



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.



Caracterización citogenética y determinación
del cariotipo de *Hippeastrum vittatum* 'Red
Giant'.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

RICARDO BRYAN KOSONoy GONZÁLEZ

ZAPOPAN, JALISCO, AGOSTO DE 2021





GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 17 de agosto de 2021
CP/947/2021

RICARDO BRYAN KOSONoy GONZÁLEZ

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS DE LA FLORICULTURA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1801MG6449
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Caracterización citogenética y determinación del cariotipo de *Hippeastrum vittatum* Red giant**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. Rodrigo Barba González. Director de tesis
Dr. Ernesto Tapia Campos. Co-director de tesis
Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez. Asesor de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



Guadalajara, Jalisco a 30 de Julio de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Ricardo Bryan Kosonoy González**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “CARACTERIZACIÓN CITOGÉNÉTICA Y DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO DE *HIPPEASTRUM VITTATUM* ‘RED GIANT’.” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura, con opción terminal Mejoramiento Genético durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 30 del mes de Julio del año dos mil veintiuno.



Dr. Rodrigo Barba González

Director de tesis



Dr. Ernesto Tapia Campos

Co-director de tesis



Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez

Asesor

Agradecimientos

A mis padres Adriana Sofía González Valenzuela y Ricardo Kosonoy Haro por brindarme todo el amor y paciencia que siempre me impulsó a seguir adelante.

Al Dr. Rodrigo Barba González, por sus enseñanzas tanto académicas como de vida, por ayudarme en el desarrollo de mi trabajo y sobre todo por su amistad.

Al Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez, por su gran amistad y sus enseñanzas, por hacer que me apasionara una vez mas por la ciencia.

Al Dr. Ernesto Tapia Campos, por su enseñanza, por compartirme el valor de la responsabilidad y del trabajo duro.

A la Dra. Antonia Gutierrez Mora, por su apoyo y motivación de realizar la maestría.

A la Dra. Soledad García Morales, por su amistad y su apoyo.

A Jorge Roberto Rubio, por su gran y sincera amistad, por ayudarme a seguir adelante siempre.

A mi compañero Fidel Fernando Cruz Sánchez, por su gran amistad, por todo su apoyo en el desarrollo de mi trabajo y en las clases.

A Antontio Cruz Duque, por su amistad, su gran apoyo y su paciencia.

A Jorge Jonathan Oswaldo Garza García y José Armando Hernández Díaz, por su amistad y su apoyo, además de sus palabras motivadoras.

A Jesus trinidad, Vladimir Muro Medina, Karen Serrano, Javier Cuauhtémoc Fragoso y Maria Fernanda Juarez García, por su apoyo y su gran amistad.

A CIATEJ por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo económico otorgado en el proyecto "Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTecc" con número 315918.

Indice

Resumen	1
Summary	2
I. Introducción	3
I. Introducción	3
II. Antecedentes	4
Familia Amarylidaceae	4
Distribución	4
<i>Hippeastrum vitattum</i>	5
Etimología	5
Distribución	5
Variación genética y morfológica	5
Variación cromosómica	6
Citogenética	6
Importancia	7
Número básico, número gamético y número somático.....	7
Morfología y clasificación	7
Constricciones secundarias	8
Cariotipo	9
Asimetría de cariotipo	9
Cariograma	10
Ideograma	10
Determinación de la hora mitótica	10
Preparación de tejido	10
Fijación	11
Tratamiento y digestión enzimática	11
ADN ribosomal utilizado en FISH.....	11
III. Justificación	13
IV. Objetivos	13
V. Hipótesis	13
VI. Materiales y métodos	14

Purificación de ADN ribosomal	14
Preparación de sondas de ADN	14
Colecta y preparación de raíces	14
Preparación de los cromosomas	14
Hibridación fluorescente in situ (FISH)	15
Lavados de astringencia	16
Contratinción y montaje	16
Recolección de datos	16
Recopilación de datos	17
VII. Resultados y discusión	18
Cariograma	18
Hibridación in situ	22
VIII. Conclusiones y discusión.....	25
IX. Bibliografía.....	26

Indice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los cromosomas de acuerdo a Levan et al. (1964).....	8
Tabla 2. Volumen, reactivo y concentración de este utilizada en la preparación de la mezcla de marcaje con fluoróforos.....	20
Tabla 3. Ejemplos de especies del género <i>Hippeastrum</i> en donde se han encontrado diferentes números cromosómicos y niveles de ploidía	25
Tabla 4. Parámetros cromosómicos de <i>Hippeastrum vittatum</i> 'Red Giant'	26

Índice de figuras

Figura 1. Ilustración de <i>Hippeastrum vittatum</i> . Tomado de Redouté, 1805.....	6
Figura 2. Representación gráfica de los diferentes tipos de cromosomas según su morfología. Tomado y modificado de Levan et al., 1964.....	9
Figura 3. Representación de las partes de un cromosoma. Tomado de Arroyo Martínez 2014.....	9
Figura 4. <i>Hippeastrum vittatum</i> 'Red Giant'. Tomado de Plant World Seeds.....	15
Figura 5. Células en metafase de <i>Hippeastrum vittatum</i> con cromosomas con buena condensación y separación. Barra = 10 µm.....	23
Figura 6. Cariograma de <i>Hippeastrum vittatum</i> 'Red Giant'. Los pares 1 y 2 son cromosomas metacéntricos; los pares 3 al 8 son cromosomas submetacéntricos y los pares 9 al 12 son cromosomas subteloicéntricos. El par cromosómico 10 es un par heteromórfico.....	27
Figura 7. Hibridación in situ fluorescente del ADN ribosomal 45S, marcado con Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (flechas) en cromosomas de <i>Hippeastrum vittatum</i> 'Red Giant'.....	28
Figura 8. Hibridación in situ fluorescente del ADN ribosomal 5S, marcado con Fluorescein-12- dUTP (flechas) en cromosomas de <i>Hippeastrum vittatum</i> 'Red Giant'.....	28
Figura 9. Ideograma de <i>Hippeastrum vittatum</i> 'Red Giant'. La fórmula cariotípica es 2m + 6 sm + 4 st. En el brazo corto en la región telomérica del cromosoma 1 se localiza el sitio de hibridación del ADN ribosomal 5S (marcado con verde). En el brazo corto en la región telomérica del cromosoma 12 se localiza el sitio de hibridación del ADN ribosomal 45S (marcado con rojo).....	29

Resumen

El número cromosómico y la localización del ADN ribosomal fueron estudiados en plantas de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' (Amaryllidaceae) de la colección de plantas ornamentales del CIATEJ. Se determinó el número cromosómico y el nivel de ploidía, siendo estos: $2n = 2x = 24$. Se localizaron y mapearon los sitios de hibridación de los genes ribosomales 5S y 45S de trigo mediante la hibridación fluorescente in situ de las sondas que contenían los genes. Se encontraron dos sitios de hibridación de la sonda 45S en la región telomérica del par cromosómico 12. Así también, se encontraron dos sitios de hibridación de la sonda 5S, en la región telomérica del par cromosómico 1. La fórmula cariotípica de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' es $2m + 6sm + 4st$ y los índices de simetría/asimetría del cariotipo son: TF % = 28.98, AsK % = 71.02 y Syi % = 40.81, con lo que se concluye que el cariotipo es asimétrico, bimodal con dos pares de cromosomas metacéntricos pequeños en comparación con el resto de cromosomas submetacéntricos y subtelocéntricos. Adicionalmente se reporta la presencia de un par de cromosomas heteromórficos. Los resultados de los análisis realizados muestran discrepancia con el número cromosómico reportado por otros autores, sugiriendo con esto la presencia de un cromosoma adicional el cual pudiera ser el par heteromórfico.

Summary

Chromosomal number and ribosomal DNA localization were studied in plants of *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' (Amaryllidaceae) from the ornamental plant collection of CIATEJ. Chromosome number and ploidy level were determined as $2n = 2x = 24$. The hybridization sites of the 5S and 45S ribosomal genes of wheat were located and mapped by fluorescence in situ hybridization of the probes containing the genes. Two hybridization sites of the 45S probe were found in the telomeric region of chromosome pair 12. Two hybridization sites of the 5S probe were also found in the telomeric region of chromosome pair 1. The karyotypic formula of *Hippeastrum vittatum* is $2m + 6sm + 4st$ and the symmetry/asymmetry indices of the karyotype are: TF % = 28.98, AsK % = 71.02 and Syi % = 40.81, thus concluding that the karyotype is asymmetric, bimodal with two pairs of small metacentric chromosomes compared to the rest of submetacentric and subtelocentric chromosomes. Additionally, the presence of a heteromorphic chromosome pair is reported. The results of the analyses performed show discrepancy with the chromosome number reported by other authors, suggesting the presence of an additional chromosome which could be the heteromorphic pair.

Introducción

La familia Amaryllidaceae es un grupo monofilético, reconocido como familia desde inicios del siglo XIX, y en la delimitación actual incluye cerca de 1650 especies en 73 géneros. Está integrada por especies herbáceas o suculentas perennes, que pueden presentar bulbos, rizomas o cormos, hojas lineales a lanceoladas generalmente basales y flores vistosas (Chase et al., 2009).

El género *Hippeastrum* está conformado por más de 70 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica. Es una planta perteneciente a la familia Amaryllidaceae, siendo *Hippeastrum* el género más popular. Tiene su origen en Chile y Perú, fue introducido en Europa en 1769 (Baker, 1888). De acuerdo con algunos autores el género *Hippeastrum* es un sinónimo del género *Amaryllis*, sin embargo, de acuerdo con Moore (1963), el género *Hippeastrum* se aplica para las especies sudamericanas y el género *Amaryllis* se aplica a especies sudafricanas (Shafiq & Vahidy, 1998) El número de cromosomas básico es $x = 11$ (Poggio et al., 2007), aunque se han reportado otros.

La hibridación fluorescente in situ (Fluorescent in situ hybridization; FISH) permite la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos en cromosomas, células y tejidos morfológicamente preservados. Esta técnica, basada en la naturaleza de doble cadena complementaria de ADN, se hibrida en ADN específico marcado con fluorocromos (sonda), el cual se une a un sitio diana en la célula y desarrolla una señal fluorescente (Mühlmann, 2002). El marcaje con sondas de ADN ribosomal en los cromosomas de las diferentes especies de plantas es de gran utilidad para la identificación de cromosomas homólogos, ya que con dicha técnica es posible obtener una mejor caracterización del cariotipo (Lim et al., 2001).

En el presente trabajo se obtuvo el cariotipo e ideograma de la especie *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' mediante técnicas citogenéticas convencionales y la hibridación in situ fluorescente (FISH) de secuencias de ADN repetitivo en células metafásicas, con la finalidad de tener un conocimiento más amplio de la composición, estructura y organización de los cromosomas de *Hippeastrum vittatum* y del género *Hippeastrum* en general.

Antecedentes

Familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae es un grupo monofilético, reconocido como familia desde inicios del siglo XIX, y en la delimitación actual incluye cerca de 1650 especies en 73 géneros. (Chase et al., 2009), reconocen tres grandes clados para Amaryllidaceae, representados en las subfamilias Agapanthoideae, Allioideae y Amaryllidoideae. (Alzate et al., 2019).

La familia Amaryllidaceae se caracteriza por ser hierbas perennes o bienales con bulbos cubiertos por catáfilas, ocasionalmente con rizomas, las hojas se encuentran basalmente dispuestas y con un escapo terminal. Generalmente de hojas aplanadas, dorsiventrales y lineares, envainadoras en la base, paralelinervias, normalmente glabras. De Inflorescencia pseudoumbela escaposa, glabra, formada por una o varias cimas helicoideas con los ejes suprimidos, asociadas a un involucre constituido por brácteas libres o basalmente connadas; flores actinomorfas a débilmente zigomorfas, bisexuales, trímeras, epíginas, los tépalos acomodados en dos series de tres, subiguales, usualmente unidos en la base formando un tubo, de color blanco, amarillo, rosado, púrpura o rojo; estambres 6, en dos series, los filamentos angostos o aplanados e insertos en la base de los lóbulos del perianto o en la parte apical del tubo, en ocasiones (*Hymenocallis*) los filamentos expandidos y connados en su base para formar una corona estaminal, las anteras dorsifijas o basifijas, generalmente alargadas y con dehiscencia longitudinal; ovario infero, tricarpelar, trilocular, provisto de nectarios septales, el estilo simple, el estigma puntiforme, capitado o trilobado. Fruto generalmente una cápsula, raramente carnoso e indehiscente; semillas por lo general más o menos aplanadas, con fitomelano. (López-Ferrari & Espejo- Serna, 1993)

Distribución

Las Amaryllidaceae se distribuyen principalmente en zonas tropicales y holárticas, con una considerable diversidad en África y Sudamérica, seguida de Asia y Australia (Meerow & Snijman, 1998).

Tiene una amplia distribución y está bien representada en los trópicos, con centros importantes de diversidad en Sudáfrica, en los Andes en Sudamérica y en el Mediterráneo. Agrupa alrededor de 860 especies en 50 géneros. En México se presentan 7 géneros silvestres y algunos otros. *Clivia*, *Hippeastrum*, *Eucharis* y *Narcissus* se cultivan ampliamente en parques y jardines. Dentro de la familia Amaryllidaceae se consideraron alguna vez géneros como *Agave*, *Bomarea* e *Hypoxis*, entre otros, los cuales ahora se ubican en distintas familias. (Chase et al., 1995).

El género *Hippeastrum*

Etimología

Hippeastrum: nombre genérico que deriva del griego y significa "estrella del caballero", fue elegido por el reverendo William Herbert en 1821 para describir a la primera especie del género, *Hippeastrum reginae*. El epíteto deriva del adjetivo latino vittatus, que significa "estriado longitudinalmente", en referencia a las estrías o franjas de color rosado que presentan sus flores. (Lara Rico & Vasquez Chavez, 2015)

Número cromosómico del género *Hippeastrum*

El género *Hippeastrum* es conformado por más de 70 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de sudamérica. El número de cromosomas básico es $x = 11$ y muchas de las especies muestran un constante cariotipo básico bimodal de cuatro cromosomas cortos (metacéntrico (m) o submetacéntrico (sm)) y siete largos (cuatro sm y tres cromosomas subterminales (st)). Además del número cromosómico básico de $x = 11$, se han reportado otros números básicos: $x = 8$ en las especies *H. igneum* y *H. bicolor* (Esponda Fernandez, 1970); $x = 10$ en la especie *H. blumenavia* (Arroyo, 1982) y $x = 12$ en las especies *H. morelianum* (Flory & Coulthard, 1981) y *H. iguazuanum* (Williams & Dudley, 1984). No solo se han reportado diferentes números cromosómicos básicos, sino también diferentes niveles de ploidía, siendo los más comunes el triploide, tetraploide y pentaploide ($2n = 33, 44$ y 55) (Arroyo, 1982)

En *Hippeastrum vittatum* se han reportado diferentes números cromosómicos y niveles de ploidía: $2n = 2x = 22$ (Naranjo y Andrada, 1975; Khaleel et al., 1991); $2n = 4x = 44$ (Mookerjea, 1955; Shafiq & Vahidy, 1998), $2n = 3x+5 = 38$ y $2n = 4x+1 = 45$ (Mookerjea, 1955)

Hippeastrum vittatum

La especie *Hippeastrum vittatum* (Figura 1.) fue descrita por William Herbert y publicado en An Appendix 31, en el año 1821. Es una planta perteneciente a la familia Amaryllidaceae, siendo *Hippeastrum* el género más popular. Tiene su origen en Chile y Perú, fue introducido en Europa en 1769 (Baker, 1888). En 1799, un relojero inglés de apellido Johnson de Prescott, realizó el primer cruzamiento que se conoce usando dos especies, *H. vittatum* x *H. reginae* (L.) Herbert y obtuvo un híbrido conocido desde entonces como *H. xJohnsonii* de ahí en adelante, *H. vittatum* ha sido usada intensamente por los viveristas, sobre todo holandeses, para producir los híbridos de grandes flores que actualmente son apreciadas y comercializadas en todo el mundo.



Figura 1. Ilustración de *Hippeastrum vittatum*. Tomado de Redouté, 1805.

Variación genética y morfológica

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. 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 (Arroyo-Martínez, 2014)

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).

Citogenética

Fue el botánico suizo Nageli quien describió por primera vez las estructuras en forma de hilo en los núcleos de las células vegetales en la década de 1840, y lo que llamó "citoblastos transitorios" ahora se conocen como cromosomas. La citogenética es el estudio de la estructura y propiedades de los cromosomas, su comportamiento durante la división de células somáticas durante el crecimiento y desarrollo (mitosis) y la división de células germinales durante la reproducción (meiosis), así como su influencia en el fenotipo y el estudio de factores que causan cambios cromosómicos. (Cruz Duque A., 2014).

Importancia de la citogenética

Los trabajos citogenéticos realizados en los últimos veinte años se han concentrado principalmente en el estudio de la estructura y evolución del genoma de diferentes especies vegetales, tanto silvestres como cultivadas. En estas últimas, la citogenética ha facilitado grandemente el entendimiento de la organización y estructura de los genomas, de ahí la importancia que ha empezado a tener en los proyectos de mapeo genético que se adelantan actualmente en distintas especies. (Herrera, 2007)

Marceña-Delgado (2010) menciona la importancia de conocer las características del material genético antes de proceder con cualquier trabajo de mejoramiento genético, ya que pueden encontrarse diversas barreras y limitantes para llegar al objetivo.

Mediante la observación microscópica se determina el número cromosómico somático ($2n$) y, a través del análisis de microfotografías o dibujos de metafases con cromosomas bien definidos y separados, se establecen los cariotipos (García-Velázquez, 1990).

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 los gametos 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)

Morfología y clasificación

la morfología de los cromosomas se determina gracias a la posición del centrómero y la longitud de los brazos corto (bc) y largo (bl), así como la longitud total (lt) de cada cromosoma. A partir de estas medidas, se calcula el índice centromérico [$IC = (bc / lt) \times 100$], según el cual los cromosomas se clasifican en cuatro tipos morfológicos: metacéntricos (m, $IC = 50 - 37,5$), submetacéntricos (sm, $IC = 37,5 - 25$), subteloacéntricos (st, $IC = 25-12,5$), acrocéntricos (t, $IC = 12,5 - 0$) y telocéntricos (T, $IC = 0$). (Levitus et al., 2010) (Tabla. 1)

Dicha clasificación fue propuesta por Levan et al. (1964) agrupando los cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero; m (metacéntricos), sm (submetacéntricos), st (subtelocéntricos) y t (telocéntricos o acrocéntricos). (Figura 2.)

Dichas clasificaciones son utilizadas para establecer el cariotipo de una especie.

Tabla 1. Clasificación de los cromosomas de acuerdo con Levan et al. (1964).

Clasificación	bl / bc	IC	Posición
Metacéntrico (M)	1	50	Medio
metacéntrico (m)	1.0 – 1.7	47.5 - 37.5	Región media
submetacéntrico (sm)	1.7 – 3.0	37.5 - 25	Región sub-media
subtelocéntrico (st)	3.0 – 7.0	25 - 12.5	Región sub-terminal
telo ó acrocéntrico (t)	7 – ∞	12.5 - 2.5	Región terminal
Telocéntrico (T)	∞	0	Punto terminal

Constricciones secundarias

Otro aspecto por 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. (Figura 3.) Dichas constricciones corresponden a regiones organizadoras de los nucleolos (NORs) y los satélites a las porciones cromosómicas distales delimitadas por la constricción secundaria y el telómero de los brazos que los portan. Los cromosomas que presentan satélites se denominan cromosomas SAT. (Levitus et al., 2010).

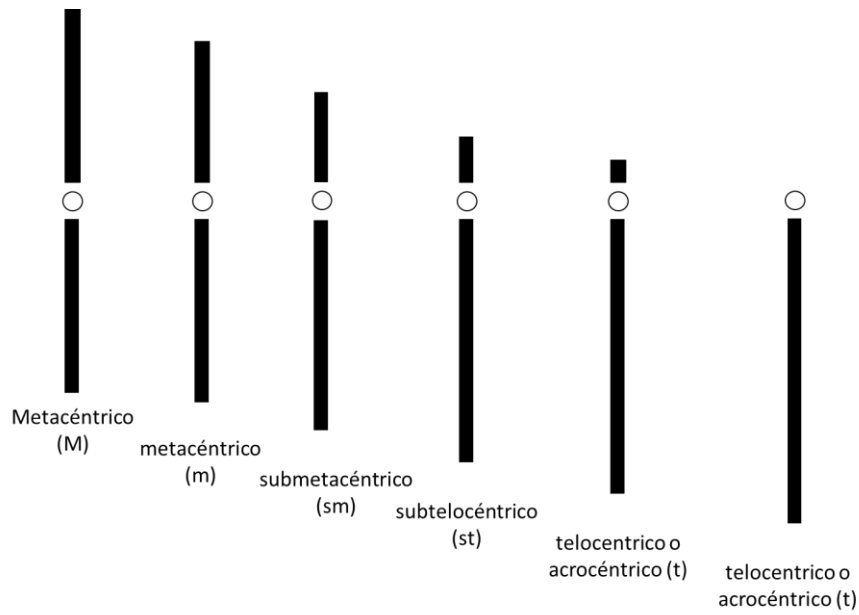


Figura 2. Representación gráfica de los diferentes tipos de cromosomas según su morfología. (Tomado y modificado de Levan et al., 1964)

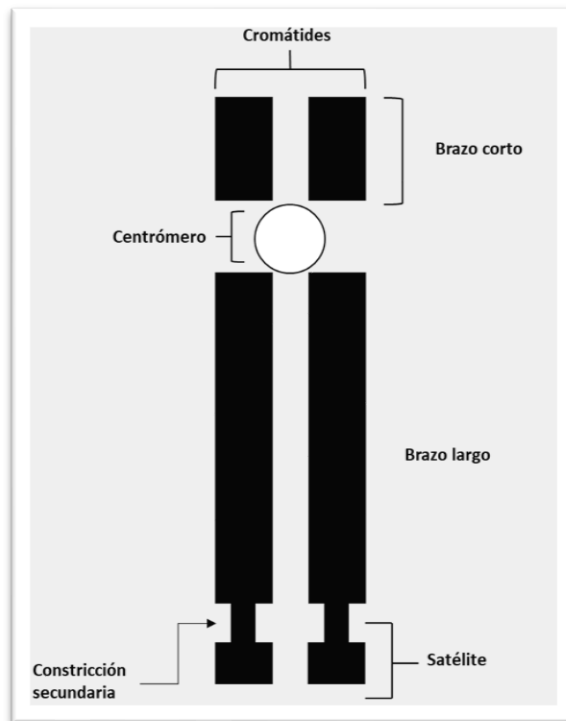


Figura 3. Representación de las partes de un cromosoma. (Tomado de Arroyo Martínez H., 2014)

Cariotipo

De acuerdo con Levan et al. (1964), en la identificación morfológica de los cromosomas, la localización del centrómero es el hito más útil y se caracteriza por una gran constancia.

En un cariotipo, se deben organizar los cromosomas según su tamaño (acomodados de mayor a menor) alineando los centrómeros en el mismo eje y altura, con los brazos cortos hacia arriba. En las plantas diploides y aloploides, el cariotipo se compone de pares de cromosomas homólogos; mientras que en las autopoliploides se compone de grupos de tres o más cromosomas de acuerdo con el nivel de ploidía. (Arroyo-Hernández, 2014)

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.

Variación cromosómica

Los citólogos, bioquímicos y genetistas han estudiado los cromosomas o sus componentes durante más de un siglo. De ellos hemos heredado descripciones de las características estructurales generales de los cromosomas y cierto conocimiento de las funciones vitales que realizan los cromosomas. Los cromosomas tienen centrómero, lo que permite que las fibras del huso se adhieran a ellos y aseguren su separación durante la división celular, dicho centrómero les dota de una identidad a cada cromosoma dada su posición, esto se traduce como una variabilidad innata que se requiere estudiar para comprender los y tratar de encontrar los cambios que la especie ha sufrido con el tiempo y de cierta manera también los cambios que está teniendo actualmente (Flavell, 1980)

Varios géneros de la familia Amaryllidaceae han presentado una variabilidad en cuanto a sus números básicos y diversidad en la morfología cromosómica entre las especies. Por otro lado, en *Hippeastrum* esta variación parece ser sustituida por un cariotipo básico constante (Naranjo & Andrada, 1975)

Asimetría del cariotipo

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). (Levitus et al., 2010).

De acuerdo con Peruzzi & Eroglu (2013) el concepto de cariotipo asimétrico está marcado por el predominio de cromosomas con centrómeros terminales o subterminales (asimetría intracromosómica) y tamaños de cromosomas muy heterogéneos (asimetría intercromosómica), es decir que la asimetría cromosómica se debe a la heterogeneidad entre los tamaños de los cromosomas en un complemento.

Fundamentalmente, las medidas básicas, utilizadas en todos los métodos propuestos hasta ahora, son las relativas a la longitud del brazo largo (L) y corto (S) de cada cromosoma en un complemento.

Todos los cariotipos en los que estas medidas no son aplicables (por ejemplo, aquellos con cromosomas holocéntricos o aquellos con cromosomas muy pequeños, 1 μm o menos), no son adecuados para la estimación de la asimetría intracromosómica en absoluto. Para todos los demás (la mayoría), típicamente $L \geq S \geq 0$ y $L \geq S$. (Peruzzi & Eroglu., 2013)

Cariograma

Un cariograma (También llamado mapa citogenético) se refiere a la representación ordenada de los cromosomas de un individuo. 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 (Arroyo-Hernández, 2014).

Idiograma

El idiograma es básicamente un "mapa cromosómico" que muestra la relación entre los brazos corto y largo, el centrómero y, en el caso de cromosomas acrocéntricos, los tallos y satélites. También se ilustran los patrones de bandas específicos. Cada banda se numera, lo que sirve de ayuda para indicar la ubicación de los genes y para la descripción de reorganizaciones cromosómicas. 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 (Arroyo-Hernández, 2014).

Determinación de la hora mitótica

El trabajo de caracterización debe realizarse en metafase mitótica. En la metafase, los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación, se encuentran individualizados y presentan una forma característica que permite diferenciarlos y clasificarlos morfológicamente (Arroyo-Martínez, 2014).

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 en las horas de la mañana hasta aproximadamente las 11:00 am (Delgado et al., 2010).

Preparación del tejido

Para los estudios citogenéticos suele utilizarse tejidos meristemáticos que tengan una concentración alta de células en división como ápices radicales y caulinares. Dichos tejidos son expuestos a sustancias comúnmente llamadas venenos del huso, las cuales inhiben la formación del huso mitótico en las células con la finalidad de mantener las células en metafase además de producir una condensación de estos (Delgado et al., 2010).

Fijación

Con el fin de preservar el tejido, se utiliza una solución fijadora compuesta por una solución 3:1 (alcohol etílico-ácido acético), la cual se encarga de detener los procesos vitales del tejido, preservando la estructura del tejido con el menor número de alteraciones posibles. (Ferrer-Pereira et al., 2007; Delgado et al., 2010).

Tratamiento y digestión enzimática

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 ello se utilizó una solución que combina 3 enzimas diferentes, citohelicasa, pectoliasa y celulasa. Finalmente, se utilizan los tejidos, macerando y aplastando ("squash") el material sobre un portaobjetos (Arroyo-Martínez, 2014).

ADN ribosomal utilizado en FISH

Los genes del ADN ribosomal (ADNr) y los espaciadores transcritos se encuentran presentes en arreglos en tándem (Gerlach & Bedbrook, 1979) en el genoma nuclear de los eucariontes superiores (Appels y Honeycutt, 1986). La unidad de repetición del ADN ribosomal 45S consiste en regiones codificadoras altamente conservadas y más repetidas en eucariotas (18S, 5.8S y 25S ADNr), los espaciadores internos transcritos (ITS) y espaciadores no transcritos o NTS (Roa & Guerra, 2012); mientras que cada unidad de ADN ribosomal 5S consiste de una secuencia codificadora de ≈ 120 pb y un espaciador no transcrito (Negi et al., 2002).

En décadas recientes, el ADN ribosomal ha sido utilizado a través de la hibridación in situ como sonda para la identificación de cromosomas en diferentes especies vegetales, entre algunas de ellas se encuentran *Populus deltoides* (Negi et al., 2002), *Trigonella foenum-graecum* (Ahmad et al., 1999), *Hordeum vulgare* (Brown et al., 1999), *Medicago truncatula* (Falistocco y Falcinelli, 2003), *Elaeis guineensis* (Castilho et al., 2000), *Lilium longiflorum* y *L. rubellum* (Lim et al., 2001), entre otras.

En casos diversos se ha utilizado como sondas los clones de EcoRI pTa71 y pTa794 de trigo (*Triticum aestivum*), que contienen los fragmentos 18S,-5.8S-26S (45S) y los espaciadores intergénicos así como el fragmento 5S y el espaciador intergénico, respectivamente (Gerlach & Bedbrook, 1979); algunos ejemplos son *Arabidopsis thaliana* (Brandes et al., 1997), *Crocus vernus* (Frello y Heslop-Harrison, 2000), *Vicia benghalensis* (Galasso et al., 1997), entre otros.

La variación en el tamaño y secuencia de los espaciadores internos transcritos da lugar a una heterogeneidad de tamaños de las unidades de ADNr dentro y entre especies. Numerosos estudios filogenéticos y evolucionarios de muchas especies animales y vegetales se basan en los análisis de secuencias de los ADNs ribosómicos 45S y 5S (Appels y Honeycutt, 1986; Bachmann, 1992).

Justificación

Las especies de amarilidáceas son altamente apreciadas como plantas ornamentales, su larga vida de florero les dota de una utilidad extra como flor cortada, así como también sus flores secas son muy utilizadas como decoración. Estas características hacen que la especie sea objetivo de entrar en programas de mejoramiento genético, los cuales buscan resaltar los atributos de las especies y en algunos casos dotar de nuevos atractivos a especies que se consideren atractivas para el comercio.

Para iniciar un programa de mejoramiento genético es necesario contar con cierta información básica, esta información incluye el número cromosómico y el nivel de ploidía. En el banco de especies ornamentales del CIATEJ se cuenta con ejemplares de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant', pero no se cuenta con información citogenética de estos ejemplares, la cual es indispensable para realizar y predecir el resultado de cruces en un programa de mejoramiento genético. Este trabajo será el primer reporte que involucre la hibridación in situ de genes para la identificación cromosómica, por lo que la información recabada además de asistir en un programa de mejoramiento genético servirá para conocer la estructura y evolución del genoma del género *Hippeastrum*.

Objetivos

Objetivo general

- Determinar el cariotipo de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant'

Objetivos específicos

- Determinar la estructura cromosómica de *Hippeastrum vitattum* 'Red Giant' mediante la construcción de su cariotipo e ideograma
- Determinar los índices de asimetría TF %, AsK % y Syi %.
- Realizar Hibridación Fluorescente in situ (FISH) en cromosomas de *Hippeastrum vitattum* 'Red Giant'

Hipótesis

La especie evaluada de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' presenta el número cromosómico reportado en la bibliografía.

Materiales y métodos

Preparaciones cromosómicas

Material vegetal

Ejemplares de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' (Figura 4.) forman parte de la colección de especies ornamentales del CIATEJ. Semillas de *H. vittatum* 'Red Giant' fueron obtenidas de la casa comercial Plant World Seeds (con sede en Inglaterra) y fueron germinadas en peat moss mezcla 3 (Sunshine®). Posteriormente fueron transplantadas a macetas de plástico de 5 pulgadas que contenían una mezcla de sustrato compuesto por tierra de hoja : peat moss mezcla 3 en proporciones 3:1. Las plantas fueron mantenidas en condiciones estándar de invernadero. Las raíces fueron podadas para favorecer el crecimiento de nuevas raíces para la ejecución de este trabajo.



Figura 4. *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant'. Tomado de Plant World Seeds

Colecta y preparación de raíces

De las plantas de invernadero se tomó aproximadamente se tomó 1 cm del ápice de las raíces que presentaban crecimiento activo (de un color blanco lechoso y sin la presencia de pelos radicales). Los ápices fueron colocados en tubos de 1.5 mL que contenían α -bromonaftaleno saturado (1 μ L/mL), se etiquetaron y se guardaron en

obscuridad a temperatura constante de 4°C hasta el día siguiente. Posteriormente, los ápices fueron transferidos a otro tubo de 1-5 mL que contenía 1 mL de solución Farmer (alcohol : ácido acético 3 : 1) y fueron colocados a una temperatura de 4°C por al menos 48 horas.

Digestión enzimática

Los ápices radiculares se colocaron en un tubo de 1.5 mL que contenía agua destilada para enjuagarlos (5 minutos aproximadamente), el enjuague se repitió 3 veces utilizando agua destilada limpia en cada enjuague para eliminar la solución Farmer del ápice radicular. Posteriormente se retiró el agua destilada, los ápices radiculares fueron transferidos a placas RA Lamb para embriones donde fueron incubados durante 10 minutos en buffer de citrato (10 mM citrato trisódico, 10 mM ácido cítrico; pH 4.5), transcurrido el tiempo, se retiró el buffer de citrato con ayuda de una pipeta pasteur y se agregaron 50 µL de solución enzimática, que consiste en una mezcla de celulasa RS 1%, pectoliasa Y23 1% y citohelicasa 1%, disueltas en una proporción 1:10 en buffer citrato 10 mM, pH 4.5). Las placas para embriones que contenían los ápices radiculares con la solución enzimática fueron incubados en una cámara húmeda durante al menos dos horas a 37°C. La digestión se monitoreó transcurridas las dos horas retirando el líquido de la solución enzimática y observando con la ayuda de un microscopio estereoscópico si la cofia se desprendía y las células se disgregaban, de ser así se procedía a realizar el aplastado cromosómico, de lo contrario, se regresaba la solución enzimática y se continuaba con la incubación a 37°C hasta que se observara el desprendimiento de la cofia y se disgregaban las células como se explicó anteriormente.

Aplastado cromosómico “Squash”

Una vez que se llevaba a cabo la digestión enzimática, cada uno de los ápices radiculares fue transferido a un portaobjetos previamente lavado con jabón para cristalería de laboratorio (alconox), almacenado en alcohol al 70% y secado con paños de poca pelusa (Kimwipes). Una vez que el ápice era transferido al portaobjetos, el tejido fue disgregado utilizando una aguja de disección o pinzas finas en una gota de ácido acético al 45%. Posteriormente, fue cubierto con un cubreobjetos, colocado en una toalla de papel y se le aplicó presión con la yema del dedo para extender los cromosomas en la preparación. El portaobjetos fue sumergido en nitrógeno líquido y transcurridos unos minutos fue retirado, con la ayuda de una navaja de afeitar, el cubreobjetos fue retirado y la preparación fue deshidratada en alcohol al 70%, 90% y absoluto, durante tres minutos en cada paso y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Observaciones cromosómicas

Las preparaciones cromosómicas fueron observadas en un microscopio óptico Leica DMRA2, bajo un aumento de 40x utilizando contraste de fases. Una vez identificadas las células en metafase, se tomaron fotografías con una cámara Evolution QEI (MediaCybernetics) utilizando el software ImagePro Plus 6.2 (MediaCybernetics).

Mediciones cromosómicas

Una vez obtenidas las preparaciones se seleccionaron aquellas en que era posible contar los cromosomas, en que los cromosomas se encontraban en un mismo plano y estaban separados. Se tomaron los datos de al menos 8 células. Se cuantificó el número de cromosomas. La morfología de los cromosomas y la posición del centrómero se determinó con la metodología propuesta por Levan et al. (1964), para lo cual se calculó:

- La relación de brazos cromosómicos (r), donde: $r = bl / bc$
(bl = brazo corto; bc = brazo largo)
- La longitud total de cada cromosoma (LTC), donde: $LTC = bl + bc$.
- Índice centromérico (lc), donde: $lc = (bc / LTC) \times 100$.

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 presenta esa posición centromérica y considerando la relación de los brazos cromosómicos: i) Metacéntricos si la relación es de 1 – 1.7; ii) submetacéntricos, si la relación es de 1.7 – 3; iii) Subtelocéntricos cuando la relación es de 3 – 7; y iv) Telocéntricos si la relación es > 7 .
- La longitud total del genoma (LTG), donde: $LTG = \sum LTC$
- Los índices de asimetría:
TF %, donde: $TF \% = (\sum bc / LTG) * 100$
AsK %, donde: $AsK \% = (\sum bl / LTG) * 100$
Syi %, donde: $Syi \% = (\bar{X} bc / \bar{X} bl) * 100$

Construcción del cariotipo

La homología cromosómica se estableció de acuerdo con las similitudes en longitud y posición centromérica, ordenándolos en forma decreciente en longitud, colocando primero los cromosomas metacéntricos, seguidos por los cromosomas submetacéntricos y posteriormente los subteloecéntricos. La imagen del cariotipo se elaboró recortando de la fotografía y acomodando los cromosomas sobre un fondo negro cada uno de los cromosomas, considerando la posición del centrómero y la longitud del cromosoma como se mencionó anteriormente, utilizando el software Microsoft PowerPoint.

Hibridación in situ

La hibridación in situ consiste en la hibridación de secuencia genómicas (genes) con las secuencias homólogas en los cromosomas. Estas secuencias pueden visualizarse con la ayuda de un microscopio equipado con epi-fluorescencia, marcando previamente la sonda (la secuencia genómica de interés) con fluorocromos específicos a diferentes longitudes de onda. La hibridación in situ fluorescente consta de varios pasos, que se menciona a continuación.

Amplificación de ADN ribosomal

Para la técnica de hibridación in situ fluorescente es necesaria una gran cantidad de ADN de la sonda (1µg). Para este trabajo se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* pTa71, que contiene plásmidos con un fragmento de EcoRI de 9 kilobases que incluyen los genes 18S-5.8S-26S (45S) y un espaciador intergénico de *Triticum aestivum*; así como la cepa pTa794 que contiene plásmidos que incluyen un fragmento de 410-pb del gen ADNr 5S y un espaciador intergénico de *T. aestivum*. Las bacterias se encuentran resguardadas a -80 °C en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

Para su cultivo se descongelaron y se tomó una alícuota (10 µL), las cuales fueron transferidas a diferentes tubos de polipropileno cónico de 15 mL que contenían 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina (10 g/L Peptona de caseína, 5 g/L Extracto de levadura, 5 g/L Cloruro de sodio (pH 7.2 ± 0.2) + 200 mg/L ampicilina), los tubos fueron incubados bajo agitación continua (250 rpm), a 37 °C durante 12 h.

Extracción de plásmidos

Los plásmidos fueron extraídos de las bacterias cultivadas como se explicó anteriormente utilizando el kit de extracción QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen®) como se describe a continuación:

Las bacterias fueron concentradas por centrifugación a >8000 rpm en una centrífuga de mesa convencional durante 3 minutos a temperatura ambiente (15–25°C). Posteriormente fueron resuspendidas en 250 µL de buffer 1, adicionado con RNase A. Las células fueron transferidas a un tubo de 1.5 mL, se adicionaron 250 µL de buffer P2 y se mezclaron vigorosamente por inversión durante 4 a 6 veces. Se añadieron 350 µL de buffer N3 y se mezcló inmediatamente por inversión vigorosa del tubo por 4 a 6 ocasiones. Los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 13,000 rpm en una centrífuga de mesa. El sobrenadante fue transferido por decantación a una columna QIAprep spin, la cual fue centrifugada por 1 minuto a 13,000 rpm, el líquido fue descartado. Posteriormente, la columna fue lavada añadiendo 0.5 mL de buffer PB y centrifugando por 1 minuto a 13,000 rpm, nuevamente el líquido fue descartado. Se añadieron 0.75 mL de Buffer PE para un nuevo lavado de la columna y se centrifugó a 13,000 rpm por otro minuto. El líquido fue descartado nuevamente y se centrifugó otra vez por un minuto a 13,000 revoluciones para remover el buffer de lavado adicional. Finalmente, la columna fue transferida a un tubo limpio de 1.5 mL, se añadieron 30 µL de buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) para eluir los plásmidos, se tuvo cuidado de que el buffer EB se colocara en el centro de la columna, se incubó por un minuto y se centrifugó por otro minuto.

La concentración del plásmido fue registrada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop®.

Marcaje de sondas de ADN ribosomal

Las sondas de ADN ribosomal se elaboraron marcando los plásmidos que contienen los genes 45S y 5S de trigo que se obtuvieron como se describió anteriormente. El ADN ribosomal 45S fue marcado con el fluorocromo Tetra-methyl-rhodamine-5-dUTP y el ADN ribosomal 5S fue marcado con el fluorocromo Fluorescein-12- dUTP, utilizando el kit Nick Translation Mix (Roche®) que contiene buffer de reacción estabilizado en 50% glicerol (v/v), ADN polimerasa y ADNasa, siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe a continuación.

Primero se prepararon las mezclas de marcaje con fluoróforos (fluorophore labeling mix). Para la preparación de una solución 5x de 50 µL se añadió el volumen de cada uno de los reactivos mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Volumen, reactivo y concentración de este utilizada en la preparación de la mezcla de marcaje con fluoróforos

Volumen	Reactivo	Concentración
5 μ L	dATP	2.5 mM
5 μ L	dCTP	2.5 mM
5 μ L	dGTP	2.5 mM
3.4 μ L	dTTP	2.5 mM
4 μ L	Tetra-methyl-rhodamine-5-dUTP ó Fluorescein-12- dUTP	1 mM
x μ L	Agua mQ para un volumen final de 50 μ L	

Se preparó una mezcla de 50 μ L con el fluorocromo Tetra-methyl-rhodamine-5-dUTP y otros 50 μ L con el fluorocromo Fluorescein-12- dUTP.

Para el marcaje de los diferentes ADN ribosomales se prepararon las siguientes mezclas:

10 μ L de 45S ADNr que contenían 1 μ g de plásmido, 4 μ L de la solución 5x de la mezcla de marcaje con el fluoróforo Tetra-methyl-rhodamine-5-dUTP, 4 μ L de Nick Translation Mix y 2 μ L de agua mQ, para un volumen final de 20 μ L.

10 μ L de 5S ADNr que contenían 1 μ g de plásmido, 4 μ L de la solución 5x de la mezcla de marcaje con el fluoróforo Fluorescein-12- dUTP, 4 μ L de Nick Translation Mix y 2 μ L de agua mQ, para un volumen final de 20 μ L.

Cada una de las mezclas fue incubada durante 60 minutos a una temperatura de 15 °C. Las reacciones fueron detenidas añadiendo 1 μ L de 0.5 M EDTA y calentando la mezcla a 65 °C por 10 minutos. Las sondas de ADN ribosomal fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Pretratamiento de cromosomas

Las preparaciones cromosómicas con células metafásicas fueron sujetas a un pretratamiento que se describe a continuación:

Las preparaciones cromosómicas fueron deshidratadas en una incubadora a 37 °C durante la noche; al día siguiente, se le colocaron 200 μ l de ARNasa A en una concentración de 100 μ g/mL (diluida en 2x SSC [0.3 M NaCl, 0.03M Citrato trisódico, pH 7.0]), el portaobjetos fue cubierto con un cubreobjetos de vidrio. La preparación fue incubada durante 1 hora a 37 °C en una cámara húmeda precalentada.

Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados en 2x SSC tres veces durante 5 minutos cada lavado. Las preparaciones fueron incubadas en HCl 0.01 M durante 2 minutos y fueron cubiertas con un cubreobjetos de plástico. Transcurrido el tiempo a cada portaobjetos se le agregaron 200 μ l de una solución de pepsina a una concentración de 5 μ g/mL diluida en HCl 0.01 M. la preparación fue cubierta con un cubreobjetos de vidrio e incubada en una cámara húmeda durante 10 min a 37 °C. Las preparaciones fueron lavadas en agua mQ durante 2 minutos, seguido de dos lavados en 2xSSC durante 5 minutos en cada lavado. El siguiente paso consistió en incubar las preparaciones en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y las preparaciones fueron lavadas nuevamente en 2x SSC dos veces durante 5 minutos en cada lavado. Finalmente, las preparaciones fueron deshidratadas en etanol al 70% (enfriado con hielo), al 90% y al 100% durante tres minutos en cada paso y posteriormente fueron secadas al aire.

Hibridación fluorescente in situ (FISH)

Para la hibridación se prepara una mezcla de hibridación, el cual consiste en 20 μ L de formamida deionizada, 8 μ L dextransulfato 50% (precalentado a 37 °C), 4 μ L 20x SSC (3 M NaCl, 0.3M Citrato trisódico, pH 7.0), 1 μ L dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, 1 μ L (50 ng) de la sonda de ADN ribosomal 45S (marcada con Tetra-methyl-rhodamine-5-dUTP), 1 μ L (50 ng) de la sonda de ADN ribosomal 5S (marcada con Fluorescein-12- dUTP) y 5 μ L de agua mQ. A cada preparación se le agregan 40 μ L de la mezcla de hibridación, así que se preparó una mezcla equivalente al número de hibridaciones que se realizaban en cada ocasión.

La mezcla de hibridación se desnaturalizó durante 10 minutos a una temperatura de 70 °C y posteriormente se colocó en hielo durante al menos 10 minutos; en este tiempo, se preparó la cámara húmeda a 80 °C (para después de la desnaturalización de las preparaciones la disminución de la temperatura sea gradual). Transcurrido el tiempo, se agregaron 40 μ L de la mezcla de hibridación a cada preparación y se les colocó un cubreobjetos. Posteriormente, se desnaturalizaron las preparaciones durante 5 minutos a una temperatura de 80 °C. Las preparaciones se colocaron en la cámara húmeda precalentada y se incubó toda la noche a 37 °C.

Eliminación de hibridación cruzada

Para prevenir la hibridación cruzada, que es la hibridación de secuencias de la sonda que no correspondan en al menos al 70% de homología con las secuencias del ADN de los cromosomas, se llevaron a cabo una serie de lavados, que consistieron en lavar las preparaciones en buffer 2x SSC a 37 °C, tres veces durante 5 minutos en cada lavado (en el último lavado se incrementó la temperatura a 42 °C). Posteriormente, se

lavaron en buffer 0.1x SSC, tres veces durante 10 minutos en cada lavado a 42 °C. Se realizó otro lavado en buffer 2x SSC durante 3 minutos a 42 °C y se dejó enfriar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las preparaciones en buffer 2x SSC, dos veces por 5 minutos en cada lavado a temperatura ambiente.

Contratinción y montaje

A cada preparación se agregaron 100 µL de una solución de contratinción (90 µL 2x SSC + 10 µL DAPI 100 µg/mL), se les colocó un cubreobjetos y se incubaron durante 5 minutos en oscuridad. Se lavaron brevemente en buffer 2x SSC para remover los cubreobjetos y se les agregaron 30 µL de Vectashield® (Vector Laboratories); nuevamente se les colocó cubreobjetos (25x50) y se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su observación.

Toma de fotografías de fluorescencia

Al igual que para la medición de los cromosomas se utilizó el microscopio Leica modelo DMRA2, equipado con epi-fluorescencia, el cual está equipado con filtros DAPI, con el cual es posible visualizar el ADN gracias a la contratinción realizada con DAPI; el filtro Cy3 permite la visualización del fluorocromo Tetra-methyl-rhodamine; y el filtro FITC permite la visualización del fluorocromo Fluorescein. Así también se utilizó la cámara Evolution QEi y el software ImagePro Plus 6.2® para la captura de las imágenes de fluorescencia, las cuales fueron capturadas en cada uno de los canales (filtros) y pseudo coloreadas con DAPI, Tetra-methyl-rhodamine y FITC según correspondía. Para la localización de las señales de hibridación en los cromosomas se ajustó el tiempo de exposición y se realizó una imagen compuesta. En la edición de las imágenes se ajustó el brillo y contraste, en las imágenes de DAPI se aplicó un filtro HiGauss 7x7 con 2 pasos.

Construcción del Ideograma

Para la construcción del ideograma se realizó una representación gráfica de cada uno de los cromosomas observados, se tomó en cuenta el promedio de cada una de las mediciones realizadas (longitud del brazo corto, longitud del brazo largo, longitud del cromosoma, distancia al centrómero de la señal de hibridación); así también se colocó las marcas de hibridación en los cromosomas correspondientes. Se ordenaron en orden descendiente según su tamaño, agrupando primero los cromosomas metacéntricos, seguido de los cromosomas submetacéntricos y finalmente los cromosomas subtelocéntricos.

Resultados y discusión

Colecta de raíces y preparaciones cromosómicas

Las preparaciones cromosómicas se realizaron con éxito y aunque no se llevó un registro detallado sobre el número de metafases encontradas con relación con la hora de la colecta, se observó que las raíces colectadas entre las 9:00 – 10:00 horas mostraron un mayor número de células metafásicas. En las preparaciones realizadas se encontró un buen número de células en metafase con una buena dispersión, con los cromosomas en el mismo plano y separados (Figura 5.). Se utilizaron estas células para realizar las mediciones de los cromosomas.

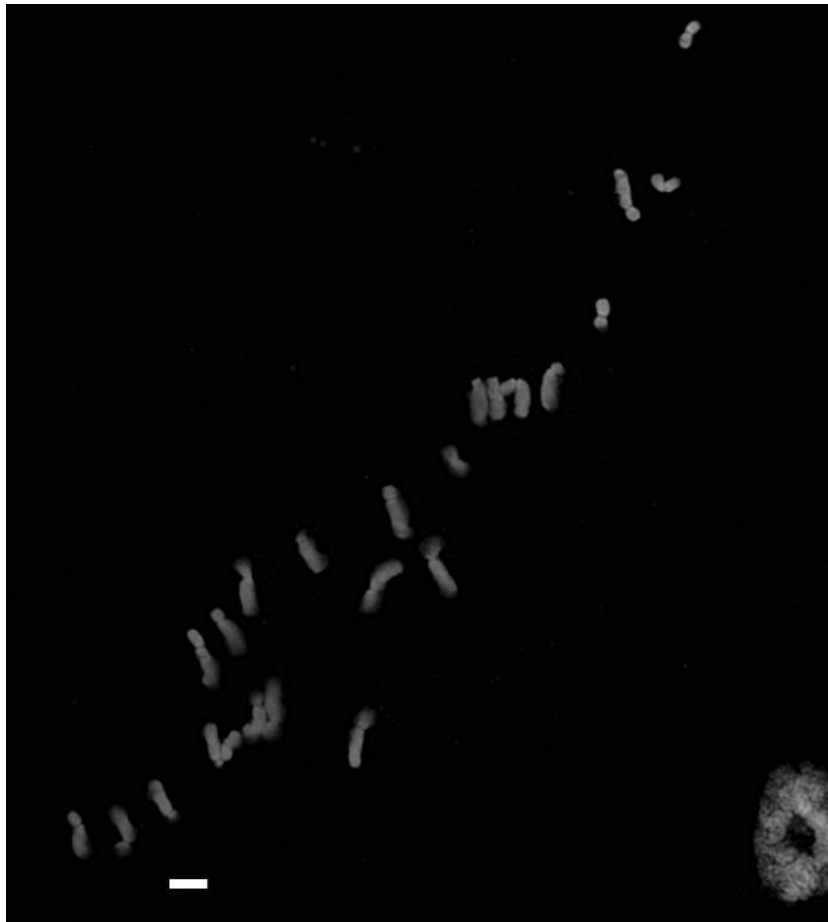


Figura 5. Células en metafase de *Hippeastrum vittatum* con cromosomas con buena condensación y separación. Barra = 10 μ m.

Número cromosómico de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant'

De manera sorprendente se encontró que el número cromosómico de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' es de $2n = 24$ en los ejemplares de la colección del CIATEJ. Es sorprendente porque existen diferentes reportes del número cromosómico en *H. vittatum*, y ninguno de ellos coincide con el número cromosómico encontrado.

Naranjo & Andrada (1975) y Shafiq & Vahidy (1988) reportan un número cromosómico de $2n = 22$, mientras que Inariyama (1937), Sato (1942), Mookerjea (1955), Sharma (1956), Khaleel et al. (1991) y Shafiq & Vahidy (1988) reportan un número cromosómico de $2n = 44$. Nagao & Takusagawa (1932) reportan un número cromosómico de $2n = 46$. Todos los autores reportan un número básico $x = 11$.

Cabe resaltar que la mayoría de los autores reportan número poliploide, $2n = 44$; muy probablemente tetraploide ($4x$). Lo cual se podría explicar con el origen de las plantas que analizaron, ya que Khaleel et al. (1991) analizaron nueve cultivares comerciales. Aunque menciona que son plantas de *Amaryllis*, no es claro si se trata plantas del género *Amaryllis* o *Hippeastrum*; Mookerjea (1955), reporta también $2n = 44$ en cultivares comerciales. Shafiq & Vahidy (1988) también reportan los números cromosómicos de tres cultivares comerciales, y todos presentan plantas diploides ($2n = 22$) y tetraploides ($2n = 44$). El único conteo cromosómico de la especie silvestre se trata del trabajo de Naranjo & Andrada (1975), quienes la colectaron en la Provincia de Córdoba (Argentina) y reportan un número cromosómico diploide ($2n = 22$). La importancia de que se trate de cultivares comerciales o la especie silvestre es grande, ya que al tratarse de cultivares comerciales, éstos son seleccionados muchas veces por las características agronómicas y ornamentales, como lo son: crecimiento vigoroso, mayor tamaño de la flor, mayor tamaño de los tallos, mayor vida de florero, etc. Dichas características de mayor tamaño muchas veces son conferidas por la poliploidía, por lo cual no es raro encontrar plantas poliploides entre los cultivares comerciales.

El número cromosómico encontrado en *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' no solo es inusual cuando es comparado con otros reportes de la especie, sino también es inusual dentro del género *Hippeastrum*. Conteos cromosómicos se han realizado en diferentes especies del género, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 3. Es importante resaltar que la mayoría de las especies presentan un número básico de $x = 11$, el cual ha sido tratado como el número básico del género (Arroyo, 1982); sin embargo, se han reportado otros números cromosómicos básicos en *H. igneum* y *H. bicolor*, especies que presentan $2n = 16$, por lo que el número básico es $x = 8$. Otro número básico reportado es $x = 10$, el cual se reportó para *H. blumenavia* ($2n = 20$) (Arroyo, 1982). *H. iguazuatum* es la única especie reportada con $2n = 24$ (Williams & Dudley, 1984), aunque no es claro si se trata de una especie con número cromosómico básico de $x =$

6 o si se trata de un aneuploide $2n = 22 + 2$. Los autores sugieren que se tienen que realizar análisis de la meiosis para determinar el número cromosómico básico.

Tabla 3. Ejemplos de especies del género *Hippeastrum* en donde se han encontrado diferentes números cromosómicos y niveles de ploidía.

Especie	2n	x =	Referencia
<i>Hippeastrum igneum</i>	16	8	Esponda Fernandez 1970
<i>Hippeastrum bicolor</i>	16	8	Esponda Fernandez 1970
<i>Hippeastrum aulicum</i>	22	11	Arroyo 1982
<i>Hippeastrum machupichense</i>	22	11	Arroyo 1982
<i>Hippeastrum psittacinum</i>	22	11	Arroyo 1982
<i>Hippeastrum solandrifolium</i>	22	11	Arroyo 1982
<i>Hippeastrum forgetii</i>	23	11	Arroyo 1982
<i>Hippeastrum blumenavia</i>	20	10	Arroyo 1982
<i>Hippeastrum argentinum</i>	33	11	Arroyo 1982, Naranjo & Andrada 1975
<i>Hippeastrum reginae</i>	44	11	Arroyo 1982
<i>Hippeastrum rutilum</i>	55	11	Arroyo 1982, Naranjo & Andrada 1975
<i>Hippeastrum iguazuenum</i>	24	12	Williams & Dudley 1984
<i>Hippeastrum petiolatum</i>	44	11	Naranjo & Andrada 1975
<i>Hippeastrum aglaiae</i>	22	11	Naranjo & Andrada 1975

Construcción del cariotipo

El cariotipo de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' (Figura 6.) se construyó ordenando los cromosomas, clasificándolos por la posición del centrómero y de mayor a menor tamaño (Levan et al., 1964). Se midieron la longitud del brazo corto (bc), del brazo largo (bl), la longitud total de los cromosomas (LTC) y la distancia de la señal de la sonda al centrómero; se calculó la relación de los brazos cromosómicos (r) y el índice centromérico (Tabla 4.).

El cariotipo del género *Hippeastrum* es muy conservado, donde la mayoría de las especies presentan un cariotipo bimodal, con cromosomas metacéntricos pequeños y cromosomas submetacéntricos y subtlococéntricos grandes (Naranjo & Andrada, 1975; Arroyo, 1982; Khaleel et al., 1991). El cual es el mismo caso de *Hippeastrum vittatum* 'Reg Giant'.

La fórmula cariotípica de *H. vittatum* 'Red Giant' consiste en $2m + 6sm + 4st$ de acuerdo a la relación de los brazos cromosómicos (Levan et al., 1964). La fórmula cariotípica no coincide con la reportada por Naranjo & Andrada (1975) quienes son los únicos autores que reportan la fórmula cariotípica de *H. vittatum*. Ellos reportan una fórmula cariotípica de $4m + 3sm + 4st$. Siendo claro que la diferencia se encuentra en

el número de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, en el cultivar 'Red Giant' se encontraron 2 pares de cromosomas metacéntricos y 6 pares de cromosomas submetacéntricos, mientras que en *H. vittatum* se encontraron 4 pares metacéntricos y 3 pares submetacéntricos.

La posición del centrómero no es la única diferencia, como ya se había advertido anteriormente, el número de cromosomas también es diferente, en el cultivar 'Red Giant' existe un par de cromosomas adicional, también, el par cromosómico número 10 (Figura 6.) el cual es un par heteromórfico, los cuales únicamente han sido reportados por Shafiq & Vahidy (1998) en cultivares comerciales de *H. vittatum*.

Tabla 4. Parámetros cromosómicos de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant'

Par cromosómico	bc	bl	LTC	r	lc	D	Posición del centrómero
1	2.45	2.89	5.34	1.18	45.81	2.66	M
2	2.51	2.61	5.12	1.04	48.96		M
3	3.58	6.84	10.42	1.92	34.33		Sm
4	3.16	6.90	10.06	2.18	31.43		Sm
5	2.72	7.17	9.88	2.67	27.50		Sm
6	2.68	6.46	9.14	2.42	29.35		Sm
7	2.61	6.17	8.78	2.42	29.71		Sm
8	2.49	6.05	8.54	2.43	29.12		Sm
9	1.60	6.35	7.95	3.97	20.15		St
10	1.51	5.87	7.38	3.92	20.41		St
11	1.09	6.20	7.29	5.70	14.95		St
12	1.64	5.15	6.79	3.17	24.14	2.56	St

bc = brazo corto

bl = brazo largo

LTC = Longitud Total del Cromosoma

r = relación de brazos cromosómicos, $r = bl/bc$

lc = Índice centromérico, $lc = (bc/LTC) \times 100$

D = Distancia de la señal de fluorescencia al centrómero

M = Metacéntrico

Sm = Submetacéntrico

St = subtelocéntrico

El largo total del genoma (LTG) es de 193.36 μm . Los índices de asimetría de los cromosomas de *H. vittatum* 'Red Giant' son: TF % = 28.98; AsK % = 71.02, Syi = 40.81. Que, entre más cerca estén del 50 más simétrico será el cariotipo, al revisar los valores es claro que se trata de un cariotipo asimétrico.



Figura 6. Cariograma de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant'. Los pares 1 y 2 son cromosomas metacéntricos; los pares 3 al 8 son cromosomas submetacéntricos y los pares 9 al 12 son cromosomas subteloacéntricos. El par cromosómico 10 es un par heteromórfico.

Hibridación in situ

Roa & Guerra (2012) mencionan que el número de loci más frecuentes del ADN ribosomal 45S en las angiospermas es de dos y cuatro por cariotipo diploide y se localizan generalmente en la región terminal de los cromosomas, con mayor frecuencia en los brazos cortos. En concordancia con los estudios de Roa & Guerra (2012), se obtuvieron dos señales de hibridación del ADN ribosomal 45S, así como dos señales de hibridación del ADN ribosomal 5S. El ADN ribosomal 45S (marcado con Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP) se localizó en el brazo corto, en la región telomérica del cromosoma 12 (Figuras 7. y 9.). El ADN ribosomal 5S (marcado con Fluorescein-12-dUTP) se localizó en el brazo corto, en la región telomérica del cromosoma 1 (Figuras 8. y 9.).

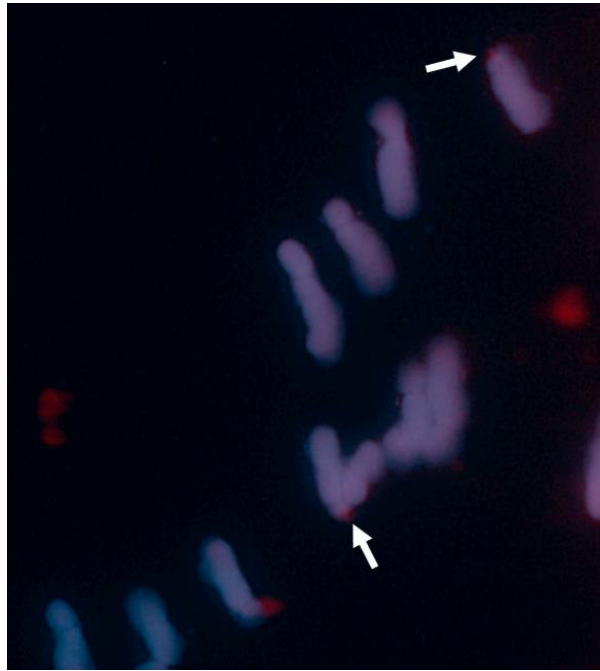


Figura 7. Hibridación in situ fluorescente del ADN ribosomal 45S, marcado con Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (flechas) en cromosomas de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant'.

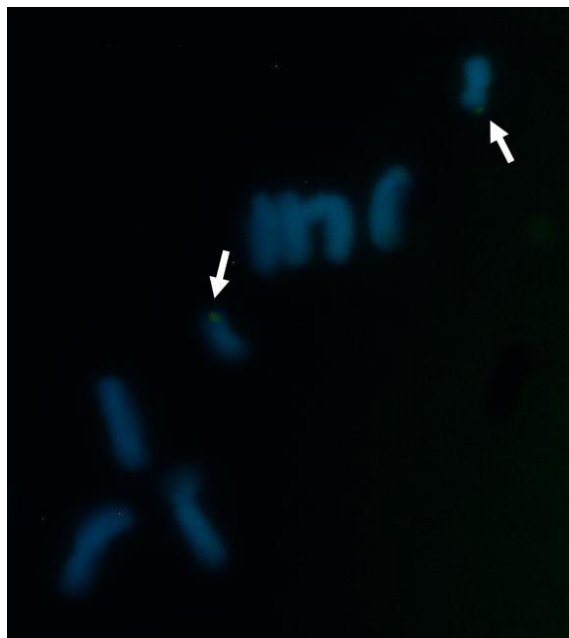


Figura 8. Hibridación in situ fluorescente del ADN ribosomal 5S, marcado con Fluorescein-12- dUTP (flechas) en cromosomas de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant'.

Ideograma

Con la información recabada de las mediciones de los cromosomas y los sitios de hibridación del ADN ribosomal en los cromosomas de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant' fue posible construir el ideograma (Figura 9.).

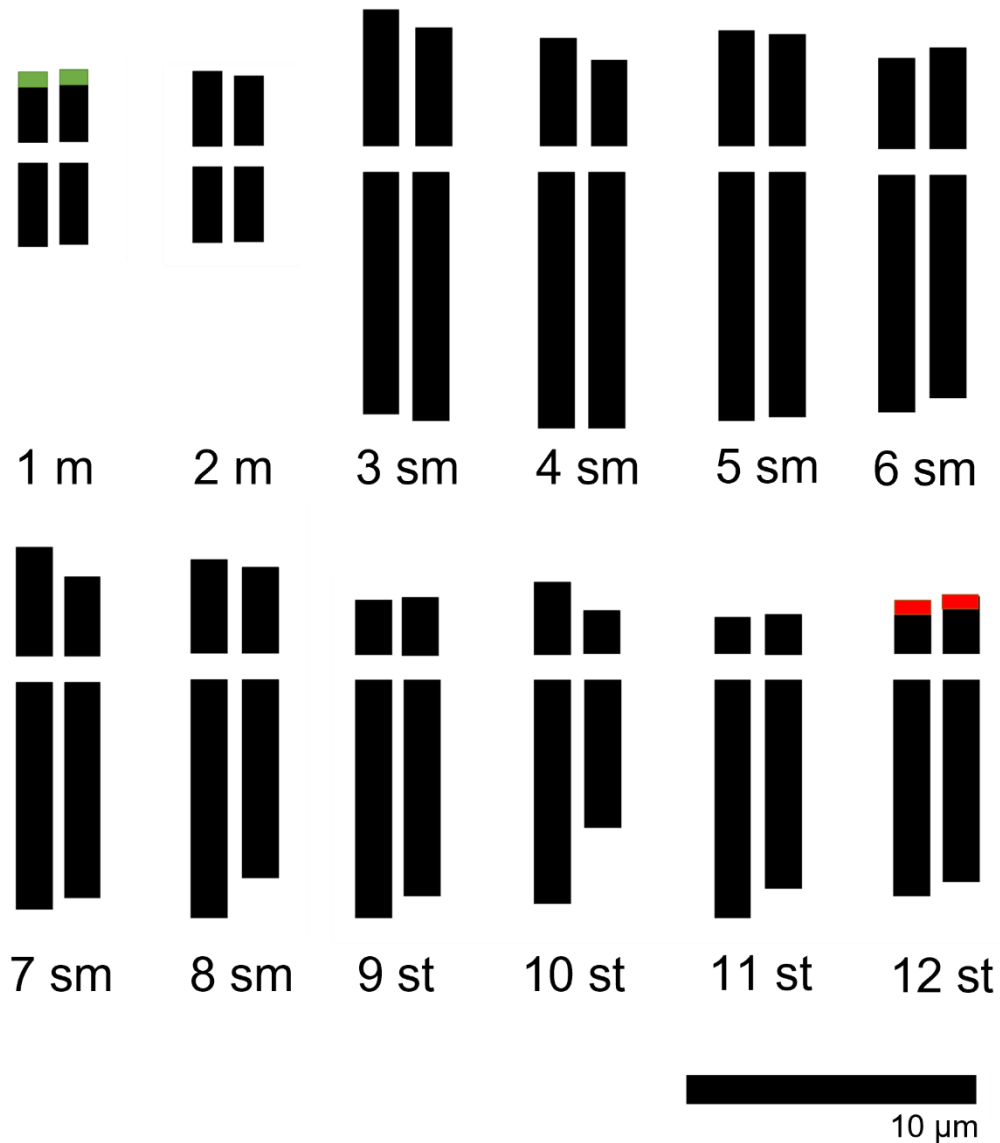


Figura 9. Ideograma de *Hippeastrum vittatum* 'Red Giant'. La fórmula cariotípica es $2m + 6sm + 4st$. En el brazo corto en la región telomérica del cromosoma 1 se localiza el sitio de hibridación del ADN ribosomal 5S (marcado con verde). En el brazo corto en la región telomérica del cromosoma 12 se localiza el sitio de hibridación del ADN ribosomal 45S (marcado con rojo).

Conclusiones

El número cromosómico del cultivar 'Red Giant' de *Hippeastrum vittatum* es $2n = 24$. Tomando en cuenta que los reportes del género sugieren que el número cromosómico básico es $x = 11$, lo más probable es que el cultivar 'Red Giant' sea un cultivar aneuploide, $2n = 22 + 2$. Es probable que el par cromosómico adicional le confiera alguna característica ornamental sobresaliente, y por esta haya sido seleccionado como cultivar comercial.

Se localizaron y mapearon los sitios de hibridación de los genes ribosomales 5S y 45S de trigo mediante la hibridación fluorescente in situ de las sondas que contenían los genes. Se encontraron dos sitios de hibridación de la sonda 45S en la región telomérica del par cromosómico 12. Así también, se encontraron dos sitios de hibridación de la sonda 5S, en la región telomérica del par cromosómico 1. Este es el primer reporte de hibridación in situ fluorescente en el género *Hippeastrum*. El cual servirá para conocer la estructura cromosómica del género.

El tamaño total del genoma (LTG) de *Hippeastrum vittatum* es $193.36 \mu\text{m}$. Su fórmula cariotípica es $2m + 6sm + 4st$ y los índices de simetría/asimetría del cariotipo son: TF % = 28.98, AsK % = 71.02 y Syi % = 40.81, con lo que se concluye que el cariotipo es asimétrico, bimodal con dos pares de cromosomas metacéntricos pequeños en comparación con el resto de cromosomas submetacéntricos y subtelocéntricos. Adicionalmente se reporta la presencia de un par de cromosomas heteromórficos. Los resultados de los análisis realizados muestran discrepancia con el número cromosómico reportado por otros autores, sugiriendo con esto la presencia de un cromosoma adicional el cual pudiera ser el par heteromórfico.

Es necesario realizar análisis cromosómicos en otros cultivares de *H. vittatum*, así como en otras especies del género *Hippeastrum*, ya que la información disponible es poca y de manera general se reduce a conteos cromosómicos, por lo que información como la reportada en este trabajo servirá para una mejor comprensión de la evolución del género *Hippeastrum* y la familia Amaryllidaceae, así como para poder realizar una planeación en un programa de mejoramiento genético.

Bibliografía

- Ahmad F, Acharya SN, Mir Z & Mir PS (1999) Localization and activity of rRNA genes on fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) chromosomes by fluorescent in situ hybridization and silver staining. *Theor Appl Genet* 98: 179-185.
- Alzate F, Lesmes M, Cortés N, Varela S & Osorio, E (2019). Sinopsis de la familia Amaryllidaceae en Colombia. *Biota Colombiana*, 20(1), 2-20.
- Appels R & Honeycutt RL (1986) rDNA: evolution over a billion years. En: Dutta SK (ed) *DNA systematic*. Vol I, II. CRC press Inc, Boca Raton.
- Arroyo S (1982) The chromosomes of *Hippeastrum*, *Amaryllis* and *Phycella* (Amaryllidaceae). *Kew Bull* 37(2): 211-216
- Arroyo Martinez Hugo (2014) Determinación del cariotipo en tres especies silvestres de *Tigridia* spp.
- Bachmann K (1992) Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. *Acta Botanica Neerlandica* 41 (4): 369-384
- Baker J.G. (1888) *Handbook of the Amaryllideae, including the Alstroemerieae and Agaveae*. London: George Bell & Sons.
- Brandes A, Thompson H, Dean C & Heslop-Harrison JS (1997) Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. *Chromosome Res* 5: 238-246.
- Brown SE, Stephens JL, Lapitan NLV & Knudson DL (1999) FISH landmarks for barley chromosomes (*Hordeum vulgare* L.). *Genome* 42: 274-281.
- Castilho A, Vershinin A & Heslop-Harrison JS (2000). Repetitive DNA and the chromosomes in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Ann Bot* 85: 837-844.
- Chase M, Reveal J & Fay M (2009) A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Bot J Linnean Soc* 161: 132-136.
- Chase MW, Duvall MR, Hills HG, Conran JG, Cox AV & Eguiarte LE (1995) *Molecular Systematics of Liliaceae*. En: Rudall PJ, PJ Cribb & CJ Humphries (Eds.) *Monocotyledons: Systematics and evolution*: 109-137. Chicago University Press.
- Cruz Duque Albino A. (2014) Hibridación Fluorescente in situ (FISH) en células metafásicas de *Habranthus tubispanthus* para la identificación de su cariotipo.
- Dahlgren RMT, Clifford HT & Yeo PF (1985) *The families of the Monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy*. Springer Verlag. Berlin. 520 pp.

Delgado L, Lastra M & Marulanda Angel M (2010) Estandarización de la técnica citogenética squash para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia Et Technica*. 3 (46): 74 - 79.

El-Naggar AH & El-Nasharty AB (2009) Effect of Growing Media and Mineral Fertilization on Growth, Flowering, Bulbs Productivity and Chemical Constituents of *Hippeastrum vittatum*, Herb. *American-Eurasian J Agric & Environ Sci* 6 (3): 360-371.

Espejo-Serna A & López-Ferrari AR (1993) Las monocotiledóneas mexicanas, una sinopsis florística 1. Lista de referencia, parte I. Agavaceae, Alismaceae, Alliaceae, Alstroemeriaceae y Amaryllidaceae. Consejo Nacional de la Flora de México y Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F., México.

Esponda Fernández P (1970) Cytotaxonomy of two species of the genus *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Cytologia* 35: 431-433.

Falisticco E & Falcinelli M (2003) Genomic organization of rDNA loci in natural populations of *Medicago truncatula* Gaertn. *Hereditas* 138: 1-5.

Ferrer-Pereira HE, Alcorcés-de-Guerra NC & Méndez-Natera JR (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.

Flavell R (1980) The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA Sequences. *Ann Rev Plant Physiol* 31 (3): 569-596.

Flory WS & Coulthard Jr RF (1981) New chromosome counts, numbers, and types in Genus *Amaryllis*. *Plant Life (Amaryllis Year Book)* 37(1): 43.

Frello S & Heslop-Harrison JS (2000) Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by in situ hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. *Ann Bot* 86: 317-322.

Galasso I, Sonnante G, Guido-Tota S & Pignone D (1997). Comparison of molecular cytogenetic and genetic analyses in accessions of the two biotypes of *Vicia benghalensis* L. *Ann Bot* 79: 311-317.

García-Velázquez A (1990) Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Talleres Gráficos de la Nación. México, D.F. 137 pp.

Gerlach WL & Bedbrook JR. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res* 7 (7): 1869-1885.

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

Inariyama S. (1937) Karyotype studies in Amaryllidaceae I. Sei. Rep. Tokyo Bunriki Daigaku. Sect. B. 3: 95-113.

Kannan TP & Zilfalil BA (2009) Cytogenetics: past, present and future. Malays J Med Sci 16 (2): 4-9.

Khaleel TF, Haven S & Gilg T (1991) Karyomorphology of *Amaryllis* hybrids. Cytologia 56: 31-41.

Lara-Rico RF & Vásquez-Chávez (2015) Notas acerca del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) en Bolivia, II. Fontqueria 56 (43): 403-438.

Levan A, Fredga K & Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52(2): 201-220.

Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E & Mroginski L (2010) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. INTA, Argentina. 650 pp.

Lim K-B, Wennekes J, De Jong JH, Jacobsen E & Van Tuyl JM (2001) Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescent in situ hybridisation. Genome 44: 911-918.

Lopez Ferrari AR & Espejo Serna A (2002) Amaryllidaceae. Flora de Veracruz, Fascículo 128. Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz. 32 pp.

Meerow AW & Snijman DA (1998) Amaryllidaceae. In: Kubitzki K. (ed) Flowering Plants · Monocotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg.

Mookerjee (1955) Cytology of Amaryllids as an aid to the understanding of evolution, Caryologia 7(1): 1-71.

Moore HE (1963) *Amaryllis* and *Hippeastrum*. Baileya 11: 15-16

Mühlmann M (2002) Molecular cytogenetics in metaphase and interphase cells for cancer and genetic research, diagnosis and prognosis. Application in tissue sections and cell suspensions. Genet Mol Res 1 (2): 117-127

Naranjo C & Andrada A (1975). El cariotipo fundamental en el género *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae). Darwiniana, 19(2/4): 566-582.

Negi MS, Rajagopal J, Chauhan N, Cronn R & Lakshmikumaran M (2002) Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides*. Genome 45: 1181- 1188.

Peruzzi L & Eroglu HE (2013) Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure?. Comp Cytogenet 7 (1): 1-9.

- Piña-Escutia JL, Vences-Contreras C, Gutiérrez-Martínez MG, Vázquez-García LM & Arzate-Fernández AM (2010) Caracterización morfológica y molecular de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia* 44 (2): 147-158.
- Poggio L, González G & Naranjo CA (2007) Chromosome studies in *Hippeastrum* (Amaryllidaceae): variation in genome size. *Bot J Linnean Soc* 155: 171-178.
- Redouté PJ (1805) Les liliacees. Paris : Chez l'auteur, an 13-[24], 1805-1816 [i.e. 1802-1815] as *Amaryllis vittata*
- Roa F & Guerra M (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evol Biol* 12, 225
- Sato D (1942) Karyotype alteration and phylogeny in Liliaceae and allied families. *Jap J Bot* 12 (1-2): 57-123.
- Shafiq FA & Vahidy AA (1998) Chromosomal Heteromorphy in the Karyotypes of Three Local Cultivars of *Hippeastrum vittatum* (Amaryllidaceae). *Pakistan J Biol Sci* 1(1): 5-10.
- Sharma AK (1956) A new concept of a means of speciation in plants. *Caryologia* 9: 93-130.
- Swanson C, Mertz T & Young WJ (1981) The Chromosome in division, inheritance and evolution. Segunda Edición. Prentice Hall. Englewood cliffs New Jersey. USA. 304 pp.
- Williams M & Dudley TR (1984) Chromosome count for *Hippeastrum iguazuianum*. *Taxon* 33(2): 271-275.