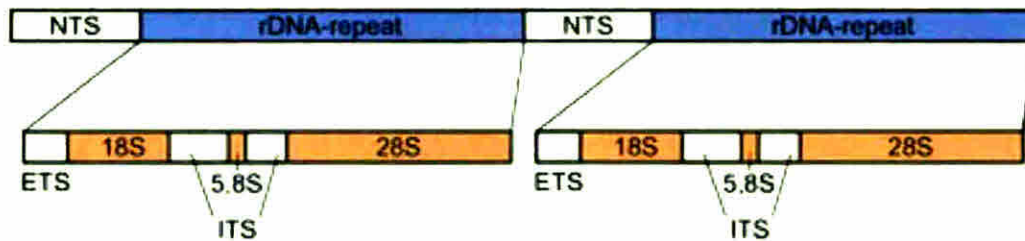


Fig. 1: Diagrama de la disposición del ADN ribosómico (ADNr) eucariótico 18S, 5.8S y 28S en tándem: IGS (Espaciador Intergénico): ADN no codificante que separa copias en tándem de secuencias génicas o ADNr (NTS: Espaciador no transcrito y ETS: Espaciador Transcrito Externo). ITS (Espaciador Transcrito Interno): Regiones no codificantes que separa los componentes individuales de las unidades de ADNr (ITS₁ e ITS₂). Accesado en: http://es.wikipedia.org/wiki/ADN_ribos%C3%B3mico.

Las subunidades 18S, 5.8S y 28S, son regiones altamente conservadas a lo largo de todo un genoma. Evolucionan muy lentamente, por lo que son frecuentemente usados para determinar la clasificación a nivel taxonómico alto, tal como las relaciones entre las ordenes (Hills y Dixon, 1991). Sin embargo, los espaciadores no codificantes ITS e IGS pueden variar sustancialmente aun entre las especies cercanamente relacionadas, debido a que cambian rápidamente y pueden ser útiles para la comparación intra e interespecifica (Stouthamer, 2007).

De particular interés resultan los fragmentos ITS₁ e ITS₂, ya que han demostrado que pueden proveer una serie de caracteres para resolver problemas en angiospermas, (Baldwing et al. 1995; Moller et al. 1997; Soltis, 1998; Dick, et al. 2003; Gustafsson et al. 2003). Además, las secuencias ITS₁ e ITS₂, han sido ampliamente usadas para comparaciones filogenéticas dentro de las familias de las gimnospermas (Cheng et al. 2000; Liston et al. 1996). Otros como Schultz et al. 2005 y 2009, señalan que la región ITS₂ fue seleccionado como un candidato de código de barras porque sus secuencias son

marcadores filogenéticos potenciales y ampliamente utilizados para reconstrucciones filogenéticas a nivel de género y especies

Chen et al 2010 concluyen en sus investigaciones que la región ITS₂ puede ser potencialmente utilizada como un código de barras del ADN estándar para identificar especies de plantas estrechamente relacionadas y puede servir como un código de barras universal novedoso para la identificación de una gama más amplia de taxones vegetales

En el orden Cycadales se han realizado investigaciones en Estados Unidos, por Saas et al en el año 2007 quienes trabajaron con las regiones del cloroplasto propuestas por el Grupo de Trabajo para Plantas del CBoL matK, rpoC1 rpoB además ACCD YCF5 con ndhJ como una sexta región potencial y dos alternativas el espaciador intergénico cloroplástico psbA trnH y el espaciador interno transcrito ribosomal nuclear nrITS

La región nrITS mostró ser el más prometedor en cuanto a variabilidad, con el único inconveniente al momento de secuenciar porque el nrITS en cícadas (y otras gimnospermas) es variable en longitud (de 1100 a 1400 pb) además se requiere el uso de cebadores internos para generar contigs otro factor potencialmente negativo es la presencia de poli T poli C y repeticiones poli – A, que son difíciles de secuenciar

Las identificaciones moleculares alcanzadas con código de barras en *Zamia* tendrían que ser consideradas de manera paralela con aquellos aspectos que la taxonomía tradicional aún no ha logrado solventar en especial al momento de identificar taxa, como una amplia variación morfológica entre y dentro de especies especies crípticas” y que a su vez presenten una amplia distribución geográfica (Nicolalde 2009a)

Otra investigación sobre las cícadas fue realizada por Nicolalde et al 2010a, en México utilizando diversas combinaciones multigénicas para el código de barras

genético para cicadales. Fueron utilizados los siguientes genes codificantes del cloroplasto *matK*, *rpoB*, *rpoC1* y *rbcL* y los genes no codificantes *atpF/H*, *psbK/I* y *trnH-psbA*, más el espaciador transcrito interno del núcleo nrITS. Resultando la combinación de las regiones *psbK-psbI* +*atpF-atpH+rpoC1+ITS2* con 75 % de descripción de las 24 especies de *Zamia* entre otros géneros. Cuando el análisis se efectuó por una sola región, el mejor rendimiento fue para la región *psbK/I*, este valor es similar al espaciador *ITS2* y *atpF-atpH* que resultó en segundo lugar para el género *Zamia*.

Los resultados anteriores obtenidos por Nicolalde y su grupo de trabajo demostraron que los genes *matK* y *rbcL* en contraste con los resultados presentados por el PWG del CBoL (2009) no cumplen con ninguno de los géneros de cicadas. Este resultado se basó en el criterio de la "discriminación" del tercer parámetro según el cual un segmento del genoma puede ser propuesto como región para el código de barras de ADN para la cual deberá ser aceptado en consenso por distinguir la mayoría de las especies en estudio.

Ese mismo año Nicolalde et al. 2010b basados en los estudios anteriores Nicolalde et al. 2010a, utilizaron combinaciones multigénicas para el código de barras para las Cicadas de México. Realizaron pruebas de código de barras genético específicamente para la especie *Zamia* L. con los siguientes sitios *matK*, *rpoC1*, *psbK/I*, *atpF/H* e *ITS2*. Los resultados obtenidos demuestran que el gen espaciador del cloroplasto *psbK/I* constituye una potente región para código de barras genético para las especies de *Zamia* de México. Este resultado apoya los obtenidos en los estudios efectuados en las cicadas de México por Nicolalde et al. 2010a.

El uso de caracteres de ADN como sitios diagnósticos no sólo en cícadas sino en diversos grupos de gimnospermas y angiospermas ha unido la sistemática molecular con la taxonomía tradicional al demostrar que algunas regiones del genoma son prácticamente invariables entre poblaciones de una especie mientras que otras muestran variación entre especies (Nicolalde-Morejon et al 2011)

Vovides (2011) señala que el código de barras de ADN se está convirtiendo en un apoyo científico de escala internacional que pretende establecer criterios objetivos para la identificación de especies Tarea que no sólo tiene el potencial de hacer avanzar enormemente la taxonomía y sistemática básica de los organismos descritos y aun por describirse sino también las tareas propias de la biología de la conservación en grupos amenazados

Esta investigación preliminar de la sistemática molecular de las especies de *Zamia* reportadas para Panamá (Cuadro I) y con una distribución a lo largo del País (Fig 6) tiene como antecedentes una serie de estudios realizados con anterioridad, que han servido de guía para comprender e interpretar los resultados propios, estudios detallados en los siguientes párrafos

Para resolver las relaciones filogenéticas de especies de *Zamia*, Caputo et al 1996 efectuaron estudios filogenéticos usando datos citológicos de 26 especies de *Zamia* de Mesoamérica, de los cuales 7 especies se adscribieron a Panamá saber *Z. cunaria*, *Z. ipetiensis*, *Z. obliqua*, *Z. manicata*, *Z. skinneri*, *Z. neurophyllidia* y *Z. acuminata*. Dando como resultado un cladograma que presenta a *Z. skinneri* y *Z. neurophyllidia* en un mismo clado con una raíz en común

Seguendo la misma línea de investigación, Caputo et al. en 2004 introduce nuevos criterios datos moleculares (ITS₂) y morfológicos, en sus estudios filogenéticos de *Zamia*. Incluyendo en esta ocasión 23 especies de *Zamia* de las cuales cinco especies son de Panamá *Z. acuminata*, *Z. neurophyllidia*, *Z. obliqua*, *Z. pseudoparasitica* y *Z. skinneri* obteniendo como resultado un cladograma de máxima parsimonia mostrando varios clados pobremente resueltos. Definiéndose dos grupos uno compuesto por especies principalmente de América Central y el otro incluye el resto de las especies investigadas. Las especies de Panamá se muestran en el clado llamado “clado pseudoparasitica” formado principalmente por especies de América Central. Hoy día existen dudas sobre la identidad taxonómica de las especies *Z. acuminata* y *Z. skinneri* utilizadas en dichos estudios.

En Taylor et al 2012a, se muestra un cladograma, basado en datos moleculares y morfológicos que incluye 12 especies adicionales al estudio anterior dando un total de 35 especies de *Zamia*. De ellas nueve especies son de Panamá *Z. acuminata*, *Z. dressleri*, *Z. ipetiensis*, *Z. manicata*, *Z. neurophyllidia*, *Z. pseudomonticola*, *Z. pseudoparasitica*, *Z. obliqua*, *Z. skinneri* y todas son agrupadas en el clado llamado “clado Panamá” con excepción de *Z. ipetiensis* que se ubica ésta en el “clado América del Sur”. El resto de las 27 especies que se ubica en el clado Caribe o clado mega México”

Los resultados de Caputo indican que la semejanza morfológica en el género no se corresponde con el patrón de relaciones filogenéticas mientras que los resultados obtenidos muestran un patrón ampliamente congruente con su distribución geográfica.

La importancia botánica de estudiar las cícadas como ya se ha mencionado ha motivado su inclusión en estudios detallados sobre relaciones filogenética a gran en

plantas vasculares a gran escala. Además el estatus de plantas amenazadas, el valor comercial y el atractivo ornamental de algunas especies a forzado un gran numero de investigaciones sobre la biología de las cícadas (Caputo et al 2004)

Las cícadas actuales aun están en proceso evolutivo aunque su numero se ha reducido en comparación con su predominancia en la Era Jurásica (Taylor et al 2012a) Aunque recientemente (Nagalingum et al 2011) ha postulado que tanto las cícadas actuales como otras especies llamadas 'fósiles vivientes' en realidad son de más reciente evolución y que el parecido con los fósiles de eras pasadas sólo es superficial, debido a la supervivencia de un patrón morfológico de gran adaptabilidad

Panamá tiene diecisiete especies descritas (Taylor et al 2012b) (Cuadro I) (Figs 2 5) distribuidas a lo largo de todo el País (Fig 6) El unico criterio para la clasificación utilizado hasta el momento es la información que se ha generado sobre algunos caracteres morfológicos de órganos vegetativos y reproductivos (Cuadro II)

Existen muchos estudios morfológicos en filogenia de Cycadales y *Zamia* (Stevenson et al 1992 y 1993) pero pocos estudios de filogenia molecular en *Zamia* (Caputo et al. 2004) Actualmente hay un cladograma resuelto con caracteres moleculares y morfológicos en *Zamia* (Taylor et al. 2012a) que incluye 9 especies pero algunas de estas especies tales como *Z. acuminata*, *Z. pettiensis/cunaria* y *Z. skanneri* probablemente sean especies diferentes a las utilizadas en este trabajo

Cuadro I LISTADO DE ESPECIES DE ZAMIA DE PANAMÁ

Especie	Lugar de colecta	Endémica
<i>Zamia acuminata</i> Oersted ex Dyer * (Fig 2a, 2d)	Panamá (Coclé)	X
<i>Zamia cunaria</i> Dressler & D W Stev (Fig 2e, 2f, 2h)	Panamá (Guna Yala)	X
<i>Zamia dressleri</i> D W Stev (Fig 2g, 2i)	Panamá (Colón y Guna Yala)	X
<i>Zamia elegantissima</i> Schutzman, Vovides & R. S Adams (Fig 3a)	Panamá (Colón y Guna Yala)	X
<i>Zamia fairchildiana</i> L D Gómez (Fig 3 b)	Panamá (Chiriquí) y Costa Rica	---
<i>Zamia cf hamannii</i> A S Taylor J L Haynes & Holzman (Fig 3c)	Panamá (Bocas del Toro)	X
<i>Zamia imperialis</i> A S Taylor J L Haynes & Holzman (Fig 3d)	Panamá (Coclé y Veraguas)	X
<i>Zamia ipetiensis</i> D W Stev (Fig 3e)	Panamá (Darién Grupo Emberá)	X
<i>Zamia lindleyi</i> Warsz ex A. Dietr (Fig 3f)	Panamá (Chiriquí)	X
<i>Zamia manicata</i> Linden ex Regel (Fig 4a)	Panamá (Darién) y Colombia	---
<i>Zamia nesophila</i> A S Taylor J L Haynes & Holzman (Fig 4b)	Panamá (Bocas del Toro)	X
<i>Zamia neurophyllidia</i> D W Stev (Fig 4c)	Panamá (Bocas del Toro) Costa Rica	---
<i>Zamia obliqua</i> A. Braun (Fig 4d, 4f, 4g)	Panamá (Darién, Colón, Coclé Panamá), Colombia	---
<i>Zamia pseudomonticola</i> L D Gómez (Fig 4e)	Panamá (Chiriquí) y Costa Rica	---
<i>Zamia pseudoparasitica</i> Yates in Seemann (Fig 5a)	Panamá (Bocas del Toro Coclé Colón, Panamá y Veraguas)	X
<i>Zamia skanneri</i> Warsz ex A Dietr (Fig 5b)	Panamá (Bocas del Toro)	X
<i>Zamia stevensonii</i> A S Taylor & G Holzman (Fig 2b)	Panamá (Panamá)	X

Fuente Taylor et al 2012b

*Identificada como *Zamia nana* Lindström A Calonje M Stevenson D Husby C Y Taylor A 2013
X indica endémica para Panamá.

Cuadro II CLAVE ARTIFICIAL PARA SEPARAR ESPECIES DE *ZAMIA* DE PANAMÁ

1 Hojas plegadas (folíolos)	
2 Tallo subterráneo, megasporofilo maduro chocolate rojizo	<i>Z. dressleri</i>
2 Tallo arborescente, megasporofilo de diferente color	3
3 Hojas emergentes rojizas, carmesí o rosadas	4
4 Hojas usualmente 3 hojas emergentes carmesí folíolos mediales 27–75 cm de largo, 6.5–21 cm de ancho megasporofilos maduros chocolate (por debajo tomentoso)	<i>Z. imperialis</i>
4 Hojas 10 o más, las emergentes rojizas, anaranjadas a rosa-rosadas, cubiertas con un tomento plateado folíolo mediales de 26–62 cm de largo	<i>Z. hamannii</i>
3 Hojas emergentes verde brillante, glabras folíolos mediales ≤ 52 cm de largo	5
5 Folíolos mediales de 25.5–51.4 cm de largo 7–16.6 cm de ancho longitud promedio de anchura (L/W) típicamente > 4.0 pares de folíolos ≤ 10 peciolo y raquis típicamente de igual longitud	<i>Z. skinneri</i>
5 Folíolos mediales ≤ 38 cm longitud, ≤ 10.5 cm de ancho, promedio L/W ≤ 6 pares de folíolos 5–12 peciolo típicamente más corto que el raquis	6
6 Tallo hasta 2.8 m de altura y 24 cm de diámetro hojas de 2.4 m de largo folíolos mediales 25–38 cm de largo, 6.5–10.5 cm de ancho, promedio L/W=3.6 estróbilo ovulado típicamente colgante en la madurez	<i>Z. nesophila</i>
6 Tallo de 2 m de altura y 12 cm de diámetro hojas de 1.8 m de longitud, folíolos mediales 20–31.3 cm de largo, 6.1–9.8 cm de ancho, promedio L/W=3.25 estróbilo ovulado erecto en la madurez.	<i>Z. neurophyllidia</i>
1 Hojas no plegadas (folíolos)	
7 Tallo arborescente	8
8 Folíolos enteros, planta muy parecida a una palma	<i>Z. lundleyi</i>
8 Folíolos aserrados al menos en el tercio superior planta no muy parecida a una palma	9
9 Folíolos ovados a obovados	<i>Z. obliqua</i>
9 Folíolos oblongos a lanceolados	10
10 Peciolo y raquis sin o con muy pocas espinas, superficie del folíolo bastante plana con pequeños márgenes dentados dispersos especialmente en el extremo proximal de la punta aguda del folíolo	11
11 Hojas emergentes verde pálido a verde amarillento, la base del tallo en plantas con conos o maduras mayor de 8 y hasta 21 cm de diámetro	<i>Z. elegantissima</i>
11 Hojas emergentes blancas, a veces al principio amarillo-blancuzcas, la base del tallo en plantas con conos o maduras, menor de 8 cm de diámetro	<i>Z. stevensonii</i>
10 Peciolo y raquis con espinas obvias hasta la base del raquis, la mayoría de las superficies de los folíolos con un pliegue longitudinal obvio, los márgenes casi enteros, excepto por una pequeña hendidura en el extremo proximal, ápice de los folíolos agudos a acumulado	12
12 Ápice de los folíolos menos de 3 cm de largo	<i>Z. pseudomonticola</i>
12 Ápice de los folíolos frecuentemente más de 3 cm de largo	<i>Z. fairchildiana</i>
7 Tallo epífita o subterráneo	13
13 Tallo epífita, raíces enroscadas en las ramas de los árboles, a veces con crecimiento y anclado firme en el suelo las plantas más viejas tienden a crecer con el ápice del tallo volteado y la planta pendiente de las ramas de los árboles	<i>Z. pseudoparasitica</i>
13 Tallo subterráneo	14
14 Folíolos con peciolo con una pequeña glándula protuberante en la base	<i>Z. manicata</i>
14 Folíolos sésiles	15
15 Hojas 1 (4) hasta 11 por plantas, folíolos 7–17 pares en poblaciones naturales, folíolos con marcado pliegue dorsal	<i>Z. nana</i>
15 Hoja usualmente 1 a 9 superficie de los folíolos planos y hasta 9 pares	16
16 Folíolos mediales 4–9 cm de ancho	<i>Z. cunaria</i>
16 Folíolos mediales 2–7 cm de ancho	<i>Z. ipetiensis</i>
Erróneamente considerada por <i>Z. acuminata</i> endémica de Costa Rica (Lindstrom et al. 2013)	

Fuente Información facilitada por Profesor Alberto Taylor y traducida al español por R. Caballero traducción revisada por Profesor Alberto Taylor

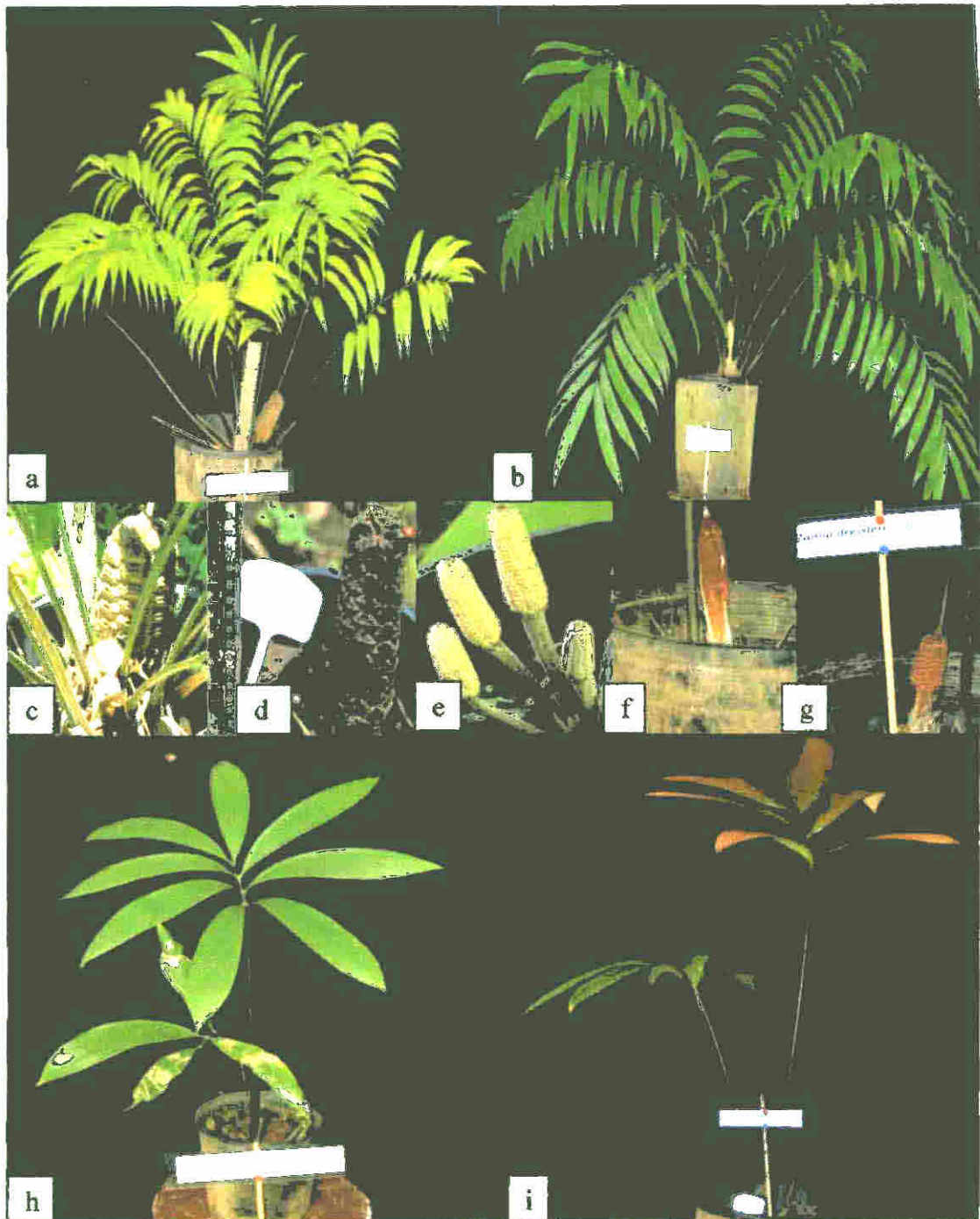


Fig. 2. (a-i). Especies de *Zamia* del estudio. a. *Z. acuminata*; b. *Z. stevensonii*; c. Cono megasporangiado de *Z. stevensonii*; d. Cono megasporangiado de *Z. acuminata*; e. Cono microesporangiado de *Z. cunaria*; f. Cono megasporangiado de *Z. cunaria*; g. Cono megasporangiado de *Z. dressleri*; h. *Z. cunaria*; i. *Z. dressleri* (Fotos tomadas por G. Valdespino).

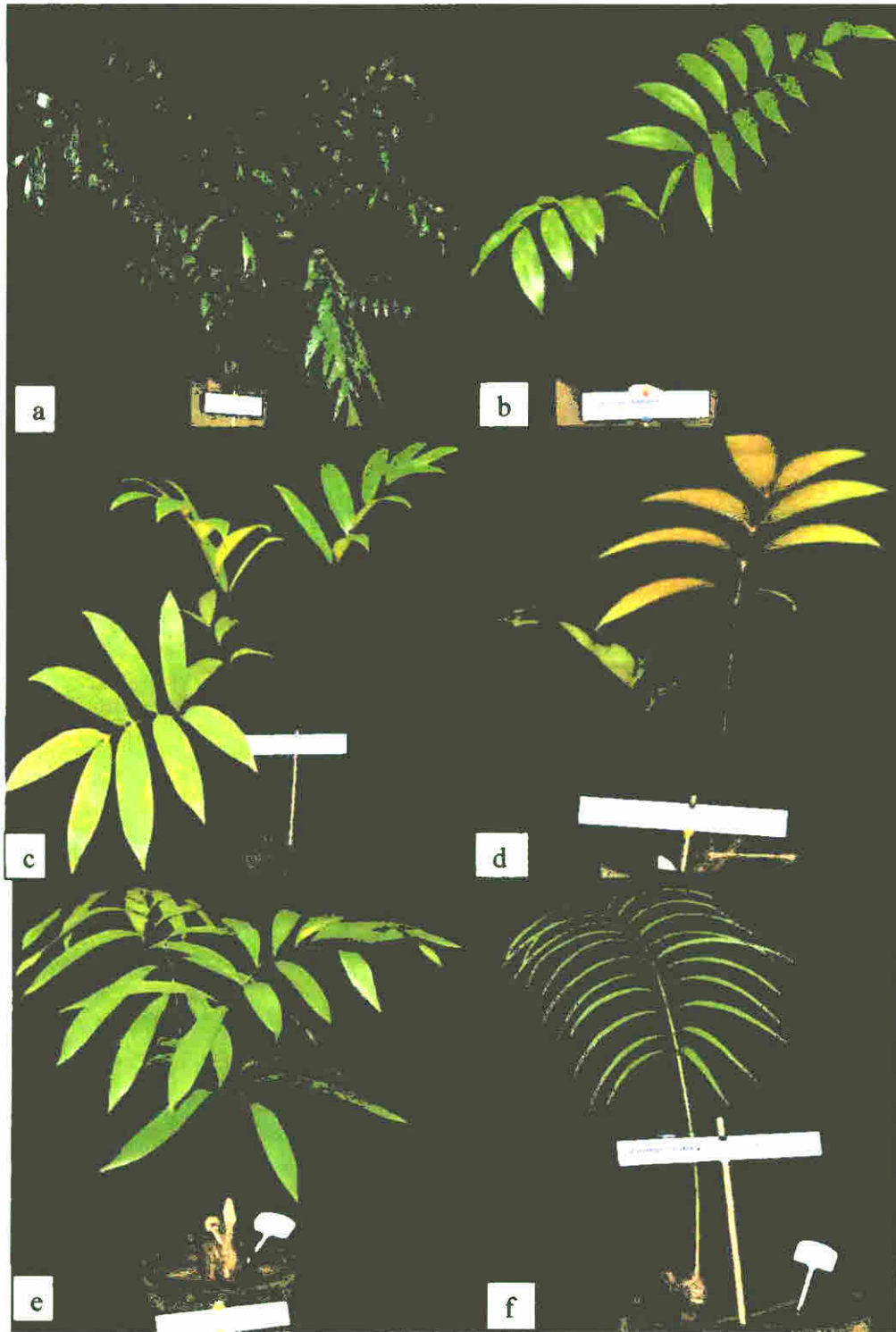


Fig. 3 (a-f). Especies de *Zamia* del estudio (continuación) a. *Z. elegantissima*; b. *Z. fairchildiana* c. *Z. cf. hamannii*; d. *Z. imperialis*; e *Z. ipetiensis*; f. *Z. lindleyi* (Fotos tomadas por G. Valdespino).

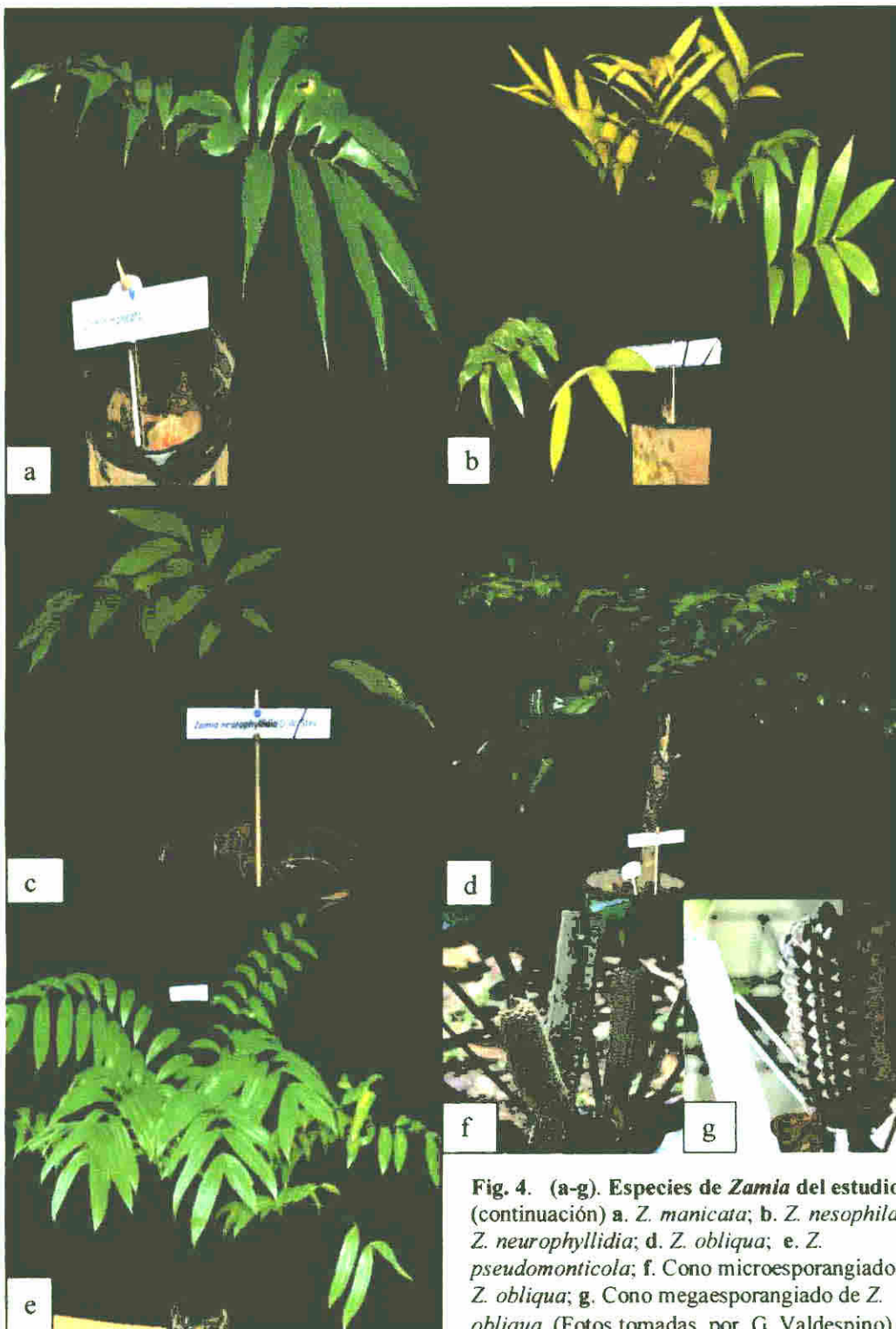


Fig. 4. (a-g). Especies de *Zamia* del estudio (continuación) a. *Z. manicata*; b. *Z. nesophila*; c. *Z. neurophyllidia*; d. *Z. obliqua*; e. *Z. pseudomonticola*; f. Cono microesporangiado de *Z. obliqua*; g. Cono megaesporangiado de *Z. obliqua* (Fotos tomadas por G. Valdespino).

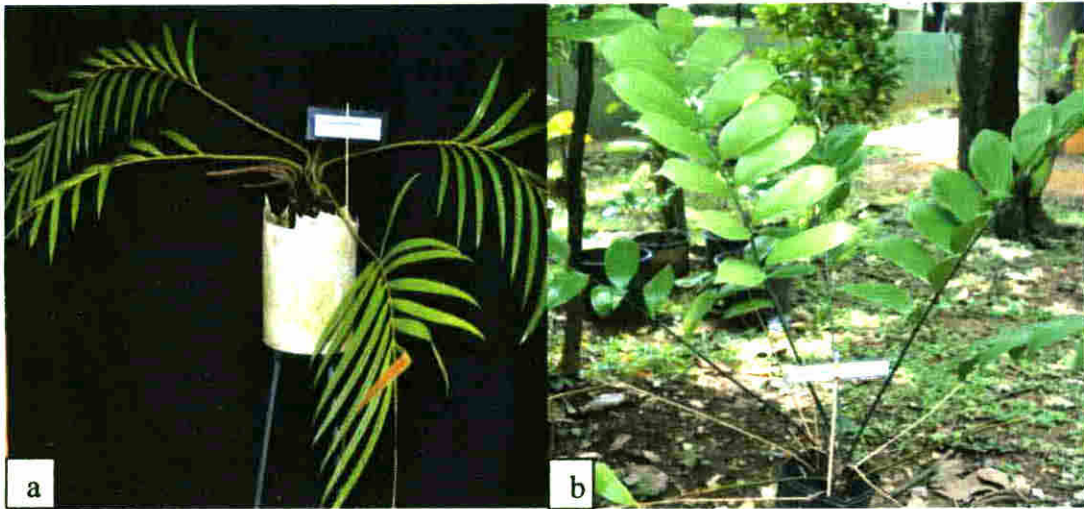


Fig. 5 (a-b). Especies de *Zamia* del estudio (continuación) a. *Z. pseudoparasitica*; b. *Z. skinneri* (Fotos tomadas por G. Valdespino).

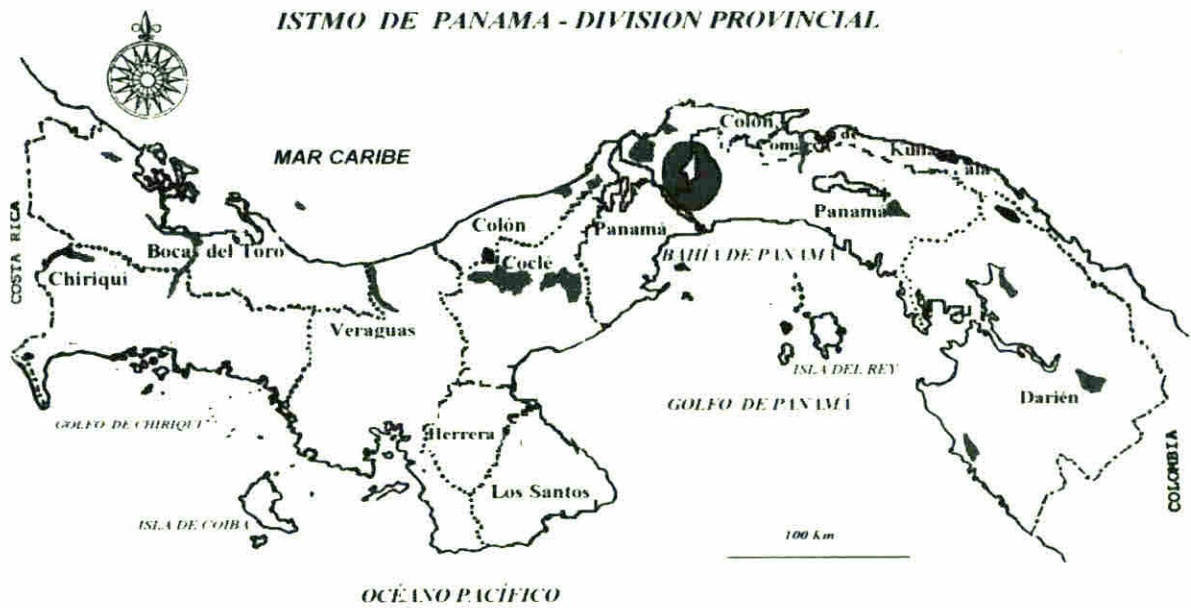


Fig. 6 Distribución de especies de *Zamia* de Panamá.

IV ASPECTOS METODOLÓGICOS

1 Colecta y secado de la muestra

Para la realización de este trabajo se colectaron muestras del Jardín Internacional de Cícadras de la Universidad de Panamá. Con el uso de guantes de hule y tijeras se colectaron hojas enteras de las 17 especies de *Zamia* (Cuadro I) Cada planta de la cual se obtuvo hojas fue enumerada y marcada con cinta reflexiva. Cada hoja fue previamente limpiada con alcohol etílico al 70 % por ambas superficies para eliminar hongos y partículas de polvo Posteriormente se obtuvieron muestras de 1cm² con el cuidado de no contaminar las muestras los instrumentos y el área de trabajo fueron desinfectados con papel toalla humedecido con alcohol al 70% Las muestras fueron colocadas dentro de bolsas plásticas con cierre hermético que contenían sulfato de calcio (Drierite) Cada bolsa fue identificada con el numero correspondiente de la muestra. El secado tomó una semana a temperatura ambiente y luego se guardaron en sobrecitos de papel manila correctamente identificados

2 Extracción y secuenciación del ADN

En el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI) se realizó el aislamiento del ADN de plantas según método estándar de QIAGEN (Anexo 2) Para la visualización del ADN genómico se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa regular (Anexo 6) Posteriormente se procedió a amplificar el intergen nuclear ITS₂ verificadas las PCR por medio de electroforesis en

gel de agarosa regular (Anexo 7), seguidamente se efectuó el corte de bandas en gel de agarosa Low Melting (Anexo 8), y se procedió a la limpieza con shepadex y finalmente se efectuaron las secuenciaciones de las corridas de ADN de cada individuo (Anexo 3).

3. Análisis de secuencias de ADN

a. Edición de secuencias

Una vez terminadas las corridas en el secuenciador de ADN (Hitachi; ABI3130; Applied Biosystems, EUA), este nos arroja datos crudos que deben ser editados manualmente por cualquier error de lectura del láser dentro de la máquina; esta edición se llevó a cabo utilizando el programa Sequencher v 4.10.1. (Gene Codes Corporation, 2006). Se importaron secuencias no editadas (extensión ab1 al programa Sequencher). Una vez importadas se alinearon secuencias de una misma región generadas con cebadores directo (ITS₃) y reverso (ITS₄) para cada muestra y se creó una secuencia consenso. Estas secuencias fueron visualizadas con el programa y editadas, en los casos necesarios, usando como referencia los cromatogramas de las mismas (Anexo 4). Después de esta edición, se generó una secuencia consenso para cada una de las muestras. Estas secuencias consenso fueron convertidas a formato fasta con el mismo programa y utilizadas para análisis filogenéticos.

b. Alineamiento

Una vez creada cada secuencia consensuada se procede a alinearla con 20 secuencia de referencia proveniente del GeneBank (<http://www.ncbi.org>) (Anexo 5), la cual nos permitió tener una mejor alineación de las muestras; dicha alineación pudo hacerse usando el programa de Se-AL (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>) el cual permite

movilizar la secuencia hacia delante o hacia atrás para alinearla con las demás
Terminada la alineación se exportaron las mismas a un archivo nexus para utilizarlo en
el siguiente programa de análisis

c **Árbol filogenético**

Las secuencias alineadas fueron importadas al programa MEGA v5 0 (Tamura et al 2011) para los análisis filogenéticos El método estadístico utilizado fue el de Neighbor Joining con *Microcycas calocoma* (Accesión en el Gen Bank AB076229) como grupo ancestral, (Crane 1988 Bogler et al. 2004 Chaw 2005) El soporte de los clados fue estimado con 1000 réplicas bootstrap (BS) y se consideró como robusto los nodos soportados con BS igual o mayor de 70 (Lecointre et al 1994)

Cuadro III ESPECIES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO LONGITUD DE LAS SECUENCIAS (PARES DE BASES PB) Y PORCENTAJE DE BASES GUANINA (G) Y CITOSINA(C) INDICADAS PARA CADA ESPECIE

Especie	Longitud del ITS₂ (pb)	GC%
<i>Zamia acuminata</i> *	428	62
<i>Zamia cunaria</i>	428	63
<i>Zamia dressleri</i>	340	66
<i>Zamia elegantissima</i>	428	63
<i>Zamia fairchildiana</i>	428	62
<i>Zamia cf hamannii</i>	428	62
<i>Zamia imperialis</i>	428	62
<i>Zamia ipetiensis</i>	428	63
<i>Zamia lindleyi</i>	428	63
<i>Zamia manicata</i>	428	62
<i>Zamia nesophila</i>	428	61
<i>Zamia neurophyllidia</i>	428	61
<i>Zamia obliqua</i>	426	62
<i>Zamia pseudomonticola</i>	427	62
<i>Zamia pseudoparasitica</i>	428	62
<i>Zamia skinneri</i>	428	61
<i>Zamia stevensonii</i>	428	62

**Zamia nana* Lindström A., Calonge, M Stevenson, D Husby C Y Taylor A. 2013

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados preliminares sobre la biología molecular de las 17 especies descritas de *Zamia* en Panamá, basados en las secuencias de la región del gen nuclear ITS₂ del ADN ribosomal, (se presentan en el Anexo 3). De las 51 muestras estudiadas, se logró secuenciar 42 muestras dando como resultado el siguiente cladograma del árbol filogenético.

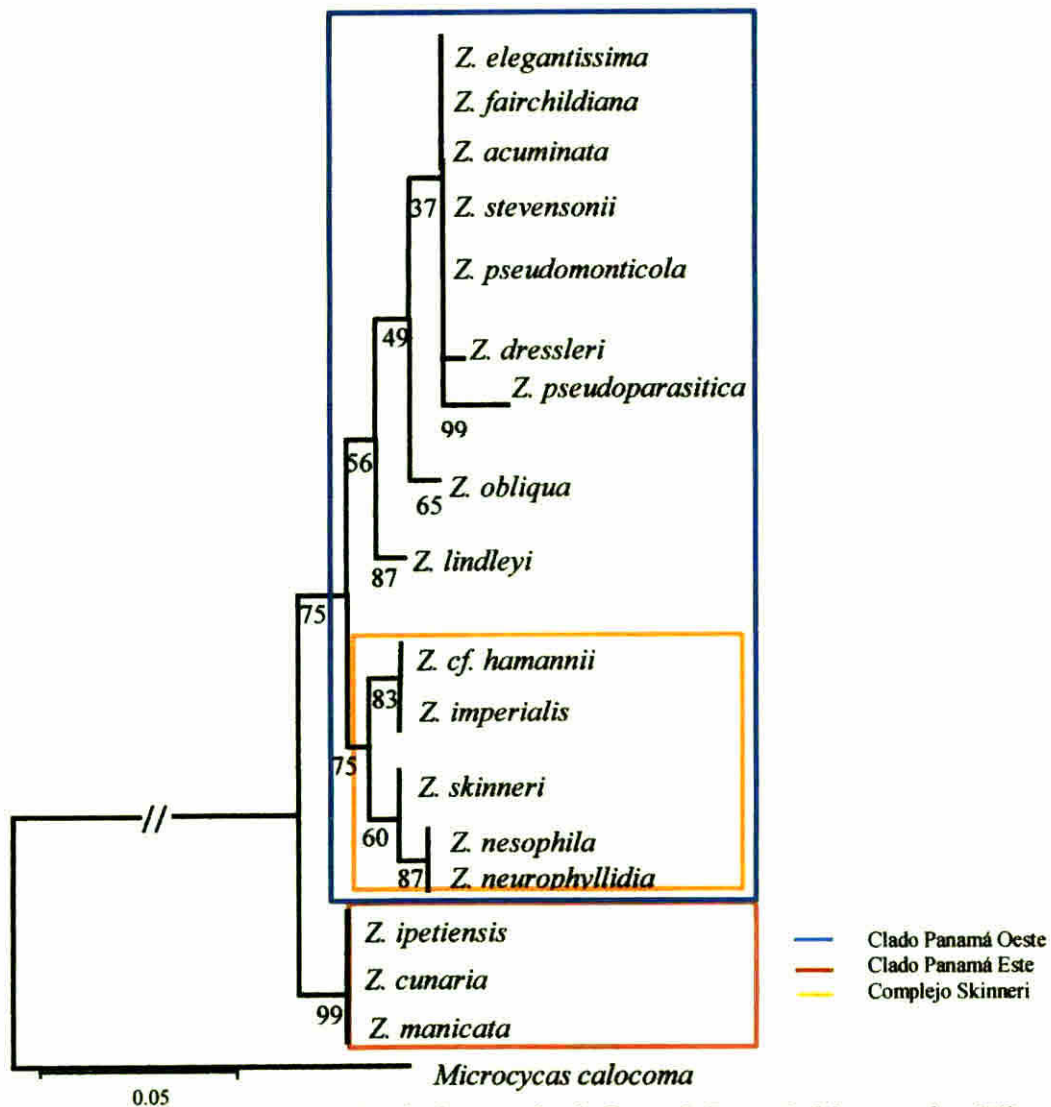


Fig. 7 Cladograma del árbol filogenético de las especies de *Zamia* de Panamá del gen nuclear ITS₂ ADN ribosomal.

Analizando el árbol filogenético se muestra dos clados (Fig 7) y utilizando a la especie *Microcycas calocoma* como grupo ancestral, define al grupo de especies de *Zamia* en un primer clado basal formado por las especies *Z. ipetiensis*, *Z. cunaria* y *Z. manicata*, con una distribución geográfica hacia el este de Panamá, y al cual hemos denominado clado Panamá este” con un valor alto de BS (Bootstrap) de 99. Las especies *Z. cunaria* y *Z. ipetiensis* presentan características vegetativas en común, este gen lo corrobora pero no las separa. La especie *Z. manicata* es morfológicamente diferente a las especies anteriores pero no sale separada en el cladograma generado.

El segundo clado con un valor de BS de 75 está conformado por el resto de las especies utilizadas en el estudio distribuidas en Panamá oeste y que incluye la región desde el centro hacia el oeste del área canalera, denominado clado Panamá oeste y dentro del cual podemos observar un grupo formado por las especies *Z. elegantissima*, *Z. fairchildiana*, *Z. acuminata*, *Z. stevensonii* y *Z. pseudomonticola* con un valor muy bajo de BS de 37. Estas especies poseen mucho en común vegetativamente y el gen analizado no las segrega en ramas independientes. La especie *Z. dressleri* se presenta separada de las especies anteriores pero sin un valor que la soporte. Formando parte de ese mismo grupo están las especies *Z. pseudoparasitica*, *Z. obliqua* y *Z. lindleyi* se encuentran en ramas definidas, con valores de 99, 65 y 87 respectivamente donde el valor de 65 está debajo del valor aceptable lo que da baja robustez a la posición de las especies *Z. obliqua*. Además es importante señalar que la especie *Z. obliqua* aunque se presenta en el clado Panamá oeste por poseer una amplia dispersión geográfica se debería presentar en ambos clados por poseer una amplia distribución a lo largo de todo el País (Cuadro I).

Formando parte de este mismo clado, en otra rama, con un valor de BS de 75 están las especies *Z. cf hamannii* y *Z. imperialis* con un valor de BS de 83 y en otra rama con un BS de 60 están *Z. nesophila* y *Z. neurophyllidia* con un valor alto de BS de 87 La especie *Z. skinneri* forma parte de dicho complejo pero se encuentra en una rama aparte En los trabajos de Caputo et al 1996 basados en datos citológicos las especies *Z. skinneri* y *Z. neurophyllidia* se presentan en un mismo clado con una raíz en comun.

Las 5 especies anteriormente mencionadas se ubican bajo el complejo "*skinneri*" con características vegetativas comunes, entre las cuales se distinguen las hojas plegadas (Taylor et al. 2008) Los resultados reportados por Caputo et al. 2004 y Taylor et al 2012a, utilizando el mismo gen nuclear combinado con atributos morfológicos de 35 especies de *Zamia* de las cuales 9 son especies de Panamá *Z. acuminata*, *Z. dressleri*, *Z. ipetiensis*, *Z. manicata*, *Z. neurophyllidia*, *Z. pseudoparasitica*, *Z. pseudomonticola*, *Z. obliqua* y *Z. skinneri* todas agrupadas en el clado llamado "clado Panamá con excepción de *Z. ipetiensis* y *Z. manicata*, ubicadas en el clado América del sur"

Antes de la publicación de la separación de especies de *Zamia* de hojas plegadas en el occidente de Panamá (Chiriquí y Bocas del Toro) (Taylor et al. 2008) lo que se daba como *Z. skinneri* era realmente *Z. imperialis* y se hablaba de *Z. skinneri* roja. Así mismo la supuesta *Z. acuminata* (Caputo et al. 1996) y la muestra de Cerro Guabal en el Valle de Antón, Panamá (Caputo et al 2004) ahora se considera una especie nueva, al restringir como endémica de Costa Rica a *Z. acuminata* (Lindstron et al en preparación) De esta manera, una parte de los especímenes de *Z. acuminata* de los trabajos de Caputo et al. 1996 y 2004 pudiese ser espécimen de Costa Rica y no de Panamá, mientras que el espécimen utilizado en los árboles que se presentan en este trabajo son de Panamá y

pertenece a *Z. nana* (Lindstron et al 2013) Así también la especie *Z. ipetiensis* que aparece en el clado de Suramérica, bien podría haber sido *Z. cumaria*, por su gran parecido morfológico de manera que pudo haber ocurrido confusión en la identificación Hoy día estas especies son tratadas como especies diferentes (Taylor et al. 2012a)

Los resultados indican que el gen ITS₂, de por sí, no es el más óptimo para hacer separación entre este grupo de especies ya que no responde a el patrón de relaciones filogenéticas más bien es congruente con su distribución geográfica. Además si se considera el criterio de la “discriminación” del tercer parámetro según el cual un segmento del genoma puede ser propuesto como región para el código de barras de ADN debe ser aceptado en consenso por distinguir la mayoría de las especies en estudio y este no es el caso

VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1 El cladograma del árbol filogenético considerando las secuencias obtenidas para la región nuclear ITS₂ resultó ser un árbol no resuelto
- 2 El árbol filogenético define dos clados uno denominado ‘Clado Panamá este’ (*Z. ipetiensis*, *Z. cunaria* y *Z. manicata*) y el otro denominado ‘Clado Panamá oeste’
En este último se ubica la mayoría de las especies en estudio (*Z. dressleri*, *Z. pseudoparasitica*, *Z. obliqua*, *Z. lindleyi*, *Z. skinneri* todas más o menos resueltas y las especies *Z. elegantissima*, *Z. fairchildiana*, *Z. acuminata*, *Z. stevensoni*, *Z. pseudomonticola*, *Z. cf hamanni*, *Z. imperialis*, *Z. nesophila* y *Z. neurophyllidia* estas últimas no resueltas
- 3 El Complejo ‘*skinneri*’ que forma parte del clado Panamá oeste (*Z. cf hamanni*, *Z. imperialis*, *Z. skinneri*, *Z. nesophila* y *Z. neurophyllidia*) muestra relación filogenética cercana entre las especies que lo conforman. Donde *Z. cf hamanni* y *Z. imperialis* al igual que *Z. nesophila* y *Z. neurophyllidia* no presenta separación entre ellas, excepto la especie *Z. skinneri* que se presenta sola en una rama.
- 4 El gen ITS₂ de por sí no es el más óptimo para hacer separación entre este grupo de especies por lo que se obtuvo un árbol filogenético no resuelto en la mayoría de las especies
- 5 Se recomienda dar continuidad a este estudio utilizando genes adicionales al ITS₂ para poder obtener una mejor definición de los clados obtenidos y adicionar la matriz morfológica (Caputo et al 2004) para obtener cladogramas integrados moleculares morfológicos

VII BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ALVAREZ I & WENDEL J F 2003 Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference *Mol Phylogenet. Evol.* 29 417-434
- ANDREASEN K, BALDWIN B G & BREMER, B 1999 Phylogenetic utility of the nuclear ITS region in subfamily Ixoroideae (Rubiaceae) comparison with cpDNA *rbcl* sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 217 119-135
- BALDWIN B G SANDERSON M J PORTER, J M WOJCIECHOWSKI, M F CAMPBELL C S & DONOGHUE, M J 1995 The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny *Ann Missouri Bot. Gard* 82:247-277
- BOGLER, D.J & ORTEGA, J F 2004 Molecular Systematic Studies in Cycads Evidence from *trnL* Intron and ITS₂ rDNA Sequences *The Botanical Review* 70(2) 260-273
- CAPUTO P COZZOLINO S GAUDIO, L MORETTI, A & STEVENSON D W 1996 Karyology and Phylogeny of some Mesoamerican Species of *Zamia* (Zamiaceae) *American Journal of Botany* 83(11) 1513-1520
- _____, COZZOLINO S DE LUCA, P MORETTI A. & STEVENSON D W 2004 Molecular phylogeny of *Zamia* (Zamiaceae) In *Cycad Classification Concepts and Recommendations* Walters, T & Osborne R (Eds) CABI Publishing ISBN 0-85199 741-4 Cambridge MA, USA. Pp 149-157
- CHAW S M WALTERS T W CHANG C C HU S H CHEN S H (2005) «A phylogeny of cycads (Cycadales) inferred from chloroplast *matK* gene *trnK* intron, and nuclear rDNA ITS region» *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37 214-234
- CHEN H YAO J HAN J LIU C SONG J 2010 Validation of the ITS₂ Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species *Plos ONE* 5(1) e8613 Doi 10.1371/journal.pone.0008613
- CHENG Y NICOLSON R.G CHAW S M 2000 Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from chloroplast *matK* genes and nuclear rDNA ITS region. *Mol. Phylogenet. Evol.* 14 353-365

- CHIOU S J YEN J H FANG C L CHEN H L & LIN T Y 2007 Authentication of medicinal herbs using PCR amplified ITS2 with specific primers *Planta Med* 73 1421–1426
- CRANE, P 1988 Major clades and relationships in higher gymnosperms In Beck, C B (Ed) *Origin and Evolution of Gymnosperms* Columbia University Press New York, pp 218–272
- _____, 1988b Phylogenetic relationships in seed plants *Cladistics* 1 329–348
- CULLINGS K W & VOGLER, D R. 1998 A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database Applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology* 7(7) 919–923 *Molecular Ecology*
- DICK, C W ABDUL-SALIM K & BERMINGHAM E 2003 Molecular Systematic Analysis Reveals Cryptic Tertiary Diversification of a Widespread Tropical Rain Forest Tree *The American naturalist* 162 6(691–703)
- GENE CODES CORPORATION 2006 Gene Codes Corporation, Ann Arbor USA
- GUSTAFSSON M H G & BITTRICH, V 2003 Evolution of morphological diversity and resin secretion in flowers of *Clusia* (Clusiaceae) insights from ITS sequence variation. *Nordic Journal of Botany* 22 183–203
- HEBERT P D N CYWINSKA, A BALL S L & DeWAARD J R. 2003 Biological identifications through DNA barcodes *Proc R. Soc London. B Biol Sci* 270 313–321
- _____, GREGORY T R. 2005 The promise of DNA barcoding for taxonomy *Syst. Biol* 54 852–859
- HILL K, D STEVENSON D W & OSBORNE R. 2007 The world list of cycads/La Lista mundial de Cicadas *Memoirs of the New Botanical Garden* 97 454–483
- HILLIS D M DIXON M T 1991 Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference *Quart Rev Biol* 66 411–453
- LECOINTRE G PHILIPPE, H VAN LE, H L & LEGUYADER, H 1994 How many nucleotides are required to resolve a phylogenetic problem? The use of a new statistical method applicable to available sequences *Mol Phylogenet. Evol* 2 292–309

- LINDSTRÖM A CALONJE M STEVENSON D HUSBY C & TAYLOR, A
2013 Clarification of *Zamia acuminata* and a new *zamia* species from Coclé
Province Panama. *Phytotaxa* 98 (2) 27-42
- LISTON A. ROBINSON W A. OLIPHANT J M 1996 Length variation in
the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non Xowering
seed plants. *Syst. Bot.* 21 109–120
- MÖLLER, M CRONK, Q C B 1997 Origin and relationships of *Saintpaulia*
(Gesneriaceae) based of ribosomal DNA internal transcribed spacer
(ITS) sequences *Amer J Bot.* 84 956-965
- MORETI, A 1990 Karyotypic data on North and Central American *Zamiaceae*
(Cycadales) and their phylogenetic implications *American Journal of Botany*
77 1016-1029
- NAGALINGUM N S MARSHALL C R. QUENTAL T B RAI, H S
LITTLE D P & MATHEWS S 2011 Recent Synchronous Radiation of a Living
Fossil *Science* 334 (6057) 796-799 DOI 10.1126/science.120996
- NICOLALDE MOREJON F 2009ª Revisión Taxonómica y Códigos de Barras de
DNA para *Zamia* L en Megaméxico Tesis Instituto de Ecología. Mexico 163
págs
-
- VOVIDES A P & STEVENSON D W 2009b
Taxonomic revision of *Zamia* in Mega Mexico *Brittonia* 61(4) 301 335
-
- VERGARA SILVA, F CONZÁLEZ ASTORGA, J
STEVENSON D W VOVIDES A P & SOSA, V 2010a. Character based
Approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combinations for
DNA barcoding *Cladistic* 26 1 15
-
- VERGARA SILVA, F CONZÁLEZ ASTORGA, J
& STEVENSON D W 2010b Character based, population level DNA
barcoding in Mexican species of *Zamia* L (*Zamiaceae* Cycadales)
Mitochondrial DNA, 21(SI) 51 59
-
- CONZÁLEZ ASTORGA, J VERGARA SILVA, F
& VOVIDES A P 2011 Perspectivas sistemática de *Zamia* (*Zamiaceae*)
Megaméxico de la Taxonomía alfa a los códigos de barras genéticos
Revista Mexicana de Biodiversidad 82 341 355

- OSBORNE R. STEVENSON D HILL K & STANBERG,L 2012 The World List of Cycads/ La Lista Mundial de Cícadas In Proceedings of the 8th International Conference on Cycad Biology Panamá, Panamá, January 2 8 2008 Memoirs of the New York Botanical Garden, Vol 106
- PENNISI, E 2007 Wanted A Barcode for Plants Science 318 190 191 www.sciencemag.org
- RATNASINHHAM S & HEBERT P D N 2007 BOLD The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org) Mol Ecol Notes doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- SASS C LITTLE D P STEVENSON D W & SPECHT C D 2007 DNA Barcoding in the Cycadales Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads PLoS ONE 2(11) e1154 doi:10.1371/journal.pone.0001154
- SCHULTZ J MAISEL S GERLACH D MÜLLER, T & WOLF M 2005 A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS 2) throughout the Eukaryota. RNA 11 361 364
- _____, & WOLF M 2009 ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics a how to manual for molecular systematics Mol Phylogenet Evol 52 520 523
- SOLTIS D E & SOLTYS P S 1998 Choosing An Approach And An Appropriate Gene For Phylogenetic Analysis pp 1-42 In Molecular systematics of Plants II DNA Sequencing Edit By Soltis D E Soltis P S Doyle J J Kluwer Academic Publisher USA
- STEVENSON D W 1989 Morphology and systematics of the Cycadales Mem. New York Bot. Gard 57 8 55
- _____, 1992 A formal classification of the extant cycads Brittonia 44.220 223
- _____, 1993 Zamiaceae in Panama with comments on phytogeography and species relationships Brittonia 45 (1) 1 16
- STOECKLE M 2003 Taxonomía, el ADN y el Código de Barras de la Vida. Ciencia Biológica 53 796 797
- STOUTHAMER, R. 2007 Herramienta para el control biológico clásico Herramientas Moleculares en Control de Plagas y Maleza por Enemigos Naturales The Forest Health Technology Enterprise Team USA. 751 p

- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- TAYLOR, A.S., HAYNES, J.L. & HOLZMAN, G. 2008. Taxonomical nomenclatural and biogeographical relevations in the *Zamia skinneri* complex of Central America (Cycadales: Zamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 158: 399-429.
- _____, HAYNES, J.L., STEVENSON, D. W., HOLZMAN, G. & MENDIETA, J. 2012a. Biogeographic Insights in Central American Cycad Biology. Pp 73-98. In: L.Stevens (ed). *Global Advances in Biogeography*. Tech Publishing, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
- _____, HOLZMAN, G. 2012b. A new *Zamia* species from the Panama Canal Area. *Bot. Rev.* Vol. 78: 335-344 DOI 10.1007/s12229-012-9105-4
- _____, HAYNES, J.L. & HOLZMAN, G. 2012c. The *Zamia skinneri* (Cycadales: Zamiaceae) complex in Panama, In: *Proceedings of S. the 8th International Conference on Cycad Biology*. Panama, Panama, January 2-8, 2008, *Memoirs of the New York Botanical Garden*, Vol. 106, Pp. 518-530.
- VOVIDES-PAPALOUKA, A., GONZALEZ-ASTORGA, J., VERGARA-SILVA, J., SOSA ORTEGA, V., STEVENSON, D., PEREZ-FARRERA, M.A., NICOLALDE-MOREJON, F. & IGLESIAS-DELFIN, C. 2011. Códigos de barras moleculares (DNA) barcoding en especies mexicanas del género *Zamia*. Instituto de Ecología, A.C. Informe final SNIB-CONABIO, GE004, México D.F.
- WILSON, G. W. 2004. The Biology and Systematics of *Bowenia* Hook ex. Hook f. (Stangeriaceae: Bowenioideae). Master (Research) Thesis, James Cook University. <http://eprints.jcu.edu.au/1270/>
- www.statmyweb.com/site/paup.csit.fsu.edu
www.ncbi.org <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>

VIII ANEXOS

Anexo 1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

a. PREPARACION DE LAS DIFERENTES ESCALERAS (LADDERS)

Debe hacer lo siguiente tome ladder que le interesaría preparar y tome las siguientes proporciones 2 2 6 es decir

2µl ladder (el que necesite)
2µl loading blue (azul para cargar)
6µl ddH₂O

b. PREPARACION DE 1M Tris-HCl pH=8.0

Tris 121.1g
ddH₂O 800.0ml
ajustar el pH con HCl, que debe ser pH=8.0 Autoclavar

c. PREPARACION DE 0.5M EDTA pH=8.0

EDTA 186.1g
ddH₂O 800.0ml
ajustar el pH con NaOH (aproximadamente como 20g de pellets)

d. PREPARACION DE LOS BUFFERES DE TBE Y TAE

• 10X TBE Regular

Mix	1.0L	4.0L
Tris	108.00g	432.0g
Boric Acid	55.00g	220.0g
EDTA	7.45g	29.8g

• 50X TAE 1L (Maniatis) pH=8.0

Mix	1.0L
Tris Base	242.0g
Glacial Acetic Acid	57.1mL
0.5M EDTA (pH=8.0)**	100.0mL

** Low EDTA reduce 1/10 the EDTA amount up to 1L

• 10X TAE

Mix	50mL
Tris Base	48.40g
Glacial Acetic Acid	11.42mL
0.5M EDTA (pH=8.0)	20.00mL

Anexo 2 METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DEL ADN HASTA SECUENCIACIÓN

a. Extracción de ADN

Paso 1 Triturar el tejido

Se pesaron 20mg de cada muestra seca en una balanza analítica, las cuales fueron colocadas dentro de tubos de 2ml con tapa de rosca que contenían vidrio molido y una bolita de cerámica en cada uno posteriormente se llevan a la centrifuga homogenizadora (Thermo Savant FastPrep FP120 Homogenizer) para triturar el tejido a 4000 rpm por espacio de 20 segundos repitiendo este mismo paso tantas veces sea necesario hasta obtener el tejido completamente pulverizado

Paso 2 Lisis celular

Una vez obtenido el tejido pulverizado se le añadieron a cada tubo 400µl de Buffer AP1 (Buffer de Lysis) y 2µl de RNasa A (solución stock 100mg/ml) mezclando muy bien todas las soluciones de forma homogénea utilizando el vórtex por unos segundos Posteriormente se colocan dichos tubos en un Baño María a 65°C para incubar las muestras por 40 minutos mezclando el contenido de 2 a 3 veces invirtiendo los tubos o pasándolos por el vórtex por unos segundos durante el tiempo de incubación.

Paso 3 Precipitar proteínas, azúcares, detergente y otros

Una vez terminado la incubación de las muestras se le agregan a cada tubo 150µl de Buffer AP2 (Buffer de precipitación, contiene ácido acético) mezclando muy bien la solución utilizando el vórtex por unos segundos Terminado esto se deja incubar en hielo por espacio de 5 minutos pasado este tiempo se lleva a la centrifuga refrigerada (Eppendorff Centrifuge 5804) a 14 000 rpm por espacio de 5 minutos

Paso 4 Remover precipitado y restos celulares

Terminado la centrifugación se pasa la muestra homogenizada a una mini columna de color lila (QIAshredder Mini Spin) que viene con un tubo colector de 2ml previamente enumerados se centrifugan los tubos a 14 000 rpm por espacio de 2 minutos obteniendo un pellet y una porción de la solución.

Paso 5 Ligación

De la porción obtenida del paso anterior se transfirieron 300µl del sobrenadante sin tocar el pellet formado a un nuevo tubo de 1.5ml enumerados previamente a cada tubo se le adicionaron 450µl de Buffer AP3/E (Binding Buffer que contiene Hidroclorito de guanidina) mezclandolo inmediatamente De los 750µl que se tienen de la mezcla anterior se transfirieron solo 650µl incluyendo el precipitado formado a una mini columna de limpieza (DNeasy Mini Spin) enumerada previamente y que viene con un tubo colector de 2ml, luego se centrifugo a 8 000 rpm por espacio de 1 minuto una vez centrifugado la porción de líquido que pasa por la columna se descartar ya que contiene residuos del buffer AP3/E de no pasar todo el líquido se debe volver a centrifugar a 8 000 rpm por espacio de 1 minuto

Paso 6 Lavado 1

Las columnas de limpieza DNeasy que contiene el ADN se colocaron sobre nuevos tubos colectores y se le añadio a cada columna 500µl de Buffer AW (Buffer de Lavado) posteriormente se centrifugo a 8 000 rpm por espacio de 1 minuto nuevamente el líquido obtenido en el tubo colector se descartar ya que contiene residuos del buffer AW

Paso 7 Lavado 2

Una vez más se añaden 500µl de Buffer AW a las columnas de limpieza DNeasy y se centrifugo a 8 000 rpm por espacio de 1 minuto descartando la fracción que pasa por la

columna; volver a centrifugar a 14,000 rpm por espacio de 2 minutos para secar toda la membrana y asegurarse que no quede residuo de etanol.

Paso. 8: Eluir el ADN

Las columnas de limpieza fueron colocadas sobre nuevos tubos de 1.5ml ya enumerados, a las columnas se les añadió 100µl del Buffer AE (Buffer de elusión) precalentado a 65°C en el baño maría, una vez añadido en la columna se dejó incubar a temperatura ambiente por espacio de 20 minutos, finalmente se centrifugo a 8,000 rpm por espacio de 1 minuto donde se obtuvieron 100 µl de ADN genómico por muestra, del cual se tomó una alícuota de 20µl para su respectivos análisis, ambos volúmenes se guardaron a -20°C.

b. Visualización del DNA genómico por electroforesis

Se visualizó el DNA genómico colocando 2µl del producto mezclado con 2µl de azul de bromofenol (Loading Buffer) y se colocó una escalera 100bp DNA Ladder (<http://www.invitrogen.com>) para determinar el tamaño de nuestra amplificación, todo esto se corrió en un gel de agarosa regular a 1.5 % preparado previamente dejándolo correr a 93 voltios por espacio de 1 hora, terminado este tiempo se llevó a la cámara (FOTODYNE incorporation, <http://www.fotodyne.com/>) bajo la luz ultravioleta (UV) (anexo 6). Para la preparación del gel, se pesaron 1.35mg de agarosa regular (SeaKem® LEAgarose, <http://www.lonza.com>) que se disolvió en 90ml de buffer TBE y se le agrego 1.5µl de bromuro de etidio, dejándolo por espacio de 30 minutos hasta que solidifique la agarosa.

c. Amplificación del gen nuclear ITS₂

Utilizando una reacción de las cadenas de polimerasa (PCR) se usó un kit comercial de la compañía Qiagen (Taq PCR Core Kit, Qiagen) con el cual se logró amplificar el gen nuclear ITS₂. Para la PCR se preparó una reacción de 25µl, usando 5µl del DNA genómico 2.5µl de cada cebador 10mM [cebador delantero ITS₃: 5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3' combinando con el cebador reverso ITS₄: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (White et al 1990)] (anexo 7) más 0.5µl de taq polimerasa 5 U/µl, 1µl de dNTPs 0.5mM 2.5µl de buffer 10X (contiene MgCl₂ 15mM) 0.25µl de BSA (Bovine Serum Albumin) 10 µg/µl se añaden 10.75 µl de agua destilada y deionizada (ddH₂O)



Fig 6 Esquema de la ubicación de primer ITS3 y el primer reverso ITS4
<http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

Una vez preparada la PCR se lleva a una máquina termocicladora (Mastercycler pro S Eppendorf, vapo protect) donde tenemos previamente un programa con distintos ciclos y tiempos a diferentes temperaturas. Dicho programa de la PCR consta de la siguiente manera: se inicia con 94°C por 5 minutos para la activación de la enzima taq polimerasa, continuando con 30 ciclos de 94°C por un minuto para la desnaturalización del DNA, 50°C por un minuto de alineamiento de los cebadores y 72°C por un minuto y 30 segundos otorgándole 3 segundos más por cada ciclo de elongación, terminando el programa con una elongación final de 72°C por 7 minutos (Sass et al (2007))

Una vez terminada la PCR los productos obtenidos se visualizan por medio de la electroforesis en un gel de agarosa de 1.5% la misma se preparó pesando 1.05g de

agarosa regular en 70ml de Buffer TBE y se le añadieron 1.5µl de bromuro de etidio, el cual ayudara a visualizar el producto obtenido del DNA usando luz UV (ver anexo 7). Una vez solidificado el gel se procede a cargar 5µl del producto de la PCR y se corre a 93volt por 30 minutos, terminado el tiempo se lleva a la cámara de FOTODYNE para tomar la foto.

d. Corte de bandas

Para cortar la bandas obtenidas en la PCR se cargó el resto del producto obtenido en un gel de agarosa low melting 1.5 % (NuSieve ® GTG ® Agarose), la cual se preparó pesando 1.05g de agarosa low melting en 70ml Buffer TAE, añadiéndole 1.5µl bromuro de etidio, posteriormente corrido el gel se procede a tomar la utilizando el sistema FOTODYNE con luz UV (anexo 8), luego se procedió al corte de las bandas obtenida de la amplificación del DNA con puntas especiales de corte (Gel Cutting tips, <http://www.midsci.com>) y se colocó el fragmento obtenido en tubos de 0.65 ml, que se llevaron a otra máquina termocicladora (Perkin Elmer Cetus) para la reacción de gelasa (GELase™ Agarose Gel-Digestion Preparation, <http://www.epibio.com>), la cual digiere todo el gel y el DNA queda disuelto en el buffer. Dicha reacción consiste en colocar los tubos 0.65ml a 70°C por 10 minutos y luego pasan a 45°C por espacio de 2 horas o toda la noche, en este momento pasados 15 minutos para estar seguros que el bloque está a 45°C se le añaden 1.2 µl de la enzima gelasa a cada muestra. NOTA: la gelasa solo es activa a 45°C, más alta temperatura se desnaturaliza la enzima, mientras que a más baja temperatura no se activa dicha enzima. Hay que estar seguros de mezclar bien la enzima antes de usarse ya que contiene glicerol y podría estar añadiendo solo glicerol y no la enzima en sí.

e. Reacción de secuenciación

Al terminar la digestión con la gelasas se procedio a preparar la reacción de ciclos de secuencia (Cycle Sequence) la cual consiste en la utilización de un kit comercial de la compañía Applied Biosystems (ABI) este kit contiene un reactivo denominado BigDye Terminator v3.1 (que contiene Buffer Taq y dNTPs marcados con fluorescencia) y adicional trae un buffer 5X. La reacción de ciclos de secuencia se preparó utilizando 1 µl de BigDye 2.5X, 2 µl de Buffer 5X y 0.4 µl del cebador 10 µM (una reacción por dirección del cebador) la cantidad de DNA que se utilizó para la reacción fue variable por lo cual se procedio a medir la cantidad de DNA obtenido en nanogramos (ng) que se necesitaban para dicha reacción, preparando un gel de agarosa regular y colocándole 5 µl del producto de la PCR y 5 µl de la escalera Low DNA Mass Ladder esta escalera indica mediante una tabla de referencia, el tamaño exacto en nanogramos que tiene el producto de PCR, por ultimo se añade lo faltante con ddH₂O para obtener un volumen final de 10 µl de la reacción. Posteriormente se lleva la reacción de ciclos de secuencia a un termociclador donde hay un programa ya establecido para dicha reacción, este consiste de la siguiente manera iniciando a 96°C por 1 minuto para activación de la enzima, seguida de 30 ciclos de 96°C por 10 segundos para la desnaturalización, 50°C por 5 segundos para anidamiento y una extensión a 60°C por 4 minutos. NOTA se podría dejar a 15°C al final si es necesario pero no es muy recomendado ya que las maquinas tienden a tener condensación y podría entrar agua al sistema eléctrico y dañarla.

f Limpieza con Sephadex y secuenciación

Terminado la reacción de ciclos de secuencia se procedio a purificar dichos productos utilizando un compuesto denominado Sephadex G 50 el mismo se preparó utilizando una

base metálica (MultiScreen 96-well Filtration Plate, <http://www.millipore.com>) en cada hoyo van 0.02g de Sephadex que serán depositados en un plato MultiScreen 96-well plates), el cual se colocara boca abajo y luego se vertira para dejar caer el Sephadex en cada hoyo, una vez en el plato se le añadiran 300µl de ddH₂O, dejándolo por espacio de 1 hora a temperatura ambiente con el fin de que el Sephadex precipite y se compacte creando una columna que funciona como filtro por donde pasaran los productos de la reacción de los ciclos de secuencia. Al finalizar el tiempo de compactación se centrifuga a 3600 rpm por 3 minutos, posteriormente se bota el agua y se le añaden nuevamente 150µl de ddH₂O para sacar cualquier burbuja que se haya formado, se centrifuga nuevamente a 3600rpm por 3min mas, luego se le añaden 10 µl de ddH₂O a la reacción de ciclos de secuencia ya que por la columna solo pasan 20µl de solución, si se coloca menos puede que todo quede retenido en la columna, se le coloca el plato que recibirá el producto final ya purificado de la reacción; posteriormente se lleva a una máquina de vacío (Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator, <http://www.thermoscientific.com>) para el secado de las muestras, dejándolos por una hora para luego resuspenderlo con un compuesto de Formamida altamente desionizada (Hi-Di™ Formamide, <http://www.appliedbiosystems.com>) dejándolos guardados a -20°C hasta ser corridos en el secuenciador automático 3130xl ABI. (anexo 3 y 4)

Anexo 3 SECUENCIAS EN BASE AL ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO 2 (ITS2)

***Zamia dressleri* 03**

AATCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTC
GCATTTGATAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTGCGGGCGATGGACCGGAGTTGGCCATCCG
TGCCTTCAGTGTTCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATACCCGTGGGTCTTGCATCCG
TGAGCGGTGGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGGATTGCTCCGGTGTGAGAA
ATGGGCGCGGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTT
GGCCAATGTGCCGTGGGCCGTGCTT

***Zamia pseudomonticola* 06**

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTGCGGGCGATGGAGCGGAKTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATACCCGTGGGTCTTGCATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGRCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAWCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCTGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

***Zamia pseudomonticola* 05**

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTGCGGGCGATGGAGCGGAKTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATACCCGTGGGTCTTGCATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGRCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAWCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCTGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

***Zamia elegantissima* 07**

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTGCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATACCCGTGGGTCTTGCATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

***Zamia elegantissima* 08**

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTGCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGYGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATACCCGTGGGTCTTGCATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia elegantissima 09

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTTCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGYGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATRCCCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia farchildiana 10

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTGTYGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAWCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia farchildiana 11

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTGTYGGGCGATGGAGCGGAKTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAWCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia farchildiana 12

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTGTYGGGCGATGGAGCGGAKTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAWCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia manicata 13

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATTAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTTCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
 GGGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCACACCCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTTGAATTGCGCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTGCTCCTTTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCGGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGCA
 TATCAATA

Zamia manicata 14

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAAATGCAGAATCCCGTGAATCATTAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCCGATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTCTGTCCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
 GGGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCACACCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCGCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTGCTCCTTGGGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCGGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia manicata 15

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATTAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCCGATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTCTGTCCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
 GGGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCACACCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCGCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTGCTCCTTGGGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCGGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia pseudoparasitica 16

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCCGATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCGTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGCGAGCGGT
 GGATCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGGACCACTCCGCCCGTCAAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAAT
 GTGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAG
 CATATCAATA

Zamia pseudoparasitica 17

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCCGATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCGTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGCGAGCGGT
 GGATCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGGACCACTCCGCCCGTCAAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAAT
 GTGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAG
 CATATCAATA

Zamia pseudoparasitica 18

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCCGATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCGTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGCGAGCGGT
 GGATCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGGACCACTCCGCCCGTCAAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAAT
 GTGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAG
 CATATCAATA

Zamia stevensonii 19

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGYGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia stevensonii 20

CGCA-GCGAAGTGCAT--ACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATC--ATCAAAT
 CTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCAT
 TTGATAG-GAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGYGCC
 TTCAGTGTTCGGTTGGCCGAAA TTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAG
 CGGTGGT TCGCCCCCTCCGG-G-G-GCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAA
 TGGGCGCGGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACT-CTGC--CCGTCAA-CCCCAGCGGTTCT
 TTGGCCAAT-GTGCCGTCCGG-CCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGC
 TGAGTTAAGCATATCAATA

Zamia stevensonii 21

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATRCCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia obliqua 22

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGTGCTTGCATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia obliqua 23

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGTGCTTGCATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia neurophyllidia 25

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCTCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGTGCGCCTGCCTATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGC
 GCGGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGACAA
 TGTGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAA
 GCATATCAAAA

Zamia neurophyllidia 26

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCTCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGTGCGCCTGCCTATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGACAAATG
 TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia hamannii 28

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia hamannii 29

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia hamannii 30

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
 AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
 TAGGAACGGCCTCGCCCCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
 GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGATCGGTGAGCGGT
 GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
 GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGCCAATG
 TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
 ATATCAATA

Zamia acuminata 31

CGCAGCGAAGT GCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCCGATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGATTTGGCCATCCGTGCCTKCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGACCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGGCG
GGTGCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCTGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia acuminata 32

CGCAGCGAAGT GCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCCGATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGATTTGGCCATCCGTGCCTKCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGACCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGGCG
GGTGCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCTGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia acuminata 33

CGCAGCGAAGT GCGATACTTGGTGTGAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCCGATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGATTTGGCCATCCGTGCCTKCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGACCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGGCG
GGTGCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCTGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia lindleyi 34

CGCAGCGAAGT GCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTCGGCCAGGGCACGGCTGCTTGGGCGTCCGATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGGCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGGCG
GGTGCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia lindleyi 35

CGCAGCGAAGT GCGATACTTGGTGTGAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTCGGCCAGGGCACGGCTGCTTGGGCGTCCGATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCCGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGGCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGGCG
GGTGCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCGAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia lindleyi 36

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCTGTCCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCAAGCGGTTCTTTGGCCAAATG
TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia nesophila 37

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCTCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGTGCGCCTGCCTATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGC
GCGGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCAAGCGGTTCTTTGGACAA
TGTGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAA
GCATATCAATA

Zamia nesophila 38

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCTCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGTGCGCCTGCCTATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGC
GCGGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCAAGCGGTTCTTTGGACAA
TGTGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAA
GCATATCAATA

Zamia nesophila 39

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCTCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGTGCGCCTGCCTATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGC
GCGGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCAAGCGGTTCTTTGGACAA
TGTGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAA
GCATATCAATA

Zamia ipetiensis 40

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCTCTGTCCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
GGGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCACACCGGTGGGTCTTGCATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCGCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCTCCTCCTGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCAAGCGGTTCTTTGGCCAAAG
TGCCGTCCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia petiensis 42

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATTAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCTCTGTGCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
GGGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCACACSCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTTGATTGCGCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCTCCTCCTTGCAGCCACTCTGCCCGTCAACCCCGGCGGTTCTTTGGCCAACG
TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCAGCCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia cunaria 43

CGCAGCGAAGTGAGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATTAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCTCTGTGCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
GGGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCACACSCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTTGATTGCGCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCTCCTCCTTGCAGCCACTCTGCCCGTCAACCCCGGCGGTTCTTTGGCCAACG
TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCAGCCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia cunaria 44

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATTAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCTCTGTGCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
GGGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCACACSCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTTGATTGCGCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCTCCTCCTTGCAGCCACTCTGCCCGTCAACCCCGGCGGTTCTTTGGCCAAYG
TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCAGCCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia cunaria 45

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATTAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCTCTGTGCGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGCGCCTTCA
GGGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCACACCCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTTGATTGCGCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCTCCTCCTTGCAGCCACTCTGCCCGTCAACCCCGGCGGTTCTTTGGCCAACG
TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCAGCCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

Zamia imperialis 46

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAAATGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCCGGCCAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCCGTGGGTCTTGCAATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCTCCTCCTCGAGCCACTCTGCCCGTCAACCCCGGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTGCGGCCGTGCTTTGCGACCCAGGTCAGGCGAGAGCAGCCCGCTGAGTTAAGC
ATATCAATA

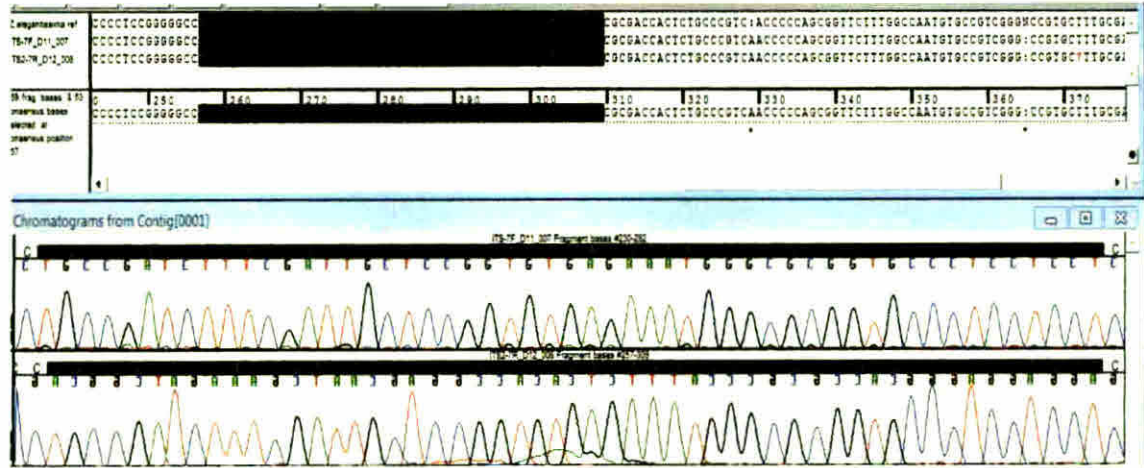
Zamia imperialis 47

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCGTGGGTCTTGATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGCCAATG
TGCCGTGCGGCCGTGCCTTGCAGCCCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTTAAGC
ATATCAATA

Zamia skinneri 50

CGCAGCGAAGTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCAAATCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCGGCCTAGGGCACGGCTGCCTGGGCGTCGCATTTGA
TAGGAACGGCCTCGCCCCCAGTTGGGCGATGGAGCGGAGTTGGCCATCCGTGCCTTCA
GTGTTCCGGTTGGCCGAAATTGGTGCGGCATAACCGTGGGTCTTGATCGGTGAGCGGT
GGTTCGCCCTCCGGGGGCCTGCCGATCTTTCGATTGCTCCGGTGTGAGAAATGGGCGC
GGTGCCCTCCTCCTCGCGACCACTCTGCCCGTCAACCCCCAGCGGTTCTTTGGACAATG
TGCCGTGCGGCCGTGCCTTGCAGCCCCAGGTCAGGCGAGAGCACCCGCTGAGTTTAAGC
ATATCAATA

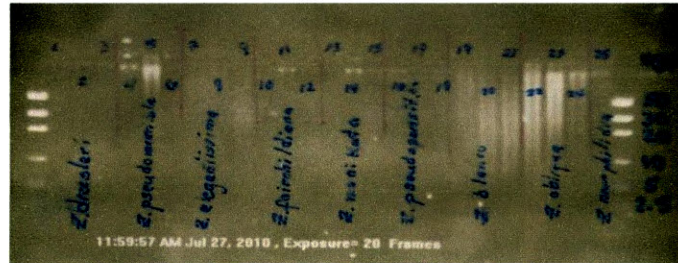
Anexo 4. ELECTROFÉROGRAMA MOSTRANDO UNA PARTE DE LA SECUENCIA DE *Z. ELEGANTISSIMA* , DESDE LA POSICIÓN 257 a la 309 pb



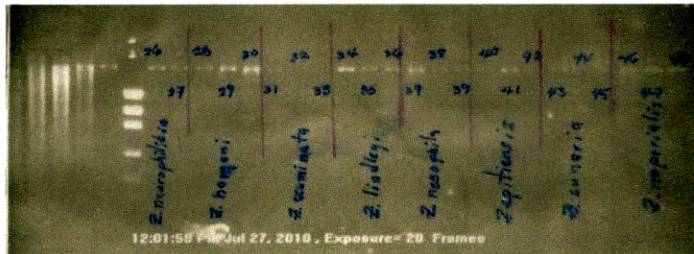
Anexo 5 LISTAS DE ESPECIES DE ZAMIA TOMADAS DEL GENBANK, USADAS COMO REFERENCIA EN EL ALINEAMIENTO DE LAS ESPECIES DE ZAMIA DE PANAMÁ (ITS₂)

Numero de accesión del GenBank	Especies de <i>Zamia</i>
GU807352 1	<i>Z. cremnophila</i>
GU807353 1	<i>Z. cunaria</i>
GU807354 1	<i>Z. fischeri</i>
GU807355 1	<i>Z. furfuracea</i>
GU807356 1	<i>Z. herrerae</i>
GU807357 1	<i>Z. integrifolia</i>
GU807358 1	<i>Z. katzeriana</i>
GU807359 1	<i>Z. lacandona</i>
GU807360 1	<i>Z. loddigesii</i>
GU807361 1	<i>Z. manicata</i>
GU807362 1	<i>Z. paucijuga</i>
GU807363 1	<i>Z. polymorpha</i>
GU807364 1	<i>Z. prasina</i>
GU807365 1	<i>Z. purpurea</i>
GU807366 1	<i>Z. socomuscensis</i>
GU807367 1	<i>Z. spartea</i>
GU807368 1	<i>Z. standleyi</i>
GU807369 1	<i>Z. tuerckheimii</i>
GU807370 1	<i>Z. variegata</i>
GU807371 1	<i>Z. vazquezii</i>

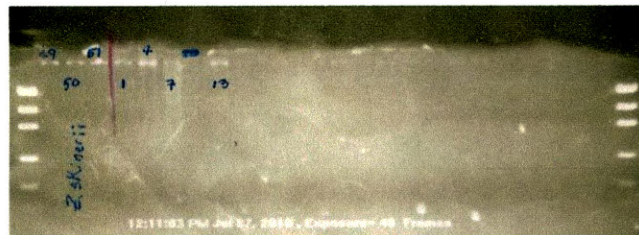
Anexo 6. VISUALIZACIÓN ADN GENOMICO



Muestras: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25



Muestras: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 y 48.



Muestras: 49, 50, 51, 1, 4, 7, 10 y 13

Anexo 7. VISUALIZACIÓN DE LAS PCR EN AGAROSA NORMAL



Muestras: 1, 4, 6, 7, 11, 15 y 17 y negativo.



Muestras: 2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 16, 18, 19, 20 y 21



Muestras: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, y 35

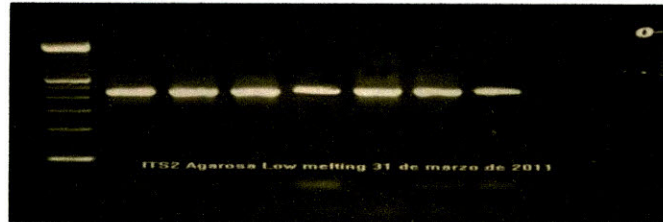


Muestras: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 42, positivo y negativo.

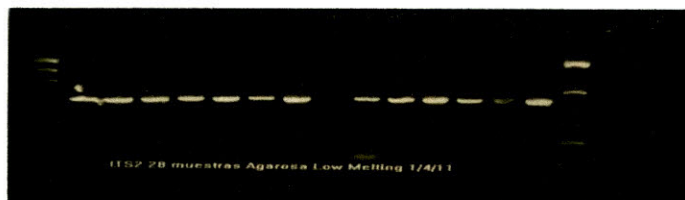


Muestras: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, positivo y negativo

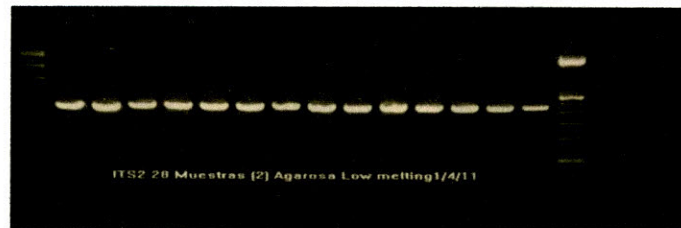
Anexo 8. VISUALIZACIÓN DE ADN EN AGAROSA LOW MELTING PARA CORTAR BANDAS



Muestras: 1,4, 6, 7, 11, 15 y 17



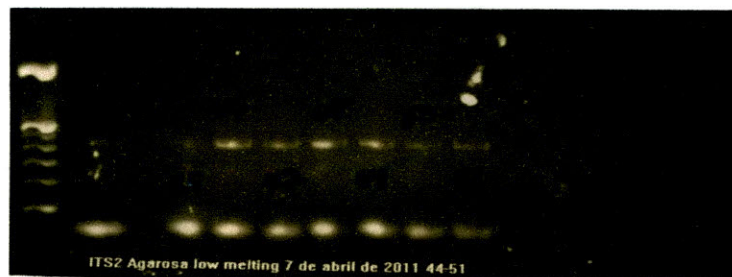
Muestras: 2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16,18,19, 20 y 21



Muestras: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35



Muestras: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43



Muestras: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 y 51