

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN CITOGÉNÉTICA DE ESPECIES DE CÍCADAS DE
PANAMÁ (*Zamia* L.: CYCADALES: ZAMIACEAE).**

YANILKA Y. ORTEGA T.
CÉDULA: 8 - 482 802

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2020

DEDICATORIA

Al único y verdadero Dios, por darme las fuerzas necesarias y la esperanza que no avergüenza para continuar, y lograr lo que Él ha preparado de antemano para mí; a mi familia, profesores, compañeros y amigos, a todas las personas que me apoyaron para hacer realidad esta investigación, en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

AGRADECIMIENTO

Al equipo de profesores del Programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología de la Universidad de Panamá, quienes han dedicado tiempo de calidad para la preparación y ejecución de este programa.

Al Ministerio de Educación por todo el apoyo brindado para culminar este programa.

A los profesores Dr. Alberto Taylor, Dr. Carlos Ramos y Dra. Magaly Sánchez de Chial por su apoyo docente y conocimientos brindados para la culminación de este trabajo de graduación.

Al profesor Jorge Mendieta, por compartir sus conocimientos y proporcionar el apoyo necesario para el uso de algunos ejemplares de *Zamia*, pertenecientes a este Jardín.

A los Profesores del Departamento de Genética y Biología Molecular por todo el apoyo necesario, por estar pendientes y animarme a finalizar mi proyecto de tesis.

A todos mis profesores, alumnos y amigos de la escuela de Biología, quienes me dieron ánimo para continuar.

A mi madre y mi hermana por su ayuda incondicional siempre durante este tiempo de trabajo, a mis familiares y amigos, por su apoyo espiritual.

ÍNDICE GENERAL

	Página
HOJA DE PRESENTACIÓN	i
HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
REVISIÓN DE LITERATURA	8
ASPECTOS METODOLÓGICOS	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFÍA CITADA	39
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Pretratamiento utilizado para detener la división celular en metafase.....	26
Tabla 2 Porcentaje de células en división celular y metafase de <i>Zamia dressleri</i>	30
Tabla 3 Efecto del pretratamiento en muestras de <i>Zamia</i>	31
Tabla 4 Medidas promedio de longitud de cromoosmas de <i>Zamia dressleri</i>	36
Tabla 5 Medidas promedio de longitud de cromosomas de <i>Zamia dressleri</i>	37
Tabla 6 ANOVA I del porcentaje de metafases de pretratamiento probados en <i>Zamia</i>	47
Tabla 7 ANOVA I del porcentaje de metafases de pretratamiento probados en <i>Zamia</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Material de estudio de <i>Zamia</i>	29
Figura 2. Cromosomas de <i>Zamia dressleri</i> vistos en el periodo de las 12:30 p. m.....	29
Figura 3. Esporocitos de <i>Zamia ipetiensis</i> en división celular.....	30
Figura 4. Tejido meristemático de hojas de <i>Zamia imperialis</i> colectados a las 12:30 p. m.	31
Figura 5. Tejido meristemático de hojas de <i>Zamia hamannii</i> colectados a las 12:30 p. m.	31
Figura 6. Esporocitos de <i>Zamia ipetiensis</i> tratadas con Colcemid.....	32
Figura 7. Cromosomas de <i>Zamia ipetiensis</i> tratados con temperatura baja.....	33
Figura 8. Cromosomas de <i>Zamia stevensonii</i> tratados con temperatura baja.	34
Figura 9. Cariotipo de <i>Zamia dressleri</i>	35
Figura 10. Pares homólogos del cariotipo de <i>Zamia dressleri</i>	35
Figura 11. Cariotipo de <i>Zamia imperialis</i>	36
Figura 12. Pares homólogos del cariotipo de <i>Zamia imperialis</i>	36

I RESUMEN

La caracterización citogenética de especies de cícadas de Panamá no ha sido esclarecida, debido a confusiones de ubicación geográfica y taxonómica, además se han identificado nuevas especies. Con el propósito de estudiar el número y la morfología de los cromosomas de las cícadas de Panamá, se colectaron raíces, hojas y conos polínicos en crecimiento de *Z. stevensonii*, *Z. dressleri*, *Z. hamannii* y *Z. imperialis*; se determinó la hora de mayor actividad mitótica, la efectividad del colcemid comercial, el agua helada y la solución Farmer a temperaturas bajas como pretratamiento para detener la mayor cantidad de células en metafase; y se determinó el número cromosómico a partir de las mejores placas metafásicas. La hora de mayor actividad mitótica y metafásica es el periodo de las 12:30 p. m. La solución comercial colcemid y el agua helada son inefectivos para detener las células en metafases, la solución Farmer a 4 °C seguida de -4 °C durante 48 horas es efectivo para obtener cromosomas condensados dispersos adecuadamente, pero con resolución inadecuada para observar con claridad las constricciones secundarias de todos los cromosomas. Este estudio permitió determinar el número cromosómico de *Z. dressleri* $2n=18$ y *Z. imperialis* $2n=22$, los cuales fueron consistente con el rango de números cromosómicos establecidos para las especies del género *Zamia*.

I ABSTRACT

The cytogenetic characterization of cycad species from Panama has not been clear, due to confusion of geographic and taxonomic location, in addition, new species have been identified. In order to study the number and morphology of the chromosomes of the cycads of Panama, growing roots, leaves and male cones of *Z. stevensonii*, *Z. dressleri*, *Z. hamannii* and *Z. imperialis* were collected; the time of greatest mitotic activity, the effectiveness of commercial colcemid, ice water and the Farmer solution at low temperatures was determined, as a pretreatment to stop as many cells in metaphase; and the chromosomal number was determined from the best metaphase plates. The hour of greatest mitotic and metaphase activity is the 12:30 p. m. period. The commercial solution colcemid and ice water are ineffective to stop cells in metaphases, the Farmer solution at 4 °C followed by -4 °C for 48 hours is effective to obtain properly dispersed condensed chromosomes, but with inadequate resolution to clearly see the secondary constrictions of all chromosomes. This study allowed to determine a chromosomal number of *Z. dressleri* $2n = 18$ and *Z. imperialis* $2n = 22$, which were consistent with the range of chromosomal numbers established for the species of the genus *Zamia*.

II INTRODUCCIÓN

Las cícadas son plantas con semillas desnudas, sin flores, dioicas, que han existido desde la era Paleozoica, hace más de 300 millones de años y han sobrevivido hasta el presente (Calonje, Stevenson y Stanberg, 2020; Esquivel, 2014).

Las cícadas se ubican taxonómicamente dentro de la clase Gymnospermae, subclase Cycadidae (Cycadophyta o cycadas), orden Cycadales. El orden Cycadales presentan dos familias: Cycadaceae y Zamiaceae. La familia Zamiaceae posee 9 géneros, agrupados en 2 subfamilias: subfamilia **Zamioideae** a la que se le asignan los géneros *Zamia*, *Mycrocycas* y *Ceratozamia* (se excluye a *Chigua* debido a que sus especies quedaron como *Zamia restrepoi*) y la subfamilia **Encephalartoideae** con los géneros *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Dioon*, *Macrozamia*, *Bowenia* y *Stangeria* (Christenhusz, Reveal, Farjon, Gardner y Chase 2011; Esquivel, 2014; Stevenson, 2001).

Esquivel (2014), afirma que “las especies de la familia *Zamiaceae* tienen una amplia distribución mundial a nivel de las regiones tropicales y subtropicales de Asia, África, Australia y América incluyendo las Antillas. El género *Zamia*, con 81 especies, es el más numeroso de la familia (Calonje, Stevenson y Osborne, 2020).

Las cícadas están representadas en Panamá solamente por el género *Zamia*, solo las provincias de Herrera y los santos carecen de poblaciones de cícadas, debido (más que por una deficiencia natural) a la destrucción de su hábitat para la agricultura y la ganadería hace cientos de años, (Taylor, Haynes, Holzman y Mendieta, 2007; Haynes, Stevenson, Holzman y Mendieta, 2012).

Existen 17 especies del género *Zamia* descritas para Panamá (Calonje, Stevenson, Osborne, 2020; Taylor, Haynes, Stevenson, Holman y Mendieta, 2012). De estas especies, 70 % son endémicas de Panamá, y 94 % están incluidas en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2020). La distribución y estado de conservación de cada especie del género *Zamia* descritas para Panamá son las siguientes:

1. *Z. cunaria* Dressler & D.W.Stev., es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, vulnerable (VU).
2. *Z. dressleri* D.W.Stev., es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, en peligro de extinción (EN).
3. *Z. obliqua* A.Braun, es una especie distribuida en Colombia, Costa Rica y Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes y en bosques de tierras bajas. Estado de conservación: casi amenazadas (NT).
4. *Z. pseudoparasitica* J.Yates, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques, tanto de tierras bajas cerca del mar como submontano siempre verdes. Estado de conservación: casi amenazada (NT).
5. *Z. nana* A.Lindstr., Calonje, D.W.Stev. & A.S.Taylor, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas y altas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, en peligro de extinción (EN).
6. *Z. imperialis* A.S.Taylor, J.L.Haynes & Holzman, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas y altas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, en peligro crítico de extinción (CR).
7. *Z. hamannii* A.S.Taylor, J.L.Haynes & Holzman, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, en peligro crítico de extinción (CR).
8. *Z. nesophila* A.S.Taylor, J.L.Haynes & Holzman, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, en peligro crítico de extinción (CR).
9. *Z. skinneri* Warsz, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, en peligro de extinción (EN).
10. *Z. neurophyllidia* D.W.Stev. es una especie distribuida en Costa Rica, Nicaragua y Panamá. Crece en bosque de tierras bajas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, vulnerable (VU).

11. *Z. elegantissima* Schutzman, Vovides & R.S.Adams, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes. Estado de conservación: amenazada, en peligro de extinción (EN).
12. *Z. stevensonii* A.S.Taylor & Holzman, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas semidecíduos. Estado de conservación: amenazada, en peligro crítico de extinción (CR).
13. *Z. pseudomonticola* L.D.Gómez ex D.W.Stev. & Sabato. se distribuye en Costa Rica y Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes submontano. Estado de conservación: casi amenazadas (NT).
14. *Z. fairchildiana* L.D.Gómez, se distribuye en Costa Rica y Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes. Estado de conservación: casi amenazadas (NT).
15. *Z. lindleyi* Warz, es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques siempre verdes submontano. Estado de conservación: datos insuficientes (DD).
16. *Z. ipetiensis* D.W.Stev., es una especie endémica de Panamá. Crece en bosques de tierras bajas siempre verdes y en bosques de tierras bajas semidecíduos. Estado de conservación: amenazada, en peligro de extinción (EN).
17. *Z. manicata* Linden ex Regel, su distribución abarca Colombia y Darién. Estado de conservación: casi amenazadas (NT).

1. Planteamiento del problema

La identificación de los cromosomas es más que un reto para muchas especies de plantas (Chen y Li, 2005). El cariotipo de varias especies del género *Zamia*, incluyendo especies provenientes de Panamá, ha sido estudiado en diversas investigaciones, reportando un amplio rango de números cromosómicos, $2n = 16$ a $2n = 28$ y variación en el número de cromosomas interespecífico e intraespecífico (Caputo, Cozzolino, Gaudio y Moretti, 1996; Moretti y Stevenson, 1996; Moretti y Sabato, 1984; Moretti, Caputo, Gaudio y Stevenson 1991; Norstog, 1980; Schutzman, Vovides y Dehgan, 1998; Tagashira y Kondo, 1999). Sin embargo, en algunos casos se presentan dudas sobre la identificación taxonómica de la planta utilizada y de su localización. Además, en Panamá se han descrito nuevas especies de *Zamia* (Lindström, 2009; Lindström, Calonje, Stevenson, Husby y Taylor, 2013; Taylor,

Haynes y Holzman, 2008; Taylor, Haynes y Holzman, 2012). Por tanto, es importante caracterizar la dotación cromosómica de las especies de *Zamia* identificadas en Panamá, para posteriormente demostrar si poseen variación en su cariotipo. Los resultados de este tipo de estudio son importantes para ayudar a esclarecer la correlación entre el rasgo cariotípico y los caracteres fenotípicos de *Zamia*; ya que, Moretti *et al.*, (1991) afirman que: “aún no están claras las características citogenéticas de *Zamia*, incluyendo los detalles de su morfología cromosómica, los mecanismos de rearrreglos cromosómicos que producen la diversificación en sus cromosomas; así como la correlación entre el cariotipo y los caracteres del fenotipo”. Esta clase de estudios servirá de apoyo a otros estudios previos para establecer una relación filogenética de las especies de *Zamia* provenientes de Panamá (ejemplo: Caballero, 2014).

Además en los estudios previos del cariotipo de *Zamia* se han utilizado pretratamientos inadecuados por su alta toxicidad para el ser humano, por impedir la identificación correcta de la morfología precisa de algunos cromosomas (ejemplo: cromosomas acrocéntricos de brazos muy pequeños y heterocromáticos), o por causar daños a los cromosomas que resultan frágiles al tratamiento; por lo cual, se hace necesario ensayar una técnica alternativa que minimice el riesgo de efectos adversos, que permitan identificar la morfología precisa de todos los cromosomas y que conserven los cromosomas en buen estado (Caputo, *et al.*, 1996; Marchant, 1968; Moretti y Sabato, 1984; Moretti, 1990 a; Moretti, 1990b; Norstog, 1980; Norstog, 1981; Pérez, Vovides, Martínez, Gómez y Galicia, 2012).

2. Importancia del estudio

Esta investigación es importante como soporte para documentar la descripción y legitimar el concepto de nuevos taxones del género *Zamia*. También permitirá justificar los planes de conservación de hábitat, protección y propagación de las especies de este género. Mediante la descripción de los cromosomas (citogenética clásica) de las especies de *Zamia* reportadas para Panamá, se creará información actualizada, que servirá de punto de partida para otros estudios, incluyendo la incorporación de técnicas que permiten el análisis molecular de los cromosomas (citogenética molecular). La citogenética clásica es necesaria

para incorporar la citogenética molecular, ambas contribuyen a los estudios taxonómicos, evolutivos y de genómica estructural y funcional, aplicables en procesos de mejoramiento genético convencionales o biotecnológicos (Xiqués, 2002; Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp y Mroginski, 2010). Además, en Panamá, no existe un estudio que compare el cariotipo de todas las especies del género *Zamia*, proveniente de Panamá, ni el uso de la técnica de temperaturas bajas como alternativa para el pretratamiento en la caracterización citogenética.

3. Utilidad o importancia de las especies de *Zamia*

Todas las especies de *Zamia* producen coronas foliares, lo que las hace muy aptas para decorar jardines (*Zamia*, s.f.). Esquivel (2014) afirma que: “Las especies de *Zamia* son importantes económicamente, la mayoría de los viveros las ofrecen a sus compradores”. Taylor (2012) afirma: “En Panamá, los grupos indígenas generalmente usan las cícadras para curar y como remedio para trastornos estomacales “-

Las cícadras, son el grupo de plantas superiores más primitivas y antiguas, las cuales poseen gran diversidad de hábitos y morfología; por tanto, son útiles para diversos estudios que contemplen, relaciones filogenéticas, estudios evolutivos, estudios de biodiversidad o estudios biogeográficos que nos ayuden a comprender diversas situaciones biológicas, incluyendo los mecanismos que están envueltos en la diversidad cariotípica (Taylor, *et al.*, 2007). Holzman y Haynes (2004) afirman que: “estas plantas están entre las más hermosas y asombrosas de todas las cícadras de América Central”.

Objetivos

Objetivo general:

Analizar la cariología de especies de *Zamia* provenientes de Panamá.

Objetivos específicos:

- Estandarizar un tratamiento efectivo para estudiar el número y la morfología de los cromosomas de las especies de cíadas de Panamá.
- Evaluar la utilidad de las temperaturas bajas como pretratamiento para detener las células en metafase.
- Determinar el número y morfología cromosómica de especies de cíadas estudiadas.

Hipótesis de trabajo

Hipótesis científica:

Las especies de cíadas de Panamá, analizadas en este estudio, poseen número cromosómico dentro del rango $2n=16$ a $2n= 24$.

5 (b). Hipótesis Nula:

Las especies de cíadas de Panamá, analizadas en este estudio, no poseen número cromosómico dentro del rango $2n=16$ a $2n= 24$.

III REVISIÓN DE LA LITERATURA

1. La citogenética, citotaxonomía y cariotipo

Según Xiqués, (2002) “la citogenética puede definirse como la ciencia que estudia el cromosoma bajo cualquier nivel y dimensión, para analizar y explicar cómo la estructura y comportamiento de los cromosomas garantizan la triple función de conservar la información genética entre las células de un organismo pluricelular, transmitirla de padres a hijos y expresarla de forma ordenada para controlar las funciones celulares”.

Según Aiassa (2015): “la citogenética como disciplina, ha existido desde 1,800, y se considera su comienzo oficial en 1956 con los investigadores Tjio y Levan, quienes pudieron ver y contar los cromosomas como algo diferente a una masa de líneas vermiformes.

La citogenética tiene por objeto el estudio de los aspectos de la genética que pueden ser observados mediante el microscopio. Como ciencia, la citogenética nace de la necesidad de relacionar los hechos descritos por la genética con los fenómenos que ocurren dentro de la célula. Aunque la citogenética históricamente surge como una ciencia híbrida entre la citología y la genética, conforme transcurrió el tiempo invadió el campo de otras ciencias y ha combinado diferentes técnicas citogenéticas (cariotipo, citogenética de flujo, análisis electroforético del cariotipo, citometría, hibridación *in situ* etc.), las cuales han permitido la caracterización de la variabilidad genética obtenida por diferentes vías, empleándolas con fines beneficiosos y como punto de partida de otros estudios. (Sáez y Cadoso, 1978; Xiqués, 2002). Así, diversos autores establecen dos modalidades o periodos en el estudio de la citogenética: la clásica y la molecular (Poggio, *et al.*, 2010). Según Poggio, “La citogenética clásica proporciona diferente nivel de análisis que la citogenética molecular, y ambas contribuyen a los estudios taxonómicos, evolutivos y de genómica estructural y funcional, aplicables en procesos de mejoramiento genético convencionales o biotecnológicos”.

La citogenética clásica es principalmente descriptiva, entre sus principales estudios figuran: la determinación de las características del cariotipo, la identificación cromosómica utilizando técnicas de tinción convencionales y bandeo cromosómico, evaluación del tamaño del cromosoma, análisis del comportamiento meiótico de los cromosomas en razas, especies, híbridos y poliploides. La citogenética molecular, combina información citológica clásica con información molecular de las secuencias, incorporando técnicas que permiten el análisis molecular y funcional de diferentes estructuras del cromosoma, así como del ciclo de división celular. Además, estas técnicas moleculares, aplicadas en citogenética, también permiten realizar estudios de mapeo y de distribución física de secuencias, analizar relaciones evolutivas entre especies y estudiar la organización del genoma y la arquitectura nuclear (Poggio, *et al.*, 2010; Xiqués, 2002).

La citogenética ha sido relevante en la rama de la taxonomía; ya que ha tenido incidencia en la resolución de problemas taxonómicos (Candan, 2013). La taxonomía moderna utiliza evidencia citológica basándose en el número cromosómico, morfología del cromosoma, comportamiento en meiosis y en formas aberrantes de reproducción. A esta aplicación que es una parte de la taxonomía experimental, basada en citología se le conoce como citotaxonomía. La citotaxonomía toma en cuenta aspectos citológicos, estudio de citogenética y aspectos clásicos de taxonomía. Así, la citotaxonomía constituye una herramienta exitosa en la clasificación de plantas y en estudios taxonómicos, particularmente en la determinación de categorías de género, especies y subespecies en casos controversiales de plantas con afinidad (Verma y Pandey, 2013).

Candan (2013), afirma que “la citotaxonomía es una disciplina secundaria que refuerza los principios de taxonomía de plantas y animales para establecer relaciones filogenéticas, y consiste en la aplicación de los datos citológicos en taxonomía. Además, la citotaxonomía estudia las características morfológicas y citológicas de los organismos relacionados con su número cromosómico y estructura del cromosoma (cariotipo)”.

El cariotipo es distintivo para cada especie, es la caracterización morfológica del complemento cromosómico en metafase, incluyendo el análisis del número, el tamaño y la forma del cromosoma (Gianfranco, Ravalli y Cremonini, 2008; International System for Human Cytogenetics Nomenclature (ISCN), 2005; Lodish, *et al.*, 2000; Xiqués, 2002).

Según Guerra (2008), “el cariotipo es el resultado final de muchas fuerzas que actúan en el genoma a niveles estructurales, organizacionales y funcionales, intentando hacerlo capaz de emparejar con la mitosis, la meiosis y los diversos estados funcionales de las células en la interfase durante toda la vida del organismo. Aunque el cariotipo es parte del fenotipo de la planta, como la morfología floral o el patrón isoenzimático, este difiere de los otros aspectos del fenotipo en que es el material genético mismo y muestra una vista global de la organización genómica”.

La organización genómica en los cromosomas es determinante en la similitud de las especies. Según Lodish, *et al.*, (2000) “especies que parecen muy similares pueden tener cariotipos muy diferentes, indicando que el potencial de similitud genética puede ser organizado en el cromosoma en vías muy diferentes”. Candan (2013) afirma que “como en otros organismos, en plantas, el número y morfología del cromosoma puede variar. En plantas el número cromosómico no provee información con respecto al nivel de desarrollo. Ejemplo: *Ophioglossum petiolatum* (Pteridophyta) tiene $2n = 2000$ cromosomas, donde *Allium cepa* (Monocotiledonea) tiene $2n = 16$ cromosomas. De dos plantas con igual cantidad de cromosomas, una puede estar más desarrollada que otra (*Acetabularia mediterránea*, la cual es un alga verde tiene igual número cromosómico que *Zea mays* $2n = 20$). Esto sugiere que el punto importante es la información contenida en el cromosoma”. El tamaño del genoma no tiene relación con la complejidad. Aunque, Alberts, *et al.*, (2011) afirman que “en general, cuanto más complejo es un organismo, más grande es su genoma. Pero esta relación no siempre se cumple (ejemplo el genoma humano es 200 veces más grande que el de la levadura *S. cerevisiae*, pero 30 veces más pequeño que el de algunos vegetales y, por lo menos, 60 veces más pequeño que el de ciertas especies de amebas). Además, el modo en que el ADN se distribuye en cromosomas también es diferente de una especie a otra. Los seres humanos tienen 46 cromosomas, pero una especie de cérvido pequeño sólo posee 6, mientras que algunas especies de carpa tienen más de 100. Incluso especies de parentesco cercano con tamaños genómicos semejantes pueden tener cantidades y tamaños de cromosomas muy diferentes. Así, aunque la cantidad de los genes se correlaciona en forma aproximada con la complejidad de la especie, no hay una relación simple entre la cantidad génica, la cantidad cromosómica y el tamaño total del genoma”.

En el análisis comparativo del cariotipo de plantas, el número cromosómico, la morfología y comportamiento del cromosoma ha sido determinante para esclarecer situaciones taxonómicas de diversas plantas (Baeza, y Torres, 2006; Budeguer, *et al.*, 2012; Chiapero, Las, Amela, y Bernardello, 2013; Gianfranco, *et al.*, 2008; Hansen, *et al.*, 2006; Mercado, *et al.*, 2012; Moyeta, Chiarini, y Barboza, 2012; Moyeta, Stiefkens, Chiarini, y Bernardello, 2012; Quijada, Segovia, Jadán y Proaño, 2010).

Los cariotipos pueden ser usados para muchos propósitos, pero un problema fundamental, en taxonomía de plantas, es la emergencia y la difusión geográfica de nuevos cariotipos (Candan, 2013).

2. El ciclo celular y cariotipo

La división celular es el proceso por el que una célula origina otra célula mediante una secuencia ordenada de acontecimientos conocida como ciclo celular (Alberts, *et al.*, 2011; Candan, 2013; Lodish, *et al.*, 2011; Xiqués, 2000). El ciclo de división celular es constante para cada especie (Sáez y Cardoso, 1978); sin embargo, según Alberts, *et al.*, (2011), “Los detalles del ciclo celular varían en los distintos organismos y en diferentes momentos de la vida de un organismo dado.” Además, según Pierce (2011) debido a que a través del ciclo celular las células progenitoras transmiten a las células hijas las instrucciones genéticas para todas las características, el proceso es crítico para la célula.

El ciclo celular de las células eucariotas incluye el periodo de tiempo entre el inicio de una división celular y el inicio de la siguiente división celular; está compuesto de una interfase larga y una fase de división corta. La fase de división o fase M, incluye la división del núcleo (mitosis) y la citocinesis (división del citoplasma). La interfase representa las primeras fases del ciclo celular. El crecimiento activo de la célula y la síntesis de los componentes de la célula ocurren durante la interfase. La fase G₁, la fase S y la fase G₂ constituyen la interfase, las cuales preparan la escena para la mitosis. La fase G₁ (intervalo: es el tiempo que media entre el final de la fase M y el comienzo de la fase S), la fase S (síntesis: la célula replica su ADN nuclear; las cohesinas se ensamblan en el ADN a medida que este se replica), la fase G₂ (intervalo: es el período entre el final de la fase S y el comienzo de la fase M). Las fases de intervalo permiten a la célula, mediante puntos de

control, ganar tiempo para crecer y duplicar los orgánulos citoplasmáticos, controlar los ambientes intracelular y extracelular, asegurando las condiciones adecuadas y preparativos completos antes de entrar a la fase S y a la fase M. En los puntos de control de la interfase actúan proteínas conocidas como sistema de control del ciclo celular, cuyo centro es una serie de interruptores bioquímicos. Estos interruptores bioquímicos están formados por proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Las Cdk operan en una secuencia definida y coordinan los principales eventos del ciclo, mediante señales y frenos moleculares que activan y desactivan las maquinarias del ciclo celular en los momentos apropiados. Por ejemplo, mitógenos, cambios cíclicos de las concentraciones de ciclinas, cambios de concentración de la proteína Cdc6, fosforilación de un tipo de Cdk en un sitio por una cinasa, desfosforilación de un tipo de Cdk en otro sitio por una proteínofosfatasa específica, el tipo de complejo ciclina-Cdk formado, la proteólisis o degradación de la proteína ciclina, cambios de concentración y actividad de la proteína p53, fosforilación de condensinas, etc. Estas proteínas del sistema de control del ciclo celular también se encuentran en puntos de control de la fase M, asegurando que los eventos propios de esta fase ocurran antes de la separación de los cromosomas duplicados (Alberts, *et al.*, 2011; Candan, 2013; Lodish, *et al.*, 2002).

Existen dos tipos de división celular: la mitosis y la meiosis. La mitosis permite transmitir idéntico contenido genético a la siguiente generación, ocurre en células somáticas. La mitosis es el tipo de división celular necesario para el crecimiento, desarrollo y regeneración de órganos. En plantas, la mitosis ocurre en el cambium, ápice de la raíz y células somáticas de otros puntos de crecimiento; La célula vegetal contiene tres genomas: en el núcleo, en la mitocondria y en los plastidios. Durante la mitosis la célula dobla sus cromosomas y sus organelos; en el caso de organelos como mitocondrias y cloroplastos se multiplican como sus ancestros procariotas mediante división por el método de fisión binaria. La meiosis es la división celular que permite el origen de gametos masculinos y femeninos con el fin de asegurar la continuidad de la especie, ocurre en células diploides. Durante la meiosis, una célula produce cuatro células hijas con la mitad del número de cromosomas, luego de dos divisiones consecutivas. En meiosis, existen dos estados; reducción, en el cual se reduce el número de cromosomas a la mitad y mitosis, el cual

preserva el número de cromosomas a la mitad (Alberts, 2011; Candan, 2013; Bhola, Kapuy, y Vinod, 2018; Megías, Molist y Pombal, 2017; Robert, *et al.*, 2016). La metafase de la mitosis y de la primera división meiótica es la idónea para estudiar los cromosomas, puesto que los cromosomas bivalentes alcanzan su máximo grado de contracción (Xiqués, 2000).

La fase M procede como una secuencia continua de procesos, pero para su estudio se divide en seis etapas. Las cinco primeras etapas de la fase M son: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase; la citocinesis es la sexta etapa, que se superpone con el final de la mitosis, comenzando en anafase y continua en la telofase (Alberts, *et al.*, 2011; Xiqués, 2000). En la profase, las condensinas se ensamblan en cada cromátida individual, ayudando a enrollar el ADN y a condensar cada cromátida junto con las cohesinas, formando anillos proteicos que ayudan a configurar los cromosomas en estructuras más compactas. Durante la profase se debe ensamblar la maquinaria citoesquelética responsable de llevar a cabo la división nuclear: un huso bipolar (Albert, *et al.*, 2011). El centro orientador de los microtúbulos (MTOC) se refiere a cualquier estructura utilizada por las células para nuclear y organizar los microtúbulos. Los centriolos no están presentes en el MTOCs de plantas y hongos, incluso, algunas células epiteliales y huevos de animales recién fertilizados también carecen de centriolos; son las proteínas asociadas con un MTOC las que tienen la capacidad de organizar los microtúbulos citosólicos. El MTOC ayuda a determinar la organización de estructuras asociadas a microtúbulos y organelos. Las células vegetales contienen cientos de MTOCs, los cuales están distribuidos por todas las partes de la célula, a menudo cerca de la corteza celular (Lodish, *et al.*, 2002). La prometafase se inicia con la desorganización de la envoltura nuclear que se rompe en pequeñas vesículas de membrana debido a la fosforilación y desensamblaje de las proteínas del poro nuclear y las proteínas de los filamentos intermedios de la lámina nuclear; todo esto permite el ensamblaje de los microtúbulos y los cromosomas en un huso bipolar; en las células sin centrosomas (p. ej. todas las células vegetales y algunos tipos de células animales) los propios cromosomas nuclea el ensamblaje de los microtúbulos y los cromosomas en un huso bipolar. Luego del movimiento activo de los cromosomas durante la prometafase, los cromosomas se alinean en el ecuador del huso y los cromosomas reunidos en el ecuador metafásico oscilan hacia adelante y hacia atrás, ajustando continuamente sus posiciones

(Albert, *et al.*, 2011). Según Xiqués (2000), de todas las fases de la mitosis, la metafase es el momento idóneo para el estudio de los cromosomas, pues es donde puede visualizarse mejor su estructura y características generales; ya que en esta fase se presenta la máxima contracción de los cromosomas, por lo que puede observarse su morfología de forma clara, a través del microscopio óptico. Según Albert, *et al.*, (2011), la anafase comienza con la liberación de cohesinas que mantienen juntas a las cromátidas hermanas (el APC destruye la securina y se activa la proteasa: separasa que destruye la cohesina), lo cual permite que cada cromátida hermana sea arrastrada hacia el polo del huso al que está unida, separando así los dos grupos idénticos de cromosomas hacia los extremos opuestos del huso. El APC también marca la ciclina M que de esta manera se destruye, desactivando el complejo Cdk de M, ayudando a iniciar la salida de la mitosis. Durante la telofase (etapa final de la mitosis) se desensambla el huso mitótico y se reensambla una envoltura nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas formando los dos núcleos hijos. Las vesículas de la membrana nuclear se agrupan alrededor de cada cromosoma y se fusionan: durante este proceso, se desfosforilan las proteínas del poro nuclear y las láminas nucleares que fueron fosforiladas durante la prometafase, lo que permite que se vuelvan a ensamblar y formen la envoltura nuclear y la lámina nuclear, respectivamente. Una vez reconstruida la membrana nuclear, los poros bombean proteínas al interior del núcleo, que se expande, y los cromosomas mitóticos condensados se descondensan hasta recuperar su estado de interfase, se ha formado un nuevo núcleo y se ha completado la mitosis. La citocinesis, proceso por el cual el citoplasma se escinde en dos, completa la fase M. El mecanismo de citocinesis en los vegetales superiores es completamente diferente del observado en las células animales: las dos células hijas no se separan por la acción de un anillo contráctil situado en la superficie de la célula, sino por la formación de una pared nueva dentro de la célula en división; la posición de esta nueva pared determina con precisión la localización de las dos células hijas respecto de las células vecinas. La pared celular nueva comienza a ensamblarse en el citoplasma entre los dos grupos de cromosomas segregados al comienzo de la telofase; el proceso de ensamblaje es guiado por el fragmoplasto (el cual está formado por los restos de los microtúbulos interpolares en el ecuador del antiguo huso mitótico); pequeñas vesículas rodeadas de membrana, derivadas en su mayor parte del complejo de

Golgi y llenas de polisacáridos y glucoproteínas requeridos para la matriz de la pared celular, son transportadas a lo largo de los microtúbulos hasta el fragmoplasto. Una vez allí, se fusionan formando una estructura similar a un disco, delimitada por una membrana, que se expande hacia afuera con nuevas fusiones de vesículas hasta que alcanza la membrana plasmática y la pared celular original, y divide a la célula en dos. Luego se depositan dentro de la matriz microfibrillas de celulosa que completan la construcción de la nueva pared celular.

Romani, (2013) afirma: “las células vegetales se caracterizan por una citocinesis basada en la tabicación, ya que la pared celular no permite la estrangulación; la división en un principio no es total sino que solo se dividen los citoplasmas y están interconectados por plasmodesmos, unos poros de comunicación entre ambas células; la célula vegetal utiliza sus vacuolas para aumentar su volumen frente a la citocinesis; en las células vegetales el proceso de citocinesis se produce de dentro a hacia fuera mientras; durante la citocinesis las células vegetales no pierden anchura en el centro”.

divisiones para producir un organismo completo.

3. Cromosomas, estructura cromosómica y variación en el número cromosómico

En Biología y Citogenética, se denomina cromosoma (del griego *χρῶμα*, -τος *chroma*, color y *σῶμα*, -τος *soma*, cuerpo o elemento) a cada una de las estructuras altamente organizadas, formadas por ADN y proteínas, que contiene la mayor parte de la información genética de un ser vivo. Los cromosomas fueron descubiertos por el botánico suizo Karl Wilhelm von Nägeli en 1842, al observar células de plantas; el patólogo alemán Wilhelm von Waldeyer, en 1889, les dio el nombre de cromosoma que significa *cuerpo coloreado* en idioma griego (Cromosoma, s.f.).

Un cromosoma funcional de eucariotas pose tres elementos esenciales; un centrómero, un par de telómeros y los orígenes de la replicación. Existen cuatro tipos principales de cromosomas eucariontes según la posición del centrómero: metacéntrico, submetacéntrico, acrocéntrico y telocéntrico (Pierce, 2011).

Durante la mitosis o meiosis el número, tamaño y forma de los cromosomas son específicos para cada especie. (Lodish, *et al.*, 2016). La mayoría de los organismos superiores son diploides con dos juegos de cromosomas homólogos: un juego donado por el padre y otro por la madre. En la naturaleza, es común encontrar variaciones en la estructura de los cromosomas (delecciones y duplicaciones en el número de genes, inversiones y translocaciones en el número de genes) y variaciones en el número de los cromosomas. La variación en el número de cromosomas se puede dar en el número de juegos de cromosomas (ploidía: mediante haploidía, donde disminuye el número de juegos de cromosomas o por poliploidía, donde aumenta el número de juegos de cromosomas) o en el número de cromosomas. En la variación del número de cromosomas no hay un número exacto de juegos cromosómicos básicos, se da la pérdida o ganancia de dos o más cromosomas; se llama aneuploidia a las variaciones de esta naturaleza y el sufijo "sómico" es parte de su nomenclatura. Los organismos diploides que han perdido un cromosoma de un solo par, son monosómicos con la fórmula genómica $2n-1$, el cromosoma solo sin una pareja puede irse a uno u otro polo durante la meiosis, pero más frecuentemente se retrasará en la anafase y no logrará ser incluido en ninguno de los dos núcleos. Así, los monosómicos pueden formar dos tipos de gametos(n) y (n-1), en las plantas el gameto n-1 rara vez es funcional. Los diploides que tienen un cromosoma extra (**trisómicos**) están representados por la fórmula $2n+1$; uno de los pares de cromosomas tiene un miembro extra, de tal forma que se puede formar una estructura trivalente durante la profase meiotica; si dos cromosomas del trivalente se van a un polo y el tercero se va al polo el trisómico puede producir fenotipos diferentes dependiendo de cuál cromosoma del complemento esté presente en triplicado. En los **tetrasómicos** un cromosoma de un organismo que de otra forma sería diploide está presente en cuatriplicado, se expresa como $2n+2$; puede formarse un cuatrivalente para este cromosoma particular durante la meiosis, el cual tiene entonces el mismo problema que se analizó para los autotetraploides. En los **trisómicos dobles** dos cromosomas diferentes están representados por triplicado, el trisómico doble puede ser simbolizado como $2n+1 + 1$. Un organismo que ha perdido un par cromosómico es un nulisómico, el resultado es comúnmente letal para diploides ($2n-2$), sin embargo, algunos poliploides pueden perder dos homólogos de un complemento, y aún sobrevivir. El término

poliploide puede ser aplicado a cualquier célula con más de $2n$ cromosomas. Se estima que un tercio de las angiospermas tienen más de dos juegos de cromosomas (poliploides); los poliploides pueden perder dos homólogos de un complemento, y aún sobrevivir. El término euploidia se aplica a los organismos con cromosomas que son múltiplos de cierto número básico (n). Monoploide: un juego de cromosomas (n) se encuentra de manera característica en el núcleo de algunos organismos inferiores como los hongos. Se conocen plantas monoploides pero son generalmente estériles; Triploide: pueden originarse tres juegos de cromosomas ($3n$) por la unión de un gameto monoploide (n) con un gameto diploide ($2n$). El juego extra de cromosomas del triploide se distribuye en varias combinaciones a las células germinales, resultando gametos desbalanceados genéticamente. Debido a la esterilidad que caracteriza a los triploides estos no se encuentran comúnmente en las poblaciones naturales. Tetraploide: en las células del cuerpo pueden surgir cuatro complementos de cromosomas ($4n$) por la duplicación somática del número de cromosomas. La duplicación se lleva a cabo en forma espontánea o puede ser inducida por exposición a agentes químicos como la colchicina. Los tetraploides se producen también por la unión de gametos diploides no reducidos ($2n$). **Autotetraploide:** el prefijo "auto" indica que la ploidia incluye sólo complementos de cromosomas homólogos. La duplicación somática de un diploide produce cuatro complementos de cromosomas homólogos (autotetraploide). La unión de gametos diploides no reducidos de la misma especie provocaría los mismos resultados. El apareamiento de cromosomas meióticos produce comúnmente cuadrivalentes (cuatro cromosomas en sinapsis) que pueden producir gametos genéticamente balanceados si la disyunción es por $2s$, es decir, los cromosomas de un cuadrivalente se van a un polo y los otros dos al opuesto. Si la disyunción no se establece con este patrón para todos los cuadrivalentes, los gametos serán genéticamente desbalanceados. La esterilidad se expresará en proporción a la producción de gametos desbalanceados. **Alotetraploide:** al prefijo "alo" indica que están involucrados complementos no homólogos de cromosomas. La unión de gametos no reducidos ($2n$) de especies diploides diferentes puede producir en un paso un alotetraploide que se parezca y se comporte como una nueva especie. En forma alternativa, dos especies vegetales diploides pueden hibridarse para producir una F_1 diploide y estéril la esterilidad resulta

del fracaso de cada complemento de cromosomas para suministrar suficiente homología genética para lograr el apareamiento. El diploide estéril puede hacerse fértil si sufre la duplicación del número cromosómico. El alotetraploide así producido tiene dos juegos de cromosomas replicados que se pueden aparear tan efectivamente como en el diploide. Los diploides dobles de este tipo encontrados solo en plantas, se llaman anfidiplóides. Por lo general, no se encuentran niveles de ploidia más altos que los tetraploides en las poblaciones naturales, pero algunos de los más importantes cultivos son poliploides. Los poliploides ofrecen una oportunidad para estudiar efectos de dosis; es decir, como dos o más alelos de un locus se comportan en presencia de una sola dosis de un alelo alternativo. El término haploide, aplicado estrictamente, se refiere al número gamético de cromosomas. Para diploides ($2n$) el número haploide es n , para un alotetraploide ($4n$) el número haploide (reducido) es $2n$, para un alohexaploide ($6n$) el número haploide es $3n$ ($2n + 1n$), etc. Los cromosomas inferiores como bacterias y virus se llaman haploides debido a que tienen un solo juego de elementos genéticos. Sin embargo, ya que no forman gametos comparables a los organismos superiores, el término "monoploide" sería más apropiado (Stanfield, 1991).

4. Técnicas para estudiar el cariotipo en plantas

La técnica para estudiar el cariotipo en plantas requiere preparaciones con un gran número de células individuales en metafases de alta calidad, cuyos cromosomas estén condensados y dispersos para identificar la morfología de los cromosomas. Para esto se han utilizado varias técnicas con el fin de inhibir la formación del huso mitótico, el arreglo ecuatorial de los cromosomas, la migración de los cromosomas hacia los polos y la división de la célula, pero no todas resultan eficaces en todas las plantas o resultan nocivas para el citólogo que la práctica, por lo que en ocasiones se modifica una técnica original (Fedak y Kim, 2008; Madrid, Mora y Mirzaghaderi, 2010; Rondon, Rache y Pacheco, 2013). Un reto muy importante que vencer en la técnica del cariotipo es la adecuada dispersión de los cromosomas, la cual está relacionada con la viscosidad de la célula (Mirzaghaderi, 2018).

Huamán, Z. (1995), afirma que “se usan varias técnicas para estudiar los cromosomas en los tejidos de las plantas, pero no todas son apropiadas, para determinadas plantas, esto

va a depender del tamaño del cromosoma, el estudio que se va a realizar y fundamentalmente del citólogo que la emplea, ya que cada persona tiene su técnica preferida o usa alguna variación de una técnica de aplicación general”.

La técnica para realizar el cariotipo en plantas conlleva los mismos pasos, con algunas variantes según la especie vegetal analizada; se necesita emplear diferentes variantes de tiempo, temperatura y reactivos para lograr un cariotipo adecuado que permita el estudio cromosómico de cualquier taxa y posterior empleo de técnicas citogenéticas moleculares. Esta es la base para realizar la caracterización del cariotipo y determinar si existen cambios numéricos y estructurales. La técnica inicia por la selección del tejido. Una vez elegido el tejido vegetal a utilizar para realizar el cariotipo en plantas se reconocen cinco fases: pretratamiento, fijación, hidrólisis, tinción y montaje (Rodríguez, 2006; Xiqués, 2010). Además, en la técnica para estudios de cariotipo es importante incluir al inicio de la misma la determinación del ciclo celular y de la mejor hora del día en la que debe realizarse la colecta, en función de las células en división (Quijada, *et al.*, 2010). Ferrer, Alcorcés y Méndez (2007) afirman que: “la determinación del ciclo celular y de la hora mitótica constituyen las herramientas principales para aumentar la efectividad de los métodos químicos y físicos para la separación de cromosomas en especies vegetales”.

4 (a). Elección de tejido para cariotipo en plantas y hora de colecta

Para iniciar el estudio de cromosomas de una planta y obtener diversos datos del cariotipo se debe elegir el tejido a utilizar, lo cual va a depender de varios factores: disponibilidad de las plantas, disponibilidad de diferentes tejidos u órganos necesarios para el estudio, disponibilidad de reactivos químicos y equipo de protección, disponibilidad de espacio físico, etc., (Anamthawat, 2003).

El tejido que se vaya a utilizar para estudiar el cariotipo de plantas debe estar en división celular para asegurar el mayor número de células en metafase; por tanto, en las investigaciones sobre el cariotipo los investigadores han utilizado tejido en división celular idóneo de la especie vegetal en estudio, proveniente de diversos órganos (células madres del polen, células madres del óvulo, pétalos muy jóvenes, hojas muy jóvenes, cambium vascular, callos obtenidos *in vitro*, de puntos en crecimiento de las yemas de ramas

laterales, del ápice de la raíz proveniente de semillas germinadas, de hojas enraizadas, de tallos enraizados, de raíces secundarias de plantas, de suspensiones celulares embriogénicas, etc. (Candan, 2013; Fedak, 2008; Rodríguez, 2006; Singh, 2018; Xiqués, 2010).

Para determinar la hora en que hay actividad mitótica y el ciclo celular se establece la cantidad de células a contar. Según Quijada, 2010: El cálculo del tamaño de la muestra “n” o número de células en mitosis a analizar por cada hora de colección se determina mediante la fórmula del tamaño muestral para la estimación de la proporción de la población, utilizando la fórmula:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 S^2}{E^2}$$

donde la expresión $Z_{\alpha/2}^2 S^2$ corresponde al percentil de la ley normal estándar cuyo valor es de 1.96 para un 95 % de confianza en el estudio, S^2 es la varianza de la proporción, su valor es de 0,25, ya que la varianza se maximiza con una proporción poblacional estimada de 0,5, y E^2 es el error máximo permitido del 5% (Quijada, 2010).

Una vez establecidos los límites, se pueden clasificar las células del tejido en división que se cuentan, si se contabilizan 100 células del tejido en división, habrá X en mitosis y $100 - X$ será el resto que se toman en interfase. Las 100 células tomadas de forma aleatoria son representativas de todo el tejido en división y, por tanto, de todo el ciclo celular. De esta manera las X que están en mitosis son una muestra proporcional de todas las que están en mitosis y $100 - X$ de las que están en interfase. El índice mitótico (I_m) es la relación entre el número de células que están en mitosis dividido por el número total de células contabilizadas. En el ejemplo: $I_m = X/100$. I_m es una medida relativa y por tanto carece de unidades (ciclo celular en células vegetales, s.f.).

4 (b). Pretratamiento

El **huso** acromático, **huso** meiótico o **huso mitótico**, es el conjunto de microtúbulos que brotan de los centriolos durante los procesos de división celular, sea mitosis (**huso mitótico**) o meiosis (**huso** acromático o meiótico), y que van desde los centrómeros de los cromosomas hacia los centriolos en los polos (Huso acromático, s.f.).

Según Lodish, *et al.*, (2002), “la mitosis depende del ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos (uno de los tres tipos de fibras del citoesqueleto envueltas en la movilidad de la célula y determinación de la forma de la célula)”. Al tejido elegido debe realizársele un pretratamiento que consiste en emplear una sustancia o una combinación de sustancias o de factores ambientales como temperatura, pH, oxigenación, y tiempo de exposición del tejido en el pretratamiento elegido. El pretratamiento tiene como finalidad impedir la formación de las fibras del huso, lograr una mayor cantidad de células en metafase, aumentar la condensación o contracción del cromosoma, alterar la viscosidad del plasma dentro de la célula (lo cual hace que los cromosomas se separen uno de otro y sean observados separadamente), lograr el mayor número de células separadas, asegurar la coagulación de proteínas en organelos celulares y ejecutar el proceso de fijación hasta cierto nivel. Existen diversos tipos de pretratamientos y su utilización va a depender del tipo de planta, lo ideal sería probar diversos pretratamientos, sometidos a diferentes condiciones ambientales, pero en ocasiones no se cuenta con un número suficiente de muestras, ni con los recursos correspondientes. Entre los pretratamientos utilizados para bloquear la mitosis están el agua fría, soluciones como: monobromonaftaleno (α -bromonaftaleno), colchicina, 8-hidroxiquinolina, coumarina, paradiclorobenceno, acenafteno, isopropilfenilcarbamato. (Candan, 2013; Chen y Li, 2005; Fedak y Kim, 2008; Madrid, *et al.*, 2010; Ospina, López y Márquez 2007; Rezaei, Daneshvar, Alizadeh, Er y Sirri 2013; Xiqués, 2010). La técnica de temperaturas bajas ha sido utilizada en el estudio de cromosomas en muchas plantas, ya sea sola o en combinación con otros agentes antimitóticos, variando las concentraciones utilizadas (Mirzaghaderi, 2010; Rezaei, *et al.*, 2013; Rodríguez y Bueno, 2006).

El efecto del pretratamiento sobre el ciclo celular se debe al bloqueo producido en la fase mitótica, impidiendo la polimerización de los dímeros de tubulina que constituyen los microtúbulos. Entre los compuestos de origen natural utilizados como pretratamiento se encuentran la Colchicina y derivados, la Podofilotoxina, la Esteganacina, el Fenstatin, las Combretastatinas y análogos, los cuales poseen similitudes en su estructura química (Ospina, *et al.*, 2007; Toyo, 2009); Ospina, *et al.*, (2007) afirman que “estos compuestos comparten ciertos sitios estructurales, como la presencia del anillo trimetoxibenceno

(importante para la interacción con la tubulina) y otro anillo aromático con dos sustituyentes oxigenados adyacentes”. Acerca de estos sitios estructurales Toyo, 2009 afirma que «les permiten unirse a un sitio común denominado “sitio de Colchicina” inhibiendo la polimerización de los microtúbulos».

4 (c). Fijación

Luego del pretratamiento la muestra debe fijarse (Candam, 2013). “La fijación de células o tejidos puede definirse como la preservación selectiva de la organización morfológica y del contenido químico para su posterior observación microscópica” (Sandoval, 2005). Aunque, según Sadoval (2005), “se acepta que es imposible obtener un equivalente absoluto del estado vivo”; Grizzle, (2001), afirma que “cada combinación de fijación, procesamiento y tinción son solo compromisos para permitir la visualización de la mejor representación estática de un tejido vivo dinámico”. Un buen fijador es aquel que induce una coagulación rápida de los constituyentes celulares, originando los cambios mínimos posibles en la composición química y la estructura celular; además debe proporcionar suficiente firmeza al material para resistir su posterior y necesaria manipulación; lo cual se logra sumergiendo el tejido en una solución creada para detener o interrumpir los procesos vitales de la célula, así como para evitar la autólisis y los posibles cambios en sus propiedades físicas y químicas (Grizzle, 2001; Grizzle, *et al.*, 2007; Grizzle, 2009; Sandoval, 2005). Existen muchos tipos de fijadores, los cuales consisten en diversas combinaciones y medidas de alcoholes; la elección del fijador depende de los propósitos de estudio, de las características fijadoras que necesitemos, de las características del material de estudio (fragilidad y contenido de agua, tamaño de la muestra, permeabilidad de la membrana, tamaño del cromosoma), de las tinciones que se utilizarán, de la capacidad de penetración del fijador y de los riesgos potenciales para la salud (Bancroft, 2013; Megías, *et al.*, 2017; Sandoval, 2005). Según el centro de recursos genéticos del trigo (WGRC), 2018 “la solución I de Carnoy (solución del agricultor) es una de las combinaciones más comúnmente usadas para estudiar cromosomas de plantas, ofrece buenos resultados para una gran cantidad de especies y tejidos diferentes; está compuesto por 1 parte de ácido acético glacial y 3 partes de etanol al 95% o absoluto (100%)”.

4 (d) Hidrólisis

La hidrólisis es un paso que ayuda a digerir la pared celular para la maceración y tinción de la célula; además disgrega el tejido para obtener con mayor facilidad células en un solo plano. La hidrólisis puede ser enzimática (celulasas, pectinasas o macerozimas a diferentes concentraciones, solas o combinadas en cocteles), ácida (utilizando ácido clorhídrico a diferentes concentraciones) o una combinación de las dos. La hidrólisis combinada resulta mejor para digerir adecuadamente la pared celular, ya que la pared celular es el resultado de un proceso evolutivo producto de las interacciones con fitopatógenos, con otros organismos y con las condiciones ambientales que se presentan como elementos seleccionadores, por lo cual, ha generado resistencia a agentes químico-enzimáticos como los empleados en la hidrólisis (Rodríguez, 2006).

4 (e) Tinción y montaje

Existen varios procedimientos de tinción para estudiar cromosomas de plantas. La tinción debe ser selectiva e, idealmente, solo debe teñir la cromatina y no el citoplasma. La cromatina es basófila, mientras que las proteínas en el citoplasma son acidófilas. Las soluciones ácidas de manchas básicas, como el carmín, o las manchas anfóteras, como la orceína, permiten la tinción diferencial de la cromatina (WGRC, 2018). Una vez observados al microscopio se seleccionan las mejores metafases, se miden los cromosomas y se ordenan en base al tamaño y posición del centrómero.

5. Técnicas para calcular las asimetrías cariotípicas

La morfología cromosómica está determinada por la posición de la constricción primaria o centrómero. Los métodos para determinar la localización del centrómero y describir los cromosomas han sido confusos. Según Ferrer, Alcorcés y Méndez, 2009, los métodos para calcular índices de asimetría propuestos por Romero-Zarco en 1986, Stebbins en 1971 y el sistema de clasificación de Levan, *et al.*, (1964) han resultado ser los más confiables para determinar la cariomorfología de los materiales de plantas evaluados, y establecer relaciones de similitud. Por tanto, se recomienda su utilización en futuros ensayos de cariomorfología y fitomejoramiento.

Considerando el complemento cromosómico en su conjunto, puede haber dos clases de cariotipos-idiogramas: simétrico y asimétrico, diferenciación que presenta gran importancia en estudios de filogenia y evolución de los organismos. Cariotipo-idiograma simétrico: presenta todos los cromosomas aproximadamente del mismo tamaño y centrómeros de posición media y submedia. Cariotipo-idiograma asimétrico: se presenta más heterogéneo, con marcadas diferencias en el tamaño relativo de los cromosomas del complemento, como consecuencia de reordenamientos cromosómicos estructurales. Cariotipo-idiograma bimodal: presenta la forma más extrema de asimetría (en aves, mariposas, y en el género *Aloe* entre otras especies) en la cual los cromosomas largos son 50 veces más largos que los más pequeños (Monero, 2008).

IV ASPECTOS METODOLÓGICOS

1. Elección del tejido para cariotipo y colecta de las muestras

Para la realización del cariotipo de las diferentes especies de *Zamia* se ensayó la posibilidad de obtener tejido en crecimiento a partir de la germinación de semillas de *Zamia ipetiensis*, desinfectadas, sometidas a imbibición durante 24 horas a 28 °C, incubadas en oscuridad a temperatura de 37 °C (usando como sustrato el musgo sphagnum, levemente húmedo) durante cuatro semanas. También se analizó la posibilidad de obtener células en división celular a partir de raíces, conos microesporangiados y hojas jóvenes de plantas de *Zamia* sembradas en bolsas, mantenidas en el vivero del Jardín Internacional de Cícadas de la Universidad de Panamá.

2. Determinación de la hora apropiada de colecta

Para verificar la hora apropiada de colecta de las muestras (que estén en división celular) se colectaron raíces en crecimiento (1 a 2 cm de longitud) de plantas de *Zamia dressleri* sembradas en bolsas, durante un período comprendido entre las 9:40 a. m. y las 4:00 p. m., a intervalos de una hora; teniendo cuidado de no romper el ápice, enjuagando con agua (para eliminar partículas), se colocaron por separado (debidamente identificadas) en solución Farmer (Etanol 95%: Ácido acético glacial en proporción 3:1, respectivamente) a 4°C, durante 24 horas, se enjuagaron con agua y se procedió con la técnica de hidrolisis y disgregación del tejido narrada en el punto cuatro de esta metodología.

Se observaron aleatoriamente 100 células, recorriendo el campo con el objetivo de 100 X, contando la cantidad de células en división celular y la cantidad de células en metafase, (repitiendo 10 veces). A partir de estos datos se realizaron los cálculos del índice de células en división celular, mediante la fórmula: $IM = \text{Número de células en división} / \text{Número de células observadas} \times 100$; además se realizaron los cálculos correspondientes al porcentaje de metafases, de acuerdo a la fórmula: $\% Me = \text{N}^\circ \text{ de células en metafase} \times 100 / \text{N}^\circ \text{ total de}$

células. (Aiassa, Bosch, Gentile, Mañas y Gorla, 2015; López y Márquez, 2002; Rondón, *et al.*, 2013).

3. Colecta de las muestras

Una vez establecida la hora de mayor índice de metafases en *Zamia dressleri*, se realizó la colecta de conos microesporangiados recién germinados, la colecta de hojas jóvenes y la colecta de raíces apicales, a partir de diferentes especies de *Zamia* sembradas en potes (Tabla 1), a las cuales sólo se les verificó el índice de metafases y la efectividad del pretratamiento.

4. Pretratamiento

Para la fase de pretratamiento, se ensayaron agentes inhibidores del huso mitótico que no fuesen nocivos para la salud o muy poco nocivos para la salud: solución comercial Colcemid, agua helada a 1 °C, conforme a la metodología de la WGRC (2018) y la solución fijadora Farmer durante 24 horas a 4 °C, almacenada luego a – 4 °C durante 48 horas. Las variables evaluadas durante los pretratamientos se indican en la Tabla 1.

Tabla 1

Pretratamiento utilizado para detener la división celular en metafase.

Pretratamiento	Concentración	Tiempo de exposición	Muestra
Colcemid comercial	0.01 %	3 horas	Conos microesporangiados de <i>Z. ipetiensis</i>
Agua helada	1 °C	24 horas	conos microesporangiados de <i>Z. ipetiensis</i> raíces de <i>Z. stevensonii</i> raíces de <i>Z. dressleri</i>
Solución fijadora Farmer	4 °C	24 horas	raíces de <i>Z. dressleri</i>
	Seguido - 4°C	48 horas	hojas de <i>Z. imperialis</i>

5. Fijación

Cada muestra debidamente identificada se transfirió (por separado) a la solución fijadora de 1 parte de ácido glacial acético y 3 partes de etanol al 95 % (solución Farmer),

durante 24 horas a temperatura de 4 °C, las muestras de *Z. dressleri* y *Z. imperialis* permanecieron 48 horas más a – 4 °C.

6. Hidrólisis, tinción y montaje

Transcurrido el tiempo de fijación, cada muestra, se enjuaga con agua durante 20 minutos. Luego, para hidrolizar las paredes celulares, se les agrega ácido clorhídrico 18 % durante tres minutos. Después de enjuagar las muestras con agua durante 20 minutos, se escurrieron y se colocaron en un portaobjetos. Se le agrega, a la muestra, 2 gotas de orceína acética al 2% durante 10 min. Posteriormente, se le agrega nuevamente 2 gotas de orceína acética al 2% durante 5 minutos, flameando a intervalos de 5 segundos sin permitir ebullición del colorante. Después, se disgrego el tejido en capas con la ayuda de una aguja, sin permitir la deshidratación de la muestra. Al tejido disgregado y teñido se le colocó el cubreobjetos. Luego, se tomaron las dos placas, recubiertas en papel adsorbente y se presionó sin deslizar las láminas. Aunque los microsporocitos no poseen pared celular (Arbo, Ferruci y Gonzáles, 2013; Raghavan, 1997), los microesporangios, tomados a partir del cono también se sometieron a hidrólisis para separar las células.

Se analizó el porcentaje de células contables y se determinó, a partir de estas, el número cromosómico. La morfología cromosómica se determinó de acuerdo a Levan, Fredga y Sandberg (1964), midiendo manualmente (en aquellos cromosomas en donde esta medición fue posible) la longitud total y la de cada brazo, utilizando un micrómetro ocular y uno de platina, donde el valor de cada división del micrómetro ocular corresponde a 2.5 µm con lente ocular de 15x y lente objetivo 100x.

7. Análisis estadístico

Los resultados del efecto del tratamiento se validaron estadísticamente, mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA I) con Excel (Juárez, 2017). La información utilizada en el ANOVA, correspondiente a los pretratamientos de los tejidos analizados y los resultados de las operaciones propias del procedimiento del análisis de varianza, se muestra en el anexo I.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas de *Zamia ipetiensis* sembradas sobre sphagnum no germinaron. El sphagnum es un substrato con propiedades antibacterianas, retenedor de humedad, el cual permite la buena aireación de las semillas y tiene acción estimulante sobre la raíz (Sphagnum Moss, s.f.); aunque no se encontró contaminación, no se observó emisión de radícula o indicios de germinación en ninguna de las semillas. Estos resultados sugieren que el tiempo de germinación ensayado es menor del que realmente necesitan, o a la pérdida de viabilidad de germinación debido al tiempo de almacenamiento de las mismas; ya que en los ensayos de germinación de semillas de *Zamia manicata* realizados por Montoya (2013), la germinación no alcanzó tasas altas, las semillas que germinaron ex situ lo hicieron en un promedio de 75,6 días ó 78,1 días; mientras que aquellas semillas en condiciones in situ germinaron en 107 días. Montoya (2013) afirma “la pérdida de viabilidad de las semillas para germinar corresponde, entre otros factores, a la mortalidad de las semillas por deshidratación al permanecer en el suelo sin germinar por un periodo de tiempo prolongado después de su siembra”. Debido a esta dificultad se descartó la utilización de raíces germinadas a partir de semillas de *Zamia*, para obtener células en metafase.

Las plantas sembradas en pots facilitaron la obtención de raíces apicales en crecimiento, hojas y conos jóvenes (figura 1); por lo que se utilizaron para verificar la hora de colecta, ensayar la utilidad de los pretratamientos antimitóticos y determinar el número cromosómico. El conteo de células en división celular y metafases a partir de raíces de *Zamia dressleri* indica que el periodo idóneo para realizar la colecta es a las 12:30 p. m. de la tarde, pues es el periodo en que se observa el mayor número de células en división celular y metafases (Tabla 2, figura 2.); lo cual concuerda con investigaciones previas (Moretti, 1990; Napolitano, Caputo y Moretti, 2004). En los estudios de cariotipo siempre es importante revisar la hora de división celular para cada especie; ya que algunos estudios de cariotipo han reportado diversas horas mitóticas en especies de un mismo género, aunque

eso no implica que especies diferentes no puedan tener la misma hora mitótica (Rondón, Rache y Pacheco, 2013; Ferrer, Alcorcés y Méndez, 2007).

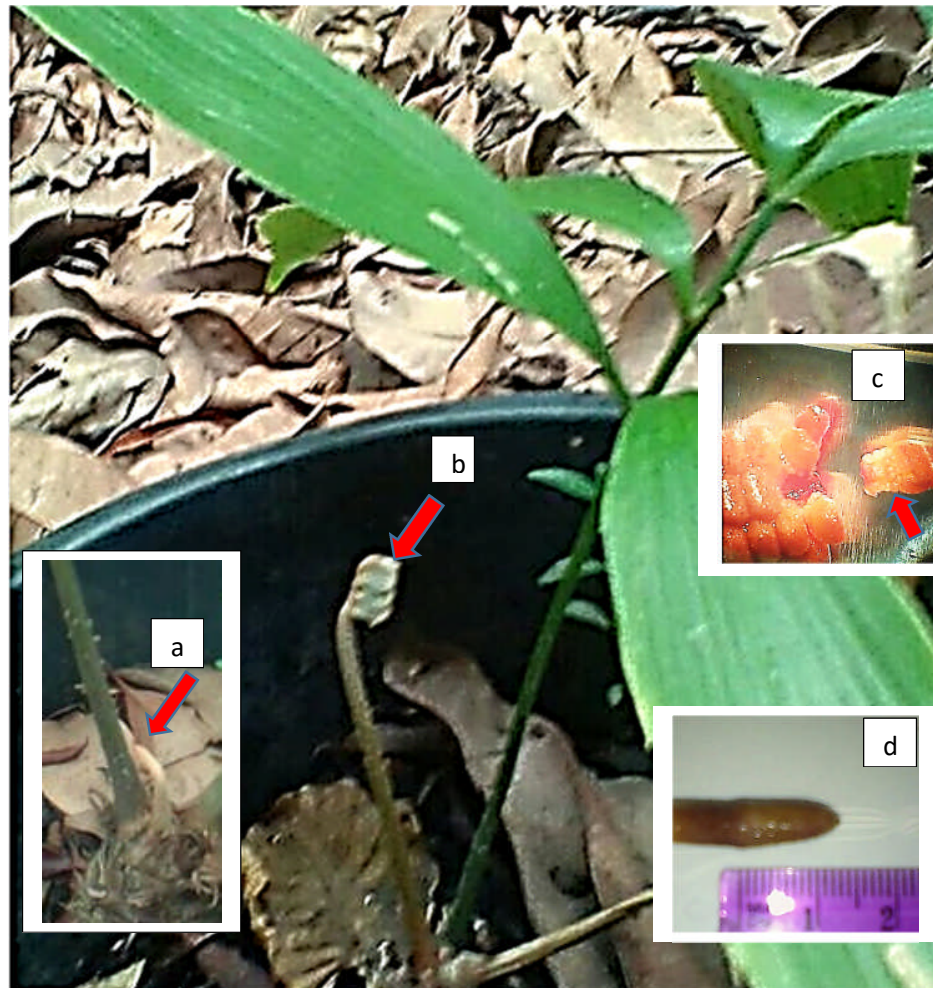


Figura 1. Material de estudio de *Zamia*. a. Hojas jóvenes de *Z. hamannii*; b. Hojas jóvenes de *Z. imperialis*; c y d. Conos microesporangiados de *Z. ipetiensis*.



Figura2. Cromosomas de *Zamia dressleri* vistos en el periodo de las 12:30 p. m.

Tabla 2

Porcentaje de células en división celular y metafases de Zamia dressleri.

Hora	% células en división celular	% de células en metafase
9:40 a. m.	80	0
10:40 a. m.	80	0
11:30 a. m.	90	0.5
12:30 p. m.	95	81
1:30 p. m.	80	0
2:30 p. m.	80	0.2
3:30 p. m.	90	0
4:00 p. m.	90	0

Los conos masculinos de *Zamia ipetiensis*, colectados a las 12:30 p.m., en sus primeras etapas de crecimiento, proveyeron la presencia de células en división celular y la liberación, con facilidad, de grupos celulares en un solo plano (figura 3). Esto se da debido a los numerosos microsporangios pequeños en su cara abaxial, los cuales contienen numerosos microsporocitos (células madres del polen) con alta actividad meiótica (figura 2 c). Las hojas jóvenes de *Z. imperialis* y de *Z. hamannii*, colectadas en sus primeras etapas de crecimiento, de aproximadamente 1.5 cm, antes de expandirse (figura 2a y 2b), también proveyeron la presencia de células en división (figuras 4 y 5). Anamthawat (2003) afirma que: “En comparación con los cromosomas de la punta de la raíz, el índice de metafase en los tejidos foliares jóvenes es alto; además la longitud de los cromosomas y la condensación de los cromosomas; así como el índice de metafase varía según el tejido utilizado”.



Figura3. Esporocitos de Zamia ipetiensis en división celular.

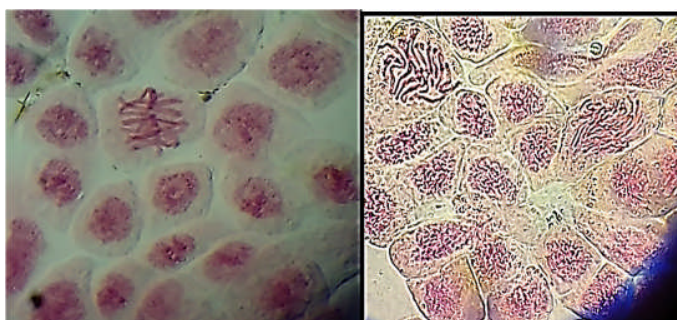


Figura 4. Tejido meristemático de hojas de *Zamia imperialis* colectados a las 12:30 p. m.

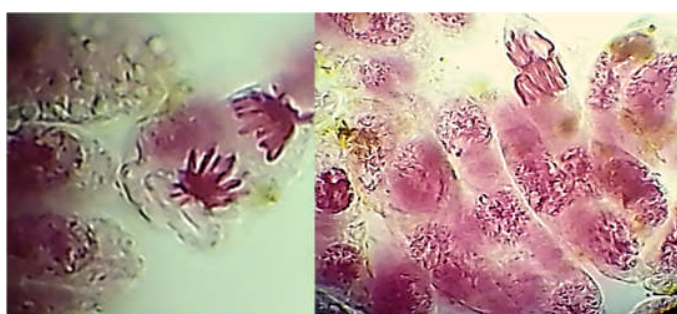


Figura 5. Tejido meristemático de hojas de *Zamia hamannii* colectados a las 12:30 p. m.

Tabla 3

Efecto del pretratamiento en muestras de Zamia.

Tratamiento	Temperatura	% de células en metafases	Contables *	ANOVA I (P= 0,05)		
				F	P	Valor crítico F
Colcemid	25 °C	0.0	0			
Agua helada	1 °C	3.7	0.3			
Farmer	4 °C durante 24 horas					
	+ (- 4 °C durante 48 horas)	82.0	26	** 11.8	0.008	5.14
				*** 9.9	0.034	7.7

* Número de metafases dispersas y útiles para contar cromosomas.

** Toma en cuenta los tres tratamientos

*** Sólo toma en cuenta el tratamiento con agua helada y con la solución Farmer

La tabla 3 resume los resultados obtenidos del análisis preliminar de los tratamientos probados en *Zamia* (el valor F mayor que el valor crítico para la F confirma estadísticamente la diferencia significativa entre los tratamientos). En el pretratamiento con colcemid, se observa: ausencia de división celular (figura 6); en el pretratamiento con agua helada y en el pretratamiento con solución Farmer se observa división celular. Por

tanto, se descartó el uso de colcemid comercial como pretratamiento útil en obtención de cromosomas para realizar el cariotipo de *Zamia*. Estos resultados están relacionados con la concentración del colcemid comercial, la cual es baja, y la capacidad de atravesar al interior de la célula (Lodish *et al*, 2002). Rondón, Rache y Pacheco (2013), afirman que “el aumento en las concentraciones de colchicina es directamente proporcional al porcentaje de células detenidas en metafase”; Ospina, López y Márquez (2007) señalan que el colcemid sólo detiene la proliferación celular en las etapas previas a la metafase, en tanto que en los otros tratamientos utilizados el bloqueo mitótico ocurre desde los inicios de la prometafase hasta la anafase tardía. Rondón, Rache y Pacheco (2013) al tratar de solucionar la dificultad relacionada con el porcentaje de colchicina, combinaron la utilización de colchicina en menores concentraciones (0.25%), solubilizada en DMSO al 2% (p/v), lo cual permitió aumentar el índice de metafases a 54.6%, pero con la dificultad de dispersión cromosómica inadecuada. Rodríguez y Bueno (2006), utilizando la misma metodología, alcanzaron un IMe de 85 %, cuyo valor es mayor que al utilizar la colchicina a concentración de 0,25 % sin DMSO al 2%. Los mismos autores afirman que “esta solución presentó un sinergismo que favoreció la penetración de la colchicina dentro de la célula, posiblemente por la acción del DMSO, que modifica los fosfolípidos de la membrana incrementando la difusión intracelular de la colchicina”.

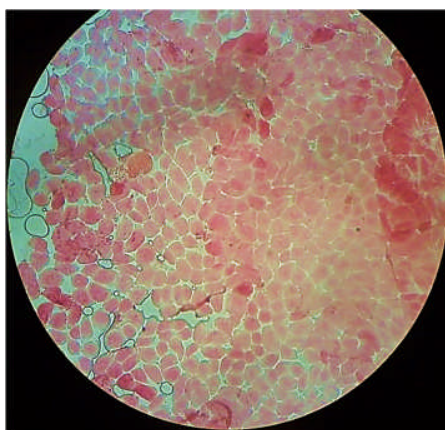


Figura 6. Esporocitos de *Zamia ipetiensis* tratadas con Colcemid..

En el tratamiento con agua helada, se observan cromosomas condensados, pero no dispersos o muy dispersos (figura 7). Mirzaghaderi, 2010, reporta resultados similares para

los cromosomas de raíces, preparados mediante la técnica convencional de aplastamiento (squash), los cuales permanecen muy juntos, o algunos se pierden o flotan entre las células durante el toque y aplastamiento. El porcentaje de metafases obtenidos por este método es 9 % para *Z. ipetiensis*, 2 % para *Z. stevensonii* y 0 % para *Z. dressleri*; de las cuales sólo una es contable y corresponde a *Z. stevensonii*, cuyo número cromosómico sugerido, a partir de esta placa metafásica, es $2n=16$ (figura 8); En investigaciones similares, el agua fría ha sido reportada como un tratamiento inefectivo para detener las células en metafases (Rodríguez y Bueno, 2006; Chen y Li, 2005). Aunque Mirzaghaderi (2010), afirma que: “Entre los pretratamientos aplicados para arrestar a las células en metafase, el agua helada produjo el índice de metafase más alto con un promedio de 19.45% de células en metafase. Este pretratamiento siempre detiene las células en metafase 3 a 4 veces más que colchicina y bromonaftaleno”. Para que el tratamiento con agua helada sea efectivo las células no deben estar más de 24 horas a temperaturas bajas, ni llegar a temperatura de congelación, ya que las células se destruyen considerablemente, afectando el IM y el IMe (Quijada, 2010).

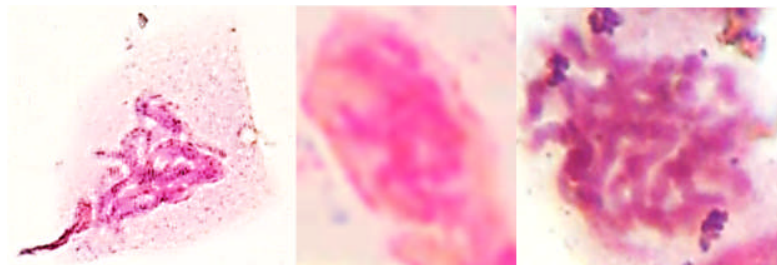


Figura 7. Cromosomas de *Zamia ipetiensis* tratados con temperatura baja.

La dispersión inadecuada de los cromosomas, cuyo grado de separación no permite comprobar su pertenencia a una sola célula, está relacionada con la viscosidad del plasma dentro de la célula; ya que la viscosidad del plasma dentro de la célula hace que los cromosomas se separen uno de otro y sean observados separadamente (Candan, 2013). Otros autores atribuyen la dispersión inadecuada de los cromosomas al efecto del proceso de la hidrólisis de la pared celular, no al tratamiento, lo cual es común en la mayoría de los estudios citogenéticos (Rondón, Rache y Pacheco, 2013).



Figura 8. Cromosomas de *Zamia stevensonii* tratados con temperatura baja.

Las muestras colocadas directamente en solución Farmer a 4 °C durante 24 horas, seguido de solución Farmer a - 4 °C durante 48 horas permite ver células en metafases con cromosomas dispersos adecuadamente (Tabla 3; figuras 9 y 11); debido a que la solución Farmer a 4 °C fija las diferentes fases y acontecimientos celulares, desde los inicios. Sin embargo, con este tratamiento no fue posible determinar con claridad la morfología de algunos cromosomas.

Se determinó que *Z. dressleri* posee un complemento cromosómico $2n = 18$ (figura 9), diferente al de *Z. wallisii* A.Braun, de Colombia, con quien fue confundida por mucho tiempo. Aunque no fue posible determinar la morfología de todos sus cromosomas, fue posible ordenarlos por tamaño (figura 10, tabla 4). *Zamia imperialis* posee un complemento cromosómico $2n = 22$ (figura 11), sus cromosomas se ordenaron según el tamaño (tabla 5).

Zamia imperialis pertenece al complejo sistemático *skinneri*. La morfología cromosómica del cariotipo de *Z. skinneri* aún no ha sido reportada, el complemento cromosómico reportado para *Z. skinneri*, proveniente de Panamá es $2n = 22$ (Norstog, 1980; Taylor, Haynes y Holzman, 2008), igual al de *Z. imperialis*.

Los números cromosómicos presentados en este estudio concuerdan con el rango de números cromosómicos establecidos para las especies del género *Zamia*; ya que en

Cycadales se sugiere la prevalencia de números cromosómicos $2n = 16, 18, 22, 24$, con la mayoría de los géneros y especies $2n = 18$ (Norstog, 1980).

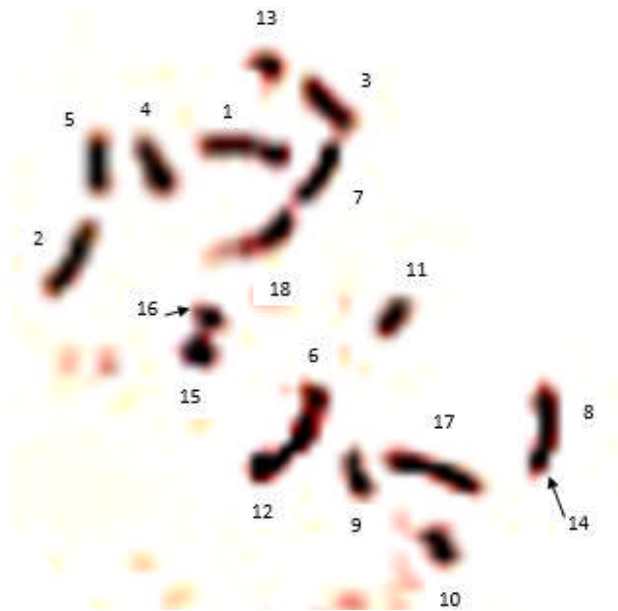


Figura 9. Cariotipo de *Zamia dressleri*. Complemento cromosómico $2n = 18$

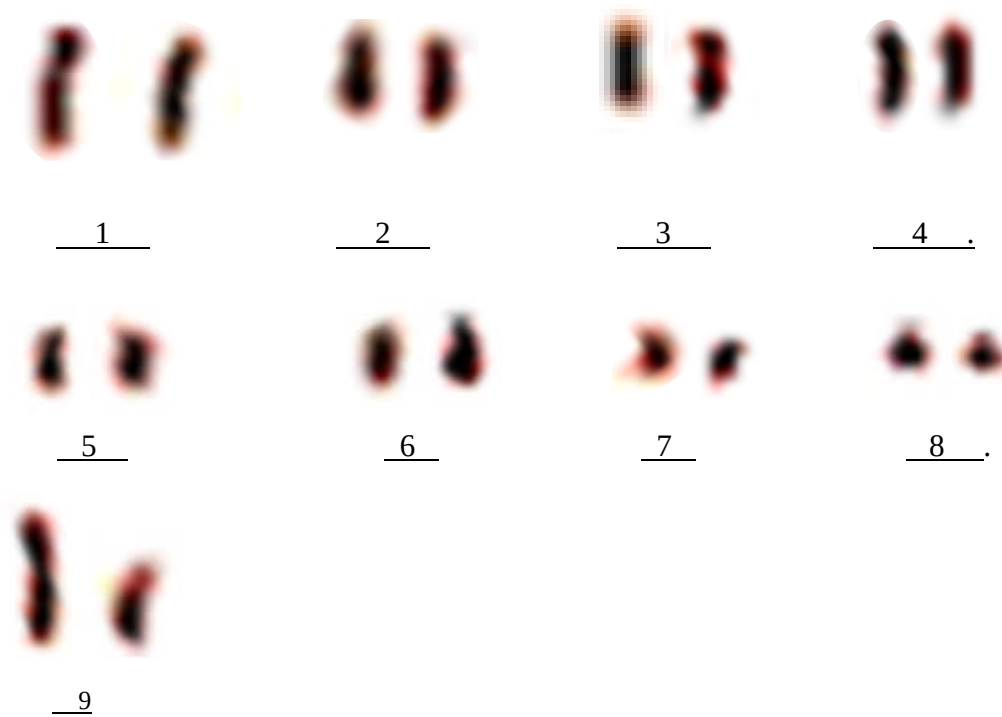


Figura 20. Pares homólogos del cariotipo de *Zamia dressleri*.

Tabla 4

Medidas promedio de longitud de cromosomas en ápices radicales de Zamia dressleri.

Par cromosómico	Cromosomas	Medida promedio	Morfología
1	1 y 2	3.8 um	S, S
2	3 y 4	2.5 um	ND, M
3	5 y 6	2.5 um	ND, M
4	7 y 8	2.5 um	A, A
5	9 y 10	1.9 um	ND, ND
6	11 y 12	1.9 um	ND, ND
7	13 y 14	1.25 um	M, ND
8	15 y 16	0.52 um	ND, ND
* 9	17 y 18	5 um y 1.9 um	M, ND

* Los cromosomas del par 9 son heteromórficos, de tamaño diferente. M (metacéntrico), S (submetacéntrico), A (acrocéntrico), ND (no determinado).

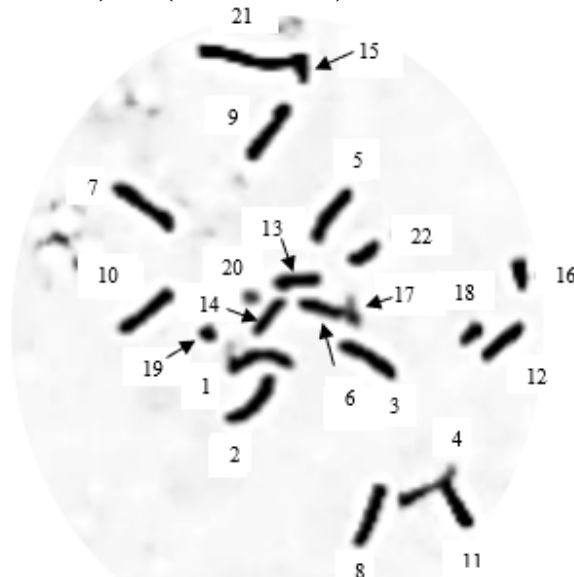


Figura 31. Cariotipo de Zamia imperialis. Complemento cromosómico 2n = 18.

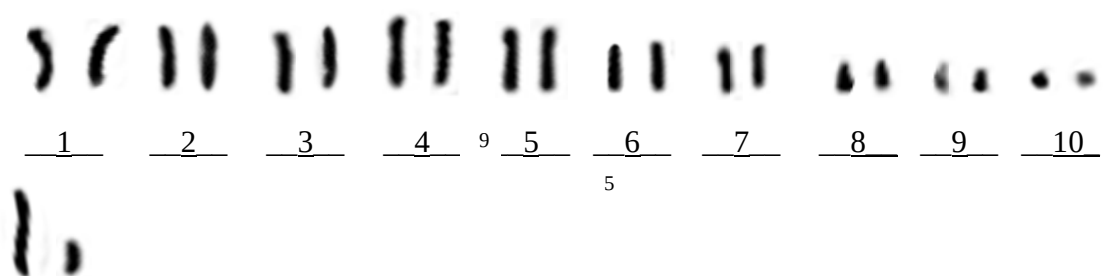


Figura 42. Pares homólogos del cariotipo de Zamia imperialis.

Tabla 5

Medidas promedio de longitud de cromosomas en ápices radicales de Zamia imperialis.

Par cromosómico	Cromosomas	Medida promedio	Morfología
1	1 y 2	2.5 um	M, M
2	3 y 4	2.5 um	M, M
3	5 y 6	2.5 um	M, M
4	7 y 8	2.5 um	A, ND
5	9 y 10	2.5 um	A, ND
6	11 y 12	1.8 um	ND, ND
7	13 y 14	1.6 um	A, ND
8	15 y 16	1.25 um	ND, ND
9	17 y 18	0.62 um	ND, ND
10	19 y 20	0.62 um	ND, ND
11	21 y 22	4.38 um, 1.25 um	ND, ND

* Los cromosomas del par 11 son heteromórficos, de tamaño diferente.

VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El periodo idóneo para realizar la colecta de las diferentes especies de *Zamia*, analizadas en este estudio, es entre 12:00 y 1:00 de la tarde.

Se recomienda verificar la hora mitótica de cada especie de *Zamia*, a utilizar en estudios citogenéticos, ya que algunos investigadores han reportado diversas horas mitóticas en estudios de cariotipo de especies de un mismo género (Delgado, Uribe y Marulanda, 2010; Ferrer, Alcorcés y Méndez, 2007; Rondón, Rache y Pacheco, 2013).

Las raíces, hojas y conos jóvenes de plantas de *Zamia*, sembradas en pote, son útiles para estudiar su cariología. Pero se recomienda ensayar el empleo de medios de cultivo *in vitro* para la obtención de ápices radiculares de especies de *Zamia*, de manera rápida y eficiente, con pared celular menos resistente. Ejemplo, el medio de cultivo Murashigue & Skoog: MS, enriquecidos con auxinas (Rodríguez y Bueno, 2006).

El tratamiento con solución Farmer, a 4 °C durante 24 horas, seguido del mismo a – 4 °C durante 48 horas, permitió obtener cromosomas fuera de la membrana celular, con una dispersión adecuada, y aunque en algunos cromosomas se observan constricciones secundarias, útiles en el conteo, la resolución no fue lo suficiente útil para establecer la morfología de todos los cromosomas. En *Z. dressleri* se pudo determinar la morfología cromosómica de los cromosomas número 1 y 2 (submetacéntrico), 7 y 8 (acrocéntrico), 13 (metacéntrico) y 17 (metacéntrico). En *Z. imperialis* se pudo determinar la morfología de los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, (metacéntricos), 7, 9 y 13 (acrocéntrico).

Se recomienda cuidar rigurosamente, la exposición de la célula a determinada temperatura y tiempo; según Quijada, 2010: “las células no deben estar más de 24 horas a temperaturas bajas, ni llegar a temperatura de congelación, ya que las células se destruyen considerablemente, afectando el IMe”.

Z. dressleri poseen un complemento cromosómico $2n = 18$, *Z. imperialis* poseen un complemento cromosómico $2n=22$. Estos números cromosómicos concuerdan con el rango de números cromosómicos establecidos para las especies del género *Zamia*.

VII BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aiassa, D., Bosch, B., Gentile, N., Mañas, F., Gorla, N. (2015). Citogenética: Manual Teoría y práctica. 1a ed. Córdoba. CEPYD. 170 págs.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Peter, W. (2011). Introducción a la biología celular. 3a ed. México. Editado por Editorial Médica Panamericana. 609 págs.

Anamthawat, K. (2003). Preparación de cromosomas a partir de meristemas de hoja de plantas para el análisis de cariotipo e hibridación in situ. *Métodos Cell Sci.* 25(3-4): 91-95.

Arbo, M. M., Ferruci, M. S. y González, A. M. (2013). Morfología de plantas vasculares. Corrientes, Argentina.
Recuperado de www.biologia.edu.ar/botanica

Baeza, C. y Torres, C. (2006). El cariotipo de *Chaetanthera pentacaenoides* (Phil.) *Hauman* (Asteraceae). *Gayana Bot.* 63(2): 180-182.

Bancroft, J. D. (2013). Safety and ergonomics in the laboratory, Cap. 2. En (Ed.), Bancroft's theory and practice of histological techniques 2013 (págs. 11 – 36). 7th Ed. China. Churchill Livingstone Elsevier. 604 págs.
Recuperado desde <http://drzafariqbal.com/wp-content/uploads/2017/07/Bancroft-Theory-and-Practice-of-Histological-Techniques-7th-2012-Pg.pdf>

Bhola, T., Kapuy, O. y Vinod, P. (2018). Computational modelling of meiotic entry and commitment. *Scientific Reports*, 8, 180 Recuperado desde nature.com

Budeguer, C., Nasif, A., Andrada, B., Pastoriza, A., Martínez, L. y Villagrán, F. (2012). Citogenética de una *Salvia* nativa de Rio Nio, Tucum. *Journal of Basic & Applied Genetics.* 23(1), 100- 101.

Caballero, R. E. (2014). Un estudio preliminar sobre la biología molecular de las especies de *Zamia* L. (Cycadales: Zamiaceae) en Panamá. Tesis de maestría. Universidad nacional de Panamá. Panamá.

Ciclo celular en células vegetales (Sin fecha). En Wikipedia. Recuperado el 30 de julio de 2018 de https://www.unioviado.es/A.Roca/citogenetica/2CICLO_CELULAR.pdf

Calonje, M., Stevenson, D.W., Osborne, R. (2020). The World List of Cycads. Edición en línea. Recuperado desde <http://www.cycadlist.org>.

Candan, F. (2013). Some observations on plant karyology and investigation methods. En (Ed.), Biochemistry, genetics and molecular biology “Current progress in biological research” (pp. 217 – 255). Rijeka, Croacia: Editado por Marina Silva – Opps. Recuperado desde <http://library.umac.mo/ebooks/b28045464.pdf>

Caputo, P., Cozzolino, S., Gaudio, L., Moretti, A., Stevenson, DW. (1996). Karyology and phylogeny of some Mesoamerican species of *Zamia* (Zamiaceae). *American Journal of Botany* 83(11): 1513 – 1520.

Chen, Q. y Li, H. (2005). An improved technique for resolution mitotic chromosome studies in *Solanum*. *HortScience* 40(1): 54-56.
Recuperado desde <http://hortsci.ashspublications.org/content/40/1/54.full.pdf>

Chiapero, A. L., Las, M. L., Amela, M. T., y Bernardello, G. (2013). Estudios citogenéticos en especies de *Passiflora* (Passifloraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 48(1): 103 – 110.

Christenhusz, M., Reveal, J., Farjon, A., Gardner, M y Chase, M. (2011): A new classification and linear sequence of extant gymnosperm. *Phytotaxa* 19: 55-70.

Cromosoma (sin fecha). En Wikipedia. Recuperado el 9 de septiembre de 2019. Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Cromosoma>

Delgado, L. M., Uribe, M. y Marulanda, M. L. (2010). Estandarización de la técnica citogenética “squash” para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia et Technica* 17(46): 74-79.

Esquivel, H. (2014). Taxonomía, sistemática e importancia de las gimnospermas. 2a ed. Editado por Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia. 170 págs.

Fedak, G. y Kim, N. (2008). Tools and methodologies for cytogenetic studies of plant chromosomes. *Cytology and Genetic* 42(3): 64 – 80.
Recuperado de <http://cytgen.com/articles/4230064a.pdf>

Ferrer, H. E.; Alcorcés, N. C. y Méndez, J. R. (2007). Determinación del ciclo mitótico de dos cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y dos ecotipos de *Gossypium barbadense* L. *Acta Biol. Par.*, Curitiba, 36(3-4): 121-149.

Ferrer, H. E.; Alcorcés, N. C. y Méndez, J. R. (2009). Asimetrías cariotípicas observadas en dos especies de *Gossypium* L. *Acta Biol. Par.*, Curitiba, 36(3-4): 179-186.

Gianfranco, V., Ravalli, C, y Cremonini, R. (2008). The karyotype as a tool to identify plant species: *Vicia* species belonging to *Vicia* subgenus. *Caryologia* 61(3), 300 – 319.

- Grizzle, W. E. (2001). The use of fixatives in diagnostic pathology. *Journal of Histotechnology*, 24(3), 151-152.
- Grizzle, W. E., Fredenburgh, J. y Myers, R. B. (2007). Fixation of tissues. En (Ed.), *Theory and Practice of Histological Techniques*, Bancroft J, Gamble M. 6th ed. (págs. 53-74). Edinburg, UK: Churchill Livingstone.
- Grizzle, W. (2009). Modelos de fijación y procesamientos de tejidos. *Biotech Histochem.* 84(5): 185 – 193. Recuperado desde www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891300/
- Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*. 120: 339-350
- Hansen, A. K., Gilbert, L.E., Simpson, B.B., Downie, S. R., Cerviy, A. C. y Jansen, K. (2006). Relaciones filogenéticas y evolución del número cromosómico en *Passiflora*. *Botánica Sistemática*, 31(1): 138-150.
- Huamán, Z. (1995). Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas. Guía de investigación CIP 10. (pp. 2-14). Lima, Perú. Editado por Centro Internacional de la papa.
- Huso acromático. (s.f.). En Wikipedia. Recuperado el 7 de Julio de (2018). Recuperado de https://es.wikipedia.org/wiki/Huso_acromático
- ISCN (2005): An international system for human cytogenetic nomenclature, Shaffer L.G., Thommerup N. (eds); S. Karger, Basel 2005. Published in collaboration with Cytogenetic and Genome Research.
- IUCN (2020). The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2020 - 2. Recuperado desde <http://www.iucnredlist.org>.
- Juarez, C. (2017). Cálculo del Análisis de Varianza con un Factor, ANOVA I con Excell. Recuperado de http://ri.uaemex.mx/bitstream/20.500.11799/70008/1/secme-16264_1.pptx
- Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 51(2):201-220. Recuperado de <https://eurekamag.com/research/038/466/038466215.php>
- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E. y Mroginski L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y ArgenBio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología). 650 págs.

Lindstrom A.J. (2009). Typification of some species names in *Zamia* L. (*Zamiaceae*), with an assessment of the status of Chigua D.Stev. *Taxon* 2009; 58(1): 265-270.

Lindström, A.J., Calonje, M., Stevenson, D., Husby CH., Taylor, A. (2013). Clarification of *Zamia acuminata* and a new *Zamia* species from Coclé Province, Panama. *Phytotaxa*, 98 (2), 27-42. Recuperado desde <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.98.2.1>

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. (2000). Molecular cell biology. 4a ed. W. H. Freeman and Company. New York, Estados Unidos de América. 1084 págs.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M. (2016). Biología celular y molecular. 7a. ed. Editorial: Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1154 págs.

López, J., Márquez, M. (2002). Modelo experimental para el estudio cromosómico en células de mamíferos, (en línea). Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado desde [www. http://bdigital.unal.edu.co/12239/1/juanbautistalopezortiz.2014.pdf](http://bdigital.unal.edu.co/12239/1/juanbautistalopezortiz.2014.pdf)

Madrid, C., Mora, J. y Mirzaghaderi, G. (2010). A simple metaphase chromosome preparation from meristematic root tip cells of wheat for karyotyping or in situ hybridization. *African Journal of Biotechnology*, 9 (3), 314 – 318. Recuperado desde [www. Academicjournals.org/AJB](http://www.Academicjournals.org/AJB)

Marchant, C. (1968). Chromosome patterns and nuclear phenomena in the cycad families, Stangeriaceae and Zamiaceae. *Chromosoma* 24: 100 – 134.

Megías, P., Molist, P., Pombal, M. (2017). *Atlas de histología vegetal y animal*. Vigo, España. Creative commons. Recuperado desde <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/9-meiosis.php>

Mercado P., Noguéz, R., Flores, H., Palacios C., Roman y P., Álvarez, V. (2012). Determinación y análisis del número cromosómico de tres especies del género *Suaeda* (CHENOPODIACEAE). *Journal of Basic & Applied Genetics*. 23 (1), 99.

Mirzaghaderi, G. (2010). A simple metaphase chromosome preparation from meristematic root tip cells of wheat for karyotyping or in situ hybridization. *African Journal of Biotechnology*. 9 (3), 314-318. Recuperado desde <http://www.academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/50D040C30830>

Monero, D. (2008). Morfología cromosómica – cariotipo, Cap. 2. En (Ed.), Cátedra I, genética (2008). Córdoba, España. OpenCourseWare (OCW). Recuperado desde

<http://www.ocw.unc.edu.ar/facultad-de-ciencias-agropecuarias/genetica/actividades-y-materiales/capitulo-2>

Montoya, V. M. (2013). Fecundidad, viabilidad de semillas y germinación *in situ* y *ex situ* de *Zamia manicata* Linden ex Regel (Zamiaceae). Tesis de pregrado. Universidad de Antioquia. Medellín.

Moretti, A. (1990). Cytotaxonomy of cycads. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 57: 114 – 122.

Moretti, A. (1990). Karyotypic data on North and Central American Zamiaceae (Cycadales) and their phylogenetic implications. *American Journal of Botany*. 77: 1016 – 1029.

Moretti, A., Caputo, P., Gaudio, L. y Stevenson, D. (1991). Intraespecific chromosome variation in *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales), *Caryologia*. 44 (1), 1-10.
Recuperado desde <http://www.tandfonline.com/tcar/20>

Moretti, A. y Sabato (1984). Karyotype evolution by centromeric fission in *Zamia* (Cycadales). *Plant Systematics and Evolution*. 146: 215 – 223

Moyeta, N., Chiarini, F. y Barboza, G. (2012). Estudios citogenéticos en *Solanum pseudocapsicum* (Solanaceae) y especies emparentadas. Resultados preliminares. *Journal of Basic & applied genetic*, 23 (1), 105.

Moyeta, N., Stiefkens, L., Chiarini, F. y Bernardello, G. (2012). Cariotipos en especies de *Solanum* del clado morelloide (Solanaceae). *Journal of Basic & applied genetic*, 23 (1), 103 – 104

Napolitano, A., Caputo, P. y Moretti, A. (2004). Karyology, Phytogeography, and the origin of intraspecific karyotypic variation in *Zamia paucijuga* and *Z. polymorpha* (Zamiaceae). *Delpinoa, n.s.*, 46: 71-83.

Norstog, K. J. (1980). Chromosome numbers in *Zamia* (Cycadales). *Caryologia*, 33 (3), 419 - 428. Recuperado desde <http://www.tandfonline.com/tcar/20>

Ospina, S., López, J. y Márquez, M. (2007). Efecto antimitótico in vitro en el extracto metanólico de macroalgas marinas de la costa Caribe Colombiana. *Vitae*, 14 (2), 84 – 89. Recuperado desde <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v14n2/v14n2a11.pdf>

Pérez, M. A., Vovides, A.P., Martínez, R., Martínez, N., Gómez, H. y Galicia, S. (2012). *Zamia grijalvensis* sp. Nov. (Zamiaceae, Cycadales) from Chiapas, Mexico with notes on hybridization and kariology. *Nordic Journal of Botany*, 30: 001 – 006.

Pierce, B. A. (2011). Fundamentos de Genética: Conceptos y relaciones. 1a ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial médica panamericana S.A.C.F. 458 pp.

Poggio, P., González, G., Ferrari, M. R., García, A. M., Wulff, A., Greizerstein, E., Tomás, P. y Schrauf, G. (2010). V. CAPÍTULO 1. Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales. En Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E. y Mroginski L. (Ed.), Biotecnología y mejoramiento vegetal II (pp. 379). Buenos Aires, Argentina: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y ArgenBio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología). 650 págs.

Quijada, L. P., Segovia, S. C., Jadán, M. y Proaño, K. (2010). Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico en especies del género *Polylepis* en el Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. 31 (1 y 2), 33-49.

Raghavan, V. (1997). Molecular embryology of lowering plants. 1ra. ed. New York, United States of America. Cambridge university press. 669 págs.

Rezaei, A., Daneshvar, S., Alizadeh, B., Er, C. y Sirri, C. (2013). A Comparison of Ice Cold Water Pretreatment and α -Bromonaphthalene Cytogenetic Method for Identification of *Papaver* Species. *The ScientificWorld Journal*, 2013: 1-6.
Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2013/608650>

Robert, B., David, R., Bruce, S., Smith-Caldas, M., Christopher, H., y Eva, H. (2016). Principles of Biology. Manhatan, Estados Unidos de América. Open Access Textbooks. 1.
Recuperado de <http://newprairiepress.org/textbooks/1>

Rodríguez, N. y Bueno, M. (2006). Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). *Acta boilógica Colombiana*, 11 (2), 75 – 85. Recuperado de www.scielo.org.co/20.pdf/abc/v11n2/v11n2a06.pdf

Rondon, H., Rache, L., Pacheco, J. (2013). Cariotipo de *Espeletiopsis muiska*. *Rev. MVZ Córdoba* 18 (3): 3868 – 3876

Romani, J. (2013). Citocinesis en células animales y vegetales. *Biology*, 1 (31).
Recuperado de <https://generalbiology2012.blogspot.com/2013/05/citocinesis-en-celulas-animales-y.html>

Sáez, F.A. y Cardoso, H. (1978). Citogenética básica y biología de los cromosomas. Monografía n° 29. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Departamento de asuntos científicos, secretaria general de la organización de los Estados Americanos. Washington D.C. 117 pp.

Sandoval, E. (2005). Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. 1a edición. Mexico, D. F. Editorial: D. R. Universidad Nacional Autónoma de México. 278 pp.

Schutzman, B., Vovides A., Dehgan, B. (1998). Two New Species of *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales) from Southern Mexico. *Bot. Gaz.* 149(3):347-360.1988

Singh, R. (2018). Practical Manual on Plant Cytogenetics. 1° ed. New York. CRC Press Taylor & Francis Group. 320 págs.

Recuperado de

https://www.researchgate.net/profile/Ram_Singh44/publication/322143909_Practical_Manual_on_Plant_Cytogenetics/links/5a47975eaca272d2945f1e90/Practical-Manual-on-Plant-Cytogenetics.pdf

Sphagnum moss (Sin fecha). En Inca Moss. Recuperado el 9 de mayo de (2018). Recuperado de <http://inkamoss.com/sphagnum-moss/>

Stanfield, W. (1991). Citogénética, Cap. 8. En (Ed.), Esquema de la teoría y los problemas de Genética 1991. 3° ed. 433 págs., págs. 177-208. New Yor, Estados Unidos de América. Editorial Mc Graw Hill.

Stevenson, D. (2001). Flora de Colombia, monografía N° 21. Orden Cycadales. Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Colciencias. Bogota. 92 págs.

Tagashira, N. y Kondo, K. (1999). A Karyotype Comparison of Nine Species of Aneuploid *Zamia* by Using the Conventional Orcein Staining and the Fluorochrome CMA-DAPI Differential Staining Methods. *Cytologia*, 64: 449-458.

Recuperadoo de https://www.jstage.jst.go.jp/article/cytologia1929/64/4/64_4_449/_pdf

Taylor, A. S. (2012). Notes on the ethnobotany of Panamanian cycads. *Mem. New York Bot .Gard.* 106: 165-177.

Taylor, A. S., Haynes, J.L. y Holzman, G. (2008). Taxonomical, nomenclatural, and biogeographical revelations in the *Zamia skinneri* species complex (Cycadales: Zamiaceae) of Central America. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158: 399–429

Taylor, A. S., Haynes, J.L. y Holzman, G. (2012). The *Zamia skinneri* (Cycadales: Zamiaceae) complex in Panama, 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, in press.

Taylor, A. S., Haynes, J.L., Holzman, G. y Mendieta, J. (2007). Variability in natural populations and conservation issues facing plicate-leaved *Zamia* species in central and western Panama. In: Vovides AP, Stevenson DW, Osborne R, eds. Proceedings of the Seventh International Conference on Cycad Biology (CYCAD 2005), Xalapa, Veracruz, Mexico. *Mimoirs of the New York Botanical Garden* 97: 557-577.

Taylor, A., S., Haynes, J. L., Stevenson, D. W., Holman G. y Mendieta, J. (2012). Biogeographic insight in Central American cycad biology. En (Ed.), Global Advances in Biogeography. (págs: 73-98). Rijeka, Croacia. Editado por Lawrence Stevens, InTech Open Access Publisher.
Recuperado desde <http://www.cycads.org/publications.htm#CycadsBiogeography.V>

Toyo, M. D. (2009). Síntesis de 1-benzoil-1,2-Dihidroquinolinas sustituidas como posibles inhibidores de la polimerización de tubulina. Tesis de grado. Univerisidad central de Venezuela. Caracas.

Verma, P. y Pandey, B. (2013). *S.Chand' S Biology for Class XI*. Editado por S. Chand Publishing.

WGRC (Sin fecha). Wheat Genetics Resource Center. Electrononic Lab Manual. Kansas State University. Recuperado desde <http://www.k-state.edu/wgrc/index.html>

Xiqués, Xonia. (2002). Caracterización citogenética de la variabilidad en plantas, Cap. 3. En (Ed.), Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas 2002. 1a. Ed. 366 págs., págs.: 67- 90. La Habana, Cuba. Editorial Félix Varela.

Zamia. (Sin fecha). En Wikipedia. Recuperado el 26 de marzo de 2018. Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Zamia>

VIII ANEXOS

Anexo 1 Operaciones propias del procedimiento del análisis de varianza

Tabla 6

ANOVA I del % de metafases de los pretratamientos en especies de Zamia.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>		<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Columna 1		3	0	0	0	
Columna 2		3	11	3.666666	22.33333	
Columna 3		3	77	25.66666	124.3333	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1156.222	2	578.1111	11.825	0.00828666	5.14325285
Dentro de los grupos	293.3333	6	48.8888			
Total	1449.555	8				

Tabla 7

ANOVA I del pretratamiento de temperatura baja y Farmer.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	3	11	3.66666667	22.3333333		
Columna 2	3	77	25.6666667	124.333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	726	1	726	9.9	0.03463284	7.70864742
Dentro de los grupos	293.33	4	73.33			
Total	1019.33	5				

