



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

Determinación del cariotipo y mapeo físico de los genes 5s y 45s rDNA
en *Tigridia pavonia* variedad Dulce

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

PRESENTA

HUGO ABELARDO ARROYO MARTÍNEZ

COMITÉ DE TUTORES

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

DR. RODRIGO BARBA GONZÁLEZ



El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Diciembre 2016

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE CUADROS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 <i>Tigridia pavonia</i> (L.f) DC.	3
2.1.1 <i>T. pavonia</i> variedad Dulce	3
2.2 Variación cromosómica	4
2.3 Citogenética	5
2.3.1 Definición	5
2.3.2 Importancia	5
2.3.3 Observación de cromosomas mitóticos.....	6
2.3.3.1 Pretratamiento	6
2.3.3.2 Fijación	7
2.3.3.3 Hidrólisis	7
2.3.3.4 Tinción	7
2.3.4 Caracterización cromosómica	8
2.3.4.1 Número básico, número gamético y número somático	8
2.3.4.2 Tamaño absoluto	8

2.3.4.3 Relación de brazos	8
2.3.4.4 Constricciones secundarias	10
2.3.4.5 Cariotipo	11
2.3.4.6 Idiograma	12
2.3.4.7 Fórmula cariotípica	13
2.3.4.8 Simetría - asimetría	14
2.3.5 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	14
2.3.5.1 Elaboración de la laminilla	15
2.3.5.2 Tratamiento con RNasa	15
2.3.5.3 Tratamiento con HCl	16
2.3.5.4 Tratamiento con detergente	16
2.3.5.5 Tratamiento con proteasa	16
2.3.5.6 Desnaturalización de la sonda y del DNA cromosómico	16
2.3.5.7 Hibridación	17
2.3.5.7.1 Temperatura	17
2.3.5.7.2 pH	17
2.3.5.7.3 Cationes monovalentes	18
2.3.5.7.4 Formamida	18
2.3.5.8 Sonda	19
2.3.5.8.1 Marcado de la sonda	19
2.3.5.9 Dextra sulfato	20
2.3.5.10 Lavados post hibridación	20
2.3.5.11 Montaje y contrateñido	21
2.3.5.12 Observación	21
2.3.6 Estudios Citogenéticos en <i>Tigridia pavonia</i>	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	24

VI. METODOLOGÍA	25
6.1 Ubicación del experimento	25
6. 2 Material vegetativo	25
6.3 Observación de cromosomas mitóticos	25
6.4 Determinación del cariotipo	26
6.5 Mapeo físico de los genes 45s y 5s rDNA	26
VII. RESULTADOS	27
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Imagen de <i>T. pavonia</i> (L.f) DC var. Dulce	4
2.	Representación gráfica de los diferentes tipos de cromosomas según su morfología	10
3.	Representación gráfica de las partes de un cromosoma	11
4.	Idiograma de <i>Agave angustifolia</i> con una fórmula cariotípica de 48m + 2sm + 6st + 4t de la población de El Chorro	13

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Clasificación de los cromosomas de acuerdo a Levan <i>et al.</i> (1964).	9

RESUMEN

Determinación del cariotipo y mapeo físico de los genes 5s y 45s rDNA en *Tigridia pavonia* variedad Dulce.

Hugo Abelardo Arroyo-Martínez*. Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Tutor Académico: José Luis Piña-Escutia¹.
Tutores Adjuntos : Amaury Martín Arzate-Fernández² y Rodrigo Barba Gonzales³

*Autor para correspondencia: escudo_0@hotmail.com

^{1,2} Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario “El Cerrillo”, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. Correspondencia: ¹jlpinas@uaemex.mx; ²arzatef@uaemex.mx

³Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad Zapopan, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, 45019, Zapopan, Jalisco, México. Correspondencia: rbarba@ciatej.mx

Tigridia pavonia (Lf) DC es una especie cuyas características morfológicas le confieren un gran potencial ornamental. Debido a la heterogeneidad morfológica de los individuos de esta especie, en el 2001 se describieron nueve variedades botánicas. Entre ellas Dulce presenta la menor formación de semillas lo cual podría significar la presencia de cambios cromosómicos. El establecimiento de las características citogenéticas de una especie es de gran interés para estudios taxonómicos y en programas de mejoramiento genético ya que facilita la selección de especies parentales más cercanas. Aunado a esto con el desarrollo de la técnica de FISH, se ha podido identificar genes de interés y establecer una mejor diferenciación de los cromosomas homólogos. A pesar de ello, no hay reportes sobre las características citogenéticas de todas las variedades. Por lo anterior en el presente estudio se determinó su cariotipo, y se realizó el mapeo físico de los genes 5s y 45s rDNA por medio de FISH. Los resultados mostraron que *Tigridia pavonia* variedad Dulce conserva su cariotipo bimodal exhibiendo un número cromosómico de $2n = 2x = 28+3B$, observando por primera vez la presencia de cromosomas B en la especie, lo que dista de reportes anteriores. De igual forma se logró la amplificación de los genes 5s y 45s rDNA por medio de la técnica de FISH, donde el gen 5s rDNA amplificó en ocho regiones diferentes, mientras que el gen 45s rDNA se observó en 10 de ellas, de las cuales, cuatro correspondían a constricciones secundarias. Esta información puede servir de base para futuros análisis evolutivos, y/o de mejoramiento genético en la especie.

Palabras clave: *Tigridia pavonia* variedad Dulce, cariotipo, Fluorescence *In Situ* Hybridization, genes ribosomales y cromosomas B.

ABSTRACT

Karyotype determination and physical mapping of the 5s and 45s rDNA genes in *Tigridia pavonia* var. Dulce

Hugo Abelardo Arroyo-Martínez*. Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Director: José Luis Piña-Escutia¹. Advisors: Amaury Martín Arzate-Fernández² and Rodrigo Barba González³

*Corresponding author: escudo_0@hotmail.com

^{1,2} Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. ¹jlpin@uaemex.mx; ²arzatef@uaemex.mx

³Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad Zapopan, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, 45019, Zapopan, Jalisco, México. Correspondencia: rbarba@ciatej.mx

Tigridia pavonia (Lf) DC is a species whose morphological characteristics confer great ornamental potential. Due to the morphological heterogeneity of the individuals of this species, in 2001 nine botanical variants were described. Among them Dulce presents the least seed formation which could mean the presence of chromosomal changes. The establishment of the cytogenetic characteristics of a species is of great interest for taxonomic studies and breeding programs, because it facilitates the selection of closer parental species. Added to this with the development of the FISH technique, it has been able to identify genes of interest and to establish a better differentiation of the homologous chromosomes. In spite of this, there are no reports on the cytogenetic characteristics of all the varieties. Therefore, in the present study, its karyotype was determined, and the physical mapping of the 5s and 45s rDNA genes was performed by FISH. The results showed that *Tigridia pavonia* var. Dulce retains its bimodal karyotype, exposing a chromosomal number of $2n = 2x = 28 + 3B$, observing for the first time the presence of B chromosomes in the species, which is far from previous reports. It was also achieved amplification of the 5s and 45s rDNA genes by FISH technique, where the 5s rDNA gene amplified in eight different regions, whereas the 45s rDNA gene was observed in 10 of them, of which four corresponded to secondary constrictions. This information can serve as a basis for future evolutionary analyzes, and/or genetic improvement in the species.

Keywords: *Tigridia pavonia* variety Dulce, karyotype, Fluorescence *In Situ* Hybridization, ribosomal genes and B chromosomes.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Tigridia* incluye al menos 43 especies y seis subespecies, de las cuales, 41 son endémicas de México (Munguía-Lino *et al.* 2015). Entre ellas, *Tigridia pavonia* (Lf) DC se destaca por la gran variabilidad en el color y belleza de su flor como atractivo recurso florícola. Hoy en día es ampliamente cultivada en Europa, Asia y Australia, donde se comercializa como planta para jardinería.

Para esta especie se conocen nueve variedades registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (SNICS 2008). Entre ellas *T. pavonia* variedad Dulce es de gran interés debido a que es la variedad que muestra un menor porcentaje de fertilidad lo cual podría denotar cambios cromosómicos en la especie.

Si bien es sabido que las características cromosómicas se mantienen de una generación a otra, aun entre variedades, a menudo ocurren variaciones estructurales y/o numéricas que pueden cambiar el número, tamaño y posición centromérica de los cromosomas, lo cual puede generar variabilidad genética (Levitus *et al.*, 2010). Es por ello que el análisis de estas características puede servir para establecer relaciones filogenéticas más certeras, así mismo, en programas de mejoramiento genético el conocimiento de las características citogenéticas suele jugar un papel importante a la hora del establecimiento de las cruas ya que como menciona Lakshmanan *et al.* (2015), el éxito del cruzamiento interespecífico o intergenérico usando métodos de mejoramiento tradicionales, depende principalmente de que tan citogenéticamente cercanos sean los progenitores.

Por otro lado con el desarrollo de la técnica de Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) se ha facilitado la obtención de patrones de sondas específicos para la discriminación de cromosomas similares, así como el mapeo físico y la identificación de genes de interés

(Navrátilová *et al.* ,2003), por lo que la adición de esta información a las características normales del cariotipo permite realizar estudios más detallados y precisos.

A pesar de ello se conoce muy poco sobre las características citogenéticas de cada una de las variedades, existiendo únicamente reportes referentes a su número cromosómico y bimodalidad del complejo cromosómico, además de que ciertos aspectos como la posición de las constricciones secundarias varían de un autor a otro.

Por lo anterior la determinación del cariotipo y el mapeo físico de los genes 5s y 45s rDNA en *Tigridia pavonia* variedad Dulce, podrá servir para tener un mayor conocimiento de los cambios cromosómicos en la especie, así como su uso en programas de mejoramiento genético.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Tigridia pavonia* (L.f) DC.

Tigridia pavonia (L.f.) DC es una especie nativa de América, siendo México considerado el centro de diversidad genética de esta especie (Piña-Escutia *et al.*, 2010).

De manera general los individuos pertenecientes a esta especie se caracterizan por presentar tallo grueso, de 3-8 mm de diámetro, y de 30 a 150 cm de altura, adjuntando de dos a varias flores. Las flores miden entre 10-15 cm de diámetro, el perianto es de colores brillantes en tonos de rosa, rojo, naranja, amarillo, blanco y con manchas en la taza de las flores, bases conniventes, los tépalos externos se disponen en copa abierta, poco profundos; los tépalos internos son pequeños, cordados, ovados u oblongo-ovados, con el ápice acuminado; los nectarios presentan surcos a cada lado de la hoja, pero no son continuos a través de su centro (Vázquez-García *et al.*, 2011).

Debido a la heterogeneidad morfológica de los individuos de esta especie, Vázquez-García *et al.* en el 2001 siguiendo el patrón de 17 caracteres describió nueve variedades botánicas colectadas en el Estado de México: Ángeles, Mariana, Carolina, Dulce, Penélope y Trinidad colectadas en el municipio de Temascaltepec a una altitud de 2250 m.s.n.m; Gloria y Samaria colectadas en el municipio de Temoaya, a una altitud de 2600 m.s.n.m; y Sandra colectada en el municipio de Tenancingo a una altitud de 2100 m. s. n. m. Todas con registro en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS).

Al respecto tanto estudios morfológicos como moleculares han mostrado que la variación genética está relacionada al origen geográfico de cada variedad (Arzate-Fernández *et al.*, 2008; Piña-Escutia *et al.*, 2010ab) y que éste factor puede ejercer una marcada influencia en la floración y la fructificación. Aunado a esto, se sabe que existe una relación entre el color de la flor y la fertilidad, siendo Sandra (variedad con flores de color rojo) la que tiene una fertilidad mayor (76.8%) en relación al 38.7% de Ángeles (variedad con flores de color blanco) y al 28.1% de Dulce (variedad con flores de color amarillo).

Para efectos del presente trabajo a continuación únicamente se describirán las características morfológicas de *T. pavonia* var. Dulce.

2.1.2 *T. pavonia* variedad Dulce

Se caracteriza porque el color principal de la flor es amarillo, con una coloración de sus machas de tono rojizo (Figura 1); la altura de su tallo puede alcázar los 47.18 cm de altura, en general por cada tallo puede producir hasta 10.4 flores, con la capacidad de generar un 28.1% de capsulas en proporción al número de flores producidas, siendo esta la variedad con menor fertilidad; la flor presenta una forma del tépalo semi oblada, con una longitud de 8.3 cm; su tepalo interno tiene una longitud de 4.33 cm; la columna estaminal tiene una longitud de 4.24 cm presentando una distancia de la antera al estigma de 2.09 cm (Vázquez-García et al., 2001).

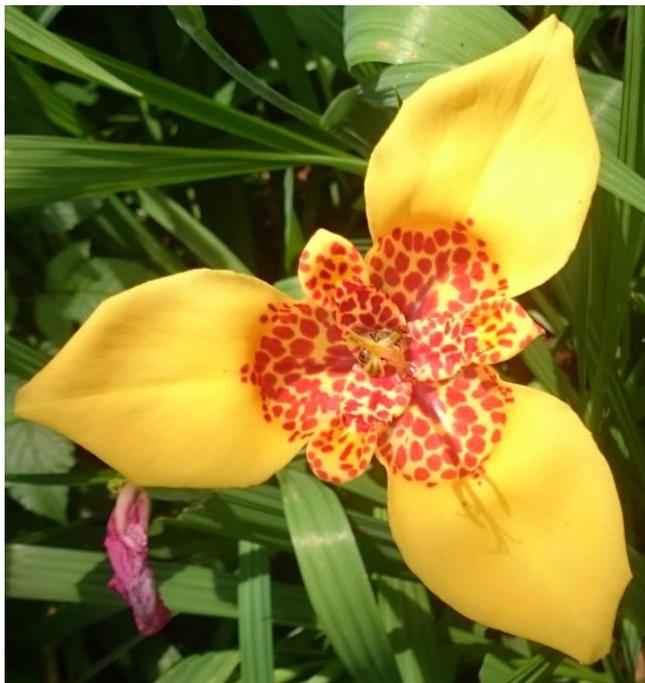


Figura 1. Imagen de *Tigridia pavonia* variedad Dulce.

2.2 Variación cromosómica

A diferencia de las características morfológicas de las plantas, las características cromosómicas como el número, morfología, presencia de constricciones secundarias, entre otras, son generalmente constantes en los seres vivos a través de generaciones y pueden utilizarse, para su clasificación taxonómica. A pesar de ello, el cariotipo característico de una especie, puede sufrir modificaciones evolutivas mediante diversos mecanismos tales como translocaciones, inversiones, deficiencias y duplicaciones de segmentos, y fusiones y fisiones del centrómero, así como cambios aneuploides y poliploides (García-Velázquez, 1990).

Estas variaciones en el cariotipo pueden ocurrir sin cambios notorios en el exofenotipo. Sin embargo, rearrreglos en condición heterocigota pueden ocasionar cambios en el apareamiento meiótico e iniciar un aislamiento reproductivo. Estos procesos pueden conducir, en algunos casos, a la existencia de especies crípticas o hermanas, con pocas diferencias a nivel bioquímico o morfológico, pero con diferencias cromosómicas que las mantendrían aisladas reproductivamente (Levitus *et al.*, 2010).

2.3 Citogenética

2.3.1 Definición

La Citogenética, es la disciplina que estudia el comportamiento y la estructura de los cromosomas y su relación con la transmisión y recombinación de los genes. De manera general se puede dividir a la citogenética como clásica y molecular. Los principales estudios de la citogenética clásica se basan en la determinación de las características del cariotipo y la identificación cromosómica mediante técnicas de tinción convencionales y bandeo cromosómico. También, evalúa el tamaño del genoma analiza el comportamiento meiótico de los cromosomas en razas, especies, híbridos y poliploides (Levitus *et al.*, 2010). Por su parte la citogenética molecular, agrupa un conjunto de técnicas que aplican diferentes métodos de la biología molecular (determinación del tamaño del genoma (picogramos), Hibridación *In Situ*, disección y caracterización de cromosomas individuales,

identificación y mapeo físico de genes de interés, entre otras) directamente sobre preparaciones citológicas tales como tejidos, células, cromosomas y fibras de DNA (Herrera, 2007).

2.3.2 Importancia

En los estudios citogenéticos, uno de los primeros objetivos es la identificación cromosómica y la determinación del cariotipo basado en las características morfológicas de los cromosomas (Lakshmanan *et al.*, 2015), en base a estas características los estudios citogenéticos pueden determinar la variación genética y sus causas, lo cual ayuda a conocer qué tan plásticos son los genotipos entre y dentro de las diferentes porciones de un rango ecológico, tomando en consideración el sistema reproductivo, ciclo de vida y grado de intercambio genético en las poblaciones (Kenton, 1986). Así mismo los análisis citogenéticos son útiles al taxónomo y al biólogo evolucionista, ya que los habilita para detectar las diferencias entre los taxa y conocer sus patrones de divergencia; al fitomejorador le facilita la manipulación de los genotipos con fines de seleccionar especies de alto rendimiento, así como el establecimiento de un programas de mejoramiento genético más certeros, ya que al realizarlas cruzas intergericas o interespecificas usando mejoramiento tradicional el éxito puede depender principalmente de que tan citogenéticamente relacionadas sean las especies parentales, además las diferencias como el número cromosómico, tamaño del genoma y morfología de los cromosomas homólogos deciden el destino del apareo de los cromosomas del híbrido durante la meiosis. (Palomino, 1995; Lakshmanan *et al.*, 2015).

2.3.3 Observación de cromosomas mitóticos

Para poder observar el complejo cromosómico de un individuo es necesario hacer previamente un tratamiento del tejido a analizar. A continuación, se explica el proceso necesario para preparar el tejido.

2.3.3.1 Pretratamiento

Para este análisis generalmente se emplean tejidos meristemáticos (ápices radicales o caulinares, óvulos, etc.) porque presentan un alto índice mitótico. Dichos tejidos son pretratados con diversas sustancias que inhiben la formación del huso mitótico (colchicina, 8-hidroxiquinoleína, pactosol, etc.) a los efectos de acumular metafases, dispersar los cromosomas en el citoplasma y producir una mayor condensación de los mismos (Levitus *et al.*, 2010).

2.3.3.2 Fijación

Los materiales se fijan a fin de detener los procesos vitales, esto se realiza por medio de agentes químicos que "matan" los tejidos, preservando ciertas estructuras con un mínimo de alteraciones. Para esto se utiliza una solución fijadora (Farmer), la cual está compuesta por tres partes de alcohol y una parte de ácido acético glacial, existen otras sustancias que se pueden usar, pero esta solución es la más empleada para este fin (Marcelo-Delgado *et al.*, 2010; Castañeda-Nava *et al.*, 2012).

2.3.3.3 Hidrólisis

Al momento de observar los cromosomas bajo el microscopio óptico, es importante que las células se encuentren dispersas formando una sola capa de células, evitando así la superposición. Para lograr este objetivo se deben destruir tanto la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares. Para tal efecto se pueden utilizar agentes químicos, tratamientos enzimáticos, o mezclas de ambos (Marcela-Delgado *et al.*, 2010). Kenton y Heywood (1984) para especies de *Tigridia* reportaron buenos resultados con HCl a 60°C por 8 min.

2.3.3.4 Tinción

Para poder observar los cromosomas se requiere de una tinción. Existe una gran variedad de colorantes nucleares como son fucsina básica, orceína, carmín, giemsa, etc., sin embargo para efectos de este proyecto analizaremos la técnica de tinción Feulgen. Este método es selectivo en el cual las moléculas del reactivo de Schiff se condensan con los grupos aldehídos funcionales, liberados de las purinas de la desoxirribosa del DNA, producto del hidrólisis, obteniendo así una coloración carmín (García-Velázquez, 1990).

Finalmente, se utilizan el tejido y sobre un portaobjetos es macerando y aplastando mediante la técnica de “squash” para posteriormente hacerlo permanente por el método de nitrógeno líquido.

2.3.4 Caracterización cromosómica

De acuerdo a García-Velázquez (1990), la caracterización cromosómica de especies o variedades de plantas se inicia con la descripción del cariotipo a través del análisis de:

2.3.4.1 Número básico, número gamético y número somático

El número básico (x), representa el mínimo de cromosomas de una serie poliploide. El número gamético (n), es el número de cromosomas que llevan las gametas y puede coincidir o no con el número básico, de acuerdo con el nivel de ploidía de la especie que se trate. El número somático ($2n$), es el número de cromosomas que llevan las células somáticas (Levitus *et al.*, 2010).

2.3.4.2 Tamaño absoluto

Se refiere a la longitud y diámetro, expresando en micras (μm), del total y de cada uno de los cromosomas (García-Velázquez, 1990).

2.3.4.3 Relación de brazos

La morfología cromosómica es determinada por la posición del centrómero (cinetocoro o constricción primaria).

El centrómero separa al cromosoma en dos regiones o brazos (brazo corto (bc) y brazo largo (bl), se caracteriza por ser constante y constituye el marcador más utilizado en la identificación y determinación morfológica de los cromosomas. Su localización puede ser expresada en términos de: relación de brazos cromosómicos ($r = bl / bc$) e índice centromérico [$IC = (bc / bl + bc) \times 100$] (García-Velázquez, 1990; Levitus *et al.*, 2010).

De acuerdo con la posición del centrómero, Levan *et al.* (1964) propuso la clasificación de los cromosomas en cuatro grupos: m (metacéntricos), sm (submetacéntricos), st (subtelocéntricos) y t (telocéntricos o acrocéntricos) (Figura 2). Cada uno de estos grupos se caracteriza por una magnitud definida de su relación de brazos o índice centromérico (Cuadro 1). Los grupos m y t incluyen respectivamente a los términos M (metacéntricos) y T (telocéntricos) para posiciones centroméricas estrictamente medias y terminales. Los cariotipos pueden estar constituidos por cualquier combinación de estos tipos (García-Velázquez, 1990)

Cuadro 1. Clasificación de los cromosomas de acuerdo a Levan *et al.* (1964).

Posición	bl / bc	IC	Clasificación
Punto medio	1.0	50	Metacéntrico (M)
Región media	1.0 – 1.7	47.5 - 37.5	metacéntrico (m)
Región submedia	1.7 – 3.0	37.5 - 25	submetacéntrico (sm)
Región subterminal	3.0 – 7.0	25 - 12.5	subtelocéntrico (st)
Región terminal	7.0 - ∞	12.5 - 2.5	telo o acrocéntrico (t)
Punto terminal	∞	0	Telocéntrico (T)

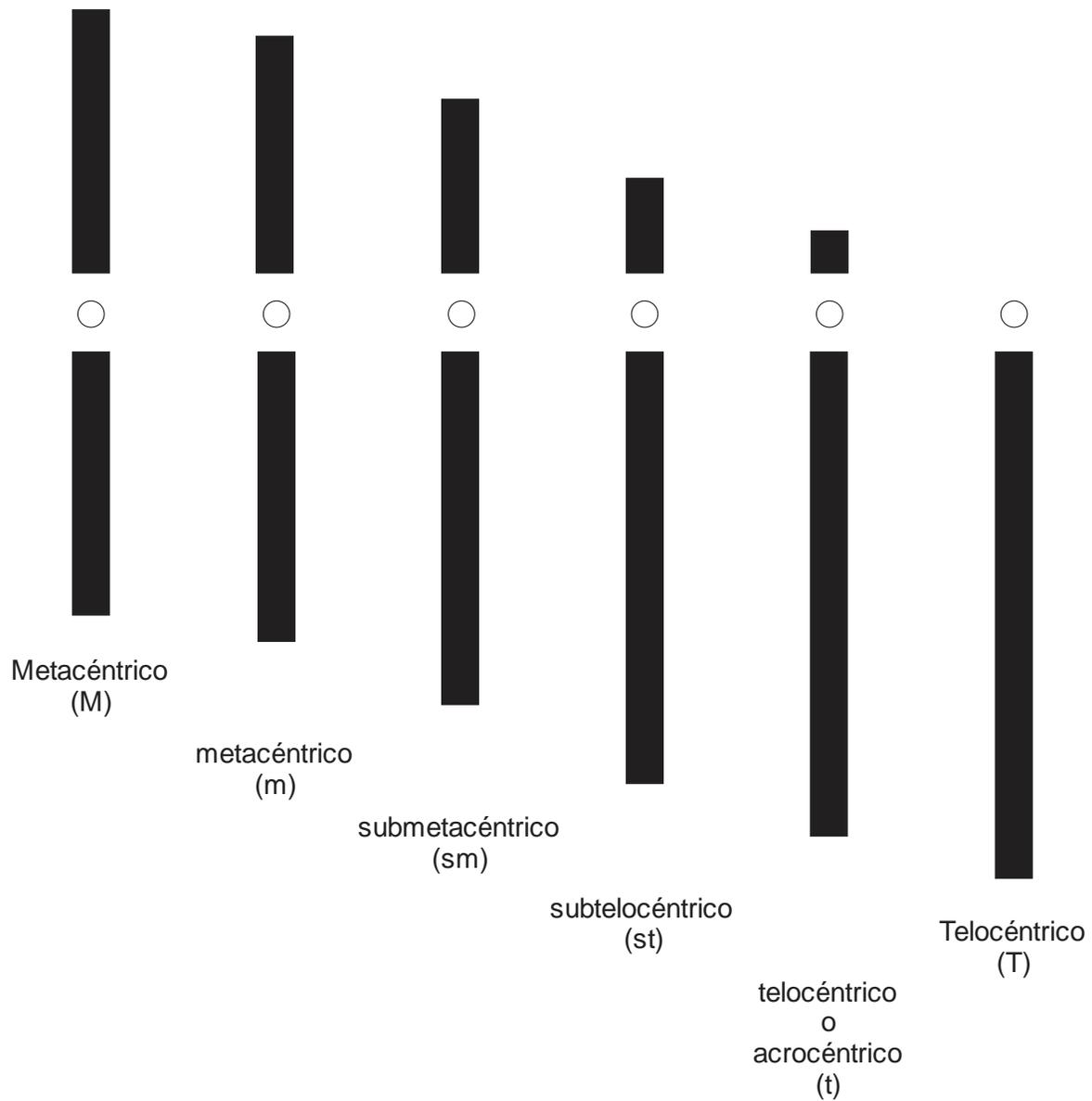


Figura 2. Representación gráfica de los diferentes tipos de cromosomas según su morfología.

2.3.4.4 Constricciones secundarias

Otro aspecto a considerar para caracterizar morfológicamente a los cromosomas es la presencia y la posición de las constricciones secundarias, así como la presencia y el tipo de satélites. En general, las primeras corresponden a regiones organizadoras de los nucléolos

(NORs) y los últimos a las porciones cromosómicas distales delimitadas por la constricción secundaria y el telómero de los brazos que los portan (Figura 3). Los cromosomas que presentan satélites se denominan cromosomas SAT. Los satélites se encuentran generalmente sobre los brazos cortos y en un solo par de cromosomas del juego; sin embargo, existen excepciones para ambos aspectos (García-Velázquez, 1990; Levitus *et al.*, 2010).

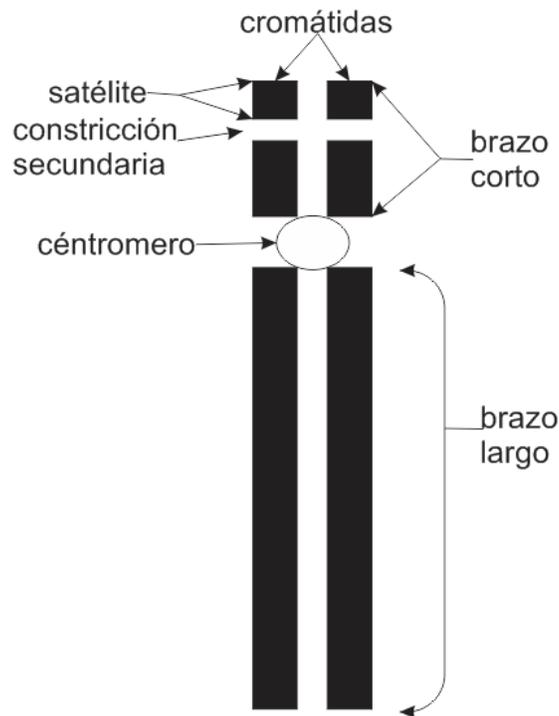


Figura 3. Representación gráfica de las partes de un cromosoma.

2.3.4.5 Cariotipo

Para la elaboración del cariotipo los cromosomas del complemento se ordenan según su tamaño (de mayor a menor) alineando los centrómeros a una misma altura y los brazos cortos hacia arriba. En las plantas diploides y aloploiploides, el cariotipo se compone de pares de cromosomas homólogos; mientras que en las autoploiploides se compone de grupos de tres o más cromosomas de acuerdo con el nivel de ploidía. El orden que ocupa en

el cariotipo cada par o grupo de cromosomas se indica mediante un número y, mediante una letra, el tipo cromosómico al que pertenece de acuerdo a su morfología (Levitus *et al.*, 2010).

De acuerdo a García-Velázquez (1990), las características del cariotipo pueden ilustrarse mediante fotografías y dibujos de los núcleos metafásicos en mitosis, o de paquiteno, en meiosis. Con este objeto se han desarrollado dos sistemas:

2.3.4.6 Idiograma

Cada cromosoma es representado por una línea o barra en la que se indica la posición relativa del centrómero, la localización de satélite, cromómeros y otras marcas citológicas (si existen), ordenándolos en forma decreciente en longitud (Figura 4). Esta representación diagramática del cariotipo se integra con la información de varias células.

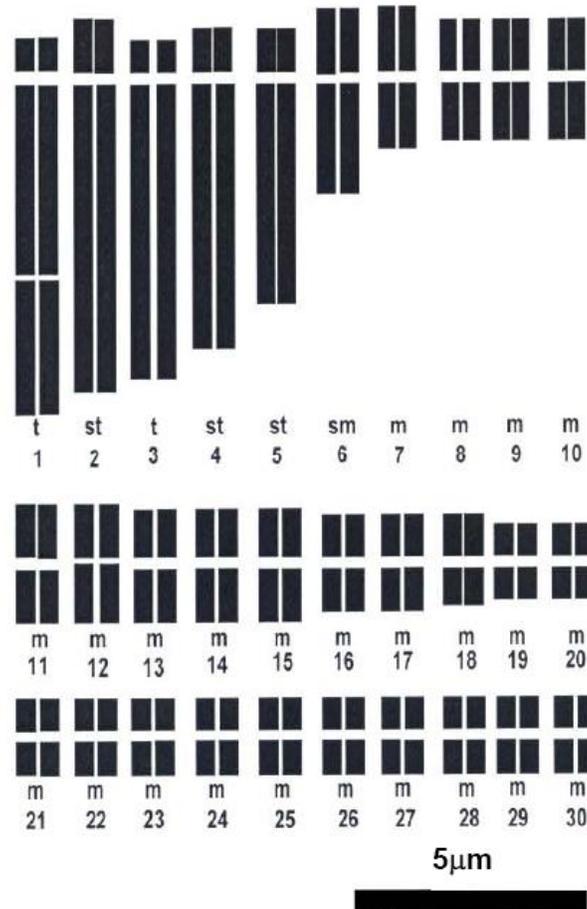


Figura 4. Idiograma de *Agave angustifolia* $2n = 60$ de la población de El Chorro. Las flechas y números indican el par de cromosomas homólogos con constricciones secundarias en los brazos largos. Fuente: Moreno-Salazar *et al.*, 2007.

2.3.4.7 Fórmula cariotípica

Es otra forma de expresar la composición de un complemento cromosómico, en la que se indica el número de cada tipo morfológico de cromosomas que presenta el material analizado (ejemplo, *Agave angustifolia* de la población de El Chorro, fórmula cariotípica de $48m + 2sm + 6st + 4t$) (Levitus *et al.*, 2010).

2.3.4.8 Simetría - asimetría

Entre los parámetros cuantitativos más utilizados para caracterizar los cariotipos se encuentra el grado de asimetría que presentan los mismos. Para ello, se emplean categorías o índices de asimetría cromosómica que consideran las diferencias de tamaño entre los cromosomas del cariotipo (asimetría intercromosómica), y las diferencias morfológicas de los cromosomas derivadas de la proporción entre sus brazos (asimetría intracromosómica). Un cariotipo simétrico es aquel cuyos cromosomas son aproximadamente del mismo tamaño y en su mayoría metacéntricos, mientras que uno asimétrico es aquel que presenta cromosomas de diferentes tamaños y predominantemente submetacéntricos, acrocéntricos o telocéntricos (Levitus *et al.*, 2010).

La información obtenida a partir del análisis de los cariotipos permite identificar cromosomas, clasificar los cariotipos, realizar análisis comparativos entre grupos de especies más o menos relacionadas e inferir sus tendencias evolutivas. Asimismo, permite detectar las anomalías numéricas y estructurales en los complementos cromosómicos de células o individuos (Levitus *et al.*, 2010). A pesar de ello, el establecimiento del cariotipo basado únicamente por el tamaño cromosómico, posición centromérica y patrón de bandeo, se ve limitado por la similitud morfológica de los cromosomas en muchas especies, razón por la cual se han tenido que desarrollar nuevas técnicas que permitan superar dichas limitaciones, una forma de superarlas es por medio de la visualización de secuencias específicas de DNA en los cromosomas usando FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization), lo cual provee de patrones de sondas específicos para la discriminación de cromosomas similares (Navrátilová *et al.*, 2003).

2.3.5 Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)

La citogenética entro en la era molecular con la introducción de la hibridación *in situ*, un procedimiento que permite a los investigadores localizar la posición específica de secuencias de DNA en cromosomas. Desde los primeros experimentos con hibridación *in*

situ en 1969, se han desarrollado muchas variaciones de la técnica, lo que ha incrementado enormemente la sensibilidad de esta. Hoy en día el procedimiento de hibridación *in situ* más usado se realiza con sondas fluorescentes que detectan secuencias de DNA, este es comúnmente referido como FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) (OConnor, 2008).

Esta técnica basada en la complementariedad del DNA, hibrida marcando secuencias específicas de DNA o RNA (sonda). Las sondas, adheridas al objetivo, desarrollaran una señal fluorescente, esta señal puede ser detectada aun en interfase, lo que provee de resultados más exactos (Abd El-Twab, 2007), esto ha permitido la apreciación de los tipos de cambios evolutivos en los cromosomas de las especies, así como el mapeo físico de las secuencias de DNA de interés (Abd El-Twab, 2007; Lakshmanan *et al.*, 2015).

A continuación, se describirán la función de los procesos más relevantes de la técnica:

2.3.5.1 Elaboración de la laminilla

En base a la metodología propuesta por Barba-González (2007) dentro del proceso de elaboración de la laminilla, posterior a la fijación del tejido, este debe ser tratado únicamente con enzimas como la Celulasa, Pectoliasa, y Citohecasica que degraden en su totalidad la pared celular y el citoplasma, ya que la presencia de estos podrían afectar la visualización de los cromosomas y de la sonda a la hora de observarlos.

Posterior al tratamiento el tejido, este se monta en un portaobjetos y se hace permanente mediante el método de nitrógeno líquido.

2.3.5.2 Tratamiento con RNasa

El tratamiento con RNasa sirve para remover el RNA endógeno que podría generar una señal o ruido en el radio de hibridación DNA-DNA (Roche, 2008).

2.3.5.3 Tratamiento con HCl

La acción precisa del tratamiento con HCl es desconocida, pero puede contribuir a la extracción de proteínas y la hidrólisis parcial de la secuencia objetivo, así como el mejoramiento de la señal (Roche, 2008).

2.3.5.4 Tratamiento con detergente

Las preparaciones pueden ser pretratadas con Triton X -100, docetil sulfato de sodio, u otros detergentes si los componentes de la membrana lipídica no han sido extraídos por medio de otros procedimientos como fijación, deshidratación, incrustación, o procedimientos de inactivación enzimática endógena (Roche, 2008).

2.3.5.5 Tratamiento con proteasa

Este tratamiento sirve para incrementar la accesibilidad del objetivo, por medio de la digestión de la proteína que rodea al ácido nucleico objetivo (Roche, 2008).

2.3.5.6 Desnaturalización de la sonda y el DNA objetivo

Para la hibridación *in situ* de DNA cromosomal, el DNA de los cromosomas debe ser desnaturalizado. En general dichos tratamientos deben llevar a la pérdida de la morfología, de esta manera en práctica, se debe comprometer la morfología para que entre e hibride la sonda. En este sentido, la desnaturalización alcalina ha sido tradicionalmente utilizada, sin embargo la desnaturalización por calor es de igual forma popular, esto debido a la simplicidad experimental y a una mayor efectividad (Roche, 2008).

2.3.5.7 Hibridación

La hibridación depende de la habilidad del DNA desnaturalizado para realinearse con fragmentos complementarios en un ambiente justo debajo de su punto de fusión (T_m). La T_m es la temperatura a la que la mitad del DNA se presenta en forma de una cadena simple (desnaturalizado). El valor T_m es diferente para el DNA genómico de diferentes organismos, por ejemplo para el DNA de *Pneumococcus* es a 85°C, mientras que para el DNA de *Serratia* es a 94°C. Esto se debe a la estabilidad del DNA la cual es depende directamente del contenido de Guanina (G) Citosina (C), cuanto mayor sea la relación molar de los pares GC en el DNA, mayor será el punto de fusión. El T_m se puede calcular mediante la medición de la absorción de luz ultra violeta a 260nm (Roche, 2008).

La T_m y la renaturalización del DNA se ven afectadas principalmente por cuatro parámetros:

2.3.5.7.1 Temperatura

El grado máximo de renaturalización (hibridación) del DNA es a los 25°C. Sin embargo, la curva en que relaciona la velocidad de renaturalización y la temperatura es ancha, con un parámetro aproximado de 16 ° C a 32 ° C por debajo de T_m (Roche, 2008).

2.3.5.7.2 pH

Con un rango de pH de 5 – 9, el radio de hibridación es bastante independiente del pH. Generalmente se usan buffers que contiene entre 20 y 50 mM de fosfato a un pH de 6.5 – 7.5, sin embargo, niveles de pH mayor se pueden usar para producir condiciones de hibridación de mayor astringencia (Roche, 2008).

2.3.5.7.3 Cationes monovalentes.

Cationes monovalentes, por ejemplo, iones de sodio, interactúan electrostáticamente con los ácidos nucleicos (principalmente con el grupo fosfato) por lo que la repulsión electrostática entre las dos cadenas de la hélice decrecimiento con el incremento de la concentración salina, por lo que a mayor concentración salina incrementa la estabilidad del híbrido, mientras que una baja concentración de sodio afecta drásticamente la T_m así como el radio de renaturalización (Roche, 2008).

2.3.5.7.4 Formamida

El DNA se desnaturaliza entre los 90 y 100°C en Na^+ a 0.1 – 0.2 M, para la hibridación *in situ* esto implica que microscópicamente las preparaciones deben hibridarse a 65 – 75°C por periodos prolongados de tiempo, esto puede producir un deterioro de la morfología cromosómica. Afortunadamente, algunos solventes orgánicos reducen la estabilidad térmica de la doble cadena de polinucleótidos, de esta forma la hibridación puede realizarse a temperaturas menores en presencia de formamida (Roche, 2008).

La formamida ha sido la opción de solvente orgánico por años. Este reduce la temperatura de fusión de la doble hélice del DNA-DNA y del DNA-RNA en una lineal por 0.72°C por cada porcentaje de formamida. Así la hibridación puede realizarse a 35-40°C con un presencia del 50% de formamida en la mezcla de hibridación. Por otro lado, el radio de hibridación disminuyen por la presencia de formamida, por lo que para calcular la T_m del híbrido en presencia de formamida se pueden seguir las siguientes ecuaciones (Roche, 2008):

Para 0.01– 0.2 M Na^+ :

$$T_m = 16.6 \log M + 0.41 (\text{GC}) + 81.5 - 0.72 (\% \text{ formamida})$$

Para concentraciones arriba de 0.4 M de Na^+ :

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\text{GC}) - 0.72 (\% \text{ formamida})$$

Para obtener un mayor incremento de la señal de hibridación *in situ* para rDNA, se hibrida con rRNA en 80% de formamida a 50-55°C, en vez de 0% de formamida a 37°C. Por último, se debe mencionar que durante el procedimiento de hibridación *in situ*, se pueden perder largas porciones de DNA relativamente (Roche, 2008).

2.3.5.8 Sonda

El genoma de muchas especies contiene una mezcla de secuencias de DNA que pueden ser clasificadas en general como únicas o repetitivas. Algunas de las secuencias repetitivas se localizan en grupos compactos de regiones particulares como los centrómeros, mientras que otras se intercalan entre secuencias únicas (Polak y McGee, 1990).

Uno de los genes más utilizado como sondas en FISH, son los genes ribosomales (rRNA), esto debido a su alta número de copias de unidades repetidas, posición específica en los cromosomas y su alta conservación de secuencias (Gomez-Rodriguez *et al.*, 2013).

Mizuochi *et al.* (2007), explica que los genes 45s rRNA (45s rDNA) están agrupados en series de unidades repetidas en tándem de los genes 18s, 5.8s y 26s rDNA, espaciadores internos transcritos (ITSs) y los separadores no transcritos (NTSs), mientras que si bien los genes 5s rRNA (5s rDNA) también aparecen en grandes números de series repetidas en tándem, en eucariotas estas son independientes de la región del gen 45s rDNA.

2.3.5.8.1 Marcado de la sonda

Para poder visualizar la sonda, se debe utilizar algún método que la distinga del demás DNA. Inicialmente, estas eran marcadas por inclusión de isotopos radioactivos, donde la sonda era detectada revistiendo el espécimen con una emulsión fotográfica, exponiéndola por días o semanas. Este método fue el más utilizado por aproximadamente 15 años, sin

embargo, presentaba varios inconvenientes importantes, incluyendo la seguridad y cuestiones de eliminación de residuos (Polak y McGee, 1990).

Para superar estas limitaciones, se desarrollaron diversos métodos de acoplamiento directo a los extremos de las sondas de RNA con fluorocromos, anticuerpos para la detección de híbridos de RNA / DNA que eran producidos por la hibridación de sondas de RNA a DNA de interés, así como métodos de unión de haptenos inmunogénicos o fluorocromos a ADN y ARN, ya sea por reacción química o incorporación enzimática de nucleótidos modificados (Polak y McGee, 1990).

Actualmente, sondas listas para usarse están disponibles por varios fabricantes. Éstos están marcados directamente con fluorocromos, o con haptenos, tales como biotina o digoxigenina, que requieren detección inmunológica con reactivos de afinidad marcados con fluorocromos. Las sondas marcadas en laboratorio usualmente se realizan con biotina, digoxigenina, o nucleótidos marcados con fluorocromos. Estas se incorporan en el DNA utilizando técnicas enzimáticas, tales como nick translation, random priming y reacción de transcripción *in vitro* (Polak y McGee, 1990).

2.3.5.9 Dexasulfato

En soluciones acuosas el dexasulfato es un fuerte hidratante. Así, las macromoléculas no tienen acceso al agua hidratante, lo que causa un aparente incremento de la concentración de la sonda y por consiguiente un radio de hibridación mayor (Roche, 2008).

2.3.5.10 Lavados post hibridación

La sonda puede hibridar con secuencias no específicas que son parcialmente mas no enteramente homologas a la secuencia de la sonda. Dichas hibridaciones son menos estables que hibridaron perfectamente. Estas pueden ser desasociadas por medio de lavados

de diferente astringencia. La astringencia de los lavados puede ser manipulada variando la concentración de la formamida, de las sales, o de la temperatura (Roche, 2008).

2.3.5.11 Montaje y contrateñido

El contrateñido se realiza con el propósito de identificar los cromosomas cuando estos son observados bajo un microscopio de fluorescencia, por lo cual es necesario teñirlos con un colorante fluorescente diferente al de las sondas. El contrateñido de DNA fluorescente se realiza usualmente con propidio rojo fluorescente (PI) o con 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) azul fluorescente. Así mismo un agente antidesecamiento debe ser añadido al medido de montaje para lo cual cuando se usan sondas fluorescentes, se recomienda usar vectashield como agente antidesecamiento (Roche, 2008).

2.3.5.12 Observación

El análisis de la laminilla hibridada se realiza por medio de un microscopio con fluorescencia ya que este contienen una lámpara para la excitación del tinte fluorescente y un filtro especial que transmite un alto porcentaje de la luz emitida por el tinte fluorescente, así mismo puede ser usado para excitar tres diferentes inmunofluoróforos con emisiones espectrales diferentes, lo que permite la detección de múltiples sondas, las que por medio de sistemas de adquisición de imágenes de alta sensibilidad pueden ser analizadas posteriormente (Roche, 2008).

2.3.6 Estudios Citogenéticos en *Tigridia pavonia*

Hasta el momento son muy pocos los trabajos realizados en esta área para esta especie y mucho menos para todas las variedades existentes, sin embargo, la información generada a

la fecha nos da un panorama general de su nivel de ploidía y características morfológicas de los cromosomas de algunas especies:

Molseed (1970) reportó en *T. pavonia* un número cromosómico $2n = 28$ con un cariotipo bimodal formado de dos pares de cromosomas grandes y 12 pares pequeños observando la presencia de constricciones secundarias en uno de los pares de cromosomas grandes, sin embargo esto contrasta con los autores citados en su trabajo: Brittenham (1934) reportó un número cromosómico de $2n = 26$; Sakai (1952) quien analizó dos variedades de colores de *T. pavonia*, y observó que estos presentaron constricciones secundarias en el par de cromosomas más grande de ambas variedades, así mismo hizo referencia a la presencia de constricciones secundarias en tres de los pares de cromosomas chicos de la variedad que denominó carmín, y para un par de los cromosomas chicos de la variedad que denominó rosa; y Sharma y Sharma (1961) quienes reportaron un número cromosómico de $2n = 26$ así como la presencia de constricciones secundarias para ambos pares de cromosomas grandes.

Por su parte Kenton y Heywood (1983), para el caso de *T. pavonia* reportó $2n = 28$ con la misma bimodalidad del cariotipo, indicando la presencia de constricciones secundarias en tres de los cromosomas chicos.

Las diferencias antes citadas pueden haberse debido principalmente a que ninguno de los autores reporta con qué variedad específica trabajó, es por ello que se necesitan más estudios citogenéticos para poder identificar las diferencias cromosómicas de cada una de las variedades.

III. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de analizar las características cromosómicas de las especies debe verse como una actividad primordial, ya que su conocimiento facilita la selección de genotipos para el desarrollo de programas de protección y mejoramiento genético, así mismo esta información es útil al taxónomo y al biólogo evolucionista, debido a que los habilita para detectar las diferencias entre los taxa y conocer sus patrones de divergencia. *Tigridia pavonia* es una especie de gran interés ornamental, a pesar de ello se conoce muy poco sobre las características cromosómicas de todas sus variedades existentes, entre ellas el análisis de la variedad Dulce es de gran interés, puesto que esta es una de las variedades que presenta un menor índice de formación de frutos, lo que podría indicar cambios cromosómicos en la especie.

IV. HIPÓTESIS

La determinación del cariotipo y el mapeo físico de los genes 5s y 45s rDNA revelaran cambios cromosómicos en *Tigridia pavonia* variedad Dulce.

V. OBJETIVOS

- Determinar el cariotipo de *Tigridia pavonia* variedad Dulce.
- Mapear físicamente los genes 5s y 45s DNA en *Tigridia pavonia* variedad Dulce
- Analizar la estructura cariotípica de *Tigridia pavonia* variedad Dulce.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Ubicación del experimento

La determinación del cariotipo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas (FCAgrí), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

El mapeo físico de los genes 5s y 45s se llevó a cabo en Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Unidad Zapopan, en el área de Biotecnología Vegetal.

6.2 Material vegetativo

Se utilizaron bulbos de *Tigridia pavonia* variedad Dulce, estos fueron cultivados bajo condiciones de invernadero. El material vegetativo fue proporcionado por el Dr. Luis Miguel Vázquez García Profesor-Investigador del Centro Universitario Tenancingo de la UAEMéx.

6.3 Observación de cromosomas mitóticos

Para la observación de los cromosomas, se prepararon laminillas de acuerdo con la metodología propuesta por Barba-González *et al.* (2005) y Palomino *et al.* (2015) con

algunos cambios, donde se ocuparon meristemos radiculares de cinco plantas de *T. pavonia* var. Dulce, observando 15 células en metafase.

6.4 Determinación del cariotipo

Una vez obtenida la preparación se seleccionó, fotografió y cuantificó el número de cromosomas, seleccionando exclusivamente las células donde los cromosomas se observaron con buena tinción, bien separados y en un solo plano.

Se determinó la morfología en base a Levan *et al.*, (1964), así mismo se definió la fórmula cariotípica, Longitud total del genoma (LTG), el índice de asimetría (TF), y se elaboró el idiograma.

6.5 Mapeo físico de los genes 5s y 45s rDNA

Por último, el mapeo físico se realizó por medio de la técnica de FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) de acuerdo con la metodología propuesta por Barba-González *et al.* (2005) utilizando como sondas los genes 5s y 45s rDNA, analizando la presencia y número de las sondas amplificadas.

VII. RESULTADOS

PENSOFT

[About Pensoft](#)
[Books](#)
[E-Books](#)
[Journals](#)
[News & Blog](#)
[Contact](#)



COMPARATIVE Cytogenetics
International Journal of Plant & Animal Cytogenetics,
Karyotypes and Molecular Systematics

Q

Submit a manuscript
Your Lists

Articles
About

MY TASKS

Pending 0

My manuscripts

Active 2

Published 0

Rejected 0

Cancelled 0

Submission #11226

Current status
Metadata

[Edit](#)

Karyotype analysis and physical mapping of the 5s and 45S rDNA genes in *Tigridia pavonia* var. Dulce

Hugo Abelardo Arroyo Martínez , Amary Martín Acosta Fernández , Rodrigo Barba-González , Jose Luis Piña Escobar

Article type: Research Article Type of review: Conventional peer review

Date submitted: 17-11-2016

Authors [Edit](#)

Name	Affiliation	Country	City	Corresponding author
Hugo Abelardo Arroyo Martínez	Universidad Autónoma del Estado de México	México	Toluca	
Amary Martín Acosta Fernández	Universidad Autónoma del Estado de México	México	Toluca	
Rodrigo Barba-González	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.	México	Guadalajara	
José Luis Piña Escobar				<input checked="" type="checkbox"/>

* only the submitting author can handle this manuscript in the journal system

Abstract [Edit](#)

Tigridia pavonia (L.) DC is a species with great ornamental potential of which nine different varieties are known. Among them, "Dulce" presents the least seed formation. Despite this, there are no reports on cytogenetic characteristics for this variety. In the present study its karyotype was determined, and the physical mapping of the 5S and 45S rDNA genes was performed by FISH. The results show that *Tigridia pavonia* variety Dulce exhibited a chromosome number of $2n = 2x = 20+2S$. The karyotype formula was $2n = 42m + 3S$. Also, amplification of the 5S and 45S rDNA genes was achieved by means of the FISH technique, where the 5S rDNA gene amplified in eight different regions, whereas the 45S rDNA gene was observed in 23 chromosome regions, of which four corresponded to secondary constrictions. The information generated can serve as a basis for future evolutionary analyses, and for genetic improvement in the species.

Keywords

3 chromosomes, Fluorescent In Situ Hybridization, Ornamental, Ribosomal genes

Indexed terms [Edit](#)

Taxon	D. Gaceae
Geo-spatial coverage	México
Subject coverage, method or approach	Molecular Genetics
Supporting agencies	

Intended to be published in: [Edit](#)

regular issue

Karyotype analysis and physical mapping of the 5s and 45s rDNA genes in *Tigridia pavonia* var. Dulce

Hugo Abelardo Arroyo Martínez¹, Amaury Martín Arzate Fernández¹, Rodrigo Barba González², José Luis Piña Escutia¹

1Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, Km 11.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, 50200, Toluca, Estado de México, México **2**Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad Zapopan, Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, 45019, Zapopan, Jalisco, México

Corresponding author: José Luis Piña Escutia (jlpin@uaemex.mx)

Abstract

Tigridia pavonia (Lf) DC is a species with great ornamental potential of which nine different varieties are known. Among them, “Dulce” presents the least seed formation. Despite this, there are no reports on cytogenetic characteristics for this variety. In the present study its karyotype was determined, and the physical mapping of the 5S and 45S rDNA genes was performed by FISH. The results show that *Tigridia pavonia* variety Dulce exhibited a chromosomal number of $2n = 2x = 28+3B$. The karyotypic formula was $26m + 2sm + 3B$. Also, amplification of the 5S and 45S rDNA genes was achieved by means of the FISH technique, where the 5S rDNA gene amplified in eight different regions, whereas the 45S rDNA gene was observed in 10 chromosome regions, of which four corresponded to secondary constrictions. The information generated can serve as a basis for future evolutionary analyzes, and / or genetic improvement in the species.

Key words: B chromosome, Fluorescent *In Situ* Hybridization, Ornamental, Ribosomal genes,

Introduction

The genus *Tigridia* includes at least 43 species and six subspecies, of which 41 are endemic to Mexico (Munguía-Lino et al. 2015). Among them, *Tigridia pavonia* (Lf) DC stands out

for the great variability in colors and beauty of its flowers as an attractive floricultural resource. Today it is widely cultivated in Europe, Asia and Australia, where it is marketed as a gardening plant.

For this species, nine varieties are known in Mexico, which are registered in the National Catalog of Varieties of Plants (Catálogo Nacional de Variedades Vegetales, CNVV 2016). Morphological characterization studies (Vázquez-García et al. 2001a), as well as molecular analyzes (Arzate-Fernández et al. 2008, Piña-Escutia et al. 2010ab) performed in these varieties, have shown that genetic variation is related to the geographical origin of each variety (Piña-Escutia et al. 2010a) and that this factor can exert a marked influence on flowering and fruiting.

In addition, it is known that there is a relationship between flower color and fertility, being “Sandra” (a variety with red flowers) with a higher fertility (76.8%) compared to 38.7% of “Angeles” (a variety with Flowers of white color) and 28.1% of “Dulce” (a variety with yellow flowers) (Vázquez-García et al. 2001b).

Variation in fertility may be a result of chromosomal pairing problems or presence of different chromosomal structural arrangements (Kumar et al. 1987, Martínez et al. 2000, Reed et al. 2001), limiting seed production. In *Tigridia*, something similar has been reported by Molseed (1970) who made crosses between *T. pavonia* and related species and did not obtain seed formation due to lack of endosperm formation. Likewise, Piña-Escutia et al. (2013) obtained a limited number of interspecific hybrids between *T. pavonia* and *T. augusta*, only when they cultured ovary sections *in vitro* of those crosses. Due to the above, a better cytogenetic knowledge of *T. pavonia* may favor the development of hybridization programs among the varieties of this specie, as well as with other related species.

In cytogenetic studies, one of the first objectives is the identification of chromosomes and the construction of the karyotype based on their morphological characteristics (Lakshmanan et al. 2015). The development of the Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) technique facilitates the identification of specific sequences of individual chromosomal of the chromosome complement (Abd El-Twab 2007, Van Laere et al. 2008), allowing to

appreciate the types of evolutionary changes in the chromosomes of certain species, as well as the physical mapping of highly repetitive DNA sequences (Abd El-Twab 2007, Lakshmanan et al. 2015). Ribosomal genes (rDNA) have been used as probes in FISH because of their high copy number of replicate units, specific position on chromosomes and their highly conserved sequences (Gomez-Rodriguez et al. 2013).

Mizuochi et al. (2007) mentions that 45S rDNA genes are highly repeatable units (18S, 5.8S and 26S rDNA), while the 5S rDNA genes, which are also highly repetitive, are independent of the region of the 45S rDNA gene in eukaryotes. In addition, both the location and number of rDNA sites vary between closely related species, as well as at intraspecific level (Raskina et al. 2008), whereby such sequences have been used in numerous phylogenetic and evolutionary studies (Mizouchi et al. 2007, Raskina et al. 2008, Van Laere et al. 2008, Lakshmanan et al. 2015).

Until now, the cytological studies performed in *T. pavonia* are very scarce. In them, only aspects referring to their chromosomal number and bimodality of the chromosomal complex have been reported, in addition to that certain characteristics as the position of the secondary constrictions vary from one author to another (Molseed 1970, Kenton and Heywood 1984). Therefore, the objective of the present work was to determine the karyotype and to perform the physical map of the 45S and 5S rDNA genes in *Tigridia pavonia* var. “Dulce”.

Material and Methods

Plant material

Bulbs of *Tigridia pavonia* var. “Dulce” were used. The bulbs were obtained from the Wild Species Conservation Center (Centro de Conservación de Especies Silvestres) of the Centro Universitario Tenancingo, of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex),

and were planted in pots containing a substrate composed of mountain soil, sand and cattle manure (ratio 1: 1: 1), in a rustic greenhouse of the Facultad de Ciencias Agrícolas of the UAEMex

Mitotic chromosome preparations

Chromosome slides preparation was done according to the methodology proposed by Barba-González et al. (2005) and Palomino et al. (2015) with a few changes, five metaphase cells of five plants of *T. pavonia* var. “Dulce”. The root meristems were placed in a solution of 8-hydroxyquinoline 0.002 M for 6 h at 4 ° C under dark conditions. Subsequently, they were fixed in Farmer solution for 24 h, and hydrolyzed with HCl (1N) for 8 min at 60 °C. Chromosomes were stained with Schiff reagent for 1 h; and subsequently treated with a mixture of enzymes to a final concentration of 1% (Cellulase, Pectolyase, Cytohelicase) in citrate buffer pH 4.5 for 2 h at 37 °C. After the enzymatic digestion, the meristem was placed in the slide and a drop of acetorcein (1%) was added. After placing the coverslips, the tissue was disrupted and the cells were left in a single plane by the squash method, the preparations were made permanent by the method of liquid nitrogen. The preparations were analyzed with an Olympus phase contrast microscope and the best cells of each species were photographed with a Leica MC170 HD camera.

Analysis of mitotic chromosomes and karyotype determination

Measurement of the chromosome arms was carried out by utilizing the software LAZE V.4 and based on this it was determined: Chromosome morphology, total genome length in μm (LGT), and asymmetry index (TF%). The classification of chromosome morphology was performed following the methodology proposed by Levan et al. (1964). Chromosomal homology was established according to the similarities in length and centromeric position. The idiograms were elaborated according to the mean values of the short arm and long arm in each pair of chromosomes and were grouped in metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st) and telocentric (t) chromosomes. The asymmetry index (TF%) was obtained as reported by Sinha and Roy (1979).

Physical mapping of the 45S and 5S rDNA genes

The physical mapping of the 45S and 5S rDNA genes was done according to the methodology proposed by Barba-González et al. (2005) with some changes, for the slide preparation the root meristems were placed in a solution of 8-hydroxyquinoline 0.002 M for 6 h at 4 °C under dark conditions. Subsequently, they were fixed in Farmer's solution for 24 h, and incubated in an enzyme digestion mixture containing 0.2% (w/v) Y23 pectolyase, 0.2% (w/v) cellulase, and cytohelicase 0.2% (w/v) in citrate buffer 10 mmol/L (pH 4.5), at 37 °C for about 2 h. Cell squash was performed in a drop of 50% acetic acid and frozen in liquid nitrogen, the coverslips were removed with a razor blade and immediately dehydrated in 96% ethanol and air dried.

Two different probes were used for the Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) technique: clones pTa71 and pTa794 which contains the EcoRI fragment of 45S and 5S ribosomal DNA from wheat respectively (Gerlach and Bedbrook, 1979; Gerlach and Dyer 1980), which were isolated with the High Pure Plasmid Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) and labelled with biotin-16-dUTP (Biotin-Nick Translation Mix) y Dig -11-dUTP (Digoxigenin-Nick Translation Mix) respectively according to the manufacturer's instructions.

Hybridization with the probes was performed by incubating the slides in RNase (100 µg/mL) for 1 h, and pepsin (5 µg/mL) for 10 min, both at 37 °C, and then in paraformaldehyde (4%) for 10 min at room temperature; then dehydrated with 70%, 90% and 100% ethanol for 3 min each, and air dried. Hybridization continued using a mixture consisting of 20x SSC, 50% formamide, 10% sodium dextran sulfate, 10% SDS, and 25-50 ng/mL of each probe. The DNA was denatured by heating the hybridization mixture to 70 °C for 10 min and placing it on ice for at least 10 min. For each slide, 80 µL of the hybridization mixture was used. The slides were denatured at 80 °C for 10 min and hybridized overnight at 37 °C in a humid chamber, the slides were washed at room temperature in 2x SSC for 15 min and in 0.1x SSC at 42 °C for 30 min. Chromosomes were counterstained with 1 µL/mL of DAPI (4',diamidino-2-phenylindole), and a drop of Vectashield antifade (Vector Laboratories) was added before examining the slides under a

Leica DMRA2 microscope (Leica Microsystems, Germany) equipped with epifluorescent lighting and coupled to an Evolution QEi camera (Media-Cybernetics, USA).

Results and Discussion

A common feature of ornamental bulbs is the existence of polyploid cultivars. For example, in *Crocus* spp., the presence of more than a basic number of chromosomes has resulted in what appear to be aneuploid cultivars (Ramanna et al. 2012), which has also been observed in *Iris japonica* (Zhou et al. 2003). In the present study, *Tigridia pavonia* var. “Dulce” exhibited a chromosome number of $2n = 2x = 28 + 3B$ (Figure 1) with the presence of three putative B chromosomes. Our results contrast with what was mentioned by Molseed (1970) and Kenton and Heywood (1984) who reported a bimodal karyotype with a chromosomal number of $2n = 28$. In this respect, it is important to note that in their studies, these researchers did not mention the variety used, which may explain the difference. This also suggests that each of the nine varieties of *T. pavonia* may have unique structural chromosomal changes, as reported by Alves et al. (2011) in *Alophia drummondii*, and Gettner (2005) in *Bellevalia saviczii* respectively, who observed that plants of the same species from different localities showed variation in chromosome number and that the presence of B chromosomes was only in some of them.

Houben and Charchilan (2012) mention that most B chromosomes do not confer any advantage, so they are not necessary for the normal growth and development of the host organism (Banaei-Moghaddam et al. 2013). However, it has been reported that their presence may affect the synthesis of essential oils (Tomson and Thoppil 2005), as well as the fertility of the organism (Jones et al. 2008). According to Ghaffari and Bidmeshkipoor (2002) in *Acanthophyllum laxiusculum*, the presence of B chromosomes might increase pollen stability and seed production. Nevertheless, the results of the present study could indicate the opposite, considering that Dulce is one of the varieties with less formation of fruits and fewer seed production, although additional studies are necessary in the rest of the varieties to confirm this.

In spite of the three additional chromosomes in the chromosomal complement, *T. pavonia* var. “Dulce” retains its bimodal karyotype, with the presence of four large and 24 small

chromosomes. In this way *T. pavonia* var. “Dulce” presented a karyotypic formula of $26m + 2sm + 3B$, presenting a Total Genome Length (μm) of $124.94 \mu\text{m}$, and an Asymmetry Index of 44.29; where the length of the large chromosomes ranged from $11.46 - 7.77 \mu\text{m}$, while the small chromosomes had a length between $4.77 - 2.11 \mu\text{m}$, and the putative B chromosomes had a length between $1.75 \mu\text{m} - 1.40 \mu\text{m}$ being markedly smaller than any normal chromosome, which is one of the main characteristics of B chromosomes (Jones et al. 2008).

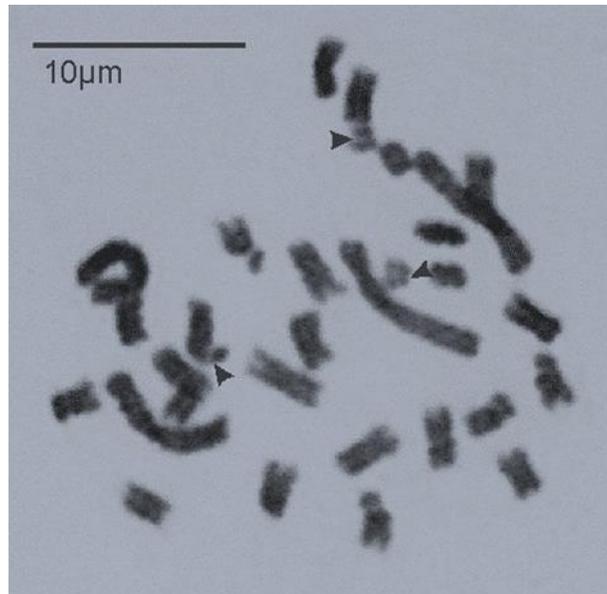


Figure 2. *Tigridia pavonia* var. “Dulce” mitotic metaphase chromosomes. $2n = 2x = 28 + 3B$. Arrows indicate putative B chromosomes.

Navrátilová et al. (2003), mention that the karyotype of various species is established on the basis of chromosome size, centromeric position and banding pattern, which, in many species is limited by the morphological similarity of the chromosomes. One way to overcome such limitations is the use of specific DNA sequences in the chromosomes through FISH, which facilitates the obtaining of specific probes patterns for discrimination of similar chromosomes. In this sense, Gomez-Rodriguez et al. (2013) analyzing three species of *Agave* observed that despite the difference in chromosome number assignment, those chromosomes that had the same position as the 18s and 5s rDNA genes were homologous; concluding that the length, intensity and position of the amplified probe are important characteristics that can help the identification of homologous chromosomes.

In the present study the amplification of the 5S (red) and 45S (green) genes of rDNA for *T. pavonia* var. “Dulce” (Figure 2) were achieved for the first time, where the 5S rDNA gene amplified in 8 regions, whereas the 45s rDNA gene amplified in 10 regions of different chromosomes respectively

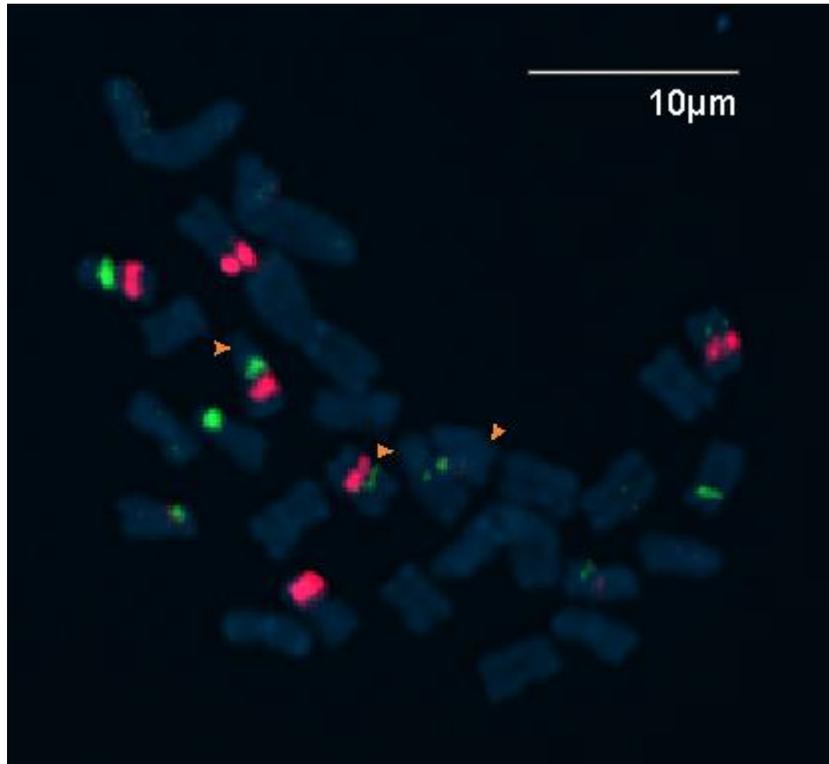


Figure 3. Fluorescent In Situ hybridization of the 5S genes (red fluorescence) and 45S rDNA (green fluorescence) in *Tigridia pavonia* var. “Dulce”. Chromosomes were counterstained with DAPI. Arrows indicate putative B chromosomes.

The data obtained by FISH were integrated into the idiograms, indicating the number and position of the 5S and 45S rDNA loci (Figure 3). It can be observed that, four of the eight loci of the 45S rDNA gene, are localized in the secondary constrictions (chromosomal pair 9 and 13). This coincides with that reported by Abd El-Twab et al. (2007), Van Laere et al. (2008) and Lakshmanan et al. (2015) who indicate that the 45S rDNA gene is associated with the nucleolar organizer region (NOR) and is usually positioned in the secondary constriction of satellite chromosomes.

It is important to note also the large number of regions localized with both genes as well as those regions of the 45S rDNA gene that are located on different regions to the secondary

constrictions, which according to Lakshmanan et al. (2015) may be due to a polyploidization event in which the number of regions of such genes is generally doubled and can be detected by the FISH technique.

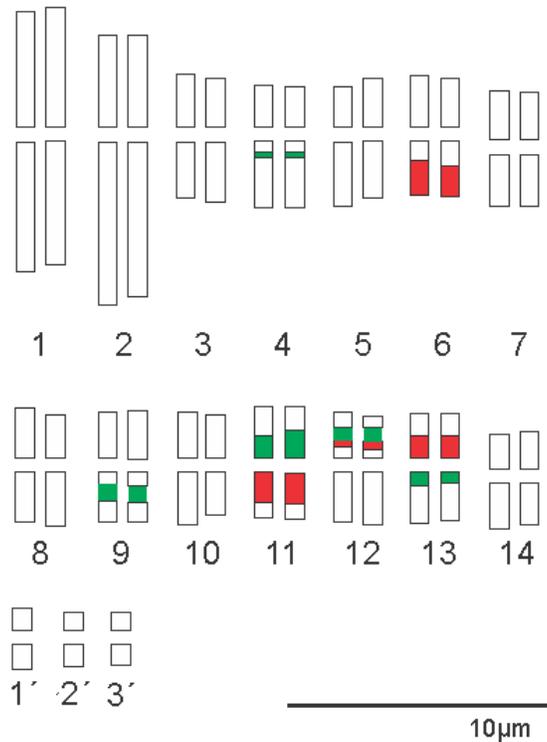


Figure 4. Idiogram of *Tigridia pavonia* var. “Dulce” with a chromosome formula of $26m + 2sm + 3B$. The red marks indicate the 5S rDNA gene and the green marks indicate the 45S rDNA gene.

Jones and Houben (2003) mention that some B chromosomes could be composed by ribosomal DNA. In this regard, Xie et al. (2014) observed in hybrids of *Lilium* that one chromosome B of the analyzed chromosome complements, was completely labeled by the 5S rDNA probe, whereas in other hybrid the chromosome B was only partially marked by the probe 45S. In contrast, in our study, none of the B chromosomes were labeled by the probes 5S or 45S evaluated, which may indicate that this type of ribosomal genes do not intervene in the origin of the B chromosomes in the analyzed plants, as pointed out by Jones et al. (2008).

Conclusions

The karyotype of *Tigridia pavonia* var. “Dulce” was determined, with a chromosome number of $2n = 2x = 28 + 3B$, with the presence of three putative B chromosomes, showing a karyotype formula of $26m + 2sm + 3B$. Likewise, we could visualize the 5S and 45S rDNA genes by means of FISH, where the 5S rDNA gene is located in eight different chromosomes (four homologous pairs), whereas the 45S rDNA gene was observed in 10 chromosomes (five homologous pairs), of which four corresponded to secondary constrictions.

Using the FISH technique, homologous chromosomes were identified and it is suggested that *T. pavonia* var. “Dulce” is a diploid species and due to a possible process of ancestral polyploidization, formed its characteristic bimodal karyotype. The information generated may serve as a basis for future evolutionary analyzes, and/or breeding programs of the species.

Bibliografía

Abd El-Twab MH (2007) Physical mapping of the 45S rDNA on the chromosomes of *Triticum turgidum* and *T. aestivum* using fluorescence *in situ* hybridization for chromosome ancestors. Arab Journal of Biotechnology 10 (1): 69-80.

Alves FLI, Lima ASA, Felix PL (2011) Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. Genetics and Molecular Biology 34 (2): 259-267. doi: 10.1590/S1415-47572011000200016.

Arzate-Fernández AM, Hoyos-Basurto A, Vázquez-García LM, Gutiérrez-Martínez MG (2008) Isozyme characterization of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. Agrociencia 42: 519-528.

Banaei-Moghaddam AM, Meier K, Karimi-Ashtiyani R, Houben A (2013) Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. The Plant Cell 25: 2536-2544. doi: 10.1105/tpc.113.111856.

Barba-Gonzalez R, Ramanna MS, Visser RGF, Van Tuyl JM (2005) Intergenomic recombination in F₁ lily hybrids (*Lilium*) and its significance for genetic variation in the BC₁ progenies as revealed by GISH and FISH. Genome 48: 884-894. doi: 10.1139/g05-057.

CNVV (2016) Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 38 pp.

- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7: 1869-1885.
- Gerlach WL, Dyer TA (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* 8: 4851-4865.
- Ghaffari SM, Bidmeshkipoor A (2002) Presence and behaviour of B-chromosomes in *Acanthophyllum laxiusculum* (*Caryophyllaceae*). *Genetica* 115: 319-323. doi: 10.1023/A:1020676119886.
- Gettner ME (2005) Variable karyotype with B-chromosomes in *Bellevalia saviczii* (*Liliaceae*). *Genetica* 124: 223–234. 10.3897/CompCytogen.v10i1.6445.
- Gomez-Rodriguez VM, Rodriguez-Garay B, Palomino G, Martínez J, Barba-Gonzalez R (2013) Physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in three species of *Agave* (*Asparagales*, *Asparagaceae*). *Comparative Cytogenetics* 7(3): 191–203. doi: 10.3897/CompCytogen.v7i3.5337.
- Houben A, Carchilan M (2012) Plant B chromosomes: What makes them different?. In: Bass HW, Birchler JA (Eds) *Plant cytogenetics. 4. Genome Structure and Chromosome Function*. Vienna: Springer. doi: 10.1007/978-0-387-70869-0_1.
- Jones RN, Houben A (2003) B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?. *Trends in Plant Science* 8: 417-423. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00187-0.
- Jones RN, Viegas W, Houben A (2008) A Century of B Chromosomes in Plants: So What?. *Annals of Botany* 101: 767–775. doi: 10.1093/aob/mcm167.
- Kenton A, Heywood CA (1984) Cytological Studies in South American Iridaceae. *Plant Systematic and Evolution* 146: 87-104. doi: 10.1007/BF00984056.
- Kumar OA, Ramesh CP, Raja Rao KG (1987) Cytogenetic studies of the F₁ hybrids of *Capsicum annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. *Theoretical Applied Genetics* 74:242-246. doi: 10.1007/BF00289975.
- Lakshmanan PS, Van Laere K, Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E, Khrustaleva L (2015) Karyotype analysis and visualization of 45S rRNA genes using fluorescence *in situ* hybridization in aroids (*Araceae*). *Comparative Cytogenetics* 9(2): 145–160. doi: 10.3897/CompCytogen.v9i2.4366.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x.

- Martinez J, Mendez I, Palomino G (2000) Cytological and genical differentiation between cytotypes of *Echeandia nana* (Anthericaceae). *Caryologia* 53 (2): 147-158. doi: 10.1080/00087114.2000.10589190.
- Mizuochi H, Marasek A, Okazaki E (2007) Molecular cloning of *Tulipa fosteriana* rDNA and subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization of 5S rDNA and 45S rDNA in *T. gesneriana* and *T. fosteriana*. *Euphytica* 155: 235–248. doi: 10.1007/s10681-006-9325-y.
- Munguía-Lino G, Vargas-Amado G, Vázquez-García LM, Rodríguez A (2015) Riqueza y distribución geográfica de la tribu Tigridieae (Iridaceae) en Norteamérica. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 80-98. doi: 10.7550/rmb.44083.
- Molseed E (1970) The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California publications in botany, Berkeley 54: 1-126.
- Navrátilová A, Neumann P, Macas J (2003) Karyotype analysis of four *Vicia* species using in situ hybridization with repetitive sequences. *Annals of Botany* 91: 921-926. doi: 10.1093/aob/mcg099.
- Palomino G, Martínez J, Méndez I, Cepeda-Cornejo V, Barba-González R, Rodríguez-Garay B (2015) Nuclear genome size and cytotype analysis in *Agave parviflora* Torr. subsp. *flexiflora* Gentry (Asparagales, Asparagaceae). *Caryologia* 68 (3): 159-168. doi: 10.1080/00087114.2015.1032575.
- Piña-Escutia JL, Vences-Contreras C, Gutiérrez-Martínez MG, Vázquez-García LM, Arzate-Fernández AM (2010a) Morphological and molecular characterization of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia* 44 (2): 147-158.
- Piña-Escutia JL, Vázquez-García LM, Arzate-Fernández AM (2010b) Variety discrimination of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. assessed by different length RAPD primers. *Electronic Journal of Biotechnology* 13 (4): 10-11. doi: 10.2225/vol13-issue4-fulltext-7.
- Piña-Escutia JL, Vázquez-García LM, Arzate-Fernández AM (2013) Interspecific hybridization between *Tigridia pavonia* and *T. augusta* through ovary slice culture. *Genetics and Molecular Research* 12 (1): 15-22. doi: 10.4238/2013.January.16.4.

Ramanna MS, Marasek-Ciolakowska A, Xie S, Khan N, Arens P, Van Tuyl JP (2012) The significance of polyploidy for bulbous ornamentals: a molecular cytogenetics assessment. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6(1): 116-121.

Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A (2008) Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research* 120:351-357. doi: 10.1159/000121084.

Reed SM, Riedel GL, Pooler MR (2001) Verification and establishment of *Hydrangea macrophylla* “Kardinal” x *H. paniculata* “Brussels Lace” interspecific hybrids. *Journal of Environmental Horticulture* 19:85-88.

Tomson M, Thoppil JE (2005) Influence of B-chromosome on essential oil content and composition in *Salvia coccinea* Buc’hoz ex Etl. (Lamiaceae). *Caryologia* 58 (3): 246-248. doi: 10.1080/00087114.2005.10589458.

Van Laere K, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E (2008) Karyotype analysis and physical mapping of 45S rRNA genes in *Hydrangea* species by fluorescence *in situ* hybridization. *Plant Breeding* 127:301-307. doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01456.x.

Vázquez-García LM, Norman MTH, Corona RMC (2001a) Oceloxochitl *Tigridia pavonia* (L. f.) DC. Colección: Ciencias Naturales y Exactas, Serie: Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. México. 69 pp.

Vázquez-García LM, Przybyla AA, De la Cruz TE, Torres Navarro H, Rodríguez G (2001b). Morphological description of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L. F.) Ker. Gawl. *Journal of Applied Botany* 75: 14-19.

Sinha SSN, Roy H (1979) Cytological studies in the genus *Phaseolus* I. Mitotic analysis in fourteen species. *Cytologia*, 44:191-199. doi: 10.1508/cytologia.44.191.

Xie S, Marasek-Ciolakowska A, Ramanna MS, Arens P, Visser RJF, Van Tuyl JM (2014) Characterization of B chromosomes in *Lilium* hybrids through GISH and FISH. *Plant Systematic Evolution* 300:1771–1777. doi: 10.1007/s00606-014-1004-1.

Zhou YH, Wu BH, Yan J, Yang RW, Ding CB, Zhang L (2003) Cytogenetic study on the interspecific hybrid between *Iris japonica* and *Iris confusa* (Iridaceae). *Acta Botanica Yunnanica* 25:497-502.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Abd El-Twab, M.H. 2007. Physical mapping of the 45S rDNA on the chromosomes of *Triticum turgidum* and *T. aestivum* using fluorescence *in situ* hybridization for chromosome ancestors. Arab Journal of Biotechnology 10 (1): 69-80.
- 2.- Barba-Gonzalez, R.; Ramanna, M.S.; Visser, R.G.F.; Van Tuyl, J.M. 2005. Intergenomic recombination in F₁ lily hybrids (*Lilium*) and its significance for genetic variation in the BC₁ progenies as revealed by GISH and FISH. Genome, 48: 884-894.
- 3.- CNVV (2016). Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 38 pp.
- 4.- Castañeda-Nava, J. J.; Santacruz-Ruvalcaba, F. y Barba-González, R. 2012. Análisis citogenético y estomático para determinar los niveles de ploidía en camote de cerro (*Dioscorea* spp.). Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Zapopan, Jalisco.
- 5.- García-Velázquez, A. 1990. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Talleres Gráficos de la Nación. México, D.F. 137 pp.
- 6.- Gomez-Rodriguez, V.M.; Rodriguez-Garay, B.; Palomino, G.; Martínez, J. y Barba-Gonzalez, R. 2013. Physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in three species of *Agave* (Asparagales, Asparagaceae). Comparative Cytogenetics 7(3): 191–203.
- 7.- Herrera, J. C. 2007. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. Agronomía Colombiana 25(1).
- 8.- Kenton, A. y Heywood, C. A. 1983. Cytological Studies in South American Iridaceae. Plant systematic and evolution 146: 87-104.

- 9.- Lakshmanan, P.S.; Van Laere, K.; Eeckhaut, T.; Van Huylenbroeck, J.; Van Bockstaele, E.; Khrustaleva, L. 2015. Karyotype analysis and visualization of 45S rRNA genes using fluorescence *in situ* hybridization in aroids (Araceae). *Comparative Cytogenetics* 9(2): 145–160.
- 10.- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes, Genetics Institute, Lund, Suecia, and Roswell Park Memorial Institute, United States of America, Buffalo, New York.
- 11.- Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, P. y Mroginski, L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.
- 12.- Marcela-Delgado, L.; Uribe-Lastra, M. y Marulanda-Angel, 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 pp.
- 13.- Munguía-Lino, G.; Vargas-Amado, G.; Vázquez-García, L.M.; Rodríguez, A. 2015. Riqueza y distribución geográfica de la tribu Tigridieae (Iridaceae) en Norteamérica. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 80-98.
- 14.- Mizuochi, H.; Marasek, A.; Okazaki, E. 2007. Molecular cloning of *Tulipa fosteriana* rDNA and subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization of 5S rDNA and 45S rDNA in *T. gesneriana* and *T. fosteriana*. *Euphytica* 155: 235–248.
- 16.- Molseed, E. 1970. The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley, 54: 1-126.

- 17.- Navrátilová, A.; Neumann, P.; Macas, J. 2003. Karyotype analysis of four *Vicia* species using *in situ* hybridization with repetitive sequences. *Annals of Botany* 91: 921-926.
- 18.- O'Connor, C. 2008. Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). *Nature Education* 1(1).
- 19.- Palomino, G.; Martínez, J.; Méndez, I.; Cepeda-Cornejo, V.; Barba-González, R. y Rodríguez-Garay, B. 2015. Nuclear genome size and cytotype analysis in *Agave parviflora* Torr. subsp. *flexiflora* Gentry (Asparagales, Asparagaceae). *Caryologia* 68 (3): 159-168.
- 20.- Piña-Escutia, J.L.; Vences-Contreras, C.; Gutiérrez-Martínez, M.G.; Vázquez-García, L.M.; Arzate-Fernández, A.M. 2010a. Morphological and molecular characterization of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia* 44 (2): 147-158.
- 21.- Polak, J. M. y McGee, J. O'D. 1990. *In Situ* Hybridization Principles and Practice. Oxford University Press. Oxford New York, USA.
- 22.- Roche Applied Science. 2008. DIG Application Manual *for Nonradioactive In Situ Hybridization*. Cuarta edición Roche Diagnostics GmbH.
- 23.- Vázquez-García, L.M.; Przybyla, A.A.; De la Cruz, T.E.; Torres Navarro, H.; Rodríguez, G. 2001b. Morphological description of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L. F.) Ker. Gawl. *Journal of Applied Botany* 75: 14-19.