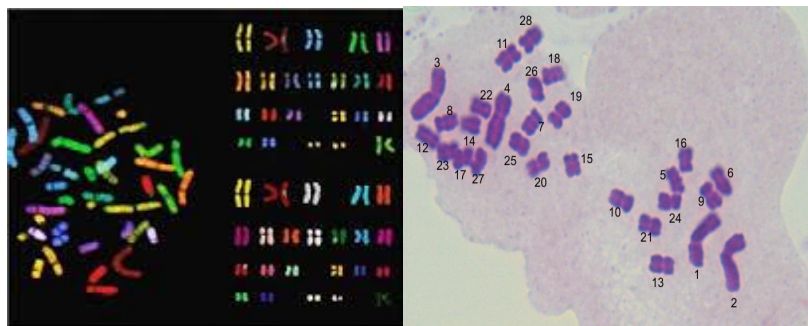


SISTEMA NACIONAL DE RECURSOS FITOGÉNETICOS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
CENTRO UNIVERSITARIO TENANCINGO

CARIOTIPO EN ESPECIES DE *Tigridia*



HUGO ABELARDO ARROYO MARTÍNEZ
JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA



ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Especies de <i>Tigridia</i> empleadas en este trabajo	2
2.1.1 <i>T. pavonia</i> (L.f) DC.	2
2.1.2 <i>T. multiflora</i> (Baker) Ravenna.....	3
2.1.3 <i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i> Molseed.....	4
2.2 Variación genética	4
2.2.1 Variación cromosómica	5
2.3 Citología	5
2.3.1 Definición	5
2.3.2 Importancia	6
2.3.3 Técnica	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1 Ubicación del experimento	7
3.2 Material vegetativo	7
3.3 Observación de cromosomas mitóticos	8
3.4 Elaboración del cariotipo	8
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4.1 Determinación de hora de colecta	10
4.2 Cariotipo	11
4.2.1 <i>T. pavonia</i>	12
4.2.2 <i>T. multiflora</i>	14
4.2.3 <i>T. alpestris</i> subsp. <i>obtusa</i>	15
4.2.4 Discusión general	17
V. LITERATURA CONSULTADA	18

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 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, pudiendo generar variabilidad genética (Levitus *et al.*, 2010).

Generalmente los miembros de algunos géneros taxonómicos presentan características citológicas similares. Sin embargo, el género *Tigridia* es citológicamente distinto, tiene

números básicos variables y no hay una información certera en los cariotipos, 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), o $2n = 14$ (Kenton y Heywood 1983).

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.

II. ANTECEDENTES

2.1 Especies de *Tigridia* empleadas en este trabajo

2.1.1 *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).

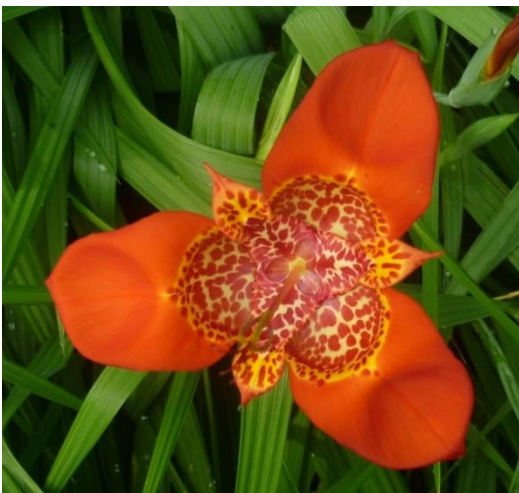


Figura 1. *T. pavonia* (L.f) DC var. Trinidad.

2.1.2 *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.

2.1.3 *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.

2.2 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).

2.2.1 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 mecanismos 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 fenotipo. 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).

2.3 Citología

2.3.1 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).

2.3.2 Importancia

Kenton (1986) explica que los estudios citogenéticos determinan la variación genética y sus causas. Esta información es fundamental para conocer la plasticidad de 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).

2.3.3 Técnica

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).

Una vez determinada la hora mitótica, para la caracterización cromosómica de especies o variedades de plantas, los tejidos meristemáticos (ápices radicales o caulinares, óvulos, etc.) son pre-tratados con diversas sustancias que inhiben la formación del huso mitótico (colchicina, 8-hidroxiquinoleína, paclosol, etc.) para acumular metafases, dispersar los cromosomas en el citoplasma y producir una mayor condensación de los mismos. Los materiales se fijan y luego se tiñen con colorantes nucleares (fucsina básica, orceína, carmín, giemsa, etc.). Finalmente, se confeccionan los preparados por macerado y aplastado (“squash”) del material sobre un portaobjetos. Con estos métodos de tinción, los

cromosomas metafásicos observados con un microscopio óptico aparecen teñidos, excepto en el centrómero (constricción primaria) y en algunas constricciones menores (secundarias). A través del análisis de microfotografías se realiza un análisis del número, el tamaño y la forma de los cromosomas que presenta el complemento cromosómico determinando en base a estos parámetros el cariotipo de la especie a analizar (Levitus *et al.*, 2010).

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 (FCAgrí), 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 1g L⁻¹ de carbón activado y 1mg 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 de cromosomas mitóticos

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

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. 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.

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

Posteriormente 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 y las fotomicrografías fueron tomadas con una cámara marca Leica MC170 HD.

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

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

- 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 CoreIDRAW 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, se determinó que el mejor tiempo para coleccionar los ápices radiculares fue a las 5:30 am (Figura 4), ya que en este periodo, en las tres 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) mencionan que la hora mitótica es un parámetro muy variable entre especies, y dentro de éstas es característico para cada especie, aunque esto no implica que especies diferentes no puedan mostrar la misma hora mitótica, como ha sido observado en *Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*, donde se encontró que el rango de hora mitótica fue de 5:00 a.m. a 6:00 a.m, periodo similar al presentado por las especies de *Tigridia* evaluadas en la presente investigación.

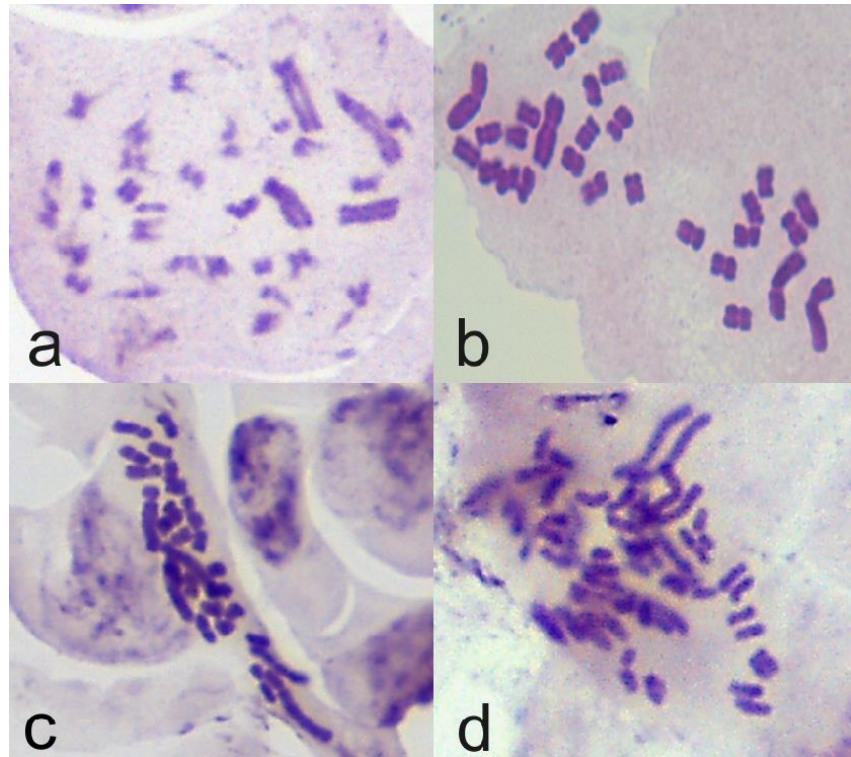


Figura 4. Células de ápices radiculares de *T. pavonia* con cromosomas en arresto mitótico, colectados en diferentes horas. a) 4:30 am; b) 5:30 am; c) 6:00 am; d) 7:00 am. Obsérvese la mayor condensación de los cromosomas en las células colectadas a las 5:30.

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.

4.2.1 *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 (Figuras 5,6), 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.

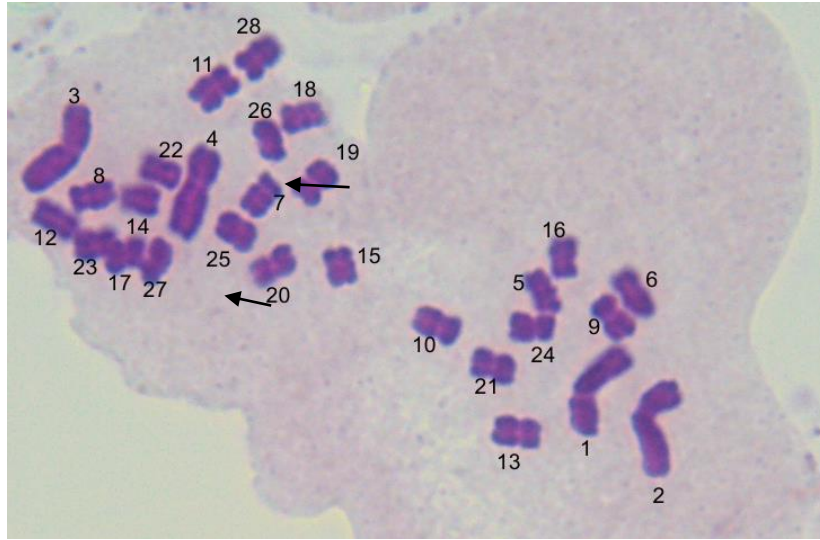


Figura 5. Célula de *T. pavonia* con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$, las flechas indican los cromosomas que presentan constricción secundaria.

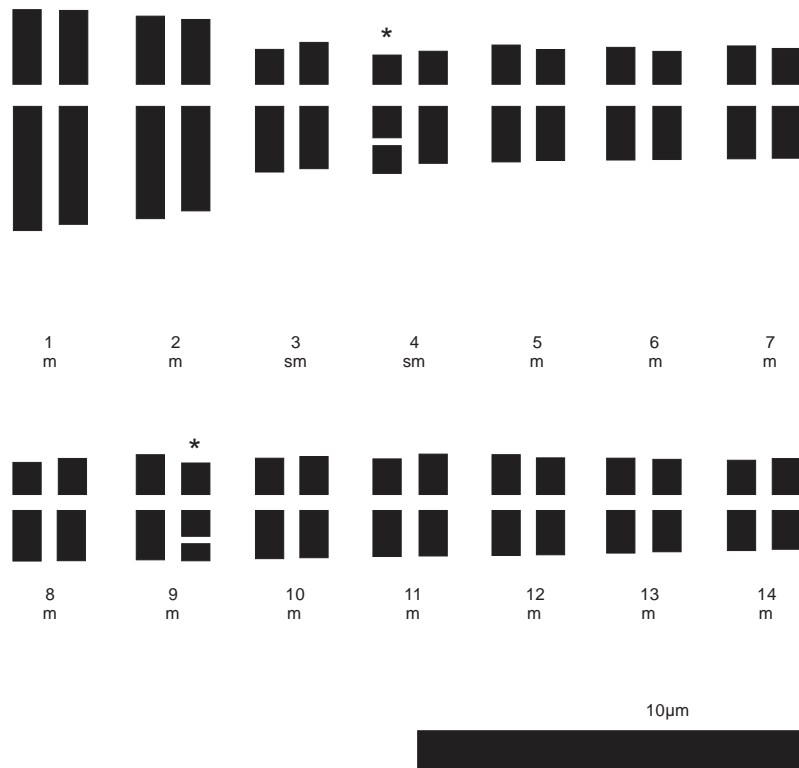


Figura 6. Idiograma de *T. pavonia* con fórmula cariotípica de $25m + 3sm$. Los asteriscos indican los cromosomas que presentan constricción secundaria.

4.2.2 *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 (Figuras 7,8). No se observaron constricciones secundarias.

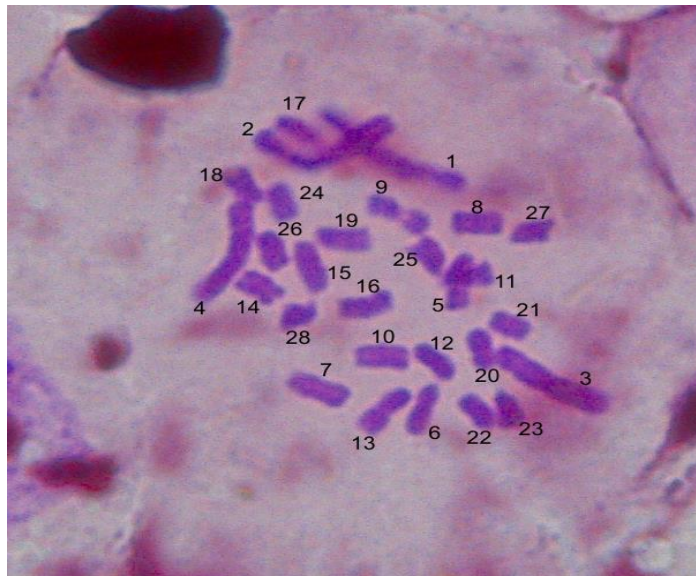


Figura 7. Célula de *T. multiflora* con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$.

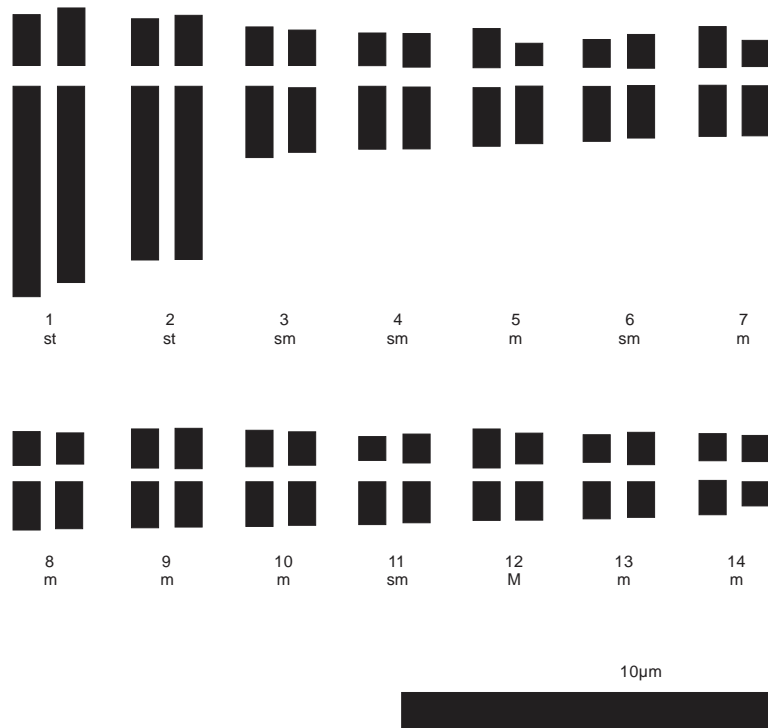


Figura 8. Idiograma de *T. multiflora* con fórmula cariotípica de $2M + 14m + 8sm + 4st$.

4.2.3 *T. alpestris* subsp. *obtusa*

Esta especie 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 (Figuras 9,10). En esta especie tampoco se observaron constricciones secundarias.

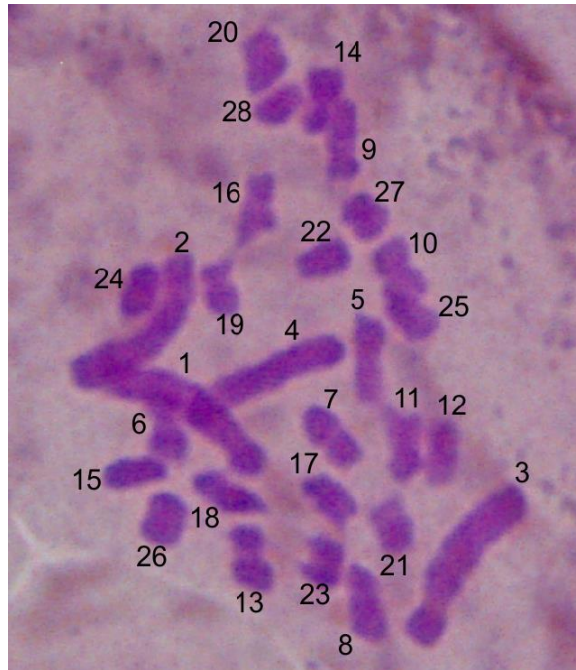


Figura 9. Célula de *T. alpestris* subsp. *obtusa* con cromosomas en metafase mitótica, $2n = 28$.

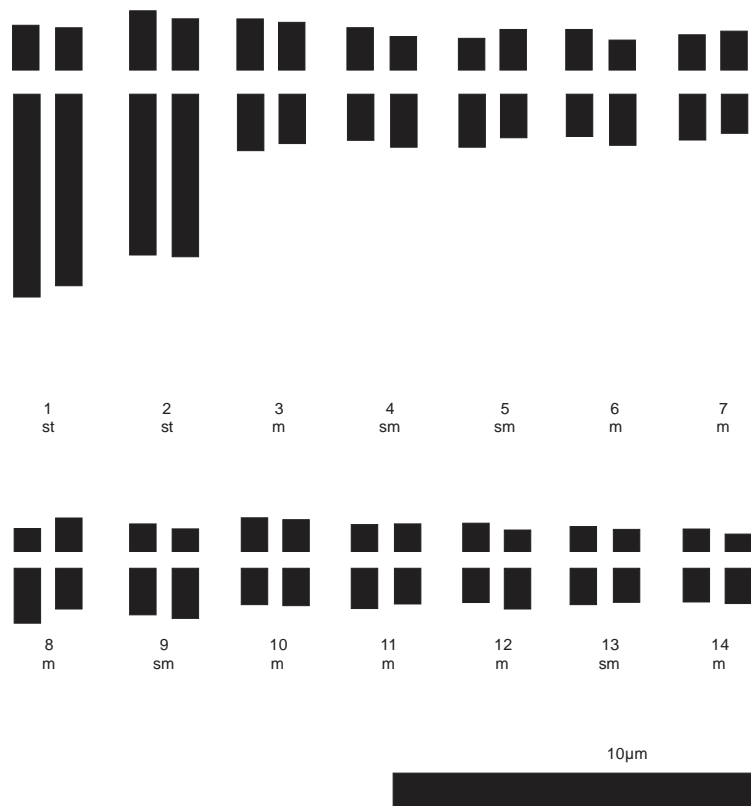


Figura 10. Idiograma de *T. alpestris* subsp. *obtusa* con fórmula cariotípica de $17m + 8sm + 3st$.

4.2.4 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 1). *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 1. Cariotipo de *T. pavonia*, *T. multiflora* y *T. alpestris* subsp. *obtusa*.

Espece	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. LITERATURA CONSULTADA

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. 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.

4. 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.
5. 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.
6. García-Velázquez, A. 1990. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Talleres Gráficos de la Nación. México, D.F. 137 pp.
7. Kenton, A. y Heywood, C. A. 1983. Cytological studies in south American Iridaceae. Plant Systematic and Evolution 146: 87-104.
8. 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.
9. 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.
10. Molseed, E. 1970. The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley. 54: 1-126.

11. 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.
12. Palomino-Hasbach, G. 1995. Estudios Citogenéticos de Plantas Mexicanas. plantas, Biotecnología - Agronomía - Nutrición. Libro de memorias, VI semana del conocimiento. Cuautla, Morelos.
13. Palomino-Hasbach, G.; Martínez, J. y Méndez, I. 2010. Análisis del tamaño del genoma y cariotipo de *Agave akites* Gentry (Agavaceae) de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 655 - 662.
14. 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.
15. Rodríguez, A.; Ortiz-Catedral, L. y Heaton, E. 2003. Tres nuevas localidades de *tigridias* endémicas de México: *Tigridia bicolor*, *T. matudae* y *T. vanhouttei* ssp. *Roldanii*. *Acta Botánica Mexicana* 62: 1-8 pp.
16. Vázquez-García, L. M.; Arzate-Fernández, A. M.; Rodríguez-Contreras, A.; Munguía-Lino, G.; Mejía-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. Catálogo de *Tigridias* Mexicanas. SINAREFI Red *Tigridia*.