



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

Caracterización molecular de cromosomas B en *Tigridia pavonia*
(L.f.) DC.

TESIS

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

PRESENTA

HUGO ABELARDO ARROYO MARTÍNEZ

TUTOR ACADÉMICO:

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

TUTORES ADJUNTOS:

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

DR. RODRIGO BARBA GONZÁLEZ



El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Octubre 2020

INDICE

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIAS..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| RESUMEN..... | xi |
| SUMMARY | xii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Cromosomas B..... | 3 |
| 2.1.1 ¿Que son los cromosomas b? | 3 |
| 2.1.2 Importancia de los cromosomas b..... | 4 |
| 2.1.2 Que diferencia a los cromosomas b, de los cromosomas a | 6 |
| 2.1.2.1 Origen de los cromosomas B..... | 6 |
| 2.1.2.2 Estructura de los cromosomas B | 9 |
| 2.2 Caracterización molecular de cromosomas b..... | 11 |
| 2.2.1 Hibridación cromosómica In situ | 11 |
| 2.2.2 Microdissección cromosómica..... | 15 |
| 2.3 <i>Tigridia pavonia</i> (L.f.) DC. | 19 |
| 2.3.1 Descripción de la especie | 19 |
| 2.3.2 Importancia de la especie | 21 |
| 2.3.2 Importancia ornamental..... | 22 |
| 2.3.3 Importancia alimenticia – medicinal | 23 |
| 2.4 Diversidad genética y citogenética en <i>Tigridia pavonia</i> | 25 |
| 2.4.1 Citogenética | 25 |
| 2.4.2 Marcadores moleculares | 27 |
| III. JUSTIFICACIÓN..... | 32 |
| IV. HIPÓTESIS | 33 |
| V. OBJETIVOS | 34 |
| 5.1 General..... | 34 |
| 5.2 Específicos | 34 |
| VI. METODOLOGÍA | 35 |
| 6.1 Material vegetativo | 35 |
| 6.2 Diseño del experimento | 35 |

| | |
|---|----|
| 6.3 Elaboración de preparaciones cromosómicas | 37 |
| 6.3.1 Reactivos | 37 |
| 6.3.2 Metodología | 37 |
| 6.4 Determinación del cariotipo..... | 38 |
| 6.5 Obtención de genes ribosomales..... | 39 |
| 6.5.1 Cultivo de cepas de <i>E. coli</i> | 39 |
| 6.5.2 Extracción del adn plasmídico | 39 |
| 6.5.3 Reactivos | 39 |
| 6.5.4 Metodología..... | 40 |
| 6.6 Extracción de ADN genómico | 42 |
| 6.6.1 Reactivos | 42 |
| 6.6.2 Metodología | 43 |
| 6.7 Hibridación In Situ..... | 45 |
| 6.7.1 Preparación del adn sonda y de bloqueo para gish..... | 45 |
| ADN Sonda | 45 |
| ADN de bloqueo | 45 |
| 6.7.2 Elaboración de la sonda..... | 45 |
| 6.7.3 Proceso de hibridación in situ | 46 |
| 6.7.3.1 Reactivos | 46 |
| 6.7.3.2 Metodología..... | 47 |
| Hibridación | 48 |
| Lavados posteriores a la hibridación..... | 48 |
| Contrateñido y montaje..... | 49 |
| Visualización | 49 |
| 6.8 Microdissección y microclonación cromosómica | 50 |
| 6.8.1 Reactivos | 50 |
| 6.8.2 Metodología | 50 |
| 6.9 Clonación de secuencias de cromosomas B | 52 |
| 6.9.1 Reactivos | 52 |
| 6.9.2 Metodología | 52 |
| 6.10 Análisis con marcadores moleculares | 56 |
| VII. RESULTADOS..... | 57 |

| | |
|--|-----|
| 7.1 Artículo aceptado | 57 |
| 7.2 Artículo enviado | 73 |
| 7.3 Reporte: Microdissección y painting de cromosomas B en <i>Tigridia pavonia</i> (L.f.) DC. | 89 |
| VIII. DISCUSIÓN GENERAL | 101 |
| IX. CONCLUSIONES GENERALES | 104 |
| X. BIBLIOGRAFÍA | 106 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fotomicrografía de cromosomas B de <i>Zea mays</i> con tres cromosomas B en metafase mitótica. Tomada de Douglas and Birchler, 2017. | 4 |
| Figura 2. Diagrama de la representación del posible origen de un cromosoma B de un triploide del cromosoma 2 en <i>Plantago lagopus</i> , basado en Dhar et al. Tomado de Jones et al. (2008)..... | 7 |
| Figura 3. Modelo del posible origen de un cromosoma B a partir de una translocación. Tomado de Martis et al. (2012). | 8 |
| Figura 4. Secuencia y organización de cromatina del cromosoma B de <i>Brachycome dichromosomatica</i> . Tomado de: Jones and Houben (2003), modificado. | 10 |
| Figura 5. Proceso de hibridación in situ. Tomado de: https://slideplayer.com/slide/11836142/ | 12 |
| Figura 6. Hibridación de cromosomas B mediante la técnica de FISH. a). Hibridación total de cromosoma B de híbrido de Lily por el gen 5s rADN, tomado de Xie et al., 2014; b). Hibridación de cromosomas B en paquiteno de <i>Zea mays</i> con la secuencia pBPC28, tomado de Cheng and Lin, 2003..... | 13 |
| Figura 7. Hibridación de ADN genómico de centeno en híbridos de <i>Aegilops variabilias</i> por medio de la técnica de GISH. Tomado de Kousaka and Endo, 2012. | 15 |
| Figura 8. A) Micro disección mediante micro agujas de vidrio, autor propio; B) Microdissección mediante laser, Tomada de: https://www.leica-microsystems.com/es/productos/microscopios-opticos/detalles/product/show/Products/leica-lmd7/ | 16 |
| Figura 9. Microdissección y microclonación de cromosomas B de centeno. A y B) Proceso de microdissección de los cromosomas B; C) Corrimiento electroforético del producto de PCR de cromosomas B. Tomado de: Long et al., 2008. | 18 |
| Figura 10. Variedades botánicas de <i>Tigridia pavonia</i> . Autor: Propio. | 20 |
| Figura 11. Oceloxochitl. Código Florentino. Tomado de: http://www.cuexcomate.com/2016/01/tigridia-pavonia-flor-de-jaguar.html | 21 |
| Figura 12. Flores de <i>Tigridia pavonia</i> . Tomado de: https://www.pinterest.es/pin/436497388863516929/ | 22 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. <i>Tigridia pavonia</i> alimento. Tomado de: https://acienciacierta.minciencias.gov.co/index.php/experiencias-ganadoras-2015/342-watsimba-alternativa-de-sustitucion-del-maiz-en-alimento-concentrado-para-aves-284 | 24 |
| Figura 14. Cariotipo e hibridación de los genes 5s y 45s rADN en <i>T. pavonia</i> var. ‘Dulce’. a) Cromosomas en metafase mitótica, $2n = 2x = 28 + 3B$. Las cabezas de flecha indican los cromosomas B putativos. b) hibridación fluorescente in situ de los genes 5s (señales rojas) y 45s (señales verdes) rADN, los cromosomas fueron contrateñidos con DAPI. Las cabezas de flecha indican los cromosomas B. Figuras tomadas de Arroyo-Martínez et al., 2018. | 27 |
| Figura 15. Dendograma generado usando el análisis UPGMA, mostrando las relaciones entre las nueve variedades de <i>T. pavonia</i> , en función de diferentes marcadores tipo RAPD a) 10, b) 15 c) 20, y d) el conjunto de 10, 15 y 20, basado en la longitud del iniciador. Tomada de Piña-Escutia et al., 2010b. | 31 |
| Figure 1. Flowers of two <i>Tigridia pavonia</i> varieties: a) ‘Trinidad’, b) ‘Penélope’ | 61 |
| Figure 2. Chromosomes in mitotic metaphase of two <i>Tigridia pavonia</i> varieties: a) ‘Trinidad’ showing $2n = 2x = 28$, b) ‘Penélope’ showing $2n = 2x = 28 + 3B$. Arrowheads indicate the chromosomes with secondary constriction. | 64 |
| Figura 1. Análisis GISH (Genomic In Situ Hybridization) de cromosomas mitóticos en <i>Tigridia pavonia</i> var. ‘Penélope’. a) Cromosomas en metafase, las flechas apuntan a las regiones marcadas solo por el genoma de ‘Dulce’ (Tinción roja) en los cromosomas B. b) Cromosomas en profase, las flechas indican regiones de mayor hibridación por el genoma de Trinidad (Tinción verde) o ‘Dulce’ (Tinción roja). | 81 |
| Figura 1. Aislamiento de cromosomas B de <i>Tigridia pavonia</i> var. ‘Dulce’ mediante micromanipulador. a) Identificación de cromosoma B en metafase mitótica. c) Cromosoma B disectado de la preparación cromosómica. | 93 |
| Figura 2. Caracterización de los productos de la primera y segunda amplificación por PCR. a) Corrimiento electroforético de la primera PCR. b) Corrimiento electroforético de la segunda PCR. Línea 1, marcador escalera; Línea 2, control negativo; Líneas 3 y 4, producto de la amplificación de los fragmentos de cromosomas B por PCR. | 94 |
| Figura 3. Análisis FISH mostrando regiones específicas hibridadas por las secuencias de los cromosomas B microdisectados. Las flechas marcan los cromosomas B. | 96 |
| Figura 4. Análisis FISH mostrando una hibridación general de las secuencias de los cromosomas B microdisectados, en las preparaciones cromosómicas de <i>T. pavonia</i> var. ‘Dulce’. Las flechas marcan los cromosomas B. | 97 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Comparación de los cinco iniciadores aleatorios de ADN más usados en el análisis del genoma de plantas. Tomado de Adhikari, 2017. | 29 |
|---|----|

RESUMEN

Tigridia pavonia (L.f.) DC. (Iridaceae), es una especie silvestre de gran valor histórico, alimenticio, medicinal y ornamental, de la cual se conocen nueve variedades vegetales. Dentro del proceso evolutivo de la especie, la variedad 'Penélope' ha sido considerada un híbrido natural producto de la cruce entre las variedades 'Trinidad' y 'Dulce', sin embargo, hasta el momento no existe ningún estudio que pueda corroborarlo. Esto toma mayor importancia si se considera que en "Dulce" se ha reportado la presencia de cromosomas B en su cariotipo. El estudio de estos cromosomas es de relevancia debido a los efectos que pueden causar en los individuos que los poseen, como puede ser: disminución de la fertilidad; alteración del porcentaje de recombinación; y afectación de la transcripción de genes de los cromosomas A. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente los cromosomas B de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. Para ello se realizó el aislamiento, amplificación y chromosome painting de fragmentos de cromosomas B de *Tigridia pavonia* var. 'Dulce'. Así mismo, se caracterizaron los patrones genéticos de las variedades "Trinidad", 'Penélope' y 'Dulce', a través de marcadores moleculares y técnicas citogenéticas. De esta forma los resultados permitieron conocer parte de la estructura genética de los cromosomas B, y además se logró observar que estos pueden ser transmitidos aún en cruces inter varietales, lo que en conjunto con otras características tanto genéticas como citogenéticas permite sugerir que 'Dulce' y 'Trinidad' pueden ser progenitores de 'Penélope'.

Palabras clave: cromosomas B, *Tigridia pavonia*, híbrido natural, microdissección, FISH, GISH, RAPD.

SUMMARY

Tigridia pavonia (L.f.) DC. (Iridaceae), is a wild specie with great historic, alimentary, medicinal and ornamental value, of which nine varieties are known. Within the evolutionary process of the species, the variety 'Penélope' has been considered a natural hybrid product of the cross between the 'Trinidad' and 'Dulce' varieties, however, so far there is no study that can corroborate it, this takes more important if it's considered that in 'Dulce' the presence of B chromosomes has been reported in its karyotype. The study of these chromosomes is of relevance due to the effects they can cause in the individuals who possess them, such as: decreased fertility; alteration of the recombination rate; and affectation of the gene transcription of chromosomes A. Therefore, the objective of the present work was to molecularly characterize the B chromosomes of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. In order to achieve this, the isolation, amplification and chromosome painting of fragments of the B chromosomes of *Tigridia pavonia* var. 'Dulce'. Likewise, the genetic patterns of the 'Trinidad', 'Penélope' and 'Dulce' varieties were also characterized, through molecular markers and cytogenetic techniques. In this way the results allowed to know part of the genetic structure of the B chromosomes, and also it was also observed that these can be transmitted even in inter-varietal crosses, which, together with other genetic and cytogenetic characteristics, allow to suggest that 'Dulce' and 'Trinidad' may be the parents of 'Penélope'.

Key words: B chromosomes, *Tigridia pavonia*, natural hybrid, microdissection, FISH, GISH, RAPD.

I. INTRODUCCIÓN

Los cromosomas B son cromosomas extra-numéricos no esenciales para el desarrollo normal del individuo. A pesar de lo anterior, se han reportado aspectos relacionados con su presencia como disminución de la fertilidad en los individuos que los poseen, dependiendo en gran medida del número de cromosomas B presentes en el organismo; alteración del porcentaje de recombinación; además de reportarse que contienen secuencias genéticas que afectan la transcripción de genes de los cromosomas A (Randolph, 1941; Kouska and Endo, 2012; Huang et al., 2016, Douglas and Birchler, 2017). No obstante, el efecto puede variar dependiendo de la especie que los posee, lo cual está relacionado con el modo de origen de estos, ya que al ser estructuras formadas a partir de los cromosomas A (complejo de cromosomas normal de individuo) (Jones et al., 2008), el efecto de estos dependerá de su forma de origen y por ende de su composición genética. Es por ello que la caracterización molecular de los cromosomas B de las diversas especies que los poseen, resulta de gran interés e importancia, puesto que de esta forma se podrá conocer e identificar de una mejor manera el efecto y la interacción de estos cromosomas en los organismos que los poseen.

Tigridia pavonia (L.f.) DC. es una planta silvestre con uso ornamental, alimenticio y medicinal (Munguia-Lino et al., 2017; Torres-Méndez et al., 2019), de la cual se conocen hasta el momento nueve variedades botánicas (SNICS, 2018). Al respecto, Arroyo-Martínez et al. (2017) reportaron la presencia de tres cromosomas B en la variedad ‘Dulce’ sin embargo, hasta el momento no existen estudios que permitan conocer mejor su composición genética de estos cromosomas. En este sentido, la técnica de microdissección y microclonación, en conjunto con técnicas como la Hibridación In Situ, han servido para la caracterización de cromosomas B en especies como *Zea mays* (Cheng and Lin, 2003), o *Secale cereale* (Long et al., 2008.), entre otras.

Aunado a lo anterior el uso de la técnica de Hibridación In Situ no solo ha permitido la caracterización de diversos cromosomas B, sino también ha facilitado la investigación de relaciones evolutivas, identificación de regiones específicas, estudios de organización y homología cromosómica, identificación y diferenciación de cromosomas de progenitores en

híbridos, entre otros (Silva & Souza, 2013; Ramzan et al., 2017). Para el caso de *T. pavonia*, se considera que ‘Penélope’ podría ser un híbrido natural, resultado de la cruce entre las variedades ‘Dulce’ y ‘Trinidad’, variedades con las que comparte la misma zona geográfica, así como valores intermedios de fertilidad, tamaño de flor, y color (Piña-Escutia et al., 2010a; Vázquez-García et al., 2001b), por lo que el análisis de estas tres variedades, resulta de gran interés para poder develar las relaciones entre estas tres variedades, así como para analizar los cromosomas B desde una perspectiva diferente.

En base a lo anterior, la caracterización molecular de los cromosomas B de *T. pavonia* var. ‘Dulce’, así como el análisis de las características genéticas y citogenéticas de las variedades ‘Trinidad’, ‘Penélope’ y ‘Dulce’, no solo permitiría conocer la composición genética de los cromosomas B de *T. pavonia*, sino también corroborar si ‘Penélope’ es un híbrido natural, y saber si los cromosomas B de ‘Dulce’ pueden ser transmitidos aún en cruces inter-varietales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cromosomas B

El termino cromosomas B fue acuñado por Randolph en 1928 para distinguir a aquellos cromosomas diferentes de los cromosomas normales A (As) en *Zea mays*, aunque en 1907 ya habían sido observados como cromosomas supernumerarios en el insecto *Metapodius* por Wilson (Douglas and Birchler, 2017). Se estima que aproximadamente el 15% de las especies eucariotas presentan cromosomas B, y la mayoría de las especies que los presentan son plantas, donde si bien es difícil estimar la cantidad exacta de individuos que los poseen, se ha reportado que aproximadamente 2087 especies vegetales los presentan (Ahmad and Martis, 2017).

2.1.1 ¿Que son los cromosomas b?

De acuerdo Douglas and Birchler (2017) las siguientes características pueden ayudar en la identificación de los cromosomas B:

Son cromosomas extra numéricos, no esenciales para el desarrollo normal del individuo, pudiendo estar presentes o no en individuos de la misma especie, donde aquellos que los poseen pueden tener diferentes números de copias entre e inclusive dentro de ellos, existiendo individuos sin cromosomas B o con hasta 31 cromosomas B, como es el caso de *Zea mays*, así mismo se han reportado individuos que pueden presentar cromosomas B en algunos de sus tejidos (como la parte apical de la planta) pero no en otros (como la parte radicular de la planta) como ha sido reportado para *Aegilops speltoides* y *A. mutica*.

Son morfológicamente diferentes de los cromosomas A, siendo generalmente los cromosomas B heterocromatinizados y más pequeños en tamaño que los cromosomas A (Figura 1).

A pesar de considerarse que los cromosomas B se originan de los A, los cromosomas B no son homólogos de ninguno de los cromosomas A, ni se aparean con estos durante la meiosis, teniendo mecanismos propios de transmisión y acumulación de los mismos, mostrando una transmisión no mendeliana.

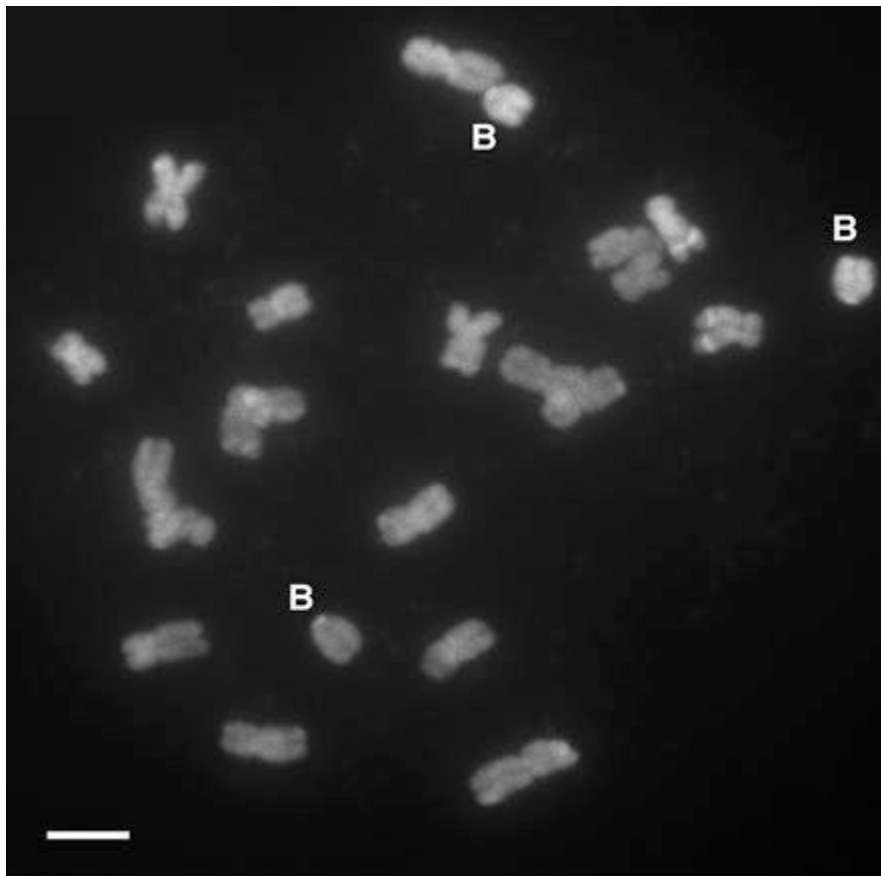


Figura 1. Fotomicrografía de cromosomas B de *Zea mays* con tres cromosomas B en metafase mitótica. Tomada de Douglas and Birchler, 2017.

2.1.2 Importancia de los cromosomas b

La importancia de los cromosomas B comenzó a observarse en función de los posibles efectos que parecían presentarse en los individuos que los poseían. Si bien existe una gran cantidad de efectos relacionados con ellos, se describen los principales:

1.- **Disminución de la fertilidad**, una de las principales razones por las que comenzaron a estudiarse este tipo de cromosomas, fue debido a la disminución de la fertilidad observada en aquellos individuos que poseían múltiples copias de estos (Randolph, 1941), donde dicha disminución puede deberse a un control genético, basado en la existencia de genotipos con una polinización preferencial donde en uno, la ovocélula es polinizada solo por aquellos granos de polen que contienen cromosomas B, como fue explicado por González-Sánchez et al. (2003) en *Zea mays*.

2.- **Alteración del porcentaje de recombinación**, se ha observado que la presencia de cromosomas B puede influir en la frecuencia de formación de quiasmas (Kouska and Endo, 2012), lo cual en programas de mejoramiento genético resulta de gran importancia al favorecer el intercambio genético. Por otro lado, este efecto podría influir en la diploidización de individuos aloploidos, donde si bien no se ha reportado mucho al respecto y se menciona que presenta dificultades en la utilización de este método de apareamiento (Jones, et al., 2008), debería considerarse en la generación de nuevas variedades.

3. **Los cromosomas B contienen secuencias genéticas que afectan la transcripción de genes de los cromosomas A**, se sabe que la mayoría de los cromosomas B contienen regiones de ADN con secuencias similares a los de los cromosomas A, en 2016 Huang et al., reportaron que varias de estas secuencias eran homologas de genes presentes en los cromosomas A y que estas podían regular la expresión de los mismos. Esta regulación genética, podría ser la que genere los diversos efectos observados en diferentes especies como: *Salvia coccinea* donde la presencia de los cromosomas B afecto la biosíntesis de aceites esenciales (Mani and Thoppil, 2005); *Allium schoenoprasum* donde su presencia se relaciona con una mejor tolerancia a condiciones de estrés por altas densidades de población, así mismo como con el incremento de la germinación y la velocidad de germinación de la semilla (Holmes and Bougourd, 1991; Plowman and Bougourd, 1994); o *Scilla autumnalis*,

donde en los individuos que presentaban cromosomas B se observó un incremento de la transcripción de la esterasa *E-1* (Oliver et al., 1982); entre otros efectos.

2.1.2 Que diferencia a los cromosomas b, de los cromosomas a

¿Qué es lo que hace tan diferente a los cromosomas B?, dos principales características que diferencian a los cromosomas B de los cromosomas A, son el origen y su estructura.

2.1.2.1 Origen de los cromosomas B

Hasta la fecha no hay un estudio que pueda demostrar una vía única para la formación de los cromosomas B, lo cual ha llevado al planteamiento de diversas teorías. En este sentido, Jones et al. (2008) recopilaron algunas de las teorías más aceptadas que se describen a continuación:

Amplificación masiva de secuencias ribosomales posterior a la fragmentación de un cromosoma A aneuploide. Una de las teorías más documentadas es la del nacimiento de los cromosomas B de *Platago lagopus* ($2n = 2x = 12$) (Figura 2), en la cual se rastreó una reciente trisomía del cromosoma 2, que después de diversas generaciones el cromosoma extra sufrió un rápido número de cambios estructurales, incluidos la formación de un cromosoma anillo, estabilizándose finalmente como un isocromosoma heterocromático con características de los cromosomas B, presentaba un centrómero funcional, no se apareaba con ningún otro cromosoma del complemento normal, mostraba transmisión preferencial y ausencia de algún efecto fenotípico. Así este nacimiento de mini-cromosoma se formó por la amplificación masiva de secuencias 5S rADN, los telómeros fueron añadidos “*de novo*” (lo cual se sabe que sucede), aunque aún no se conoce como este nacimiento de cromosomas B lleva a cabo la transmisión preferencial.

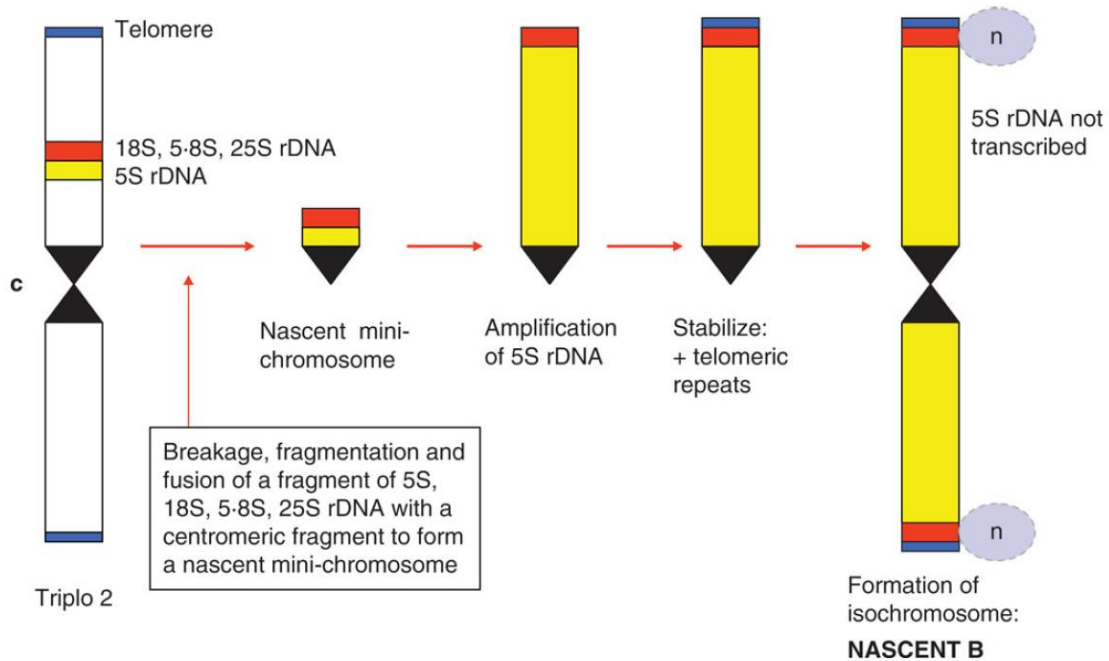


Figura 2. Diagrama de la representación del posible origen de un cromosoma B de un triploide del cromosoma 2 en *Plantago lagopus*, basado en Dhar et al. Tomado de Jones et al. (2008).

Producto de una traslocación desigual. Se ha mencionado que los cromosomas B, también pudieron originarse debido al escape de un pequeño fragmento céntrico (Figura 3) producto de: translocación; reducción del número cromosómico como se especula pudo haber pasado en la evolución de *Crepis fuliginosa* ($2n= 2x= 8 + Bs$) a partir de *C. neglecta* ($2n= 2x= 6$); o de un proceso de reducción aneuploide como se propuso para *Haplopappus gracilis* ($2n= 2x= 4 + Bs$).

Robertsonian translocation

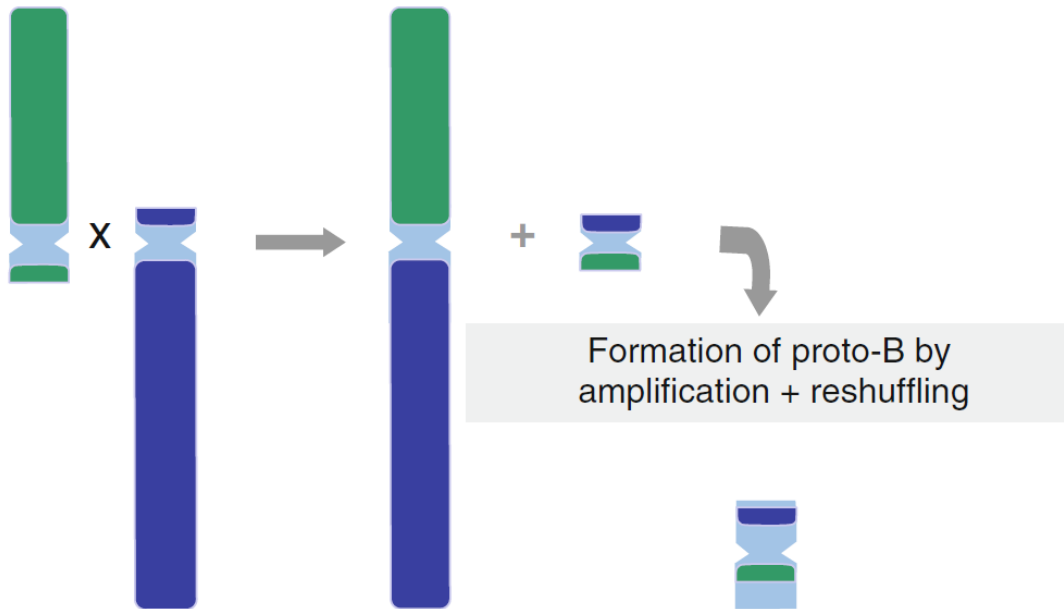


Figura 3. Modelo del posible origen de un cromosoma B a partir de una translocación. Tomado de Martis et al. (2012).

Rearreglos genómicos producto de una hibridación interespecífica. Los híbridos naturales formados por *Coix gigantea* ($2n=2x=20$) y *C. aquatica* ($2n=2x=10$), presentan uno o dos cromosomas adicionales, de los cuatro pares de cromosomas pequeños observados en sus progenitores, formando individuos con $2n=11$ así como otras combinaciones de híbridos. En este sentido se reportó que los cromosomas adicionales pequeños no se apareaban con los cromosomas A del genoma de *C. aquatica*, mostrando un comportamiento meiótico típico de un univalente de cromosoma B y además, no presentaban efectos fenotípicos aparentes. Así en la ausencia de observaciones citogenéticas de los derivados de estos híbridos, de esta forma, las diferentes formas de estos cromosomas adicionales encontrados en muestras de poblaciones de *C. aquatica* se consideraron como cromosomas B.

Formación a partir de un fragmento de cromosoma. Se ha propuesto que las secuencias formadoras de los cromosomas B pudieron haberse “liberado” de una región de cromosoma A polimórfica, la cual se estabilizó por la adición de otras secuencias como ADN extracromosómico (eccADN) y secuencias necesarias para su funcionamiento como cromosoma (e.g. secuencias teloméricas y centroméricas). De hecho, es sabido que los cromosomas B contienen tipos de secuencias de ADN repetitivo codificante y no codificante similar a las encontradas en eccADN de varios organismos. Así mismo se ha identificado eccADN con secuencias repetidas en tándem similares a las compartidas por los cromosomas A y B. De esta forma la composición del cromosoma B naciente prevendría efectivamente el apareamiento con cualquiera de los cromosomas A, adquiriendo la posibilidad de comenzar su propia vía evolutiva. En *Brachycome dichromosomatica* los cromosomas B son un conglomerado de varias secuencias repetidas en tandem derivadas de diferentes sitios de cromosomas A, por lo que no pudo haberse originado de un solo sitio de escisión de un fragmento de un cromosoma A. En este sentido, Los cromosomas B en maíz y centeno, comparten de igual manera muchas secuencias con los cromosomas A, así como un modo de origen similar a lo propuesto para el micro-B de *B. dichromosomatica*. Aunado a lo anterior se cree que los segmentos de cromosomas A supernumerarios en *B. dichromosomatica* pudieron servir también como regiones potenciales de “donación” de secuencias fundadoras, sin embargo, aún es incierto de dónde provino el centrómero, donde si bien la formación de “novo” es rara, es posible. En dicho dilema, se ha especulado sobre algún tipo de evento epigenético que indujera su actividad.

2.1.2.2 Estructura de los cromosomas B

Como se observa, el origen de los cromosomas B puede variar dependiendo de la especie que los presenta, lo que puede influir en la estructura y composición genética de los mismos, encontrando reportes de cromosomas B de 100 Mpb (*Zea mays*) hasta 580 Mpb (*Scale sereale*) (Douglas and Birchler, 2017). De esta manera, las diversas estructuras y composiciones genéticas de los cromosomas, podrían ser la razón de los diferentes efectos fenotípicos observados en los individuos que poseen los cromosomas B. A pesar de lo

anterior, podemos asumir que estos están conformados en mayor o menor medida de las siguientes partes (Figura 4):

- **Secuencias teloméricas:** proporcionan estructura y protección a los cromosomas.
- **Secuencias repetidas de genes ribosomales:** dependiendo del tipo de origen del cromosoma B, estas pueden estar o no presentes.
- **Secuencias centroméricas específicas:** las cuales han sido relacionadas con el proceso de no disyunción de los cromosomas B durante la meiosis.
- **ADN genómico con una alta homología al ADN presente en los cromosomas A.**
- **ADN cloroplástico o mitocondrial:** el cual pudo haber sido incorporado en algún momento de su formación.

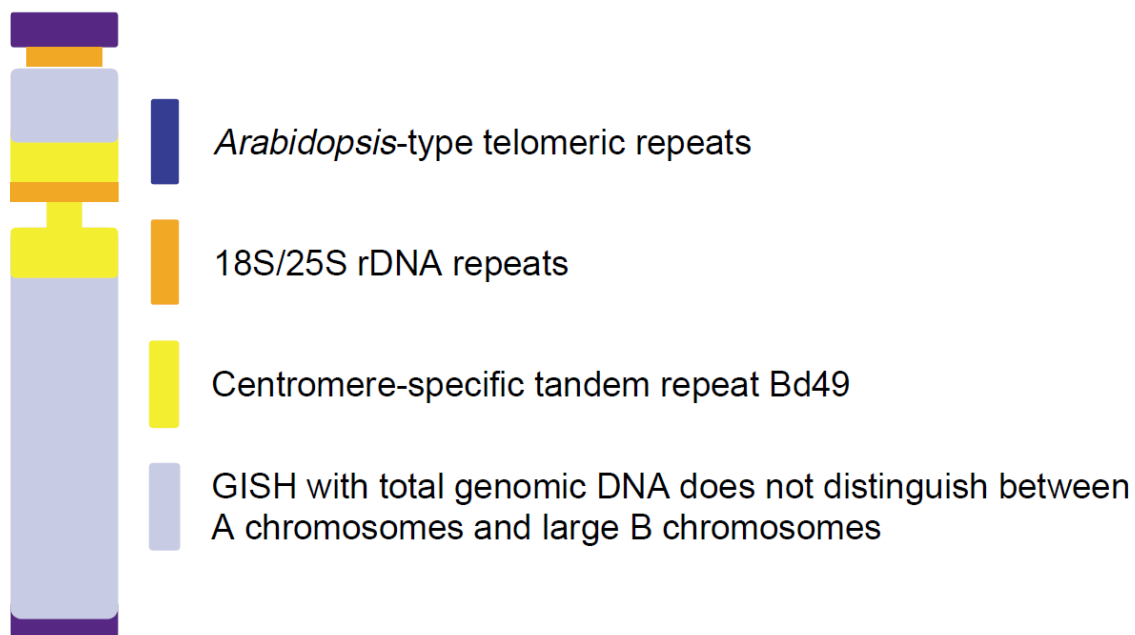


Figura 4. Secuencia y organización de cromatina del cromosoma B de *Brachycome dichromosomatica*. Tomado de: Jones and Houben (2003), modificado.

2.2 Caracterización molecular de cromosomas b

La caracterización molecular de un cromosoma implica el uso de diferentes técnicas como: marcadores moleculares tipo AFLPs (Qi et al., 2002), o Southern blot (Long et al., 2008), donde generalmente se compara el genoma de individuos con y sin la presencia de cromosomas B. En la presente investigación sólo se abordarán las técnicas de Hibridación cromosómica In Situ y Microdissección.

2.2.1 Hibridación cromosómica In situ

La citogenética entro en la era molecular con la introducción de la hibridación in situ, ésta técnica basada en la complementariedad del ADN, hibrida marcando genomas completos o secuencias específicas de ADN o ARN (sonda) (Figura 5). Las sondas, adheridas al objetivo, desarrollarán una señal fluorescente, esta señal puede ser detectada aún en interfase, lo que provee de resultados más exactos. 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 ADN de interés (Abd El-Twab, 2007; Lakshmanan et al., 2015). Desde los primeros experimentos con hibridación in situ en 1969, se han desarrollado muchas variaciones de la técnica, lo que ha incrementado la sensibilidad de esta (OConnor, 2008). En función del material genético que se use como sonda podemos distinguir dos tipos de herramientas diferentes, la hibridación fluorescente in situ (FISH) y la hibridación genómica in situ (GISH); si bien existen otras variaciones como el chromosome painting donde se hibrida en preparaciones citogenéticas, el ADN correspondiente a un solo cromosoma o sección de uno (Zhang et al., 2005), esto sería una versión de la técnica de GISH.

Hybridization and Fluorescence in situ hybridization (FISH)

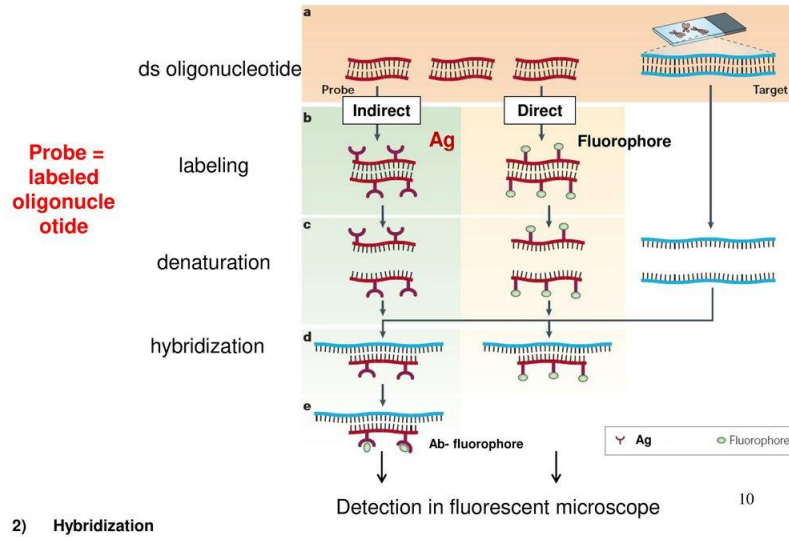


Figura 5. Proceso de hibridación in situ. Tomado de:

<https://slideplayer.com/slide/11836142/>

2.2.1.1 FISH. Esta herramienta identifica una o diversas secuencias de ADN que al ser marcadas con diferentes fluorocromos, permiten determinar la presencia y distribución específica de genes o secuencias particulares en los cromosomas, pudiendo así detectar cambios únicos en los mismos (Younis et al., 2015). Es importante mencionar que dependiendo del objetivo de la investigación se deberá seleccionar la secuencia objetivo para la elaboración de la sonda, siendo específicas las secuencias utilizadas para la identificación de la presencia y/o el mapeo de genes o secuencias concretas; mientras que para el análisis de cambios cromosómicos, se seleccionan generalmente secuencias de ADN altamente repetitivas, entre ellas, los genes ribosomales (rARN) han sido usados como sondas en FISH debido a su alto número de copias de unidades repetidas, posición específica en los cromosomas y sus secuencias altamente conservadas (Gomez-Rodriguez et al., 2013).

En este sentido, Mizuochi et al. (2007) mencionan que los genes 45s rADN son series de unidades altamente repetidas (18s, 5.8s y 26s rADN), mientras que los genes 5s rADN, que también son altamente repetitivos, son independientes de la región del gen 45s rADN en eucariotas. Además, tanto la ubicación y el número de sitios de rADN varían entre especies

estrechamente relacionadas, así como a nivel intraespecífico (Raskina et al., 2008), por lo cual, dichas secuencias han sido utilizadas en numerosos estudios filogenéticos y evolutivos (Mizouchi et al., 2007; Raskina et al., 2008; Van Laere et al., 2008; Lakshmanan et al., 2015). Aunado a lo anterior el rADN ha servido para la identificación de cromosomas B mayormente compuestos por estas secuencias (Figura 6a), como es el caso de *Plantago lagopus* (Jones et al. 2008) o en híbridos de *Lilium* (Xie et al., 2014).

De esta forma el uso de la técnica de FISH en la caracterización de cromosomas B ha sido de gran ayuda ya que ha permitido determinar la posición de diversas secuencias de ADN como es el caso de *Zea mays* (Cheng and Lin, 2003) donde diversas secuencias obtenidas a partir de la microdissección de un cromosoma B se hibridaron para conocer su posición y distribución en él (Figura 6b).

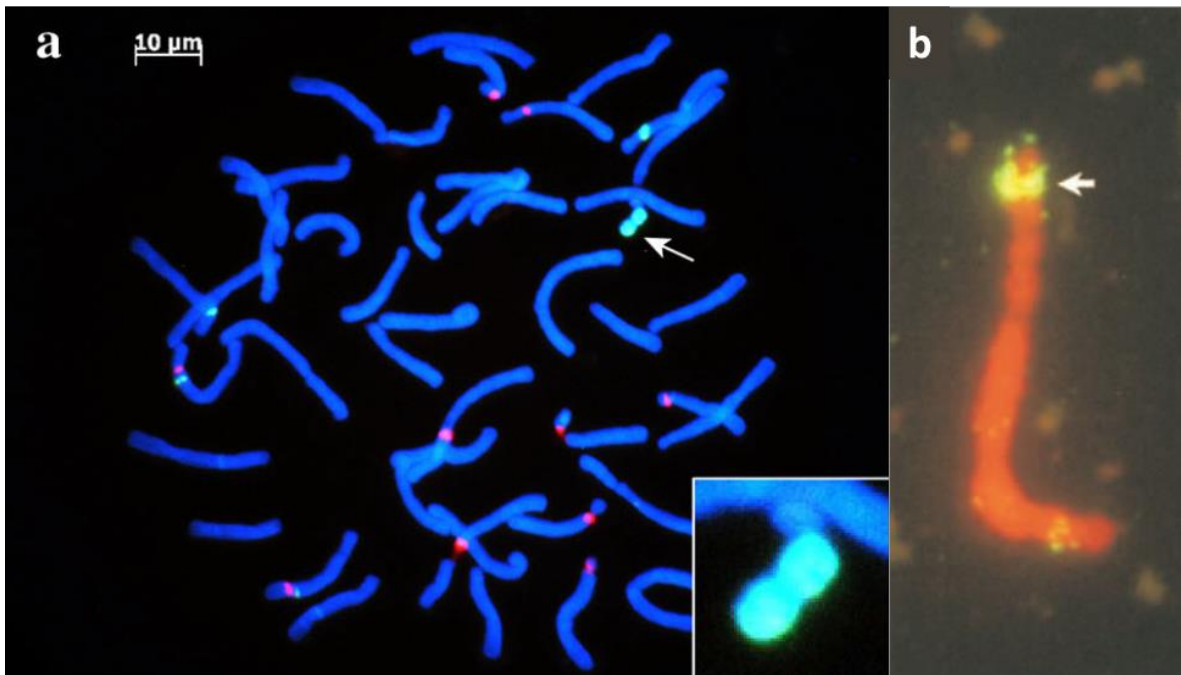


Figura 6. Hibridación de cromosomas B mediante la técnica de FISH. a). Hibridación total de cromosoma B de híbrido de Lily por el gen 5s rADN, tomado de Xie et al., 2014; b). Hibridación de cromosomas B en paquíteno de *Zea mays* con la secuencia pBPC28, tomado de Cheng and Lin, 2003.

2.2.1.2 GISH. En ésta técnica, se utiliza el ADN genómico total de una o diversas especies, que se hibrida en los cromosomas del individuo de interés, ello con el objetivo de discriminar entre genomas parentales, mostrar la organización genómica de híbridos interespecíficos, y consecuentemente identificar sitios de recombinación en cromosomas de individuos alopoliploides, líneas de introgresión interespecífica, y visualizar translocaciones cromosómicas entre diferentes genomas (Silva and Souza, 2013; Younis et al., 2015).

En relación a los cromosomas B, la técnica de GISH permitió observar que algunos de estos, presentan en su estructura secuencias con una alta homología a las secuencias de los cromosomas B (Jones and Houben, 2003). Así mismo, ha servido para la identificación de cromosomas B de *Secale cereale* en híbridos de *Triticum aestivum* x *Aegilops variabilis* que los presentaban (Kousaka and Endo, 2012).

De esta manera, en la técnica de GISH la obtención del ADN para generar la sonda, es más fácil, y se puede usar directamente, sin necesidad de amplificación o clonación en un vector, aunque cabe resaltar que este ADN debe estar presente en una cantidad específica (mínimo de 100ng/μl, preferentemente ≥ 1000 ng/μl) y debe de ser ADN integro (no fragmentado). Aunado a lo anterior, para poder realizar esta técnica en híbridos derivados de especies cercanas, se recomienda usar al mismo tiempo en el proceso de hibridación, y en una mayor concentración el ADN genómico total del otro progenitor involucrado, lo cual servirá como ADN de bloqueo. Tanto el ADN sonda como el de bloqueo deben romperse en fragmentos más pequeños y de diferente tamaño, lo cual se puede realizar mediante el uso de enzimas de restricción, uso de autoclave, o sonicación, permitiendo esta última mayor precisión para la obtención del tamaño de fragmentos de ADN deseado (Silva and Souza, 2013).

Así, la técnica de GISH ha sido exitosamente usada en una gran variedad de plantas híbridas y sus derivados, mostrando mejores resultados cuando los genomas de las especies parentales están bien diferenciados (no son similares), siendo por el contrario menos informativo si los genomas son poco diferenciados (Haider Ali et al., 2002).

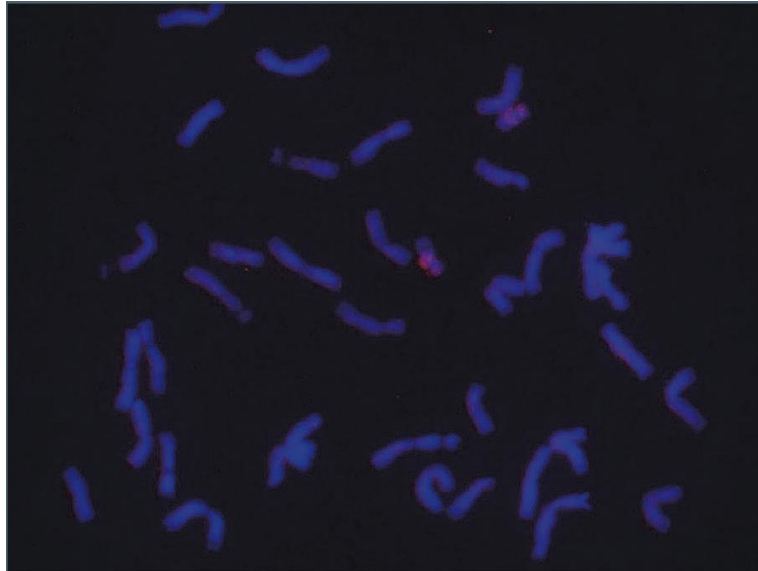


Figura 7. Hibridación de ADN genómico de centeno en híbridos de *Aegilops variabilis* por medio de la técnica de GISH. Tomado de Kousaka and Endo, 2012.

2.2.2 Microdissección cromosómica

El desarrollo de la técnica de microdissección y microclonación de cromosomas, se ha vuelto un aproximamiento directo y eficiente para el aislamiento de cromosomas específicos y/o secciones específicas de cromosomas, donde el ADN aislado puede ser utilizado para investigaciones genómicas como: mapeo de ligamiento genético y construcción de un mapeo físico; generación de sondas para el marcaje cromosómico; y generación de bibliotecas de secuencias de expresión de cromosomas específicos (Zhang et al., 2016).

En la técnica de microdissección, los cromosomas fueron disectados inicialmente con micro agujas de vidrio mediante un microscopio invertido (Figura 8a), posteriormente con el desarrollo de las tecnologías, se desarrolló el método de disección de cromosomas mediante el uso de microdisparos laser (Figura 8b), lamentablemente este último implica un alto costo, así como portaobjetos especiales para su aplicación, por lo que aún se suelen utilizar la disección por medio de micro agujas en muchos centros de investigación (Zou and Hu, 2007).

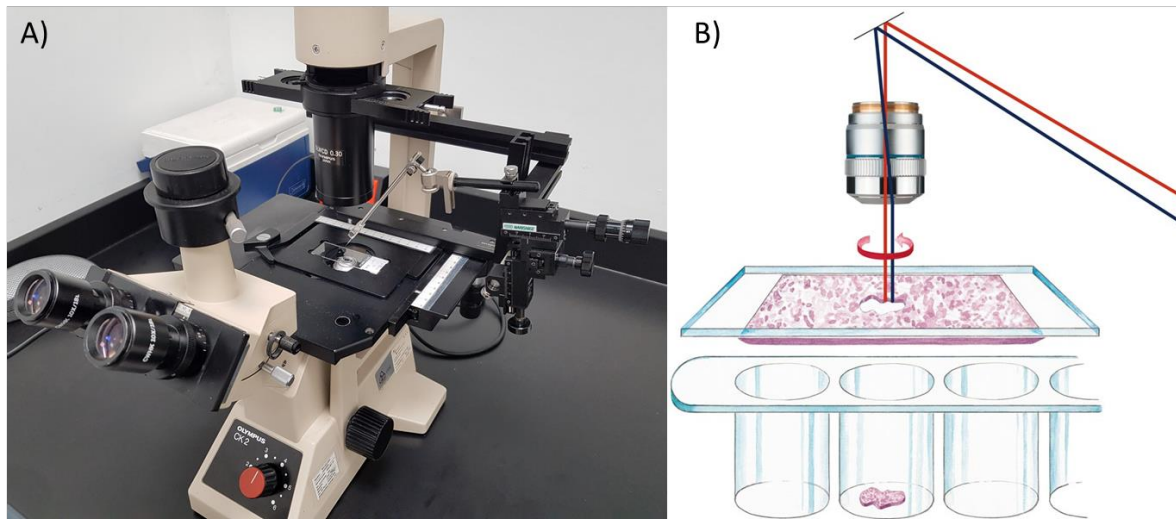


Figura 8. A) Micro disección mediante micro agujas de vidrio, autor propio; B) Microdisección mediante laser, Tomada de: <https://www.leica-microsystems.com/es/productos/microscopios-opticos/detalles/product/show/Products/leica-lmd7/>.

Por otro parte, las primeras técnicas de microclonación de cromosomas eran mediante un tipo de clonación directa de los cromosomas disectados en una microgota contenida en una cámara de aceite, este procedimiento requería una gran numero de cromosomas disecados debido a la baja eficiencia de clonado (Zou and Hu, 2007), sin embargo con la introducción de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los protocolos de microclonación, se ha realizado una mejora sustancial a la eficiencia de clonaje. A partir de ello, el número necesario de cromosomas disectados se redujo significativamente (de uno a cinco cromosomas son suficientes dependiendo de la aplicación, recomendado algunos autores hasta 10 cromosomas como máximo para evitar contaminación) (Zou and Hu, 2007; Henning et al., 2008; Hwang et al., 2012). Aunado a lo anterior, dos nuevos métodos de microclonación se desarrollaron basados en la tecnología de PCR: PCR con adaptadores mediados (LA-PCR) y PCR con iniciadores de oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR) (Zou and Hu, 2007).

Con el método de LA-PCR, el ADN cromosómico es digerido por enzimas de restricción y posteriormente se liga a adaptadores que proveen sitios de unión para iniciadores específicos para la amplificación por PCR (Hwang et al., 2012). Por su parte la técnica DOP-PCR, que es rápida, eficiente, e independiente de la especie, es diseñada para la amplificación de ADN objetivo en sitios de iniciación frecuentes, usando iniciadores con secuencias parcialmente degenerada (iniciadores degenerados), sin restricciones impuestas por la complejidad o el origen del ADN, en conjunto con una baja temperatura de alineación, es una técnica de PCR simple que involucra múltiples sitios de iniciación lo que permite una mayor amplificación general (Zou and Hu, 2007).

Por otro lado, independiente de la metodología de amplificación que se utilice, es necesario remover las histonas de los cromosomas microdisectados, por lo que se recomienda previo a la PCR, tratar los cromosomas microdisectados con una solución que contenga proteinasa K (Hwang et al. 2012). Así mismo, al iniciar los ciclos de amplificación en el termociclador, es necesario un primer paso de desnaturalización (5-10 min a 90°C) para inactivar la actividad de la proteinasa K.

Aunque esta metodología presenta muchos beneficios, está limitada a cromosomas que son fácilmente identificables (Zou and Hu, 2007), por la cual generalmente se suelen utilizar cromosomas satélites, los cromosomas más grandes o más pequeños, y cromosomas B, como objetivo. Respecto de estos últimos, la técnica de microdisección y microclonación (Figura 9), en conjunto con otras técnicas, como la secuenciación o la técnica de FISH, ha sido de gran ayuda en la caracterización de cromosomas B, ya que ha permitido conocer la composición genética de los cromosomas B y elaborar bibliotecas de secuencias de cromosomas B (Cheng and Ling, 2003; Long, 2008).

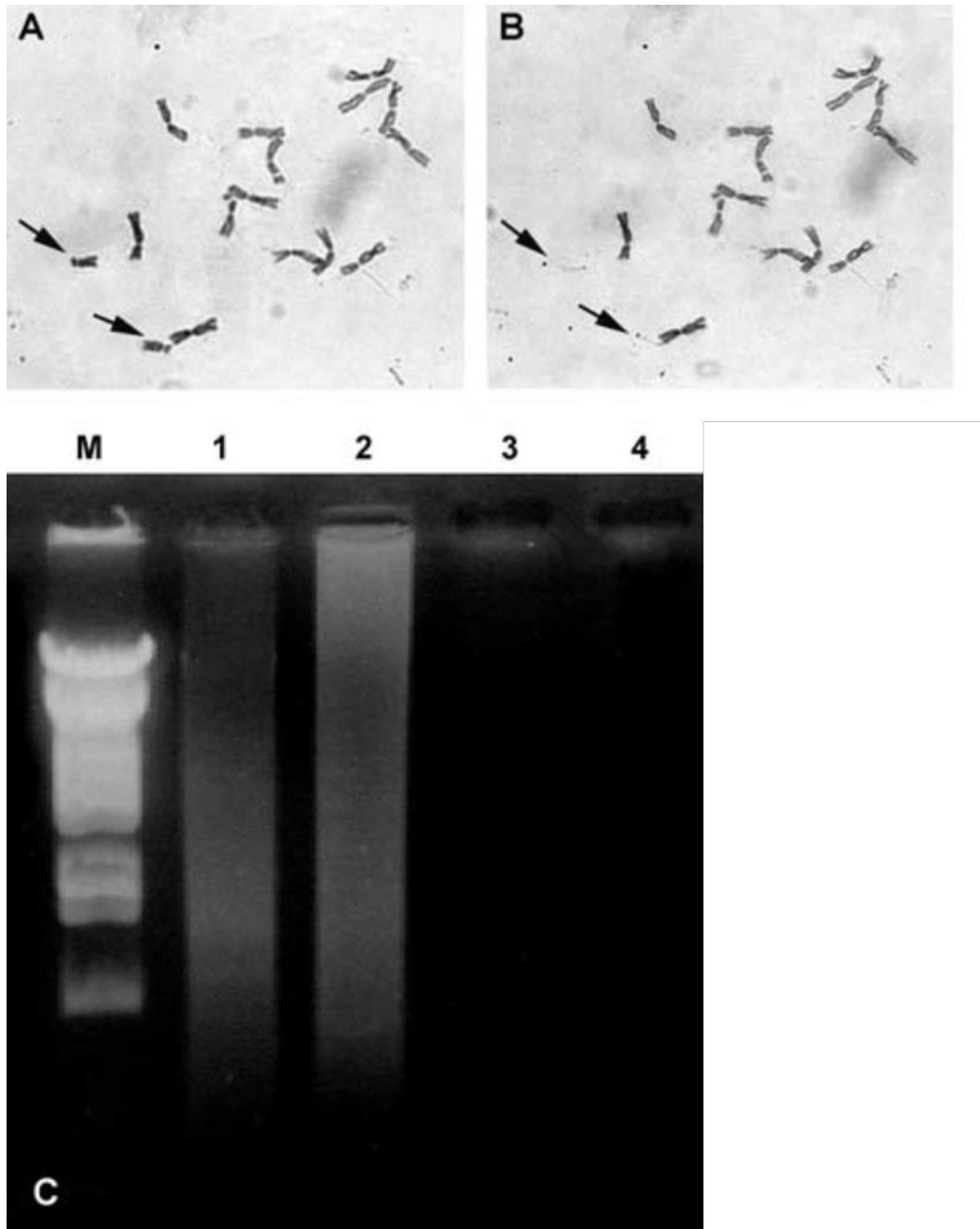


Figura 9. Microdissección y microclonación de cromosomas B de centeno. A y B) Proceso de microdissección de los cromosomas B; C) Corrimiento electroforético del producto de PCR de cromosomas B. Tomado de: Long et al., 2008.

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

2.3.1 Descripción de la especie

Tigridia pavonia (L.f.) DC (Iridaceae) 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 crecen silvestres, usualmente en bosques de *Pinus* o *Quercus*, o en vegetación riparia, 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.*, 2001; Vázquez-García *et al.*, 2011).

A pesar de lo anterior, 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 (Figura 10) 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 Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV, 2016). Así mismo, se considera que dos de estas variedades podría ser híbridos naturales resultado de la cruce entre variedades, entre ellas, ‘Penélope’ se considera híbrido de las variedades ‘Dulce’ y ‘Trinidad’, variedades con las que comparte la misma zona geográfica, así como, valores intermedios de fertilidad, tamaño de flor, y color; mientras que ‘Mariana’ se considera híbrido de las variedades ‘Carolina’ y ‘Ángeles’, variedades con las que comparte la misma zona geográfica y color intermedio entre las

variedades (Piña-Escutia et al., 2010a; Vázquez-García et al., 2001b), aunque a pesar de lo anterior, hasta el momento no existen estudios que lo demuestren..



Trinidad



Penélope



Dulce



Carolina



Mariana



Ángeles



Gloria



Samaria



Sandra

Figura 10. Variedades botánicas de *Tigridia pavonia*. Autor: Propio.

Aunado a esto, uno de las características que más difiere entre las variedades ha sido la fertilidad entre estas, siendo 'Sandra' la que tiene un mayor porcentaje (76.8%) en relación al 38.7% de 'Ángeles' y al 28.1% de 'Dulce', en este sentido, Martínez et al. (2000),

mencionaron que la compatibilidad genética disminuye proporcionalmente al incremento de la divergencia genética, y estos cambios evidencian errores en los estados de división meiótica, por lo que, la disminución de la fertilidad en individuos puede ser resultado de cambios tanto genéticos como citogenéticos.

2.3.2 Importancia de la especie

En el documento “Historia Natural de la Nueva España” de Francisco Hernández, se hace referencia por primera vez a la descripción de la planta y sus usos indicando que desde los Aztecas esta especie ya era muy valorada por su belleza ornamental y medicinal (Carrillo-Ocampo y Engleman, 2002), aspecto que fue retratado mediante un dibujo (Figura 11) hecho por tlacuilos en el Códice Florentino. En la actualidad esta especie es apreciada por la belleza y colorido de su flor, además de ser utilizada como alimento, y medicina natural.



Figura 11. Oceloxochitl. Códice Florentino. Tomado de:
<http://www.cuexcomate.com/2016/01/tigridia-pavonia-flor-de-jaguar.html>

2.3.2 Importancia ornamental

A pesar de que hasta el momento se han reportado 43 especies y seis subespecies, de las cuales 41 son endémicas de México (Munguía-Lino et al. 2015), sólo *T. pavonia* es comercializada en diversos países (Vázquez-García, 2011a; Munguía-Lino et al., 2015), siendo apreciada principalmente como planta de jardinería (Carrillo-Ocampo et al., 2002). A pesar de lo efímero de su belleza, presenta características de gran valor florícola, como la belleza y el tamaño de su flor, la gran variabilidad de colores, la cantidad de flores y de racimos florales que puede generar por bulbo, así como su comportamiento colonizador (Figura 12).



Figura 12. Flores de *Tigridia pavonia*. Tomado de:
<https://www.pinterest.es/pin/436497388863516929/>.

Muestra de ello, son los diversos estudios en la especie, encaminados tanto a su conservación, propagación y mejoramiento de la misma, como:

Díaz-L et al. (2003), quienes irradiaron con rayos gama de ^{60}Co bulbos de la variedad ‘Sandra’ con el objetivo de inducir variabilidad de interés ornamental; Piña-Escutia et al. (2003), que obtuvieron híbridos entre *T. pavonia* var ‘Carolina’ y *T. augusta* mediante el rescate en embriones cigóticos; Botina-Galeano et al. (2008), evaluaron el comportamiento de *T. pavonia* bajo tres distancias de siembra en un arreglo agroforestal con laurel de cera *Morella pubescens*; Piña-Escutia et al. (2010c), así como Kumar et al. (2012), quienes estandarizaron un protocolo de micropropagación a partir de escamas gemelas; así como Arzate-Fernández et al. (2015), quienes regeneraron plantas vía embriogénesis somática de *T. pavonia*; entre otros muchos trabajos.

2.3.3 Importancia alimenticia – medicinal

Desde la época de los aztecas, los bulbos de esta especie eran consumidos (Carrillo-Ocampo y Engleman, 2002). Aunque hoy en día esta actividad está relacionada principalmente a festividades, o a ciertas poblaciones, a pesar de ello, *T. pavonia* presenta un gran potencial valor alimenticio tanto humano como animal (Figura 13), esto debido a que es una especie de rápido crecimiento (propagación), y no es exigente en la utilización de abonos químicos para su desarrollo (Botina-Galeno et al., 2008).



Figura 13. *Tigridia pavonia* alimento. Tomado de: <https://acienciacierta.minciencias.gov.co/index.php/experiencias-ganadoras-2015/342-watsimba-alternativa-de-sustitucion-del-maiz-en-alimento-concentrado-para-aves-284>

Además de lo anterior, se ha reportado que el bulbo presenta un sabor suave y perfumado, pudiendo ser consumidos cocidos, asados, o servir para la elaboración de harinas (Vazquez-Garcia, 2017; Torres-Méndez et al., 2019). En México, se sabe que es consumido, en la festividad conocida como “La llevada de la virgen de Zapopan” en Jalisco, así mismo se ha reportado que en Colombia se emplea el bulbo y la flor en la fabricación de watsifrits, galletas, donas y mermeladas (Botina-Galeano, 2008; Leonel y Luna-Cabrera, 2017).

De igual forma, se ha reportado que la especie ha sido utilizada dentro de la herbolaria tradicional, mediante preparaciones medicinales para curar enfermedades como: insomnio, afecciones bronquiales, venas várices, flujos y dolores menstruales, dolores de cabeza, tratar la fiebre, promover la fertilidad, y otras dolencias (Botina-Galeano, 2008; Zepeda y White, 2008). En este sentido, Effers et al. (1999), reportaron la presencia de iridales en los bulbos de la especie, que son triterpenoides que han sido relacionados al tratamiento de células tumorales en humanos (Bonfils et al., 2001).

Por último, se ha menciona su uso artesanal resaltando la inmortalización de la flor para uso en diferentes decoraciones, inclusive se ha explorado su utilización en bisutería. Así mismo se menciona presenta un potencial en el uso de colorantes, ya que la flor, puede ser utilizada en la elaboración de pintura artística (Leonel y Luna-Cabrera, 2017).

2.4 Diversidad genética y citogenética en *Tigridia pavonia*

Como es bien sabido, la diversidad genética en un grupo de variedades de una misma especie, puede estar relacionado únicamente a cambios en un grupo de alelos, siendo visible en la diversidad de colores, y no tanto a cuestiones cromosómicas. Sin embargo, cuando estos cambios se relacionan con la fertilidad, esto puede ser un indicativo de cambios en los cromosomas, es por ello que la combinación de técnicas basadas en el uso de marcadores moleculares, así como de técnicas citogenéticas, son necesarias para poder comprender mejor la diversidad de un grupo de individuos.

2.4.1 Citogenética

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. Este tipo de análisis es útil 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 realizar las cruza intergenéricas o interespecíficas 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; Levitus *et al.*, 2010; Lakshmanan *et al.*, 2015).

La citogenética se puede dividir en 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 (μm), 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 ADN (Herrera, 2007).

Hasta 2017, los estudios citogenéticos en la especie únicamente abarcaban cuestiones relacionadas con el número, morfología, y la presencia y posición de constricciones secundarias de sus cromosomas, los cuales solían variar de un autor a otro (Molseed, 1970; Kenton y Heywood, 1983), características que pudieron estar influenciadas por la falta de conocimiento de las especies, puesto que ninguno de los autores reporta las variedades o en su caso, las características de los individuos con que están trabajando.

Sin embargo, a partir de 2017, y con la caracterización previa de las variedades de las especies (Vázquez-García *et al.*, 2001), se comenzaría a develar información importante sobre las características citogenéticas de las especies. Así, Arroyo-Martínez *et al.* (2017) al trabajar con la variedad ‘Sandra’, reportó un número cromosómico de $2n=28$ y una fórmula cariotípica de $28m$, sugiriendo que cada una de las variedades de *T. pavonia* podría presentar cambios cromosómicos únicos. Del mismo modo, Arroyo-Martínez *et al.* (2018), al determinar el cariotipo de la variedad ‘Dulce’, lograron observar que esta variedad presentaba un número cromosómico de $2n= 28 + 3B$ y una fórmula cariotípica de $26 m + 2sm + 3B$, resaltando tres cromosomas extra que exhibía (Figura 14a) que en función a sus características se reportaron como cromosomas B putativos, de igual forma, en la misma investigación al realizar el mapeo físico de los genes 5s y 45s rADN, los autores lograron corroborar que esta era una especie diploide, ya que si bien se presentaban un gran número de regiones hibridadas (ocho y 10 regiones de los genes 5s y 45s rADN, respectivamente), la

posición e intensidad de estas (Figura 14b), demostraron que no se trata de un individuo tetraploide como reportaron Tapia-Pastrana y Tapia-Aguirre (2017), aunado a lo anterior se logró observar que los genes ribosomales, no formaban parte de la estructura genética de los cromosomas B de ‘Dulce’, por lo que surgió la incertidumbre de cuál era la composición genética de estos .

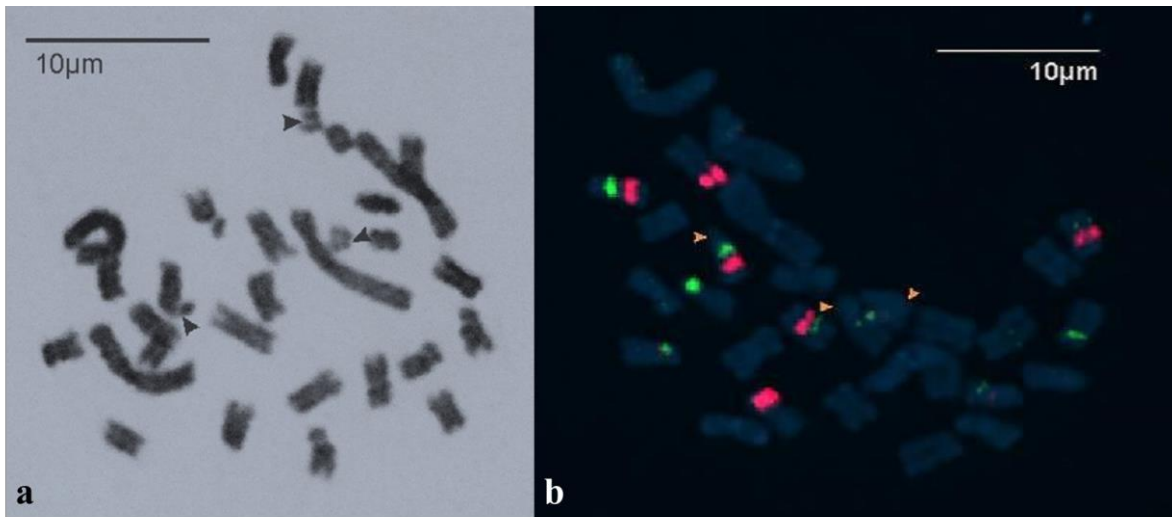


Figura 14. Cariotipo e hibridación de los genes 5s y 45s rADN en *T. pavonia* var. ‘Dulce’. a) Cromosomas en metafase mitótica, $2n = 2x = 28 + 3B$. Las cabezas de flecha indican los cromosomas B putativos. b) hibridación fluorescente in situ de los genes 5s (señales rojas) y 45s (señales verdes) rADN, los cromosomas fueron contrateñidos con DAPI. Las cabezas de flecha indican los cromosomas B. Figuras tomadas de Arroyo-Martínez et al., 2018.

2.4.2 Marcadores moleculares

El conocimiento de la estructura genética y el nivel de variación dentro y entre poblaciones de plantas, es importante para la efectiva utilización y conservación de plantas (Amom and Nongdam, 2017). En este sentido, comúnmente se utilizan diferentes marcadores moleculares con el propósito de dar información detallada sobre el genoma de las diversas especies, lo que no es posible con métodos basados en el fenotipo (Marakli, 2018). Pero ¿Qué es un marcador molecular?, Un marcador molecular se define como un segmento de ADN en particular que puede ser representativo de un gen o de las diferencias en el análisis de un

genoma (Dhutmal et al., 2018), así mismo, este tipo de marcadores son generalmente independientes de los factores ambientales, efectos pleiotrópicos y epistáticos, son estables, pudiendo detectarse en todos los tipos de tejido sin importar el crecimiento, diferenciación, desarrollo, o estado de defensa de la célula y son más numerosos que las características fenotípicas, aportando información más clara de la variación subyacente en el genoma de un organismo (Amom and Nongdam, 2017; Dhutmal et al., 2018).

Todas las técnicas de análisis con marcadores moleculares deben presentar las siguientes características para considerarse marcadores ideales (Garrido-Cardenas et al., 2017; Marakli, 2018):

- 1) Fiabilidad. Deben ser muy cercanos a un locus investigado, los resultados se logran usando ciertos marcadores, si estos están flanqueando un loci o si son intragénicos.
- 2) Deben ser altamente polimórficos, codominantes en expresión y de copia única para discriminar entre diferentes genotipos, ser igualmente distribuidos en el genoma, de naturaleza específica del genoma (especialmente cuando se trabaja con poliploides), multifuncionales, y altamente disponibles (uso sin restricciones).
- 3) Estos tendrían que ser de fácil manejo y análisis, económicos, de técnica rápida, y poder multiplexarse, con capacidad de automatizarse.
- 4) Deberían necesitar una baja cantidad de material genético de inicio para llevar a cabo el análisis.

Aunque existen diversos tipos de marcadores moleculares, con características y especificaciones diferentes (Tabla 1), para efectos de la presente investigación nos centraremos solamente en los marcadores tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Tabla 1. Comparación de los cinco iniciadores aleatorios de ADN más usados en el análisis del genoma de plantas. Tomado de Adhikari, 2017.

| <i>Característica</i> | <i>RFLP</i> | <i>Microsatélite</i> | <i>RAPD</i> | <i>AFLP</i> | <i>ISSR</i> |
|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>Abundancia genética</i> | Alto | Moderado | Muy alto | Muy alto | Medio |
| <i>Parte del genoma que reconoce</i> | Regiones de baja codificación | Todo el genoma | Todo el genoma | Todo el genoma | Todo el genoma |
| <i>Cantidad de ADN que requiere</i> | Alto | Bajo | Bajo | Moderado | Bajo |
| <i>Nivel de polimorfismo</i> | Moderado | Alto | Alto | Muy alto | Alto |
| <i>Proporción múltiple efectiva</i> | Bajo | Moderado | Moderado | Alto | Moderado |
| <i>Índice de marcador</i> | Bajo | Moderado | Moderado | Alto | Moderado |
| <i>Herencia</i> | Co-dominante | Co-dominante | Dominante | Dominante | Dominante |
| <i>Detección de alelos</i> | Si | Si | No | No | No |
| <i>Facilidad de uso</i> | Trabajo intensivo | Fácil | Fácil | Difícil al inicio | Fácil |
| <i>Automatización</i> | Bajo | Alto | Moderado | Medium | Moderado |
| <i>Reproducibilidad</i> | Alto | Alto | Intermedio | Alto | Moderado-alto |
| <i>Tipo de sondas/iniciador</i> | Copia genómica baja | Repetición específica | Usualmente nucleótidos | Secuencia específica | Repetición específica |

| | ADN o clones de ADNc | Secuencia de ADN | aleatorios de 10 pb | | Secuencia de ADN |
|------------------------------------|----------------------|------------------|---------------------|----------|------------------|
| Clonación y/o secuenciación | Si | Si | No | No | No |
| Detección radiactiva | Usualmente si | No | No | Si/no | No |
| Desarrollo / inicio | Alto | Alto | Bajo | Moderado | Moderado |

Los marcadores tipo RAPD, emplean iniciadores de oligonucleótidos individuales, cortos (decámeros) y aleatorios, lo que les permite unirse a diferentes regiones del ADN presentando una gran abundancia genómica, además de que no es necesario conocer previamente la secuencia del ADN a la que se unirá el iniciador para su construcción, son de fácil análisis y se requieren bajas cantidades de ADN (usualmente entre 5 – 50 ng por reacción) (Kesawat & Das 2009; Kumar et al., 2014; Adhikari et al., 2017; Garrido-Cardenas et al., 2017).

Estas cualidades han permitido determinar la diferenciación genética de las variedades de *T. pavonia* (Figura 15) (Piña-Escutia et al., 2010b), donde si bien se demostró que las variedades ‘Trinidad’, ‘Penélope’ y ‘Dulce’ mantienen una estrecha relación genética, lamentablemente no se hace ninguna mención respecto a si ‘Penélope’, o en su caso ‘Mariana’, son híbridos naturales (considerados así en función de sus características fenotípicas) producto de una posible cruce natural entre las variedades ‘Trinidad’ y ‘Dulce’, o, ‘Ángeles’ y ‘Carolina’, respectivamente. En este sentido los marcadores RAPD han sido ampliamente utilizados para el análisis de híbridos de *Gossypium* spp (Dongre et al., 2012), *Helianthus annuus* (Bhosle et al., 2015), *Capsicum annuum* (Pujar et al., 2017), por lo que su uso, podría arrojar información que pudiese develar dicha cuestión.

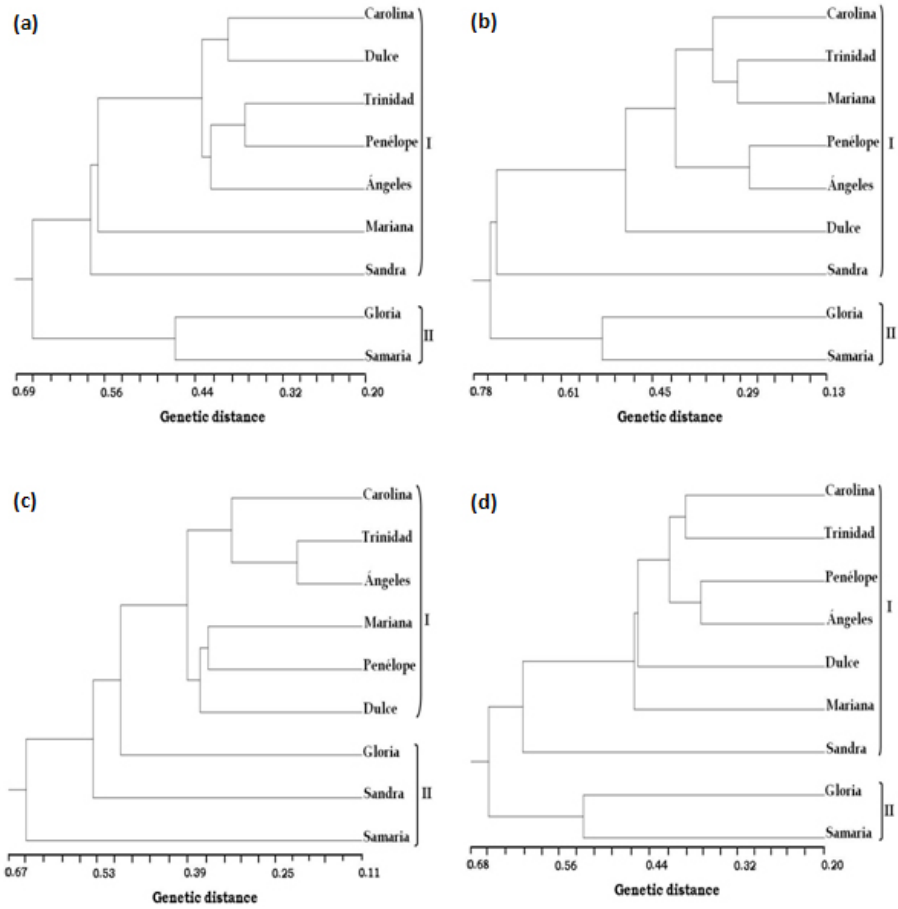


Figura 15. Dendrograma generado usando el análisis UPGMA, mostrando las relaciones entre las nueve variedades de *T. pavonia*, en función de diferentes marcadores tipo RAPD a) 10, b) 15 c) 20, y d) el conjunto de 10, 15 y 20, basado en la longitud del iniciador.

Tomada de Piña-Escutia et al., 2010b.

III. JUSTIFICACIÓN

Tigridia pavonia es una especie con importancia histórica, alimenticia, medicinal, y ornamental. A pesar de lo anterior, aún falta mucho por conocer sobre su diversidad genética y citogenética. Este conocimiento es importante para la correcta utilización y conservación de la especie. Aunque se han caracterizado nueve variedades botánicas y se han determinado la diferenciación genética entre estas, aún se desconocen muchos aspectos como las relaciones específicas que mantienen algunas de estas, sobre todo si se asume que dos de ellas podrían ser híbridos naturales. En este sentido, en el 2018, en la especie se observó por vez primera la presencia de cromosomas B en la variedad ‘Dulce’, y a pesar de la importancia que estos presentan, aún se desconoce mucho sobre sus características, como su composición genética, o si estos pueden transmitirse en cruces inter varietales. Por lo anterior la caracterización molecular de los cromosomas B de *Tigridia pavonia* var. ‘Dulce’, así como la determinación del cariotipo y el mapeo físico de los genes 5s y 45s en la variedad ‘Penélope’ (híbrido putativo natural entre ‘Trinidad’ y ‘Dulce’), permitirá obtener información importante, que pueda servir de base tanto para futuros estudios, como para el diseño de programas de mejoramiento genético.

IV. HIPÓTESIS

La estructura genética de los cromosomas B en *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. está compuesta parcial o totalmente de secuencias de cromosomas A.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar molecularmente los cromosomas B de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC.

5.2 Específicos

Analizar los cambios cromosómicos estructurales en el cariotipo de *Tigridia pavonia* var. 'Trinidad' y 'Penélope' mediante técnicas de citogenética clásica y FISH.

Analizar la transmisión y recombinación de los cromosomas B en *Tigridia pavonia* var. 'Penélope' por medio de GISH.

Analizar el producto de la amplificación de los fragmentos de cromosomas B de *Tigridia pavonia* var. 'Dulce' mediante Hibridación In Situ.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Material vegetativo

Para la obtención del material vegetal se cultivaron bulbos de las variedades ‘Penélope’, ‘Trinidad’ y ‘Dulce’ de *Tigridia pavonia*, en macetas con un sustrato compuesto por tierra de monte, arena y estiércol vacuno (proporción 1:1:1), bajo condiciones de invernadero en la Facultad de Ciencias Agrícolas (FCAgrí), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx). Los bulbos fueron donados por el Centro de Conservación de Especies Silvestres del Centro Universitario Tenancingo, de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

Una vez emergidas las primeras hojas, estas se colectaron para la obtención de ADN genómico. Mientras que, para la elaboración de preparaciones cromosómicas, se colectaron meristemos radiculares de diferentes individuos de cada variedad, de un tamaño no mayor a 3 cm.

6.2 Diseño del experimento

El experimento se dividió en cuatro etapas:

| ETAPA | OBJETIVO | MÉTODOLOGIA | UBICACIÓN |
|-------|---|--|---|
| 1 | Análisis de los cambios cromosómicos estructurales en el cariotipo de <i>Tigridia pavonia</i> var. ‘Trinidad’ y ‘Penélope’. | Determinación del cariotipo y mapeo físico de los genes 5s y 45s rADN, mediante la metodología utilizada por Barba-González <i>et al.</i> , 2005 | Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas (FCAgrí), de la Universidad Autónoma del |

| | | | |
|---|---|--|---|
| | | | Estado de México (UAEMéx) |
| 2 | Análisis GISH (Genomic In Situ Hybridization) en <i>T. pavonia</i> var. ‘Penélope’. | Hibridación del genoma de ‘Dulce’ y ‘Trinidad’ en preparaciones cromosómicas de ‘Penélope’, mediante la metodología utilizada por Barba-González <i>et al.</i> , 2005. | Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas (FCAgrí), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx) |
| 3 | Aislamiento, amplificación y clonación de secuencias de fragmentos de los cromosomas B de <i>Tigridia pavonia</i> var. ‘Dulce’ con el iniciador 6-MW. | De acuerdo a la reportada por Hening, 2008, y Zhang <i>et al.</i> , 2016. | Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Unidad Zapopan, en el área de Biotecnología Vegetal |
| 4 | Análisis del producto de la amplificación de los fragmentos de cromosomas B de <i>Tigridia pavonia</i> var. ‘Dulce’ mediante Hibridación In Situ | Hibridación del producto de la amplificación de los cromosomas B, en preparaciones cromosómicas de ‘Dulce’. | Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas (FCAgrí), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx) |

6.3 Elaboración de preparaciones cromosómicas

De acuerdo a la metodología reportada por Rodríguez-Domínguez et al., (2017)

6.3.1 Reactivos

| | |
|------------------------------|--|
| Solución de arresto mitótico | 10 µl de α-Bromonaphtalene saturado por cada 10 ml de agua |
| Buffer citrato | A 10 mM tri sodium citrate B 10 mM acid citric Mezclar A en B para obtener pH 4.5 |
| Mezcla de enzimas 1% | 1% cellulase RS 1% pectolyase Y23 1% cytohelicase en buffer citrato 10mM pH 4.5 |
| Carnoy's | Alcohol: Acetic acid 3:1 |
| Ácido acético glacial puro | |
| Methanol | |

6.3.2 Metodología

1. Colectar meristemos jóvenes (no mayores a 3 cm) y tratarlos directamente con la solución de arresto mitótico a 4°C en oscuridad durante 4h
2. Descartar la solución de arresto mitótico y fijar los meristemos en Carnoy durante 2 h a temperatura ambiente.
3. Lavar los meristemos con agua mQ y posteriormente incubarlos en buffer citrato durante 15 min.
4. Colocar lo meristemos en un tubo de 1ml y agregar 50 µl de la mezcla de enzimas a una concentración final de 0.2% e incubar a 37°C durante 4 h.

5. Agitar en un vortex los meristemas digeridos para crear una suspensión celular, las partículas largas pueden retirarse cuidadosamente succionando la suspensión mediante una micro pipeta.
6. Agregar 600 µl de agua mQ y mezclar.
7. Centrifugar a 6150 x g durante 45 s.
8. Remover el sobrenadante utilizando una micro pipeta.
9. Agregar 600 µl de metanol y mezclar.
10. Centrifugar a 7440 x g durante 30 s.
11. Descartar el sobrenadante por inversión.
12. Resuspender el pellet en 20 - 100 µl metanol dependiendo de la concentración celular.
La suspensión celular puede ser almacenada a -20°C.
13. En una cámara de extracción, colocar 7-10 µl de la suspensión celular en una laminilla inclinada en un ángulo aproximado de 45° y embebida con una ligera capa de ácido acético puro
14. Inmediatamente agregar dos gotas (100 µl) de ácido acético puro hasta que la superficie se torne granulada.
15. Colocar boca abajo en el vapor de un equipo de baño maría a 55° durante 3-5 seg.
16. Agregar una gota (50 µl) de ácido acético glacial puro.
17. Deshidratar las laminillas a temperatura ambiente.
18. Analizar las laminillas.

6.4 Determinación del cariotipo

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

La morfología se determinó de acuerdo 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 Obtención de genes ribosomales

6.5.1 Cultivo de cepas de *E. coli*

Las cepas pTa794 y pTa71 que contienen los genes 5s y 45s rADN de *Triticum aestivum* respectivamente, se cultivaron colocando 5 µl del stock de la cepa en 10 ml de medio LB (Luria-Bertani) adicionado con 200 mg/L de ampicilina, siendo incubadas a 37° C a 237 rpm, durante toda la noche.

Para almacenar las bacterias en el ultra congelador, se tomó una muestra del medio inoculado con las bacterias y se agregó glicerol en proporción 1:1 (500 µL de medio inoculado : 500 µL de glicerol estéril).

6.5.2 Extracción del adn plasmídico

El ADN plasmídico se extrajo mediante el método de lisis alcalina que a continuación se describe:

6.5.3 Reactivos

| Solución 1 | |
|--|----------|
| Glucosa (50 mM) | 9.01 g/l |
| Tris (20 mM) | 2.42 g/l |
| EDTA (10 mM) | 2.92 g/l |
| Disolver soluciones y ajustar pH a 8.0 | |
| Esterilizar por 15 min a 121 °C y almacenar a 4 °C | |

| Solución 2 (Se prepara al momento) | Para 10 ml: |
|---|-------------|
| 8.8 ml agua desionizada (mQ) estéril | |
| NaOH 10 M (399.97 g/l NaOH) | 0.2 ml |

| | |
|---------|--------|
| 10% SDS | 1.0 ml |
|---------|--------|

| | |
|--------------------------|---------|
| Solución 3 | |
| KOH 5 M (275.55 g/l KOH) | 60.0 ml |
| ácido acético glacial | 11.5 ml |
| Agua mQ estéril | 28.5 ml |
| Ajustar pH a 4.8 | |

6.5.4 Metodología

- 1.- Centrifugar 2 ml de medio inoculado a 14 000 g por 1 min a temperatura ambiente (TA).
- 2.- Remover el sobrenadante.
- 3.- Resuspender el pellet bacteriano en 100 μ l de solución 1 a 2 °C mezclando vigorosamente.
- 4.- Incubar por 5 min a TA.
- 5.- Añadir 200 μ l de solución 2 recién preparada y mezclar cuidadosamente por inversión del tubo durante 10 min.
- 6.- Incubar en hielo por 10 min.
- 7.- Añadir 150 μ l de la solución 3, mezclar cuidadosamente e incubar el tubo en hielo por 10 min.
- 8.- Centrifugar a 14 000 g por 15 min a 4 °C.
- 9.- Transferir el sobre nadante a un tubo fresco.
- 10.- Precipitar el ADN con 0.6 volúmenes de isopropanol e incubar a TA por 15 min.
- 11.- Centrifugar a 14 000 g por 5 min a TA y descartar el sobre nadante.
- 12.- Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 70% a 20 °C.
- 13.- Centrifugar a 14 000 g por 2 min a 4 °C.

- 14.- Descartar el sobre nadante y secar el pellet en cámara de vacío.
- 15.- Disolver el pellet en 30 μ l de buffer TE.
- 16.- Agregar 2 μ l de RNase A (10 mg / ml) e incubar a 37 °C por 30 min.
- 17.- Almacenar el plásmido a -20 C.

6.6 Extracción de ADN genómico

6.6.1 Reactivos

| | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1% CTAB precipitation buffer | Para 100 ml: |
| 1% CTAB | 10 ml 10% CTAB (en mQ) |
| 50 mM Tris-HCl pH 8.0 | 5 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0 |
| 10 mM EDTA pH 8.0 | 2 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 |

| | |
|--|-------------------------------|
| 2% CTAB-PVP extraction buffer | Para 100 ml: |
| 2% CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide) | 20 ml 10% CTAB (en mQ) |
| 100mM Tris-HCl pH 8.0 | 10 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0 |
| 20 mM EDTA pH 8.0 | 4 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 |
| 1.4 M NaCl | 28 ml 5 M NaCl |
| 1% PVP (polyvinilpyrrolidone) | 1g PVP (MW = 25,000 - 40,000) |

| | |
|--|---------------------------|
| 2% CTAB extraction buffer (Mercaptoethanol) | Para 100 ml: |
| 2% CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide) | 20 ml 10% CTAB (en mQ) |
| 100mM Tris-HCl pH 8.0 | 10 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0 |
| 20 mM EDTA pH 8.0 | 4 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 |
| 1.4 M NaCl | 28 ml 5 M NaCl |

| | |
|--------------------------|------------------------|
| 10% CTAB solution | Para 100 ml: |
| 10% CTAB | 10 ml 10% CTAB (en mQ) |
| 0.7 M NaCl | 4.1g NaCl |

| | |
|--|--------------|
| High salt TE buffer (Almacenar 4°C) | Para 100 ml: |
|--|--------------|

| | |
|-----------------------|--------------------------|
| 10 mM Tris-HCl pH 8.0 | 1 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0 |
| 1 mM EDTA pH 8.0 | 0.2 ml 0.5 EDTA pH 8.0 |
| 1 M NaCl | 20 ml 5 M NaCl |

| | |
|----------------------------------|----------------------------|
| 0.1 x TE (Almacenar 4°C): | Para 100 ml: |
| 1 mM Tris-HCl pH 8.0 | 0.1 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0 |
| 0.1 mM EDTA pH 8.0 | 0.02 ml 0.5 EDTA pH 8.0 |

| | |
|------------------|--|
| RNAse A | 10mg/ml ADNse-free RNAse A en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 15 mM NaCl. Calentar a 100°C y dejar enfriar a temperatura ambiente. Almacenar de -15 a -25 °C |
| 80%, 96% ethanol | v/v in water |

6.6.2 Metodología

1. Macerar de 500 a 1000 mg de tejido con nitrógeno líquido en un mortero pre-congelado.
2. Transferir las hojas maceradas a un tubo de 2ml.
3. Agregar rápidamente 500 µl de CTAB-PVP extracción buffer a 65°C (si se usa Mercaptoetanol, se añadirán 10 µl de Mercaptoetanol por cada ml de CTAB 2%, sin PVP).
4. Agitar hasta que se obtenga una suspensión homogénea y ligeramente viscosa.
5. Incubar durante 20-30 min a 65 °C en baño María (mezclar varias veces durante el tiempo de incubación).
6. Agregar 200 µl de cloroformo/alcohol isoamílico.

7. Extraer durante 20 min por rotación a temperatura ambiente (RT).
8. Centrifugar durante 30 min a 3600 rpm RT.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (2 ml).
10. Agregar 200 μ l de CTAB solución 10% a 65 °C y mezclar cuidadosamente.
11. Agregar un volumen igual (200 μ l) de cloroformo/alcohol isoamílico.
12. Extraer durante 20 min por rotación RT.
13. Centrifugar durante 30min a 3600 rpm.
14. Transferir el sobre nadante a un nuevo tubo (2 ml).
15. Agregar exactamente el mismo volumen de CTAB precipitación buffer 1%.
16. Precipitar el ADN por inversión de los tubos varias veces (la precipitación debe ser visible).
17. Centrifugar durante 3 min a 3600 rpm RT.
18. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 200 μ l de high salt TE (a 65 °C en baño María).
19. Agregar 500 μ l de etanol 96 % etanol a -4 °C, y mezcla cuidadosamente (la precipitación debe ser visible).
20. Centrifugar durante 3 min a 3600 rpm a 4 °C.
21. Descartar el sobrenadante, y secar el pellet en cámara de vacío durante 20 min.
22. Resuspender el pellet en 70 μ l de 0.1 TE buffer, agregar 1 μ l de RNase A (10 mg/ml), y almacenar a 4 °C.
23. Se cuantificará mediante un espectrofotómetro la cantidad de ADN obtenida, y los productos de la amplificación se analizarán mediante un corrimiento electroforético, en un gel de agarosa al 1%, a 70 volts durante 40 min, flanqueando los productos con marcadores escalera de bajo y alto peso molecular.

6.7 Hibridación In Situ

6.7.1 Preparación del ADN sonda y de bloqueo para gish

ADN Sonda

Diluir el ADN en 200 μ l de TE (recordando tener una concentración final mínima de ADN de 100ng/ μ l).

Sonicar durante 5 seg a una potencia mínima (20%) (microamplitud 12).

Evaluar el rango de tamaño del ADN fragmentado en gel de agarosa, el rango de tamaño debe ser de 1 – 10kb.

ADN de bloqueo

Diluir el ADN en 200 μ l de TE (recordando tener una concentración final mínima de ADN de 100ng/ μ l).

Sonicar durante 45 seg a una potencia mínima (30%) (microamplitud 12).

Evaluar el rango de tamaño del ADN fragmentado en gel de agarosa, el rango de tamaño debe ser de 100 – 500pb.

6.7.2 Elaboración de la sonda

La elaboración de la sonda tanto para la técnica de FISH como para la de GISH se realizó mediante Nick Translation Mix de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Germany), marcando el ADN genómico de la variedad 'Trinidad' y 'Dulce', así como los genes ribosomales 5s y 45s rADN con Fluorescein-12-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Germany) y Tetramethyl-Rhodamine-5-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Germany) respectivamente.

6.7.3 Proceso de hibridación in situ

6.7.3.1 Reactivos

| | |
|-----------------------------------|--|
| HCl 0.01M | 6ml de HCl 1N aforado a 60 ml en agua mQ |
| HCl 1N | 3.6ml de HCl 37% aforado a 100 ml en agua mQ |
| NaOH 10M | 400g/L |
| 20x SSC | 3 M NaCl (175.32g/L de NaCl 1N) 0.3 M Citrato trisódico, pH 7.0 (88.23g/L de Citrato trisódico 1N) Las diluciones de SSC 20x, se realizan en agua mQ. 1:9 → 2x 1:39 → 0.5x |
| 10% SDS | 10g de Dodecilsulfato sódico en 100 ml mQ |
| 50% Dextran sulfato | 5g de Dextran sulfato en 10 ml de agua mQ |
| 70%, 90%, 100% etanol | v/v en agua mQ |
| Formamida | Utilizar Formamida desionizada |
| Paraformaldehído 4% | 4g de paraformaldehído en 60ml de agua mQ + 200 µl of 10 M NaOH, agitar hasta que la solución se torne transparente |
| Solución de pepsina | Solución Stock (100x) = 500 µg /ml en 0.01 M HCl. Para su uso, diluir la solución stock 100x en 0.01M HCl (1:100), concentración final 5µg/ml Almacenar de -15 a -25 °C. |
| DAPI (4'6-diamino-2-phenylindole) | Solución Stock = 100 µg/m en agua mQ Para su uso diluir la solución stock en 2x SSC (2:100), concentración final 2 µg/ml |

| | |
|---------|---|
| | Almacenar de -15 a -25 °C en oscuridad |
| RNAse A | 10mg/ml ADNse-free RNAse A en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 15 mM NaCl. Calentar a 100°C y dejar enfriar a temperatura ambiente. Almacenar de -15 a -25 °C. |

6.7.3.2 Metodología

Pretratamiento

1. Deshidratar las preparaciones cromosómicas en una incubadora a 37 °C durante toda la noche.
2. Diluir el stock de RNAse-A a una concentración de 100 µg/ml (1:100) en 2xSSC y agregar a cada lamilla 100µl de la solución diluida. Cubrir la laminilla con cubreobjetos e incubar las laminillas en cámara de humedad pre-calentada a 37 °C durante 1h. (Preparar en este tiempo el paraformaldehído, en cámara de extracción)
3. Lavar las laminillas en 2x SSC durante 5 minutos, tres veces.
4. Incubar las laminillas en HCl 0.01M durante 2 min en jarra coplin.
5. Diluir el stock de Pepsina a una concentración de 5 µg/ml (1:100) en HCl 0.01. Agregar a cada laminilla 100µl de la solución diluida. Cubrir la laminilla con cubreobjetos e incubar las laminillas en cámara de humedad pre-calentada a 37 °C durante 10min.
6. Lavar las laminillas en agua mQ durante 2 min.
7. Lavar las laminillas en 2x SSC durante 5 min, dos veces.
8. Incubar las laminillas en paraformaldehído 4% por 10 min (usar cámara de extracción)
9. Lavar las laminillas en 2x SSC durante 5 min, dos veces
10. Deshidratar las laminillas en etanol al 70% (-20°C), 90% y 100% durante 3 min c/u, y dejar secar al ambiente.

1. Encender la plancha de calentamiento de laminillas y el baño maría.
2. Preparar la mezcla de hibridación (40 μ l para cada laminilla):

| | |
|-------------------------------|---|
| 20 μ l formamida | ▶ Añadir en la cámara de extracción |
| 8 μ l 50% dextran sulfato | Precalentar a 37°C |
| 4 μ l 20x SSC | |
| 1 μ l 10% SDS | |
| x μ l probe ADN | PARA GISH |
| | ▶ x=(25-50 ng/slide) (0.7 μ l) |
| y μ l block ADN | ▶ y=(1-4 μ g/slide) (3 μ l) |
| z μ l agua mQ esteril | |
| X+Y+Z = 7 μ l | PARA FISH |
| | Solo se agrega 1 μ l de cada sonda + el agua mQ |
3. Desnaturalizar la mezcla de hibridación a 70°C durante 10 min, al terminar el proceso, colocar directamente en hielo durante al menos 10 min.
4. Desnaturalizar la mezcla de hibridación a 70°C durante 10 min, al terminar el proceso, colocar directamente en hielo durante al menos 10 min.
5. Prepara la cámara de humedad, debe estar lo más cerca posible a 80°C, para que posteriormente a la desnaturalización la temperatura descienda lentamente durante la incubación.
6. Desnaturalizar las laminillas a 80°C durante 5 min en la plancha de calentamiento para laminillas.
7. Colocar las laminillas en la cámara de humedad precalentada e incubar toda la noche a 37°C.

Lavados posteriores a la hibridación

1. Lavar las laminillas en 2x SSC a 37°C durante 5 min, tres veces (en el último lavado incrementar la temperatura a 42°C).

2. Lavar las laminillas en 0.1x SSC a 42°C durante 3 min, tres veces (300 ml de 0.1x SSC= 15 ml de 2x SSC + 285ml de agua mQ)
3. Lavar las laminillas en 2x SSC a 42°C durante 3 min, posteriormente enfriar a temperatura ambiente de 5 – 10 min.
4. Lavar las laminillas en 2x SSC a temperatura ambiente durante 5 min, dos veces.

Contrateñido y montaje

1. Lavar las laminillas brevemente en 2x SSC a temperatura ambiente.
2. Añadir 100 µl de la solución de uso de DAPI. Cubrir las laminillas con cubreobjetos e incubar las laminillas en oscuridad durante 5 min.
3. Lavar la laminillas brevemente en 2x SSC, remover el cubreobjetos y escurrir brevemente las laminillas.
4. Inmediatamente del paso anterior, añadir 30 µl de Vectashield a cada laminilla y colocar el cubreobjetos (20x50).
5. Las laminillas se pueden almacenar 4°C en una caja para laminillas.

Visualización

1. En un microscopio equipado con módulo y filtros de fluorescencia, colocar la preparación y bajo el filtro para DAPI usando el objetivo 10x localizar la esquina superior izquierda de la preparación.
2. Escanear sistemáticamente la preparación y seleccionar las células de interés.
3. Fotografiar con cada uno de los filtros a utilizar (empezando con el filtro para DAPI) las células de interés ajustando la exposición.

6.8 Microdissección y microclonación cromosómica

6.8.1 Reactivos

| | |
|---|--|
| Buffer de colección 500 µM proteinasa K | 0.5-19 mg/ml proteinasa K (en 1× Taq ADN polymerase buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 50 mM KCl pH 8.3 (o equivalente) Almacenar a -20°C |
| Kit de reacción para PCR | |
| Iniciador degenerado para DOP-PCR | Iniciador 6-MW (5'-CCGACTGAGNNNNNATGTGG-3') |

6.8.2 Metodología

1. Identificar en el microscopio invertido que se utilizará para la microdissección, la posición de células con cromosomas B claramente visibles y disgregados.
2. Con ayuda del micropipette puller, elaborarlas micro agujas de acuerdo a las especificaciones del proveedor.
3. Esterilizar las micro agujas con luz UV durante 15 min.
4. Colocar cuidadosamente la micro aguja en el micromanipulador del microscopio invertido
5. Colectar únicamente los cromosomas B (10 cromosomas B por reacción) para evitar contaminación.
6. Romper la aguja con el/los cromosomas B colectados en un tubo de 200µl con 10 µl de buffer de colección.
7. Centrifugar levemente el contenido e incubar a 37° C durante 2 h o 24 h, dependiendo del resultado.
8. Agitar en un vortex y centrifugar el contenido, tomar los 10 µl y transferirlos a un tubo de 200 µl nuevo donde se llevará a cabo la reacción de PCR.
9. Inactivar la proteinasa K incubando a 90°C durante 10 min.
10. La amplificación se realizará agregando las soluciones para 25 µl de reacción del kit para PCR de acuerdo a las instrucciones del fabricante, así como 1 µl del iniciador 6-

MW a 10 ng/ μ l, y siguiendo el siguiente programa (Así mismo un tubo de reacción sin ADN se amplificara como control):

| Desnaturalización inicial | Pre-amplificación (4 ciclos) | Amplificación (24 ciclos) | Extensión final |
|---------------------------|---|--|--------------------------------|
| 94°C – 5 min | 94°C – 1min 30°C – 1.5 min 72°C – 3 min | 94°C – 1 min 55°C – 1 min 72°C – 1.5 min | 72°C – 10 min 4°C– ∞ |

11. Se cuantificará mediante un espectrofotómetro la cantidad de ADN obtenida, y los productos de la amplificación se analizarán mediante un corrimiento electroforético, en un gel de agarosa al 1%, a 70 volts durante 40 min, flanqueando los productos con marcadores escalera de bajo y alto peso molecular.
12. Para incrementar la cantidad obtenida de ADN, se realizará una segunda amplificación usando 2 μ l del producto de la primera amplificación como templado y siguiendo el siguiente programa:

| Amplificación (24 ciclos) | Extensión final |
|--|--------------------------------|
| 94°C – 1 min 55°C – 1 min 72°C – 1.5 min | 72°C – 10 min 4°C– ∞ |

13. Para el análisis de los productos obtenidos se realizarán las indicaciones del paso 10.
14. Los productos de la segunda amplificación se utilizarán para su análisis mediante la técnica de Hibridación In Situ.

6.9 Clonación de secuencias de cromosomas B

6.9.1 Reactivos

| | |
|--|--|
| Medio LB 1L de medio solido (con ampicilina) en cajas Petri 100ml medio liquido (sin ampicilina) Bacto-tryptone Bacto-yeast extract NaCl H ₂ O pH Agar Autoclavear Antibiótico (ampicilina) | 10g 5g 10g Aforar a 1 L 7.5 8g (solo para solido) 100-200 mg |
| X-GAL | 15 µl por caja petri |
| Kit purificación PCR | PCR clean-up Gel extraction (MACHERERY-NAGEL) |
| Ki ligación de secuencias a un vector | kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems(PROMEGA) |
| Kit de reacción para PCR | Platinum taq ADN Polimerase |
| Mondadientes estériles | La cantidad dependerá del número de colonias a analizar |
| Butyl alcohol normal | |
| etanol 70% | |

6.9.2 Metodología

1. Preparar un día antes medio LB liquido (sin ampicilina) y cajas Petri con medio LB (con ampicilina).
2. Purificar 100 µl del producto de la segunda amplificación de los fragmentos de cromosomas B mediante el kit PCR clean-up Gel extraction (MACHERERY-NAGEL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3. La ligación de las secuencias a un vector, se realizara mediante el kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA), y de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones a saber:
4. Posterior a la ligación de las secuencias al vector (paso 2 del protocolo), precipitar el ADN del vector ligado con el ADN microdisectado mediante la metodología Butyl alcohol normal:
 - a. Agregar 10 veces el volumen de Butyl alcohol normal (10ml ► 100ml).
 - b. Agitar con vortex.
 - c. Centrifugar a 13000 RPM durante 10 min.
 - d. Desechar el sobre nadante.
 - e. Añadir 100 ml (mismo volumen) de etanol 70%.
 - f. Agitar con vortex
 - g. Centrifugar 13000 rpm durante 5 min
 - h. Deshidratar a temperatura ambiente
 - i. Resuspender en 20 µl de agua mQ
5. Continuar con el proceso de transformación de las bacterias.
6. Cultivar en tubos de 500 µl, 5 µl (por muestra) de las bacterias electrocompetentes (*Escherichia coli*) en 475 µl de medio LB (sin ampicilina), e incubar durante 1h.
7. A la par, en las cajas Petri con el medio LB (con ampicilina), agregar 15 µl de X-GAL por caja, y distribuir las homogéneamente en la superficie hasta que la solución se seque.
8. La transformación de las bacterias se realizara por medio del electroporador BIORAD micropulser™, por lo que al término del proceso de incubación de las bacterias electrocompetentes, en la celda para electroporación, agregar 480 µl del medio inoculado con las bacterias electrocompetentes, e inmediatamente después agregar los 20 µl del vector ligado.
9. Mezclar mediante un ligero pipeteo, evitando la formación de burbujas.
10. Colocar la celda en el electroporador y continuar de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
11. Regresar el medio con las bacterias transformadas a su tubo correspondiente.

12. Las bacterias transformadas se transferirán a las cajas Petri previamente adicionadas con X-GAL, colocando 200 o 300 μ l, del medio en las cajas Petri distribuyendo el medio homogéneamente en la superficie hasta que la solución se seque.
13. Incubar a 37°C durante toda la noche.
14. Evaluar el crecimiento bacteriano.
15. De las colonias bacterianas desarrolladas, 10 se transferirán a una nueva caja Petri (ya no es necesaria la X-GAL), donde, cada colonia se picara con un mondadientes para transferirse a una sección de la caja Petri previamente enumerada. Las cajas Petri se incubarán durante toda la noche a 37°C.
16. Por otro lado, y posterior a que la colonia fue transferida a la nueva caja Petri, la sección del mondadientes que estuvo en contacto con la colonia, se frotará en el fondo de un tubo de 200 μ l, y se realizara una PCR con los iniciadores del plásmido (SP6 y T7), a 25 μ l de reacción y con el siguiente programa:

| Desnaturalización inicial | Amplificación (40 ciclos) | Extensión final |
|---------------------------|---------------------------|-----------------|
| 94°C – 10 min | 94°C – 0.5 min | 72°C – 7 min |
| | 52°C – 0.5 min | 4°C – ∞ |
| | 72°C – 1.5 min | |

17. Los productos de la PCR, se cuantificarán mediante un espectrofotómetro, y posteriormente se analizarán mediante un corrimiento electroforético, en un gel de agarosa al 1%, a 70 volts durante 40 min, flanqueando los productos con marcadores escalera de bajo y alto peso molecular.
18. Las colonias crecidas y enumeradas se recultivarán en 10 ml de medio LB (Luria-Bertani) adicionado con 200 mg/L de ampicilina, siendo incubadas a 37° C, 237 rpm, durante toda la noche.
19. Las bacterias se almacenarán en el ultra congelador, tomando una muestra del medio inoculado con las bacterias y agregando glicerol en proporción 1:1 (500 μ L de medio inoculado : 500 μ L de glicerol estéril).
20. El ADN plasmídico se extraerá mediante el método de lisis alcalina previamente explicado.

21. El ADN extraído se analizará mediante la técnica de Hibridación In Situ en preparaciones cromosómicas de la variedad ‘Dulce’.

6.10 Análisis con marcadores moleculares

Para el análisis de la relación genética entre ‘Penélope’ y sus posibles progenitores ‘Trinidad’ y ‘Dulce’, el ADN genómico de las tres variedades se amplificó utilizando los siguientes marcadores tipo RAPD:

| Nombre del iniciador | Secuencia(5'→3') | Número de bases | %GC | Fragmentos polimórficos (Piña-Escutia, 2010) |
|----------------------|------------------|-----------------|-----|--|
| Y24 | AACCGCGCTC | 10 | 70 | 6 |
| Y29 | TTCGGGCCGT | 10 | 70 | 10 |
| Y37 | TAACCGCGCC | 10 | 70 | 2 |
| Y38 | TAACCGCGCC | 10 | 70 | 15 |
| Y41 | GCGTCCTGGG | 10 | 80 | 41 |

Estos fueron amplificados en un termociclador de acuerdo al siguiente programa:

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| 1 ciclo | 40 ciclos | 1 ciclo |
| 94°C – 5min | 94°C – 1min | 94°C – 1min |
| 56°C – 1 min | 53°C – 1 min | 30°C – 1 min |
| 72°C – 2 min | 72°C – 2 min | 72°C – 2 min |

Los productos de la amplificación se analizaron mediante un corrimiento electroforético, en un gel de agarosa al 1%, a 70 volts durante 40 min, flanqueando los productos con un marcador escalera de bajo peso molecular.

VII. RESULTADOS

7.1 Artículo aceptado

(15/07/2020)

Arroyo-Martínez H.A., Arzate-Fernández A.M, Barba-González R., Piña-Escutia J.L. 2020. CYTOGENETIC RELATIONSHIPS IN THREE VARIETIES OF *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 23(82): 8 pp.

Tropical and Subtropical Agroecosystems 23 (2020): #82

Arroyo-Martínez et al., 2020



CYTOGENETIC RELATIONSHIPS IN THREE VARIETIES OF *Tigridia pavonia* (L.f.) DC †

[RELACIONES CITOGÉNÉTICAS EN TRES VARIEDADES DE *Tigridia pavonia* (L.f.) DC]

Hugo Abelardo Arroyo-Martínez^{1a}, Amaury Martín Arzate-Fernández^{1b}, Rodrigo Barba-González² and José Luis Piña-Escutia^{*1d}

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, Km 11.5 Carretera Toluca-Extlahuaca, 50200, Toluca, Estado de México, México. Email: A.escudo_0@hotmail.com; b: amaury1963@yahoo.com.mx; d: jlpinae@uaemex.mx

²Centro 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. Email: rbarba@ciatej.mx;

*Corresponding author

SUMMARY

Background: *Tigridia pavonia* (L.f.) DC is a wild species with great ornamental value, of which nine plant varieties are known. Within the evolutionary process of this species, Penélope has been considered a natural hybrid, product of the cross between the varieties Trinidad and Dulce. **Objective:** In the present study, the cytogenetic relationships among Trinidad, Dulce and Penélope were analyzed. **Methodology:** The karyotype of the varieties Trinidad and Penélope was determined through classic cytogenetics and the physical mapping of the genes 5s and 45s rDNA through Fluorescent in Situ Hybridization. **Results:** The results showed for the first time the karyotype and the physical mapping of the genes 5s and 45s rDNA in the varieties Trinidad and Penélope. **Implications:** The information generated can be the basis for future evolutionary analyzes, and / or breeding programs in the species. **Conclusion:** A higher cytogenetic similarity of Penélope with Trinidad and Dulce has been revealed, suggesting that the latter may be the parents.

Keywords: *Tigridia pavonia*; natural hybrid; karyotype; Fluorescent *in situ* hybridization; B chromosomes.

10 **CYTOGENETIC RELATIONSHIPS IN THREE VARIETIES OF *Tigridia pavonia* (L.f.)**
11 **DC**

12 **RELACIONES CITOGENÉTICAS EN TRES VARIEDADES DE *Tigridia pavonia* (L.f.)**
13 **DC**

14 **Hugo Abelardo Arroyo-Martínez (0000-0001-8475-0666)^{1a}, Amaury Martín Arzate-**
15 **Fernández (0000-0001-8603-0099)^{1b}, Rodrigo Barba-González (0000-0001-9336-090X)^{2c},**
16 **José Luis Piña-Escutia^{d*} (0000-0001-9678-9939)^{1d}**

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

21 a: escudo_0@hotmail.com; b: amaury1963@yahoo.com.mx; c: rbarba@ciatej.mx;

22 d*jlpiniae@uaemex.mx

23 **SUMMARY**

24 **Background:** *Tigridia pavonia* (L.f.) DC is a wild species with great ornamental value, of which
25 nine plant varieties are known. Within the evolutionary process of this species, ‘Penélope’ has been
26 considered a natural hybrid, product of the cross between the varieties ‘Trinidad’ and ‘Dulce’.

27 **Objective:** In the present study, the cytogenetic relationships among ‘Trinidad’, ‘Dulce’ and
28 ‘Penélope’ were analyzed. **Methodology:** The karyotype of the varieties ‘Trinidad’ and ‘Penélope’
29 was determined through classic cytogenetics and the physical mapping of the genes 5s and 45s
30 rDNA through Fluorescent *In Situ* Hybridization. **Results:** The results showed for the first time
31 the karyotype and the physical mapping of the genes 5s and 45s rDNA in the varieties ‘Trinidad’
32 and ‘Penélope’. **Implications:** The information generated can be the basis for future evolutionary
33 analyzes, and / or breeding programs in the species. **Conclusion:** A higher cytogenetic similarity
34 of ‘Penélope’ with ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ has been revealed, suggesting that the latter may be the
35 parents.

36 **Keywords**

37 *Tigridia pavonia*; natural hybrid; karyotype; Fluorescent *In Situ* Hybridization; B chromosomes.

38 **RESUMEN**

39 **Antecedentes:** *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. (Iridaceae) es una especie silvestre de gran valor
40 ornamental, de la cual se conocen nueve variedades vegetales. Dentro del proceso evolutivo de la

41 especie, ‘Penélope’ ha sido considerada un híbrido natural producto de la cruce entre las variedades
42 ‘Trinidad’ y ‘Dulce’. **Objetivo:** En el presente estudio se analizaron las relaciones citogenéticas
43 entre las variedades ‘Trinidad’, ‘Dulce’ y ‘Penélope’. **Metodología:** El cariotipo de las variedades
44 ‘Trinidad’ y Pénélope se determinó mediante citogenética clásica, y el mapeo físico de los genes
45 5s y 45s rDNA a través de Hibridación Fluorescente *In Situ*. **Resultados:** Los resultados mostraron
46 por primera vez el cariotipo y el mapeo físico de los genes 5s y 45s rDNA en las variedades
47 ‘Trinidad’ y ‘Penélope’. **Implicaciones:** La información generada puede servir de base para
48 análisis evolutivos, y / o programas de mejoramiento genético en la especie. **Conclusión:** Se revelo
49 una alta similitud citogenética de ‘Penélope’, con respecto a ‘Trinidad’ y ‘Dulce’, sugiriendo que
50 estos pueden ser los progenitores.

51 **Palabras clave**

52 *Tigridia pavonia*; híbridos naturales; cariotipo; Hibridación *In-Situ* Fluorescente; cromosomas B.

53 **INTRODUCTION**

54 *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. (Iridaceae) is a Mexican wild species of great ornamental value.
55 Although in Mexico its flower has a historical and social importance, their diffusion and production
56 are limited (Vázquez-García, 2011a; Peña Lomelí *et al.*, 2013). Nowadays, of the 43 species of this
57 genus reported in México only *T. pavonia* is commercialized in several countries (Vázquez-García,
58 2011a; Munguía-Lino *et al.*, 2015), being appreciated mainly as gardening plant (Carrillo-Ocampo
59 *et al.*, 2002).

60 Cytogenetic analyzes are an important tool for the design of breeding programs, and for taxonomic
61 and phylogenetic

62 studies (Ramesh, 2015). In addition, with the development of the Fluorescent In-Situ Hybridization
63 (FISH) technique, it has been possible to characterize specific chromosomes, allowing the
64 identification of chromosomal rearrangements

65 and genomic changes between different groups species or polyploid individuals (Guidini *et al.*,
66 2017; He *et al.*, 2017).

67 Some studies have been focused at the genetic breeding of this species for example; Díaz-L *et al.*
68 (2003) irradiated bulbs of the variety Sandra with gamma rays of ⁶⁰Co to induce variability of
69 ornamental importance. Likewise, Piña-Escutia *et al.* (2003) obtained hybrids between *T. pavonia*
70 var ‘Carolina’ and *T. augusta* by *in vitro* culture of ovary sections, which indicates an interest in
71 the species.

72 The FISH technique has also been useful to confirm paternity in *Passiflora* hybrids (Silva *et al.*,
73 2018). In this regard, of the nine varieties of *T. pavonia* registered in 2016 in the Catálogo Nacional
74 de Variedades Vegetales, it is considered that at least two of them could be natural hybrids,
75 although so far no research has been reported that confirms it. Thus, it is believed that ‘Penélope’
76 variety is one of them, whose parents could be ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ varieties, the latter showing
77 three B chromosomes in their karyotype (Arroyo-Martínez *et al.*, 2018). It is noteworthy pointed
78 out that ‘Penélope’ have showed intermediate features for color, height plant and fertility
79 percentage in relation to ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ varieties and the three share the same geographic
80 location.

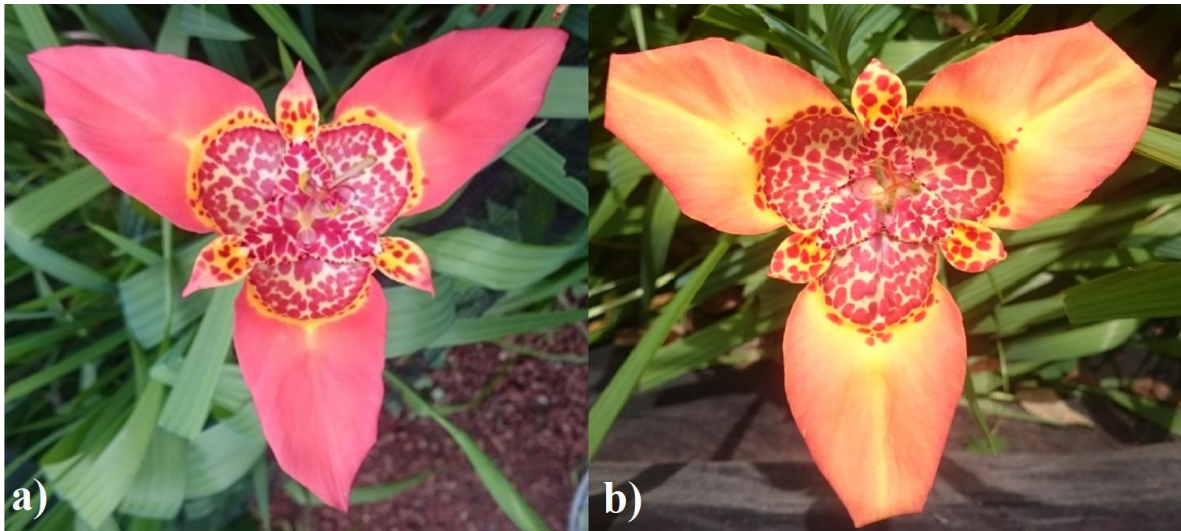
81 Karyotype characterization and the putative hybridization between these varieties becomes more
82 relevant if B chromosomes effect is considered, because in the organisms that possess them, they
83 could affect the biosynthesis of essential oils (*Salvia coccinea*); increases the esterase E-1
84 transcription (*Scilla autumnalis*); or decrease fertility (Oliver *et al.*, 1982, Ghaffari and
85 Bidmeshkipoor, 2002, Mani and Thoppil, 2005; Jones *et al.*, 2008). Thus, analysis of transmission
86 of these structures would enhance strategies of genetic breeding focused on the fertility or
87 production of seed of the *Tigridia* genus.

88 The aim of this study was to analyze the cytogenetic relationships among ‘Trinidad’, ‘Dulce’, and
89 ‘Penélope’ varieties through classical cytogenetic techniques and physical mapping of 5S and 45S
90 rDNA genes, this may provide information that aid as a basis for determinate B chromosomes
91 transmission as well as to elucidate the hybrid origin of *T. pavonia* var. ‘Penélope’.

92 **MATERIALS AND METHODS**

93 **Plant material**

94 The bulbs of ‘Trinidad’ and ‘Penélope’ varieties of *Tigridia pavonia* were donated by the Wild
95 Species Conservation Center of the Tenancingo University Center, of the Universidad Autónoma
96 del Estado de México (UAEMex). These were planted in pots with a substrate composed of soil,
97 sand and cow manure (1: 1: 1) and maintained in a rustic greenhouse of the Facultad de Ciencias
98 Agrícolas of the UAEMex until they flowering (Figure 1). Root meristems were collected for
99 chromosomal studies.



100

101

Figure 16. Flowers of two *Tigridia pavonia* varieties: a) 'Trinidad', b) 'Penélope'.

102

Mitotic chromosomes observation

103

Slide preparations were performed in accordance with the methodology proposed by Barba-González *et al.* (2005). Briefly 15 metaphase cells from five plants of *T. pavonia* of each variety were observed. Radicular meristems were placed in a 0.002 M 8-hydroxyquinoline solution for 6 h at 4 ° C under dark conditions. Subsequently, they were fixed in Farmer's solution for 24 h; and then treated with a mixture of enzymes at a final concentration of 0.2% (Cellulase, Pectolyase, Cytohelicase) in citrate buffer pH 4.5 for 2 h at 37 ° C, once the enzymatic digestion was completed, the meristem was placed in a slide and one drop of aceto-orcein (1%) was added. After placing the coverslips, the tissue was disintegrated and the cells were left in a single plane by the squash method, the preparations were made permanent by the liquid nitrogen method. The preparations were analyzed using an Olympus contrast phase microscope and the best cells of each species were photographed with a Leica MC170 HD camera.

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

Mitotic chromosome analyses and karyotype determination

115

The length of the chromosomal arms was measured by the LAZE V.4 software. Chromosomal morphology, total genome length in μm (LGT), and asymmetry index (TF%) were determined. Chromosomal morphology classification was carried out following the methodology proposed by Levan *et al.* (1964). Chromosome homology was established according to similarities in length and centromeric position. Idiograms were elaborated according to average values of the short arm and long arm in each pair of chromosomes and were grouped into metacentric (m), submetacentric

116

117

118

119

120

121 (sm), subtelocentric (st) and telocentric (t) chromosomes. The asymmetry index (TF%) was
122 obtained as reported by Sinha and Roy (1979)

123 **Statistical analysis**

124 In order to determine the possible significant differences of LGT and TF % between ‘Trinidad’ and
125 ‘Penélope’ varieties, data were analyzed with a normality test. Likewise, an analysis of variance
126 was carried out as well as a test of significant minimum difference (LSD) with software
127 Statgraphics XV.I.

128 **Physical mapping of 45S and 5S rDNA genes**

129 Physical mapping of 45S and 5S rDNA genes was carried out according to the methodology
130 proposed by Barba-González *et al.* (2005) with some changes, briefly: for the slide preparation the
131 root meristems were placed in a solution of 8-hydroxyquinoline 0.002 M for 6 h at 4 ° C in dark
132 conditions. Subsequently, they were fixed in Farmer's solution for 24 h, and then incubated in a
133 mixture of enzymatic digestion of pectolyase Y23 0.2% (w / v), cellulase RS 0.2% (w / v), and
134 cytohelicase 0.2% (w / v) in citrate buffer 10 mmol / L (pH 4.5), at 37 ° C for approximately 2 h.
135 The cell squash was made in a drop of 50% acetic acid and frozen in liquid nitrogen, the covers
136 were removed with a razor blade and immediately dehydrated in 96% ethanol and air dried.

137 For Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) technique, the 5S and 45S rDNA wheat genes were
138 utilized as probes. Both were isolated with the High Pure Plasmid Isolation kit (Roche Diagnostics
139 GmbH, Germany) and marked with Fluorescein-12-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Germany)
140 and Tetramethyl-Rhodamine-5-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Germany), respectively by Nick
141 Translation Mix, according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics GmbH,
142 Germany).

143 Probes hybridization was performed by incubating the slides in RNase (100 µg / mL) for 1 h, and
144 pepsin (5 µg / mL) for 10 min, both at 37 ° C, and later in paraformaldehyde (4%) for 10 min. at
145 room temperature; They were then dehydrated with 70%, 90% and 100% ethanol for 3 min each,
146 and air dried. Hybridization continued using a mixture of 20x SSC, formamide 50%, dextran sulfate
147 sodium 10%, SDS 10%, and 25-50 ng / mL of each probe. The DNA was denatured by heating the
148 hybridization mixture at 70 ° C for 10 min and placing it on ice for at least 10 min. For each slide,
149 40 µL of the hybridization mixture was used. The slides were denatured at 80 ° C for 10 min and

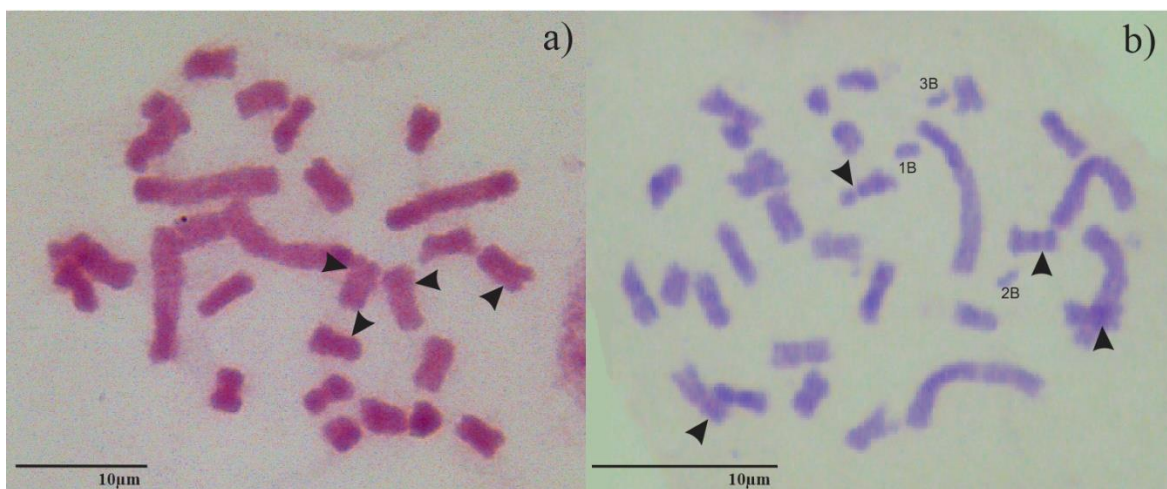
150 then hybridized overnight at 37 ° C in a humid chamber. Subsequently, the slides were washed at
151 room temperature in 2x SSC for 15 min and 0.1x SSC at 42 ° for 30 min. The chromosomes were
152 counterstained with 1 µL / mL of DAPI (4', - diamidino-2-phenylindole), a drop of Vectashield
153 antifade (Vector Laboratories) was added before examining the slides under a Leica DM3000
154 microscope (Leica Microsystems, Germany) equipped with epifluorescent lighting and coupled to
155 a Leica DF200 camera (Media-Cybernetics, USA).

156 **RESULTS AND DISCUSSION**

157 **Karyotype analyses**

158 According to Arroyo-Martínez *et al.* (2018) each of the nine varieties of *T. pavonia* can present
159 unique chromosomal features. In the present study it was observed that ‘Trinidad’ and ‘Penélope’
160 varieties presented significant differences in the karyotype, namely; ‘Trinidad’ had a chromosome
161 number of $2n = 2x = 28$ (Figure 2) an LGT = 135.38 µm, with a size range of 8.83 to 11.32 µm for
162 large chromosomes, and from 2.92 to 5.01 µm for small chromosomes. Also the presence of
163 secondary constrictions in chromosomal pairs 3 and 6 was observed whereas karyotypic formula
164 was 28m with a TF% of 46.16.

165 Our results are similar to the karyotype formula of Sandra variety (Arroyo-Martínez *et al.*, 2017)
166 except to LGT as well as number and position of secondary constrictions. It is noteworthy that
167 although both varieties have similar flower color, they come from distinct localities and their
168 morphological characteristics as height plant, internal tepal shape and color disposition are also
169 different (Vázquez-García *et al.*, 2001b). In this sense Martínez *et al.* (2000) and Moreno Salazar
170 *et al.* (2007) reported variations in the karyotype of populations of *Echeandia nana* and *Agave*
171 *angustifolia* respectively, pointing out that geographic distance between populations besides
172 physical barriers as hills and vegetation, are factors that prevent gene flow among them causing
173 biogeographic or reproductive isolation and facilitating the differentiation of populations due to
174 genetic drift. According to this it is possible that within differentiation process of *T. pavonia*
175 varieties geographical distance has influenced the modification of the karyotype, originating
176 specific characteristics of the karyotype of each variety.



177

178 Figure 17. Chromosomes in mitotic metaphase of two *Tigridia pavonia* varieties: a) ‘Trinidad’
 179 showing $2n = 2x = 28$, b) ‘Penélope’ showing $2n = 2x = 28 + 3B$. Arrowheads indicate the
 180 chromosomes with secondary constriction.

181 On the other hand, ‘Penélope’ presented a chromosome number of $2n = 2x = 28 + 3B$ (Figure 2),
 182 highlighting the three extra chromosomes. The karyotypic formula for this variety was of $26m +$
 183 $2sm + 3B$. Secondary constrictions were observed in chromosome pairs 5 and 7. The TF% was
 184 46.16, and LGT = 116.55 µm; size range for large chromosomes was from 6.0 to 7.5 µm whereas
 185 for small chromosomes was from 4.35 to 2.92 µm, and for the three putative B chromosomes was
 186 from 1.29 to 2.41µm.

187 Although is assumed that B chromosomes derived from standard A chromosomes of either the
 188 same or related species (Huang *et al.*, 2016), some evidences suggest that B chromosomes were
 189 generated spontaneously as consequence of new genomic conditions after interspecific
 190 hybridization (Dhar *et al.*, 2019). In fact, it is estimate that 30–70 % of all flowering plant species
 191 have hybridization events in their phylogenetic histories (Neri *et al.*, 2018) and apparently that
 192 anthropogenic disturbances may be the major factor promoting hybridization, more over it can
 193 create a new ecological niche in which the hybrid can establish its populations (Li *et al.*, 2017).

194 In this sense it is noteworthy that the three varieties analyzed in the present study grow wild in the
 195 same geographic zone (2200 m.a.s.l.), usually in Pinus or Quercus forest, or riparian vegetation.
 196 Also these varieties share the same flowering period from June to August and they are considered
 197 colonizing. As it is known, hybridization may enhance the colonizing behavior of certain species
 198 (López-Caamal and Tovar-Sánchez 2014) allowing that parental species may coexist through

199 formation of a stable hybrid zone (Hall 2016). These reports strengthen the idea that ‘Penélope’
 200 could be a natural hybrid between ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ varieties, especially because ‘Penélope’
 201 showed the same number of B chromosomes reported for ‘Dulce’ (Arroyo-Martínez *et al.*, 2018).
 202 Likewise, ‘Penélope’ showed intermediate values of LGT in comparison with the other two
 203 varieties (Table 1) however, a higher similarity with ‘Dulce’ ($p \leq 0.05$) was observed. This coincide
 204 with reported by Piña-Escutia *et al.* (2010a) who found a narrow genetic distance between
 205 ‘Penélope’ and ‘Dulce’ using morphological and molecular analysis, which shows the close
 206 relationship between these two varieties.

207 Barreto dos Reis *et al.* (2015) reported that the hybrid *Pennisetum purpureum* X *P. glaucum*
 208 showed DNA loss in relation to their parents, pointing out that it could be due to genomic alteration
 209 of the hybridization. In the present study similar results were found since chromosome length range
 210 of ‘Penélope’ was different from those reported previously for ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ (Arroyo-
 211 Martínez *et al.*, 2018). Our results are also coincided with Riddle and Birchler (2003) who
 212 mentioned that union of two genomes in a single nucleus can alter the number and distribution of
 213 DNA sequences, which could cause genetic and epigenetic reorganizations, resulting in
 214 intergenomic conflicts and DNA loss.

215 Table 1. Comparative analysis of the karyotype of ‘Trinidad’, ‘Penélope’ and ‘Dulce’ varieties of
 216 *Tigridia pavonia*.

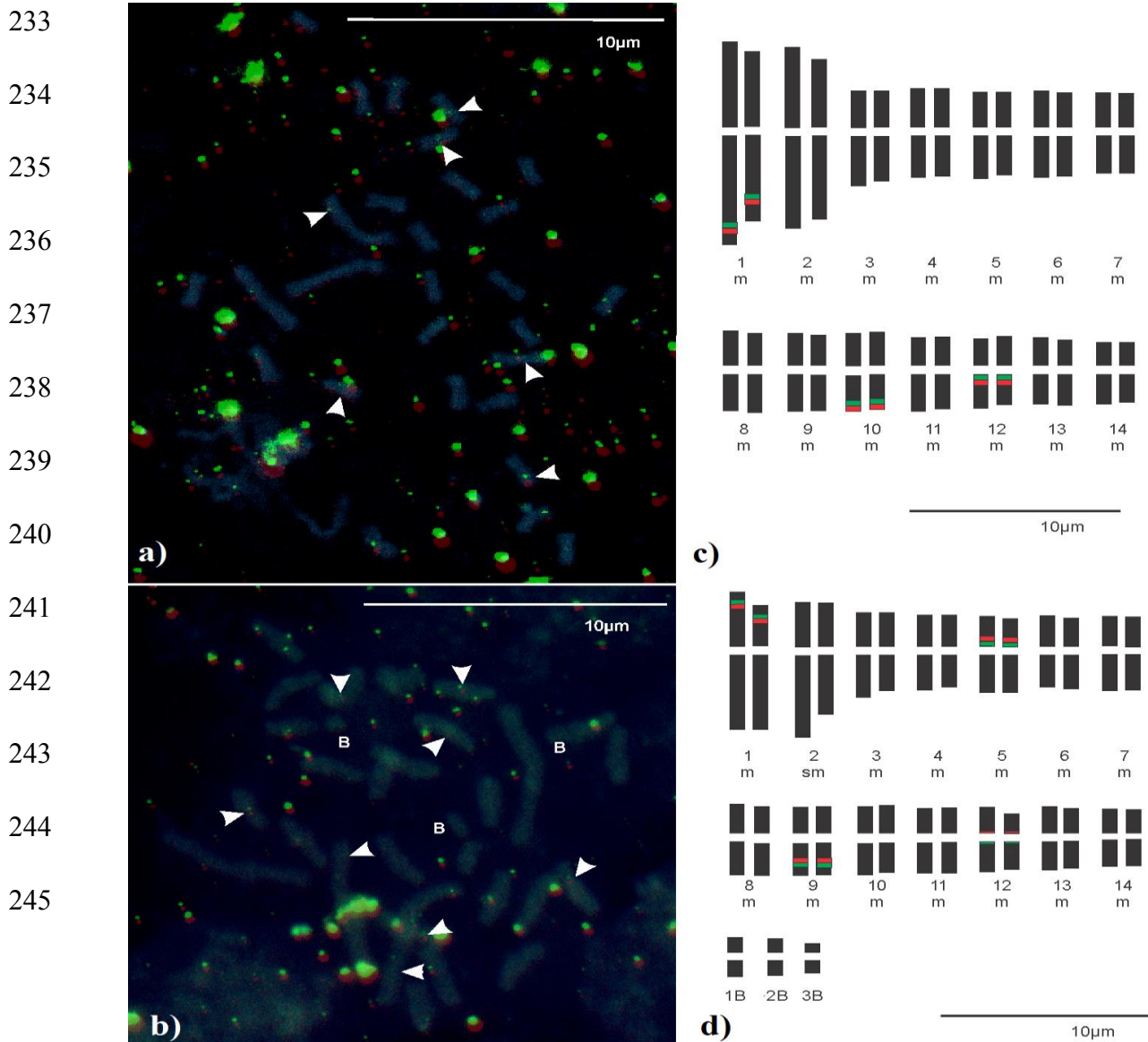
| Variety | Chromosome number | Karyotypic formula | Total length of the Genome (LGT μm) | Asymmetry index (TF%) |
|------------|-------------------|--------------------|---|-----------------------|
| ‘Trinidad’ | $2n = 28$ | 28m | 135.38 ^b | 46.16 ^a |
| ‘Penélope’ | $2n = 28+3B$ | 26m + 2sm + 3B | 116.55 ^a | 44.41 ^a |
| ‘Dulce’* | $2n = 28+3B$ | 26m + 2sm + 3B | 124.94 ^a | 44.29 ^a |

217 LSD ($p \leq 0.05$).

218 *Data reported by Arroyo-Martínez *et al.* (2018)

219 **Physical mapping of 5S and 45S rDNA genes**

220 Labeling of repetitive sequences, such as ribosomal genes facilitate the identification of specific
 221 chromosomes of different species, allowing observe a specific distribution pattern that can be used
 222 as a karyotype marker for to enhances genomic differentiation among highly related species
 223 (Guidini *et al.*, 2017; She *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). In the present study similar results were
 224 found since ‘Trinidad’ showed six hybridization sites for both genes (chromosomal pairs 1, 10 and
 225 12) two of them were found in two of the large chromosomes and the rest in the small ones (Figure
 226 4ac). Interestingly ‘Penélope’ also showed two hybridization sites of both genes in two of the large
 227 chromosomes and the rest in the small ones (Figure 4bd), contrary to reported for ‘Dulce’ where
 228 none hybridization site corresponded to large chromosomes (Arroyo-Martínez *et al.*, 2018), this
 229 suggest that ‘Trinidad’ and ‘Penélope’ could share similar genetic accommodation of their DNA
 230 sequences. Our results also coincide with reported by Piña-Escutia *et al.* (2010b) who observed a
 231 narrow genetic distance between ‘Trinidad’ and ‘Penélope’ when these were evaluated with RAPD
 232 markers.



246

247

248

249 Figure 4. Fluorescent *In Situ* Hybridization of 5S (green) and 45S rDNA (red) genes in
250 chromosomes of two *Tigridia pavonia* varieties: a) ‘Trinidad’, b) ‘Penélope’. Arrowheads indicate
251 hybridization sites of both genes. c) ‘Trinidad’ idiogram showing a karyotypic formula of 28m. d)
252 ‘Penélope’ idiogram showing a karyotypic formula of 26 m + 2 sm + 3 B. Red marks indicate 5S
253 rDNA genes and green marks indicate 45S rDNA genes.

254 López-Caamal and Tovar-Sánchez (2014) mention that chromosome number of hybrids is not a
255 reliable tool when used in the absence of additional data, however it may provide robust hypothesis
256 of hybridization when morphological or DNA fingerprinting techniques are used. Thus,
257 considering that the three varieties coexist in the same geographic area, the intermediate values in
258 flower size and percentage of fruit formation that ‘Penélope’ presents in relation to ‘Trinidad’ and
259 ‘Dulce’ (Vázquez-García *et al.*, 2001), the genetic similarity among these varieties (Piña-Escutia *et*
260 *al.*, 2010ab), and the cytogenetic results observed in the present study, it can be inferred that
261 ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ varieties could act as parents of the ‘Penélope’ variety, although more
262 specific analyzes like Genomic *In Situ* Hybridization or the use of molecular markers are required
263 to confirm this.

264 CONCLUSIONS

265 In the present work it was possible to observe a high cytogenetic similarity among ‘Penélope’,
266 ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ suggesting that the latter may be the parents. Likewise, the karyotype of the
267 ‘Penélope’ variety is reported for the first time, with a chromosome number of $2n = 2x = 28 + 3B$,
268 a karyotypic formula of $26m + 2sm + 3B$, showing eight hybridization sites of the 5S and 45S
269 rDNA respectively. ‘Trinidad’ presented a chromosome number of $2n = 2x = 28$ with a karyotypic
270 formula of 28m and showed six hybridization sites of both 5S and 45S rDNA genes.

271 **Acknowledgements.** We thank to Plant Biotechnology team of the Centro de Investigación y
272 Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) for aid in carrying out part
273 of the research.

274 **Funding.** This investigation was financed for the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
275 (CONACYT) through the project 243266.

276 **Conflict of interest.** The authors confirm that this is an original work that is not considered for
277 publication in any other journal, which does not present any conflict of interest that may
278 inappropriately influence the work of persons or institutions.

279 **Compliance with ethical standards.** The research was conducted according to the established
280 procedures of the Universidad Autónoma del Estado de México, under the authorization of the
281 project CONACYT 243266.

282 **Data availability.** Data are available with the corresponding author Dr. José Luis Piña Escutia at:
283 (jlpinac@uaemex.mx) upon reasonable request.

284 REFERENCES

285 Arroyo Martínez, H. A., Arzate Fernández, A. M., Barba González, R., Piña Escutia, J. L. 2017.
286 Karyotype determination of three *Tigridia* species (Asparagales, Iridaceae). *Caryologia*. 70(3): 5
287 pp. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.2017.1321312>.

288 Arroyo-Martínez, H. A., Arzate-Fernández, A. M., Barba-González, R., Piña-Escutia, J. L. 2018.
289 Karyotype analysis and physical mapping of the 5S and 45S rDNA genes in *Tigridia pavonia* var.
290 ‘Dulce’ (Iridaceae). *Caryologia*. 71(1): 6 pp. DOI:
291 <https://doi.org/10.1080/00087114.2017.1382302>.

292 Barba-González, R., Ramanna, M. S., Visser, R. G. F., Van Tuyl, J. M. 2005. Intergenomic
293 recombination in F₁ lily hybrids (*Lilium*) and its significance for genetic variation in the BC1
294 progenies as revealed by GISH and FISH. *Genome*. 48: 884–894 pp. DOI: 10.1139/g05-057.

295 Barreto dos Reis, G., Andrade-Vieira, L. F., Salabert de Campos, J. M., Vander Pereira, A.,
296 Chamma Davide, L. 2015. Karyotype alterations after hybridization between *Pennisetum*
297 *purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Ciência e Agrotecnologia*., 39(5): 443–454 pp. DOI:
298 10.1590/S1413-70542015000500003.

299 Carrillo-Ocampo, A., Engleman, E. M. 2002. Anatomía de la semilla de *Tigridia pavonia*
300 (Iridaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 70: 67–77 pp. DOI:
301 <https://doi.org/10.17129/botsoci.1655>.

- 302 CNVV. 2016. Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. Secretaría de Agricultura Ganadería,
303 Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 38 pp.
- 304 Dhar, M. K., Kour, J., Kaul S. 2019. Origin, behaviour, and transmission of B chromosome with
305 special reference to *Plantago lagopus*. Genes. 10(2): 152 pp. DOI: 10.3390/genes10020152.
- 306 Díaz-L., C., Pichardo-R., J., De la Cruz-T., E., Norman-M., T., Sandoval-R., F., Vázquez-G., L.
307 2003. Variabilidad inducida en *Tigridia pavonia* (L. f.) D.C. var. Sandra por irradiación de bulbos
308 con rayos gamma DE ⁶⁰Co. Revista Chapingo Serie Horticultura. 9(2): 235–241 pp. DOI:
309 10.5154/r.rchsh.2002.06.037.
- 310 Guidini, C. C., Pinto-Maglio, C. A. F., Lombello, R. A. 2017. Karyotype, rDNA localization and
311 meiotic behavior of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae). Caryologia. 70(4): 385–389 pp. DOI:
312 <https://doi.org/10.1080/00087114.2017.1372255>.
- 313 Ghaffari, S. M., Bidmeshkipoor, A. 2002. Presence and behaviour of B-chromosomes in
314 *Acanthophyllum laxiusculum* (Caryophyllaceae). Genetica. 115(3): 319–323 pp. DOI:
315 <https://doi.org/10.1023/A:1020676119886>.
- 316 Hall, R. J. 2016. Hybridization helps colonizers become conquerors. Proceedings of the National
317 Academy of Sciences 113 (36): 9963–9964 pp. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1611222113>.
- 318 He, F., Wang, Y., Bao, Y., Ma, Y., Wang, X., Li, X., Wang, H. 2017. Chromosomal constitutions
319 of five wheat–*Elytrigia elongata* partial amphiploids as revealed by GISH, multicolor GISH and
320 FISH. Comparative Cytogenetics. 11(3): 525–540 pp. DOI:
321 <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i3.11883>.
- 322 Huang, W., Du, Y., Zhao, X., Jin, W. 2016. B chromosome contains active genes and impacts the
323 transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). BMC Plant Biology. 16:88 pp. DOI:
324 10.1186/s12870-016-0775-7.
- 325 Jones, R. N., Viegas, W., Houben, A. 2008. A Century of B Chromosomes in Plants: So What?.
326 Annals of Botany. 101(6): 767–775 pp. DOI: 10.1093/aob/mcm167.
- 327 Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on
328 chromosomes. Hereditas. 52: 201–220 pp. DOI:10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x.

- 329 Li, M., Chen, S., Zhou, R., Fan, Qiang., Li, Feifei., Liao, W. 2017. Molecular evidence for natural
330 hybridization between *Cotoneaster dielsianus* and *C. glaucophyllus*. *Frontiers in Plant Science*. 8:
331 11 pp. DOI: 10.3389/fpls.2017.00704.
- 332 López-Caamal, A., Tovar-Sánchez, E. 2014. Genetic, morphological, and chemical patterns of
333 plant hybridization. *Revista chilena de historia natural*. 87: 1–14 pp.
334 DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/s40693-014-0016-0>.
- 335 Mani, T., Thoppil, J. E. 2005. Influence of B-chromosome on essential oil content and composition
336 in *Salvia coccinea* Buc'hoz ex Etl. (Lamiaceae). *Caryologia*. 58(3): 246–248 pp. DOI:
337 10.1080/00087114.2005.10589458.
- 338 Martínez, J., Méndez, I., Palomino, G. 2000. Cytological and genical differentiation between
339 cytotypes of *Echeandia nana* (Anthericaceae). *Caryologia*. 53(2): 147–158 pp. DOI:
340 10.1080/00087114.2000.10589190.
- 341 Munguía-Lino, G., Vargas-Amado, G., Vázquez-García, L. M., Rodríguez, A. 2015. Riqueza y
342 distribución geográfica de la tribu Tigridieae (Iridaceae) en Norteamérica. *Revista Mexicana de*
343 *Biodiversidad*. 86(1): 80–98 pp. DOI: 10.7550/rmb.44083.
- 344 Moreno Salazar, S. F., Esqueda, M., Martínez, J., Palomino, G. 2007. Tamaño del genoma y
345 cariotipo en *Agave angustifolia* Y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Revista Fitotecnia*
346 *Mexicana*. 30 (1): 13–23 pp.
- 347 Neri, J., Wendt, T., Palma-Silva, C. 2018. Natural hybridization and genetic and morphological
348 variation between two epiphytic bromeliads. *AoB PLANTS* 10(1): 16 pp. DOI:
349 10.1093/aobpla/plx061.
- 350 Oliver, J. L., Posse, F., Martínez-Zapater, J. M., Enriquez, A. M., Ruiz-Rejón, M. 1982. B-
351 Chromosomes and E-1 Isozyme Activity in Mosaic Bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae).
352 *Chromosoma (Berl.)*. 85(3): 399–403 pp. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00330362>.
- 353 Peña Lomelí, A., Magaña Lira, N., Montes Hernández, S., Sánchez Martínez, N., Santiaguillo
354 Hernández, J. F. 2013. Variedades de uso común; un breve mirar a la riqueza mexicana, Tigridias
355 y Echeverias. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1: 27
356 pp.

- 357 Piña-Escutia, J. L., Vences-Contreras, C., Gutiérrez-Martínez, M. G., Vázquez-García, L. M.,
358 Arzate-Fernández, A. M. 2010a. Morphological and molecular characterization of nine botanical
359 varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia*. 44 (2): 147–158 pp.
- 360 Piña-Escutia, J. L., Vázquez-García, L. M., Arzate-Fernández, A. M. 2010b. Variety discrimination
361 of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. assessed by different length RAPD primers. *Electronic Journal of*
362 *Biotechnology*. 13 (4): 10–11 pp. DOI: 10.2225/vol13-issue4-fulltext-7.
- 363 Piña-Escutia, J. L., Vázquez-García, L. M., Arzate-Fernández, A. M. 2013. Interspecific
364 hybridization between *Tigridia pavonia* and *T. augusta* through ovary slice culture. *Genetics and*
365 *Molecular Research* 12(1): 15–22 pp. DOI: 10.4238/2013.
- 366 Ramesh, A. 2015. Karyotypic analysis in three species of *Allium* and their some varieties.
367 *International Research Journal of Biological Sciences*. 4(9): 1–9 pp.
- 368 Riddle, N. C., Birchler, J. A. 2003. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in
369 allopolyploids and species hybrids. *Trends in Genetics*. 19(11): 597–600 pp. DOI:
370 10.1016/j.tig.2003.09.005
- 371 She, C. W., Wei, L., Jiang, X. H. 2017. Molecular cytogenetic characterization and comparison of
372 the two cultivated *Canavalia* species (Fabaceae). *Comparative Cytogenetics*. 11(4): 579–600 pp.
373 DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i4.13604>.
- 374 Silva, G. S., Magalhães Souza, M., Ferreira de Melo, A. C., Domingo Urdampilleta, J., Forni-
375 Martins, E. R. 2018. Identification and characterization of karyotype in *Passiflora* hybrids using
376 FISH and GISH. *BMC Genetics*. 19(1): 26 pp. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0612-0>.
- 377 Sinha, S. S. N., Roy, H. 1979. Cytological studies in the genus *Phaseolus* I. Mitotic analysis in
378 fourteen species. *Cytologia*. 44: 191–199 pp.
- 379 Vázquez-García, L. M., Przybyla, A. A., De la Cruz, T. E., Torres Navarro, H., Rodríguez, G.
380 2001b. Morphological description of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L. F.) Ker. Gawl.
381 *Journal of Applied Botany*. 75: 14–19 pp.
- 382 Vázquez-García, L. M. 2011. *Tigridias ornamentales, su uso y distribución*. México: Universidad
383 Autónoma Chapingo. 104 pp.

384 Zhao, Y., Xie, J., Dou, Q., Wang, J., Zhang, Z. 2017. Diversification of the P genome among
385 *Agropyron* Gaertn. (Poaceae) species detected by FISH. *Comparative Cytogenetics*. 11(3): 495–
386 509 pp. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i3.13124>.

7.2 Artículo enviado

(20/03/2020)

Arroyo-Martínez H.A., Arzate-Fernández A.M, Barba-González R., Piña-Escutia J.L. ANÁLISIS DE GISH Y RAPD REVELAN HIBRIDACIÓN NATURAL EN *Tigridia pavonia*. En revisión con clave R2020026, REVISTA FITOTECNIA MEXICANA.



Revista
Fitotecnia Mexicana
PUBLICADA POR LA SOCIEDAD MEXICANA DE FITOGENÉTICA, A.C.



CARTA DE RECEPCIÓN

Chapingo, Estado de México, 20 de marzo de 2020

JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Con la presente se hace constar que se ha recibido el manuscrito propuesto para su publicación en la **REVISTA FITOTECNIA MEXICANA** titulado:

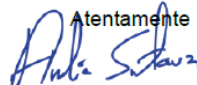
ANÁLISIS DE GISH Y RAPD REVELAN HIBRIDACIÓN NATURAL EN
Tigridia pavonia
VAR. PENÉLOPE

AUTORES: ARROYO MARTÍNEZ HUGO ABELARDO, ARZATE FERNÁNDEZ AMAURY MARTÍN, BARBA GONZÁLEZ RODRIGO, PIÑA ESCUTIA JOSÉ LUIS*.

Para su evaluación, el manuscrito con clave: **R2020026** será enviado a dos revisores técnicos y a un editor, cuyo dictamen se hará de su conocimiento tan pronto esté disponible.

Para facilitar la comunicación del caso, le agradeceré que en toda correspondencia relacionada con este manuscrito anote la clave asignada. En adición, es necesario que oportunamente nos avise de cualquier cambio de domicilio y que nos proporcione su número telefónico, y correo electrónico.

Sin otro particular por el momento, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Amalio Santacruz Varela
Director

ASV*gdr

Ubicación: Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco. Edif. "Hernández Xolocotzi", Ofna. 319-3er Piso, 56230, Chapingo, Edo. de México. Dirección Postal: Apdo Postal No. 21, 56230, Chapingo, Edo. de México. Tel: 01 (595) 952-1729 y 595 - 952-1500 ext. 1729 y 5795.

Desde la Ciudad de México al Tel. 01 (55) 5533-1108 ext. 1729 ó 5795. E-mail: revfitotecniamex@gmail.com Portal: <http://www.revistafitotecniamexicana.org>

**ANÁLISIS DE GISH Y RAPD REVELAN HIBRIDACIÓN NATURAL EN *Tigridia pavonia*
VAR. ‘PENÉLOPE’**
***GISH AND RAPD ANALYSIS REVEALS NATURAL HYBRIDIZATION IN *Tigridia pavonia*
VAR. ‘PENÉLOPE’***

Arroyo-Martínez Hugo Abelardo¹, Arzate-Fernández Amaury Martín¹, Barba-González Rodrigo²,
Piña-Escutia José Luis*¹

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, Km 11.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, 50200, Toluca, Estado de México, México ²Centro 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

*Autor para correspondencia: José Luis Piña Escutia (jpginae@uaemex.mx)

ANÁLISIS DE GISH Y RAPD REVELAN HIBRIDACIÓN NATURAL EN *Tigridia pavonia* VAR. ‘PENÉLOPE’

GISH AND RAPD ANALYSIS REVEALS NATURAL HYBRIDIZATION IN *Tigridia pavonia* VAR. ‘PENÉLOPE’

Arroyo-Martínez Hugo Abelardo¹, Arzate-Fernández Amaury Martín¹, Barba-González Rodrigo², Piña-Escutia José Luis*¹

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, Km 11.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, 50200, Toluca, Estado de México, México ²Centro 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

*Autor para correspondencia: José Luis Piña Escutia (jlpin@uaemex.mx)

RESUMEN

El mejoramiento de los recursos fitogenéticos depende de un programa continuo de cruzamientos entre parientes, por lo que la comprensión de las relaciones genéticas entre las especies resulta importante para su conservación y mantenimiento. *Tigridia pavonia* var. ‘Penélope’ se considera un híbrido natural entre las variedades ‘Trinidad’ y ‘Dulce’, sin embargo hasta el momento no existen estudios específicos que lo corroboren. En esta investigación se caracterizaron los patrones genéticos de las variedades ‘Dulce’, ‘Trinidad’, y ‘Penélope’, a través de marcadores moleculares y técnicas citogenéticas, para determinar el posible origen híbrido de ‘Penélope’. Los resultados mostraron por vez primera la hibridación del genoma de las variedades ‘Trinidad’ y ‘Dulce’ en los cromosomas de la variedad ‘Penélope’. Así mismo, con el uso de marcadores RAPD se logró visualizar bandas comunes entre las tres variedades analizadas, lo que sugiere que ‘Dulce’ y ‘Trinidad’ pueden ser progenitores de ‘Penélope’.

Palabras clave: *Tigridia pavonia*, híbrido natural, GISH, RAPD, cromosomas B.

SUMMARY

The improvement of the phylogenetic resources depends of a continuous program of crosses between relatives, so the understanding of genetic relationships between species it is important for its conservation and maintenance. *Tigridia pavonia* var. ‘Penélope’ it’s

considered to be a natural hybrid between the ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ varieties, however, until now there are no specific studies to corroborate it. In this investigation it has been characterized the genetic patrons of the ‘Dulce’, ‘Trinidad’ and ‘Penélope’ varieties, through molecular markers and cytogenetic techniques to determinate the possible hybrid origin of ‘Penélope’. The results show for the first time the hybridization of the ‘Trinidad’ and ‘Dulce’ varieties genome in the chromosomes of the ‘Penélope’ variety. Likewise, with the use of the RAPD markers, it was possible to visualize common bands between the three analyzed varieties, which suggests that ‘Dulce’ and ‘Trinidad’ may be the progenitors of ‘Penélope’.

Key words: *Tigridia pavonia*, natural hybrid, GISH, RAPD, B chromosome.

INTRODUCCIÓN

Tigridia pavonia L.f. (D.C.) es una planta silvestre con uso ornamental, alimenticio y medicinal (Munguia-Lino *et al.*, 2017; Torres-Méndez *et al.*, 2019), de la cual se conocen hasta el momento nueve variedades botánicas (SNICS, 2018). Entre ellas, se considera que ‘Penélope’ podría ser un híbrido natural, resultado de la cruce entre las variedades ‘Dulce’ y ‘Trinidad’, variedades con las que comparte la misma zona geográfica, así como, valores intermedios de fertilidad, tamaño de flor, y color (Piña-Escutia *et al.*, 2010a; Vázquez-García *et al.*, 2001b).

Al respecto, Arroyo-Martínez *et al.* (2017) reportaron la presencia de tres cromosomas B en la variedad ‘Dulce’, donde interesantemente, el mismo número de cromosomas B también se observó en ‘Penélope’, esta característica, así como su número cromosómico de $2n = 28$ y fórmula cariotípica de $26m + 2sm + 3B$, resultan iguales en ambas variedades, lo que aunado al hecho de que, ‘Penélope’ presenta un mismo sitio de hibridación de los genes 5s y 45s rDNA que la variedad ‘Trinidad’, denotaron su estrecha relación entre estas tres variedades (Arroyo-Martínez *et al.*, 2019 en prensa). A pesar de ello, hasta ahora no existen estudios específicos que puedan confirmar que ‘Penélope’ es realmente un híbrido entre las variedades ‘Trinidad’ y ‘Dulce’. En este sentido, el uso de marcadores moleculares para la detección de híbridos es una técnica versátil que permite el análisis de un gran número de muestras, en función del polimorfismo presente entre las secuencias de nucleótidos de diferentes

individuos. Esto permite su aplicación en diversos trabajos como pruebas de paternidad, análisis de híbridos, determinación de la diversidad genética, entre otros (Adhikari *et al.*, 2017; Nadeem *et al.*, 2017; Dhutmal *et al.*, 2018).

Los marcadores RAPD han sido ampliamente utilizados para el análisis de híbridos de *Gossypium* spp (Dongre *et al.*, 2012), *Helianthus annuus* (Bhosle *et al.*, 2015), *Capsicum annuum* (Pujuar *et al.*, 2017) entre otros. Esto se debe a que utilizan iniciadores cortos y aleatorios, lo que les permite unirse a diferentes regiones del DNA, presentando una gran abundancia genómica, además de no ser necesario el conocimiento previo del propio DNA (Kesawat & Das 2009; Kumar *et al.*, 2014; Adhikari *et al.*, 2017; Garrido-Cárdenas *et al.*, 2017)

Aunado a lo anterior, el uso de técnicas citogenéticas moleculares como la técnica de GISH (Genomic *In Situ* Hybridization) fortalece los resultados obtenidos con marcadores moleculares. En esta metodología, se utiliza como sonda el DNA genómico total de las especies analizadas, lo que permite el marcaje total del genoma objetivo, facilitando la investigación de relaciones evolutivas, identificación de regiones específicas, estudios de organización y homología cromosómica, identificación y diferenciación de cromosomas de progenitores en híbridos, entre otros (Silva & Souza, 2013; Ramzan *et al.*, 2017).

El mejoramiento de los recursos fitogenéticos depende de un programa continuo de cruzamientos entre parientes silvestres y/o variedades tradicionales, así como del uso de modernas técnicas de reproducción. Por lo cual, la comprensión de la base molecular en las plantas es crucial para la conservación efectiva, manejo, selección, y utilización de variedades con mejores características comerciales (Mondini *et al.*, 2009).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar los patrones genéticos de las variedades ‘Dulce’, ‘Trinidad’, y ‘Penélope’, a través de marcadores moleculares y técnicas citogenéticas, y determinar el posible origen híbrido de ‘Penélope’.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron bulbos de las variedades ‘Dulce’, ‘Trinidad’ y ‘Penélope’ de *Tigridia pavonia*, los cuales fueron establecidos en macetas con un sustrato compuesto por tierra de monte, arena y estiércol vacuno (proporción 1:1:1), y mantenidos en un invernadero tipo rústico de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMex.

Cuando las plantas tuvieron una altura de 5 cm, se colectaron meristemos radiculares de la variedad ‘Penélope’ para la elaboración de preparaciones cromosómicas. Así mismo, para la obtención de DNA genómico se colectó tejido foliar de las tres variedades.

Elaboración de preparaciones cromosómicas

La preparación de laminillas se realizó de acuerdo con la metodología empleada por Barba-González *et al.* (2005) con algunos cambios, a saber: se colectaron meristemos radiculares de la variedad ‘Penélope’ y fueron colocados en una solución de 8-hidroxiquinoleína 0.002 M por 6 h a 4° C en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se fijaron en solución Farmer por 24 h; y luego fueron tratados con una mezcla de enzimas a una concentración final de 1% (Celulasa, Pectoliasa, Citohelicasa) en buffer citrato pH 4.5 por 2 h a 37°C, una vez terminada la digestión enzimática el meristemo se colocó en porta objetos y se añadió una gota de aceto orceína (1%).

Después de colocar el cubre objetos, se disgregó el tejido y se procedió a dejar las células en un solo plano por el método de squash, las preparaciones se hicieron permanentes por el método de nitrógeno líquido. Las preparaciones se analizaron con un microscopio de contraste de fases marca Olympus.

Extracción de DNA

El DNA genómico fue aislado a partir de un gramo de tejido foliar de las variedades ‘Trinidad’ y ‘Dulce’, siguiendo el protocolo usado por Barba-Gonzales (2005).

Preparación del DNA sonda y de bloqueo

El DNA genómico de ambas variedades fue fragmentado utilizando un ultrasonificador marca SONICS modelo VCX 130. Para el DNA sonda se utilizó el DNA genómico de la variedad ‘Trinidad’, el cual fue sonicado por cinco segundos a 20 % de amplitud para obtener un rango

de tamaño de 100 – 500 pb. Para el DNA de bloqueo se utilizó el DNA genómico de la variedad ‘Dulce’, sonificado por 45 segundos a 30 % de amplitud para obtener un rango de tamaño de 1-10 kb. El DNA fragmentado se marcó con Fluorescein-12-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Germany) y Tetramethyl-Rhodamine-5-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Germany) respectivamente, mediante Nick Translation Mix, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Germany)

Análisis GISH

La hibridación con las sondas se realizó incubando diez preparaciones cromosómicas (laminillas) de diferentes individuos, en RNAsa (100 µg/mL) por 1 h, y pepsina (5 µg/mL) por 10 min a 37° C, y posteriormente, en paraformaldehído (4%) por 10 min a temperatura ambiente; enseguida fueron deshidratados con etanol al 70%, 90% y 100% por 3 min cada uno, y secados al aire. La hibridación continuó usando una mezcla de 20X SSC, formamida 50%, dextran sulfato sódico 10%, SDS 10%, y de 25-50 ng/mL de cada sonda. El DNA se desnaturalizó calentando la mezcla de hibridación a 70°C por 10 min y colocándola en hielo por al menos 10 min. Para cada laminilla, se usaron 80 µL de la mezcla de hibridación.

Las laminillas fueron desnaturalizadas a 80°C por 10 min y luego se hibridaron durante toda la noche a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente, las laminillas se lavaron a temperatura ambiente en 2x SSC por 15 min y 0.1x SSC a 42° por 30 min. Los cromosomas fueron contrateñidos con 1 µL/mL de DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole), se añadió una gota de Vectashield antifade (Vector Laboratories) antes de examinar las laminillas bajo un microscopio Leica DM3000 (Leica Microsystems, Germany) equipado con iluminación epifluorescente y acoplado a una cámara Leica DF200 (Media-Cybernetics, USA).

Amplificación por PCR y electroforesis de DNA

Para la amplificación de fragmentos de DNA se utilizaron cinco de los iniciadores tipo RAPD reportados por Piña-Escutia *et al.* (2010), que presentaron un mayor número de fragmentos amplificados y de polimorfismo. La mezcla de PCR se preparó en un volumen de reacción de 10 µL que contenían 2 µL de buffer de reacción My Taq 5X (MgCl₂ 15 mM y dNTPs 15 mM) (Bioline™), 0.2 µL iniciador (20 µM) (Invitrogen™) y 1 µL de DNA (10 ng). Los ciclos de amplificación de los iniciadores fueron los reportados por los mismos autores.

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®) modelo Hamburg 22331-246227. La separación de los fragmentos se llevó a cabo en cámaras de electroforesis horizontal (Easycast™), con geles de agarosa tipo II (Sigma®) al 2 %, a los cuales se agregaron 3 µL de bromuro de etidio (Sigma™). Las muestras se corrieron a 80 V y 120 mA durante 80 min, y los fragmentos de DNA amplificados fueron visualizados usando un transiluminador UV BioDoc-It System Imaging (UVP™).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis GISH

En esta investigación se logró la hibridación del genoma de las variedades ‘Trinidad’ (Tinción verde) y ‘Dulce’ (Tinción roja), con el de ‘Penélope’, aunque ésta no fue distintiva en todos los cromosomas A (Figura 1a). Esto podría indicar la alta similitud genética entre los dos presuntos progenitores, donde dicha similitud entre ‘Trinidad’ y ‘Penélope’, pudo favorecer su cruzamiento, como explica Carlson *et al.* (2013) “la similaridad genética entre el progenitor masculino y femenino, ha sido usado como un parámetro para predecir el éxito reproductivo”.

Aunado a lo anterior, si bien con la técnica de GISH se obtienen mejores resultados cuando los genomas de las especies parentales están bien diferenciados, esta técnica resulta menos informativa si los genomas son menos diferenciados (Haider Ali *et al.*, 2002), como se observó en el presente estudio. Aunque la hibridación no fue distintiva cuando los cromosomas se encontraron en metafase mitótica, al analizarlos en profase, se pudo observar algunas regiones con mayor tinción por uno u otro genoma, identificando un mayor número de regiones del genoma de ‘Dulce’ (Tinción roja), lo cual pudo ocurrir a casusa de que en dichas regiones existe una mayor homología con dicho genoma (Figura 1b).

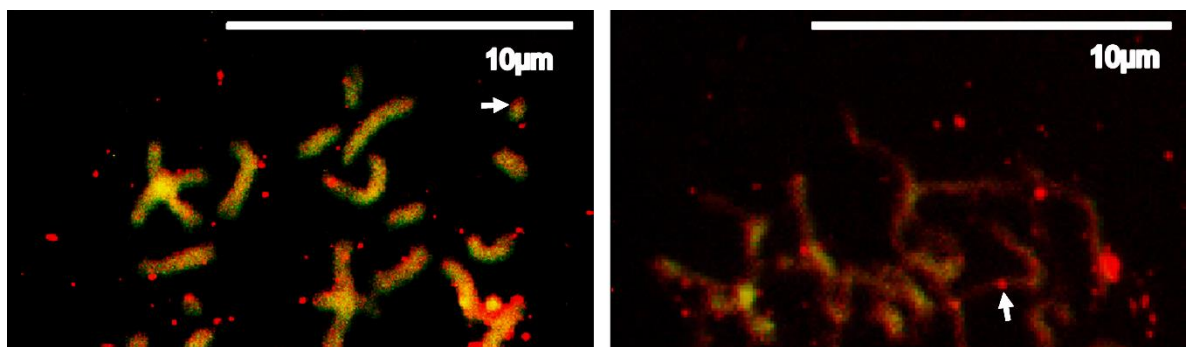


Figura 18. Análisis GISH (Genomic *In Situ* Hybridization) de cromosomas mitóticos en *Tigridia pavonia* var. ‘Penélope’. a) Cromosomas en metafase, las flechas apuntan a las regiones marcadas solo por el genoma de ‘Dulce’ (Tinción roja) en los cromosomas B. b) Cromosomas en profase, las flechas indican regiones de mayor hibridación por el genoma de Trinidad (Tinción verde) o ‘Dulce’ (Tinción roja).

En cuanto a la hibridación en los tres cromosomas B, ésta tampoco fue en su mayoría distintiva. Esto puede indicar una alta homología entre las secuencias de DNA de los cromosomas A con las secuencias de los cromosomas B, como ha sido reportado en especies como: *Brachycome* (Leach *et al.*, 2004), *Hypsiboas albopunctatusque* (Gruber *et al.*, 2014), *Zea mays* (Huang *et al.*, 2016), y *Cestrum strigilatum* (Laforga Vanzela *et al.* 2017), donde la baja diferenciación entre los genomas de los progenitores, que como previamente se discutió, pudo favorecer este resultado.

Aunado a lo anterior, los cromosomas B de ‘Penélope’ presentaron una región que únicamente mostró hibridación con el genoma de ‘Dulce’ (Tinción roja) (Figura 1a), variedad en la que se reportó por vez primera la presencia de cromosomas B en la especie (Arroyo-Martínez *et al.*, 2017).

Esto podría sugerir que tanto ‘Dulce’ es el progenitor que hereda estos cromosomas B en ‘Penélope’, como que los cromosomas B de ‘Dulce’ pueden presentar secuencias específicas, que debido a que ‘Dulce’ es el progenitor que los transmite, es de esperar que una región de los cromosomas B de ‘Penélope’, solo sea hibridada por el genoma de ‘Dulce’. Resultados similares obtuvieron Kousaka y Endo (2012) donde para identificar cromosomas B de *Secale cereale*, en híbridos de *Triticum aestivum* x *Aegilops variabilis* que los contenían, utilizaron la técnica de GISH con el DNA genómico de *Secale cereale* como sonda, identificando así los cromosomas B por una región hibridada solo en los cromosomas B. Aunado a lo anterior

se ha reportado en especies como *Zea mays* (Ya-Ming and Bor-Yaw, 2003), *Secale cereale* (Hong *et al.*, 2008), entre otras, la presencia de secuencias específicas de cromosomas B, por lo que la presencia de secuencias específicas en los cromosomas B de *Tigridia pavonia* var. ‘Dulce’ podría ser muy viable. En este sentido si se considera que los cromosomas B pueden; a) afectar la fertilidad de los organismos que los presentan (Douglas & Birchler, 2017), b) impactar la transcripción de los genes del genoma A (Huang *et al.*, 2016), o c) alterar la frecuencia de formación de quiasmas (Harper *et al.*, 2018), son necesarios entonces estudios de aislamiento de cromosomas y análisis de secuencias, que permitan dilucidar la importancia de éste tipo de cromosomas, en las variedades evaluadas, y aún más, pueden ser la base para diseñar estrategias de mejoramiento en la especie.

Análisis con marcadores genéticos

Previamente, con el uso de marcadores RAPD se demostró que las variedades ‘Trinidad’, ‘Penélope’ y ‘Dulce’ mantienen una estrecha relación genética (Piña-Escutia *et al* 2010ab). En la presente investigación al realizar el análisis genético con marcadores RAPD, donde a pesar de la selección de aquellos marcadores que habían reportado una mayor amplificación de fragmentos, solo dos de ellos permitieron observar bandas suficientes para su análisis, y que así mismo presentaran bandas comunes entre ‘Penélope’, y sus posibles progenitores (‘Dulce’ y ‘Trinidad’). El iniciador Y38 amplificó 8 bandas con rango de peso de peso de entre 400 a 3000 pb, de las cuales una fue específica para ‘Penélope’, una fue común entre ‘Penélope’ y ‘Trinidad’, y el resto fueron monomórficas, lo cual confirma la similitud genética observada en el análisis GISH. Por su parte el iniciador Y41 amplificó un total de 7 bandas con rango de peso de 150 a 2000 pb, de las cuales 3 fueron específicas de ‘Trinidad’, una fue compartida entre ‘Trinidad’ y ‘Penélope’, una fue compartida por ‘Penélope’ y ‘Dulce’, y una fue monomórfica.

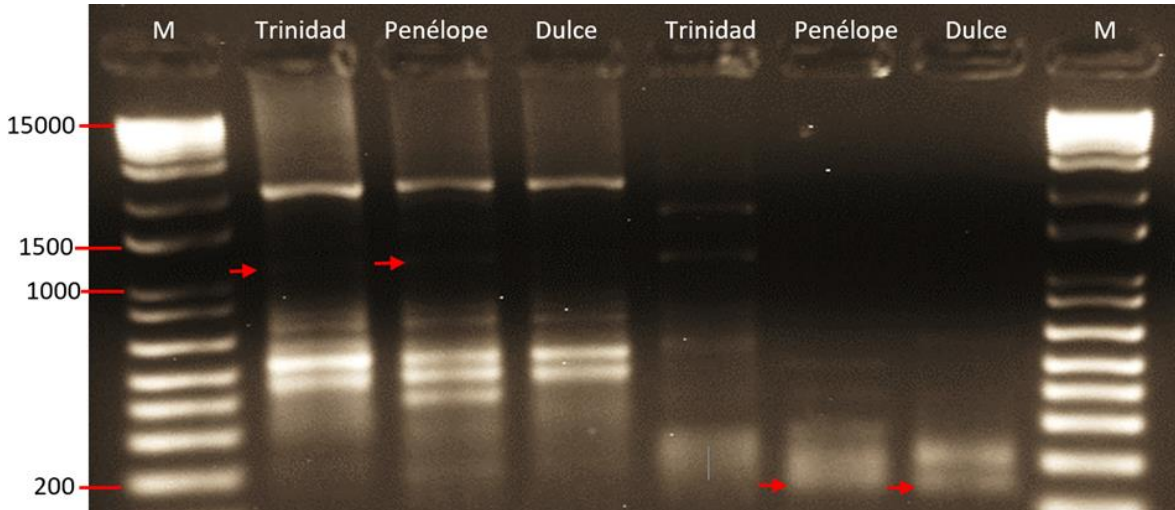


Figura 2. Perfil electroforético de marcadores RAPD en las variedades ‘Trinidad’, ‘Penélope’ y ‘Dulce’ de *Tigridia pavonia*. M = Marcador escalera.

Considerando los patrones genéticos indicados, podemos inferir que dentro del proceso evolutivo de *T. pavonia*, la alogamia, y el origen geográfico en común de las variedades ‘Dulce’ y ‘Trinidad’ (Piña-Escutia *et al.*, 2010a), favorecieron un mayor flujo genético entre ellas, lo que eventualmente, derivó en el origen de la variedad ‘Penélope’. Nuestros resultados son similares a los reportados por Ysbelia y Raymúndez (2017) en *Aloe x spinosissima* y Turchetto *et al.* (2015) en *Petunia*, donde los progenitores compartían la misma área geográfica de desarrollo, factor que favorece el flujo genético (Ohsawa y Ide 2007; Twyford y Ennos 2012).

Del mismo modo, la visualización de bandas comunes entre las tres variedades analizadas con marcadores RAPD sugiere que ‘Dulce’ y ‘Trinidad’ pueden ser progenitores de ‘Penélope’. Este tipo de marcadores también han sido útiles para la identificación de híbridos de *Gossypium* (Dongre *et al.*, 2011), *Helianthus annuus* (Bhosle *et al.*, 2015), y *Capsicum annuum* (Pujar *et al.*, 2017), entre otros, lo que fortalece su efectividad.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se observó por vez primera la hibridación del genoma de las variedades ‘Trinidad’ y ‘Dulce’ en los cromosomas de la variedad ‘Penélope’.

Así mismo, con el uso de marcadores RAPD se logró visualizar bandas que comparten las tres variedades analizadas, lo que sugiere que ‘Dulce’ y ‘Trinidad’ pueden ser progenitores de ‘Penélope’.

BIBLIOGRAFÍA

Arroyo-Martínez H. A., A. M. Arzate-Fernández, R. Barba-González and J. L. Piña-Escutia. 2020. Cytogenetic relationships in three varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. En prensa.

Adhikari S., S. Saha, A. Biswas, T. S. Rana, T. K. Bandyopadhyay and P. Ghosh. 2017. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *Nucleus*, 60 (3): 283 – 297 pp. DOI: 10.1007/s13237-017-0214-7.

Barba-González, R., M. S. Ramanna, R. G. F. Visser, and J. M. Van Tuyl. 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 pp. DOI: 10.1139/g05-057.

Bhosle S. M., R. L. Chavhan, V. R. Hinge and M. K. Ghodke. 2015. Molecular fingerprinting and assessment of genetic purity of sunflower (*Helianthus annuus l.*) hybrids by using RAPD and SSR markers. *The Bioscan*, 10 (2): 773 – 779 pp.

Carlson A. L., H. Gong, C. Toomajian and R. Swanson. 2013. Parental genetic distance and patterns in nonrandom mating and seed yield in predominately selfing *Arabidopsis thaliana*. *Plant Reprod*, 26 (4):317 – 328 pp. DOI: 10.1007/s00497-013-0228-5.

Dongre A. B., M. P. Raut, V. M. Paikrao and S. S. Pande. 2012. Genetic purity testing of cotton F1 hybrid DHH-11 and parents revealed by molecular markers. *International Research Journal of Biotechnology*, 3 (3): 32 – 36 pp.

Douglas R. N., and J. A. Birchler. 2017. B Chromosomes. In: *Chromosome Structure and Aberrations*. T. A. Bhat and A. A. Wani (eds.). Springer editorial, India, 13 – 39 pp. DOI: 10.1007/978-81-322-3673-3.

Dhutmal R. R., A. G. Mundhe and A. W. More. 2018. Molecular marker techniques: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Special Issue 6: 816 - 825 pp.

Garrido-Cardenas J. A., C. Mesa-Valle and F. Manzano-Agugliaro. 2017. Trends in plant research using molecular markers. *Planta*, 247 (3): 543 – 557 pp. DOI: 10.1007/s00425-017-2829-y.

Gruber S. L., D. Diniz, P. E. Sobrinho-Scudeler, F. Foresti, C. F. D. Haddad and S. Kasahara. 2014. Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridization. *Comparative Cytogenetic*, 8(3): 185 – 197 pp. DOI: 10.3897/CompCytogen.v8i3.7771.

Haider Ali S. N., M. S. Ramanna, E. Jacobsen and R. G. F. Visser. 2002. Genome differentiation between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* as revealed by Genomic *In Situ* Hybridization. *Euphytica*, 127 (2): 227 – 234 pp. DOI: 10.1023/A:1020282311843.

Harper J., D. Phillips, A. Thomas, D. Gasior, C. Evans, W. Powell, J. King, I. King, G. Jenkins and I. Armstead. 2017. B chromosomes are associated with redistribution of genetic recombination towards lower recombination chromosomal regions in perennial ryegrass. *Journal of Experimental Botany*, 69(8): 11 pp. DOI: 10.1093/jxb/ery052.

Hong L., Q. Zhong-Xia, S. Xiao-Ming, Ch. Cheng-Bin, L. Xiu-Lan, S. Wen-Qin and Ch. Rui-Yang. 2008. Characters of DNA constitution in the Rye B chromosome. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (2): 183 – 189. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00588.x.

Huang W., Y. Du, X. Zhao and W. Jin. 2016. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology*, 16: 14 pp. 10.1186/s12870-016-0775-7.

Kesawat1 S. and B. K. Das. 2009. Molecular markers: it's application in crop improvement. *J. Crop Sci. Biotech*, 12 (4): 169 – 181pp. DOI: 10.1007/s12892-009-0124-6.

- Kousaka R. and T. R. Endo. 2012. Effect of a rye B chromosome and its segments on homoeologous pairing in hybrids between common wheat and *Aegilops variabilis*. *Genes Genet. Syst.*, 87(1): 1 – 7 pp. DOI: 10.1266/ggs.87.1.
- Kumar V., S. K. Rajvanshi and R. K. Yadav. 2014. Potential application of molecular markers in improvement of vegetable crops. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 15 (4): 690 – 707 pp.
- Laforga Vanzela A. L., A. Alves de Paula, C. C. Quintas, T. Fernandes, B. J. Neres da Cruz and T. Boldieri de Souza. 2017. *Cestrum strigilatum* (Ruiz & Pavón, 1799) B chromosome shares repetitive DNA sequences with A chromosomes of different *Cestrum* (Linnaeus, 1753) species. *Comparative Cytogenetics*, 11(3): 511 – 524 pp. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i3.13418>.
- Leach C. R., A. Houben and J. N. Timmissa. 2004. The B chromosomes in *Brachycome*. *Cytogenet Genome Res*, 106: 199 – 209 pp. DOI: 10.1159/000079288.
- Mondini L., A. Noorani and M. A. Pagnotta. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1): 19 - 35 pp. DOI:10.3390/d1010019.
- Munguía-Lino G., O. Vargas-Ponce and A. Rodríguez. 2017. Tigridieae (Iridaceae) in North America: floral diversity, flower preservation methods and keys for the identification of genera and species. *Botanical Sciences*, 95 (3): 473 pp. DOI: 10.17129/botsci.727.
- Nadeem M. A., M. A. Nawaz, M. Q. Shahid, Y. Dogan, G. Comertpay, M. Yıldız, R. Hatipoglu, F. Ahmad, A. Alsaleh, N. Labhane, H. Ozkan, G. Chung and F. S. Baloch. 2017. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & biotechnological equipment*, 32 (2): 25 pp. DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401.
- Ohsawa T., and Y. Ide. 2008. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecol. Biogeography*, 17(2): 152 – 163 pp. DOI: 10.1111/j.1466-8238.2007.00357.x.

Piña-Escutia J. L., C. Vences-Contreras, M. G. Gutiérrez-Martínez, L. M. Vázquez-García and A. M. Arzate-Fernández. 2010a. Morphological and molecular characterization of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia*. 44 (2): 147 – 158 pp.

Piña-Escutia J. L., L. M. Vázquez-García and A. M. Arzate-Fernández. 2010b. Variety discrimination of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. assessed by different length RAPD primers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13 (4): 10 – 11 pp. DOI: 10.2225/vol13-issue4-fulltext-7.

Pujar U. U., S. Tirakannavar, R. C. Jagadeesha and N. Sandhyarani. 2017. Hybrid purity testing of chilli hybrid (Pusa Jwala × Arka Lohit) through RAPD and ISSR molecular markers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (11): 2079 – 2086 pp. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.611.245>.

Ramzan R., A. Younis and K. B. Lim. 2017. Application of Genomic *In Situ* Hybridization in horticultural science. *International Journal of Genomics*, 2017: 12 pp. DOI: 10.1155/2017/7561909.

Silva G. S. and M. M. Souza. 2013. Genomic *In Situ* Hybridization in plants. *Genet. Mol. Res*, 12 (3): 2953 – 2965 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2013.August.12.11>.

Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). 2018. Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Núm. 17. México.

Torres-Méndez S. A., L. Caso-Barrera y M. M. Aliphath-Fernández. 2019. Conocimiento ecológico, alimentación tradicional y clasificación frío caliente: la perspectiva de los niños tseltales de Tenejapa, Chiapas. *LiminaR. Estudios Sociales y Humanísticos*, 17(2): 148 – 166 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.29043/liminar.v17i2.673>.

Turchetto C., A. L. A. Segatto, J. Beduschi, S. L. Bonatto and L. B. Freitas. 2015. Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB PLANTS*, 7: 1 – 12 pp. plv084. DOI: 10.1093/aobpla/plv084.

Twyford A. D. and R. A. Ennos. 2012. Next-generation hybridization and introgression. *Heredity*, 108(3): 179 – 189 pp. DOI: 10.1038/hdy.2011.68.

Vázquez-García L. M., A. A. Przybyla, T. E. De la Cruz, H. Torres Navarro and G. Rodríguez. 2001b. Morphological description of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L. F.) Ker. Gawl J Appl Bot. 75:14 – 19 pp.

Ya-Ming Ch. and L. Bor-Yaw. 2003. Cloning and Characterization of Maize B Chromosome Sequences Derived From Microdissection. Genetics Society of America. 164(1): 299 – 310 pp.

Ysbelia S. G. y M. B. Raymúndez. 2017. Análisis del cariotipo del híbrido natural *Aloe x spinosissima* y de sus parentales *Aloe arborescens* y *Aloe humilis*, mediante bandeo cromosómico C, CMA y DAPI. Rodriguésia, 68(4): 1263 – 1272 pp. DOI: 10.1590/2175-7860201768410.

7.3 Reporte: Microdissección y painting de cromosomas B en *Tigridia pavonia* (L.f.) DC.

INTRODUCCIÓN

Los cromosomas B, son cromosomas extra-numéricos no esenciales para el desarrollo normal del individuo, a pesar de lo anterior se han reportado aspectos relacionados con su presencia, como la disminución de fertilidad en los individuos que los poseen (dependiendo en gran medida del número de cromosomas B presentes en el organismo); alteración del porcentaje de recombinación; y alteración de la transcripción de genes de los cromosomas A (Randolph, 1941; Kouska and Endo, 2012; Huang et al., 2016, Douglas and Birchler, 2017), es por ello que su análisis es de gran importancia, y más aún en especies donde se desconoce el efecto que estos puedan generar, como es el caso de *Tigridia pavonia*, que es una especie con importancia, histórica, alimenticia, y principalmente ornamental (Carrillo-Ocampo y Engleman, 2002; Botina-Galeano, 2008; Vázquez-García, 2011; Munguía-Lino et al., 2015; Leonel y Luna-Cabrera, 2017).

Tigridia pavonia (L.f.) DC (Iridaceae) es una especie nativa de América, siendo México considerado el centro de diversidad genética de esta especie (Piña-Escutia *et al.*, 2010), de la cual se sabe que al menos dos de las nueve variedades vegetales reportadas hasta el momento, presenta en su cariotipo tres cromosomas B (Arroyo-Martínez et al., 2018 y 2020). A pesar de ello, mucho se desconoce sobre la composición genética de estos, y sobre todo el efecto que pudieran tener en las variedades que los poseen.

En este sentido la microdissección y microclonación, en conjunto con técnicas moleculares como la hibridación in situ, se ha vuelto un método directo y eficiente para las investigaciones genómicas, esto debido a que permite el aislamiento de cromosomas específicos y/o secciones específicas de cromosomas, donde el DNA aislado puede ser utilizado para mapeo de ligamiento genético y construcción de un mapeo físico; generación de sondas para el marcaje cromosómico; y generación de bibliotecas de secuencias de expresión de cromosomas específicos (Zhang et al., 2016). Por ello esta técnica ha permitido la

caracterización molecular de cromosomas de especies de gran importancia como *Zea mays* (Cheng and Lin, 2003), o *Secale cereale* (Long et al., 2008).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue analizar las secuencias obtenidas de la microdissección y microclonación de cromosomas B de *T. pavonia* variedad ‘Dulce’ mediante la técnica de Hibridación In Situ.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se utilizaron bulbos de *Tigridia pavonia* var. ‘Dulce’, los cuales fueron establecidos en macetas con un sustrato compuesto por tierra de monte, arena y estiércol vacuno (proporción 1:1:1), y mantenidos en un invernadero tipo rústico de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMex. Los bulbos fueron donados por el Centro de Conservación de Especies Silvestres del Centro Universitario Tenancingo, de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

Para la elaboración de preparaciones cromosómicas, una vez emergidas las primeras raíces se colectaron meristemos radiculares no mayores a 3 cm de longitud.

Elaboración de preparaciones cromosómicas

La preparación de laminillas se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Rodríguez-Domínguez, et al. (2017), como a continuación se describe: Una vez colectados los meristemos radiculares fueron colocados en una solución de 8-hidroxiquinoleína 0.002 M por 6 h a 4° C en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se fijaron en solución Farmer por 24 h; y luego fueron tratados en un tubo de 1ml, con una mezcla de enzimas a una concentración final de 0.2% (Celulasa, Pectoliasa, Citohehlicasa) en buffer citrato pH 4.5 por

4 h a 37°C, una vez terminada la digestión enzimática, se elaboró la suspensión celular de los meristemas con el uso de un vortex. Se agregaron 600 µl de agua mQ y se mezcló, posteriormente la suspensión celular se centrifugó a 6150 x g durante 45 s., se removió el sobrenadante y se agregaron 600 µl de metanol, mezclando brevemente, se centrifugó a 7440 x g durante 30 s., y se descartó el sobrenadante.

El pellet obtenido se resuspendió en 20 - 100 µl metanol dependiendo de la concentración celular y se almacenó a -20°C. Una vez obtenida la suspensión celular, en una cámara de extracción, se agregaron 7-10 µl de la suspensión celular en una laminilla inclinada en un ángulo aproximado de 45° y embebida con una ligera capa de ácido acético puro, inmediatamente se agregaron dos gotas (100 µl) de ácido acético puro hasta que la superficie se torne granulada, las laminillas se colocaron boca abajo en el vapor de un equipo de baño maría a 55° durante 3-5 s., y se agregó una gota (50 µl) de ácido acético glacial puro, por último las laminillas se deshidrataron a temperatura ambiente, y se analizaron.

Microdissección y microclonación de cromosomas B

Para la microdissección y microclonación de cromosomas B se siguió la metodología propuesta por Hening (2008) y Zhang *et al.* (2016), para lo cual, la extracción de los cromosomas B se realizó por medio de micro agujas, bajo un microscopio invertido marca OLYMPUS (ULWCD 0.30), equipado con un micromanipulador marca NARISHIGE. Una vez microdisectados los cromosomas B la aguja se rompió en un tubo de 200 µl, que contenía 10 µl una mezcla de 19 mg/ml proteinasa K (en 1× Taq DNA polymerase buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl pH 8.3) y se incubaron a 37° C durante 2 h. La inactivación de la proteinasa K se realizó incubando la mezcla con 10 cromosomas B, a 90°C durante 10 min. Posteriormente los cromosomas B se amplificaron mediante el iniciador 6-MW (5'-CCGACTGAGNNNNNNATGTGG-3') de acuerdo al siguiente programa: desnaturalización inicial 94°C por 5 min; preamplificación a 94°C por 1 min, 30°C por 1.5

min (4 ciclos), 72°C por 3 min; Amplificación (24 ciclos); y por ultimo un ciclo de extensión final de 72°C por 10 min.

Para incrementar la cantidad obtenida de DNA, se realizó una segunda amplificación usando 2 µl del producto de la primera amplificación como templado mediante el siguiente programa; Amplificación (24 ciclos) y un ciclo de extensión final de 72°C por 10 min. Los productos de la primera y segunda PCR, se cuantificaron mediante un espectrofotómetro y se analizaron mediante un corrimiento electroforético, en un gel de agarosa al 1%, a 70 volts durante 40 min.

Para la clonación de las secuencias de DNA de los cromosomas B, se utilizó el kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las secuencias de cromosomas B en las colonias de *Escherichia coli* se obtuvieron por medio del kit QIAprep^R Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Análisis de las secuencias de DNA de los cromosomas B mediante Hibridación Fluorescente In Situ (FISH)

La elaboración de las sondas se realizó marcando las secuencias de DNA de los cromosomas B con Fluorescein-12-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Germany), mediante Nick Translation Mix, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

El mapeo físico de las secuencias, se hizo de acuerdo con la metodología usada por Barba-González et al. (2005). La hibridación con las sondas se realizó incubando las preparaciones cromosómicas (lamillas) de meristemos radiculares de *T. pavonia* var. 'Dulce', en RNAsa (100 µg/mL) por 1 h, y pepsina (5 µg/mL) por 10 min a 37° C, y posteriormente, en paraformaldehido (4%) por 10 min a temperatura ambiente; enseguida fueron deshidratados con etanol al 70%, 90% y 100% por 3 min cada uno, y secados al aire. La hibridación continuó usando una mezcla de 20X SSC, formamida 50%, dextrasulfato de sodio 10%, SDS 10%, y de 25-50 ng/mL de cada sonda. El DNA se desnaturalizó calentando la mezcla de hibridación a 70°C por 10 min y colocándola en hielo por al menos 10 min. Para cada laminilla, se usaron 80 µL de la mezcla de hibridación.

Las laminillas fueron desnaturalizadas a 80°C por 10 min y luego se hibridaron durante toda la noche a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente, las laminillas se lavaron a temperatura ambiente en 2x SSC por 15 min y 0.1x SSC a 42° por 30 min. Los cromosomas fueron contrateñidos con 1 µL/mL de DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole), se añadió una gota de Vectashield antifade (Vector Laboratories) antes de examinar las laminillas bajo un microscopio Leica DM3000 (Leica Microsystems, Germany) equipado con iluminación epifluorescente y acoplado a una cámara Leica DF200 (Media-Cybernetics, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de los cromosomas B se realizó en función a su tamaño, siendo estos más pequeños que el resto de los cromosomas A (Figura 1a). El aislamiento de los cromosomas B en metafase mitótica de *T. pavonia* var. 'Dulce' (Figura 1a), se realizó por medio de un micromanipulador.

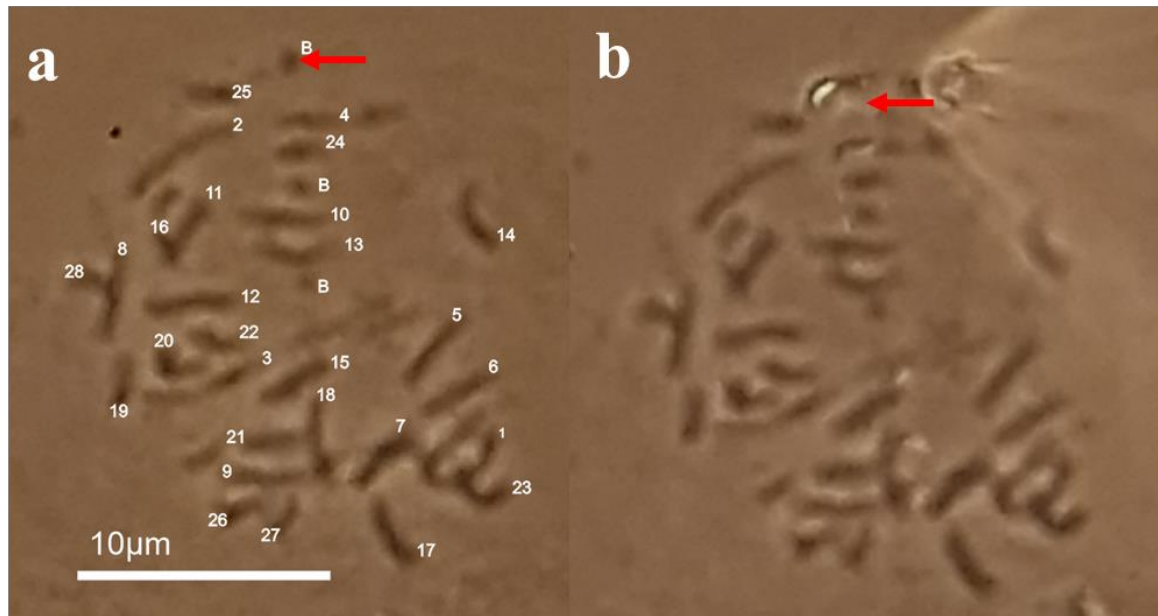


Figura 19. Aislamiento de cromosomas B de *Tigridia pavonia* var. 'Dulce' mediante micromanipulador. a) Identificación de cromosoma B en metafase mitótica. c) Cromosoma B disectado de la preparación cromosómica.

Los cromosomas B microdisectados y amplificados mostraron un producto mayor a las 1500 pb (Figura 1ab), donde si bien el control negativo de ambas amplificaciones, exhibió de igual forma un corrimiento en el carril 2, esto se podría deber a la dimerización de los nucleótidos, o a la amplificación de DNA de una fuente desconocida, como reportan (Cheng and Lin, 2003), quien al amplificar cromosomas B de *Zea mays* con el mismo iniciador (6-MW), observaron de igual forma el corrimiento electroforético de su control negativo, a pesar de ello al realizar los análisis posteriores pudieron corroborar, el éxito de la técnica. Así mismo Long et al. (2008), a pesar de observar la amplificación de su control negativo al microdisectar cromosomas B de *Secale cereale*, lograron obtener resultados favorables en su investigación. Lo anterior indica que la amplificación del control negativo en el proceso de microdissección de cromosomas, no es un indicativo de que el proceso no sea exitoso o de que no se haya realizado de forma correcta.

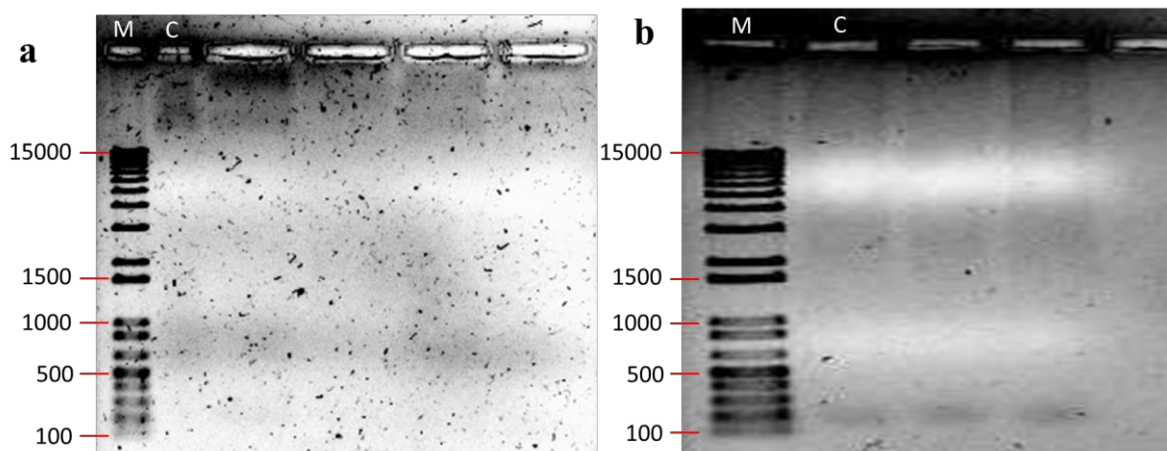


Figura 20. Caracterización de los productos de la primera y segunda amplificación por PCR. a) Corrimiento electroforético de la primera PCR. b) Corrimiento electroforético de la segunda PCR. Línea 1, marcador escalera; Línea 2, control negativo; Líneas 3 y 4, producto de la amplificación de los fragmentos de cromosomas B por PCR.

Mapeo de las secuencias de cromosomas B

En la presente investigación se logro hibridar diferentes secuencias de cromosomas B, en preparación cromosómicas de *T. pavonia* var. ‘Dulce’, observando la presencia de regiones

hibridadas en diferentes cromosomas A (Figura 3), lo cual indica que los cromosomas B están conformados, de secuencias de diversos cromosomas A. Resultados similares han sido observados en análisis citogenéticos con diversas especies con cromosomas B, como: *Brachycome dicromosomatica*, *Zea mays* y *Scale sereale* (Jones et al., 2008).

Así mismo, aunque no se observa la hibridación de estas secuencias en ninguno de los cromosomas B (Figura 3), esto no significa que estas no pertenezcan a ellos, Chen and Lin (2003), observaron resultados similares, al hibridar las secuencias obtenidas de la microdissección de cromosomas B en *Zea mays*. Los autores indican que este efecto se pudo haber generado debido a que estas secuencias no presentaban una cantidad de copias suficientes en los cromosomas B, lo que permitiría una mejor hibridación en ellos. Algo similar podría estar ocurriendo con las secuencias obtenidas de la microdissección de cromosomas B de *T. pavonia*, donde las secuencias seleccionadas podrían no presentar la cantidad de copias necesarias para hibridar en los cromosomas B.

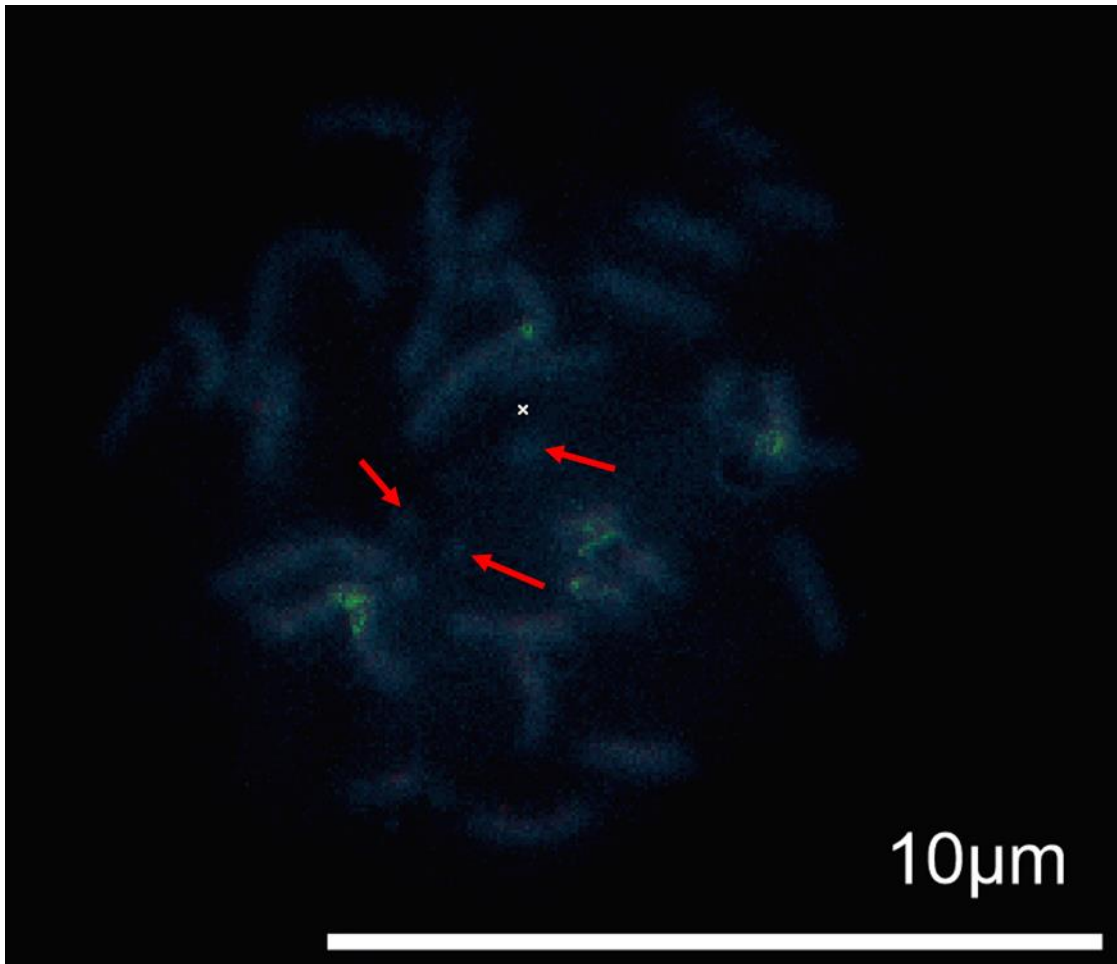


Figura 21. Análisis FISH mostrando regiones específicas hibridadas por las secuencias de los cromosomas B microdisectados. Las flechas marcan los cromosomas B.

Por otro lado, si bien se presentaron secuencias que hibridaron únicamente en regiones específicas de los cromosomas A, de igual forma se presentaron aquellas que hibridaron parcialmente a los cromosomas A y ligeramente a los B (Figura 4), esto se puede deber a que estas secuencias son quizá secuencias altamente repetitivas presentes en diversos cromosomas. Cheng and Lin (2003), observaron resultados similares, donde una de las secuencias obtenidas de la microdissección de cromosomas B de *Zea mays*, hibridó casi en su totalidad en uno de los cromosomas B.

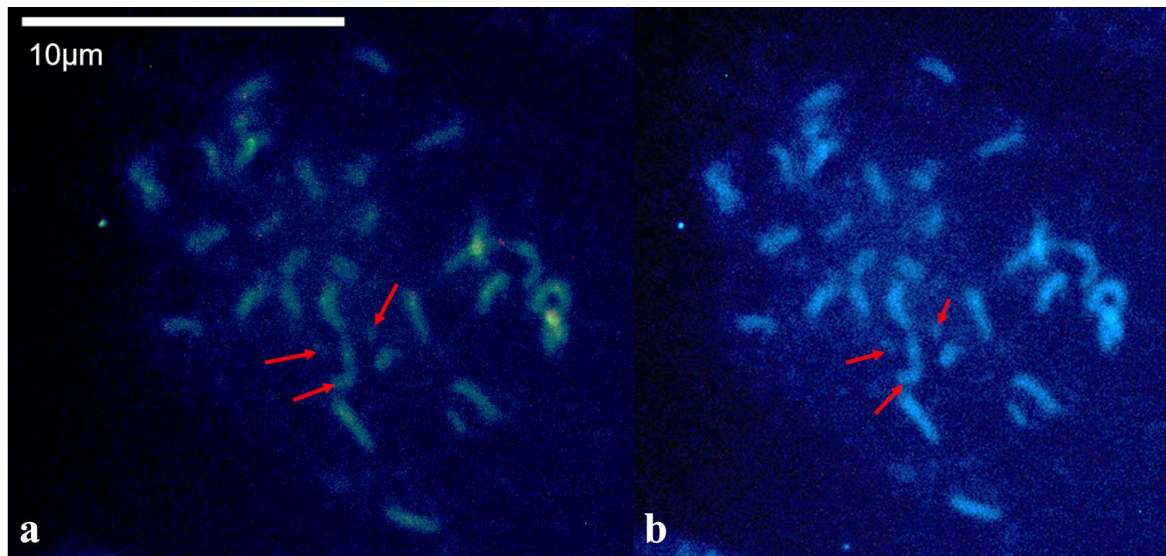


Figura 22. Análisis FISH mostrando una hibridación general de las secuencias de los cromosomas B microdisectados, en las preparaciones cromosómicas de *T. pavonia* var. 'Dulce'. Las flechas marcan los cromosomas B.

De esta forma, los resultados obtenidos podrían sugerir un origen de múltiples regiones de diferentes cromosomas A, esto en función de la hibridación de las secuencias de los cromosomas B, en diversas regiones de diferentes cromosomas A, así como una composición de secuencias altamente repetidas.

BIBLIOGRAFÍA

Arroyo-Martínez H.A., Arzate-Fernández A.M., Barba-González R., Piña-Escutia J.L. 2017. Karyotype determination of three *Tigridia* species (Asparagales, Iridaceae). *Caryologia*, 70(1): 1–5. DOI:10.1080/00087114.2017.1321312.

Arroyo-Martínez H.A., Arzate-Fernández A.M., Barba-González R., Piña-Escutia J.L. 2020. CYTOGENETIC RELATIONSHIPS IN THREE VARIETIES OF *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(82): 8 pp.

- Barba-González, R., M. S. Ramanna, R. G. F. Visser, and J. M. Van Tuyl. 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 pp. DOI: 10.1139/g05-057.
- Botina-Galeano A.A., Bravo-Patiño S.A., Luna-Cabrera G.C., 2008. Evaluacion del comportamiento de la watsimba *Tigridia pavonia* bajo tres distancias de siembra en un arreglo agroforestal con laurel de cera *Morella pubescens* H &B ex Willd, Wilbur en el municipio de Sibundoy – Putumayo. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 25(1 y 2): 77–96pp. URL: <https://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/78>.
- Carrillo-Ocampo A., Engleman E. M. 2002. Anatomía de la semilla de *Tigridia pavonia* (Iridaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 70: 66–77. DOI: 10.17129/botsoci.1655.
- Cheng Y.-M., Lin B.-L. 2003. Cloning and characterization of maize b chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics* 164(1): 299–310.
- Douglas R.N., Birchler J.A. 2017. B Chromosomes. En: *Chromosome Structure and Aberrations*, Bhat T.A., Wani A.A. (eds.). Editorial Springer, India. 13–39pp. DOI: 10.1007/978-81-322-3673-3_2
- Huang W., Du Y., Zhao X., Jin W. 2016. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology*, 16(1): 14pp. DOI 10.1186/s12870-016-0775-7.
- Jones R.N., Viegas W., Houben A. 2008. A Century of B Chromosomes in Plants: So What?. *Annals of Botany* 101(6): 767–775. DOI: 10.1093/aob/mcm167.
- Kousaka R., Endo T.R. 2012. Effect of a rye B chromosome and its segments on homoeologous pairing in hybrids between common wheat and *Aegilops variabilis*. *Genes Genet. Syst.*, 87(1): 1–7 pp. DOI: 10.1266/ggs.87.1.
- Randolph L.F. 1941. Genetic Characteristics of the B Chromosomes in Maize. *Genetics*: 26(6):608–31 pp.

Leonel H.F., Luna-Cabrera G.C. 2017. Evaluación de procesos participativos para la formación ambiental a partir del conocimiento de watsimba *Tigridia pavonia* (L.f.) DC en Sibundoy, Putumayo, Colombia. *Información Tecnológica*, 28(1): 219–228pp. DOI: 10.4067/S0718-07642017000100022.

Long H, Qi Z.X., Sun X.M., Chen C.B., Li X.L., Song W.Q., Chen R.Y. 2008. Characters of DNA constitution in the rye B chromosome. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(2): 183–189 p. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00588.x.

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(1): 80–98pp. DOI: 10.7550/rmb.44083.

Piña-Escutia J.L., Vázquez-García L.M., Arzate-Fernández A.M. 2010c. In vitro regeneration and genetic fidelity of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1): 1–7pp. DOI: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-1.

Randolph L.F. 1941. Genetic Characteristics of the B Chromosomes in Maize. *Genetics*: 26(6):608–31 pp.

Rodríguez-Domínguez J.M., Ríos-Lara L.L., Tapia-Campos E., Barba-Gonzalez R. 2017. An improved technique for obtaining well-spread metaphases from plants with numerous large chromosomes. *Biotechnic & Histochemistry*, 92(3): 159–166pp .DOI: 10.1080/10520295.2017.1288927.

Vázquez-García, L.M. 2011. *Tigridias ornamentales, su uso y distribución*. México: Universidad Autónoma Chapingo. 104pp.

Zhang Y.-X., Deng Ch.-L. , Hu Z.-M. 2016. The chromosome microdissection and microcloning technique. En: *Plant Cytogenetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1429. Springer Science Business Media New York. DOI: 10.1007/978-1-4939-3622-9_12.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

De manera general se asume que *Tigridia pavonia* var. ‘Penélope’ es un híbrido natural entre ‘Trinidad’ y ‘Dulce’, esta última exhibiendo un número cromosómico de $2n= 28 + 3B$ con una fórmula cariotípica de $26m + 2sm + 3B$ (Arroyo-Martínez et al., 2017), resaltando la presencia de los tres cromosomas B que posee, tanto por ser un carácter que puede servir para la discriminación de individuos como por el efecto que pueden causar en los organismos que los posee.

En este sentido en la presente investigación se logró observar que ‘Penélope’ comparte una estrecha relación citogenética con las variedades: ‘Trinidad’, variedad con la que comparten cierta relación en el acomodo genético de sus secuencias de ADN, esto demostrado por los dos sitios de hibridación de ambos genes se encontraron únicamente en dos de los cromosomas grandes de ambas variedades; mientras que con ‘Dulce’ la similitud se observó tanto en el número cromosómico ($28+ 3B$) y la fórmula cariotípica ($26m + 2sm + 3B$) donde resalta la presencia de los 3 cromosomas B en ambas variedades.

Así, considerando nuestros resultados, los valores intermedios en el tamaño de flor y porcentaje de formación de frutos que ‘Penélope’ presenta respecto a ‘Trinidad’ y ‘Dulce’ (Vázquez-García et al., 2001), así como la similitud genética reportada por Piña-Escutia et al. (2010ab), se puede inferir que ambas variedades pudieron fungir como progenitores de la variedad ‘Penélope’.

En relación con lo anterior, el uso de marcadores RAPD así como el análisis GISH, permitieron sugerir que las variedades ‘Dulce’ y ‘Trinidad’ son los progenitores de ‘Penélope’. En el análisis con marcadores RAPD, el patrón de bandeo del iniciador Y38 mostró una banda que fue común entre ‘Penélope’ y ‘Trinidad’, mientras que el iniciador Y41 amplificó una banda compartida entre ‘Trinidad’ y ‘Penélope’, así como una entre ‘Penélope’ y ‘Dulce’.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Piña-Escutia *et al* (2010ab), quienes con el uso de marcadores RAPD demostraron que las variedades ‘Trinidad’, ‘Penélope’ y ‘Dulce’ mantienen una estrecha relación genética.

Respecto al análisis GISH, se logró la hibridación del genoma de las variedades ‘Trinidad’ (Tinción verde) y ‘Dulce’ (Tinción roja), con el de ‘Penélope’, la cual, no mostró una clara distintiva en todos los cromosomas A. Esto podría indicar la alta similitud genética entre los dos presuntos progenitores, donde dicha similitud entre ‘Trinidad’ y ‘Penélope’, pudo favorecer su cruzamiento, como fue reportado por Carlson *et al.* (2013) quienes indican que la similaridad genética entre el progenitor masculino y femenino, ha sido usado como un parámetro para predecir el éxito reproductivo. Aunado a lo anterior, la hibridación en los tres cromosomas B, tampoco fue en su mayoría distintiva. Esto puede indicar una alta homología entre las secuencias de ADN de los cromosomas A con las secuencias de los cromosomas B, como ha sido reportado en especies como: *Brachycome* (Leach *et al.*, 2004), *Hypsiboas albopunctatusque* (Gruber *et al.*, 2014), *Zea mays* (Huang *et al.*, 2016), y *Cestrum strigilatum* (Laforga Vanzela *et al.* 2017), donde la baja diferenciación entre los genomas de los progenitores pudo favorecer este resultado.

Así mismo, los cromosomas B de ‘Penélope’ presentaron una región que únicamente mostró hibridación con el genoma de ‘Dulce’ (Tinción roja), lo que permite inferir que ‘Dulce’ es el progenitor que hereda estos cromosomas B en ‘Penélope’, ya que teóricamente al ser ‘Dulce’ el progenitor que transmitió los cromosomas B, es de esperar que una región de los cromosomas B de ‘Penélope’, solo sea hibridada por el genoma de ‘Dulce’. Resultados similares obtuvieron Kousaka y Endo (2012) donde para identificar cromosomas B de *Secale cereale*, en híbridos de *Triticum aestivum* x *Aegilops variabilis* que los contenían, utilizaron la técnica de GISH con el ADN genómico de *Secale cereale* como sonda, identificando así los cromosomas B por una región hibridada solo en los cromosomas B.

De esta forma, considerando las características citogenéticas de las variedades, el análisis GISH, así como los patrones genéticos indicados, podemos inferir que dentro del proceso evolutivo de *T. pavonia*, la alogamia, y el origen geográfico en común de las variedades ‘Dulce’ y ‘Trinidad’ (Piña-Escutia *et al.*, 2010a), favorecieron un mayor flujo genético entre ellas, lo que eventualmente, derivó en el origen de la variedad ‘Penélope’.

Por último, en la presente investigación se logró hibridar las diferentes secuencias de cromosomas B obtenidas a partir de la microdissección de cromosomas B de la variedad ‘Dulce’, en preparaciones cromosómicas de la misma variedad, observando la presencia de regiones hibridadas tanto en cromosomas A, como en cromosomas B, indicando que los cromosomas B están conformados, de secuencias de diversos cromosomas A, como fue observado en el análisis GISH de ‘Penélope’. Lo anterior ha sido previamente observado en análisis citogenéticos con diversas especies con cromosomas B, como: *Brachycome dicromosomatica*, *Zea mays* y *Scale sereale* (Jones et al., 2008).

Así mismo, la hibridación de secuencias únicas en cromosomas A, no significa que estas no pertenezcan a los cromosomas B. Al respecto, Chen and Lin (2003), observaron que al hibridar las secuencias obtenidas de la microdissección de cromosomas B en *Zea mays*, varias de estas solo hibridaban en los cromosomas A, explicando que este efecto puede ser debido a que estas secuencias no presentan una cantidad de copias suficientes en los cromosomas B, como para hibridarse en ellos. De esta forma, algo similar podría estar ocurriendo con las secuencias obtenidas de la microdissección de cromosomas B de *T. pavonia*, donde las secuencias seleccionadas podrían no presentar la cantidad de copias necesarias para hibridar en los cromosomas B.

Así, los resultados obtenidos, además de permitir observar que los cromosomas B de *Tigridia pavonia* var. ‘Dulce’ están conformados por secuencias similares a las presentes en los cromosomas A, también podrían sugerir un origen de múltiples regiones de diferentes cromosomas A, como fue propuesto en los cromosomas B de diversas especies (Jones et al., 2008).

IX. CONCLUSIONES GENERALES

Se reporta por primera vez el cariotipo de: la variedad 'Penélope', con un número cromosómico de $2n=2x=28+3B$, una fórmula cariotípica de $26m+2sm+3B$, observando 6 sitios de hibridación de los genes 5s y 45s rADN; y la variedad 'Trinidad' con un número cromosómico de $2n=2x=28$, una fórmula cariotípica de $28m$, observando 6 sitios de hibridación de ambos genes 5s y 45s rADN.

Se observó por vez primera la hibridación del genoma de las variedades 'Trinidad' y 'Dulce' en los cromosomas de la variedad 'Penélope'.

Mediante la técnica de GISH se logró observar que los cromosomas B de 'Penélope' presentan una alta homología entre las secuencias de ADN de los cromosomas A con las secuencias de los cromosomas B. Así mismo se logró visualizar que los cromosomas B de 'Penélope' presentaron una región que únicamente mostró hibridación con el genoma de 'Dulce'.

Con el uso de marcadores RAPD se logró visualizar bandas que comparten las tres variedades analizadas, lo que en conjunto con los datos de GISH, y las características citogenéticas de las tres variedades, sugiere que 'Dulce' y 'Trinidad' pueden ser progenitores de 'Penélope'.

Mediante la técnica de Hibridación *In Situ* se logró hibridar el producto de la amplificación de los fragmentos de cromosomas B de *Tigridia pavonia* var. 'Dulce', en preparaciones citogenéticas de la misma variedad, observando la hibridación de estos tanto en secciones de cromosomas A, como en los cromosomas B.

X. BIBLIOGRAFÍA

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): 69–80pp. DOI: 10.38001/ijlsb.438133.

Adhikari S., Saha S., Biswas A., Rana T.S., Bandyopadhyay T.P., Ghosh P. 2017. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. The Nucleus, 60: 283–297 pp. DOI 10.1007/s13237-017-0214-7.

Amom T., Nongdam P. 2017. The use of molecular marker methods in plants: a review. International Journal of Current Research and Academic Review, 9(17): 7pp. DOI: 10.7324/IJCRR.2017.9171.

Arroyo-Martínez H.A., Arzate-Fernández A.M., Barba-González R., Piña-Escutia J.L. 2017. Karyotype determination of three *Tigridia* species (Asparagales, Iridaceae). Caryologia, 70(1): 1–5. DOI:10.1080/00087114.2017.1321312.

Arroyo-Martínez H. A., Arzate-Fernández A. M., Barba-González R., Piña-Escutia J. L. 2018. Karyotype analysis and physical mapping of the 5S and 45S rDNA genes in *Tigridia pavonia* var. Dulce (Iridaceae). Caryologia. 71(1): 6pp. DOI: <https://doi.org/10.1080/00087114.2017.1382302>.

Arzate-Fernández A.F., Hoyos-Basurto A., Vázquez-García L.M., Gutiérrez-Martínez M.G. 2008. Caracterización isoenzimática de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L. f.) DC. Agrociencia, 42(5): 519–528pp.

Arzate-Fernández A.M., González-González H., Vázquez-García L.M., Norman-Mondragón T.H., González-Villarreal C., Brumbley S.M., Piña-Escutial J.L. 2015. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. a mexican native ornamental plant. PROPAGATION OF ORNAMENTAL PLANTS, 15(3): 101–106pp.

Ahmad S.F, Martins C. 2017. The Modern View of B Chromosomes under the impact of high scale omics analyses. Cells, 8(2): 156 pp. DOI: 10.3390/cells8020156.

Barba-González, R., M. S. Ramanna, R. G. F. Visser, and J. M. Van Tuyl. 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 pp. DOI: 10.1139/g05-057.

Bhosle SM, Chavhan RL, Hinge VR, Ghodke MK. 2015. Molecular fingerprinting and assessment of genetic purity of sunflower (*Helianthus annuus l.*) hybrids by using RAPD and SSR markers. The Bioscan, 10 (2): 773 – 779.

Bonfils J.P., Pinguet F., Culine S., Sauvaire Y. 2001. Cytotoxicity of iridals, triterpenoids from Iris, on human tumor cell lines A2780 and K562. Planta Med, 67(1): 79–81pp. DOI: 10.1055/s-2001-10625.

Botina-Galeano A.A., Bravo-Patiño S.A., Luna-Cabrera G.C., 2008. Evaluación del comportamiento de la watsimba *Tigridia pavonia* bajo tres distancias de siembra en un arreglo agroforestal con laurel de cera *Morella pubescens* H & B ex Willd, Wilbur en el municipio de Sibundoy – Putumayo. Revista de Ciencias Agrícolas, 25(1 y 2): 77–96pp. URL: <https://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/78>.

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

Carrillo-Ocampo A., Engleman E. M. 2002. Anatomía de la semilla de *Tigridia pavonia* (Iridaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México, 70: 66–77. DOI: 10.17129/botsci.1655.

Cheng Y.-M., Lin B.-L. 2003. Cloning and characterization of maize b chromosome sequences derived from microdissection. Genetics 164(1): 299–310.

Dhutmal R. R., Mundhe A. G., More A. W. 2018. Molecular Marker Techniques: A Review, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, Special Issue 6: 816–825 pp.

Díaz-L., C., Pichardo-R., J., De la Cruz-T., E., Norman-M., T., Sandoval-R., F., Vázquez-G., L. 2003. Variabilidad inducida en *Tigridia pavonia* (L. f.) D.C. var. Sandra por irradiación de bulbos con rayos gamma DE 60Co. Revista Chapingo Serie Horticultura. 9(2): 235–241 pp. DOI: 10.5154/r.rchsh.2002.06.037.

Dongre AB, Raut MP, Paikrao VM, Pande SS. 2012. Genetic purity testing of cotton F1 hybrid DHH-11 and parents revealed by molecular markers. International Research Journal of Biotechnology, 3 (3): 32 – 36 pp.

Douglas R.N., Birchler J.A. 2017. B Chromosomes. En: Chromosome Structure and Aberrations, Bhat T.A., Wani A.A. (eds.). Editorial Springer, India. 13–39pp. DOI: 10.1007/978-81-322-3673-3_2

Effers K., Scholz B., Nickel C., Hanisch B., Marner F.-J. 1999. Structure Determination of Tigridial, an Iridopentaene from *Tigridia pavonia* (Iridaceae). European Journal of Organic Chemistry, 1999(11): 2793–2797pp. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199911\)1999:11<2793::AID-EJOC2793>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199911)1999:11<2793::AID-EJOC2793>3.0.CO;2-Z).

Garrido-Cardenas J.A., Mesa-Valle C., Manzano-Agugliaro F. 2017. Trends in plant research using molecular marker. Planta, 247: 543–557 pp. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2829-y>.

González-Sánchez M., González-González E., Molina F., Chiavarino A.M., Rosato M., Puertas M.J. 2003. One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene(s) determines their meiotic loss. Heredity, 90(2): 122–129. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800185.

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.

Haider Ali S.N., Ramanna M.S., Jacobsen E., Visser R.G.F. 2002. Genome differentiation between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* as revealed by genomic in situ hybridization. Euphytica, 127 (2): 227–234 pp. DOI: 10.1023/A:1020282311843.

Hagag N.G. 2004. Chromosome, microdissection and microcloning, en Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2nd Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Henning F., Trifonov V., Almeida-Toledo L.F. 2008. Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 279–283pp. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200022>.

Herrera J. C. 2007. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana* 25(1): 26–35pp.

Holmes D.S., Bougourd S.M. 1991. B-chromosome selection in *Allium schoenoprasum* II. Experimental populations. *Heredity*, 67(1): 117–122. DOI: 10.1038/hdy.1991.70.

Huang W., Du Y., Zhao X., Jin W. 2016. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology*, 16(1): 14pp. DOI 10.1186/s12870-016-0775-7.

Hwang Y.-J., Arens P., Van Tuyl J.M., Yang T.-J., Lim K.-B. 2012. Genome analysis of *lilium tigrinum* by chromosome microdissection and molecular cytogenetic techniques. 6(special issue 2): 84–88pp.

Jones N., Houben A. 2003. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?. *TRENDS in Plant Science*, 8(9): 417–423. DOI: 10.1016/S1360-1385(03)00187-0.

Jones R.N., Viegas W., Houben A. 2008. A Century of B Chromosomes in Plants: So What?. *Annals of Botany* 101(6): 767–775. DOI: 10.1093/aob/mcm167.

Kenton A., Heywood C.A. 1984. Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 146(1):87–104pp. DOI:10.1007/BF00984056.

Kesawat1 S., Das B.K. 2009. Molecular markers: it's application in crop improvement. *J. Crop Sci. Biotech*, 12 (4): 169 – 181 pp. DOI: 10.1007/s12892-009-0124-6.

Kousaka R., Endo T.R. 2012. Effect of a rye B chromosome and its segments on homoeologous pairing in hybrids between common wheat and *Aegilops variabilis*. *Genes Genet. Syst.*, 87(1): 1–7 pp. DOI: 10.1266/ggs.87.1.

Kumar L., Joseph S., Bai N. Micropropagation of *Tigridia pavonia* (L.f) DC-a potential floricultural plant from twin scale explants. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 1(1): 38–41 pp. DOI: 10.1016/S2305-0500(13)60045-7.

Kumar V., Rajvanshi S.K., Yadav R.K. 2014. Potential application of molecular markers in improvement of vegetable crops. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 15 (4): 690 – 707 pp.

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.

Leonel H.F., Luna-Cabrera G.C. 2017. Evaluación de procesos participativos para la formación ambiental a partir del conocimiento de watsimba *Tigridia pavonia* (L.f.) DC en Sibundoy, Putumayo, Colombia. *Información Tecnológica*, 28(1): 219–228pp. DOI: 10.4067/S0718-07642017000100022.

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.

Long H, Qi Z.X., Sun X.M., Chen C.B., Li X.L., Song W.Q., Chen R.Y. 2008. Characters of DNA constitution in the rye B chromosome. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(2): 183–189 p. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00588.x.

Marakli S. 2018. A Brief Review of Molecular Markers to Analyse Medicinally Important Plants. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2018. 1(1): 29–36 pp.

Martinez J., Mendez I., Palomino G. 2000. Cytological and genical differentiation between cytotypes of *Echeandia nana* (Anthericaceae). *CARYOLOGIA*, 53(2): 147–158.

Mani T., Thoppil J.E. 2005. Influence of B-chromosome on essential oil content and composition in *Salvia coccinea* Buc'hoz ex Etl. (Lamiaceae). *CARYOLOGIA*, 58(3): 246–248 pp. DOI: 10.1080/00087114.2005.10589458.

Marques A., Klemme S., Houben A. 2018. Evolution of Plant B Chromosome Enriched Sequences. *Genes*, 9(10): 515 pp. DOI: 10.3390/genes9100515.

Martis M.M., Klemmeb S., Banaei-Moghaddamb A.M., Blattnerb F.R., Macasc J., Schmutzerb T., Scholzb U., Gundlacha H., Wickerd T., Simkovác H., Novák P., Neumannc P., Kubaláková M., Bauerf E., Haseneyerf G., Fuchsb J., Dolezele J., Steinb N., Mayera K.F.X., Houbenb A. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. PNAS, 109(33): 13343–13346pp. DOI: 10.1073/pnas.1204237109.

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: 235–248pp.

Molseed E. 1970. The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley: University of California Press, 54: 1–126 pp.

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(1): 80–98pp. DOI: 10.7550/rmb.44083.

O'Connor, C. 2008. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Nature Education 1(1).

Oliver J.L., Posse F., Martinez-Zapater J.M., Enriquez A.M., Ruiz-Rejón M. 1982. B-Chromosomes and E-1 Isozyme Activity in Mosaic Bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). Chromosoma, 85(3):399–403pp. DOI: 10.1007/BF00330362.

Palomino-Hasbach, G. 1995. Estudios Citogenéticos de Plantas Mexicanas. Plantas, Biotecnología - Agronomía - Nutrición. Libro de memorias, VI semana del conocimiento. Cuautla, Morelos.

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): 147–158pp.

Piña-Escutia J.L., Vázquez-García L.M., Arzate-Fernández A.M. 2010b. Variety discrimination of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. assessed by different length RAPD primers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13(4): 10–11 pp. DOI: 10.2225/vol13-issue4-fulltext-7.

Piña-Escutia J.L., Vázquez-García L.M., Arzate-Fernández A.M. 2010c. In vitro regeneration and genetic fidelity of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1): 1–7pp. DOI: 10.2225/vol13-issue1-fulltext-1.

Piña-Escutia, J. L., Vázquez-García, L. M., Arzate-Fernández, A. M. 2013. Interspecific hybridization between *Tigridia pavonia* and *T. augusta* through ovary slice culture. *Genetics and Molecular Research* 12(1): 15–22pp. DOI: 10.4238/2013

Plowman A.B., Bougourd S.M. 1994. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity*, 72(): 587–593 pp DOI:10.1038/hdy.1994.81.

Pujar UU, Tirakannanavar S, Jagadeesha RC, Sandhyarani N. 2017. Hybrid purity testing of chilli hybrid (Pusa Jwala × Arka Lohit) through RAPD and ISSR molecular markers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (11): 2079 – 2086 pp. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.245>.

Qi Z.X., Zeng H., Li X.L., Chen Ch.B, Song W.Q., Chen R.Y. 2002. The molecular characterization of maize B chromosome specific AFLPs. *Cell Research*, 2(1):63–68 pp. DOI: 10.1038/sj.cr.7290111.

Randolph L.F. 1941. Genetic Characteristics of the B Chromosomes in Maize. *Genetics*: 26(6):608–31 pp.

Raskina O., Barber J.C., Nevo E., Belyayev A. 2008. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3-4): 351–357pp. DOI: 10.1159/000121084

Rodríguez-Domínguez J.M., Ríos-Lara L.L., Tapia-Campos E., Barba-Gonzalez R. 2017. An improved technique for obtaining well-spread metaphases from plants with numerous large chromosomes. *Biotechnic & Histochemistry*, 92(3): 159–166pp .DOI: 10.1080/10520295.2017.1288927.

Silva G.S., Souza M.M. 2013. Genomic in situ hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research*, 12(3): 2953–2965pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2013.August.12.11>.

Tapia-Pastrana F., Tapia-Aguirre F. 2017. Evidencia de autoploidía y translocaciones en el cariotipo de *Tigridia pavonia* (Iridaceae, Iridoideae) de la Reserva Ecológica del Pedregal

de San Ángel, México. *Acta Botánica Mexicana*, 121: 151–158pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.21829/abm121.2017.1205>

Torres-Méndez S.A., Caso-Barrera L., Aliphat-Fernández M.M. 2019. Conocimiento ecológico, alimentación tradicional y clasificación fríocaliente: la perspectiva de los niños tseltales de Tenejapa, Chiapas. *LiminaR. Estudios Sociales y Humanísticos*, 17(2): 148–166pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.29043/liminar.v17i2.673>.

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(3):301–307pp. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01456.x.

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: 14–19pp.

Vázquez-García, L.M. 2011. *Tigridias ornamentales, su uso y distribución*. México: Universidad Autónoma Chapingo. 104pp.

Vázquez-García, L.M. 2017. Fascículo 6: Tigridias (flores de ocelote). En: *Joyas de la naturaleza mexicana. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI)*, México. URL: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225098/Fasc_culo_Tigridias.pdf.

Velázquez-López R., Cano-Santana Z., Damián-Domínguez X. 2009. Historia natural y biología reproductiva de la flor del tigre, *Tigridia pavonia* (Iridaceae). En *Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel –*

Universidad Nacional Autónoma de México. URL:
http://www.repsa.unam.mx/documentos/Velasquez-Lopez_et_al_2009_Tigridia.pdf.

Xie S., Marasek-Ciolakowska A., Ramanna M.S., Arens P., Visser R.G. F., Van Tuyl J.M. 2014. Characterization of B chromosomes in *Lilium* hybrids through GISH and FISH. *Plant Systematics and Evolution*, 300(8): 1771–1777. DOI: 10.1007/s00606-014-1004-.

Younis A., Ramzan F., Yoon-Jung H., Ki-Byung L. 2015. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant Cell Rep*, 34(9): 1477–1488 pp. DOI: 10.1007/s00299-015-1828-3.

Zepeda C., White L. 2008. Herbolaria y pintura mural: plantas medicinales en los murales del convento del divino salvador de Malinalco, Estado de México. *Polibotánica*, 25: 173-199pp.

ZHANG Y., ZHANG S. G., QI L.W., LIU B., GAO J. M., CHEN C. B., LI X. L., SONG W. Q. 2005. Chromosome Microdissection, Cloning and Painting of the Chromosome 1 in Poplar (*Populus tremula*). *Silvae Genetica*, 54(4): 211–217 pp. DOI:10.1515/sg-2005-0031.

Zhang Y.-X., Deng Ch.-L. , Hu Z.-M. 2016. The chromosome microdissection and microcloning technique. En: *Plant Cytogenetics: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1429. Springer Science Business Media New York. DOI: 10.1007/978-1-4939-3622-9_12.

Zhou Y., Wang H., Wei J., Cui L., Deng X., Wang X., Chen Z. 2000. Comparison of two PCR techniques used in amplification of microdissected plant chromosomes from rice and wheat. *BioTechniques*, 28(4):766–774pp. DOI: 10.2144/00284rr06.

Zhou R.-N., Hu Z.-M. 2007. The development of chromosome microdissection and microcloning technique and its applications in genomic research. *Current Genomics*, 8(1): 67–72pp. DOI: 10.2174/138920207780076929.

Espero la información generada en esta investigación, sirva de apoyo o inspiración para que alguien pueda hacer algo grande.

