



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO EN TRES ESPECIES
SILVESTRES DE *Tigridia* spp.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

PRESENTA

HUGO ABELARDO ARROYO MARTÍNEZ

MODALIDAD: TESIS

ASESORES

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

DR. LUIS MIGUEL VÁZQUEZ GARCÍA

JUNIO, 2014.

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", EL CERRILLO PIEDRAS
BLANCAS MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉXICO.



ÍNDICE

	Página
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Morfología del género <i>Tigridia</i>	4
2.2 Distribución	4
2.3 Especies de <i>Tigridia</i> empleadas en este trabajo	5
2.3.1 <i>T. pavonia</i> (L.f) DC.	5
2.3.2 <i>T. multiflora</i> (Baker) Ravenna.....	6
2.3.3 <i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i> Molseed.....	7
2.4 Variación genética	7
2.4.1 Variación morfológica.....	8
2.4.2 Variación cromosómica	9

2.4 Citología	9
2.4.1 Definición	9
2.4.2 Importancia	10
2.4.3 Preparación del tejido meristemático	10
2.4.3.1 Determinación de la hora mitótica	11
2.4.3.2 Pretratamiento	11
2.4.3.3 Fijación	12
2.4.3.4 Hidrólisis	12
2.4.3.5 Tinción	12
2.4.4 Caracterización cromosómica	13
2.4.4.1 Número básico, número gamético y número somático	13
2.4.4.2 Tamaño absoluto	14
2.4.4.3 Relación de brazos	14
2.4.4.4 Constricciones secundarias	16
2.4.4.5 Cariotipo	17
2.4.4.5.1 Cariograma	17
2.4.4.5.2 Idiograma	18
2.4.4.6 Fórmula cariotípica	19
2.4.4.7 Simetría - asimetría	20
2.5 Citología en el género <i>Tigridia</i>	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Ubicación del experimento	24
3.2 Material vegetativo	24
3.3 Observación y clasificación de cromosomas mitóticos	24
3.3.1 Pretratamiento de ápices radiculares	25
3.3.2 Fijación	25
3.3.3 Hidrólisis	25
3.3.4 Tinción	25
3.3.5 Aplastamiento celular	26
3.4 Elaboración del cariotipo	26

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Determinación de hora de colecta	29
4.2 Cariotipo	30
4.2.3 <i>T. pavonia</i>	32
4.2.4 <i>T. multiflora</i>	34
4.2.5 <i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i>	36
4.2.6 Discusión general	37
V. CONCLUSIONES	40
VI. ANEXOS	41
VII. GLOSARIO	44
VII. BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Imagen de <i>T. pavonia</i> (L.f) DC var. Trinidad	6
2.	Imagen de <i>T. multiflora</i> (Baker) Ravenna	6
3.	Imagen de <i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i>	7
4.	Representación gráfica de los diferentes tipos de cromosomas según su morfología	15
5.	Representación gráfica de las partes de un cromosoma	16
6.	Cariograma de <i>Pseudotsuga</i> sp. $2n = 28$	18
7.	Idiograma de <i>Agave angustifolia</i> con una fórmula cariotípica de $48m + 2sm + 6st + 4t$ de la población de El Chorro	19
8.	Cariotipos de cuatro especies de <i>Tigridia</i>	23
9.	Células de ápices radiculares de <i>T. pavonia</i> con cromosomas en arresto mitótico, colectados en diferentes horas	30
10.	Célula de <i>T. pavonia</i> con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$	32
11.	Idiograma de <i>T. pavonia</i> con fórmula cariotípica de $25m + 3sm$	33
12.	Célula de <i>T. multiflora</i> con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$	34
13.	Idiograma de <i>T. multiflora</i> con fórmula cariotípica de $2M + 14m + 8sm + 4st$	35
14.	Célula de <i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i> con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$	36
15.	Idiograma de <i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i> con fórmula cariotípica de $17m + 8sm + 3st$	37

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Clasificación de los cromosomas de acuerdo a Levan <i>et al.</i> (1964).	15
2.	Número cromosómico de ocho especies de <i>Tigridia</i>	21
3.	Cariotipo de <i>T. pavonia</i> , <i>T. multiflora</i> y <i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i>	38

LISTA DE ANEXOS

Cuadro		Página
1.	Promedio de las longitudes y clasificación de cada cromosoma en <i>T. pavonia</i>	41
2.	Promedio de las longitudes y clasificación de cada cromosoma en <i>T. multiflora</i>	42
3.	Promedio de las longitudes y clasificación de cada cromosoma en <i>T. alpestris</i> subsp <i>obtusa</i>	43

RESUMEN

DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO EN TRES ESPECIES SILVESTRES DE *Tigridia* spp.

Hugo Abelardo Arroyo-Martínez*. Ingeniero Agrónomo en Floricultura.
Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.
Director de Tesis: José Luis Piña-Escutia¹. Asesores: Amaury Martín Arzate-
Fernández² y Luis Miguel Vázquez-García³

*Autor para correspondencia: escudo_0@hotmail.com

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

³Centro Universitario Tenancingo. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km. 1.5. Ex hacienda de Santa Ana, C.P. 52400, Tenancingo, México. Correspondencia: lmvarezg@uaemex.mx

El género *Tigridia*, es citológicamente distinto, tiene números básicos variables e inadecuada información en los cariotipos, por lo cual los límites genéricos, afiliaciones de especies y relaciones filogenéticas, varían de un autor a otro. En el presente trabajo se determinó la hora de colecta, evaluando cuatro periodos distintos y el cariotipo de tres especies silvestres de *Tigridia*, determinando el número cromosómico, morfología de los cromosomas, fórmula cariotípica, longitud total del genoma, simetría cromosómica e índice de asimetría. La mejor hora de colecta para obtener células en metafase mitótica para las tres especies de *Tigridia* fue a las 5:30 am. Las tres especies de *Tigridia* presentaron un número cromosómico de $2n = 28$, conservando un cariotipo bimodal formado por cuatro cromosomas grandes y 24 pequeños. *T. pavonia*, presentó una fórmula cariotípica de $25m + 3sm$, presentando constricciones secundarias en los cromosomas 7 y 18; *T. multiflora* mostró una fórmula cariotípica de $2M + 14m + 8sm + 4st$; *T. alpestris* subsp. *obtusa* exhibió una fórmula cariotípica de $17m + 8sm + 3st$,

ambas sin constricciones secundarias. Así mismo los otros parámetros presentaron valores muy contrastantes.

Palabras clave: *Tigridia*, hora de colecta, cariotipo, número cromosómico y morfología cromosómica.

ABSTRACT

KARYOTYPE DETERMINATION IN THREE WILD SPECIES OF *Tigridia* spp.

Hugo Abelardo Arroyo-Martínez*. Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Director: José Luis Piña-Escutia¹. Advisors: Amaury Martín Arzate-Fernández² and Luis Miguel Vázquez-García³

*Corresponding author: escudo_0@hotmail.com

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

³Centro Universitario Tenancingo. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km. 1.5. Ex hacienda de Santa Ana, C.P. 52400, Tenancingo, México. ³lmvazquezg@uaemex.mx

The genus *Tigridia*, is cytologically different, has variable basic numbers and inadequate information in the karyotypes, so the generic limits, affiliations and phylogenetic relationships of species differ from one author to another. In the present work were determined the collect hour, evaluating four different periods and the karyotype of three wild species of *Tigridia*, determining chromosome number, chromosome morphology, karyotype formula, total length of the genome, chromosome symmetry and asymmetry index. The best collect hour to obtain mitotic cells in metaphase was at 5:30 am. The three species of *Tigridia* had a chromosome number of $2n = 28$, keeping a bimodal karyotype composed of four large chromosomes and 24 small. *T. pavonia* presented a karyotype formula of $25m + 3sm$, presenting secondary constrictions on chromosomes 7 and 18; *T. multiflora* showed a karyotype formula of $2M + 14m + 8sm + 4st$; *T. alpestris* subsp. *obtusata* exhibited a karyotype formula of $17m + 8sm + 3st$, both without secondary constrictions. Also the other parameters had very contrasting values.

Keywords: *Tigridia*, collecting hour, karyotype, chromosome number and chromosome morphology.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Tigridia* se distribuye principalmente en el continente Americano; siendo México su centro de diversidad, actualmente existen 40 especies, distribuidas en 29 estados de la República Mexicana; algunas con de amplia distribución como *T. pavonia*, otras de distribución restringida como *T. hintonii* (Vázquez-García *et al.*, 2011).

En los últimos años, el tamaño de su flor, su forma arquitectónica, así como la abundante variabilidad de colores, han hecho de las especies de *Tigridia* un atractivo recurso florícola con una importante demanda en el mercado como planta ornamental para jardines y macetería (Borys *et al.*, 2000). Actualmente, sólo la especie *T. pavonia* se encuentra ampliamente distribuida en Europa, Asia y Australia, donde se comercializa como planta para jardinería. A pesar de esto, en México, ésta y las demás especies no son explotadas debido a la poca información sobre su abundancia y distribución. Por lo cual, los estudios sobre su variabilidad genética son necesarios para generar el conocimiento para su eficiente conservación, así como para su uso en programas de mejoramiento genético.

La variabilidad genética vegetal puede ser entendida como la fuente de recursos para el mantenimiento y mejora de la agricultura, y si bien en México, dicha variabilidad existe y es abundante, primero es necesario conocerla para poder utilizarla y conservarla racionalmente (Hoyos-Basurto *et al.*, 2006). La variabilidad genética puede medirse mediante la variación en el contenido o tamaño del DNA, así como en el número y estructura de los cromosomas. Las características del cariotipo son generalmente

constantes en un grupo de especies y aún de géneros, pero a menudo ocurren variaciones estructurales y/o numéricas que pueden cambiar el número, tamaño y posición centromérica de los cromosomas, dichas variaciones pueden generar variabilidad genética (Levitus *et al.*, 2010).

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, se evalúa el tamaño del genoma y se analiza el comportamiento meiótico de los cromosomas en razas, especies, híbridos y poliploides. Los resultados que se obtienen mediante la aplicación de estas técnicas facilitan estudios de sistemática, filogenia, biodiversidad, evolución, mejoramiento y biotecnología.

Generalmente los miembros de algunos géneros taxonómicos presentan características citológicas similares. Sin embargo, el género *Tigridia*, es citológicamente distinto, tiene números básicos variables e inadecuada información en los cariotipos, por lo cual los límites genéricos, afiliaciones de especies y relaciones filogenéticas, varían de un autor a otro (Rodríguez *et al.*, 2003); es por eso que hasta ahora no hay un estudio citológico que indique un nivel de ploidía certero, pues aunque de manera general se asume un número diploide ($2n = 28$), se han reportado variaciones de $2n = 26$ (Molseed, 1970), mientras que Kenton y Heywood (1983), reportaron la existencia de una especie de *Tigridia* con $2n = 14$, haciendo aún más difícil establecer si las especies del género tienen un número básico uniforme o si existe poliploidía en el mismo.

Por ello la determinación cariotípica de las especies de *Tigridia* mediante citología clásica no sólo proporcionará información necesaria para la identificación de su cariotipo, sino que además podrá servir de base para el establecimiento de relaciones filogenéticas más precisas, así como su uso en programas de mejoramiento genético.

1.1 Objetivo general

- Determinar el cariotipo de tres especies silvestres de *Tigridia*; *T. pavonia*, *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar la estructura cromosómica de cada una de las especies.
- Cuantificar la variación cromosómica entre las especies evaluadas.

1.2 Hipótesis

Las especies de *Tigridia* evaluadas presentan el mismo número y estructura cromosómica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Morfología del género *Tigridia*

El género *Tigridia* Juss. (Iridaceae) agrupa plantas herbáceas perennes, bulbosas, con hojas plegadas y flores erectas o nutantes. Los segmentos del perianto están dispuestos en dos series distintas en forma y tamaño; a menudo, los segmentos son conniventes a manera de copa o en forma de campana. Generalmente, los tépalos presentan coloraciones llamativas. En la porción media inferior de los tépalos interiores se encuentra una región nectarial. Los nectarios pueden estar expuestos o bien dentro de un canal formado por el plegamiento de la parte media de los tépalos. Los filamentos son connatos, las anteras son libres y presentan dehiscencia longitudinal. El estilo es filiforme, trifido y con las ramas opuestas a los estambres, a su vez cada rama está profundamente dividida en dos brazos, con la parte estigmática en el ápice. Generalmente entre cada par de brazos del estilo se encuentra un mucrón. El fruto es una cápsula trivalvada, de forma subglobosa, claviforme o elipsoide. Por último, las semillas son globosas o piriformes (Rodríguez y Sytsma, 2005).

2.2 Distribución

La mayor parte de las especies que conforman el género habitan en bosques templados, desde encinares hasta abietales; sin embargo, algunas otras, como *T. huajuapensis* Cruden, *T. ehrenbergii* (Schldl.) Molseed y *T. hallbergii* Molseed, habitan bosques tropicales caducifolios, matorrales, palmares, llanos y pastizales. El intervalo altitudinal

en el que con mayor frecuencia se encuentran las especies de *Tigridia* va de los 2000 a los 3500 m.s.n.m., aunque algunas pueden crecer a altitudes menores, pero no se han reportado especies que se desarrollen por debajo de los 500 m.

Si bien los representantes del género se distribuyen a todo lo largo y ancho del país, muchas de sus especies son endémicas de zonas muy localizadas (Espejo-Serna y López-Ferrari, 1996).

2.3 Especies de *Tigridia* empleadas en este trabajo

2.3.1 *T. pavonia* (L.f) DC.

Pertenece al subgénero *Tigridia* Molseed, grupo 1, complejo *pavonia* (Molseed, 1970), Tallo grueso, de 3-8 mm de diámetro; floración de 30 a 150 cm de altura, adjuntando de dos a varias flores. Flores de 10-15 cm de diámetro, el perianto de colores brillantes en tonos de rosa, rojo, naranja, amarillo, blanco y con manchas en la taza de las flores, bases conniventes, tépalos externos en copa abierta, poco profundos; tépalos internos pequeños, cordados, ovados u oblongo-ovados, con ápice acuminado; los nectarios presentan surcos a cada lado de la hoja, pero no son continuos a través de su centro (Vázquez-García *et al.*, 2011) (Figura 1).

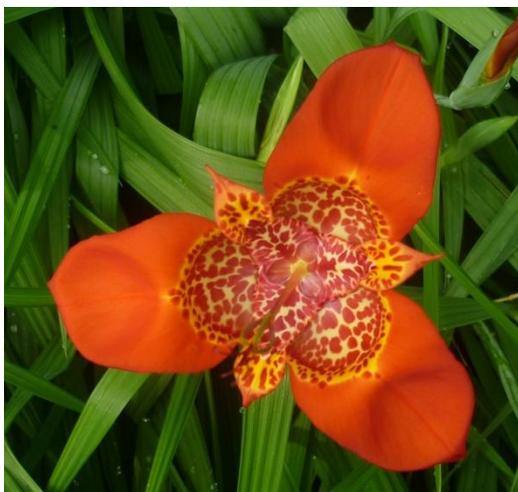


Figura 1. *T. pavonia* (L.f) DC var. Trinidad.

2.3.1 *T. multiflora* (Baker) Ravenna

Pertenece al subgénero *Hydrotaenia* Molseed, grupo 2, complejo *multiflora* (Molseed, 1970). Tallo envainado en una hoja basal, ramificado de 1-3 ramas. Flores erectas de color lavanda y naranja, con base color púrpura y marrón; tépalos distales, la parte exterior del tépalo es elíptica de 15-30 mm de largo, 6-13 mm de ancho (Vázquez-García *et al.*, 2011) (Figura 2).



Figura 2. *T. multiflora* (Baker) Ravenna. Fuente: Vázquez-García *et al.*, 2011.

2.3.2 *T. alpestris* subsp. *obtusa* Molseed

Pertenece al subgénero *Hydrotaenia* Molseed, grupo 2, complejo *vanhouttei* (Molseed, 1970). Tallos de 80 cm de altura y 6 mm de diámetro. Presenta flores de 2.5 - 4 cm de diámetro, en forma campanulada, los tépalos son de color vino amarillo-verdes; los tépalos externos son ampliamente elípticos y completamente cóncavos (Vázquez-García *et al.*, 2011) (Figura 3).



Figura 3. *T. alpestris* subsp. *obtusa* Molseed. Fuente: Vázquez-García *et al.*, 2011.

2.4 Variación genética

Un primer paso en la investigación a nivel genético de las especies vegetales es la detección de la variabilidad genética existente en las diferentes poblaciones y su cuantificación.

El conocimiento de la diversidad genética de especies ampliamente distribuidas es importante para su conservación y distinción genética y fenotípica, pues generalmente muestran variación morfológica, fisiológica y en la estructura genética de sus poblaciones (Piña-Escutia *et al.*, 2010).

2.4.1 Variación Morfológica

Los intentos tradicionales de estimar la variabilidad genética y de discriminar poblaciones han estado basados en el análisis comparativo de caracteres merísticos y morfométricos. Estos caracteres son de fácil medición y análisis. En muchos casos, los estudios morfológicos han ayudado a explicar la diversidad intraespecífica, pero la mayoría de los análisis de variación fenotípica han sido, estadísticamente, inadecuados. Esta falta de datos reales ha llevado a errar, a menudo, en la identificación de poblaciones, subespecies, etc., y a sobreenfatizar el control genético de caracteres morfológicos que están influidos por el ambiente. Por lo tanto, como señalan Messiah y Tibbo (1971), para poder diferenciar con seguridad unidades poblacionales intraespecíficas se requiere una demostración a nivel genético (Elorrieta-Jove y Benito-Jiménez, 1993).

Por ello, a lo largo de las últimas décadas se han probado distintos métodos para analizar y cuantificar dicha variabilidad genética, uno de ellos es la variación cromosómica.

2.4.2 Variación cromosómica

Las características morfológicas de los cromosomas y su número son generalmente constantes en los seres vivos a través de generaciones y pueden utilizarse, para su clasificación taxonómica. El cariotipo característico de una especie, puede sufrir modificaciones evolutivas mediante diversos mecanismo tales como translocaciones, inversiones, deficiencias y duplicaciones de segmentos, y fusiones y fisiones del centrómero. Igualmente, el cariotipo puede presentar cambios aneuploides y poliploides (García-Velásquez, 1990).

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

2.4 Citología

2.4.1 Definición

La Citología, es la disciplina que estudia el comportamiento y la estructura de los cromosomas y su relación con la transmisión y recombinación de los genes. Los principales estudios de la citogenética clásica se basan en la determinación de las

características del cariotipo y la identificación cromosómica mediante técnicas de tinción convencionales y bandeo cromosómico. También, evalúa el tamaño del genoma analiza el comportamiento meiótico de los cromosomas en razas, especies, híbridos y poliploides (Levitus *et al.*, 2010).

2.4.2 Importancia

Kenton (1986) explica que los estudios citogenéticos determinan la variación genética y sus causas. Esta información es fundamental para conocer que tan plásticos son los genotipos entre y dentro de las diferentes porciones de un rango ecológico, tomando en consideración el sistema reproductivo, ciclo de vida y grado de intercambio genético en las poblaciones. Los análisis citogenéticos son útiles al taxónomo y al biólogo evolucionista, ya que los habilita para detectar las diferencias entre los taxa y conocer sus patrones de divergencia. Así mismo, al fitomejorador le facilita la manipulación de los genotipos con fines de seleccionar especies de altos rendimientos (Palomino, 1995).

2.4.3 Preparación del tejido meristemático

Para realizar los estudios citogenéticos es necesario hacer previamente un tratamiento de los tejidos a estudiar. A continuación se explica el proceso necesario para preparar el tejido meristemático.

2.4.3.1 Determinación de la hora mitótica

La caracterización cromosómica se realiza en metafase mitótica debido a que, en esta fase, los cromosomas han alcanzado su máximo grado de condensación y sus límites están perfectamente definidos. Es por eso que la determinación del ciclo celular y de la hora mitótica constituyen las herramientas principales para aumentar la efectividad de los métodos químicos y físicos para la separación de cromosomas en especies vegetales (Ferrer-Pereira *et al.*, 2007; Levitus *et al.*, 2010).

Swanson *et al.* (1981) indicó que el momento del día en el cual las células se multiplican con mayor rapidez varía de una especie a otra, pero por lo general, la hora mitótica se encuentra de las primeras horas de la mañana hasta aproximadamente las 11:00 am (Marcela-Delgado *et al.*, 2010).

2.4.3.2 Pretratamiento

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

2.4.3.3 Fijación

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

2.4.3.4 Hidrólisis

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

2.4.3.5 Tinción

Para poder observar los cromosomas se requiere de una tinción. Existe una gran variedad de colorantes nucleares como son fucsina básica, orceína, carmín, giemsa, etc., sin embargo para efectos de este proyecto analizaremos la técnica de tinción Feulgen.

Este método es selectivo en el cual las moléculas del reactivo de Schiff se condensan con los grupos aldehídos funcionales, liberados de las purinas de la desoxirribosa del DNA, producto de la hidrólisis, obteniendo así una coloración carmín (García-Velásquez, 1990).

Finalmente, se utilizan los tejidos, macerando y aplastando (“squash”) el material sobre un portaobjetos.

2.4.4 Caracterización cromosómica

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

2.4.4.1 Número básico, número gamético y número somático

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

2.4.4.2 Tamaño absoluto

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

2.4.4.3 Relación de brazos

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

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

De acuerdo con la posición del centrómero, Levan *et al.* (1964) propuso la clasificación de los cromosomas en cuatro grupos: m (metacéntricos), sm (submetacéntricos), st (subtelocéntricos) y t (telocéntricos o acrocéntricos) (Figura 4). Cada uno de estos grupos se caracteriza por una magnitud definida de su relación de brazos o índice centromérico (Cuadro 1). Los grupos m y t incluyen respectivamente a los términos M (metacéntricos) y T (telocéntricos) para posiciones centroméricas estrictamente medias y terminales. Los cariotipos pueden estar constituidos por cualquier combinación de estos tipos (García-Velásquez, 1990)

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

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

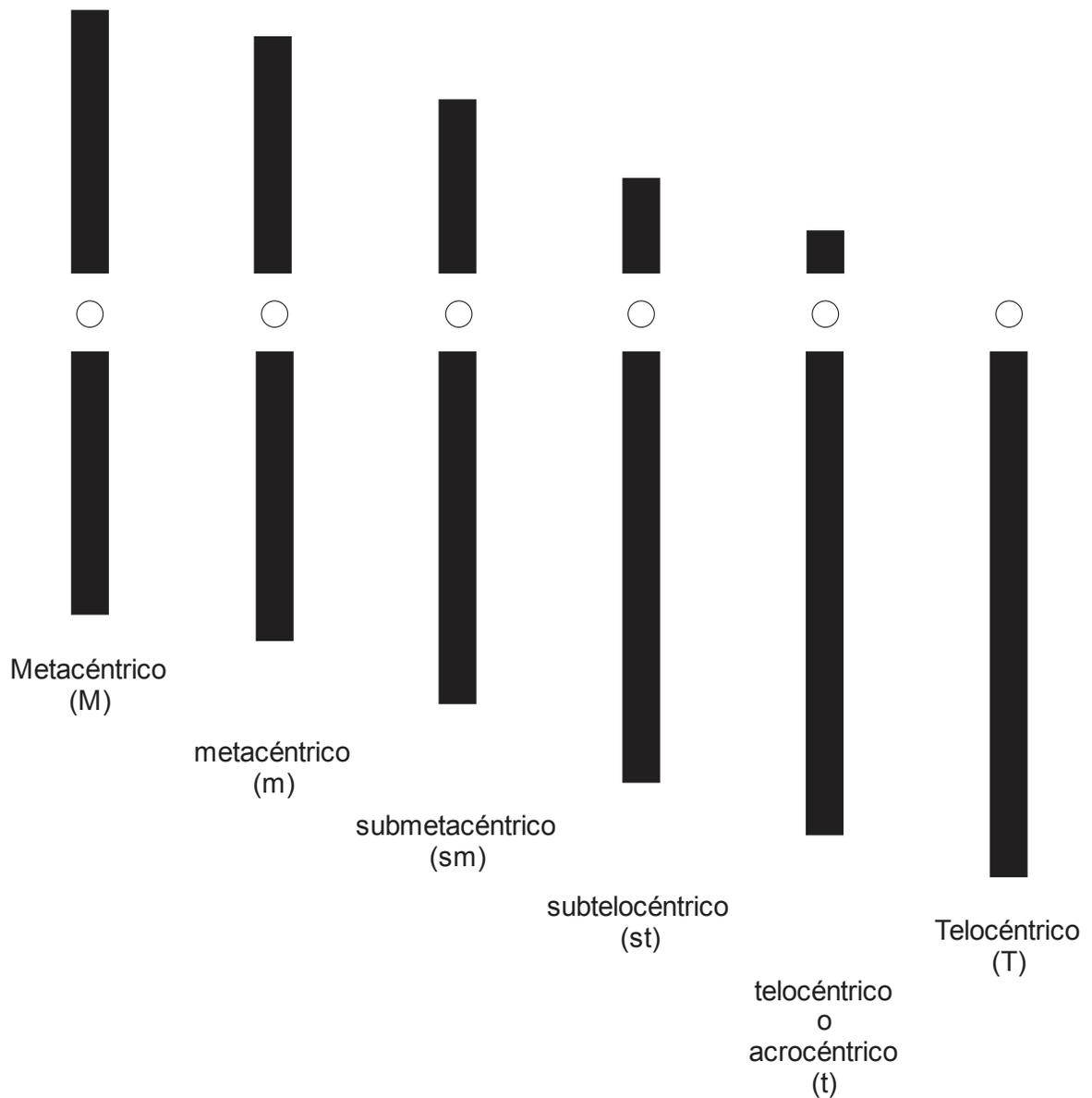


Figura 4. Representación gráfica de los diferentes tipos de cromosomas según su morfología.

2.4.4.4 Constricciones secundarias

Otro aspecto a considerar para caracterizar morfológicamente a los cromosomas es la presencia y la posición de las constricciones secundarias, así como la presencia y el tipo de satélites. En general, las primeras corresponden a regiones organizadoras de los nucléolos (NORs) y los últimos a las porciones cromosómicas distales delimitadas por la constricción secundaria y el telómero de los brazos que los portan (Figura 5). Los cromosomas que presentan satélites se denominan cromosomas SAT. Los satélites se encuentran generalmente sobre los brazos cortos y en un solo par de cromosomas del juego; sin embargo, existen excepciones para ambos aspectos (García-Velásquez, 1990; Levitus *et al.*, 2010).

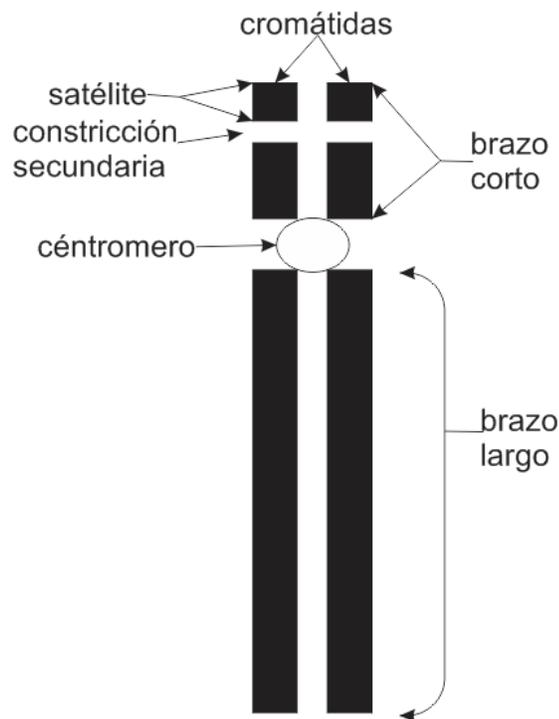


Figura 5. Representación gráfica de las partes de un cromosoma.

2.4.3 Cariotipo

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

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

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

2.4.3.1 Cariograma

El complejo cromosómico se representa mediante el arreglo de las fotomicrografías de cada uno de los cromosomas ordenándolos en forma decreciente en longitud, siendo el primer cromosoma el de mayor longitud y el último el de menor longitud (Figura 6).

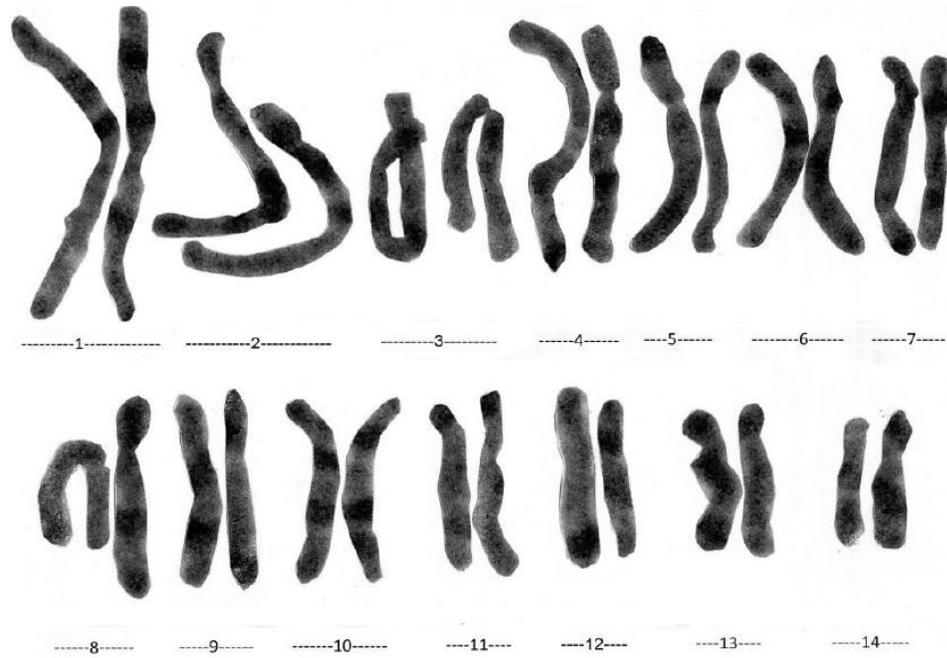


Figura 6. Cariograma de *Pseudotsuga* sp. $2n = 28$. Fuente: Cruzado-Vargas y Perea-Badillo, 2013.

2.4.3.2 Idiograma

Cada cromosoma es representado por una línea o barra en la que se indica la posición relativa del centrómero, la localización de satélite, cromómeros y otras marcas citológicas (si existen), ordenándolos en forma decreciente en longitud (Figura 7). Esta representación diagramática del cariotipo se integra con la información de varias células.

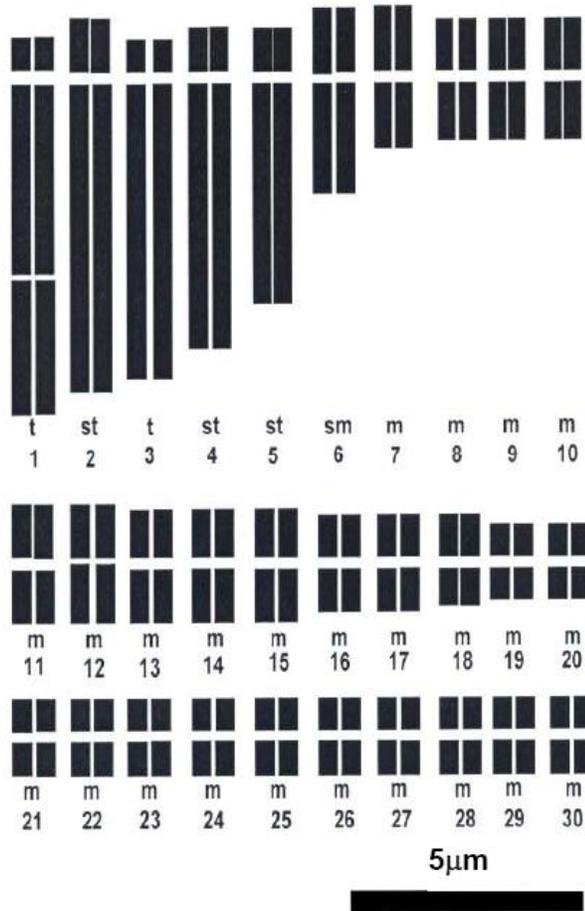


Figura 7. Idiograma de *Agave angustifolia* $2n = 60$ de la población de El Chorro. Las flechas y números indican el par de cromosomas homólogos con constricciones secundarias en los brazos largos. Fuente: Moreno-Salazar *et al.*, 2007.

2.4.4 Fórmula cariotípica

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

2.4.5 Simetría - asimetría

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

La información obtenida a partir del análisis de los cariotipos permite identificar cromosomas, clasificar los cariotipos, realizar análisis comparativos entre grupos de especies más o menos relacionadas e inferir sus tendencias evolutivas. Asimismo, permite detectar las anomalías numéricas y estructurales en los complementos cromosómicos de células o individuos (Levitus *et al.*, 2010).

2.5 Citología en el género *Tigridia*

Son muy pocos los estudios citológicos relacionados con las especies del género *Tigridia* y los que existen no abarcan todas las especies hasta ahora reportadas, sin

embargo estos nos ayudan a darnos un panorama general de su nivel de ploidía y características morfológicas de los cromosomas de algunas especies.

Molseed (1970) reportó el número cromosómico de ocho especies de *Tigridia* (Cuadro 2), haciendo referencia a diferencias, como números cromosómicos diferentes o la presencia de constricciones secundarias; observadas por diversos autores para los casos de *T. pavonia* y *T. galanthoides*, para los cuales menciona no haber explicación a dichos resultados, ya que en su estudio todas las especies tratadas presentaron $2n = 28$.

De igual manera el mismo autor reportó que las especies de *Tigridia* estudiadas, presentaron un cariotipo bimodal formado de dos pares grandes y 12 pares pequeños, mientras que en *T. pavonia* se observó la presencia de constricciones secundarias en uno de los pares de cromosomas grandes.

Cuadro 2. Número cromosómico de ocho especies de *Tigridia* (Molseed, 1970).

Especies	Número cromosómico	Fuente
Subgénero <i>Tigridia</i>		
<i>T. pavonia</i>	26	Brittingham 1934
<i>T. pavonia</i>	28	Miduino en 1937 como reportó Sakai 1952
<i>T. pavonia</i>	28	Sakai 1952
<i>T. pavonia</i>	26	Sharma y Sharma 1961
<i>T. pavonia</i>	28	Molseed
<i>T. pavonia</i>	28	Molseed
<i>T. pavonia</i>	28	Molseed
<i>T. Seleriana</i>	28	Molseed
<i>T. Seleriana</i>	28	Molseed
<i>T. mexicana</i> subsp. <i>passiflora</i>	28	Molseed
<i>T. mexicana</i> subsp. <i>passiflora</i>	28	Molseed
Subgénero <i>Hydrotaenia</i>		
<i>T. meleagris</i>	28	Molseed

Especies	Número cromosómico	Fuente
<i>T. multiflora</i>	28	Molseed
<i>T. galanthoides</i>	14	Molseed
<i>T. galanthoides</i>	28	Molseed
<i>T. vanHouttei</i>	28	Molseed
<i>T. hallbergii</i>	28	Molseed
<i>T. hallbergii</i>	28	MacDougall

Por su parte Kenton y Heywood (1983) reportaron el número cromosómico de diferentes especies de Iridaceae de América, entre ellas, cuatro especies de *Tigridia*, de las cuales tres de ellas fueron de origen Mexicano, presentando $2n = 28$, mientras que en una de origen peruano, se observó, $2n = 14$, encontrando que las cuatro especies de *Tigridia* presentan un cariotipo bimodal, formado de cuatro cromosomas grandes y 24 pequeños para las especies Mexicanas, y en el caso de la especie peruana, dos cromosomas grandes y 12 pequeños. Debido a esta discrepancia en el número cromosómico y a la similitud en cuanto a la bimodalidad de los cromosomas, los autores asumen que la subtribu *Tigridinae* pudiese tener un número básico de $x = 7$, y que aquellas especies con $2n = 28$ podrían ser alotetraploides, las cuales debido a su ascendencia híbrida, han reemplazado a los diploides. Así mismo, en el idiograma, los autores indican la presencia de constricciones secundarias para el caso de *T. pavonia*, *T. dugesii* y *T. sp.* (Figura 8) (Kenton y Heywood, 1983).

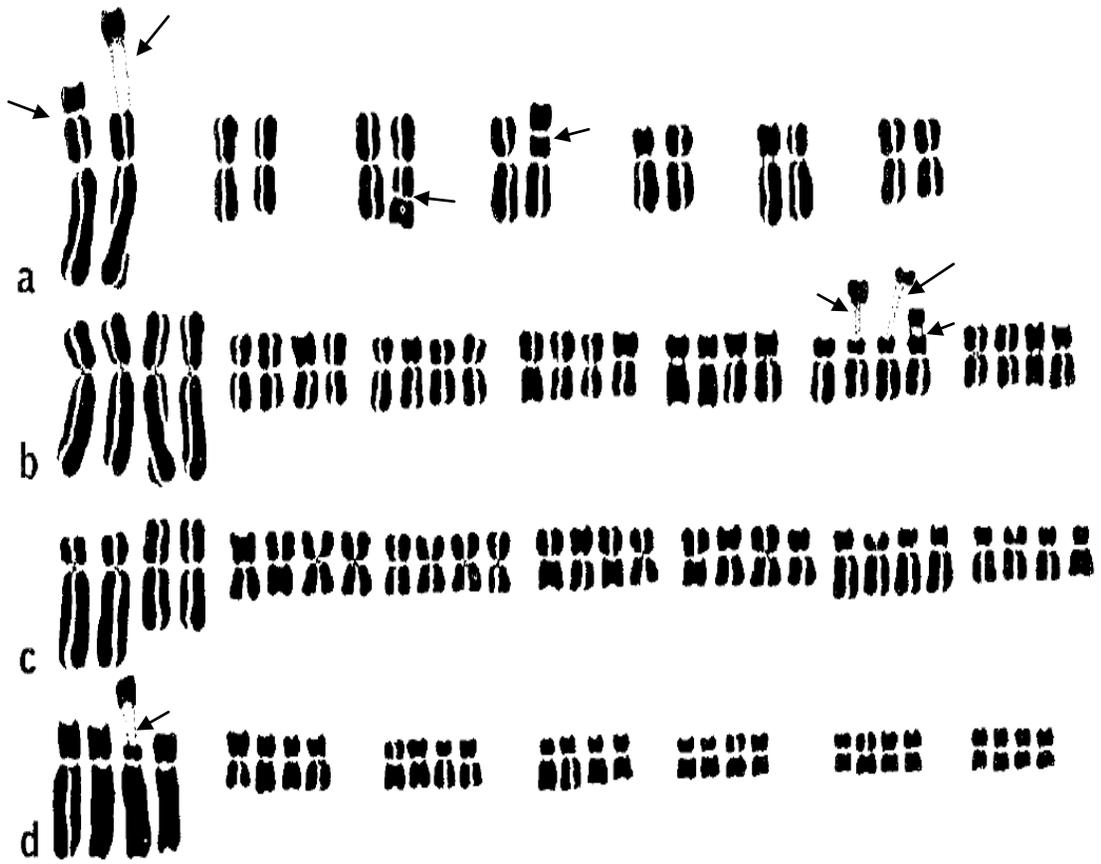


Figura 8. Cariotipos de cuatro especies de *Tigridia*, a) *T. sp.*, $2n = 14$; b) *T. pavonia*, $2n = 28$; c) *T. bicolor*, $2n = 28$; d) *T. dugesii*, $2n = 28$. Fuente: Kenton y Heywood, 1983. Las flechas indican las constricciones secundarias.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas (FCAgri), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

3.2 Material vegetativo

El material vegetativo fue proporcionado por el Dr. Luis Miguel Vázquez García Profesor-Investigador del Centro Universitario Tenancingo de la UAEMéx.

Se utilizaron semillas de tres especies de *Tigridia*: *T. pavonia* var. Trinidad, *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*. Estas fueron cultivadas *in-vitro* en medio MS al 50%. Un vez formado el bulbillo (tres - cinco meses) las plantas fueron transferidas a medio MS al 50%, adicionado con 1 g L^{-1} de carbón activado y 1 mg L^{-1} de ácido naftalén acético, a fin de inducir la brotación de nuevas raíces y que sus ápices radiculares se encontrarán en división celular activa.

3.3 Observación y clasificación de cromosomas mitóticos

La observación y clasificación de los cromosomas se hizo de acuerdo a la metodología propuesta por Palomino *et. al.* (2010).

3.3.1 Pretratamiento de ápices radiculares

Se utilizaron ápices radiculares colectados en cuatro periodos distintos (4:30 am, 5:30 am, 6:00 am y 7:00 am), los cuales fueron tratados con 8-hidroxiquinoleína (0.02 M) por 5 h en obscuridad a 18°C.

3.3.2 Fijación

Para retirar los residuos del pre-tratamiento, se lavaron los ápices radiculares, sumergiéndolos en agua destilada y después colocándolos en papel filtro, posteriormente se fijaron por 24 h en reactivo de Farmer (alcohol etílico 96 % y ácido acético glacial, 3:1 v/v) a temperatura ambiente.

3.3.3 Hidrólisis

Se lavaron los ápices radiculares y se hidrolizaron en una solución de HCl 1 N a 60 °C, durante 8 min.

3.3.4 Tinción

Los ápices radiculares se retiraron de la hidrólisis absorbiendo los restos de HCl con papel filtro y posteriormente se colocaron en reactivo de Schiff (Feulgen) durante 30 min a temperatura ambiente en obscuridad.

3.3.5 Aplastamiento celular

A un segmento de meristemo radicular de aproximadamente 0.5 mm colocado sobre un portaobjetos, se le añadió una gota de aceto-orceína 1.8% y se le colocó el cubre objetos; posteriormente se golpeó suavemente, con la punta de unas pinzas, hasta esparcir el tejido. Cuando se observaron células en metafase mitótica, se procedió a dejarlas en un solo plano (horizontal), mediante presión sobre el cubreobjetos. Las laminillas se hicieron permanentes sumergiéndolas en nitrógeno líquido por 1 min, se retiró el cubre objetos y se deshidrataron en alcohol etílico (96 %).

3.4 Elaboración del cariotipo

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

Se analizaron de 10 a 15 individuos por especie, obteniendo de dos a tres ápices radiculares por individuo, y observando de 2 a 4 células por ápice.

Las preparaciones se analizaron en un microscopio de contraste de fases, marca OLYMPUS modelo BX43, con el objetivo 100x y las fotomicrografías fueron tomadas con una cámara marca Leica modelo MC170 HD & SW Kit.

Las fotografías se utilizaron para medir los brazos cromosómicos: brazo largo (bl) y brazo corto (bc). Estos fueron medidos con el programa de la marca Leica, LAS V4.3.

La posición del centrómero y morfología de los cromosomas se definió siguiendo la metodología propuesta por Levan *et. al.* (1964), para la cual se determino:

- La relación de brazos cromosómicos (r), donde: $r = bl / bc$.

-La longitud total de cada cromosoma (LTC), donde: $LTC = bl + bc$.

-Índice centromérico (IC), donde: $IC = (bc / LTC) \times 100$.

Así mismo se definió:

- La fórmula cariotípica mediante la combinación de las posiciones centroméricas de los cromosomas, indicando con un número la cantidad de pares de cromosomas que presentan esa posición centromérica

-La longitud total del genoma (LTG), donde: $LTG = \Sigma LTC$

-El índice de asimetría (TF), donde: $TF = (\Sigma bc / LTG) * 100$

La homología cromosómica se estableció de acuerdo con las similitudes en longitud y posición centromérica, ordenándolos en forma decreciente en longitud, siendo el primer cromosoma el de mayor longitud y el último el de menor longitud.

Los idiogramas se elaboraron con el programa CorelDRAW X6 de acuerdo con los valores promedio del brazo corto y largo en cada cromosoma de cinco células de diferentes individuos por especie. Cada uno de los cromosomas fue representado por una línea o barra en la que se indicó la posición relativa del centrómero y la localización de las constricciones secundarias.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de hora de colecta.

En el presente estudio, una vez analizadas las fotomicrofotografías se determinó que el mejor tiempo para coleccionar los ápices radiculares fue a las 5:30 am (Figura 9), ya que en este periodo, en todas las especies de *Tigridia* estudiadas se logró observar una mayor cantidad de células con cromosomas en metafase mitótica, facilitando así su análisis. Al respecto Alcorcés-de-Guerra (2002) menciona que la hora mitótica es un parámetro muy variable entre especies, y dentro de éstas es característico para cada especie y más aún para genotipos infraespecíficos, aunque esto no implica que especies diferentes no puedan mostrar la misma hora mitótica, como ha sido observado en *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* D'Arcy & Eshbaugh, ya que se encontró que su rango de hora mitótica es de 5:00 a.m. a 6:00 a.m, periodo similar al presentado por las especies de *Tigridia*.

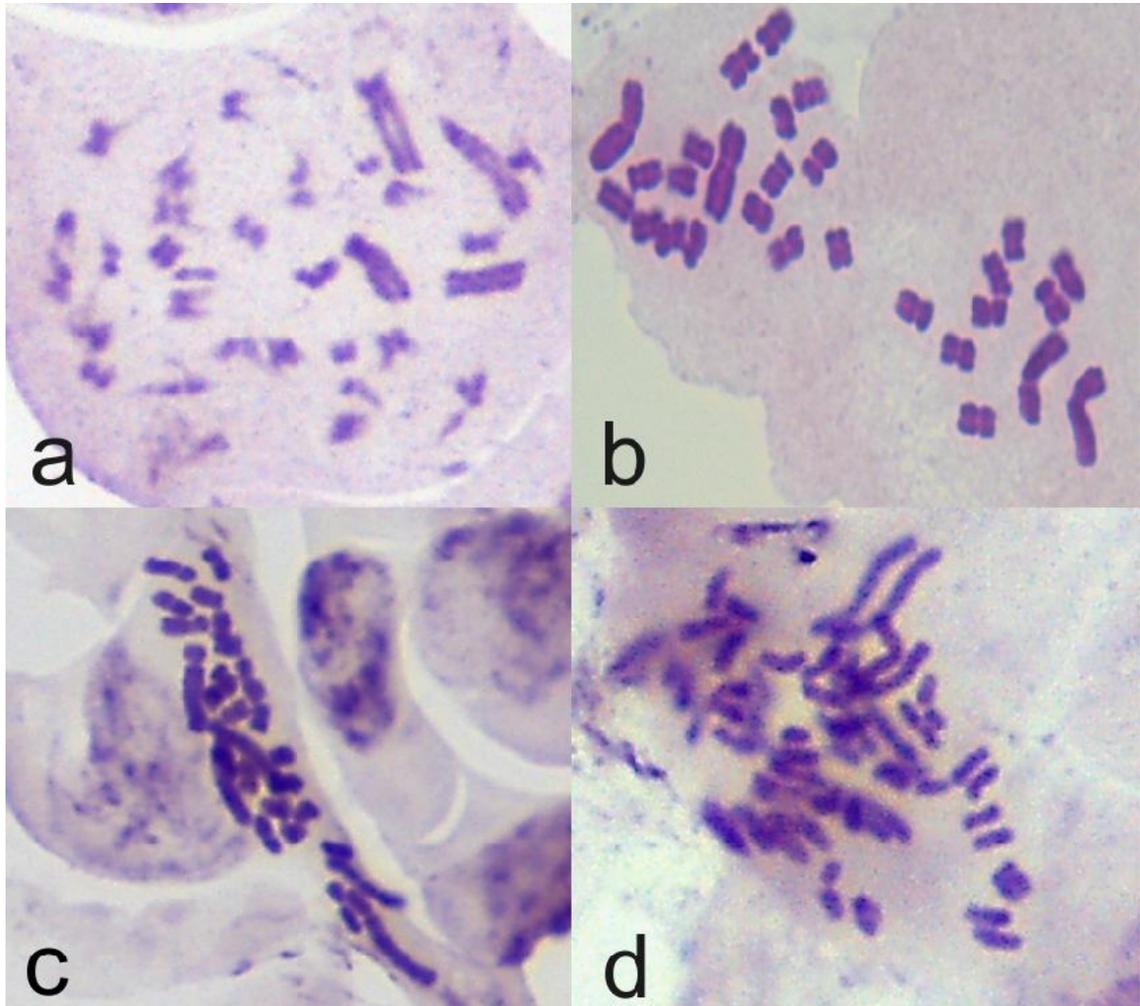


Figura 9. Células de ápices radiculares de *T. pavonia* con cromosomas en arresto mitótico, colectados en diferentes horas. a) 4:30 am; b) 5:30 am; c) 6:00 am; d) 7:00 am. Obsérvese la mayor condensación de los cromosomas en las células colectadas a las 5:30.

4.2 Cariotipo

Las tres especies de *Tigridia* estudiadas presentaron un número cromosómico de $2n = 28$, y mostraron un cariotipo bimodal formado por cuatro cromosomas grandes y 24 pequeños, lo que concuerda con las especies de *Tigridia* estudiadas por Molseed (1970) y Kenton y Heywood (1983).

Al respecto Moreno-Salazar *et al.* (2007), estudiando especies de *Agave*, reportaron que estas presentaron cariotipos bimodales formados por un grupo de cinco pares de cromosomas grandes y 25 pequeños, atribuyendo esta característica a un proceso de evolución natural llamado “orto-selección” el cual, según Brandham y Doherty (1998), consiste en la ampliación de regiones de ADN que no codifican genes, en sitios distribuidos entre las regiones de entrecruzamiento en los cromosomas del complemento, lo que da como resultado un número básico (x) uniforme y cariotipos en los que se mantiene el grupo de cromosomas grandes y pequeños. Así mismo, Castorena-Sánchez *et al.* (1991), al analizar el cariotipo de cinco taxones diploides y poliploides de *Agave*, observaron que, independientemente de la poliploidía, se mantienen los cariotipos bimodales, plateando que el proceso de especiación en *Agave* se debió a rearrreglos estructurales y a mutaciones puntuales en el grupo de cromosomas pequeños del complemento, explicando así dicho fenómeno. Estos procesos podrían explicar el hecho de que las especies del género *Tigridia* hasta ahora reportadas presenten el mismo tipo de cariotipo bimodal en todas las especies hasta ahora estudiadas.

A pesar de que las tres especies de *Tigridia* analizadas presentaron el mismo número cromosómico y bimodalidad en el cariotipo, cada una presentó características morfológicas y formulas cariotípicas diferentes, como se explica a continuación.

4.2.3 *T. pavonia*

Esta especie mostró un cariotipo formado por 25 cromosomas metacéntricos y 3 submetacéntricos, presentando heteromorfismo en el par tres. De igual manera, se puede apreciar que todos los pares de cromosomas variaron en cuanto a tamaño y proporción (Figura 10, 11; Anexo 1), pudiéndose apreciar constricciones secundarias en el cromosoma 7 y 18. Nuestros resultados son contradictorios con aquellos reportados por Molseed (1970) el cual menciona que encontró constricciones secundarias sólo en uno de los pares grandes; y con lo mencionado por Kenton y Heywood (1983), quienes reportaron constricciones secundarias en los cromosomas 22, 23 y 24, estas diferencias muy probablemente surgieron debido al empleo de variedades diferentes para cada estudio, ya que ninguno de los autores hizo mención de dicho dato.

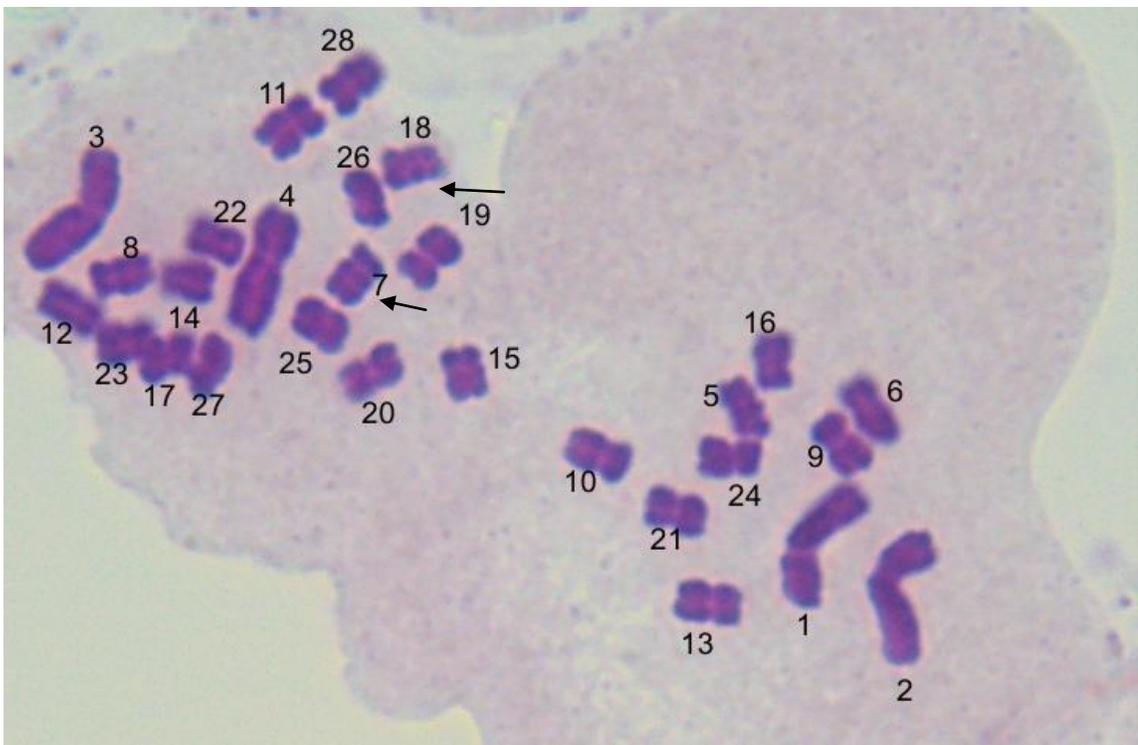


Figura 10. Célula de *T. pavonia* con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$, las flechas indican los cromosomas que presentan constricción secundaria.

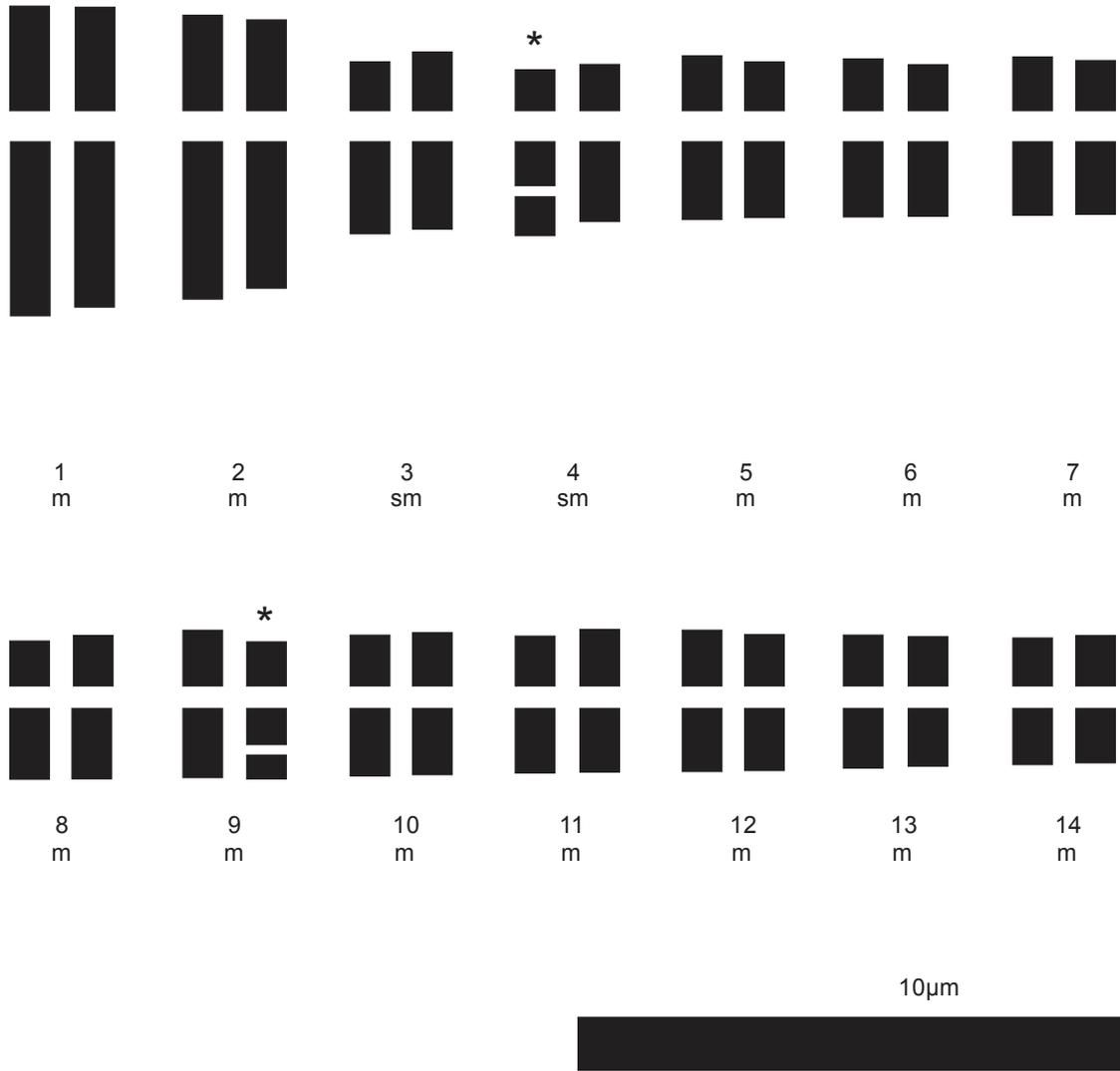


Figura 11. Idiograma de *T. pavonia* con fórmula cariotípica de 25m + 3sm. Los asteriscos indican los cromosomas que presentan constricción secundaria.

4.2.4 *T. multiflora*

Presentó una fórmula cariotípica con 2 cromosomas Metacéntricos, 14 metacéntricos, 8 submetacéntricos y 4 subtelocéntricos, mostrando heteromorfismo en seis pares de cromosomas (5, 6, 7, 11, 12 y 14), aunque de igual manera los demás pares cromosómicos presentaron diferencias visibles en cuanto a tamaño y proporción (Figura 12, 13; Anexo 2). No se observaron constricciones secundarias.

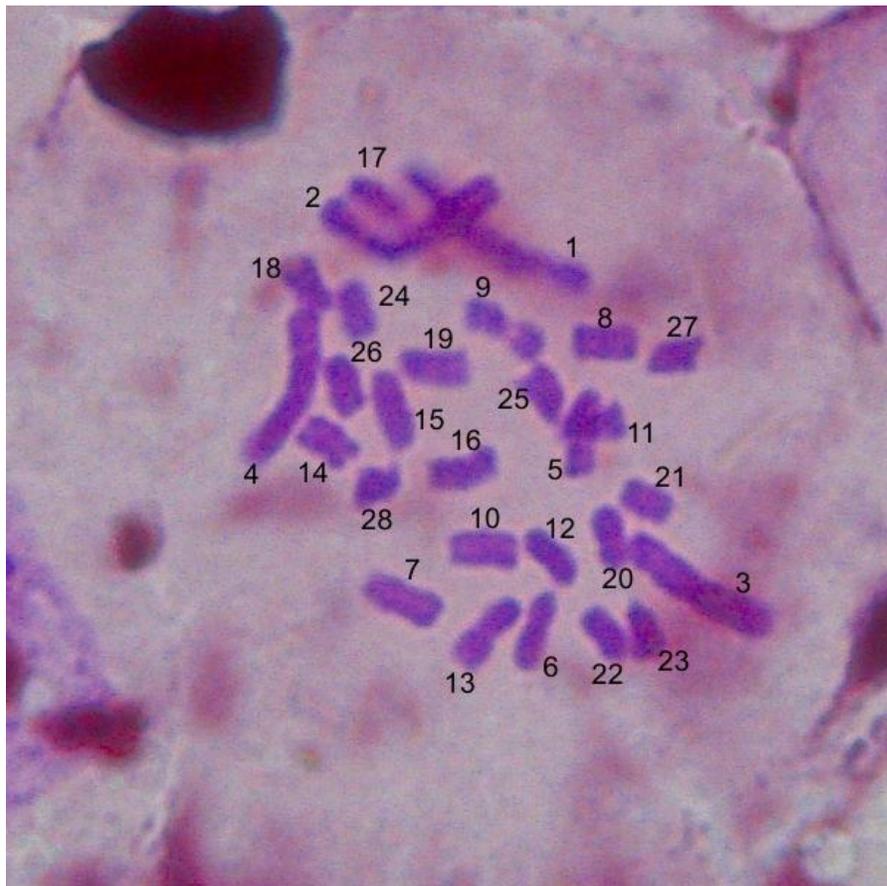


Figura 12. Célula de *T. multiflora* con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$.

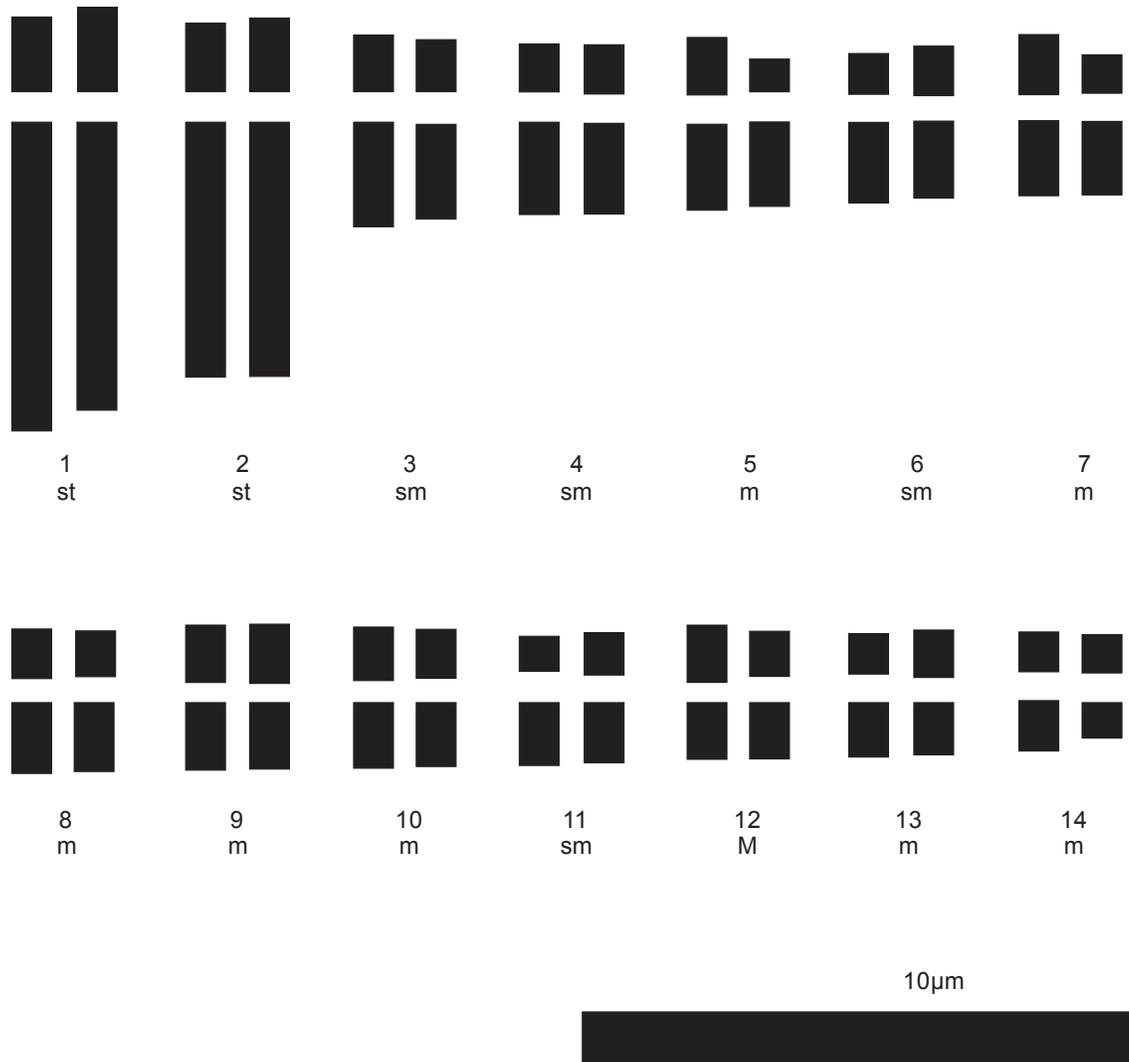


Figura 13. Idiograma de *T. multiflora* con fórmula cariotípica de $2M + 14m + 8sm + 4st$.

4.2.5 *T. alpestris* subsp. *obtusa*

Exhibió una fórmula cariotípica de 17 cromosomas metacéntricos, 8 submetacéntricos y 3 subtelocéntricos, presentando heteromorfismo en seis pares de cromosomas (2, 3, 4, 6, 9 y 13), pero al igual que las otras especies estudiadas, los restantes pares cromosómicos presentaron diferencias visibles en cuanto a tamaño y proporción (Figura 14, 15; Anexo 3). En esta especie tampoco se observaron constricciones secundarias.

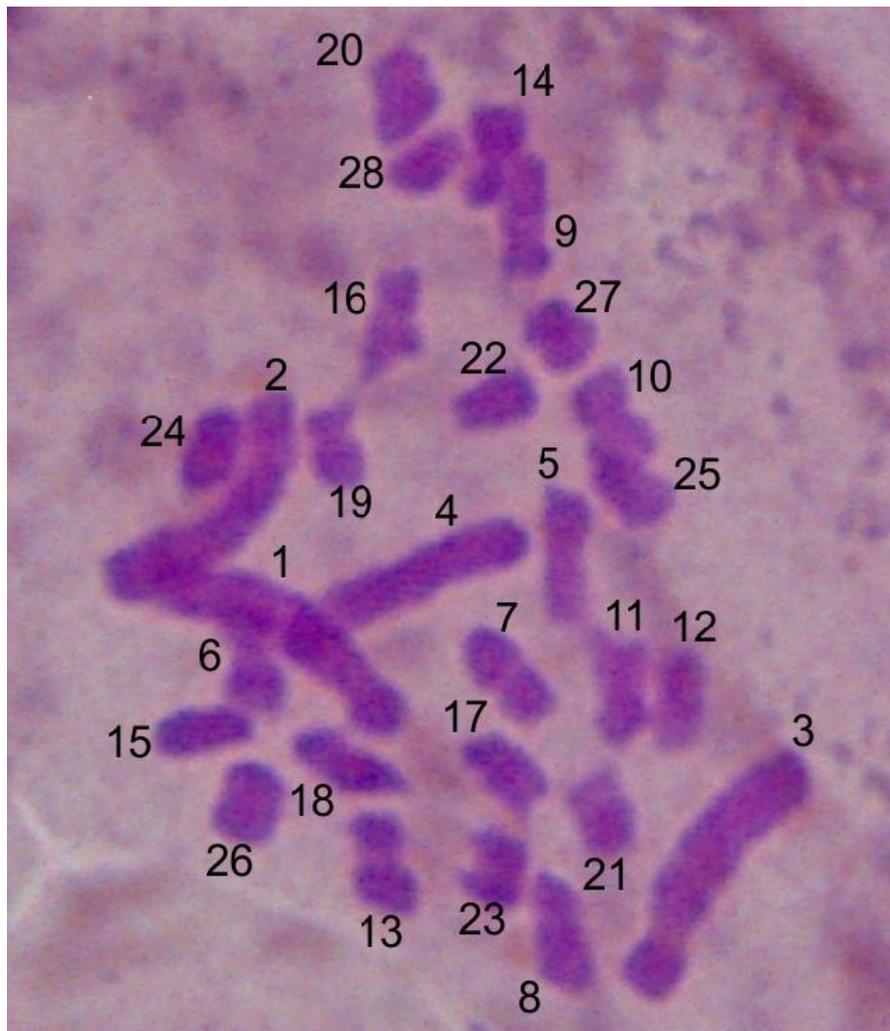


Figura 14. Célula de *T. alpestris* subsp. *obtusa* con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$.

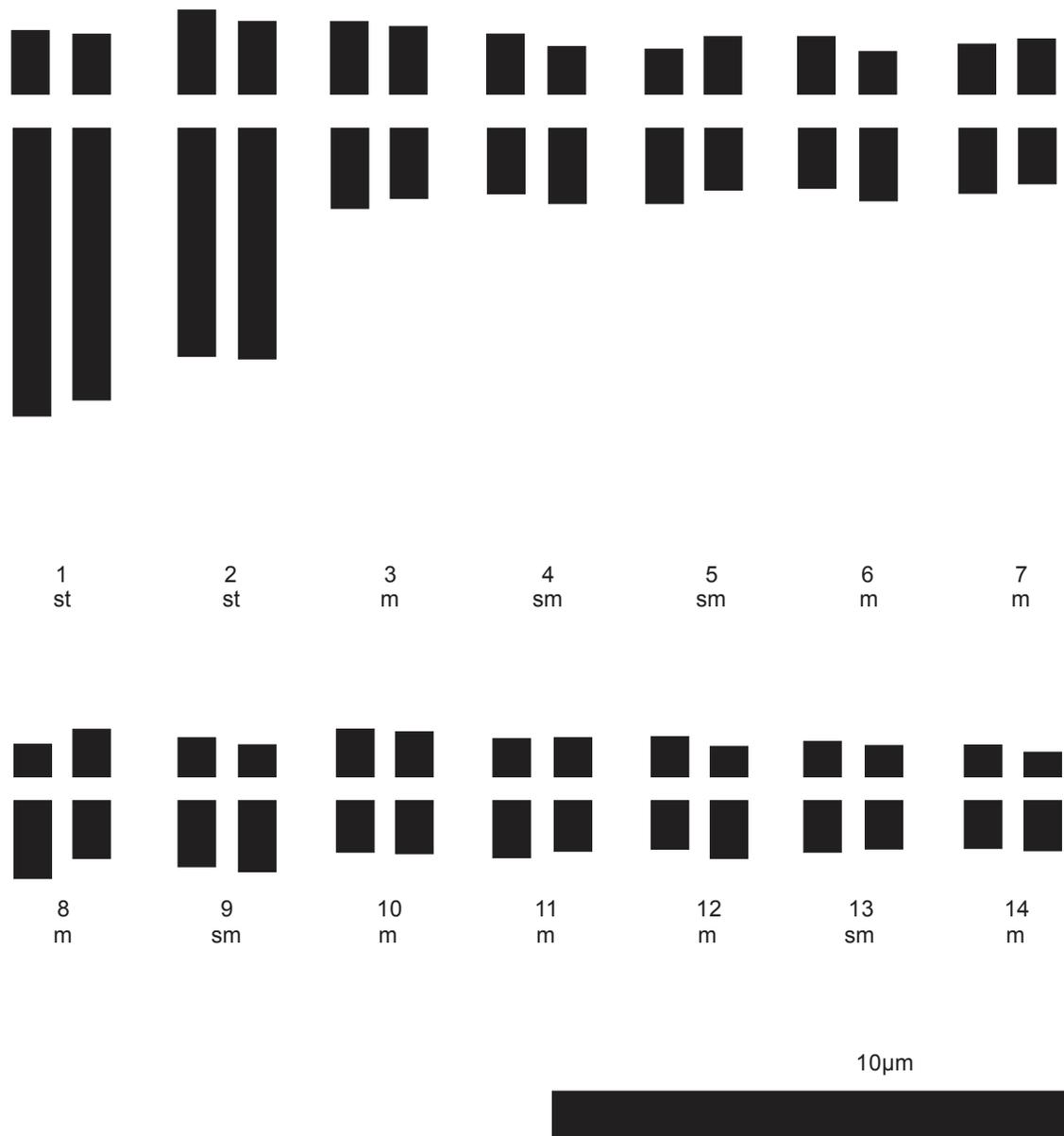


Figura 15. Idiograma de *T. alpestris* subsp. *obtusa* con fórmula cariotípica de 17m + 8sm + 3st.

4.2.6 Discusión general

Como se puede observar existe una gran diferencia en cuanto a las fórmulas cariotípicas de las especies. Así mismo la simetría cromosómica, índice de asimetría (TF%) y la Longitud Total del Genoma (LTG) presentaron valores muy contrastantes (Cuadro 3). *T.*

pavonia mostró un cariotipo con mayor simetría, presentando una alta cantidad de cromosomas metacéntricos, en contraste con *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*, que presentaron un cariotipo menos simétrico mostrando mayor cantidad de cromosomas submetacéntricos y subtelocéntricos. Al respecto Levitzky (1931) y Stebbins (1958) mencionan que los cariotipos con un mayor grado de simetría son más primitivos que los cariotipos asimétricos (Calderón-Olascoaga y Farias-Chagoya, 2011). Esto sugiere que *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*, son especies más evolucionadas que *T. pavonia*. Explicando así porque las especies de *T. pavonia*, se encuentran distribuidas en una zona más amplia que las otras especies. A lo que Díaz-de-la-Vega *et al.* (2007), comenta que, el endemismo es resultado de la combinación de evolución y aislamiento geográfico. Así mismo con respecto al TF% se aprecia nuevamente que *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa* no presentan variaciones significativas, en contrastes con *T. pavonia*, mientras que en la LTG, ocurrió lo contrario: *T. pavonia* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*, no presentaron diferencias significativas, a diferencia de *T. multiflora*, lo que de acuerdo a Moreno-Salazar *et al.* (2007), podría indicar que el arreglo lineal de los genes en los cromosomas es diferente en las tres especies.

Cuadro 3. Cariotipo de *T. pavonia*, *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*.

Especie	Número cromosómico 2n	Fórmula cariotípica	(LTG) µm	TF%
<i>T. pavonia</i>	2n = 28	25m + 3sm	69.560	40.834
<i>T. multiflora</i>	2n = 28	2M + 14m + 8sm + 4st	74.647	34.091
<i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i>	2n = 28	17m + 8sm + 3st	71.527	35.198

El análisis comparativo de los cariotipos puede mostrar diferencias entre las especies y también puede dar indicios de cómo surgieron estas diferencias en el curso de la evolución (García- Velásquez, 1990) Así los resultados obtenidos en este estudio, podrán servir para futuros estudios taxonómicos, sistemáticos y de mejoramiento genético de las especies de *Tigridia*, recurso fitogenético importante en México.

V. CONCLUSIONES

-Se determinó que la mejor hora de colecta para obtener células en metafase mitótica para las tres especies de *Tigridia* fue a las 5:30 am.

-Se estableció el número cromosómico de *T. pavonia*, *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa* con $2n = 28$.

-Se observó que todas las especies estudiadas de *Tigridia*, conservan un cariotipo bimodal formado por 4 cromosomas grandes y 24 pequeños.

-Se logró determinar el cariotipo de:

-*T. pavonia*, con formula cariotípica de $25m + 3sm$, presentando constricciones secundarias en los cromosomas 7 y 18.

- *T. multiflora* con formula cariotípica de $2M + 14m + 8sm + 4st$

- *T. alpestris* subsp. *obtusa* con formula cariotípica de $17m + 8sm + 3st$, ambas sin constricciones secundarias visibles.

-*T. pavonia* mostró un cariotipo más simétrico que *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*.

- *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa* presentaron un TF% menor que *T. pavonia*.

-*T. pavonia* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*, no presentaron diferencias significativas en la LTG a diferencia de *T. multiflora*.

VI. ANEXOS

Anexo 1. Promedio de las longitudes y clasificación de cada cromosoma en *T. pavonia*. LTC: Longitud total de cada cromosoma; LTG: Longitud Total del Genoma; bc: brazo corto; bl: brazo largo; C.S.: Constricciones Secundarias; r: Relación de brazos cromosómicos; IC: índice Centromérico.

No. C.	LTC	Longitud (μm)		CS	r	IC	Clasificación
		bl	Bc				
1	4.9252	3.076	1.849		7.081	37.539	m
2	4.7520	2.922	1.830		6.832	38.513	m
3	4.4694	2.781	1.688		6.425	37.774	m
4	4.1951	2.589	1.606		6.031	38.290	m
5	2.4911	1.626	0.865		3.581	34.715	sm
6	2.5819	1.544	1.038		3.712	40.186	m
7	2.1884	1.465	0.724	0.778	3.146	33.075	sm
8	2.2299	1.411	0.819		3.206	36.730	sm
9	2.3482	1.376	0.972		3.376	41.388	m
10	2.2028	1.341	0.862		3.167	39.135	m
11	2.2439	1.329	0.915		3.226	40.786	m
12	2.1314	1.317	0.815		3.064	38.230	m
13	2.2493	1.299	0.950		3.234	42.257	m
14	2.1725	1.284	0.888		3.123	40.879	m
15	2.0477	1.253	0.795		2.944	38.817	m
16	2.1369	1.244	0.893		3.072	41.788	m
17	2.2076	1.222	0.986		3.174	44.646	m
18	1.9854	1.204	0.781	0.640	2.854	39.342	m
19	2.0916	1.193	0.899		3.007	42.976	m
20	2.1111	1.170	0.942		3.035	44.601	m
21	2.0226	1.140	0.882		2.908	43.620	m
22	2.1284	1.127	1.001		3.060	47.039	m
23	2.1017	1.115	0.987		3.021	46.968	m
24	2.0051	1.098	0.908		2.883	45.259	m
25	1.9545	1.055	0.900		2.810	46.024	m
26	1.8942	1.023	0.871		2.723	45.977	m
27	1.8419	0.993	0.849		2.648	46.088	m
28	1.8503	0.960	0.891		2.660	48.141	m
LTG	69.560						

Anexo 2. Promedio de las longitudes y clasificación de cada cromosoma en *T. multiflora*. LTC: Longitud total de cada cromosoma; LTG: Longitud Total del Genoma; bc: brazo corto; bl: brazo largo; C.S.: Constricciones Secundarias; r: Relación de brazos cromosómicos; IC: índice Centromérico.

No. C.	LTC	Longitud (μm)		CS	r	IC	Clasificación
		bl	bc				
1	6.7447	5.432	1.313		4.137	19.467	st
2	6.5513	5.066	1.485		3.412	22.667	st
3	5.6910	4.485	1.206		3.719	21.191	st
4	5.7671	4.472	1.295		3.454	22.450	st
5	2.8360	1.840	0.996		1.846	35.132	sm
6	2.5835	1.668	0.915		1.822	35.432	sm
7	2.4663	1.624	0.843		1.927	34.167	sm
8	2.4657	1.598	0.867		1.843	35.176	sm
9	2.5257	1.513	1.012		1.495	40.082	m
10	2.0623	1.486	0.576		2.578	27.946	sm
11	2.1350	1.418	0.717		1.979	33.568	sm
12	2.2257	1.355	0.871		1.555	39.134	m
13	2.3787	1.320	1.058		1.248	44.493	m
14	1.9690	1.293	0.676		1.911	34.349	sm
15	2.1193	1.246	0.873		1.427	41.208	m
16	2.0170	1.212	0.805		1.507	39.894	m
17	2.1970	1.188	1.009		1.177	45.941	m
18	2.2110	1.169	1.042		1.123	47.113	m
19	2.0953	1.154	0.942		1.225	44.941	m
20	1.9863	1.124	0.862		1.304	43.397	m
21	1.7213	1.105	0.616		1.794	35.786	sm
22	1.8037	1.058	0.746		1.418	41.360	m
23	2.0040	0.997	1.007		0.990	50.250	M
24	1.7847	0.990	0.794		1.247	44.509	m
25	1.6687	0.957	0.712		1.344	42.669	m
26	1.7537	0.919	0.835		1.100	47.615	m
27	1.5857	0.886	0.700		1.266	44.124	m
28	1.2971	0.623	0.674		0.925	51.936	M
LTG	74.647						

Anexo 3. Promedio de las longitudes y clasificación de cada cromosoma en *T. alpestris* subsp *obtusa*. LTC: Longitud total de cada cromosoma; LTG: Longitud Total del Genoma; bc: brazo corto; bl: brazo largo; C.S.: Constrictiones Secundarias; r: Relación de brazos cromosómicos; IC: índice Centromérico.

No. C.	Longitud (μm)			C.S.	r	IC	Clasificación
	LTC	bl	bc				
1	6.544	5.360	1.184		4.527	18.093	st
2	6.180	5.062	1.118		4.528	18.091	st
3	5.816	4.25	1.566		2.714	26.926	st
4	5.650	4.296	1.354		3.173	23.965	sm
5	2.844	1.492	1.352		1.104	47.539	m
6	2.566	1.305	1.261		1.035	49.143	sm
7	2.339	1.219	1.12		1.088	47.884	sm
8	2.287	1.401	0.886		1.581	38.741	m
9	2.240	1.401	0.839		1.670	37.455	sm
10	2.224	1.151	1.073		1.073	48.246	sm
11	2.191	1.118	1.073		1.042	48.973	m
12	2.144	1.351	0.793		1.704	36.987	sm
13	2.143	1.211	0.932		1.299	43.490	m
14	2.063	1.034	1.029		1.005	49.879	m
15	2.058	1.451	0.607		2.390	29.495	m
16	1.961	1.076	0.885		1.216	45.130	m
17	1.958	1.23	0.728		1.690	37.181	sm
18	1.921	1.324	0.597		2.218	31.078	m
19	1.851	0.961	0.89		1.080	48.082	m
20	1.827	0.987	0.84		1.175	45.977	m
21	1.775	1.064	0.711		1.496	40.056	m
22	1.672	0.943	0.729		1.294	43.600	m
23	1.652	0.905	0.747		1.212	45.218	m
24	1.643	1.076	0.567		1.898	34.510	m
25	1.620	0.961	0.659		1.458	40.679	sm
26	1.484	0.9	0.584		1.541	39.353	m
27	1.483	0.89	0.593		1.501	39.987	m
28	1.391	0.932	0.459		2.031	32.998	m
LTG	71.527						

VII. GLOSARIO¹

Aneuploide: Cuyo número es mayor o menor que un múltiplo exacto del número cromosómico haploide o dosis génica haploide; anomalías cromosómicas que distorsionan la dosis génica relativa, como las deleciones.

Alopoliploide, aloploide: Poliploide producido a partir de un híbrido entre dos o más especies distintas y que por lo tanto posee dos o más juegos cromosómicos.

Autopoliploide, autoploide: Organismo que tiene más de dos juegos completos de cromosomas homólogos, poliploide en el que todos los juegos cromosómicos provienen de una única especie.

Críptico: Especies muy similares en el aspecto externo pero que normalmente no hibridan.

Cinetocoro: Región fibrilar que se tiñe intensamente en el centrómero de un cromosoma, a la que se unen los microtúbulos del huso durante la meiosis o la mitosis.

Cromosoma: En las células eucarióticas, estructura que se compone de DNA asociado con proteínas y que lleva la información genética. Los cromosomas son visibles al microscopio óptico, en la mitosis y en la meiosis, como pequeñas estructuras con forma de bastón teñidas intensamente. En otras fases del ciclo celular los cromosomas son estructuras filamentosas que se encuentran en el núcleo. En la interfase del ciclo celular, antes de la replicación del DNA, cada cromosoma consta de una única y larga molécula de DNA asociada con histonas (también con proteínas no histónicas) formando la cromatina: Los cromosomas que entran en mitosis o en meiosis han replicado su DNA con lo que se componen de dos moléculas idénticas de DNA (las dos cromátidas) que se mantienen juntas. Cada especie tiene una dotación cromosómica característica que

¹ Términos tomados del Diccionario Akal de Términos Biológicos. Para mayor amplitud de los términos utilizados en el presente trabajo, consultar: Lawrence, E. (ed.). (2003). Diccionario Akal de Términos Biológicos. Akal ediciones, España. 688 pp.

generalmente se distingue de las de otras especies en la forma, tamaño y número de los cromosomas correspondientes.

Diploide: Organismos cuyas células (que no sean los gametos) tiene dos juegos de cromosomas y, por lo tanto, dos copias del complemento genético básico de la especie. Se designa como $2n$.

DNA: Ácido desoxirribonucleico, una molécula lineal muy larga que actúa como almacén de la información genética de todas las células. Contiene carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y fósforo. Una molécula de DNA se compone de dos cadenas de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente, una única molécula puede estar formada por millones de nucleótidos. Las dos cadenas se enrollan entre sí formando la doble hélice dextrógira de Watson y Crick. Los cuatro tipos de desoxirribonucleótidos del DNA tienen las bases adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). Cada cadena se compone de nucleótidos unidos covalentemente mediante enlaces esterfosfóricos que se repiten regularmente, los enlaces se producen entre el grupo hidroxilo del C5 de una desoxirribosa y el grupo fosfato del C3 de otra desoxirribosa. Las dos cadenas son exactamente complementarias en sus secuencias de bases y se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno específicos entre las A de una cadena y las T de la otra y entre las C de una cadena y las G de la otra. La información genética está codificada en la secuencia de bases a lo largo de las cadenas polinucleotídicas, constituyendo un código genético que dirige la síntesis de RNA y proteínas. En las células eucarióticas el ADN se acompleja con histonas formando la cromatina, la cual se empaqueta junto con otras proteínas dando lugar a cromosomas discretos. La replicación del DNA es semiconservativa, las dos hebras de la doble hélice se separan y dos nuevas hebras complementarias se sintetizan utilizando las viejas como moldes.

Endémico: Restringido a una determinada región o parte de una región.

Filogenia: Historia evolutiva y línea de descendencia de una especie o grupo taxonómico superior.

Gameto: Célula reproductora haploide producida por meiosis que se fusiona con otra del sexo, o del tipo de apareador, opuesto para dar lugar a un cigoto diploide.

Genoma: la totalidad de los distintos genes de un organismo o de un virus. El genoma de un organismo diploide generalmente hace referencia al conjunto haploide de los genes; a veces se utiliza para referirse al contenido total de ADN de un núcleo.

Haploide: Células que tienen un juego de cromosomas que representa el complemento básico de la especie, se suelen designar como n .

Heterocigótico: Organismo, célula o núcleo diploide, que tiene dos alelos diferentes en un locus determinado.

Homocigótico: Célula, organismo o núcleo diploide que tiene dos alelos idénticos en un locus determinado.

Índice mitótico: el número de células que se encuentran en mitosis por cada mil observadas

Mucro: Terminación puntiaguda de un órgano u otra estructura.

Paquitena: Fase de la primera profase meiótica en la que los cromosomas homólogos están ya asociados por completo, formando bivalentes.

Ploidía: número de cromosomas o de moléculas de ADN de una célula o de un orgánulo; el número cromosómico típico de una especie.

Poliploide: Que tiene más de dos juegos cromosómicos, por ej. el triploide tiene 3, el tetraploide 4.

Purina: Tipo de base orgánica nitrogenada. La adenina y la guanina son las más comunes en las células.

Taxón: los miembros de cualquier grupo taxonómico, por ej. una especie, un género o una familia.

Taxonomía: Análisis de las características de un organismo con el propósito de clasificarlo.

Telómero: El extremo de un cromosoma, que se compone de elementos estructurales especiales de ADN responsables del «sellado» de los extremos de los cromosomas, evitando así que se fusionen con los de otros cromosomas. Los telómeros están formados por secuencias de ADN repetidas e invertidas, se replican mediante un mecanismo especial, en el que está implicado la telomerasa, distinto del mecanismo por el que se replica la mayoría del ADN cromosómico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcorcés-de-Guerra, N. 2002. Cariología de Dos Especies del Género *Tabebuia* Gomez (Bignoniaceae). Revista Científica UDO Agrícola: 2(1): 14-21pp.
2. Borys, M. W.; Leszczyńska-Borys, H. y Galván, J. L. 2000. Continuity of roots emergence and growth in *Tigridia pavonia* Ker. Gawl. Revista Chapingo Serie Horticultura: 6(1): 57-61 pp.
3. Castañeda-Nava, J. J.; Santacruz-Ruvalcaba, F. y Barba-González, R. 2012. Análisis citogenético y estomático para determinar los niveles de ploidía en camote de cerro (*Dioscorea* spp.). Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Zapopan, Jalisco.
4. Calderón-Olascoaga, J. A. y Farías-Chagoya, H. A. 2011. Análisis Citogenético Comparativo entre dos Especies del Género *Diospyros* (*Ebanaceae*). Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. Morelia, Michoacán.
5. Cruzado-Vargas, A. N. y Perea-Badillo, L. 2013. Estudio cariotípico de *Pseudotsuga* sp., en una localidad del centro de México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. División de Ciencias Forestales. Chapingo, México.

6. Díaz-de-la-Vega, P. J.; Jiménez-Toboso, F.; López-Alija, T.; Lorenzo-Hernández, C.; Marcos-Vega, A.; Noriega-Galán, J.; Sánchez-González, R.; Aguado-Ruiz, I.; Blázquez-Blázquez, R.; García-de-Álvaro, I.; Salinas-Lozano, M. I. y Valle-Benito, M. 2007. Estudio comparativo de las laderas norte y sur de la Sierra de Gredos. http://www.jpimentel.com/ciencias_experimentales/pagwebciencias/pagweb/estudio_comparativo_gredos/endemismos/endemismos_flora.htm. Consultado el 19 de mayo de 2014.
7. Elorrieta-Jove, A. y Benito-Jiménez, C. 1993. Caracterización y análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de Tenca. Tesis de doctorado. Universidad Complutense De Madrid. Facultad de Biología. Madrid, España.
8. Espejo, S. A. y López-Ferrari, A. R. 1996. Comentarios florístico ecológicos sobre las Iridaceas mexicanas. *Acta Botánica Mexicana* 34: 25-47.
9. Ferrer-Pereira, H. E.; Alcorcés-De-Guerra, N. C. y Méndez-Natera, J. R. 2007. Determinación del ciclo mitótico de dos cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y dos ecotipos de *Gossypium barbadense* L. *Acta Biol. Par., Curitiba*, 36 (3-4): 121-149 pp.
10. García-Velázquez, A. 1990. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Talleres Gráficos de la Nación. México, D.F. 137 pp.

11. Hoyos-Basurto, A. y Amaury-Martín, A. M. 2006. Caracterización isoenzimática de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L. F.) Ker. Gawl. Anteproyecto de tesis. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Toluca, Estado de México.
12. Kenton, A. y Heywood, C. A. 1983. Cytological Studies in South American Iridaceae. *Plant systematic and evolution* 146: 87-104.
13. Lawrence, E. (ed.). (2003). Diccionario Akal de Términos Biológicos. Akal ediciones, España. 688 pp.
14. Levan, A.; Fredga, K. y Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes, Genetics Institute, Lund, Suecia, and Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, N.Y., U.S.A.
15. 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.
16. Marcela-Delgado, L.; Uribe-Lastra, M. y Marulanda-Angel, M. L. 2010. Estandarización de la técnica citogenética "squash" para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia Et Technica*: 17 (46): 74-79 pp.

17. Molseed, E. 1970. The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley. 54: 1-126.
18. Moreno-Salazar, S. F.; Esqueda, M.; Martínez, J. y Palomino, G. 2007. Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *Agave. rhodacantha* de Sonora, México. Revista de Fitotecnia. México. Vol. 30 (1): 13 - 23.
19. Palomino-Hasbach, G. 1995. Estudios Citogenéticos de Plantas Mexicanas. plantas, Biotecnología - Agronomía - Nutrición. Libro de memorias, VI semana del conocimiento. Cuautla, Morelos.
20. Palomino-Hasbach, G.; Martínez, J. y Méndez, I. 2010. Análisis del tamaño del genoma y cariotipo de *Agave aktites* Gentry (Agavaceae) de Sonora, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 81: 655 - 662.
21. Piña-Escutia, J. L.; Vences-Contreras, C.; Gutiérrez-Martínez, M. G.; Vázquez-García, L. M. y Arzate-Fernández, A. M. 2010. Caracterización morfológica y molecular de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. Agrociencia, 44 (2): 147-158.
22. Rodríguez, A.; Ortiz-Catedral, L. y Heaton, E. 2003. Tres nuevas localidades de tigrídias endémicas de México: *Tigridia bicolor*, *T. matudae* y *T. vanhouttei* ssp. Roldanii. Acta Botánica Mexicana 62: 1-8 pp.

23. Rodríguez, A. y Sytsma, K. J. 2005. Phylogenetics of the “tiger-flower” group (Tigridieae: Iridaceae): molecular and morphological evidence. *The Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont* 22(1): 412–424 pp.
24. Vázquez-García, L. M.; Arzate-Fernandez, A. M.; Rodríguez-Contreras, A.; Munguia-Lino, G.; Mejia-Carranza, J.; Piña-Escutia, J. L.; Palma-Linares, V.; Castañeda-Casa, M.; Castañeda, E. S.; Sumano-Gil, M.; Peña-V., R. y Méndez, S. 2011. *Catalogo de Tigrídias Mexicanas. SINAREFI Red Tigridia.*