



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Obtención y Comparación de Cariotipos Mediante Diferentes Técnicas de Citogenética Molecular en el Género *Lilium*.

Tesis

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de
Recursos Naturales y Agrícolas

Presenta

Alfredo Gabriel Rodríguez Rodríguez

Dr. Rodrigo Barba González

Director

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba

Co-Director

Zapopan, Jalisco

07 de Julio de 2011



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Obtención y Comparación de Cariotipos Mediante Diferentes Técnicas de Citogenética Molecular en el Género *Lilium*

Por

Alfredo Gabriel Rodríguez Rodríguez

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de
Recursos Naturales y Agrícolas**

Aprobada por:

Dr. Rodrigo Barba González
Director de tesis e integrante del jurado

Fecha

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
Co-Director de tesis e integrante del jurado

Fecha

Dr. Ernesto Tapia Campos
Asesor del comité e integrante del jurado

Fecha

Dr. Lino de la Cruz Larios
Asesor del comité e integrante del jurado

Fecha

La realización de este trabajo fue con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAYT) México. Investigación Científica Básica (SEP-CONACYT). Proyecto 61669.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara por la oportunidad de ingresar al Maestría en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Dr. Salvador Mena Munguía, Rector del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, por el apoyo brindado.

Dr. Rodrigo Barba González, director externo de la tesis, por confiar en mí desde el primer momento y permitirme trabajar en su grupo de investigación del CIATEJ, transmitiéndome sus conocimientos y experiencia científica. Gracias por su inestimable ayuda.

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba, director interno de la tesis, quien siempre mostró su disposición y apoyo incondicional y porque desde el principio y hasta el final me respaldo.

Mi reconocimiento a mi asesor por sus valiosas sugerencias, Dr. Ernesto Tapia Campos

Mi reconocimiento a mi asesor y maestro por sus valiosas sugerencias, Dr. Lino de la Cruz

Biol. Milagros Revuelta, por su apoyo y disposición cuando lo necesite.

Dra. Patricia Dupre, por su apoyo y disposición cuando lo necesite.

M. en C. Leticia Fregoso Franco por su apoyo cuando lo necesite

M. en C. Manuel Rodríguez Domínguez por su apoyo y disposición cuando lo necesite.

Dra. Evangelina Quiñones Aguilar, por su colaboración en el Laboratorio.

Dr. Ramón Rodríguez Macías, director del Departamento de Biología y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agronómicas de la Universidad de Guadalajara, por apoyarme para el logro de mis objetivos.

Al Dr. Mario Alberto Ruíz López, en su momento como administrador, ahora como compañero y amigo el apoyo que me brindó en el logro de mis objetivos.

A mis compañeros de laboratorio: Laura Mendoza, Víctor Gómez, Li Wei Lin.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2. OBJETIVOS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS PARTICULARES	8
CAPITULO 3. HIPÓTESIS	9
HIPÓTESIS	9
CAPITULO 4. IDENTIFICACIÓN DE CROMOSOMAS DEL GÉNERO <i>LILIUM</i> UTILIZANDO HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA <i>IN SITU</i> (CGISH)	10
INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS Y DISCUSIONES	14

CAPITULO 5. IDENTIFICACIÓN DE CROMOSOMAS EN EL GÉNERO <i>LILIUM</i> UTILIZANDO SONDAS ESPECÍFICAS DE ADN RIBOSÓMICO	18
INTRODUCCIÓN	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
CAPITULO 6. CONCLUSIONES	35
LITERATURA CITADA	36
LISTA DE APÉNDICE	41
APÉNDICE A	41
APÉNDICE B	45
APÉNDICE C	46
APÉNDICE D	47
APÉNDICE E	48

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 3.1. Rigor utilizado para la eliminación de la hibridación cruzada	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Localización física (puntos de referencia) de hibridación de ADN genómico de <i>A. thaliana</i> y <i>T. aestivum</i> en cromosomas de <i>Lilium</i> .	15
Figura 3.2. Ideogramas de tres variedades comerciales de <i>Lilium</i> mostrando las Bandas DAPI y la hibridación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Triticum aestivum</i>	16
Figura 4.1. Mapa del Vector pGEM [®] -T Easy	23
Figura 4.2. Amplificación por PCR de la secuencia de ADN r5S de ≈500pb del cultivar ‘Sapporo’ del género <i>Lilium</i> en membrana de Agarosa 1% revelado con Bromuro de Etidio	28
Figura 4.3. Amplificación por PCR de la secuencia de ADN ribosómico 5.8S de 550pb del cultivar ‘Sapporo’ del género <i>Lilium</i> en membrana de agarosa 1% Revelado con bromuro de etidio	28
Figura 4.4. Colonias de bacterias transformadas de color blanco y Colonias de bacterias no transformadas de color azul. En medio de cultivo LB suplementado con ampicilina a 0.1mg/mL y X-Gal	29
Figura 4.5. ADNp recombinante (P) y ADN genómico del 5S ribosomal (5S) del cultivar Sapporo en membrana de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio	29
Figura 4.6. Secuencia del ADN ribosómico 5.8S del cultivar ‘Sapporo’ del género <i>Lilium</i>	30
4.7 Hibridación <i>in situ</i> de ADN ribosómico en cromosomas del género <i>Lilium</i> .	31
Figura 4.8 Hibridación <i>in situ</i> de ADN ribosómico 5S en cromosomas del género <i>Lilium</i> de la variedad Oriental Chinon.	32

RESUMEN

La identificación individual de cromosomas es de importancia primordial en el estudio de los procesos evolutivos en genomas complejos, tales como eventos de poliploidización e hibridación, entre otros. Tradicionalmente la identificación cromosómica es realizada organizando los cromosomas por el tamaño de los brazos corto (p) y largo (q), identificando los centrómeros y constricciones secundarias. Adicionalmente, la identificación precisa de cromosomas individuales puede ser realizada a través de técnicas de diferenciación cromosómica tales como los bandeos G- y C-, que produce la tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva, N- en la cual se utiliza nitrato de plata y tiñe los sitios de las regiones organizadoras de los nucléolos NOR (por sus siglas en inglés: Nucleolar Organization Región) y Q- las cuales forman un patrón fluorescente que se obtiene al utilizar quinacrine. En los últimos años, con el desarrollo de técnicas como la Hibridación *In situ* Fluorescente (FISH), se ha logrado la identificación aun más precisa de cromosomas individuales, por medio de la hibridación de secuencias repetitivas altamente conservadas, tales como el ADN ribosómico. Sin embargo, es necesario desarrollar sondas particulares a través de técnicas de aislamiento y clonación molecular.

La Hibridación *In situ* Comparativa (cGISH) es una técnica sencilla y directa que permite la identificación individual de cromosomas con la generación de señales de regiones de ADN conservadas a lo largo de los cromosomas de diferentes especies. En este trabajo se marco ADN genómico total de *Triticum aestivum* y *Arabidopsis thaliana* y se hibridó a cromosomas de diferentes cultivares del género *Lilium*. Se aplicó diferente rigor para determinar la remoción óptima de hibridación cruzada, el rigor al 80% mostró ser el mejor, dando una señal clara y removiendo la mayoría de la hibridación cruzada. El ADN total de *Triticum aestivum* expuso seis puntos de referencia en tres cromosomas homólogos en los cultivares White Heaven, Dordogne y Casa Blanca del género *Lilium*, mientras que el ADN genómico total de *Arabidopsis thaliana* también expuso seis puntos de referencia en tres cromosomas homólogos, sin embargo, uno de los puntos expuestos se encontró en un cromosoma diferente al de las señales de *T. aestivum*. Junto con las bandas DAPI, los puntos de referencia del ADN genómico total permitieron la identificación de 6 de 12 cromosomas homólogos individuales. Por otro lado, se elaboraron

sondas de ADN ribosómico específico al género *Lilium*, mediante el aislamiento y clonación del las fracciones 5S y 5.8S específico al género, éstas secuencias fueron hibridadas en cromosomas de los cultivares ‘Chinon’ y ‘Sapporo’ del género *Lilium*, logrando la identificación de 8 y 10 cromosomas respectivamente cuando se utilizó el fragmento 5.8S de *Lilium*. Con respecto al 5S específico a *Lilium*, solo hibridó en cromosomas de la variedad ‘Chinon’ logrando la identificación de 4 cromosomas.

ABSTRACT

Single chromosome identification is of primal importance in the study of evolutive process in complex genomes, such as poliploidization and hybridization events, among others. Traditionally, chromosome identification is made by arranging the chromosomes by the length of the short (*p*) and the long (*q*) arms, identifying the centromeres and secondary constrictions. Furthermore, accurate chromosome identification can be performed through chromosome differentiation techniques such as G- and C- banding, which produces a constitutive heterochromatin selective stain; N- banding, in which silver nitrate is utilized and stain the nucleolar organization region (NOR); and Q-banding, these form a fluorescent pattern with the use of quinacrine. In the last years, through the development of fluorescent *in situ* hybridization techniques (FISH), even more accurate single chromosome identification has been accomplished, by the hybridization of highly conserved repetitive sequences, such as rDNAs. However, particular probes must be developed through isolation and molecular cloning techniques.

The comparative genomic *in situ* hybridization (cGISH) is a straightforward technique that allows the identification of single chromosomes by the generation of signals of conserved DNA regions along the chromosomes of different species. In this study we labeled total genomic DNA of *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana* and hybridized it to chromosomes of different cultivars of the genus *Lilium*. Different stringencies were applied to determine the optimum removal of cross hybridization, the 80% stringency showed to be the best, giving a clear signal and removing most of the cross hybridization. *Triticum aestivum* total genomic DNA exhibited six landmarks on three homologous chromosomes in the three different cultivars while *Arabidopsis thaliana* total genomic DNA exhibited six landmarks on three homologous chromosomes on *Lilium*, one of these signals being in a different chromosome of those of the *T. aestivum* signals. Together with the DAPI bands the total genomic DNAs landmarks allowed the identification of six out of 12 single homologous chromosomes. Furthermore, *Lilium* specific ribosomal DNA probes were elaborated through isolation and cloning of the 5S and 5.8S fragments, these sequences were hybridized to chromosomes of the *Lilium* cultivars ‘Chinon’ and ‘Sapporo’, achieving the identification of 8 and 10 chromosomes respectively when the 5.8S fragment was used. With respect to the 5S rDNA specific to *Lilium*, this was hybridized to ‘Chinon’ chromosomes attaining the identification of 4 chromosomes.

INTRODUCCIÓN

Identificación cromosómica

Un cariotipo es el arreglo estandarizado que muestra todos los cromosomas de una célula ordenados en secuencia descendiente de acuerdo a su longitud (Linde-Laursen 1975). Los cromosomas se muestran en un formato estándar conocido como ideograma y se acomodan en pares, ordenados por tamaño y posición del centrómero, con el brazo corto (*p*) en la parte superior. Los cariotipos se utilizan para estudiar aberraciones cromosómicas, relaciones filogenéticas, mecanismos evolutivos y en muchos casos se utilizan para determinar aspectos visibles de genotipos individuales. La construcción de cariotipos generalmente incluye patrones heterocromáticos basados en bandeos C-, N- y Q, así como en otras técnicas de diferenciación cromosómica.

En los cariotipos ‘clásicos’, se utiliza un tinte, por lo general Giemsa, que produce la tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva (bandas G- y C-) o el nitrato de plata, que tiñe los sitios de las regiones organizadoras de los nucléolos NOR (por sus siglas en inglés: Nucleolar Organization Región) (bandas N-) para visualizar bandas en los cromosomas. Los cariotipos espectrales son el resultado de técnicas recientes de citogenética molecular, se utilizan para visualizar en diferentes colores todos los cromosomas homólogos de un organismo. Las sondas marcadas con fluorescencia se obtienen marcando ADN específico a los cromosomas con fluorocromos diferentes. Las diferencias espectrales generadas por el marcaje combinado son capturadas y analizadas en microscopio equipado con fluorescencia. Posteriormente, software procesador de imágenes asigna un pseudo-color a cada combinación espectral diferente, permitiendo la visualización de los cromosomas coloreados individualmente (Schrock *et al.* 1996). Esta técnica se utiliza para identificar aberraciones estructurales en células cancerígenas y otras condiciones anormales en humanos, donde el bandedo Giemsa y otras técnicas no son lo suficientemente precisas.

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH)), la cual mapea secuencias repetitivas y copias sencillas de ADN en los cromosomas, complementa las tecnologías de bandeo, junto con la utilización de fluorocromos específicos para ADN (Peterson *et al.* 1999), los cuales dilucidan variación local en el ADN y/o en la composición de la cromatina, se ha convertido en el método más apropiado para el mapeo físico de secuencias de ADN en cromosomas y en la identificación de cromosomas con diferentes marcadores. Además de la identificación de cada uno de los cromosomas humanos, la hibridación *in situ* y las técnicas de bandeo de cromosomas fueron integradas exitosamente en un solo procedimiento a través de varias combinaciones de bandeo G-, Q-, las cuales forman un patrón fluorescente que se obtiene al utilizar quinacrina; y de replicación con la hibridación *in situ* (McNeil *et al.* 1991). Con la disponibilidad de sondas para cromosomas humanos completos, la hibridación genómica comparativa (Comparative Genomic Hybridization (CGH)) y la hibridación genómica *in situ* (Genomic *In situ* Hybridization (GISH)) con supresión cromosómica *in situ* (Chromosomal *In situ* Suppression (CISS)), éstas técnicas de hibridación ha sido aplicada exitosamente en la citogenética animal para estudiar cambios en los cariotipos durante el proceso de especiación o reacomodos en los cariotipos entre especies intergenéricas (Wienberg y Stanyon 1995). Mapas comparativos de cromosomas fueron desarrollados para humanos y varios mamíferos (Wienberg *et al.* 1990,1992) y fueron extendidos a mamíferos distantemente relacionados utilizando ZOO-FISH (Scherthan *et al.* 1994, Rettenbergger *et al.* 1995).

En lo que respecta a la citogenética vegetal, el estudio comparativo aún tiene que ser desarrollado, desafortunadamente, no existen sondas para cromosomas completos; los métodos utilizados con mayor frecuencia para la identificación de cromosomas, especialmente para especies poliploides como el trigo hexaploide, son las técnicas convencionales de bandeo N- y C- (Endo y Gill 1984, Gill *et al.* 1991). Las bandas N- corresponden a las regiones de ADN satélite (GAA)_m (GAG)_n del trigo y la cebada (Dennis *et al.* 1980, Gerlach y Bedbrook 1980). Recientemente, se han utilizado ADN satelital (ADN-SAT) y otras secuencias de simple repetición (SSRs) en estudios de FISH para generar patrones similares al bandeo N- en la cebada, trigo y otras especies del género *Triticaceae* (Pedersen *et al.* 1996; Pedersen y Langridge 1997;

Cuadrado y Schwarzacher 1998). Desafortunadamente, el bandeo N- se ha aplicado en un número limitado de especies de plantas y en algunas ocasiones no han provisto de cariotipos completos. Por ejemplo, no todos los cromosomas del trigo y el centeno son marcados por bandas N-. Además, no existe aún alguna relación clara entre las bandas C- con la hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Se ha establecido la hibridación secuencial *in situ* (ISH) con secuencias repetitivas (Hutchinson y Seal 1983, Jiang y Gill 1993) pero tan solo algunas secuencias de ADN se encuentran disponibles para la identificación de cromosomas y para los estudios comparativos entre diferentes especies de plantas, excepto para algunas especies de gramíneas (Mukai *et al.* 1993, Badaeva *et al.* 1996, Busch *et al.* 1995), en las que se encuentran casi restringidas a secuencias de ADN conservadas, rDNA, centroméricas y teloméricas.

Hasta ahora, no existen sondas de ADN específicas para cromosomas de genomas vegetales. Por lo tanto, en los experimentos de FISH varias secuencias repetidas en tándem aún poseen un alto valor de diagnóstico, y la hibridación simultánea de diferentes secuencias repetitivas de ADN, se han vuelto una técnica estándar en la citogenética vegetal para identificar genomas, cromosomas y segmentos de cromosomas (Leitch *et al.* 1991, Mukai *et al.* 1993). Con base en lo anterior, es preferible utilizar secuencias repetitivas de especies de las que exista información para desarrollar sondas.

Existen diferentes tipos de ADN repetitivo, estas secuencias constituyen parte de los orígenes de replicación, centrómeros y telómeros en la mayoría de los genomas, pero además constituyen señales que dirigen la compactación del genoma con proteínas y del ácido ribonucleico (RNA) para formar determinadas estructuras de la cromatina y señales para el anclaje del ADN a estructuras celulares (Shapiro 2005). Los centrómeros están compuestos principalmente por dos tipos de ADN repetitivo, transponibles y el ADN satelital (Wong y Choo 2004); Los telómeros están formados por ADN medianamente repetitivos, especialmente por secuencias minisatelitales transposones. Además, las regiones pericentroméricas y subteloméricas son muy ricas en ADN altamente repetitivo, ayudando a definir las estructuras anteriores. Las secuencias repetitivas cambian rápidamente durante eventos evolutivos y son

constantemente homogenizados dando origen a las secuencias específicas de ciertos géneros, especies, (*Triticum*, *Aegilops*, *Oryza*, *Cucurbita*, *Musa*, entre otras) (Gerlach y Bedbrook 1980) e incluso en ciertos cromosomas (*Lilium*, *Oryza*, *Pinus*).

La mayoría de las secuencias altamente repetitivas están contenidas en el $C_{ot} 1$. El C_{ot} es la concentración de ADN de doble cadena en x lapso de tiempo y se describe por la formula de la reacción de renaturalización del ADN:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + k C_0 t}$$

en donde la concentración de ADN de doble cadena (C), medida en moles/litro, presente en la reacción después de t segundos es dependiente de la concentración inicial de ADN (C_0) y el número de las diferentes secuencias presentes en el ADN (complejidad). El valor del rango constante k es proporcional a la complejidad, o el número de pares de base en la muestra de ADN. Los valores relativos de k para diferentes valores de ADN pueden ser determinados midiendo la cinética de la renaturalización (Appels *et al.* 1998).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* es uno de los estudiados más intensamente entre las plantas superiores y se ha convertido en un modelo en genética y citogenética. *Arabidopsis* tiene uno de los genomas más pequeños que se conocen, con un contenido de ADN de 0.07 pg/1C (Bennett y Smith 1991) pero con un juego de genes esencial para el desarrollo y reproducción de la planta. La mayoría del ADN nuclear (50-55%) se trata de secuencias ininterrumpidas de ADN de una sola copia (Leutwiler *et al.* 1984, Pruitt y Meyerowitz 1986). El ADN celular total contiene 10-14% de ADN rápidamente reasociable (altamente repetitivo) y 23-27% de ADN medianamente repetitivo, del cual la mayor parte proviene de los cloroplastos. En 25% del ADN genómico de *Arabidopsis* contiene secuencias repetitivas, de las cuales el mayor componente (aproximadamente 8%) son secuencias repetidas en tándem de los genes 18S-5.8S-25S y 5S rADN así como las secuencias paracentroméricas pAL1/pATMR1 que comprenden el 1-1.5% del total del genoma (Martinez-Zapater *et al.* 1986, Murata *et al.* 1994).

Otro de los modelos genéticos y citogenéticos dentro de las plantas superiores es el género *Lilium* L. Es un género bulboso monocotiledoneo de la familia *Liliaceae*. Ha sido cultivado durante siglos como planta ornamental (Woodcock y Stearn 1950). Este modelo ha provisto de una cantidad considerable de información general de la composición, organización y evolución de un gran fracción de los genomas vegetales (Catcheside 1976, Hotta y Stern 1975, Stern y Hotta 1978). Mas del 90% de su genoma está representado por secuencias repetitivas, siendo el tamaño del genoma más grande en el reino vegetal (90,000'000 kb) (Bennet y Smith, 1976; 1991). Ha sido utilizado como modelo en estudios genéticos y citogenéticos desde Strasburger (1880), especialmente en la morfología cromosómica en *Lilium longiflorum* Thunb. ($2x=2n=24$) (Stewart, 1947), patrones de bandeo (Holm, 1976; Von Kalm y Smyth 1984) y la detección de las regiones organizadoras del núcleo (NORs) (Von Kalm y Smyth 1980; 1984). Este modelo ha provisto de una cantidad considerable de información general de la composición, organización y evolución de una gran fracción de los genomas vegetales (Catcheside 1976, Hotta y Stern 1975, Stern y Hotta 1978).

Por otro lado, existen marcadores moleculares basados en el ADN, con los cuales es posible identificar especies y variedades, construir árboles filogenéticos, identificar genes etc. Estas técnicas se pueden reunir en tres categorías: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)), (Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación (MAAP)) y Sitios de secuencia etiquetada (Sequence-Tagged Sites (STS)). Estas técnicas han aportado grandes contribuciones a la ciencia, sin embargo, cuentan con grandes desventajas, que, en general se podrían englobar en: altos costos, son técnicas laboriosas, en la mayoría de los casos es necesario utilizar sondas específicas, baja reproducibilidad, bajo contenido de información por *locus*. Estas técnicas han evolucionado y se han desarrollado otras que han resuelto algunas de las desventajas anteriores, sin embargo, aún siguen siendo muy costosas y laboriosas; pero principalmente, la mayor desventaja es la carencia de información sobre la localización real de las secuencias de ADN en los cromosomas (Chang *et al.* 2004), por lo tanto no pueden ser directamente utilizados para la identificación *in situ* de cromosomas.

Aplicación en el mejoramiento genético

El mejoramiento genético vegetal tiene como objetivo final la obtención de genotipos superiores tendientes a satisfacer las crecientes necesidades del hombre, dentro de un sistema de producción sostenible. El mejoramiento genético tradicional en especies vegetales se ha llevado a cabo durante miles de años (Harlander 2002) y está enfocado a desarrollar nuevas variedades partiendo de una especie original, combinando su calidad con una característica mejorada presente en otra planta. Esta característica puede ser la resistencia a una plaga o enfermedad en particular, o tolerancia a alguna condición climática específica (Harlander 2002). Los programas de mejoramiento tradicionales toman varios años y son muy laboriosos. Se requiere de un gran esfuerzo para separar las características deseadas y muchas veces esto no es económicamente factible, ya que las plantas deben ser retrocruzadas una y otra vez, con la finalidad de descartar las características no deseadas.

Las técnicas biotecnológicas actuales han contribuido drásticamente en el proceso de mejoramiento genético. La identificación de cromosomas individuales es una de las herramientas más importantes para el mejoramiento genético, estudios evolutivos y de comparación de genomas entre diferentes especies. En programas de mejoramiento genético en plantas ornamentales, la realización de cruzas inter-específicas e inter-genéricas es el principal procedimiento para lograr variación genética (Van Tuyl 1997). Sin embargo, uno de los principales problemas en el mejoramiento genético vegetal, cuando se llevan a cabo programas de hibridación inter-específica o hibridación con especies o variedades de diferente ploidía es el monitoreo de cromosomas en los híbridos y en cruzas subsecuentes, lo que retrasa el proceso de selección. Recientemente, la técnica de FISH ha sido utilizada para la localización de ADN ribosómico en el género *Lilium* (Lim *et al.* 2001), facilitando la construcción de cariotipos. Sin embargo, el número de bandas presentes en los cromosomas de *Lilium* no permite la identificación completa de cromosomas individuales, el cual es un factor crucial en programas de mejoramiento genético, especialmente en los que se involucran poblaciones aneuploides (Barba-González *et al.* 2006).

Debido a la inexistencia de una técnica que permita la completa identificación de cromosomas en especies vegetales, en este trabajo, se pretende estandarizar una técnica con la cual sea posible obtener un patrón de bandeo en los cromosomas que faciliten la elaboración de cariotipos en plantas superiores, utilizando secuencias de ADN altamente repetitivas como marcadores, con la finalidad de que pueda ser utilizada en programas de mejoramiento genético selectivo, asistido por la identificación de cromosomas y dando seguimiento a los cromosomas en un programa de cruza que involucre diferentes especies y números de ploidía.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener patrones de bandeo que permitan la identificación individual de cromosomas en el género *Lilium* utilizando hibridación *in situ* de secuencias altamente repetitivas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener cariotipos en diferentes especies del género *Lilium* mediante hibridación *in situ* del ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* y *Triticum aestivum*
2. Obtener cariotipos en diferentes especies del género *Lilium* mediante hibridación *in situ* utilizando sondas de ADN repetitivo
3. Evaluar la eficiencia de las diferentes sondas para la construcción de cariotipos y la identificación individual de los cromosomas del género *Lilium*

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Con el uso de secuencias altamente repetitivas como sondas en la hibridación cromosómica *in situ* en el género *Lilium*, se obtendrán bandas específicas que permitirán su identificación individual.

IDENTIFICACIÓN DE CROMOSOMAS DEL GÉNERO *LILIUM* UTILIZANDO HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA *IN SITU* (cGISH)

Publicado en Acta Horticulturae con modificaciones (2010, 855: 35-40)

INTRODUCCIÓN

El género *Lilium* son plantas monocotiledoneas bulbosas de la familia *Liliaceae*. Ha sido cultivada durante siglos como planta ornamental (Woodcock y Stearn 1950). El genoma del género *Lilium* se encuentra entre los más grandes del reino vegetal (Bennet y Smith, 1976; 1991). Ha sido utilizado como modelo genético y citogenético desde el siglo XVII (Strasburger 1880), especialmente en la morfología cromosómica de *Lilium longiflorum* Thunb. ($2x=2n=24$) (Stewart 1947), patrones de bandeo (Holm 1976; Von Kalm y Smith 1984) y la detección de las regiones organizadoras de los nucléolos (NORs) (Von Kalm y Smith 1980; 1984). La construcción de cariotipos por lo general muestra los cromosomas ordenados en secuencia descendiente de acuerdo a su longitud e incluye patrones heterocromáticos basados en bandas C-, N- y Q-, así como de otras técnicas de diferenciación cromosómica. Los cromosomas satélites pueden ser identificados por sus micro- o macro-satélites o por tinciones Ag-NOR, una técnica que específicamente visualiza los sitios NOR metabólicamente activos (Linde-Laursen 1975). La hibridación *in situ* fluorescente (FISH), con la cual es posible visualizar secuencias

únicas o repetitivas en los cromosomas, complementa ahora las tecnologías de bandeo cromosómico, junto con la utilización de fluorocromos específicos para la tinción de ADN (Peterson *et al.* 1999), los cuales dilucidan variación local en el ADN y en la composición de la cromatina. Recientemente, esta técnica ha sido utilizada en el género *Lilium* (Lim *et al.* 2001), facilitando la construcción de cariotipos. Sin embargo, el número de bandas presentes en los cromosomas de *Lilium* no permite la identificación completa de cromosomas individuales, lo cual es crucial en programas de mejoramiento genético, especialmente cuando se involucran poblaciones aneuploides (Barba-González *et al.* 2006). El propósito de este trabajo fue el desarrollar una técnica que permita identificar el mayor número de cromosomas en el género *Lilium* a través de la hibridación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* y *Triticum aestivum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron tres cultivares comerciales de dos secciones taxonómicas del género *Lilium*: ‘White Heaven’ de la sección Leucolirion, así como ‘Dordogne’ y ‘Casa Blanca’ de la sección Archelirion, los cuales fueron cultivadas bajo condiciones estándar en invernadero para la recolección de raíces.

Semillas de *A. thaliana* y *T. aestivum* fueron colocadas en cajas que contenían una mezcla de turba canadiense (peat-moss): vermiculita, 7:3 en invernadero hasta su germinación. Las plántulas fueron colectadas para la extracción de ADN utilizando el método de CTAB, (Apéndice A) una vez que alcanzaron un diámetro de 10 cm y una altura de 20 cm para *A. thaliana* y *T. aestivum* respectivamente.

Preparaciones Cromosómicas

Se colectaron los ápices radiculares de los bulbos de lilis, temprano por la mañana y fueron pre-tratadas en una solución saturada de α -bromonaftaleno en agua de hielo hasta el día siguiente, posteriormente las raíces se enjuagaron y fueron fijadas en una solución de etanol: ácido acético, 3:1, donde se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

Los ápices radiculares fueron enjuagados en agua mQ tres veces y fueron colocados en buffer de citrato (Apéndice B). Posteriormente fueron incubados en una mezcla de enzimas pectiolíticas que contenía 0.2% (p/v) pectoliasa Y23, 0.2% (p/v) celulasa RS y 0.2% (p/v) citohelicasa en 10 mM de buffer de citrato (pH 4.5) a 37 °C durante 1–1.5 h, el aplastado de las preparaciones se realizó en una gota de ácido acético al 45%, seguido de inmersión en nitrógeno líquido; el cubreobjetos fue removido utilizando una navaja de rasurar. Las preparaciones fueron deshidratadas en etanol absoluto y secadas al aire.

Preparación de Sondas de ADN

El ADN genómico de *A. thaliana* y *T. aestivum* fue colocado en agua hirviendo durante 10 minutos para obtener fragmentos de ADN de 1–10 kb. El ADN fragmentado fue utilizado como sonda después de haber sido marcado con Biotin-16-dUTP (Biotin-16–2'-deoxyuridine-5'-triphosphate) por 'nick translation' de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche).

Hibridación *In situ*

De manera breve, el protocolo de hibridación (Apéndice C) se llevó a cabo como se menciona a continuación. Las preparaciones fueron pre-tratadas con RNasa A (100 µg/mL) durante 1 h y pepsina (5 µg/mL) durante 10 min, ambas a 37 °C, seguido de una incubación en paraformaldehído (4%) durante 10 min a temperatura ambiente, las preparaciones fueron deshidratadas secuencialmente en alcohol al 70%, 90% y 96% durante 3 min en cada paso y secadas al aire. La hibridación se realizó utilizando una mezcla de 20X SSC, formamida al 50%, 10% de dextran sulfato sódico, 10% de dodecil sulfato de sodio, 25–50 ng/mL de sonda de ADN. El ADN fue desnaturalizado calentando la mezcla de hibridación a 70°C durante 10 min y posteriormente fue colocada en hielo durante al menos 10 min. A cada preparación se añadieron 40 µL de mezcla de hibridación, las preparaciones fueron desnaturalizadas a 80 °C durante 10 minutos e incubando la hibridación durante toda la noche a 37 °C en una cámara húmeda.

Tratamientos de Rigor

Después de la hibridación durante toda la noche, las preparaciones fueron lavadas a temperatura ambiente en 2X SSC durante 15 min en tres tratamientos de rigor diferentes (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Rigor utilizado para la eliminación de la hibridación cruzada.

% Rigor	Temperatura ° C	Formamida (%)
68	37°	0
73	42°	0
80	37°	20

Detección y Contra-tinción

El ADN marcado con Biotina fue detectado con streptavidina-Cy3 (Amersham Biosciences, UK), y amplificada con goat-antistreptavidina biotilada (Vector laboratories, Burlingame, Calif.). Los cromosomas fueron contrateñidos con 1 µg/mL de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) y examinados en un microscopio Leica DMR equipado con epi-fluorescencia. Las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara Evolution QEi (Media-Cybernetics) y analizadas con el programa Image-pro® (Media-Cybernetics).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ADN genómico de *A. thaliana* y *T. aestivum* hibridó exitosamente los cromosomas de *Lilium*. En rigor al 68% mostró sitios de hibridación en todos los cromosomas de *Lilium*, sin embargo, no fue posible reconocer sitios de referencia específicos debido a la hibridación cruzada. Conforme el rigor alcanzo el 73% la hibridación cruzada persistió, pero en este caso fue posible identificar bandas específicas, con el rigor al 80% la hibridación cruzada fue eliminada, evidenciando nuevos puntos de referencia consistentes, dando como resultado una señal clara en algunos de los cromosomas permitiendo su identificación (Figura 3.1).

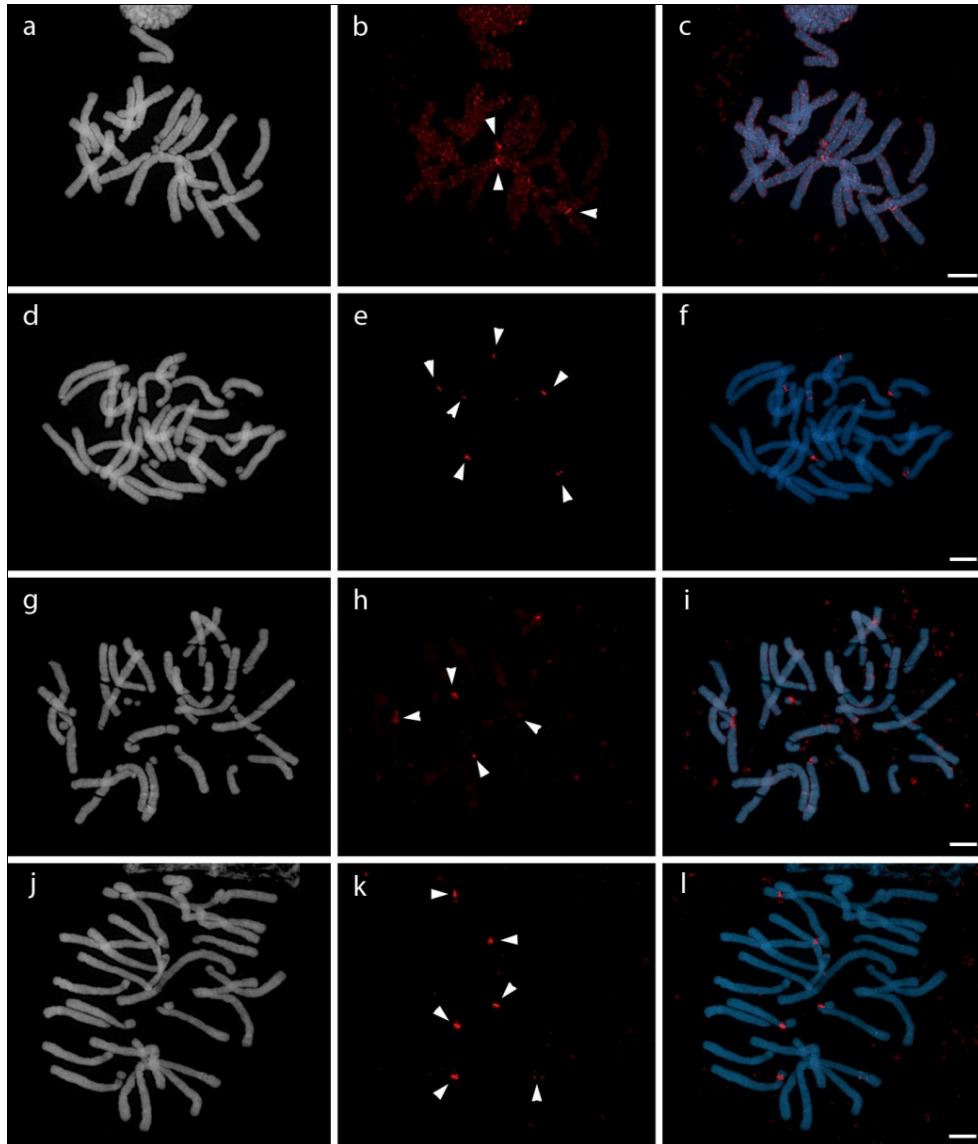


Figura 3.1. Localización física (puntos de referencia) de hibridación de ADN genómico de *A. thaliana* y *T. aestivum* en cromosomas de *Lilium*. **a, d, g, j.** Tinción DAPI. **b.** Hibridación de ADN genómico de *T. aestivum* con 73% de rigor (puntas de flecha). Se observa la hibridación cruzada. **e.** Hibridación de ADN genómico de *T. aestivum* con 80% de rigor (puntas de flecha). **h.** Hibridación de ADN genómico de *A. thaliana* con 73% de rigor (puntas de flecha). **k.** Hibridación de ADN genómico de *A. thaliana* con 80% de rigor (puntas de flecha). **c, f, i, l.** Composición de la hibridación del ADN genómico (rojo) sobre cromosomas de *Lilium* teñidos con DAPI. Barra 10 μm .

En el caso del ADN de *A. thaliana* se encontró una hibridación similar en las regiones centroméricas de los cromosomas de *Lilium*, a diferencia del ADN de *T. aestivum* la hibridación cruzada a un rigor bajo (68% y 73%) no fue importante; y de manera similar, cuando se incremento el rigor, se evidenciaron nuevos puntos de referencia, permitiendo así, la identificación de cromosomas (Figura 3.1).

La localización de puntos de referencia de ADN genómico varió entre *A. thaliana* y *T. aestivum* en los diferentes cultivares de *Lilium*. En el caso de ‘White heaven’ se identificaron tres puntos de referencia de *A. thaliana* en los cromosomas 3, 8 y 10, mientras que los puntos de referencia de *T. aestivum* se localizaron en los cromosomas 3, 6 y 8. En los cultivares ‘Casa blanca’ y ‘Dordogne’ el punto de referencia de *A. thaliana* se localizó en el cromosomas 5, mientras que los puntos de referencia de *T. aestivum* se localizaron en los cromosomas 4, 8 y 9. La construcción de ideogramas fue posible para los tres cultivares de *Lilium* (Figura 3.2), utilizando las bandas de la señal de hibridación del rigor al 80%. Las bandas DAPI fueron también útiles en la identificación de cromosomas.

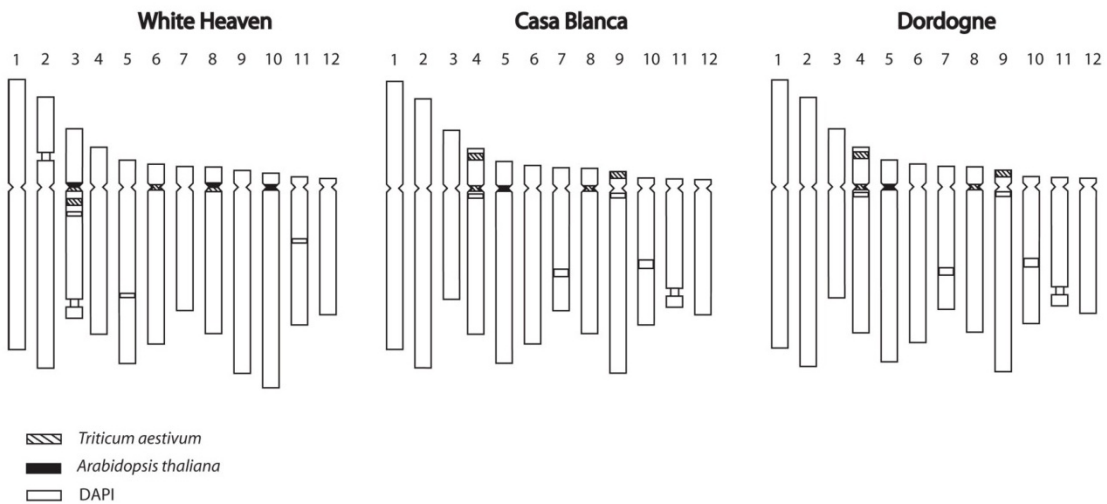


Figura 3.2. Ideogramas de tres variedades comerciales de *Lilium* mostrando las bandas DAPI y la hibridación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* y *Triticum aestivum*.

Fue posible identificar 6 de 12 cromosomas de *Lilium* en los tres cultivares utilizados. Junto con las bandas DAPI, el ADN genómico de *A. thaliana* y *T. aestivum* permitieron la identificación de seis cromosomas individuales, con su par homólogo respectivo, haciendo de ésta una técnica sencilla y directa para la identificación de cromosomas, la identificación tradicional de cromosomas de *Lilium* utilizando el ADN ribosómico de trigo 45S y 5S, junto con bandeos de Ag-NOR y C-, permitieron la identificación de un máximo de 6 cromosomas en las especies *L. longiflorum* y *L. rubellum* (Lim *et al.* 2001). Sin embargo, con la hibridación *in situ* de ADN ribosómico de trigo en *L. longiflorum* solamente identificaron 3 cromosomas (3, 4 y 7) y 4 en *L. rubellum* (2, 3, 4 y 12), en este trabajo se identificaron los cromosomas 3, 6, 8, y 10 en el caso del cultivar ‘White heaven’; y los cromosomas 4, 5, 8 y 9 en los cultivares Orientales ‘Casa Blanca’ y ‘Dordogne’. Siendo ‘White heaven’ un cultivar de *L. longiflorum* es posible concluir, de manera hipotética, que al combinar ambas técnicas (la hibridación del ADN genómico de *T. aestivum* y *A. thaliana* y la hibridación de ADN ribosómico), sin tomar en cuenta las bandas DAPI, será posible identificar los cromosomas 3, 4, 6, 7, 8, y 10 (6 de 12), logrando con esto la identificación de un mayor número de cromosomas en *L. longiflorum*. También, de manera hipotética, es posible identificar los cromosomas 2, 3, 4, 5, 8, 9 y 12 (7 de 12) en los cultivares orientales, ya que *L. rubellum* ha sido ampliamente utilizado para dar origen a los cultivares Orientales; sin embargo, es necesario aplicar ambas técnicas para conocer el número real de cromosomas que pueden ser identificados.

IDENTIFICACIÓN DE CROMOSOMAS EN EL GÉNERO *LILIUM* UTILIZANDO SONDAS ESPECÍFICAS DE ADN RIBOSÓMICO

INTRODUCCIÓN

Los genes del ADN ribosomal y los espaciadores transcritos se encuentran presentes en arreglos en tándem (Negi *et al.* 2002) en el genoma nuclear de los eucariontes superiores (Appels y Honeycutt 1986). La unidad de repetición del ADN ribosomal 45S consiste de regiones codificadoras altamente conservadas (18S, 5.8S y 25S ADN_r), los espaciadores internos transcritos (ITS) y espaciadores no-transcritos (NTS) (Mizuochi *et al.* 2007); 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 los últimos años, el ADN ribosomal ha sido utilizado como sonda para identificar cromosomas en diferentes especies vegetales mediante la hibridación *in situ* de estas secuencias, algunos ejemplos incluyen: *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 muchos otros. En muchos casos se ha utilizado como sondas los clones de *EcoRI* pTa71 y pTa794, que contienen los fragmentos 18S,-5.8S-26S (45S) y los espaciadores intergénicos así como el fragmento 5S y el espaciador intergénico, respectivamente, de trigo

(Gerlach y Bedbrook, 1979). Tal es el caso de *Arabidopsis thaliana* (Brandes *et al* 1997), *Crocus vernus* (Frello y Heslop-Harrison 2000), *Vicia benghalensis* (Galasso *et al.* 1997), varias especies de los géneros *Musa* (Osuji *et al.* 1998), *Saccharum* (D'Hont *et al.* 1998), *Aloe* (Adams *et al.* 2000), *Lens* (Galasso 2003) 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). En el caso de *Tulipa fosteriana* y *T. gesneriana* Mizuochi *et al.* (2007) clonaron las secuencias de los ADNs ribosómicos 45S y 5S e identificaron por lo menos 7 tipos de ADNr 4S, en el caso del ADNr 5S obtuvieron tres clases de 390, 364 y 380 pb; una vez hibridadas las secuencias, los sitios de hibridación del 5S variaron, desde 45 hasta 71, en el caso del 45S el número reportado fue aproximadamente de la mitad, entre diferentes cultivares, siendo este, el reporte del mayor número de sitios en cromosomas vegetales. En las especies *Alstroemeria aurea* y *A. inodora*, Kamstra *et al.* (1997) detectaron 32 y 24 sitios de hibridación respectivamente, utilizando la fracción 25S del ADNr de *Petunia*.

En base a la variación que existe en el ADNr entre especies y el limitado número de sitios de hibridación del ADNr de trigo en los cromosomas del género *Lilium*, el propósito de este trabajo fue obtener ADNr específico para el género *Lilium* con la finalidad de obtener un mayor número de sitios de hibridación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron bulbos de dos diferentes cultivares de la sección taxonómica Archelirion del genero *Lilium*: ‘Chinon’ y ‘Sapporo’. Los bulbos fueron plantados en cajas de plástico que contenían una mezcla de turba canadiense (peat-moss):arena:vermiculita 3:3:1; las cajas con los bulbos fueron colocados bajo malla sombra al 30% para el crecimiento de las plantas, fueron regados abundantemente 3 veces por semana.

Preparaciones cromosómicas

Después de 1-2 semanas de haber sido plantados los bulbos, los ápices radiculares de las 3 variedades fueron colectados temprano por la mañana. Los ápices fueron pre-tratados en una solución saturada de α -bromonaftaleno y colocados en agua de hielo durante 24 h, posteriormente, las raíces se enjuagaron y fueron fijadas en una solución de etanol:ácidoacético, 3:1, donde se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

Los ápices radiculares fueron enjuagados en agua mQ tres veces durante 5 minutos y fueron colocados en buffer de citrato (Apéndice B). Posteriormente fueron incubados en una mezcla de enzimas pectiolíticas que contenía 0.2% (p/v) pectoliasa Y23, 0.2% (p/v) celulasa RS y 0.2% (p/v) citohelicasa en 10 mM de buffer de citrato (pH 4.5) a 37 °C durante 1–1.5 h, el ápice (1-3 mm) fue macerado en una gota de ácido acético al 45% y posteriormente aplastado con el cubreobjetos, seguido de inmersión en nitrógeno líquido; el cubreobjetos fue removido utilizando una navaja de rasurar. Las preparaciones fueron deshidratadas en alcohol al 96% y secadas al aire.

Aislamiento y transformación con ADN Ribosómico específico de *Lilium*

Extracción del ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico se colectaron hojas de la variedad Oriental ‘Sapporo’. El ADN genómico se extrajo utilizando el método CTAB (Apéndice A). De manera breve, se molieron 4 g de tejido (hojas) del cultivar Oriental ‘Sapporo’ en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido. Las hojas molidas se transfirieron a un tubo de 50 mL y se añadieron 4 mL de buffer de extracción 2% CTAB-PVP a 65 °C. Se agitó hasta obtener una suspensión viscosa. Se incubó durante 20-30 min en baño maría y posteriormente se añadió un volumen similar (5mL) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se extrajo por rotación durante 20 min a temperatura ambiente. Los tubos fueron centrifugados por 30 min a 3600 rpm, la fase sobrenadante fue transferida a tubos de 15 mL. Se añadió 0.1 volúmenes de buffer 10% CTAB a 65 °C y se mezcló cuidadosamente. Se añadió un volumen similar (4 mL) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se extrajo nuevamente por rotación a temperatura ambiente durante 20 min, se centrifugó a 3600 rpm durante 30 min y se transfirió la fase sobrenadante a otro tubo de 15 mL. Se adicionó un volumen similar de buffer de precipitación 1% CTAB y al ADN se precipitó invirtiendo el tubo varias veces. Los tubos se centrifugaron por 3 min a 3600 rpm y se descartó el sobrenadante, la pastilla de ADN fue resuspendida con 1.5 mL de buffer TE alto en sales a 65 °C en un baño maría. Se añadieron 2 veces el volumen (3 mL) de etanol 96% previamente enfriado en hielo y se centrifugó a 3600 rpm durante 3 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 3 mL de etanol al 80% y se mezcló cuidadosamente. Los tubos fueron centrifugados a 3600 rpm por 3 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN fue secada en un horno a 37 °C durante 4 h, se resuspendió en 250 µL de buffer TE 0.1 y se añadió 1µL de RNasa A y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Amplificación del ADN Ribosómico

Se realizó una búsqueda en la base de datos EMBL Nucleotide Sequence Database para identificar secuencias frecuentes al inicio y al final de los genes reportados que pudieran ser utilizadas como iniciadores para la amplificación del ADN ribosómico (ADNr). Se diseñaron

varios iniciadores con variaciones mínimas, por simplicidad se muestran tan solo los seleccionados: 5S ribosomal: F1(5'-TTA GTG CTG GTA TGA TCG CA-3') y R2(5'-CAC CGG ATC CCA TCA GAA CT-3'); 5.8S ribosomal: F1 (5'-GAG AGA CCG CGA ACC TGT AA-3') y R2 (5'-CCT CCC TGT ACG GAG CAC G-3'), los iniciadores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT[®]). La reacción de amplificación se compuso de 5.2 µL de H₂O mQ, 2µL de *Taq* buffer 10x, 1 µL de 50 mM MgCl₂, 1.6 µL de 25 mM dNTPs, 2 unidades de *Taq* polimerasa, 5µL de iniciadores (F1 + R2) 1 mM y 50 ng de ADN (5µL). Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos de 0.2 mL en un termociclador TC-4000 de la marca Techne[®]. La amplificación del ADNr 5.8S se realizó con un paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 40 s y 72 °C durante 1 minuto y 30 s, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. La amplificación del ADNr 5.8S se realizó con un paso de 94 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Para comprobar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, durante 1 h con una corriente de 80 voltios.

Purificación de los fragmentos de ADN ribosómico

La purificación de los fragmentos de ADNr 5S y 5.8S se realizó utilizando el kit de purificación Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). El producto de la amplificación se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se mezcló en un vórtex durante 1 min en intervalos de 30 s. Se agregaron 100 µL de buffer de purificación (Direct Purification Buffer) y 1 mL de resina y se mezcló utilizando el vórtex durante 1 min en intervalos de 30 s. Se colocó una mini columna Wizard[®] en la punta de una jeringa Luer-Lok[®], se retiró el émbolo y se adicionó la mezcla (del producto de la PCR, el buffer y la resina). El émbolo fue colocado nuevamente permitiendo que la mezcla baje por gravedad a través de la mini columna, auxiliando suavemente con el émbolo. Se adicionaron 2 mL de isopropanol al 80% dentro de la jeringa y se hizo pasar hasta la mini columna. Se retiró la columna y se colocó en un tubo eppendorf de 2 mL, se centrifugó durante 2 min a 7,000 rpm. La mini columna fue transferida a un nuevo tubo eppendorf y se añadieron 33 µL de H₂O mQ, después de 1 min se centrifugó a 6,500 rpm durante 30 s.

Ligación del inserto

La ligación de los fragmentos de ADN_r (5S y 5.8S) se realizó utilizando el kit pGem[®]-T Easy Vector Systems de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega). El vector utilizado fue el pGem[®]-T (Figura 4.1). Se realizó una mezcla que contenía 5µL de buffer de ligación 2X, 1µL (50ng) del vector pGem[®]-T, 1µL (25 ng) del inserto (producto de la PCR), 1 µL de T4 ADN ligasa y se aforó a 10 µL. La solución se pipeteó para mezclar homogéneamente y se incubó toda la noche a 4 °C.

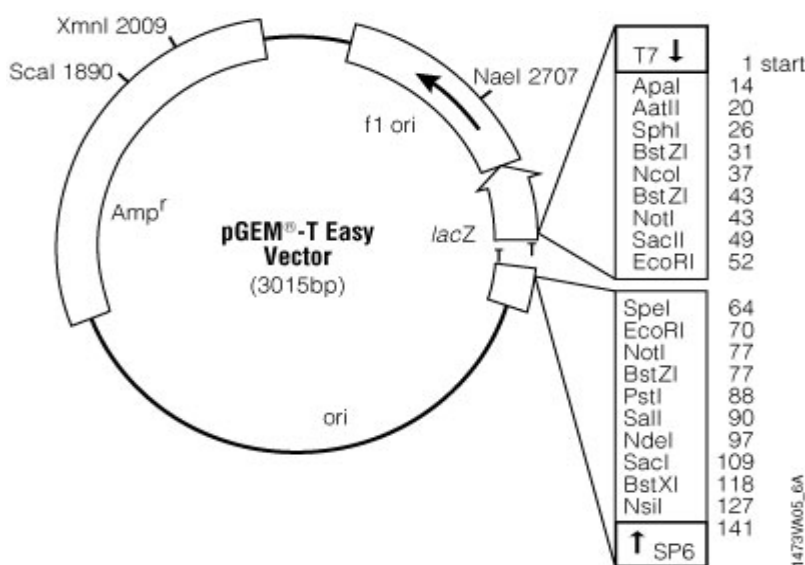


Figura 4.1. Mapa del Vector pGEM[®]-T Easy

Células competentes *Escherichia coli* DH5α

Para el cultivo de las bacterias se preparó medio líquido Luria-Bertani (LB) (Apéndice C). Se inocularon 50µL de la bacteria *E. coli* DH5α en 30 mL de medio LB, se incubó a 37 °C durante toda la noche en un agitador orbital (190-200 rpm). Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO_{600}) = Absorbancia (A^0) y se realizaron diluciones hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.1 A^0$ en 200 mL. El cultivo se incubó a 37 °C hasta que alcanzó una $DO_{600} = 0.6-0.8$, se distribuyó equitativamente en tubos de 100 mL y se centrifugó durante 12 min a 10,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue decantado y la pastilla se resuspendió en tres ocasiones en 100 mL de agua desionizada estéril a 4 °C. Después del tercer lavado la pastilla fue resuspendida en 2 mL de agua

desionizada estéril y se transfirió a tubos de 1.5 mL (1 mL en cada tubo). Los tubos fueron centrifugados durante 10 min a 13,000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 1 mL de glicerol al 10%. Las células fueron distribuidas en tubos de 200 µL y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Electrotransformación

La transformación se realizó mediante la técnica de electroporación (electrotransformación), utilizando un MicroPulser[®] (Bio-Rad). En una celda de 0.1 cm (Bio-Rad), se agregaron 70µL de células competentes de *E.coli* DH5α + 2µL de la ligación y se sometió a un descarga eléctrica de 1.8 KV por algunos milisegundos (pulso). Después del disparo se adicionaron 900 µL de medio SOC (Apéndice E) y se incubo 1 h a 37 °C, en agitación constante a 225 rpm. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular (pastilla) en 100 µL de H₂O estéril libre de RNA. A cajas Petri que contenían medio LB, solidificado con 15 g/L de bactoagar y suplementado con 0.1 mM de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) y 100µg/mL de ampicilina (ApéndiceD) se le agregaron 20 µL (20 mg/mL) del cromógeno acoplado; 20 min después se sembraron las células resuspendidas y se incubaron a 37 °C durante 20 horas.

Aislamiento de plásmidos

Después del cultivo se seleccionaron y aislaron las colonias de bacterias de color blanco (el color blanco es un indicador de que la transformación fue efectiva, ya que contienen el gen *lacZ*, con el cual pierden la capacidad de degradar la β-galactosidasa), se incubaron durante 24 h a 37 °C, con agitación constante a 225 rpm en tubos Falcón que contenían 30 mL de medio LB adicionado con 0.1 mg/mL de ampicilina. El aislamiento de los plásmidos se realizó utilizando el kit Nucleo Bond Plasmid Purification[®] (Machere-Nagel) de acuerdo a las instrucciones del proveedor; 30 mL de cultivo fueron centrifugados a 6,000 rpm durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante se agregaron 4 mL de buffer de resuspensión, 4 mL de buffer de lisis, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se adicionaron 4 mL de buffer de neutralización y se mezcló por inversión suave; se incubó en hielo durante 5 min y

posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 25 min. El sobrenadante fue transferido a una columna de filtrado previamente humedecida con 2.5 mL de buffer de equilibrio. Se añadieron 10 mL de buffer de lavado a la columna seguido de 5 mL de buffer de elución, el cual fue colectado en un tubo de 15 mL. Se agregaron 3.5 mL de isopropanol al 99% y se centrifugó a 11,000 por 30 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de etanol al 70%, se mezcló con el vórtex y nuevamente fue centrifugado a 11,000 rpm por 20 min, se retiró el etanol y el precipitado fue secado a temperatura ambiente. Las pastilla se reconstituyó en 100 µL de buffer TE bajo en sales.

La concentración del plásmido fue determinada utilizando un espectrofotómetro y la integridad del plásmido fue confirmada por electroforesis en membrana de agarosa al 1%.

Construcción de Sondas

Para la realización de este trabajo se utilizaron sondas de ADN_r de distintos orígenes: i) el 45S y 5S de *Triticum aestivum*, los cuales se encuentran en los clones pTa71 y pTa794 respectivamente (Gerlach y Bedbrook 1979), estos fueron donados por Hans de Jong del Departamento de Genética de la Universidad de Wageningen en los Países Bajos y ii) los fragmentos 5S y 5.8S del género *Lilium*, los cuales fueron obtenidos como se ha descrito anteriormente.

Aislamiento de plásmidos con ADN ribosómico de trigo

Las cepas pTa71 y pTa794 fueron cultivadas durante 24 h en agitación constante (225 rpm) a 37 °C en medio LB (Apéndice C) adicionado con 0.1 mg/mL de ampicilina. El aislamiento de los ADN_r de trigo se realizó utilizando el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche) de acuerdo a las instrucciones del proveedor: 4 mL del medio de cultivo inoculado fueron transferidos a tubos Falcón de 15 mL y se centrifugaron a 9,000 rpm durante 1min, se descartó el sobrenadante; se agregaron 250 µL de buffer de suspensión y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 250 µL de buffer de lisis y se mezcló por inmersión, posteriormente se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se agregaron 350 µL de buffer vinculante y se incubó

durante 5 min en hielo; una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue transferido a una membrana de filtración y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, la membrana fue transferida a un nuevo tubo y se añadieron 500 µL de buffer de lavado, nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, se transfirió la columna a un nuevo tubo y se agregaron 700 µL de buffer de lavado; se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min seguido de una nueva centrifugación a 13,000 rpm por 1 min para secar la membrana, la cual fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 100 µL de buffer de elución y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min.

Marcaje de las sondas

Tanto los ADNr de *Lilium* (5S y 5.8S) como los de *Triticum aestivum* (5S y 45S) fueron marcados por 'nick translation' con biotina o digoxigenina utilizando los kits Biotin-Nick Translation Mix y/o DIG-Nick Translation Mix (Roche) respectivamente, siguiendo las instrucciones del proveedor: se disolvió 1 µg de ADNr en 16 µL de agua mQ, se agregaron 4 µL de Biotin- ó DIG-Nick Translation Mix y se centrifugó brevemente. Se incubó a 15°C durante 90 min y posteriormente se detuvo la reacción añadiendo 1 µL de 0.5M EDTA (ácido etil-diamino-tetra-acético) y calentando a 65 °C por 10 min.

Hibridación In situ

Hibridación

Las preparaciones fueron pre-tratadas con RNasa A (100 µg/mL) durante 1 h y pepsina (5 µg/mL) durante 10 min, ambas a 37 °C, seguido de una incubación en paraformaldehído (4%) durante 10 min a temperatura ambiente, las preparaciones fueron deshidratadas secuencialmente en alcohol al 70%, 90% y 96% durante 3 min en cada paso y secadas al aire. La hibridación se realizó utilizando una mezcla de 20X SSC, formamida al 50%, 10% de dextran sulfato sódico, 10% de dodecil sulfato de sodio, 25–50 ng/mL de sonda de ADN. El ADN fue desnaturalizado calentando la mezcla de hibridación a 70 °C durante 10 min y posteriormente fue colocada en hielo durante al menos 10 min. A cada preparación se añadieron 40 µL de mezcla de hibridación,

las preparaciones fueron desnaturalizadas a 80°C durante 10 min y hibridadas durante toda la noche a 37 °C en una cámara húmeda. Posteriormente las preparaciones fueron lavadas a temperatura ambiente en 2X SSC durante 15 min y se incubaron en 0.1X SSC a 42 °C en 3 ocasiones durante 10 min cada una; seguido de 2 lavados en 2X SSC por 5min.

Detección y Contra-tinción

El ADN marcado con Biotina fue detectado con streptavidin-Alexa Fluor[®] conjugate (Invitrogen) y amplificado con biotinylated goat-antistreptavidin (Vector laboratories). El ADN marcado con Digoxigenina fue detectado con anti-digoxigenin-fluorescein (Roche) y amplificado con fluorescein anti-sheep y fluorescein anti-rabbit (Vector). Los cromosomas fueron contra-teñidos con 1 µg/mL de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) y examinados en un microscopio Leica DMR equipado con epi-fluorescencia. Las imágenes fueron fotografiadas utilizando una cámara Evolution QEi camera (Media-Cybernetics) y analizadas con el programa Image-pro[®] (Media-Cybernetics).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Aislamiento y transformación con ADN ribosómico específico de *Lilium*

ADN ribosómico específico al género *Lilium*

La amplificación de los segmentos de ADN_r se comprobó a través de electroforesis en gel de agarosa; la amplificación del segmento 5S se logró utilizando la combinación de iniciadores F1 y R2, en este caso se obtuvo un fragmento de ≈ 500 pb (Figura 4.2). En el caso de la amplificación del ADN_r 5.8S se obtuvo un segmento de similar longitud (≈550) independientemente de la combinación de iniciadores utilizados (Figura 4.3).

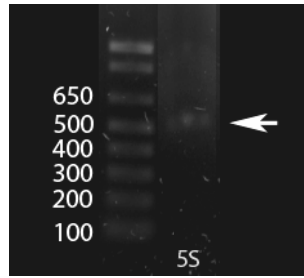


Figura 4.2. Amplificación por PCR de la secuencia de ADNr5S de ≈ 500 pb del cultivar ‘Sapporo’ del género *Lilium* en membrana de Agarosa 1% revelado con Bromuro de Etidio

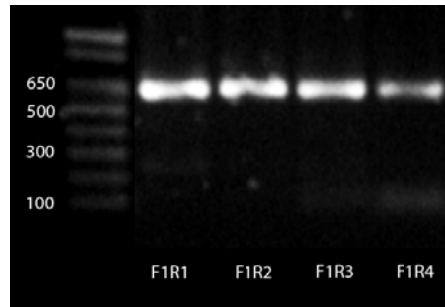


Figura 4.3. Amplificación por PCR de la secuencia de ADN ribosómico 5.8S de 550pb del cultivar ‘Sapporo’ del género *Lilium* en membrana de agarosa 1% revelado con bromuro de etidio

Los fragmentos obtenidos fueron purificados y ligados al vector pGem[®]-T, posteriormente, el vector fue incorporado por electroporación a bacterias competentes de *E. coli* DH5 α . Las bacterias transformadas con el vector que contiene los fragmentos 5S y 5.8S fueron identificadas por su crecimiento en medio selectivo (LB + X-Gal) y se seleccionaron aquellas colonias que presentaron una coloración blanca (Figura 4.4). La comprobación de la transformación se realizó aislando el plásmido y verificando su tamaño a través de electroforesis (Figura 4.5).

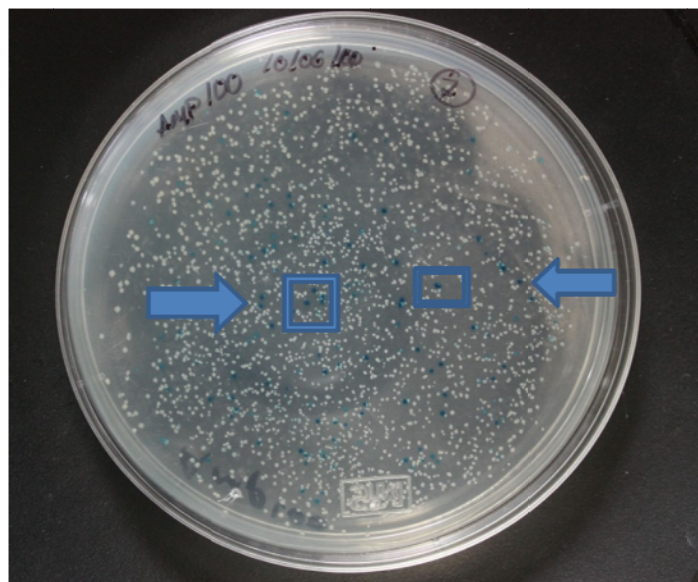


Figura 4.4. Colonias de bacterias transformadas de color blanco y colonias de bacterias no transformadas de color azul. En medio de cultivo LB suplementado con ampicilina a 0.1 mg/mL y X-Gal

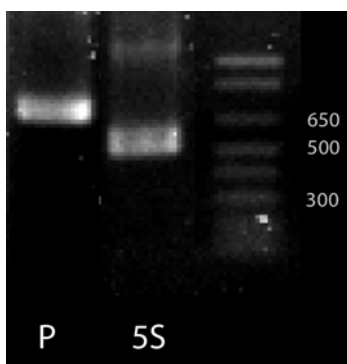


Figura 4.5. ADNp recombinante (P) y ADN genómico del 5S ribosomal (5S) del cultivar ‘Sapporo’ en membrana de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio.

El plásmido fue secuenciado en la unidad LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad) del CINVESTAV, Irapuato. La secuencia del segmento 5.8S del ADNr del cultivar ‘Sapporo’ presentó una identidad del 97% con *Lilium alexandrae* y 96% con *L. speciosum* de acuerdo a un análisis blastn (nucleotide blast) en la base de datos de NCBI, corroborando así que efectivamente se trata del ADNr5.8S. La secuencia además incluye los espaciadores internos transcritos 1 y 2 (ITS 1, ITS 2) (Figura 4.6).

Lilium hybrid división VII cv 'Sapporo'
 Tamaño 1..601
 ITS 1 1..216
 rRNA 217..379
 ITS 2 380..601

1	GAGAGACCGC	GAACCTGTAA	ACGGATGACA	CTGTGTCGGG	CGGGCATTAT	GTCCGCCCTA
61	CTCGGGACCT	CACATCGTAT	CTGCGGCCGC	CTCCGAGCGT	TCCCGGCATG	ATTTGCGGGG
121	GACGAATGAA	ACCCCGGCAC	AGCCTGTGCC	AAGGAACATA	TGTCAGGACG	GACGCGTGCC
181	AATGCCTCTG	TGGTGGGGCG	ACGTCCGCTC	TTTATCTGTA	CGACTCTCGG	CAACGGATAT
241	CTCGGCTCTC	GCATCGATGA	AGAACATAGC	AAAATGTGAT	ACTTAGTGTG	AATTACAGGA
301	TCCCGTGAAC	CATCGAGTCT	TTGAACGCAA	GTTGTGCCTG	AGGCCTTTCA	GTTGAGGGCA
361	CGCCTGCCTG	GGCGTCACGC	CTTTATTTTCG	CTCTGTGTGC	CCATGCTCCT	TCGGGGGCAG
421	TCATGGATGC	GGAGATTGGC	CCTCCGTGCC	TTGTGTGCGG	CGGGCTTAAG	CGCAGGCTGT
481	CGGCATCGGG	TTGGGCACGA	CGAGTGGTGG	ACGGAGTACC	AGCAGGATGT	CGTGGTCCCT
541	CGTCGCCTTA	AGGGGGGCTC	AAGAGACCCG	GACTAGGTGA	GCCGTGCTCC	GTACGGGGAG
601	G					

Figura 4.6. Secuencia del ADN ribosómico 5.8S del cultivar 'Sapporo' del género *Lilium*. Los nucleótidos 1 al 216 corresponden al espaciador interno transcrito 1; los nucleótidos 217 al 379 al gen del ADN ribosómico 5.8S y los nucleótidos 380 al 601 corresponden al espaciador interno transcrito 2.

Hibridación *In situ*

El ADNr 5.8S específico al género *Lilium* mostró un número diferente de sitios de hibridación entre las dos variedades Orientales del género *Lilium*. En la variedad 'Chinon' hubo ocho sitios de hibridación (Figura 4.7), mientras que en la variedad 'Sapporo' hubo diez señales, con estos sitios de hibridación fue posible identificar 4 y 5 cromosomas homólogos respectivamente. Más allá, cuando se utilizó la sonda de ADNr 45S de trigo en las mismas variedades, se identificaron seis y ocho señales en 'Chinon' y 'Sapporo' respectivamente, con las cuales es posible identificar 3 y 4 cromosomas homólogos. Debido a lo anterior, con el ADNr 5.8S específico al género *Lilium* es posible identificar un cromosoma adicional en las distintas variedades con respecto al ADNr 45S de trigo.

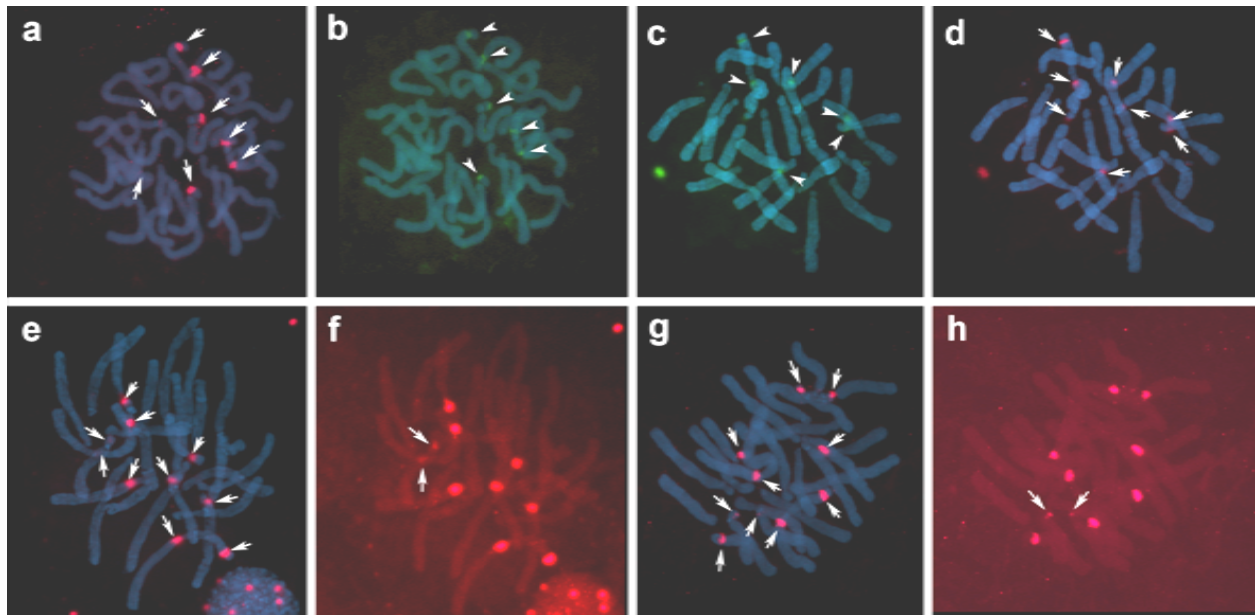


Figura 4.7 Hibridación *in situ* de ADN ribosómico en cromosomas del género *Lilium*. **a** y **d**) Ocho sitios de hibridación *in situ* de ADN ribosómico 5.8S específico al género *Lilium* (flechas) en cromosomas de la variedad Oriental ‘Chinon’, detectados con Alexa 546. **b** y **c**) Seis sitios de hibridación *in situ* de ADN ribosómico 45S de trigo (puntas de flecha) en cromosomas de la variedad Oriental ‘Chinon’, detectados con FITC. **e** y **g**) Diez sitios de hibridación *in situ* de ADN ribosómico 5.8S específico al género *Lilium* (flechas) en cromosomas de la variedad Oriental ‘Sapporo’, detectados con Alexa 546. **f** y **h**) Imagen de los sitios de hibridación *in situ* del ADN ribosómico 5.8S específico al género *Lilium* en donde son evidentes ocho señales y dos son menos intensas (flechas).

De manera similar, cuando se utilizó el ADNr 5S específico al género *Lilium*, en los cromosomas de la variedad Oriental ‘Chinon’, fue posible identificar dos cromosomas homólogos (cuatro señales) (Figura 5.8b), mientras que, cuando se utilizó la sonda con el ADNr 5S de trigo tan solo se pudo identificar un cromosoma homólogo (dos señales) (Figura 4.8a).

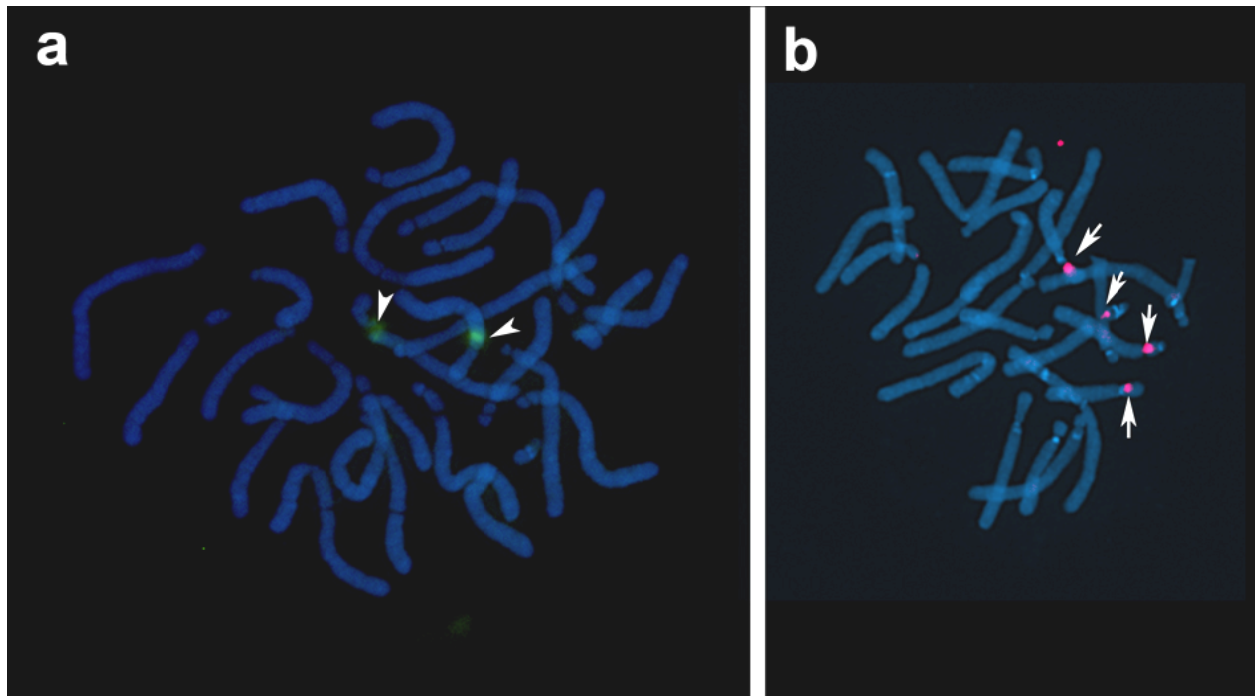


Figura 4.8 Hibridación *in situ* de ADN ribosómico 5S en cromosomas del género *Lilium* de la variedad Oriental ‘Chinon’. **a)** Hibridación *in situ* del ADN ribosómico 5S de trigo (puntas de flecha), detectado con FITC. **b)** hibridación *in situ* del ADN ribosómico 5S específico al género *Lilium* (flechas), detectado con Alexa 546.

Con el aislamiento del ADNr específico al género *Lilium* se logró la identificación de cromosomas individuales. El ADNr 5.8S hibridó en 5 de 12 cromosomas, en el caso de *L. longiflorum* cuando se utilizó el ADNr 45S de *Triticum aestivum* como sonda tan solo 3 cromosomas pudieron ser identificados, siendo el mismo caso cuando se utilizó el ADNr 5S; sin embargo, cuando estas sondas fueron utilizadas en *L. rubellum* se lograron identificar 6 cromosomas con el ADNr 45S y 4 cromosomas con el ADNr 5S (Lim *et al.* 2001). Contrario a este trabajo, cuando se analizó la hibridación del 45S y 5S de trigo en los cromosomas de *L. longiflorum* y *L. rubellum* no se dispuso de ADNr específico al género. En este caso, cuando se utilizó el ADNr de trigo se identificaron menos sitios de hibridación que cuando se utilizó el ADNr específico del género; al comparar la secuencia del ADNr 5.8S con las de otras especies del género, esta presentó una identidad mayor (96%) con *L. alexandrae*, lo cual concuerda con el origen del cultivar ‘Sapporo’ ya que es un híbrido interespecífico de la sección taxonómica Archelirion (McRae 1998), la cual se compone por especies como *L. alexandrae*, *L. speciosum*,

L. rubellum, *L. auratum*, *L. nobilissimum* y *L. japonicum* (Van Tuyl y Vat Holsteijn. 1996), con las cuales la secuencia aislada comparte una identidad del 96% y 95%. Al comparar la secuencia específica al género *Lilium* con secuencias de ADN de *T. aestivum* con un análisis blastn (nucleotide blast) en la base de datos de NCBI se encontró que tienen una identidad del 90%, sin embargo, esta identidad tan solo se encuentra en un 26% de la secuencia, específicamente a la región que corresponde al gen 5.8S y no a los espaciadores internos transcritos. Al conocer la ‘similitud’ de las secuencias es posible sugerir que la razón del mayor número de señales de hibridación en los cromosomas obtenido con el 5.8S específico al género es debido a que la secuencia de *Triticum*, al contar con una identidad menor (90% en el 26% del total) hibrida en menos sitios que la específica al género, y esta última, a su vez, es capaz de reconocer un mayor número de sitios, los cuales podrían ser funcionales o no.

En otras especies en donde se han utilizado los clones pTa71 y pTa794 (como sondas para la identificación individual de cromosomas, los cuales contienen el ADNr de trigo, se encontro un número relativamente bajo de señales de hibridación, este es el caso de *Elaeis guineensis* (Castilho *et al.* 2000) en donde fue posible identificar 2 cromosomas, con sus respectivos homólogos, siendo identificado un cromosoma por cada una de las sondas; en el caso de *Trigonella foenum-graecum* (Ahmad *et al.* 1999) se identificaron 2 cromosomas al utilizar el clon pTa71; en *Vicia benghalensis* se detectaron 1 y 2 cromosomas utilizando los clones pTa71 y pTa794 respectivamente (Galasso *et al.* 1997); en el caso del género *Musa* fue posible identificar desde 1 hasta 3 cromosomas en diferentes especies (Osuji *et al.* 1998) y en el género *Saccharum* se identificaron hasta 4 cromosomas en diferentes especies (D’Hont *et al.* 1998); en el género *Aloe* se identificaron en diferentes especies desde 2 cromosomas hasta 4 con el clon pTa71 y desde 1 hasta 3 con el clon pTa794. Es de llamar la atención que el ADNr contenido en los clones pTa71 y pT794 es de *Triticum aestivum* y no es específico a ninguna de las especies anteriores. En el caso de *Alstroemeria aurea* y *A. inodora* se utilizó el ADNr 25S de *Petunia* y fue posible identificar 7 de 8 cromosomas en *A. aurea* y 8 de los 8 cromosomas en *A. inodora*, adicionalmente, se utilizó el ADNr 5S de *Arabidopsis thaliana* y con este se detectaron 4 sitios de hibridación en 4 diferentes cromosomas en cada una de las diferentes especies de *Alstroemeria* (Kamstra *et al.* 1997).

En el caso del género *Tulipa* Mizuochi *et al.* (2007) clonaron el ADNr 45S y 5S específicos al género, obteniendo al menos 7 tipos. Al hibridar los ADNr en diferentes cultivares de *T. gesneriana* y *T. fosteriana* se identificaron 6 y 7 cromosomas (de 12) en los distintos cultivares, mostrando al menos 35 sitios de hibridación; el ADNr 5S hibridó en la totalidad de los cromosomas hasta en 71 sitios diferentes, logrando con esto la identificación de todos los cromosomas en los diferentes cultivares.

Debido a lo anterior es probable que los clones pTa71 y pTa794 (Gerlach y Bedbrook, 1979) no sean los más adecuados para lograr la identificación de cromosomas en diferentes especies así como en el género *Lilium*, en este trabajo se aislaron el ADNr 5.8S y 5S específicos a este género, logrando la identificación de un mayor número de cromosomas que con la utilización del ADNr de trigo; es posible también que exista un mayor número de tipos de ADN ribosomal que los aislados, que permitan la identificación de un mayor número de cromosomas en el género, por lo cual sería recomendable realizar la clonación de más secuencias de ADNr y explorar la hibridación de las mismas en cromosomas del género.

CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó la hibridación *in situ* de ADN genómico de *A. thaliana* y *T. aestivum*, en cromosomas de diferentes cultivares del género *Lilium*, se probaron diferentes tratamientos de rigor, entre los cuales el rigor del 80% permitió la generación de un patrón de bandeo el cual sirvió para la identificación individual de cromosomas, asimismo, se aislaron y clonaron el ADN ribosómico 5S y 5.8S específicos al género, los cuales fueron hibridados a cromosomas de diferentes cultivares del género, obteniendo patrones de bandeo con los cuales se identificaron varios cromosomas de los distintos cultivares del género *Lilium*. Tanto con la hibridación *in situ* del ADN genómico de *A. thaliana* y *T. aestivum* así como con el ADNr específico al género es posible identificar cromosomas individuales, es posible utilizar los patrones de bandeo para la construcción de cariotipos, lo cual será de gran utilidad en programas de mejoramiento genético asistido, en los cuales es indispensable la identificación de cromosomas individuales para poder monitorear la segregación cromosómica en las distintas generaciones.

LITERATURA CITADA

- Adams AP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR (2000) Ribosomal DNA evolution, phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Am J Bot* 87: 1578-1583
- Ahmad F, Acharya SN, Mir Z, Mir PS (1999) Localization, activity of rRNA genes on fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization, silver staining. *Theor Appl Genet* 98: 179-185
- 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 pp 320, 350
- Appels R, Morris R, Gill B, May C (1998) Chromosome Biology Kluwer Academic publishers. The Netherlands pp 234-235
- Bachmann K (1992) Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. *Acta Bot Neerl* 39: 369-384
- Badaeva ED, Friebe B, Gill BS (1996) Genome differentiation in *Aegilops* 1 Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome* 39: 293-306
- Barba-Gonzalez R, Van Silfhout AA, Visser RGF, Ramanna MS, Van Tuyl JM (2006) Progenies of allotriploids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*) examined by GISH analysis. *Euphytica* 151: 243-250
- Bennett, MD, Smith, JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond* 274: 227-274
- Bennett, MD, Smith, JB (1991) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 334: 309-345
- 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
- Busch W, Martin R, Herrmann RG, Hohmann U (1995) Repeated DNA sequences isolated by microdissection II Comparative analysis in *Horedum vulgare*, *Triticum aestivum* *Theor Appl Genet* 93: 164-171

- Castilho A, Vershinin A, Heslop-Harrison JS (2000) Repetitive DNA, the chromosomes in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Ann Bot* 85: pp 837-844
- Catcheside DG (1976) The genetics of recombination. University Park Press, London
- Chang S-B, Jesse T, Meijer-Dekens F (2004) Physical mapping of BACs on tomato chromosome 6 at pachytene, DNA fibers using multi-colour FISH. En: Chang S-B. Cytogenetic, molecular studies on tomato chromosomes using diploid tomato, tomato monosomic additions in tetraploid potato. Wageningen University dissertations pp 89-103
- Cuadrado A, Schwarzacher T (1998) The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat, rye genomes. *Chromosoma* 107: 587-594
- Dennis ES, Gerlach WJ, Peacock WJ, (1980) Identical polypyrimidine-polypurine satellite DNAs in wheat, Barley. *Heredity* 44: 349-366
- D'Hont A, Ison D, Alix K, Roux C, Glaszmann (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41: 221-225
- Endo T, Gill BS (1984) Somatic karyotype, heterochromatin distribution, nature of chromosome differentiation in common wheat, *Triticum aestivum* L. *Chromosoma* 89: 361-369
- Falisto E, Falcinelli M (2003) Genomic organization of rDNA loci in natural populations of *Medicago truncatula* Gaertn. *Hereditas* 138: 1-5
- Frello S, Heslop-Harrison JS (2000) Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by *in situ* hybridization of rDNA, a tandemly repeated sequence. *Ann Bot* 86: 317-322
- Galasso I, Sonnante G, Guido-Tota S, Pignone D (1997) Comparison of molecular cytogenetic, genetic analyses in accessions of the two biotypes of *Vicia benghalensis* L. *Ann Bot* 79: 311-317
- Galasso I (2003) Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Lens* Miller. *Genome* 46: 1118-1124
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979) Cloning, characterization of ribosomal RNA genes from wheat, barley *Nucleic Acids Res* 7: 1869-1885
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1980) Chromosomal locations of highly repeated DNA sequences in wheat. *Heredity* 44: 269-276

- Gill BS, Friebe B, Endo T (1991) Standard karyotype, nomenclature system for description of chromosome bands, structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*) *Genome* 34: 830-839
- Harlander SK (2002) The evolution of modern agriculture, its future with biotechnology. *Coll Nutr* 21: 1615-1655
- Holm, PB (1976) The C, Q banding patterns of the chromosomes of *Lilium longiflorum* (Thunb). *Carlsberg Res Commun* 41: 217-224
- Hotta Y, Stern M (1975) Zigotene, Pachytene-labeled Sequences in the meiotic organization of chromosomes En: *The eucaryotic chromosome*. ed Peacock WJ, Brock RD pp 283-300. Aust Natl Univ Press
- Hutchinson J, Seal AG (1983) A sequential *in situ* hybridization, C-banding *Heredity* 51: 507-509
- Jiang J, Gill BS (1993) Sequential chromosome banding, *in situ* hybridization analysis *Genome* 36: 792-795
- Kamstra SA, Kuipers AGJ, De Jeu M, Ramanna MS, Jacobsen E (1997) Physical localization of repetitive sequences in *Alstroemeria*: karyotyping of two species with species-specific, ribosomal DNA. *Genome* 40: 652-658
- Leitch IJ, Leitch AR, Heslop-Harrison JS (1991) Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneously *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes *Genome* 34: 329-333
- Leutwiler LS, Hough-Evans BR, Meyerowitz EM (1984) The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 194: 15-23
- Lim, K-B., Wennekes, J, De Jong, JH, Jacobsen, E, Van Tuyl, JM (2001) Karyotype analysis of *Lilium longiflorum*, *Lilium rubellum* by chromosome banding, fluorescent *in situ* hybridisation *Genome* 44: 911-918
- Linde-Laursen, I (1975) Giemsa C-banding of the chromosomes of 'Emir' barley. *Hereditas* 81: 285-289
- Martinez-Zapater JM, Estelle MA, Sommerville CR (1986) A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana* *Mol Gen Genet* 204:417-423
- McNeil JA, Jonson CV, Carter KC, Singer RH, Lawrence JB (1991) Localizing DNA, RNA within nuclei, chromosomes by *in situ* hybridization. *Genet Anal Tech Appl* 8: 41-58

- McRae EA (1998) Lilies: a guide for growers, collectors. Timber press Portland, Oregon
- Mizuochi H, Marasek A, Okazaki K (2007) Molecular cloning of *Tulipa fosteriana*, rDNA subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization of 5S rDNA, 45S rDNA in *T gesneriana*, *T fosteriana*. *Euphytica* 155: 235-248
- Mukai Y, Nakahara Y, Yamamoto M (1993) Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic, highly repeated DNA. *Genome* 36: 489-494
- Murata M, Ogura Y, Motoyoshi F (1994) Centromeric repetitive sequences in *Arabidopsis thaliana* *Jpn J Genet* 69: 361-370
- Negi MS, Rajagopal J, Chauhan N, Cronn R, Lakshmikumaran M (2002) Length, sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides*. *Genome* 45: 1181-1188
- Osuji JO, Crouch J, Harrison G, Heslop-Harrison JS (1998) Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars, hybrids: location of 18S-5.8S-25S, 5S rDNA, telomere-like sequences *Ann Bot* 82: 243-248
- Pedersen C, Langridge P (1997) Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome* 40: 589-593
- Pedersen C, Ramussen SK, Linde-Laursen I (1996) Genome, chromosome identification in cultivated barley, related species of the Triticeae (Poaceae) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence *Genome* 39: 93-104
- Peterson DG, Lapitan NLV, Stack SM (1999) Localization of single, low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) *Genetics* 152: 427-439
- Pruitt RE, Meyerowitz EM (1986) Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana* *J Mol Biol* 187: 169-183
- Rettenbergger G, Klett C, Zechner U, Bruch J, Just W, Vogel W, Hameister H (1995) ZOO-FISH analysis: cat, human karyotypes closely resemble the putative ancestral mammalian karyotype *Chromosome Res* 3: 479-486
- Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes *Science*, 273: 497-494

- Shapiro JA (2005) A 21st century view of evolution: genome system architecture, repetitive DNA, natural genetic engineering. *Gene* 34: 91-100
- Sherthan H, Cremer T, Arnason U, Weiher H-U, Lima-de-Faria A, Frönicke L (1994) Comparative chromosome painting discloses homoeologous segments in distantly related mammals. *Nat Genet* 6: 342-347
- Stern H, Hotta Y (1978) Regulatory mechanism in meiotic crossing over. *Ann Rev Plant Physiol* 29: 415-436
- Stewart, RN (1947) The morphology of somatic chromosomes in *Lilium* *Am J Bot* 34: 9-26
- Strasburger, E (1880) *Zellbildung und Zelltheilung* 3rd ed. Fischer Verlag, Jena 392 p
- Van, Tuyl JM, Van Holsteijn (1996) Lily breeding research in the Netherlands *Acta Hort* 414: 35-45
- Van, Tuyl (1997) Interspecific hybridization in flower bulbs A Review *Acta Hort* 430: 465-476
- Von Kalm, L, Smyth, DR (1980) Silver staining test of nucleolar suppression in the *Lilium* hybrid 'Black Beauty' *Exp Cell Res* 129: 481-485
- Von Kalm, L Smyth, DR (1984) Ribosomal RNA genes, the substructure of nucleolar organizing genes in *Lilium*. *Can J Genet Cytol* 26: 158-166
- Wienberg J, Stanyon R (1995) Chromosome painting in mammals as an approach to comparative genomics *Curr Opin Genet Dev* 5: 792-797
- Wienberg J, Jauch A, Stanyon R, Cremer T (1990) Molecular cytogenetics of primates by chromosomal *in situ* suppression hybridization. *Genomics* 8: 347-350
- Wienberg J, Jauch A, Stanyon R, Cremer T (1992) Homologies in human, *Manaca fustaca* chromosomes revealed by *in situ* suppression hybridization with human chromosome specific DNA libraries *Chromosoma* 101: 265-270
- Wong LH, Choo K (2004) Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere *Trends Genet* 20 (12): 611-616, 204
- Woodcock, HBD, Stearn, WT (1950) *Lilies of the world: their cultivation & classification* Country Life Limited, London, pp 15-20

LISTA DE APÉNDICES

APÉNDICE A

Método CTAB para extracción de ADN

Soluciones:

1% CTAB Buffer de precipitación

1% CTAB

50 mM Tris-HCl pH 8.0

10 mM EDTA pH 8.0

para 100 mL:

10 mL 10% CTAB (en mQ)

5 mL 1 M Tris-HCl pH 8.0

2 mL 0.5 M EDTA pH 8.0

2% CTAB Buffer de extracción

2% CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide)

100mM Tris-HCl pH 8.0

20 mM EDTA pH 8.0

1.4 M NaCl

1% PVP (polyvinilpyrrolidone)

para 100 mL:

20 mL 10% CTAB (en mQ)

10 mL 1 M Tris-HCl pH 8.0

4 mL 0.5 M EDTA pH 8.0

28 mL 5 M NaCl

1g PVP (Mw = 25,000 - 40,000)

10% CTAB solución

10% CTAB

0.7 M NaCl

para 100 mL:

10 mL 10% CTAB (in mQ)

4.1g NaCl

Buffer TE Alto en Sales

10 mM Tris-HCl pH 8.0

1 mM EDTA pH 8.0

1 M NaCl

para 100 mL:

1 mL 1 M Tris-HCl pH 8.0

0.2 mL 0.5 EDTA pH 8.0

20 mL 5 M NaCl

0.1 x TE:

1 mM Tris-HCl pH 8.0

para 100 mL:

1 mL 1 M Tris-HCl pH 8.0

0.1 mM EDTA pH 8.0

0.02 mL 0.5 EDTA pH 8.0

RNAsa A

10mg/mL RNAsa A libre de DNAsa en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM NaCl. Hervir 15 minutos y permitir que se enfríe. Conserve en congelación

80%, 96% ethanol

v/v en agua

Material:

- Nitrógeno líquido
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- CTAB 2% (65 °C)
- CTAB10% (65 °C)
- CTAB 1%
- Buffer TE Alto en Sales (65 °C)
- 0.1 TE buffer
- Ethanol 96%, en hielo
- Ethanol 80%
- RNAsa A, (10mg/mL)

Procedimiento:

Colección de tejido

1. Congele tejido de hojas jóvenes y frescas en nitrógeno líquido
2. Conserve a -80 °C.

Método CTAB

1. Muela de 2 a 4 gramos de material vegetal congelado en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido.
2. Transfiera el tejido molido a un tubo de 50 mL.

3. Rápidaente añada 4 mL (65 °C) de 2% CTAB buffer de extracción (*destrucción de las membranas*)
4. Agite hasta que se forme una solución homogénea, ligeramente viscosa.
5. Incubar por 20-30 min a 65 °C en baño maría (Mezclar varias veces durante la incubación).
6. Añadir un volumen similar (5mL) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (desnaturalización de proteínas)
7. Extraer durante 20 min por rotación a temperatura ambiente.
8. Centrifugue por 30 min a 3600 rpm.
9. Transfiera la fase sobrenadante a un tubo de 15mL.
10. Añada 0.1 volúmenes de 10% CTAB solución (65 °C) y mezcle cuidadosamente.
11. Añada un volume similar (4 mL) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1).
12. Extraer durante 20 min por rotación a temperatura ambiente.
13. Centrifugue por 30 min a 3600 rpm.
14. Transfiera la fase sobrenadante a un tubo de 15mL.
15. Añada un volumen similar (exactamente!) 1% CTAB buffer de precipitación.
16. Precipite el ADN invirtiendo el tubo varias veces (la precipitación debe ser visible).

17. Centrifugue por 3 min a 3600 rpm.
18. Descarte el sobrenadante y resuspenda la pastilla en 1.5 mL buffer TE Alto en Sales (en baño maría a 65 °C)
19. Añada 2 volúmenes de alcohol al 96% enfriado en hielo, mezcle cuidadosamente (*la precipitación deberá ser visible*).
20. Centrifugue por 3 min a 3600 rpm (4 °C).
21. Descarte el sobrenadante y añada 3 mL de etanol al 80% y mezcle.
22. Centrifugue por 3 min a 3600 (4 °C).
23. Descarte el sobrenadante, seque la pastilla en vacío durante 20 min.
24. Resuspenda la pastilla en 500 µl 0.1 TE buffer y añada 1 µl RNasa A (10mg/mL).
25. Conserve a 4 °C.

APÉNDICE B

Buffer de citrato

A 10 mM Citrato trisodico

B 10 mM Acido Cítrico

Mezclar A y B para obtener pH 4.5

APÉNDICE C

Medio líquido Luria-Bertoni (LB)

Reactivos:

1000 mL	Agua desionizada
10 g	Triptona
5 g	Extracto de levadura
10 g	NaCl

Mezclar los reactivos, ajustar el pH a 7.5 con NaOH. Esterilizar en autoclave a 120 °C a una presión 1.1 Kg/cm² durante 15 min.

APÉNDICE D

Medio sólido Luria-Bertoni (LB)

Reactivos:

1000 mL	Agua desionizada
10 g	Triptona
5 g	Extracto de levadura
10 g	NaCl
15 g	Agar
0.1 mg/mL	Ampicilina

Mezclar los reactivos, a excepción del agar y la ampicilina, ajustar el pH a 7.5 con NaOH y agregar el agar. Esterilizar en autoclave a 120 °C a una presión 1.1 Kg/cm² durante 15 min. En campana de flujo laminar, ya que el medio se haya enfriado un poco, agregar la ampicilina y revolver; llenar las cajas de petri con 25 mL del medio y dejar solidificar a temperatura ambiente.

APÉNDICE E

Medio SOC

900 mL	Agua desionizada
20 g	Bacto-Triptona
5 g	Extracto de levadura
2mL	5M NaCl
2.5 mL	1M KCl
10 mL	1M MgCl ₂
10 mL	1M MgSO ₄
20 mL	1M Glucosa

Aforar a 1 litro y esterilizar en autoclave a 120 °C a una presión 1.1 Kg/cm² durante 15 min