



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**VARIACIÓN CROMOSÓMICA DE *Choeronycteris mexicana*
(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) DE SANTO DOMINGO
HUEHUETLÁN EL GRANDE, PUEBLA**

Tesis presentada como requisito para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**PRESENTA:
EDUARDO CALVARIO CARRILLO**

**DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. ROSA MARÍA GONZÁLEZ MONROY**



Abril, 2016

“Bats are Beautiful”

DEDICATORIA

Me entusiasma dedicar esta tesis a personas que han marcado fuertemente mi vida con palabras y acciones, revolucionando mis ideales:

A mi padre Felipe Fermín Calvario, por siempre estar presente y apoyarme incondicionalmente en mis metas, sueños, por educarme para ser una persona crítica, responsable, diferente y extraordinaria.

A mi madre Ruth Carrillo, por impulsarme a salir y conocer el mundo, a disfrutar la vida y por sentarse a escuchar mis historias, por el apoyo y el amor de madre.

A mis hermanos Elizabeth y Juan Carlos, por siempre impulsarme a ser mejor y hacerme sonreír todos los días.

A mis amigos y colegas Margarita González, Karina Hernández, Marta Andrea Varguez, Diego Peña, Raúl Sánchez, Luis Armando Estudillo y Soledad Carrillo por permanecer juntos durante toda la vida universitaria, por los viajes, consejos y recuerdos, por ayudarme en clases y sus recomendaciones profesionales para culminar mi proyecto de tesis.

A mis profesores de la licenciatura y movilidad por enseñarme todo cuanto sé hoy sobre la vida y sus procesos, por adentrarme a este maravilloso mundo de la ciencia y por enseñarme el valor del conocimiento.

A la ciencia, Biología, por cambiar mi mundo y hacerme eternamente feliz.

A los murciélagos, por ser criaturas extraordinarias y llevarme a tener una de las mejores experiencias de vida.

A mí mismo, por siempre cumplir mis objetivos y metas con disciplina, sacrificio y decisión, incluyendo esta meta de ser Biólogo.

Finalmente, quisiera agradecer a todas las personas que me falta por nombrar pues la lista es bastante larga. De verdad, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a la M. en C. Rosa María González Monroy por el conocimiento transmitido en el área de Citogenética y adentrarme al mundo de los mamíferos, por ser una excelente directora de tesis y el apoyo incondicional a nivel profesional.

Al Dr. Jesús Martínez Vázquez por sus consejos en el laboratorio y en campo, así como el tiempo dedicado para culminar esta tesis.

Al M. en C. Héctor Rafael Elosa León por los conocimientos, el apoyo y las revisiones que ayudaron a mejorar la calidad de la presente tesis.

A las autoridades y pobladores de Santo Domingo Huehuetlán El Grande por las facilidades para llevar a cabo este proyecto de tesis.

A la Cooperativa Atotonilco S.C. de R.L. de C.V. por siempre recibirnos y apoyarnos en todo momento para llevar a cabo el trabajo de campo.

A quienes participaron en la fase de muestreo y experimento: Carlos Sosa, Margarita González, Karina Hernández, Marta Andrea Varguez y Raúl Sánchez.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP por la beca otorgada durante la realización del proyecto "Variación cromosómica de murciélagos de Santo Domingo Huehuetlán El Grande, Puebla".

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a la Escuela de Biología por los conocimientos transmitidos a lo largo de mi carrera universitaria.

Finalmente quisiera agradecer a la Dirección General de Planeación Institucional por el financiamiento para la impresión de esta tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. HETEROCROMATINA Y EUCROMATINA.....	3
1.2. BANDEO CROMOSÓMICO.....	4
1.3. VARIACIÓN CROMOSÓMICA.....	6
2 EL ORDEN CHIROPTERA.....	8
2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.....	9
2.1.1 INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	10
2.1.2 DISTRIBUCIÓN.....	10
2.1.3 HISTORIA NATURAL.....	11
2.1.4 HÁBITAT.....	11
2.1.5 ESTADO DE CONSERVACIÓN.....	12
2.1.6 FACTORES DE RIESGO.....	13
3 ANTECEDENTES.....	13
4 JUSTIFICACIÓN.....	15
5 HIPÓTESIS.....	16
6 OBJETIVOS.....	17
7 MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
7.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	18
7.2 COLECTA DE MURCIÉLAGOS.....	20
7.3 TRABAJO DE LABORATORIO.....	22
7.4 ELABORACIÓN DE LAMINILLAS Y TINCIÓN CONVENCIONAL.....	24
7.5 BANDAS CROMOSÓMICAS G.....	24
7.6 BANDAS CROMOSÓMICAS C.....	26
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y OBTENCIÓN DEL CARIOTIPO.....	27
8 RESULTADOS.....	30

8.1	CARIOTIPO CONVENCIONAL.....	29
8.2	BANDAS CROMOSÓMICAS G.....	33
8.3	BANDAS CROMOSÓMICAS C.....	36
9	DISCUSIÓN.....	39
10	CONCLUSIONES.....	43
11	PROPUESTAS.....	44
12	BIBLIOGRAFÍA.....	45
13	ANEXO.....	52

RESUMEN

La citogenética es la disciplina encargada de estudiar el comportamiento cromosómico durante la mitosis y la meiosis. Cada especie tiene un cariotipo particular en el cual el número y morfología de los cromosomas son específicos. Las inversiones, translocaciones, fusiones y fisiones, son principalmente los cambios cromosómicos más importantes en la evolución de los mamíferos afectando la constancia cromosómica de estos. En el caso de los quirópteros y a pesar de su gran diversidad, pocos son los trabajos que estudian la variabilidad genética de las poblaciones. El objetivo de este estudio fue analizar la variación cromosómica del murciélago *Choeronycteris mexicana* en la localidad de Santo Domingo Huehuetlán El Grande, describir el cariotipo y elaborar el bandeo cromosómico G y C. Se colectaron 12 ejemplares machos en dos cuevas de Huehuetlán El Grande en el Estado de Puebla y se les aplicó la técnica de extracción de médula ósea usando Colchicina como inhibidor mitótico para obtener los cromosomas. Posteriormente, se identificaron bandas cromosómicas utilizando tratamientos con Tripsina e Hidróxido de Bario. Se realizaron 23 preparaciones y se analizaron 423 campos mitóticos con un número diploide de 16 y un número fundamental de 24.

El cariotipo se estableció usando el índice centromérico obteniendo un par metacéntrico, tres pares submetacéntricos, un par subtelocéntrico y dos pares telocéntricos. El cromosoma sexual X es metacéntrico y el Y es telocéntrico. Se observaron de tres a cinco bandas de Eucromatina en los cromosomas birrámeos, de una a dos en los monorrámeos y una sola banda en el cromosoma X y Y. La heterocromatina constitutiva se localizó en el centrómero de todos los cromosomas en mínima proporción. Los resultados de este estudio difieren a los reportados para poblaciones de Guerrero, México y de Arizona, Estados Unidos de América con un número diploide de 16, un número fundamental de 24-26 y fórmula cromosómica de dos metacéntricos, dos submetacéntricos, dos subtelocéntricos y dos telocéntricos. Esto se debe posiblemente a que la población de Santo Domingo Huehuetlán El Grande está pasando por un proceso de especiación.

1. INTRODUCCIÓN

A finales del siglo XIX, diversos científicos como Strasburger y Fleming comenzaron a apreciar estructuras inestables que aparecen al principio de las divisiones celulares, durante las que tienen un comportamiento característico y que desaparecen al final de ellas, hoy mejor conocidas como cromosomas. El término fue acuñado por Waldeyer (1888) y en la actualidad se pueden definir como el material hereditario organizado cuya estructura adquiere complejidad creciente en la evolución, pasando de simples moléculas desnudas de ácidos nucleicos en algunos procariontes a asociaciones de ácidos nucleicos con proteínas histónicas como componentes químicos mayoritarios en eucariontes (Lacadena, 1996). Estas estructuras son el resultado de la condensación de la cromatina durante la mitosis, la cual está dividida convencionalmente en cuatro etapas (profase, metafase, anafase y telofase) y que tiene como función realizar los movimientos necesarios para repartir equitativamente el material genético en las células hijas (Lomanto *et al.*, 2003). Durante la metafase, los cromosomas presentan dos cromátidas hermanas idénticas en su morfología e información genética contenida en el ADN, conectadas por un centrómero (Puentes-Martínez, 2000; Figura 1).

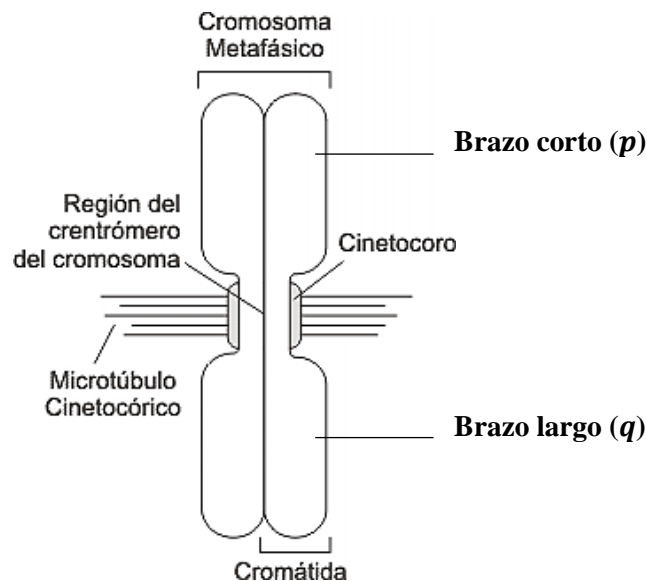


Figura 1. Esquema de cromosoma replicado (Genoma Sur, 2016).

Con la llegada en 1902-1903 de la *Teoría Cromosómica de la Herencia* de Sutton y Boveri surge la Citogenética, la cual es el campo de investigación que se desarrolla a partir de dos ciencias, la Genética y la Citología, y tradicionalmente comprende el estudio del comportamiento cromosómico durante la mitosis y la meiosis, así como su relación con la transmisión y recombinación de genes (Sutton, 1903). En esta misma área, fue Levitsky en 1924 el primero en definir el cariotipo como el fenotipo físico de nuestros genes. Una definición más usada podría tomarse de Pérez- Suárez *et al.* (1991) como el conjunto de características morfológicas de los cromosomas de células somáticas, ordenados por pares de homólogos y tamaño decreciente, donde los cromosomas X y Y se conocen como cromosomas sexuales y el resto se denominan autosomas.

Cada especie tiene un cariotipo particular en el cual el número diploide ($2n$), número fundamental (NF) y morfología de los cromosomas son específicos. El centrómero de cada cromosoma, proporciona a cada uno una morfología característica al dividirlo en dos brazos (brazo p o brazo corto, y brazo q o brazo largo) que pueden ser iguales y desiguales (birrámeos) o con un solo brazo (monorrámeos). Levan *et al.* (1964) usaron esta información y propusieron clasificar a los cromosomas en cuatro tipos básicos dependiendo de la posición del centrómero, de acuerdo al índice centromérico (longitud del brazo corto en relación a la longitud total del cromosoma; Figura 2):

- **Metacéntricos:** donde el centrómero se ubica aproximadamente en el medio, por lo que el cromosoma posee brazos de la misma longitud.
- **Submetacéntricos:** donde el centrómero está desplazado hacia un extremo, lo que produce un brazo largo y un brazo corto.
- **Subtelocéntricos:** donde el centrómero está cerca de un extremo, lo que produce un brazo largo y un botón o brazo corto en el otro extremo.
- **Telocéntricos:** donde el telómero está en el extremo del cromosoma o muy cercano al él.

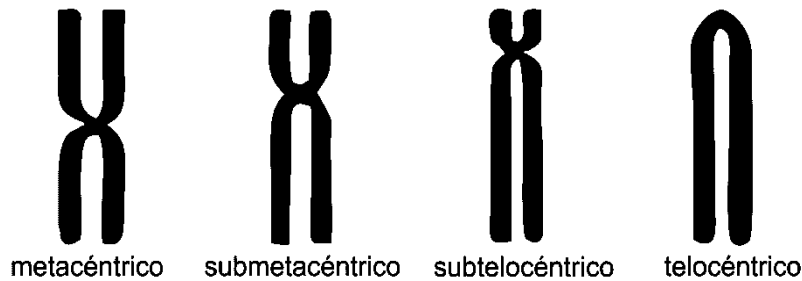


Figura 2. Clasificación de los cromosomas según Levan *et al.* (1964).

1.1 HETEROCROMATINA Y EUCROMATINA

La cromatina es el conjunto de histonas asociadas al ADN (H2A, H2B, H3 y H4 y H1) junto con otras proteínas responsables de la expresión, síntesis y empaquetamiento del ADN (Molist *et al.*, 2015).

Durante la interfase y a la vista del microscopio óptico, pueden observarse zonas claras y oscuras. Las oscuras corresponden principalmente a cromatina compactada denominada heterocromatina. En esta fase del ciclo celular, la heterocromatina suele situarse en las proximidades de la envoltura nuclear o alrededor del nucléolo. En las zonas claras, la cromatina se presenta de forma más laxa y se denomina eucromatina. Esta suele corresponder con regiones del ADN que está en proceso de transcripción, mientras que la heterocromatina en su mayoría es transcripcionalmente inactiva. La heterocromatina puede dividirse en facultativa (puede pasar de heterocromatina a eucromatina y viceversa) y constitutiva (corresponde al 10-20% de la heterocromatina y siempre permanece condensada). Si bien existen porciones de ADN en la heterocromatina constitutiva que se transcriben, generalmente aquí se encuentran los genes que no se expresan (Molist *et al.*, 2015).

Durante los procesos de mitosis y meiosis, la heterocromatina y eucromatina se compactan aún más formando a los cromosomas dentro de las células. Además de estas dos categorías de cromatina, algunas regiones tampoco son totalmente homogéneas. Este comportamiento es precisamente la base del patrón de bandas

característico de cada cromosoma y que permite la creación del cariotipo bandeado.

1.2 BANDEO CROMOSÓMICO

Desde hace unos 40 años la citogenética dispone de una serie de técnicas que permiten la identificación de todas las variaciones ya mencionadas a través de estructuras cromosómicas transversales (bandas) de diferente tamaño a lo largo de los cromosomas. El gran valor de los diversos patrones de bandeo es que caracterizan a cada cromosoma de diversas especies de entidades biológicas superiores. En los vertebrados las bandas se originaron a través de prolongados procesos evolucionarios acaecidos a distintos niveles evolutivos constituyendo los componentes cromosómicos observables actualmente (Drets, 2002).

De entre las técnicas más usadas en los estudios citogenéticos para mamíferos cabe destacar las siguientes (Pérez-Suárez *et al.*, 1991):

- a) **Bandeo cromosómico G.** Descrito por primera vez en 1971, el bandeo G se denomina de este modo debido al colorante que se emplea desarrollado por Gustav Giemsa (1948). Además, esta técnica incluye la digestión de los cromosomas con una enzima proteolítica: la tripsina.

La técnica del bandeo cromosómico G permite teñir ciertas regiones de los cromosomas de la gran mayoría de especies animales durante la metafase, es decir, cuando están condensados. El resultado de la tinción es una coloración oscura en determinadas zonas de cada cromosoma, lo que da un patrón de bandas característico y repetible para cada cromosoma y cada uno de sus brazos. Las bandas surgen de la tinción desigual de las proteínas acompañantes del ácido desoxido ribonucleico.

Las bandas positivas (las que se tiñen y se observan oscuras) se producen por la tinción de proteínas ricas en puentes disulfuro (representados esquemáticamente como -S-S-) y las regiones negativas (bandas claras) presentan por otra parte proteínas ricas en grupos sulfhidrilos (-SH). Por lo

tanto, las bandas G no tienen ningún tipo de relación con los genes codificados en cada cromosoma.

Se ha observado que la unión del colorante es más fuerte en regiones de ADN ricas en pares A-T (que representan el 55-60% del total) y de una cierta longitud mínima. La idea es que las bandas G positivas (más oscuras) aparecen puesto que son más resistentes a la tripsina por tener más A-T y al contrario, las bandas G negativas contienen proteínas que se ven más afectadas por la digestión desnaturizante de la tripsina por tener menos A-T (Moore y Best, 2001).

b) Bando cromosómico C. Es el método para analizar las bandas heterocromáticas en cromosomas de plantas y animales, tanto vertebrados como invertebrados. Está basado en el método BSG de Sumner (1972). Las preparaciones cromosómicas se tratan con álcali moderadamente fuerte (NaOH, Ba (OH)₂) seguido por solución salina caliente y tinción con Giemsa. Las bandas más prominentes aparecen en muchos organismos en las regiones centroméricas y/o teloméricas. El tratamiento degrada el ADN cromosómico y lo extrae selectivamente de las partes eucromáticas del cromosoma, dejando por tanto que las zonas heterocromáticas se tiñan más intensamente con Giemsa. El nombre de bando C se debe a que produce bandas constantes que corresponden a regiones de heterocromatina constitutiva que no se descondensan en interfase, siendo visibles tanto en mitosis como en interfase y de tamaño relativamente constante. Según los organismos pueden ser centroméricas, teloméricas o intersticiales. Las bandas C corresponden a regiones cromosómicas aparentemente desprovistas de genes (Lacadena, 1996).

1.3 VARIACIÓN CROMOSÓMICA

Una vez definida la constancia en el número y la morfología de los cromosomas de una especie, los casos en los que se modifica esta constancia se agrupan bajo el nombre de variaciones cromosómicas.

Históricamente cuando se empezaron a estudiar los cromosomas, su morfología y su contenido se distinguieron perfectamente entre las mutaciones génicas y las cromosómicas. Las primeras provocan cambios fenotípicos en el individuo y no van acompañadas de modificaciones en la morfología de los cromosomas. En cambio las mutaciones cromosómicas suponen cambios en los cromosomas y no tienen que ir asociadas en todos los casos a cambios fenotípicos.

Se considera variación cromosómica a cualquier cambio que afecte a la disposición lineal de los genes sobre los cromosomas o al número de éstos, debido a reordenamientos cromosómicos (Roca, 2008).

Los cambios cromosómicos más importantes en la evolución de los cariotipos que afectan a los autosomas y cromosomas sexuales se mencionan a continuación (Pérez-Suárez *et al.*, 1991):

- **Inversiones pericéntricas:** son giros de 180 grados de fragmentos cromosómicos que incluyen el centrómero. Según el tamaño afectado y la situación del centrómero un cromosoma metacéntrico puede convertirse en telocéntrico o viceversa. Normalmente, estas inversiones pueden inducir a una reducción de la fertilidad. No obstante, son muy comunes en los mamíferos.
- **Inversiones paracéntricas:** son giros de 180 grados de fragmentos cromosómicos, pero que no incluyen al centrómero. Tanto las inversiones pericéntricas, que modifican la morfología cromosómica, como las paracéntricas, que no lo hacen, sólo pueden detectarse con la ayuda de las técnicas de tinción diferencial, especialmente bandeos G y R.
- **Translocaciones:** las translocaciones recíprocas incluyen el intercambio de segmentos cromosómicos entre dos cromosomas, mientras que en las

translocaciones no recíprocas se transfiere un segmento de cromosoma a otro.

- **Fusiones y fisiones:** las fusiones cromosómicas son un tipo especial de translocaciones en las que dos cromosomas telocéntricos se unen por el centrómero o por la región del telómero. Según el punto de unión, las fusiones pueden ser céntricas, telómero-céntricas y teloméricas. Las fisiones o disociaciones, por el contrario, son divisiones de un cromosoma en dos. Las fusiones y fisiones, llamadas translocaciones Robertsonianas, son mutaciones que modifican severamente el número diploide y el número fundamental de las especies y constituyen uno de los mecanismos más importantes en la evolución de los mamíferos.
- **Cambios en la heterocromatina:** los cambios cuantitativos más frecuentes son las adiciones y las deleciones de heterocromatina en los brazos cromosómicos o en la región centromérica y se consideran como factores en el polimorfismo cariotípico, especiación y evolución de los organismos.

2. EL ORDEN CHIROPTERA

La palabra “murciélago” deriva del latín *mus*, *muris* (ratón), *caecus* (ciego) y *alatus* (alado), esto es, *mus caecus alatus*, o ratón ciego alado. Este nombre nace de la creencia popular de que a los ratones, al envejecer, les salían alas y echaban a volar, volviéndose así murciélagos (Castro-Luna y Galindo-González, 2009). Sin embargo, la única verdad de lo anterior es que los murciélagos son los únicos mamíferos que pueden volar y pertenecen al Orden Chiroptera, por lo que se conocen comúnmente como *quirópteros*. Además, sus familias se han extendido por casi todo el planeta.

En México existen 139 especies de 1116 en el mundo, es decir, el país tiene el 12.4% de la diversidad total (Ceballos, 2014). En el caso del Estado de Puebla, se tienen 66 especies representadas en 6 familias: Emballonuridae, Mormoopidae, Natalidae, Vespertilionidae, Molossidae y Phyllostomidae (CONABIO, 2011).

Actualmente se tienen registradas 38 especies en la NOM-059-SEMARNAT-2010; cuatro en peligro de extinción, 17 amenazadas y 17 sujetas a protección especial.

Algunas especies de murciélagos son migratorias, lo que les otorga la membrecía de viajeros frecuentes debido a sus periódicas visitas a latitudes tropicales del planeta, donde su alimento es más abundante. El 70% de las especies se alimenta de insectos y otros invertebrados; 24% de frutas, polen, néctar, peces y carne; y, a pesar de ser comúnmente conocidos como vampiros, sólo un 1% (3 especies) se alimenta de sangre. Las especies que se mantienen de frutos, polen y néctar, son importantes dispersoras de semillas y polinizadoras. Más de 130 plantas utilizadas para la producción de alimentos, dependen de esta dispersión. Para los agricultores, los murciélagos insectívoros son controladores importantes de plagas. Estos organismos pueden consumir hasta 50 toneladas de insectos en una sola noche, lo que ayuda decididamente a la eliminación de plagas o de transmisores de enfermedades (CONABIO, 2011).

2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Choeronycteris mexicana, también conocido como murciélago trompudo, es un filostómido de talla mediana cuyo peso oscila entre los 10 y 20 g. El pelaje es de tonalidad grisácea-marrón (siendo el vientre más pálido que el dorso) de hasta 7 mm de largo y el hocico es alargado con lengua larga y extensible. La cola es corta de aproximadamente 1/3 del largo del uropatagio el cual es desnudo y de la mitad de longitud del fémur. Las orejas son cortas con las membranas oscuras, la hoja nasal es ancha en la base y terminada en punta con aproximadamente 5 mm de largo (Arroyo-Cabrales *et al.*, 1987; Figura 3).



Figura 3. Ejemplar de *Choeronycteris mexicana*.

2.1.1 INFORMACIÓN TAXONÓMICA

REINO: Animalia

PHYLUM: Chordata

CLASE: Mammalia

ORDEN: Chiroptera

SUBORDEN: Microchiroptera

FAMILIA: Phyllostomidae

TRIBU: Glossophagini

GÉNERO: *Choeronycteris*

ESPECIE: *Choeronycteris mexicana*

2.1.2 DISTRIBUCIÓN

Esta especie se extiende desde el sur de California, el sur de Arizona y el suroeste de Nuevo México en Estados Unidos de América hasta El Salvador y Honduras, distribuyéndose por todo México (incluyendo Baja California y las Islas Marías), a excepción del norte de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, la costa del Golfo de México y la Península de Yucatán (Figura 4). Se le ha encontrado en altitudes desde los 300 hasta los 2400 m.s.n.m. (Arroyo-Cabrales *et al.*, 1987; Gómez-Nisino, 2006; Hall, 1981; Villa, 1966).

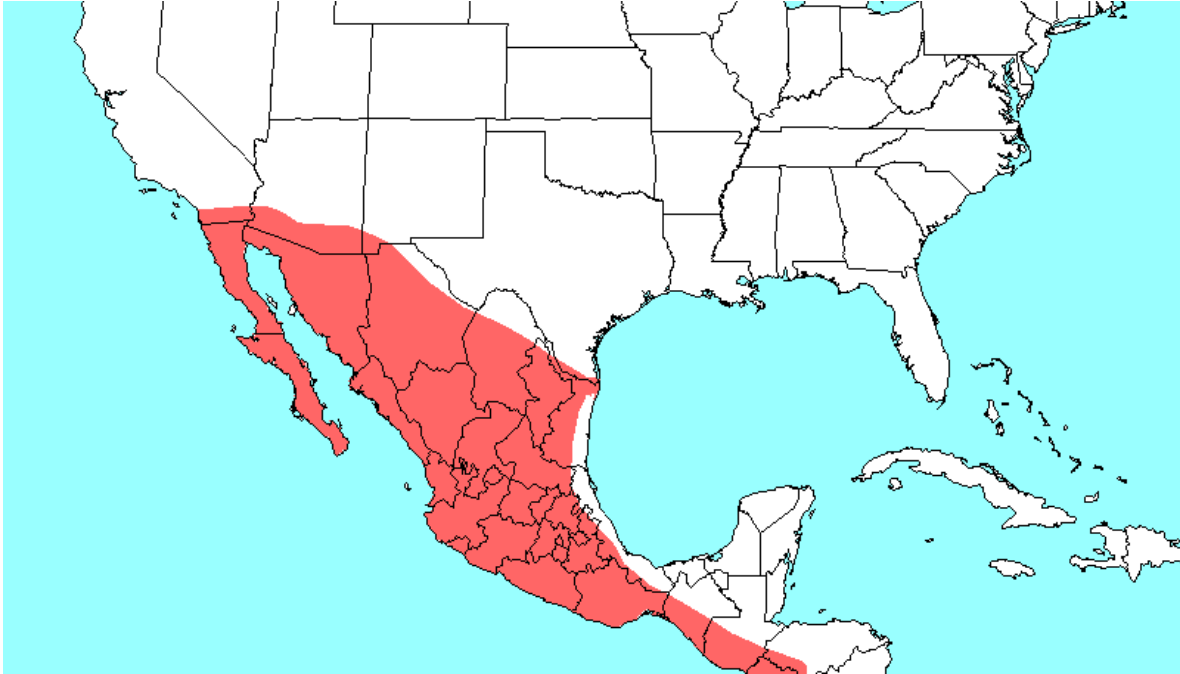


Figura 4. Distribución geográfica de *Choeronycteris mexicana* (Tomado de Kays y Wilson, 2009).

2.1.3 HISTORIA NATURAL

Es una especie vivípara, homeoterma, nectarívora y polinívora principalmente. También se han descrito como alimento frutos y probablemente insectos asociados a las flores que consumen. Es polinizador de las plantas de las cuales se alimenta donde análisis estomacales del centro del país incluyen granos de polen de pitahayas (*Lemaireocereus* sp), cazahuates (*Ipomoea* sp) *Ceiba*, *Agave* y garambullo (*Myrtillocactus* sp), y algunas semillas de frutos como pitahayas y garambullos señalándolo como dispersor (Álvarez y González, 1970; Arroyo-Cabrales *et al.*, 1987; Cryan y Bogan, 2003; Gómez-Nisino, 2006).

2.1.4 HÁBITAT

Choeronycteris mexicana ha sido registrado en una gran variedad de tipos de vegetación que van desde el matorral xerófilo, el bosque tropical caducifolio, el

bosque espinoso, bosque de coníferas hasta el bosque de pino encino (Arroyo-Cabrales *et al.*, 1987).

Los sitios de descanso generalmente se encuentran en la entrada de grandes cuevas y minas abandonadas formando grupos pequeños, en los cuales los adultos no tienen contacto y se encuentran separados a una distancia aproximada de 2 a 5 cm, colgando de una sola pata y rotando 360° para detectar cualquier intruso. Si los individuos son perturbados, estos pueden huir a otros sitios ocupados por conspecíficos o volar en la luz antes que adentrarse a las profundidades de las cuevas. *Choeronycteris mexicana* es considerada una especie migratoria, sin embargo es capaz de ocupar el mismo sitio durante años (Cryan y Bogan, 2003).

2.1.5 ESTADO DE CONSERVACIÓN

Se encuentra como especie amenazada (A) en la NOM-059-2010 SEMARNAT, aunque debido a que se le encuentra en diversos hábitats y a sus hábitos migratorios la situación es variable (Gómez-Nisino, 2006).

2.1.6 FACTORES DE RIESGO

Principalmente fragmentación y destrucción del hábitat debido a las prácticas agrícolas y forestales, extracción ilegal de cactáceas y perturbaciones ocasionadas en los refugios por el hombre debido a la ignorancia y a los mitos existentes en torno a ellos (Gómez-Nisino, 2006).

3. ANTECEDENTES

Pocos son los estudios que han encontrado variación cromosómica en especies de la familia Phyllostomidae. Baker (1970), quien ha sido figura clave en la investigación cariológica de quirópteros, reportó cambios en el número diploide, número fundamental y morfología del cromosoma Y en especímenes de *Macrotus waterhousii* de localidades del norte (California y Arizona, Estados Unidos de América y Sonora, México) con respecto a las poblaciones del sur (Morelos y Guerrero, México). También encontró las mismas diferencias para especímenes de *Uroderma bilobatum* de Chiapas, México, y de Trinidad y Tobago.

También se han reportado cambios en el número diploide y número fundamental entre *Mycronycteris hirsuta* de Centroamérica y de Trinidad y Tobago y *Vampyressa pusilla* de Centroamérica y Colombia (Baker, 1979).

En el caso de *Choeronycteris mexicana* se han realizado diversos trabajos citogenéticos. Un análisis comparativo del cariotipo de 14 especies de murciélago encontró fusiones céntricas e inversiones pericéntricas como los principales reordenamientos cromosómicos en las familias Vespertilionidae, Molosidae y Phyllostomidae. En este estudio, *Choeronycteris mexicana* de Pima Co., Arizona, Estados Unidos de América, presentó un número diploide de 16 y un número fundamental de 26. El número fundamental fue determinado contando todos los brazos de los cromosomas incluyendo los sexuales. Además, los cromosomas fueron ordenados por grupos y por tamaño para poder establecer el cariotipo. La morfología se estableció por el tamaño de los brazos y contando todos los cromosomas como autosomas (incluyendo los sexuales), siendo dos pares metacéntricos, dos pares submetacéntricos, dos pares subtelocéntricos y dos pares telocéntricos (Osborne, 1965).

Un estudio realizado para evaluar los conceptos sobre la filogenia de los murciélagos de la familia Phyllostomidae analizando citogenéticamente 27 especies mostró que *Choeronycteris mexicana* de Teloloapan, Guerrero, presentó un número diploide de 16 y un número fundamental de 24-26. La morfología de los cromosomas consistió también en dos pares metacéntricos, dos pares

submetacéntricos, dos pares subtlocéntricos y dos pares telocéntricos. Los cromosomas sexuales no pudieron ser determinados y fueron considerados como autosomas (Baker, 1967).

Un análisis del cariotipo de 26 especies de murciélagos de la familia Phyllostomidae pero con especial enfoque sobre los cromosomas sexuales y el sistema XX/XY_1Y_2 menciona un número diploide de 16 para *Choeronycteris mexicana* de Teloloapan, Guerrero, y a las translocaciones Robertsonianas como principales reordenamientos cromosómicos involucrados en la morfología de los cromosomas sexuales de los quirópteros analizados (Hsu *et al.*, 1968).

Un estudio citogenético comparando principalmente la frecuencia del número diploide y la frecuencia del número fundamental de 77 especies de la familia Phyllostomidae, reportó un número diploide de 16 y un número fundamental de 24 para *Choeronycteris mexicana*. Solo se menciona la morfología de los cromosomas sexuales siendo tanto X como Y submetacéntricos (Baker, 1973).

Finalmente, un análisis cladístico con base en las bandas cromosómicas G de murciélagos de la subfamilia Glossophaginae, menciona un número diploide de 16 para *Choeronycteris mexicana* de Álamos, Sonora, y que esta especie presenta de tres a siete bandas de Eucromatina en los autosomas birrámeos, y de una a dos bandas en los autosomas monorrámeos, y probablemente una banda en los cromosomas sexuales XX, compartiendo un alto grado de homología con base en los patrones de bandas cromosómicas G con *Choeroniscus minor*, *Musonycteris harrisoni* e *Hylonycteris underwoodi* (Haiduk y Baker, 1982).

4. JUSTIFICACIÓN

Tal como sucede con los roedores y a pesar de la gran riqueza de especies del orden Chiroptera, los estudios genéticos son diversos, pero pocos se enfocan en la variabilidad genética de las poblaciones (Piñero *et al.*, 2008). Por lo anterior y sabiendo la importancia incuestionable de los murciélagos, este trabajo pretende aportar información sobre la diversidad cromosómica de mamíferos como lo son los quirópteros, específicamente de la especie *Choeronycteris mexicana*.

5. HIPÓTESIS

Debido a que se han reportado variaciones cromosómicas en diferentes grupos de murciélagos silvestres y se ha demostrado en otros mamíferos la susceptibilidad de variaciones, entonces es posible que *Choeronycteris mexicana* de Santo Domingo Huehuetlán El Grande presente variación cromosómica en su cariotipo comparado con lo reportado por varios autores en Arizona, Estados Unidos de América y Álamos, Sonora y Teloloapan, Guerrero, México, como uno de los elementos fundamentales del proceso evolutivo de la misma especie.

6. OBJETIVO

Contribuir al conocimiento del murciélago *Choeronycteris mexicana* en Santo Domingo Huehuetlán El Grande, Puebla.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir el cariotipo del murciélago *Choeronycteris mexicana*.
- Realizar bandeo cromosómico G y C del murciélago *Choeronycteris mexicana*.
- Realizar el ideograma del cariotipo del murciélago *Choeronycteris mexicana*.
- Comparar y analizar la variación del cariotipo obtenido de *Choeronycteris mexicana* con el reportado para otras poblaciones.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 ÁREA DE ESTUDIO

La localidad de Santo Domingo Huehuetlán esta situada en el Municipio de Huehuetlán El Grande en el Estado de Puebla. Se localiza entre los paralelos $18^{\circ} 40'$ y $18^{\circ} 51'$ N; los meridianos $98^{\circ} 04'$ y $98^{\circ} 15'$ O; a una altitud entre 1200 y 2200 m.s.n.m.

Colinda al norte con los municipios de Teopantlán, Puebla y Tzicatlancoyan; al este con los municipios de Tzicatlancoyan, San Juan Atzompa, La Magdalena Tlatlauquitepec y Huatlatlauca; al sur con los municipios de Huatlatlauca y Teopantlan; al oeste con el municipio de Teopantlan. El municipio de Huehuetlán El Grande tiene una superficie de 264.08 kilómetros cuadrados que corresponden al 0.53% de la superficie del estado (INEGI, 2009; Figura 5).

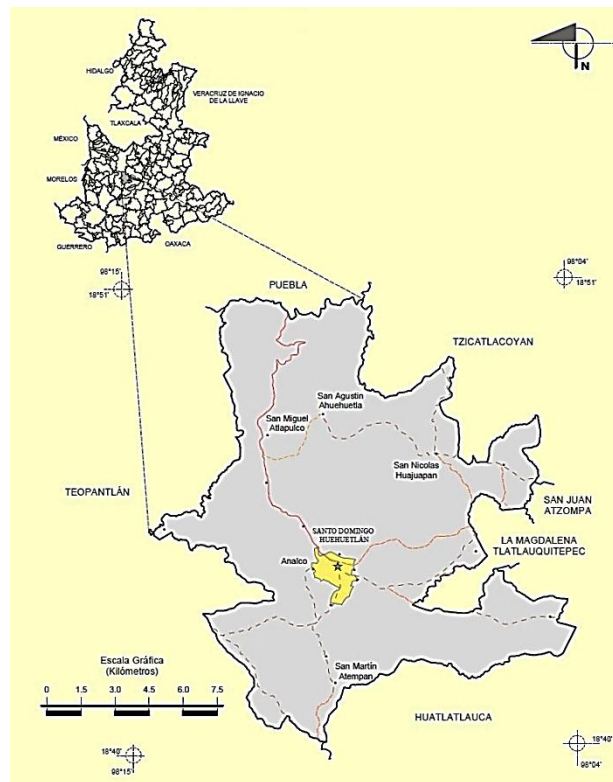


Figura 5 . Ubicación del Área de Estudio, Santo Domingo Huehuetlán El Grande, Puebla (INEGI, 2009).

El municipio forma parte de tres regiones morfológicas; a partir de la cota 2,000 hacia el norte, forma parte de la Sierra del Tentzo; el área comprendida entre el río Huehuetlán y la cota 1,500 al suroeste pertenece al Valle de Matamoros; el resto del municipio, constituye el extremo oriental del valle de Atlixco.

Huehuetlán El Grande pertenece a la cuenca del río Atoyac y es bañado por numerosas corrientes intermitentes originadas en la sierra del Tentzo al norte; recorren el municipio de norte a sur, formando algunas barrancas importantes como La Barranca Grande y Barranca Tepeyole; terminan concentrándose en el río Huehuetlán, que es el único de carácter permanente y que más al sur se une al Atoyac.

En el municipio se pueden identificar tres tipos de clima, semicalido subhmedo, calido subhmedo y templado subhmedo con lluvias en verano. El rango de temperatura oscila entre los 17 y 23° C; y el rango de precipitación es de 700-900 mm. El norte del municipio que comprende parte de la sierra del Tentzo, está cubierta por bosques de encino asociados con vegetación secundaria arbustiva; coincide con las zonas montañosas, suelos de rendzina y clima templado. Al centro, la vegetación predominante es la selva baja caducifolia, asociada en ocasiones con vegetación secundaria arbustiva o arbórea, coincidiendo con el curso del río Huehuetlán, se presenta un área con Agricultura de riego tanto de cultivos anuales como semipermanentes. Existe una considerable extensión al sur dedicada a la Agricultura temporalera. Por último se tienen pequeñas áreas dispersas de pastizal inducido (INAFED, 2016).

7.2 COLECTA DE MURCIÉLAGOS

Se realizaron 10 salidas de campo en el transcurso de Enero del 2015 a Enero del 2016. Siguiendo las recomendaciones de Varella-Garcia y Taddei (1989), se colocaron redes de niebla de 9 m de largo en un periodo de 7 horas (desde el amanecer y hasta el mediodía, y desde el atardecer hasta la media noche) en la entrada de las cuevas cercanas a la localidad de Santo Domingo Huehuetlán El Grande (18° 45' 32.9" N, 98° 10' 25" O) siendo revisadas cada media hora (Figuras 6 y 7). Ocasionalmente y de forma directa, se utilizaron redes de golpe tomando las precauciones necesarias para evitar la exposición a Histoplasmosis.

Los murciélagos se retiraron cuidadosamente de las redes protegiendo las manos del colector con guantes de carnaza y colocándolos en bolsas de manta para su posterior identificación taxonómica con base en los caracteres morfológicos y morfométricos señalados por Álvarez-Castañeda *et al.* (2015). Los organismos fueron transportados al Laboratorio de Mastozoología de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el procesamiento se realizó siguiendo los métodos éticos recomendados por el "Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists" (Sikes *et al.*, 2011).

El permiso bajo el cual se realizó la colecta es el NUM. SGPA/DGVS/09236/14 concedido por la SEMARNAT a la M. en C. Rosa María González Monroy.



Figura 6. Entrada a las cuevas de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.



Figura 7. Ejemplares de *Choeronycteris mexicana* encontrados en las cuevas.

7.3 TRABAJO DE LABORATORIO

A los ejemplares capturados se les aplicó la técnica de extracción de médula ósea de Baker *et al.* (1982); Baker y Qumsiyeh (1988); y Baker *et al.* (2003) con modificaciones para la obtención de los cromosomas.

Una vez tomado el peso, a los ejemplares se les inyectó Colchicina de forma intraperitoneal a una concentración de 0.004% (0.1 ml por cada 10 gr de peso) para interferir con la formación del huso acromático durante la mitosis, acumulando células en metafase (Tolliver y Robbins, 1991; Figura 8). Se dejó actuar 30 minutos y posteriormente los organismos fueron sacrificados por medio de dislocación cervical. Se tomaron las medidas longitud total, longitud de oreja, longitud de pata, longitud de cola, se identificó el sexo e inmediatamente después se extrajeron los fémures, húmeros y radios para obtener la mayor cantidad de material celular. Una vez que se extrajeron las piezas óseas, se cortó la epífisis de sus extremos. Con una jeringa de 3 ml, se extrajo la médula ósea y se depositó en tubos para centrifuga previamente incubados con solución hipotónica de KCl 0.075 M (Figura 9). La solución se resuspendió suavemente hasta que se produjo una suspensión celular homogénea y se dejó incubar por 30 minutos a 37° C. El material celular se centrifugo después durante 8 minutos a 800 rpm (Figura 10). A continuación se eliminó la mayor parte del sobrenadante dejándolo en la misma proporción que el paquete celular y se agregó fijador Carnoy recién preparado (metanol-ácido acético en proporción 3:1) por las paredes del tubo hasta un volumen de 4 ml para fijar las células sin deshidratarlas y eliminar a la vez residuos citoesqueléticos (Carvajal *et al.*, 2011; Figura 11), dejándolo después en el congelador a 4°C por 24 horas.



Figura 8. Inyección intraperitoneal con Colchicina.

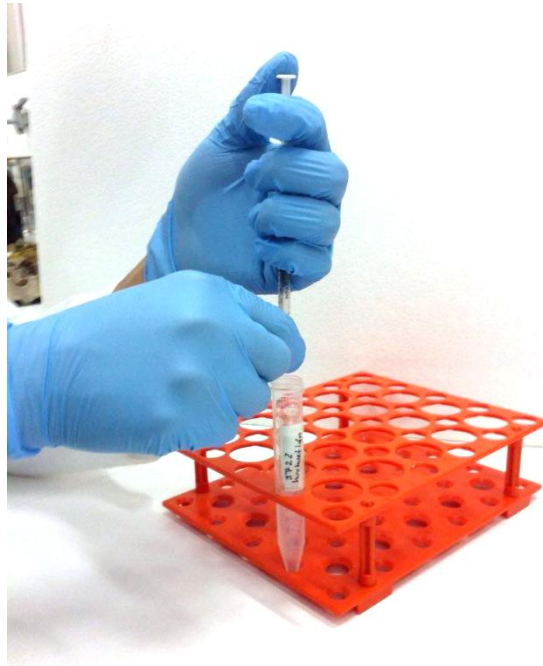


Figura 9. Extracción y depósito de médula ósea en solución KCl.



Figura 10. Centrifugado de la muestra.

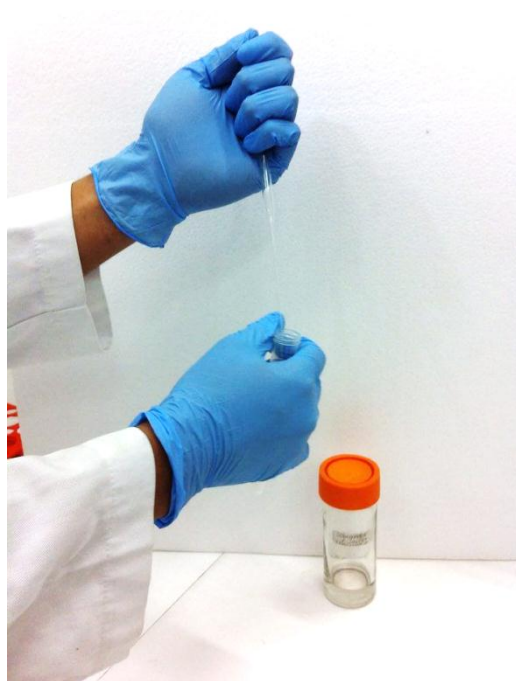


Figura 11. Adición del fijador Carnoy.

7.4 ELABORACIÓN DE LAMINILLAS Y TINCIÓN CONVENCIONAL

La muestra se centrifugó nuevamente durante 8 minutos a 800 rpm y se resuspendió una vez más en fijador Carnoy con una pipeta Pasteur hasta que la solución se observará blanquecina. Posteriormente, se tomó una pequeña cantidad de material celular con una pipeta Pasteur y se dejaron caer tres gotas a una altura de 200 cm sobre un portaobjetos colocado a 45° de inclinación previamente inmerso en alcohol frío. Inmediatamente se le aplicó aire comprimido para expandir el material y obtener mejores campos mitóticos. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente y se tiñeron con colorante Giemsa 1:50 durante 7 minutos, enjuagando después con agua destilada para retirar el exceso de colorante (Figura 12).



Figura 12. Tinción convencional con colorante de Giemsa.

7.5 BANDEO CROMOSÓMICO G

Se realizó la técnica de Grouchy y Turleau (1977); Patton y Baker (1978) utilizando laminillas con campos mitóticos definidos las cuales fueron desteñidas y se colocaron en una estufa de cultivo a 65°C durante 13 horas para endurecer a los cromosomas y obtener mejores bandas cromosómicas.

Posteriormente, las laminillas se sacaron de la estufa dejándolas enfriar a temperatura ambiente. Después, se sumergieron en un vaso Coplin con solución de Tripsina Difco 0.025% entre un periodo de 60 a 70 segundos para poder desnaturalizar las proteínas contenidas en los cromosomas. Inmediatamente se sumergieron diez veces en dos vasos Coplin con PBS (el primero para inactivar y el segundo para eliminar el exceso de Tripsina; Figura 13).

Las preparaciones fueron teñidas según Seabright (1971) durante 6 minutos en Buffer de Giemsa al 2% en un vaso Coplin donde se agito vigorosamente para producir espuma y así permitir una mejor tinción.

Una vez teñidas, las preparaciones se enjuagaron por unos instantes en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Estas fueron revisadas con un microscopio óptico usando filtros de color amarillo y verde colocados sobre el foco del microscopio para tener mejor contraste en las bandas y se fotografiaron los mejores campos con una cámara digital SONY Cybershot de 8.1 Megapixeles. Las fotografías fueron editadas con el software Adobe Photoshop CS6 y posteriormente se imprimieron en papel fotográfico de alta resolución.

El cariotipo de bandas cromosómicas G se construyó ordenando a los autosomas y cromosomas sexuales por pares homólogos de acuerdo a su longitud, morfología y número de bandas.

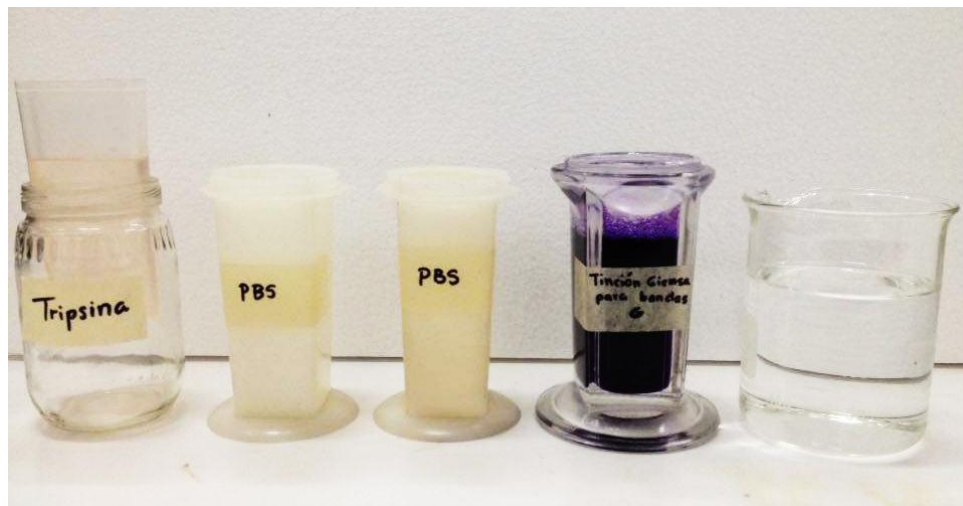


Figura 13. Tratamiento para bandas cromosómicas G.

7.6 BANDEO CROMOSÓMICO C

Para la elaboración de bandas cromosómicas C se realizó la técnica descrita por Summer (1972). Las laminillas se sumergieron en un vaso Coplin con solución de HCl 0.2 N durante 15 minutos para remover proteínas.

Posteriormente, se introdujeron en un vaso Coplin con solución saturada de Hidróxido de Bario a 45°C durante 120 segundos para disociar la eucromatina. Después se colocaron nuevamente en HCl 0.2 N durante cinco segundos y se lavaron tres veces en agua destilada, dejando secar a temperatura ambiente (Figura 14).

Las preparaciones se colocaron en una cámara húmeda (Caja Petri con dos hojas de papel filtro, solución de 2XSSC pH 0.7 y dos tapones de plástico como soporte) verificando que tuvieran suficiente solución de 2XSSC para que no se secan. Con una pipeta Pasteur se agregaron ocho gotas de 2XSSC donde se encontraban los campos más definidos y se dejó caer encima un cubreobjetos en cada laminilla, incubando inmediatamente a 65°C durante 13 horas (Figura 15).

Pasado este tiempo, las preparaciones se sacudieron para retirar los cubreobjetos, enjuagando posteriormente con agua destilada tres veces y dejándolas secar. Después se sumergieron las laminillas en un vaso Coplin que contenía alcohol al 70% durante cinco minutos, se sacaron y se sumergieron en otro vaso Coplin con alcohol al 96% también durante cinco minutos para evitar la formación de cristales. Se dejaron secar y se tiñeron con Buffer Giemsa al 4% durante 8 minutos, enjuagando en agua destilada y dejando secar a temperatura ambiente.

Los campos cromosómicos fueron analizados en un microscopio óptico con filtros verde y amarillo para obtener un mejor contraste. Los mejores campos fueron fotografiados con una cámara digital SONY Cybershot de 8.1 Megapíxeles. Las fotografías se imprimieron, recortando y ordenando a los autosomas por pares homólogos, morfología y tamaño decreciente.

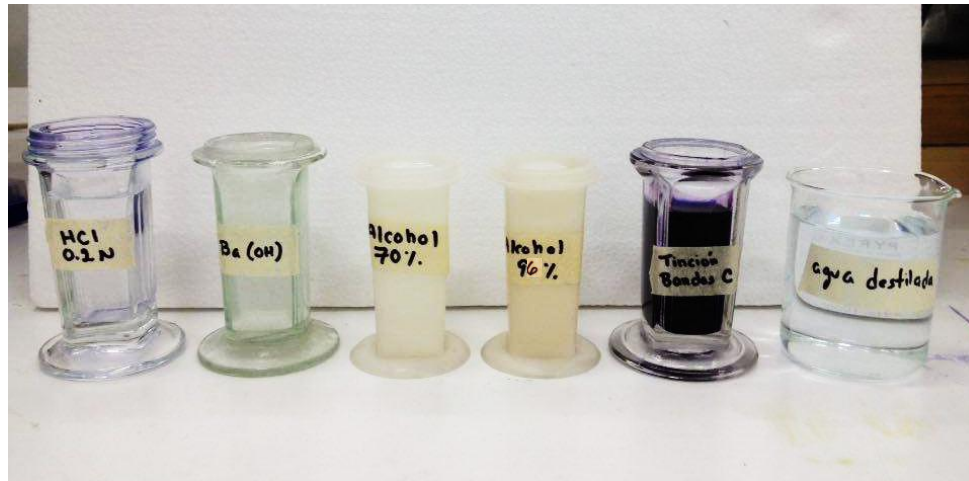


Figura 14. Tratamiento para bandas cromosómicas C.



Figura 15. Cámaras húmedas en estufa de cultivo.

7.7 ANÁLISIS DE DATOS Y OBTENCIÓN DEL CARIOTIPO

Las preparaciones fueron revisadas en un microscopio óptico Leica y con objetivos de 10X, 40X y 100X. Las mejores dispersiones cromosómicas fueron digitalizadas con una cámara SONY Cybershot de 8.1 Megapixeles y las imágenes fueron editadas usando el programa Adobe Photoshop CS 6.01. El número diploide se consideró contando los cromosomas sobre las imágenes y se imprimieron las mejores fotografías en papel fotográfico de alta resolución, y se recortaron los cromosomas ordenándolos por pares homólogos del más grande al más pequeño

para poder medir el brazo corto (p) y brazo largo (q) con un vernier digital Mitutoyo, y obtener el promedio \pm desviación estándar. El número fundamental se determinó contando el número de brazos de los autosomas.

El cariotipo se construyó considerando el índice centromérico con las siguiente fórmula de Levan *et al.* (1964):

$$IC = \frac{p}{p + q} \times 100$$

Dónde:

IC= índice centromérico

q= brazo largo

p= brazo corto

Los ideogramas en mitosis se trazaron con el programa Corel Draw X7 basado en las longitudes promedio en mm de p y q de cada par cromosómico, el número de bandas de eucromatina y la localización de heterocromatina constitutiva.

8. RESULTADOS

Se colectaron 12 ejemplares machos de la especie *Choeronycteris mexicana* y se obtuvieron 23 laminillas con un total de 423 campos mitóticos. Solo se fotografiaron las mejores dispersiones cromosómicas obteniendo un total de 53 metafases. Del análisis anterior, se encontró un número diploide de 16 y un número fundamental de 24.

8.1 CARIOTIPO CONVENCIONAL

Con base en las longitudes promedio, la longitud total y el índice centromérico, se estableció que el cariotipo metafásico de *Choeronycteris mexicana* está constituido por cinco pares de cromosomas birrámeos y dos pares monorrámeos, de los cuales un par es metacéntrico, tres pares son submetacéntricos, un par es subtlocéntrico y dos pares son telocéntricos. El cromosoma sexual X es metacéntrico y el Y es telocéntrico (Figuras 16 y 17; Tabla 1).

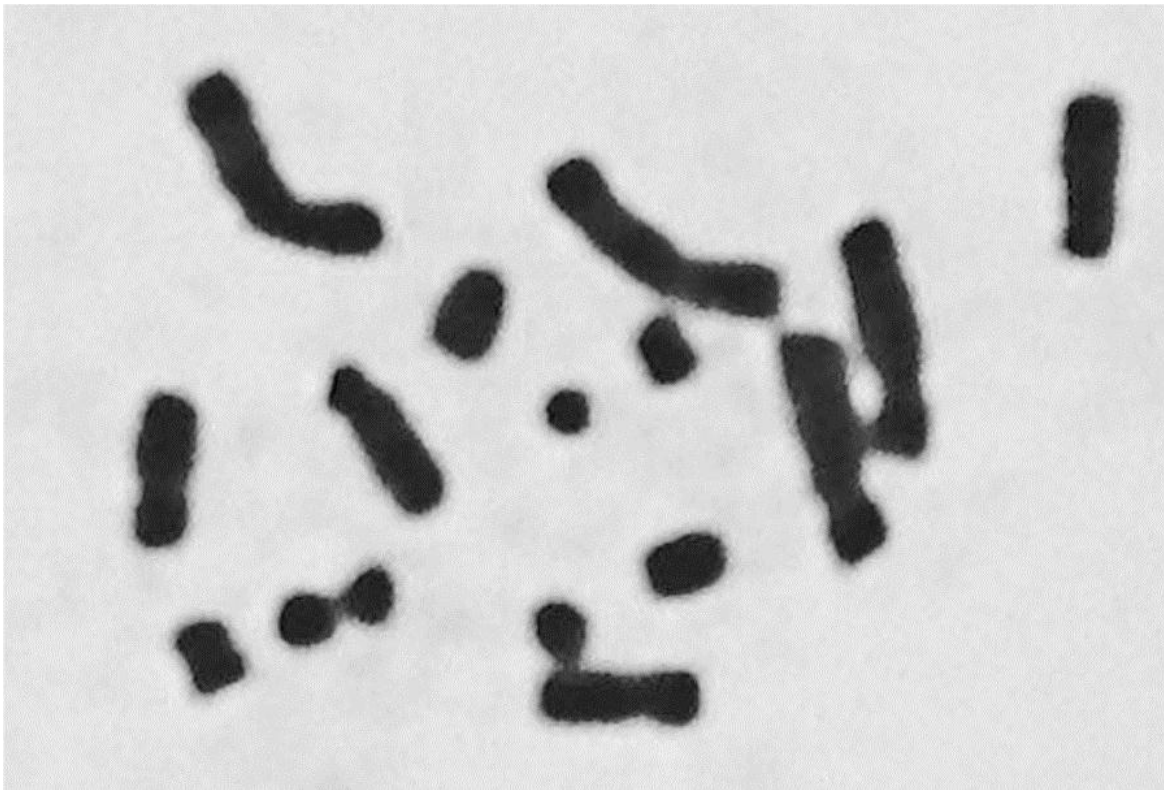


Figura 16. Campo mitótico de *Choeronycteris mexicana* (macho) de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.

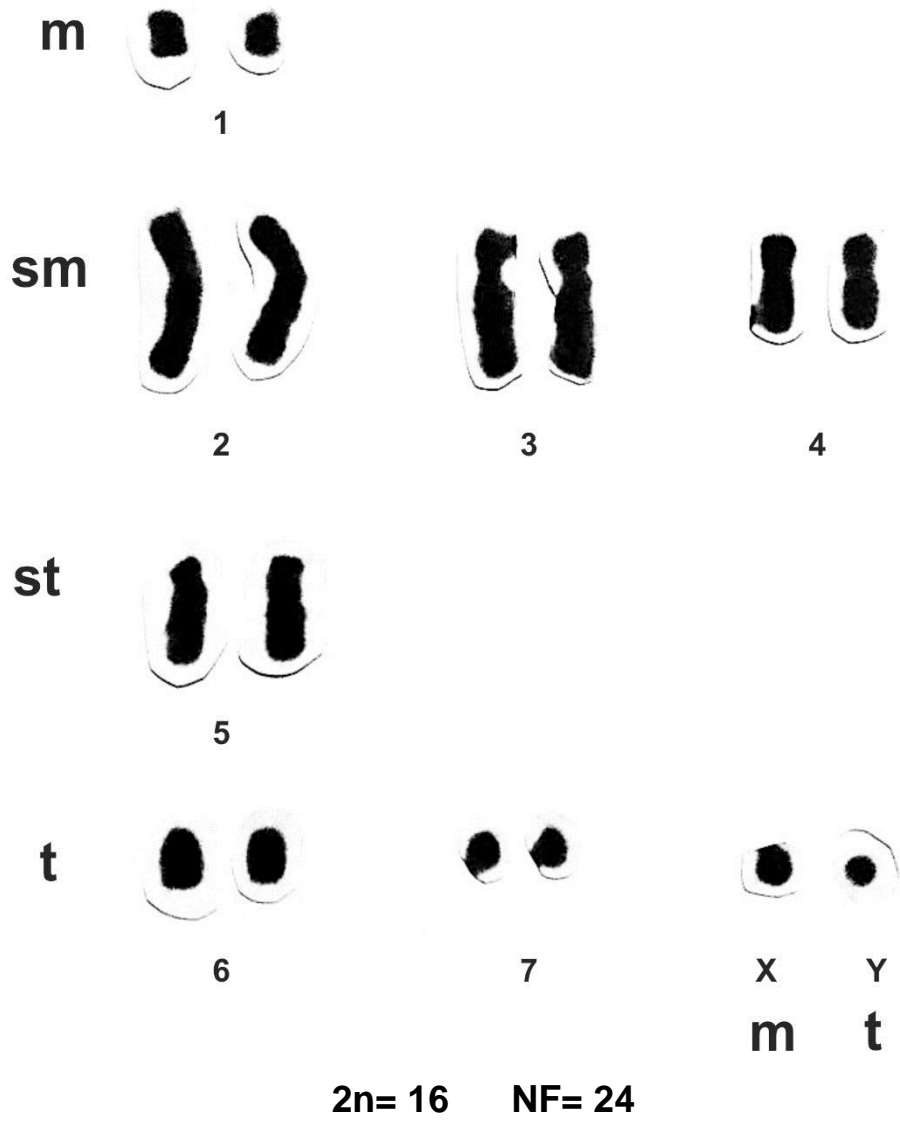


Figura 17. Cariotipo convencional de *Choeronycteris mexicana* (macho) de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.

Dónde:

- m = metacéntrico
- sm= submetacéntrico
- st= subtlocéntrico
- t= telocéntrico
- X = cromosoma sexual X
- Y= cromosoma sexual Y
- 2n= número diploide
- NF= número fundamental

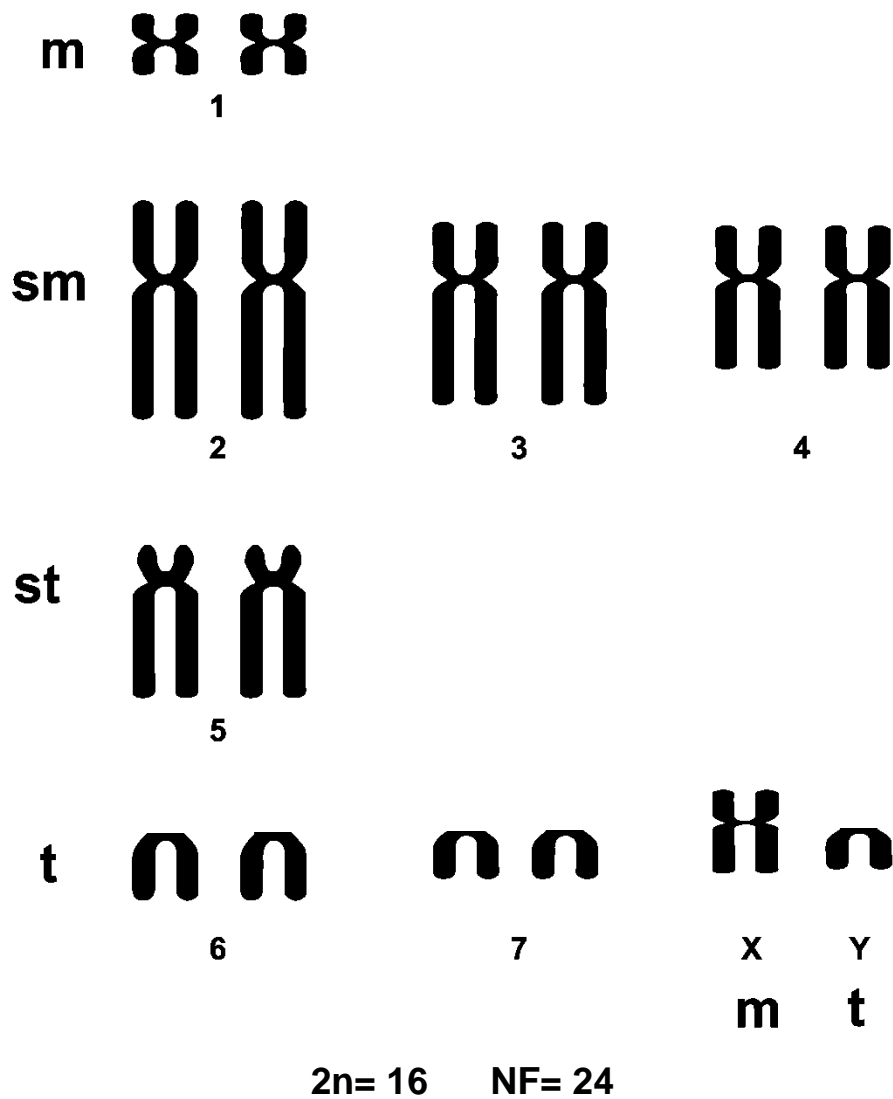


Figura 18. Ideograma de *Choeronycteris mexicana* (macho) de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.

Dónde:

- m = metacéntrico
- sm = submetacéntrico
- st = subtelocéntrico
- t = telocéntrico
- X = cromosoma sexual X
- Y = cromosoma sexual Y
- 2n = número diploide
- NF = número fundamental

El índice centromérico y las longitudes de cada uno de los pares cromosómicos de *Choeronycteris mexicana* de Santo Domingo Huehuetlán El Grande se aprecian en el cuadro 1. Las medidas variaron desde el par dos como el de mayor longitud con 21.62 mm y hasta el cromosoma Y como el más pequeño con 4.61 mm, obteniéndose tres pares birrámeos grandes, un par birrámeo mediano, dos pares birrámeos pequeños, un par monorrámeo grande y un par monorrámeo pequeño. Tanto el cromosoma sexual X (birrámeo) como Y (monorrámeo) son de tamaño pequeña.

Cuadro 1. Índice centromérico del cariotipo de *Choeronycteris mexicana* (macho) de Santo Domingo Huehuetlán el Grande, Puebla.

Par	Xp ± D.E. (mm)	Xq ± D.E. (mm)	Longitud total $p + q$ (mm)	ic	Clasificación (Levan <i>et al.</i> , 1964)
1	2.84±0.31	3.20±0.43	6.05	46.99	m
2	7.91±2.32	13.70±1.51	21.62	36.62	sm
3	5.62±0.84	12.14±1.94	18.10	32.93	sm
4	5.30±1.49	8.91±2.34	14.21	37.29	sm
5	3.77±0.95	11.43±1.37	15.21	24.83	st
6	-	7.68±.144	7.68	0.00	t
7	-	5.23±0.74	5.23	0.00	t
X	2.42±0.35	3.58±0.68	6.01	40.29	m
Y	-	4.61±0.62	4.61	0.00	t

Dónde:

Xp = longitud promedio brazo corto

Xq = longitud promedio brazo largo

D.E.= desviación estándar

ic= índice centromérico

m= metacéntrico

sm= submetacéntrico

st= subtlocéntrico

t= telocéntrico.

X= cromosoma sexual X

Y= cromosoma sexual Y

8.2 BANDAS CROMOSÓMICAS G

Se usaron 5 laminillas con 53 campos para aplicar el tratamiento de bandas cromosómicas G, obteniendo un total de 14 campos mitóticos definidos. Se identificaron en los cromosomas birrámeos de una a dos bandas oscuras de eucromatina en el brazo corto y de dos a cuatro bandas en el brazo largo, de una a dos bandas en el único brazo de los dos pares de cromosomas monorrámeos y una sola banda en el brazo largo de los cromosomas sexuales X y Y (Figura 19 y 20).

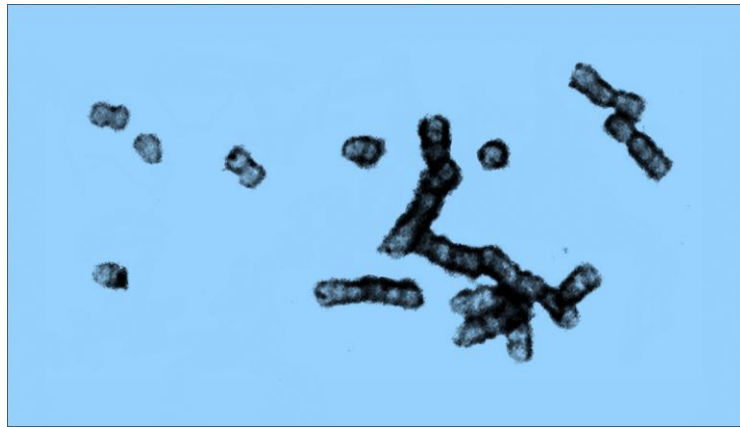


Figura 19. Campo mitótico con bandas cromosómicas G de *Choeronycteris mexicana* (macho) de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.

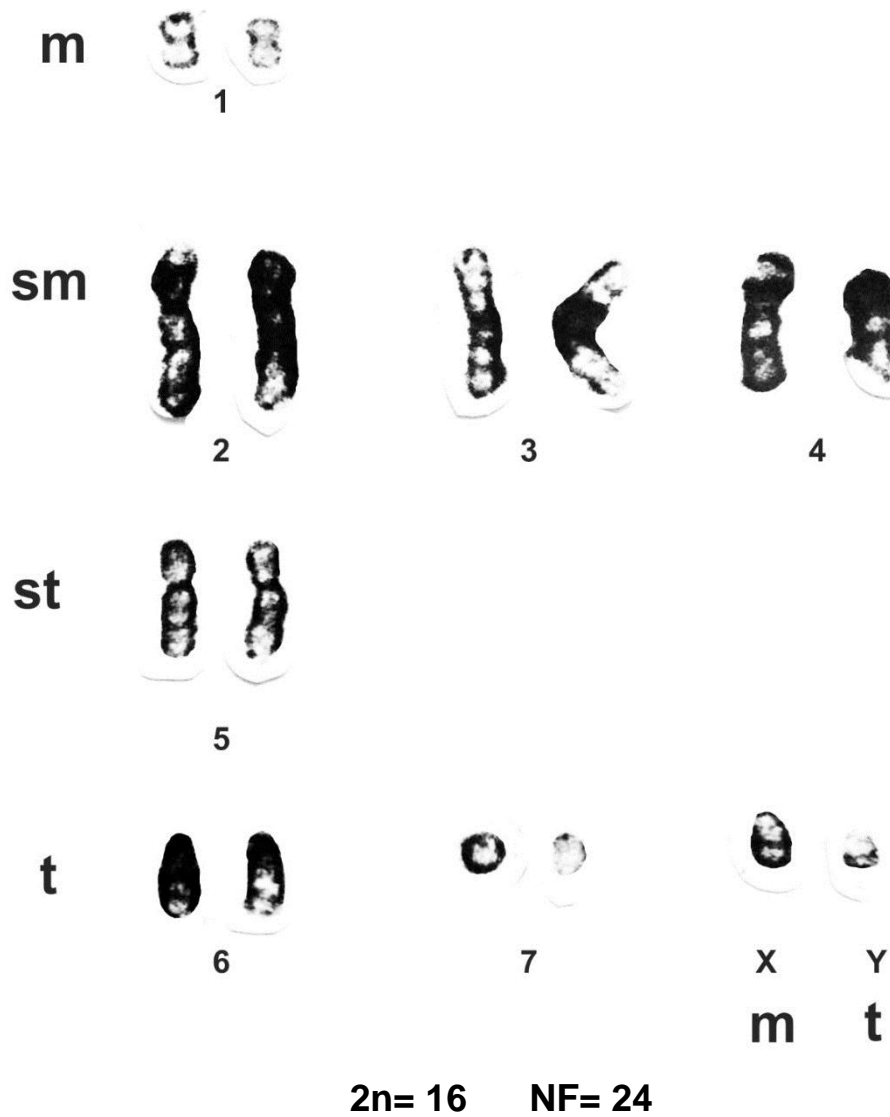


Figura 20. Cariotipo con tratamiento de bandas cromosómicas G de *Choeronycteris mexicana* macho de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.

Dónde:

- m = metacéntrico
- sm= submetacéntrico
- st= subtelocéntrico
- t= telocéntrico
- X = cromosoma sexual X
- Y= cromosoma sexual Y
- 2n= número diploide
- NF= número fundamental

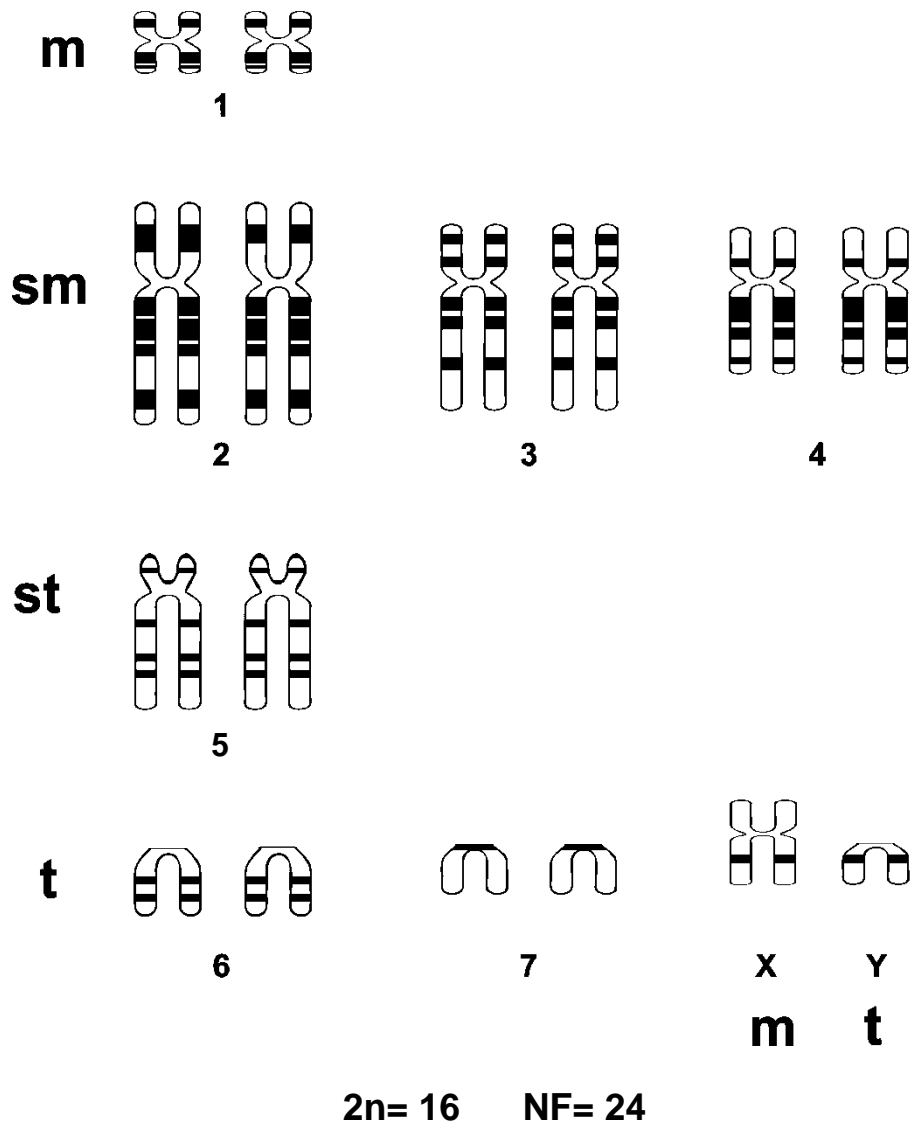


Figura 21. Ideograma con bandas cromosómicas G de *Choeronycteris mexicana* (macho) de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.

Dónde:

- m = metacéntrico
- sm= submetacéntrico
- st= subtelocéntrico
- t= telocéntrico
- X = cromosoma sexual X
- Y= cromosoma sexual Y
- 2n= número diploide
- NF= número fundamental

8.3 BANDAS CROMOSÓMICAS C

Se utilizaron cinco laminillas para el tratamiento de bandas cromosómicas C, obteniendo un total de ocho campos mitóticos. La Heterocromatina constitutiva se localizó en mínima proporción en los autosomas y cromosomas sexuales X y Y (Figura 22 y 23).

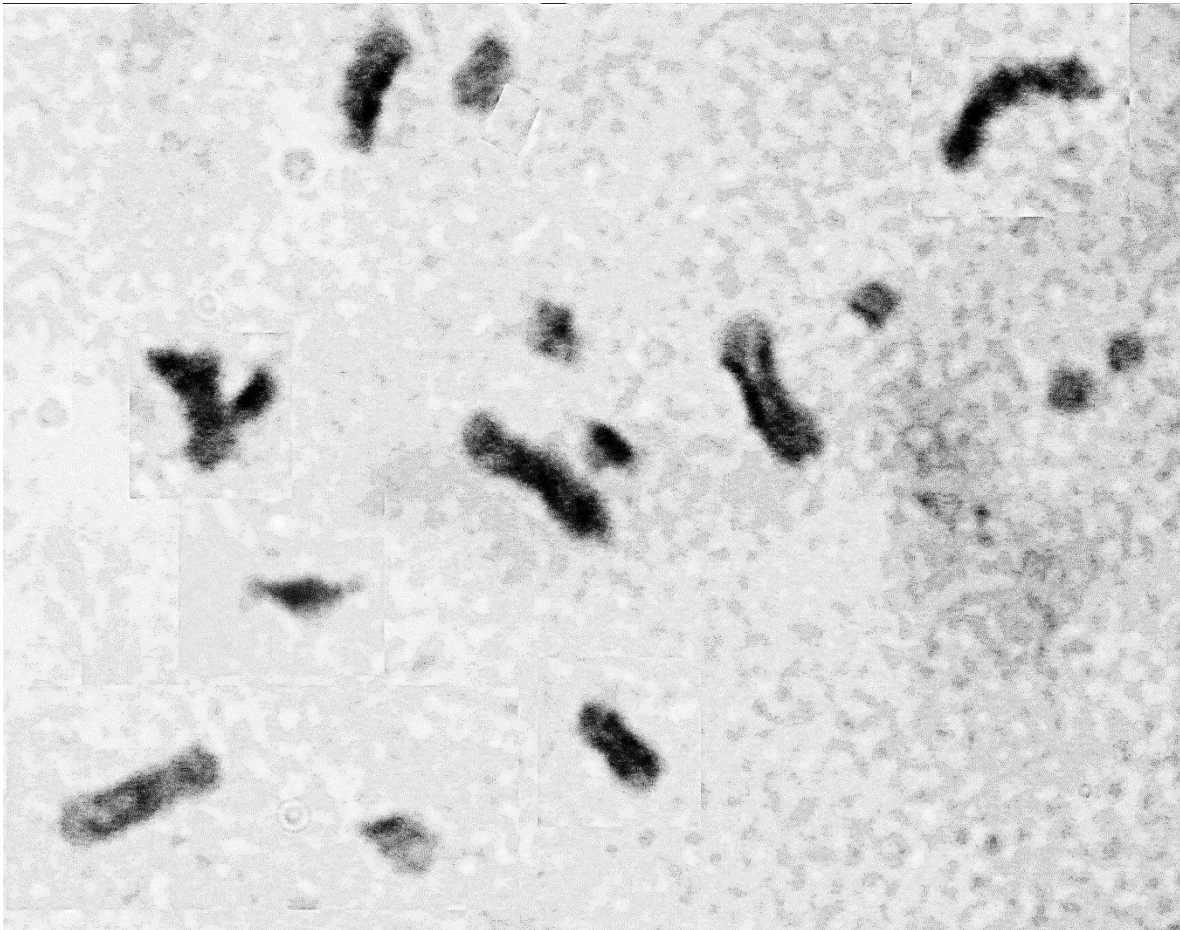


Figura 22. Campo mitótico con bandas cromosómicas C de *Choeronycteris mexicana* (macho) de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.

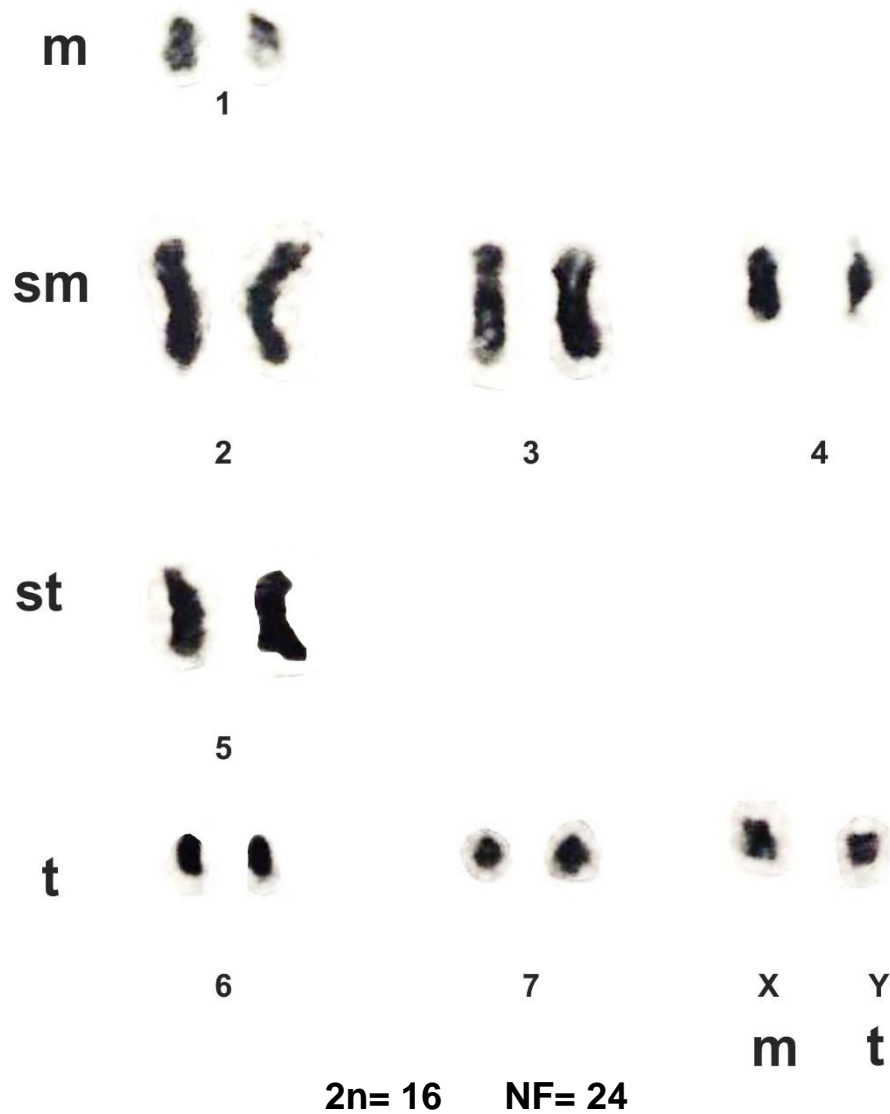


Figura 23. Cariotipo con tratamiento de bandas cromosómicas C de *Choeronycteris mexicana* (macho) de Santo Domingo Huehuetlán El Grande.

Dónde:

- m = metacéntrico
- sm = submetacéntrico
- st = subtelocéntrico
- t = telocéntrico
- X = cromosoma sexual X
- Y = cromosoma sexual Y
- 2n = número diploide
- NF = número fundamental

9. DISCUSIÓN

En este estudio, *Choeronycterys mexicana* de Santo Domingo Huehuetlán El Grande presenta un número diploide de 16 y un número fundamental de 24. Autores como Osborne (1965), Baker (1967), Hsu *et al.*, (1968), Baker (1973), y Haiduk y Baker (1982), reportaron un número diploide y número fundamental similar para las localidades de Pima Co., Arizona, Estados Unidos de América y Teloloapan, Guerrero y Álamos, Sonora, México respectivamente (Cuadro 2). Estos trabajos consideraron a todos los cromosomas como autosomas ya que no fue posible determinar a los cromosomas sexuales, por lo que consideraron un número fundamental de 24-26, similar al del presente estudio.

La morfología cromosómica observada para todos los organismos analizados en este trabajo consta de un par metacéntrico, tres pares submetacéntricos, un par subtlocéntrico y dos pares telocéntricos. Como se muestra en el cuadro 2, se observó el aumento de un par submetacéntrico y la disminución de un par metacéntrico y un par subtlocéntrico. Posiblemente estas diferencias no son reales ya que analizando y comparando visualmente los cariotipos reportados, la morfología cromosómica reportada por Osborne (1965) y Baker (1967) es probablemente diferente.

Cuadro 2. Trabajos citogenéticos realizados con *Choeronycteris mexicana*.

Localidad	2n	NF	m	sm	st	t	X	Y	Autores
Pima Co., Arizona, Estados Unidos.	16	26	2	2	2	2			Osborne, 1965
Teloloapan, Guerrero.	16	24-26	2	2	2	2			Baker, 1967
Teloloapan, Guerrero.	16								Hsu <i>et al.</i> , 1968
No determinada	16	24					sm	sm	Baker, 1973
Álamos, Sonora.	16								Haiduk y Baker, 1982
Presente estudio: Huehuetlán El Grande, Puebla.	16	24	1	3	1	2	m	t	Calvario, 2016

2n= número diploide cromosómico

NF= número fundamental

m= metacéntrico

sm= submetacéntrico

st= subtlocéntrico

t= telocéntrico

M= número de machos

H= número de hembras.

Baker (1973) reportó la morfología de los cromosomas sexuales de *Choeronycteris mexicana*, siendo tanto el cromosoma X como Y submetacéntricos. Estos resultados difieren con la morfología de los cromosomas sexuales de *Choeronycteris mexicana* de Santo Domingo Huehuetlán El Grande, donde el cromosoma X es metacéntrico y el Y es telocéntrico. En este caso existe posiblemente una pérdida de material cromosómico en el cromosoma sexual Y, específicamente entre el brazo corto y una posible adición en el brazo corto del cromosoma X. Cambios en la morfología de los cromosomas sexuales ya han sido reportados entre poblaciones de *Artibeus intermedius* de la misma localidad del presente estudio y poblaciones del Estado de Chiapas, así como entre *Sturnira hondurensis* de Huehuetlán El Grande y poblaciones del Estado de Michoacán,

Nayarit, México y Texas, Estados Unidos de América (Aguilera-Miller, 2008; Cruz, 2015).

Por otra parte, la técnica de bandeo cromosómico G reveló cinco bandas de eucromatina en los pares uno y dos, difiriendo con respecto a las siete bandas reportadas en esos pares cromosómicos en la localidad de Álamos, Sonora (Haiduk y Baker, 1982), sugiriendo la presencia de dos inversiones paracéntricas mientras que el resto de los pares cromosómicos no mostraron cambios en los patrones de bandas. En cuanto a la heterocromatina constitutiva, esta se localiza en mínima proporción en el centrómero de todos los autosomas y los cromosomas sexuales X y Y.

Reordenamientos como inversiones cromosómicas ya han sido reportadas en especies de quirópteros de la subfamilia Glossopahinae como *Hylonycteris underwoodi*, *Musoycteris harrisoni*, y propiamente en *Choeronycteris mexicana*, así como en el cariotipo de quirópteros de la familia Vespertilionidae como *Lasiurus ega* y *Lasiurus intermedius* (Bickham, 1987; Haiduk y Baker, 1982).

Generalmente, la tasa de inversiones es muy baja en comparación a reordenamientos Robertsonianos, como fusiones y fisiones, que son los más comunes dentro de la variación cariotípica de los quirópteros. A pesar de esto, se sabe que los primeros tienen una incuestionable importancia en la evolución cromosómica de los mamíferos (Capanna y Civitelli, 1970; Bush *et al.*, 1977).

A diferencia de otros mamíferos como los roedores, los quirópteros presentan una baja tasa de cambios cromosómicos en su cariotipo (Baker, 1970; Burt, 2001; Zima, 2000). Sin embargo, trabajos previos han reportado variación cromosómica en el número diploide, número fundamental y morfología cromosómica de especies de la familia Phyllostomidae como: *Macrotus waterhoussii*, *Mycronycteris hirsuta*, *Vampyressa pusilla* y *Uroderma bilobatum* (Baker, 1970; Baker, 1979).

En el caso de *Choeronycteris mexicana*, se sabe que el matorral desértico donde habita está bajo presión por destrucción y fragmentación provocada por la extracción ilegal de cactáceas, expansión poblacional y agrícola como son la

deforestación y el pastoreo, provocando como consecuencia la formación de islas con considerables efectos sobre la población (Gómez-Nisino, 2006). Probablemente este factor junto a otros como el clima y las barreras geográficas, estén influyendo en la morfología cromosómica y provocando un aislamiento genético en la población de la localidad de Santo Domingo Huehuetlán El Grande. Por tanto, esta especie pueda estar pasando por un proceso de especiación similar a la de *Artibeus intermedius* y *Sturnira hondurensis* de la misma localidad de estudio.

Para comprobar esta hipótesis es necesario realizar más estudios ya que el problema de la evolución, por su complejidad, trasciende el marco de la citogenética y debe ser abordado desde distintos frentes: ecológico, genético, bioquímico, citológico, morfológico y paleontológico (Pérez-Suárez *et al.*, 1991).

10. CONCLUSIONES

- El número diploide para *Choeronycteris mexicana* de la localidad de Santo Domingo Huehuetlán El Grande es $2n=16$ y el NF= 24.
- La morfología cromosómica consta de un par metacéntrico, tres pares submetacéntricos, un par subtelocéntico y dos pares telocéntricos. El cromosoma sexual X es submetacéntrico y el Y es telocéntrico
- Todos los cromosomas birrámeos presentan de tres cinco bandas de eucromatina, los monorrámeos de una a dos bandas y los cromosomas X y Y una única banda.
- La heterocromatina constitutiva de los autosomas y los cromosomas sexuales se localiza en el centrómero en mínima proporción.

11. PROPUESTAS

- a) Realizar técnicas de citogenética molecular como FISH para visualizar los reordenamientos involucrados en los cromosomas sexuales ya que estos son muy similares en morfología a los autosomas.
- b) Realizar estudios citogenéticos con *Choeronycteris mexicana* en las poblaciones del norte y otras zonas de distribución geográfica como Guerrero para analizar la variación cariotípica de la especie.
- c) Realizar estudios morfométricos craneales.
- d) Utilizar métodos moleculares como secuenciación de ADN, PCR y electroforesis para determinar que genes están involucrados en los reordenamientos cromosómicos.
- e) Realizar estudios meióticos para estudiar el aislamiento genético de las poblaciones y fertilidad de los organismos.

12. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera-Miller, E. F. 2008. Análisis Cromosómico de *Artibeus intermedius* de Santo Domingo Huehuetlán El Grande, Puebla. Laboratorio de Mastozoología. Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, 38 pp.

Álvarez-Castañeda, S. T., Álvarez, T. y González-Ruiz, N. 2015. Guía para la identificación de los mamíferos de México en campo y laboratorio. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C - Asociación Mexicana de Mastozoología A. C. 300 pp.

Álvarez, T. L. G. Q. y González, L. 1970. Análisis polínico del contenido gástrico de murciélagos Glossophaginae de México. In *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, Vol. 18: 137-165.

Arroyo-Cabrales, J., Hollander, R. R. y Jones, J. K. 1987. *Choeronycteris mexicana*. *Mammalian Species* 291:1-5.

Baker, R. J. 1967. Karyotypes of bats of the family Phyllostomidae and their taxonomic implications. *The Southwestern Naturalist*: 407-428.

Baker, R. J. 1970. Karyotypic trends in bats. *Biology of bats*, 1: 65-96.

Baker, R. J. 1973. Comparative cytogenetics of the New World leaf-nosed bats (Phyllostomatidae). *Periodicum Biologorum* 75: 37-45.

Baker, R. J. 1979. Karyology. En *Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae*, Part III. (Baker, R. J., Jones, J. K. Jr. y Carter, D. C.) *Special Publications of the Museum of Texas Tech University* 16: i+1-441.

Baker, R. J., Haiduk, M., Robbins, L. W., Cadena, A. y Koop, B. 1982. Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications. En *Mammalian biology in South America* (Mares, M. A. y Genoways, H. H.). Special Publication Series, Pymatuning Laboratory of Ecology VI: 303-327.

Baker, R. J., y Qumsiyeh. M. B. 1988. *Methods in chiropteran mitotic chromosomal studies. Ecological and behavioral methods for the study of bats.* Smithsonian Inst. Press: 425-435.

Baker, R. J., Hamilton, M. y Parish, D. A. 2003. Preparations of mammalian karyotypes under field conditions. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University* 228: i+1-8.

Boveri, Th. 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh. Phys-med. Ges.* 35: 67-90.

Bush, G. L., Case, S. M., Wilson, A. C., y Patton, J. L. 1977. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 3942-3946.

Burt, D. W. 2001. Chromosome rearrangement in evolution. *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-5.

Capanna, E. y Civitelli, M. V. 1970. Chromosomal mechanisms in the evolution of Chiropteran karyotype chromosomal tables of Chiroptera. *Caryologia*, 23: 79-111.

Carvajal, M. J., Nates-Parra, G. y Burbano, M. C. 2011. Fijación Carnoy, una técnica para obtención de cromosomas en Himenóptera. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 3: 15-20.

Castro-Luna, A. A., y Galindo-González, J. 2009. Murciélagos en el México de Ayer y Hoy. *La Ciencia y el Hombre*, 22: 53-56.

Ceballos, G. 2014. *Mammals of Mexico*. John Hopkins University Press, Baltimore. 957 pp.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2011. *La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado*. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 440 pp.

Cruz, P. V. 2015. Análisis Cromosómico del Murciélago *Sturnira hondurensis* de Huehuetlán El Grande, Puebla. Laboratorio de Mastozoología. Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, 45 pp.

Cryan, P. M. y Bogan, M. A. 2003. Recurrence of Mexican long-tongued bats (*Choeronycteris mexicana*) at historical sites in Arizona and New Mexico. *Western North American Naturalist*: 314-319.

Drets, M. E. 2002. Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeo cromosómico. Significado y proyección bio-médica. *Revista Médica del Uruguay*, 18: 107-121.

GenomaSur. 2016. División celular. Guía temática de Biología. V (12b) (en línea). Disponible en Web: <http://genomasur.com/lecturas/Guia12b.htm>

Gomez-Nisino, A. 2006. Ficha técnica de *Choeronycteris mexicana*. En Medellín, R. (compilador). *Los mamíferos mexicanos en riesgo de extinción según PROY-NOM-059-ECOL-2000*. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W005. México, D.F., pp. 1-5.

Grouchy, J. de, y Turleau, C. 1977. Atlas des maladies chromosomiques. Expansion Scientifique, París. 356 pp.

Haiduk, M. W. y Baker, R. J. 1982. Cladistical analysis of the G-banded chromosomes of nectar-feeding bats. (Glossophaginae: Phyllostomidae). Systematic Zoology 31: 252-265.

Hall, E. R. 1981. The mammals of North America. Nueva York. 128 pp.

Hsu, T. C., Baker, R. J. y Utakoji, T. 1968. The multiple sex chromosome system of American leaf-nosed bats (Chiroptera, Phyllostomidae). Cytogenetic and Genome Research, 7: 27-38.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Huehuetlán el Grande, clave geoestadística 21150: 1-9.

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Sistema Nacional de Información Municipal. 2016. Enciclopedia de Municipios (en línea). Disponible en Web:

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/index.html>

Kays, R. y Wilson, D. 2002. Mammals of North America. Princeton, NJ: Princeton University Press. 816 pp.

King, M. 1987. Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. Heredity, 59: 1-6.

Lacadena, J. R. 1996. Citogenética. Editorial Complutense, Madrid. 245 pp.

Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

Levitsky, G. A. 1924. The material basis of heredity. Kiev: State Publication Office of the Ukraine. 295 pp.

Lomanto D., Ortiz C., Bretón P., Gómez L. y Mesa C. 2003. El ciclo celular. *MedUNAB*, 6: 21-29.

Molist, P., Pombal, M. A. y Megías, M. 2015. Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas Histológicas. Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud Facultad de Biología Universidad de Vigo. 58 pp.

Moore, C. y Best, R. 2001. Chromosome Preparation and Banding. *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-7.

Osborne, J. L. 1965. Karyotypes of selected bats (order Chiroptera). Tesis profesional de maestría. Departamento de Zoología, Universidad de Arizona, Arizona, 57 pp.

Patton, J. C. y Baker, R.J. 1978. Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoids bats. *Systematic Zoology*. 27: 449-462.

Pérez-Suárez, G., Reina, J. M., Navlet, J., De Paz, O. y López-Caballero, E. J. 1991. Citogenética de quirópteros en la península ibérica. En *Los murciélagos de España y Portugal*. (Benzal, J. y De Paz, O.) Colección técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Madrid, pp 305-330.

Piñero, D., Caballero-Mellado, J., y Cabrera-Toledo, D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la

biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México*, 1: 437-494.

Puentes-Martínez, J. 2000. *Citogenética de la biodiversidad animal*. Universidad Nacional Abierta y A Distancia, Bogotá D. C. 162 pp.

Roca, M. A. 2008. *Citogenética*. Universidad de Oviedo. Departamento de Biología, área de Genética, España. 112 pp.

Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*, 298: 971-972.

SEMARNAT. 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación (Segunda Sección)*: 1-77.

Sikes, R. S., Gannon, W. L. y the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92: 235-253.

Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental cell research*, 75: 304-306.

Sutton, W. S. 1902. On the morphology of the chromosome group in *Brachystola magna*. *The Biological Bulletin*. 4: 24-39.

Sutton, W. S. 1903. The chromosomes in heredity. *The Biological Bulletin*, 4: 231-250.

Tolliver, D. K. y Robbins, L. W. 1991. Techniques in karyology: The bone marrow extraction method. *Tested studies for laboratory teaching*, 12: 69-74.

Varella-Garcia, M., & Taddei, V. A. 1989. Citogenética de quirópteros: métodos e aplicações. *Revista Brasileira de Zoologia*, 6: 297-323.

Villa, R. 1966. Los murciélagos de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México D.F. 491 pp.

Waldeyer, W. 1888. Über Karyokinese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 32:1-122.

Zima, J. 2000. Chromosomal evolution in small mammals (Insectivora, Chiroptera, Rodentia). *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 11:5-15.

13. ANEXO

SOLUCIÓN HIPOTÓNICA

- **0.075 M KCl**

Se pesan 0.56 gr de KCl y se diluyen en 100 ml de agua destilada. Puede ser utilizada por un máximo de dos días si no se encuentra contaminada, manteniéndola en refrigeración.

FIJADOR CARNOY

- **Proporción 3:1**

3: Metanol

1: Ácido acético

Se prepara 30 minutos antes de ser utilizado para evitar su hidratación, manteniéndolo en refrigeración.

COLORANTE GIEMSA PARA TINCIÓN CONVENCIONAL

- **Preparación de tinción**

- I. Solución concentrada de Giemsa (Microlab): 1 ml.
- II. Solución buffer AB (pH 6.5-6.8): 2 ml.

Solución A: 10 M NaH_2PO_4

Se pesan 0.69 gr y se afora en 50 ml de agua destilada, utilizando posteriormente 15 ml.

Solución B: 10 M Na_2HPO_4

Se pesan 0.71 gr y se aforan en 50 ml de agua destilada, utilizando posteriormente 10 ml.

Estas soluciones pueden ser almacenadas a 4°C hasta no observar contaminación.

III. Agua destilada: 47 ml.

Esta preparación puede utilizarse en el transcurso de 24 horas conservándola a temperatura ambiente.

BUFFER GIEMSA 2% PARA BANDAS CROMOSÓMICAS G

I. Buffer de Fosfato de Sodio 0.14 M: 1 ml.

Se pesan 0.938 gr de Na_2HPO_4 y se diluyen en 25 ml de agua destilada (pH 9.0). Se puede conservar a temperatura ambiente hasta no observar contaminación.

II. Solución concentrada de Giemsa (Microlab): 1 ml

III. Agua destilada: 48 ml.

SOLUCIÓN STOCK DE TRIPSINA

I. Tripsina Difco (1:250): 0.05 gr.

II. Buffer Fosfato Salino (PBS): 100 ml.

Se pesan 4 gr de NaCl , 0.1 gr de KCl , 0.574 gr de Na_2HPO_4 , 0.1 gr de KH_2PO_4 y se diluyen en 250 ml de agua destilada. La solución buffer debe conservarse a 4°C.

La solución Stock de Tripsina debe mantenerse en el congelador y ser usada evitando contaminación bacteriana o fúngica.

Se diluye una parte de la solución Stock de Tripsina en tres partes de PBS para obtener una concentración final de 0.025% utilizándola únicamente en el transcurso de 24 horas.

SOLUCIÓN STOCK 10XSSC PARA BANDAS CROMOSÓMICAS C

- Se utiliza 1.5 M NaCl pesando 4.38 gr del reactivo y 0.15 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ pesando 2.206 gr respectivamente. Los dos reactivos se diluyen en 50 ml de agua destilada, conservando la solución en refrigeración a 4°C.
- Se toman 10 ml de 10 XSSC y 40 ml de agua destilada para obtener una solución 2XSSC, conservando la solución en refrigeración a 4°C y utilizándola en el transcurso de 24 horas.

GIEMSA 4% PREPARADA CON BUFFER DE FOSFATO DE SODIO PARA BANDAS CROMOSÓMICAS C

- **0.01M NaH_2PO_4**

Se pesan 0.069 gr. y se diluyen en 50 ml. de agua destilada, utilizando 34 ml.

- **0.01 M Na_2HPO_4**

Se pesan 0.071 gr. y se diluyen en 50 ml. de agua destilada, utilizando 50 ml.

Se toman 2 ml de Giemsa (Microlab) y 48 ml del buffer preparado para teñir. La solución buffer se puede utilizar en el transcurso de 24 horas a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO

- **Preparar solución Stock 5N HCl**

Tomar 2 ml de HCl 5 N y 48 ml. de agua destilada para obtener una concentración 0.2 N.

La solución Stock se mantiene a temperatura ambiente hasta que no se observe contaminación y la solución 0.2 N se puede conservar durante 24 horas a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN SATURADA DE HIDRÓXIDO DE BARIO

I. Ba (OH)₂: 5 gr.

II. Agua destilada: 50 ml.

Debe prepararse 24 o 48 horas antes de ser utilizada, conservándola a temperatura ambiente hasta por dos semanas.