



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE *Peromyscus gratus* DE
TECAMACHALCO, PUEBLA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

MARIA DE LOS ANGELES MONTERO VELA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESÚS MARTÍNEZ VÁZQUEZ



PUEBLA

AGOSTO, 2018

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biología de la especie	4
1.1.1 Descripción morfológica.....	4
1.1.2 Estado de conservación.....	5
1.1.3 Distribución	6
2. ANTECEDENTES	7
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. OBJETIVO GENERAL.....	11
4.1 Objetivos particulares.....	11
5. ÁREA DE ESTUDIO.....	12
6.1 Trabajo de campo	14
6.2 Trabajo de laboratorio	14
6.2.1 Obtención de cromosomas	14
6.2.2 Elaboración de laminillas	15
6.2.3 Construcción del cariotipo.....	16
6.3 Elaboración de bandas cromosómicas G.....	17
6.4 Elaboración de bandas cromosómicas C.....	17
7. RESULTADOS	19
8. DISCUSIÓN	28
9. CONCLUSIÓN	32
10. LITERATURA CITADA.....	33
ANEXO.....	37

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis

A mi papá el sr. Francisco Motero Ramírez, a mi mamá la sra. María Ofelia Vela Coyotl, por su apoyo, confianza, cariño incondicional y motivación.

A mis hermanas Leti, Cris, Lulú, Isa y a mi hermano Florentino por su apoyo y confianza en mí, por su motivación constante.

A mi sobrina Fátima y mi sobrino Saúl por ser parte de mi familia, porque aunque aún son pequeños me han motivado a seguir adelante.

A mis amigas y amigos, por haberme permitido ser parte de su vida y compartir su conocimiento conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Martínez Vázquez por su ayuda, paciencia y asesoramiento para la realización del presente estudio.

A la M. en C. Rosa María González Monroy, por sus consejos, motivación y asesoramiento para la culminación de la presente tesis.

Al M. en C. Héctor Rafael Eliosa León por su atención brindada durante la revisión de este trabajo.

A toda mi familia y a todos los que hicieron posible la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias Biológicas y del Laboratorio de Mastozoología, por su compañía, apoyo y valiosos consejos.

A todos mis maestros por su tiempo y dedicación en mi formación profesional.

GRACIAS

RESUMEN

El cariotipo es el conjunto de cromosomas ordenados de acuerdo a sus características morfológicas como forma, tamaño y número que es propio de una especie. El análisis de cariotipo es fundamental para comparar especies, para estudiar variaciones intraespecíficas y asegurar el patrón de determinación sexual. Con la ayuda de la citogenética se han obtenido análisis cromosómicos en los cuales se ha podido observar las variantes en los cromosomas que presentan algunos géneros y especies de roedores. El presente estudio tuvo como objetivo realizar la descripción del cariotipo, así como el patrón de bandas cromosómicas G y C del ratón *Peromyscus gratus* del Municipio de Tecamachalco, Puebla. Se utilizaron trampas Sherman para capturar vivos a los organismos y posteriormente fueron trasladarlos al laboratorio de Mastozoología (BUAP) en donde se les realizó la técnica de extracción de médula ósea para obtener el cariotipo convencional. Para la obtención de bandas cromosómicas G se empleó Tripsina, y para bandas C se utilizó una solución de Hidróxido de Bario. Los resultados indican que *Peromyscus gratus* presenta un número diploide de $2n=48$ y un número fundamental de $NF=54$, los autosomas corresponden a cuatro pares de cromosomas birrámeos, el primer par de autosomas fue metacéntrico pequeño, el segundo corresponde a submetacéntrico pequeño, el tercero y cuarto par de autosomas fueron subtelocéntricos grandes y 19 pares telocéntricos de grandes a pequeños. El cromosoma sexual X fue subtelocéntrico grande y el Y fue submetacéntrico pequeño. El género *Peromyscus* presenta variación en cuanto al número de brazos autosómicos, también se encontraron diferencias en cuanto a la morfología de los cromosomas. Respecto al patrón de bandas cromosómicas G se observó que en los cromosomas grandes se presentaron de 7 a 11 bandas, en los autosomas medianos de cuatro a seis bandas y en los autosomas pequeños de una a tres bandas claras y oscuras de eucromatina. En cuanto al bandeo cromosómico C se encontró que la heterocromatina constitutiva se situó en la regiones centroméricas de los cromosomas, que es similar a lo que ocurre con otras especies del género *Peromyscus*.

1. INTRODUCCIÓN

Los cromosomas son los transmisores de la información genética dentro de la célula los cuales están constituidos por ADN y proteínas asociadas; las células de cada especie poseen un número característico de cromosomas, en la mayor parte de las células eucariontes existen dos conjuntos de cromosomas como consecuencia de la reproducción sexual, así cada cromosoma de un conjunto tienen su correspondiente en el otro juego formando un par homólogo, ambos parecidos en estructura y tamaño y cada uno contiene información genética para el mismo conjunto de características hereditarias (Pierce, 2009).

El ciclo celular es un proceso crítico porque a través de él, las células progenitoras pasan a las células hijas instrucciones genéticas para todas las características, consta de dos fases principales, la primera es la interfase en el que la célula crece, se desarrolla y se prepara para su división, la segunda es la fase M (mitótica) que incluye a la mitosis y la citocinesis; la mitosis es la fase en la cual las cromátides hermanas se separan y las célula se divide para proveer un juego completo de información genética a cada una de las células resultantes; se divide en profase, prometafase, metafase, anafase y telofase (Pierce, 2009). En cualquier tejido que se divida activamente es posible obtener preparados cromosómicos deteniendo las células en la metafase, el estadio del ciclo celular en el que los cromosomas alcanzan su condensación máxima (Aiassa *et al.*, 2015) y es posible observarlos, los cuales son genes arreglados de modo lineal en estructuras nucleares que resultan de la condensación de la cromatina (Gardner, 2003).

La citogenética es la disciplina que estudia las estructuras celulares y los eventos citológicos que intervienen en la formación hereditaria (Gardner, 2003). Un cromosoma posee un brazo corto designado como p y un brazo largo designado como q separados por una constricción primaria denominada centrómero que es el punto donde se une el huso mitótico (es esencial para el movimiento y segregación normales del cromosoma durante la división celular) y un par de telómeros (Gardner, 2003; Pierce, 2009; Aiassa *et al.*, 2015).

Los cromosomas en metafase presentan cuatro formas básicas y se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de los brazos corto y largo, así como por la posición del centrómero. Los cromosomas metacéntricos tienen los brazos corto y largo de aproximadamente la misma longitud, con el centrómero en el punto medio. Los cromosomas submetacéntricos tienen los brazos corto y largo de longitudes desiguales, con el centrómero en posición submedia. Los cromosomas subteloicéntricos tienen el centrómero muy cerca de un extremo, es decir en posición subterminal, con un brazo corto muy pequeño. Los cromosomas telocéntricos tienen el centrómero en un extremo (Levan *et al.*, 1964; Aiassa *et al.*, 2015). Algunos cromosomas presentan constricciones secundarias en los brazos cortos, que conectan trozos muy pequeños del ADN con el centrómero llamados tallos y satélites, los tallos contienen genes que codifican el ARN ribosómico. (Aiassa *et al.*, 2015).

El conjunto de cromosomas de un organismo constituye el complemento cromosómico, el estudio de sus características morfológicas externas se realiza ordenando los pares de cromosomas homólogos en relación con su tamaño y forma llamado cariotipo (Lacadena, 1996; Pierce, 2009). Los cariotipos se preparan a partir de células en división activa como los glóbulos blancos, células de medula ósea, o células de tejidos meristemáticos de las plantas (Pierce, 2009). La representación gráfica simplificada del cariotipo constituye el idiograma (Lacadena, 1996).

Las diferentes técnicas de bandeo cromosómico han significado un considerable progreso tanto en citogenética humana como en citogenética general haciendo posible disponer de una herramienta de identificación de cada cromosoma de un importante número de organismos tanto animales como vegetales además de posibles rearrreglos estructurales (Cortés, 1984; Drets, 2002).

Los mecanismos de variabilidad y herencia que estudia la genética nos permite comprender y dar a entender cómo han cambiado las poblaciones a través del tiempo, gran parte de los fenómenos de mutación y recombinación permiten explicar la variabilidad, que es la clave para la adaptación de los organismos, la

cual ayuda a soportar las presiones de selección natural (Garay, 1988). El análisis de cariotipo es fundamental para identificar y comparar especies, para estudiar variaciones dentro de una misma especie, asegurar el patrón de determinación sexual y/o para correlacionar determinadas patologías con alteraciones del cariotipo normal (Aiassa *et al.*, 2015).

Con la ayuda de la citogenética se han obtenido análisis cromosómicos en los cuales se ha podido observar variantes en los cromosomas que presentan algunos géneros de roedores. Este grupo de organismos se utiliza con mayor frecuencia en la investigación debido a su grado de evolución adaptativa y especiación además por sus características biológicas como: tamaño de camada, ciclos de vida cortos y alto potencial reproductivo (Santos y Hortelano, 1997).

Dentro de la clase Mammalia se encuentra el orden Rodentia que es el más numeroso de esta clase, comprendiendo 29 familias, 468 géneros y 2,052 especies en todo el mundo. La familia Cricetidae tiene una amplia distribución, ausente sólo en algunas islas. Consiste en 130 géneros y 681 especies de ratas y ratones. Hasta hace poco, la mayoría de los ratones que se encontraban en América se clasificaban en la familia Muridae; sin embargo, la disposición actual que es ampliamente aceptada implica el reconocimiento de las ratas y ratones nativos del Nuevo Mundo dentro de la familia Cricetidae (Ceballos, 2014; Ramírez-Pulido *et al.*, 2014). La riqueza de especies del género *Peromyscus* es alta con 51 especies de los cuales 33 son endémicos de México (León, 2014), además es uno de los géneros de mamíferos más diversos en todo el mundo (Ceballos y Oliva, 2005). Algunos roedores son utilizados como bioindicadores por la estrecha relación que mantienen con los requerimientos de su hábitat (Garmendia *et al.*, 2009).

1.1 Biología de la especie

1.1.1 Descripción morfológica

Peromyscus gratus (Merriam, 1898) es también conocido como el ratón piñonero es un roedor de tamaño pequeño, su coloración puede ser de gris claro levemente mezclado con amarillento sobre un fondo gris a ocre mezclado ligeramente con pardo y puede llegar a presentar una mancha pectoral de color ocre (Ceballos y Oliva, 2005; Ceballos, 2014). Sus orejas son grandes, largas y expandidas con grandes bullas auditivas, la cola es bicolor, parda por arriba y blanquecina por debajo y más larga que la cabeza y el cuerpo, las patas son de color blanco, el hallux es rudimentario mientras que los otros dedos tienen garras bien desarrolladas (Figura 1). El cráneo es pequeño con una caja craneal claramente redondeada y el rostro es corto (Ceballos y Oliva, 2005; Núñez-Garduño, 2005; Ceballos, 2014).

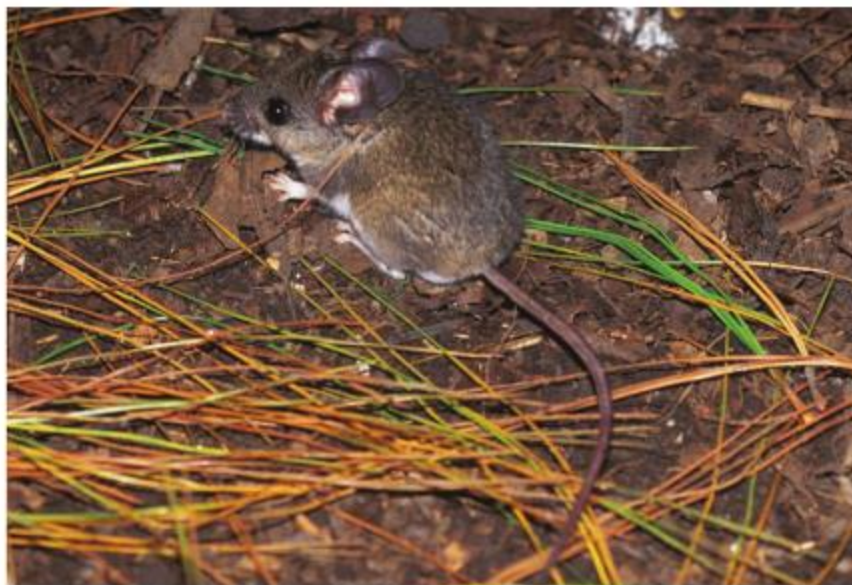


Figura 1. *Peromyscus gratus* (Ceballos, 2005).

La nomenclatura es de acuerdo a Ramírez-Pulido *et al.* (2014).

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Clase Mammalia

Orden Rodentia

Familia Cricetidae

Subfamilia Neotominae

Género *Peromyscus*

Especie *Peromyscus gratus*

1.1.2 Estado de conservación

Abunda en todo su rango de distribución principalmente en ambientes rocosos y no enfrenta problemas de conservación (Ceballos y Oliva, 2005; Ceballos, 2014). En la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) esta especie se encuentra catalogada como de preocupación menor (Lacher *et al.*, 2016).

1.1.3 Distribución

Se encuentra en ecosistemas rocosos y preferentemente en laderas dentro de bosques de pino, junípero y encino, de igual manera se les puede encontrar en zonas con vegetación xerófila y pastizales (Núñez-Garduño, 2005; Lacher *et al.*, 2016).

Son nativos de Estados Unidos y México presentándose desde los Estados de Colorado y Nuevo México; atravesando Chihuahua se extiende por las altiplanicies de México, traspasando el Eje Neovolcánico llegando al norte de Michoacán y hasta el Norte de Oaxaca (Ceballos y Oliva, 2005; Núñez-Garduño, 2005; Lacher *et al.*, 2016).



Figura 2. Distribución de *Peromyscus gratus* (Ceballos y Oliva, 2005).

2. ANTECEDENTES

El género *Peromyscus* se divide en grupos de especies, el grupo *P. truei* está conformado por seis especies: *P. attwateri*, *P. difficilis*, *P. gratus*, *P. nasutus*, *P. pectoralis* y *P. truei* (Durish *et al.*, 2004). Anteriormente en la especie *Peromyscus truei* se incluyeron poblaciones mexicanas y del suroeste de Estados Unidos que después se reconocieron como *Peromyscus gratus* (Janecek, 1990; GBIF, 2018).

El cariotipo primitivo reconocido para el género *Peromyscus*, tiene un número diploide $2n=48$ con 20 pares de autosomas acrocéntricos excepto los pares 1, 22 y 23 que son birrámeos, un $NF=52$ la cual estaba basada en especímenes de *Peromyscus boylii glasselli* de la isla de San Pedro Nolasco del Golfo de California (Greenbaum y Baker, 1978; Greenbaum *et al.*, 1994).

Robbins y Baker (1981) reportaron para *Peromyscus attwateri* un $2n= 48$ con un $NF=56$, los pares de autosomas 1, 2, 6, 22 y 23 fueron birrámeos y 18 pares acrocéntricos; respecto a bandas cromosómicas C, la heterocromatina está restringida a la región centromérica. Los cromosomas sexuales X y Y fueron submetacéntricos (Lee *et al.*, 1972).

Para *Peromyscus pectoralis* se reportó un $2n=48$ con un $FN=58$, los pares autosómicos 1, 2, 3, 9, 22 y 23 fueron birrámeos el resto de los autosomas son acrocéntricos, el cromosoma sexual X es subtelocéntrico y el cromosoma sexual Y metacéntrico; en cuanto a bandas cromosómicas C se observó que la heterocromatina se encuentra en la región centromérica (Lee *et al.*, 1972; Robbins y Baker, 1981).

Peromyscus truei presenta un número diploide $2n=48$ con ocho pares de autosomas birrámeos y 15 pares de autosomas monorrámeos (acrocéntricos), un $NF=62$, el cromosoma sexual X fue subtelocéntrico y el cromosoma sexual Y fue acrocéntrico; en relación a bandas cromosómicas G, se encontró en autosomas grandes de 8 a 11 bandas, en autosomas medianos de cuatro a ocho bandas y en autosomas pequeños de una a cuatro bandas claras y oscuras de eucromatina. Con respecto al bandeo cromosómico C la heterocromatina se encuentra principalmente en el centrómero (Hoffmeister, 1981; Robbins y Baker, 1981).

Hsu y Arrighi (1968) reportaron especímenes de *P. truei* con un $2n=48$ y un $NF=54$ del suroeste de Estados Unidos, con dos pares de autosomas birrámeos de medianos a grandes, dos pares de autosomas birrámeos pequeños y 19 pares de autosomas acrocéntricos. Zimmerman *et al.*, (1975) reportó para especímenes de *Peromyscus truei* de Durango y Chihuahua un $2n=48$ y un $NF=54$, con dos pares de autosomas birrámeos medianos a grandes y dos pares de autosomas birrámeos pequeños y 19 pares de autosomas acrocéntricos. Los cariotipos diferentes y sus distancias genéticas cuestionaron la unidad de *P. truei* (Zimmerman *et al.*, 1978), posteriormente se reportó un área de simpatria en Nuevo Mexico y se designó como *P. gratus* Modi y Lee (1984). Janecek (1990) respalda con datos moleculares la posición taxonómica de *P. truei* y *P. gratus* para considerarlas especies independientes.

Lee *et al.*, (1972) mencionan para *Peromyscus gratus* de Coahuila un número diploide de $2n=48$ y un número fundamental de $NF=54$, con dos pares de autosomas birrámeos de medianos a grandes, dos pares de autosomas birrámeos pequeños y 19 pares de autosomas acrocéntricos. El cromosoma sexual X fue subtelocéntrico grande

Modi y Lee (1984) en un estudio realizado en Nuevo Mexico reportaron para *Peromyscus gratus* un $2n=48$, con un $NF=54$, con cuatro pares de autosomas birrámeos y 19 pares de autosomas acrocéntricos. El cromosoma sexual X fue submetacéntrico grande y el Y fue metacéntrico pequeño. El patrón de bandas cromosómicas G se observa que los autosomas grandes presentaron de 10 a 13

bandas, en los medianos de tres a ocho bandas y en los autosomas pequeños de tres a cuatro bandas claras y oscuras; el patrón de bandas G para el brazo corto de los cromosomas sexuales X y Y presentan tres bandas. En cuanto al patrón de bandas cromosómicas C, la heterocromatina se localizó en el centrómero de todos los autosomas.

Alonso (2009) realizó un estudio cromosómico en Ixtacamaxtitlan, Puebla, encontrando en *Peromyscus difficilis* un número diploide de $2n=48$ y un $NF=50$, dos pares de cromosomas fueron birrámeos (un par submetacéntrico y un par subtelocéntrico) y 21 pares monorrámeos. El cromosoma sexual X fue submetacéntrico grande y el Y fue subtelocéntrico pequeño. En cuanto al patrón de bandas G encontró que los autosomas grandes presentaron de cuatro a cinco bandas, en los autosomas medianos de dos a tres bandas y en los autosomas pequeños de una a dos bandas claras y oscuras de eucromatina. En el patrón de bandas cromosómicas C se observó que la heterocromatina constitutiva se encontró principalmente en las regiones centroméricas de los autosomas.

3. JUSTIFICACIÓN

Los roedores son un buen modelo para la investigación y han sido los más estudiados a nivel cromosómico, lo que aporta información necesaria para establecer o verificar relaciones filogenéticas y evolutivas en los diversos grupos. *Peromyscus gratus* es una especie endémica de Norte América que cumple con importantes funciones como fuente de proteína para algunas especies, contribuye en la dispersión de semillas, posee ciclo de vida cortos, tamaño de camada grandes, su alto potencial reproductivo y su amplia distribución geográfica. En Mexico se han realizado pocos trabajos citogenéticos sobre esta especie por lo que este estudio realizó el análisis cromosómico para determinar su cariotipo y observar los posibles cambios que ha sufrido su conformación cromosómica.

4. OBJETIVO GENERAL

Describir el cariotipo de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

4.1 Objetivos particulares

Obtener el número diploide, el número fundamental, la morfología de los autosomas y la morfología del par sexual de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

Determinar el patrón de bandas cromosómicas G y C de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

5. ÁREA DE ESTUDIO

El Municipio de Tecamachalco se localiza al Sureste del Estado de Puebla entre los paralelos 18° 46' y 18° 57' de latitud norte; los meridianos 97° 38' y 97° 48' de longitud oeste; se encuentra a una altitud entre 1900 y 2800 msnm. Colinda al norte con los municipios de San Salvador Huixcolotla, Acatzingo y Quecholac; al este con los municipios de Quecholac, Palmar de Bravo y Yehualtepec; al sur con los municipios de Yehualtepec, Xochitlán Todos Santos y Tochtepec; al oeste con los municipios de Tochtepec, Cuapiaxtla de Madero y San Salvador Huixcolotla. Tiene un clima Templado subhúmedo con lluvias en verano, el tipo de suelo predominante es Phaeozem (39%) y Leptosol (20%; INEGI, 2009).

Los principales ecosistemas son las zonas montañosas de la cordillera El Monumento y el cerro de Techachales, están cubiertos principalmente de matorral desértico rosetófilo asociado a matorral subinermes y en menor grado de matorral crasicaule asociado a vegetación secundaria arbustiva; también presentan pastizal inducido. Las áreas planas están dedicadas a la agricultura: en donde se encuentra el sistema de canales de riego; y el resto de temporal, forma parte de la gran extensión de regadío del Valle de Tepeaca (INEGI, 2009).

El mapa se realizó utilizando el programa QGIS versión 2.18, obteniendo la carta topográfica E14B54-TEPEACA de INEGI y los mapas de división política del Portal de Geoinformación de CONABIO.

Municipio de Tecamachalco Puebla

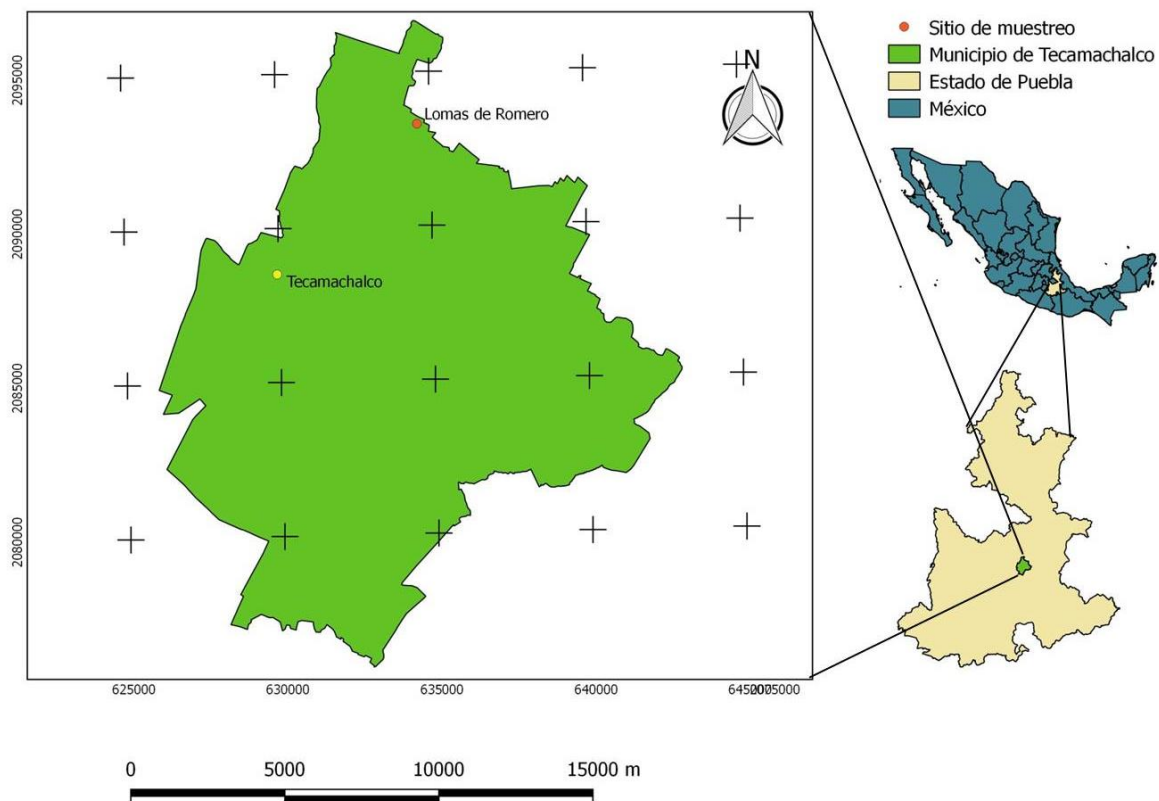


Figura 3. Ubicación del sitio de colecta del ratón piñonero *Peromyscus gratus* del Municipio de Tecamachalco en el Estado de Puebla.



Figura 4. Sitio de muestreo, Lomas de Romero, Tecamachalco, Puebla.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Trabajo de campo

Colecta de ejemplares: La colecta se realizó en la localidad Lomas de Romero que se ubica en la parte norte del municipio de Tecamachalco, del estado de Puebla; se colocaron 30 trampas, con un cebo de hojuelas de avena mezcladas con vainilla a lo largo de un transecto en una zona rocosa, colocándose en un intervalo de 10 metros cada una y se recogieron en la mañana del día siguiente. Se tomaron datos del sitio de muestreo como: localidad, coordenadas geográficas, altitud y fecha de colecta; solo se transportaron cuatro ejemplares (dos machos y dos hembras) al laboratorio de Mastozoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP para realizar la técnica de extracción de médula ósea.

6.2 Trabajo de laboratorio

6.2.1 Obtención de cromosomas

El material celular para la obtención de los cromosomas se adquirió mediante la técnica de extracción de médula ósea de acuerdo a lo propuesto por Lee (1969), Baker y Qumsiyeh (1988). Los ejemplares fueron caracterizados sexualmente, posteriormente se pesaron usando un dinamómetro marca pesola, inmediatamente se les inyectó colchicina intraperitonealmente, 0.1 ml de colchicina por cada 10 gramos de peso corporal del ejemplar y se dejó actuar durante 35 minutos, con la finalidad de inhibir el huso acromático y detener la división celular en la etapa de metafase.

Se sacrificó cada espécimen por dislocación cervical y se tomaron las medidas morfométricas convencionales (longitud total del cuerpo, longitud de la cola, longitud de la pata trasera, longitud de la oreja en mm, el peso en gramos y el sexo). Después se procedió a extraer los fémures y las tibias, a los cuales se cortó la epífisis en el extremo proximal. Con ayuda de una jeringa con solución

hipotónica se extrajo la médula ósea y se vació en tubos de centrifuga de 15 ml. los cuales contenían una solución hipotónica de KCl 0.075 M en proporción al tamaño del paquete celular, esta solución hipotónica provoca la entrada de agua a las células, debido a la alta concentración de sales que hay en el interior de las mismas, por lo tanto el citoplasma aumenta su volumen y los cromosomas permanecen flotando en su interior.

El material celular fue resuspendido con una jeringa y se aplicó más solución hipotónica a los tubos hasta alcanzar un volumen de 5 ml, se procedió a incubar durante 40 minutos a 37°C. Posteriormente, se centrifugó en una centrifuga VELAB a 800 rpm durante 8 minutos, consecutivamente se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y el paquete celular se resuspendió en solución fijadora de Carnoy (metanol-ácido acético en proporción 3:1), aplicándose lentamente por las paredes del tubo.

El fijador de Carnoy se preparó 30 minutos antes de ser utilizado para evitar su evaporización. A los organismos colectados se les realizó la taxidermia científica y fueron registrados en la base de datos y depositados en la Colección científica de mamíferos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP.

6.2.2 Elaboración de laminillas

Para la elaboración de laminillas, se lavaron los portaobjetos luego se colocaron en un frasco con alcohol al 96% previamente refrigerado. Cada tubo con el material celular se centrifugó nuevamente a 800 rpm durante 8 minutos; posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se resuspende suavemente con solución fijadora de Carnoy fresca en proporción al tamaño del botón celular. Con una pipeta Pasteur se tomó el material celular, desde una altura aproximada de 3 metros se dejaron caer tres a cinco gotas distribuidas a lo largo del portaobjetos, inmediatamente, se realizó un extendido del material celular con aire comprimido y se dejó secar a temperatura ambiente esta técnica se realizó a 27 laminillas. A 26 laminillas se realizó el extendido cromosómico con calor, con la ayuda de una

pipeta Pasteur se goteo el material celular sobre un portaobjetos, enseguida se le aplico calor con un encendedor se agita la laminilla para apagar el fuego y después se dejó secar a temperatura ambiente.

Cada laminilla se tiñó con Giemsa durante 10 minutos (48 ml de agua, 2 ml de buffer de fosfatos y 1 ml de Giemsa), posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar. Después las laminillas fueron observadas con un microscopio óptico con los objetivos de 10X, 40X y 100X, para localizar los campos mitóticos en metafase y después fueron fotografiados los mejores campos mitóticos.

6.2.3 Construcción del cariotipo

Los campos mitóticos en donde los cromosomas estuvieran separados y con mejor resolución se fotografiaron utilizando una cámara PROGRES GRYPHAX integrada a un microscopio Leica DM 1000 LED; las cuales se imprimieron en papel fotográfico. Después los cromosomas fueron recortados y se ordenaron por pares homólogos de acuerdo a su tamaño y posición del centrómero según la clasificación de Levan *et al.* (1964). Los brazos cortos (p) y largos (q) se midieron con ayuda de un vernier digital marca Mitutoyo, se obtuvieron los promedios correspondientes de dichos brazos para establecer la proporción entre ellos y obtener el índice centromérico IC.

El índice centromérico se obtuvo con la siguiente fórmula:

Dónde:

$$Ic = \text{índice centromérico} \qquad Ic = \frac{p}{p + q} * 100$$

p = Brazo corto

q = Brazo largo

Está dado por la relación de la longitud del brazo corto entre la longitud total del cromosoma y multiplicado por 100.

Para la construcción del cariotipo los cromosomas se ordenaron siguiendo la nomenclatura de Levan *et al.* (1964). Se agruparon conforme a su morfología, ordenándose de acuerdo a su longitud en forma decreciente describiendo de esta manera las constantes cromosómicas ($2n$ y NF).

6.3 Elaboración de bandas cromosómicas G

Las preparaciones se dejaron envejecer cinco días, para colocarlas en la estufa a 65°C durante 14 horas. Posteriormente, se dejan enfriar a temperatura ambiente y se colocaron en solución de Tripsina a 0.025% durante 70 segundos. Pasando este tiempo las laminillas se metieron inmediatamente en amortiguador de fosfato salino (PBS), en dos vasos Coplin por separado, lavando 10 veces la laminilla en cada uno. Enseguida se tiñeron (sin dejar secar) en colorante Giemsa al 2% previamente agitado, en un vaso Coplin, durante ocho minutos; inmediatamente se retiraron y se enjuagaron con agua destilada, dejándolas secar a temperatura ambiente para después observarlas al microscopio óptico marca Leica DM 1000 LED utilizando los objetivos de 10X, 40X y 100X.

6.4 Elaboración de bandas cromosómicas C

Las laminillas con los campos mitóticos se dejaron envejecer durante cinco días, posteriormente se colocaron en un vaso Coplin que contenía HCl 0.2 N durante 15 minutos, inmediatamente se sumergieron de cuatro a cinco veces en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las preparaciones se trataron de 60 a 80 segundos en Hidróxido de Bario a 45°C , inmediatamente se sumergieron en HCl 0.2N y posteriormente en agua destilada de dos a tres veces. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se colocaron en cámaras húmedas (cajas Petri con solución salina 2XSSC). Se colocaron a lo largo de la laminilla de 6 a 10 gotas de solución salina 2XSSC con una pipeta Pasteur y se les acomodó un cubreobjetos en la parte donde se encontraban los campos cromosómicos, después se incubaron a 65°C durante 16 horas, al término de este lapso se retiró

el cubreobjetos y las preparaciones se lavaron con agua destilada, se dejaron secar y posteriormente, se mantuvieron durante cinco minutos en etanol al 70% y al 96% para ayudar a la deshidratación y se secaron a temperatura ambiente. Las preparaciones se tiñeron con Giemsa al 4% preparada en amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0 durante 12 minutos y se enjuagaron en agua destilada para dejarlas secar a temperatura ambiente.

Elaboración de idiograma

El idiograma se realizó a partir del cariotipo convencional, utilizando formas de Microsoft Word, siguiendo la morfología y longitud de cada par cromosómico.

7. RESULTADOS

Para describir el cariotipo convencional de *Peromyscus gratus* del Municipio de Tecamachalco, Puebla; se capturaron cuatro ejemplares de los cuales dos eran machos y dos hembras, se obtuvieron 55 laminillas de las cuales se analizaron un total de 414 campos en metafase, solo se tomaron fotografías a los mejores campos bien definidos y con los cromosomas separados (Figuras 5 y 6).

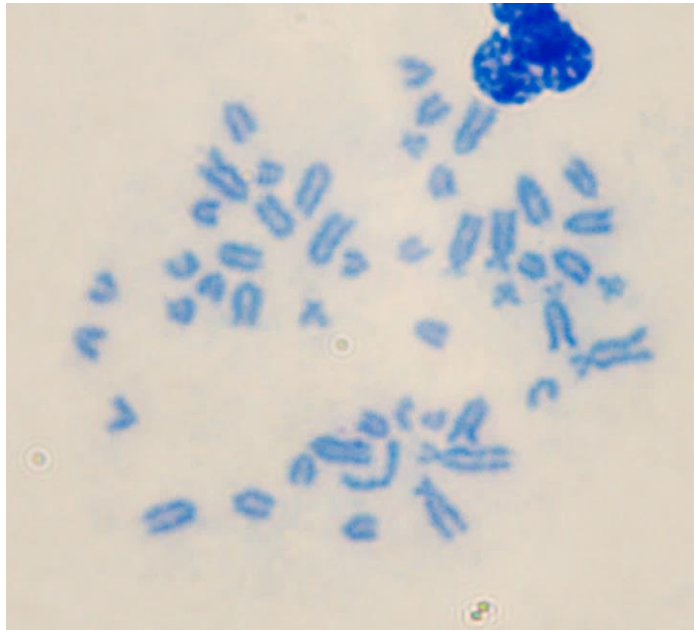


Figura 5. Campo cromosómico (100X) de ejemplar hembra de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

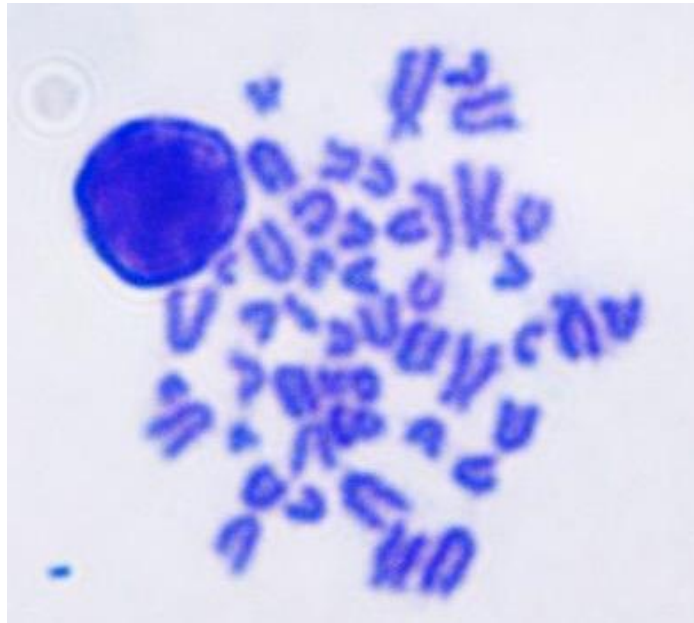


Figura 6. Campo cromosómico (100X) de ejemplar macho de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

Los análisis indican que el ratón piñonero (*Peromyscus gratus*) presenta un número cromosómico diploide de $2n=48$ y un número fundamental de $NF=54$, el complemento autosómico está constituido por cuatro pares de cromosomas birrámeos, el primer par de autosomas fue metacéntrico pequeño, el segundo corresponde a submetacéntrico pequeño, el tercero y cuarto par de autosomas fueron subtelocéntricos grandes y 19 pares monorrámeos de grandes a pequeños todos fueron telocéntricos. El cromosoma sexual X fue subtelocéntrico y el Y fue submetacéntrico pequeño (Figuras 7 y 8).

En el cuadro 1 se presentan los datos promedio de las longitudes relativas de los cromosomas, el cariotipo convencional se agrupó de acuerdo a las categorías basadas en la posición del centrómero y en orden descendente de tamaño (Levan *et al.*, 1964).

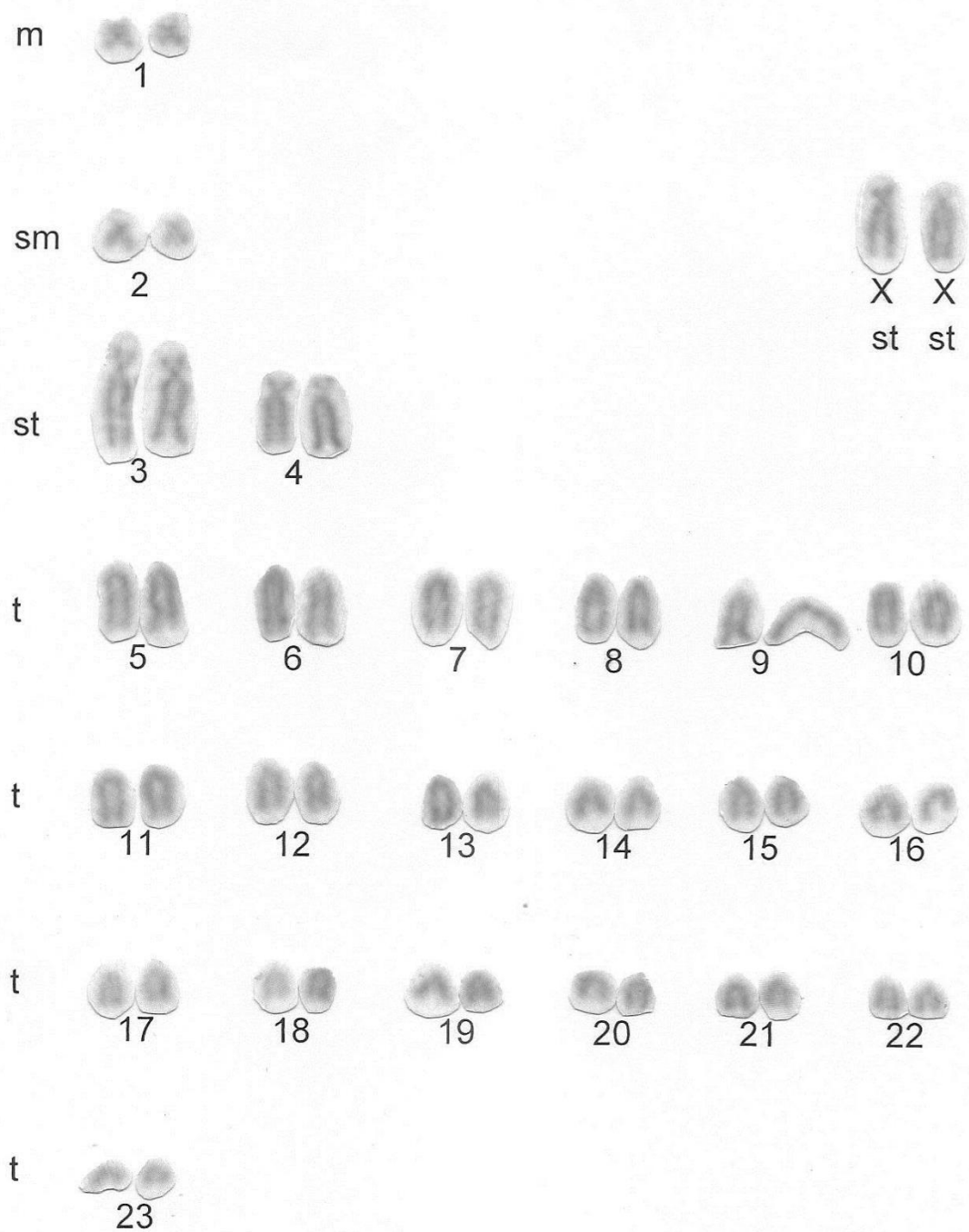


Figura 7. Cariotipo de ejemplar hembra de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

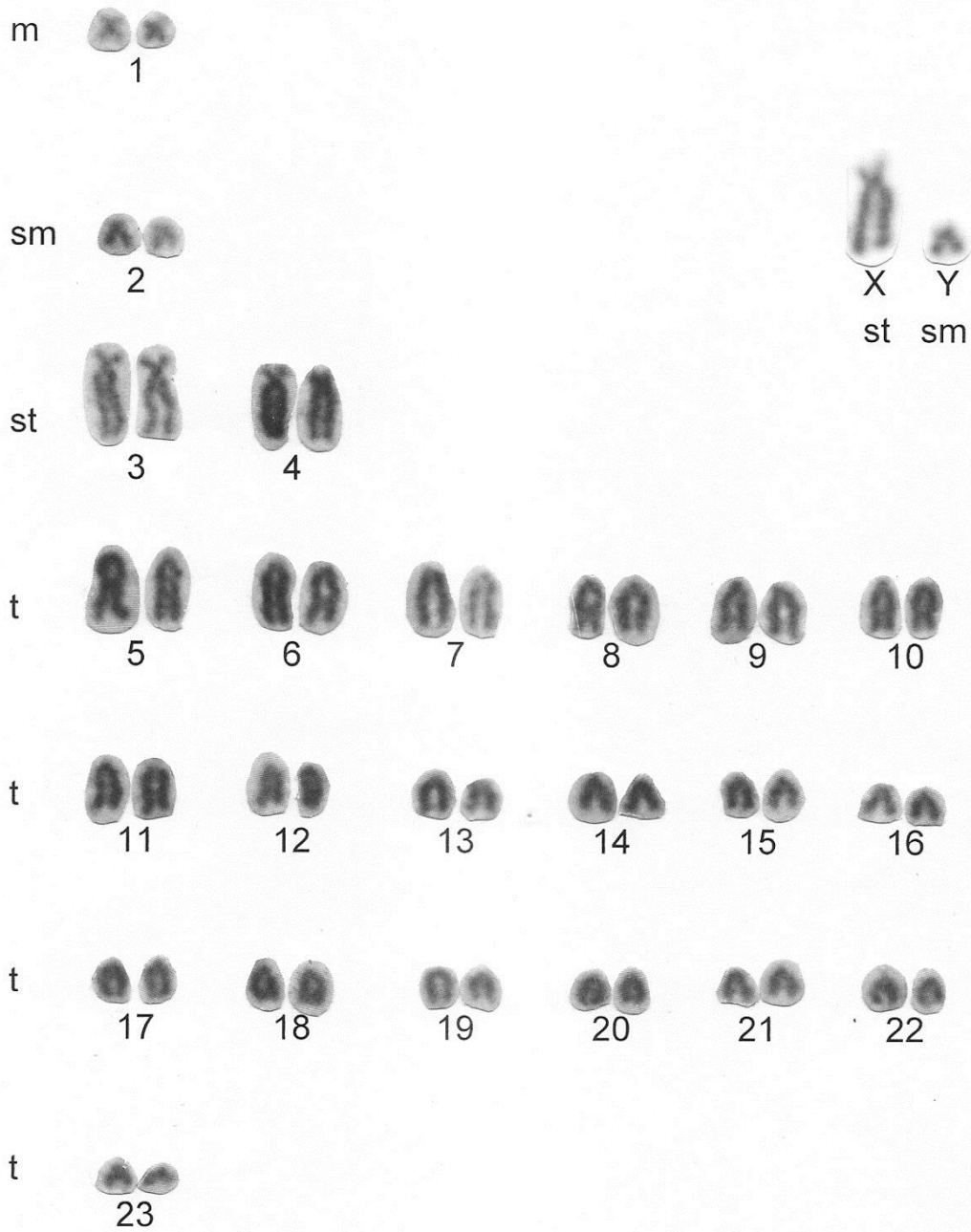


Figura 8. Cariotipo de ejemplar macho de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

Cuadro 1. Longitudes relativas y clasificación de los cromosomas de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

LRp=Longitud relativa promedio del brazo corto, LRq=Longitud relativa promedio del brazo largo, LRp+q=Longitud relativa promedio del cromosoma, DS=Desviación estándar, IC=Índice centromérico, m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, st=subtelocéntrico y t=telocéntrico.

Par Cromosómico	LRp	DS p	LRq	DS q	LRp+q	DS p+q	IC	Clasificación de Levan <i>et al.</i> (1964)
1	1.92	0.47	2.83	0.13	4.76	0.51	40.44	m
2	1.79	0.24	3.49	0.64	5.28	0.79	33.93	sm
3	3.43	0.57	12.21	2.33	15.64	2.64	21.94	st
4	2.91	1.05	9.30	1.53	12.20	1.83	23.83	st
5	-	-	11.97	2.24	11.97	2.24	-	t
6	-	-	11.10	1.31	11.10	1.31	-	t
7	-	-	10.58	1.58	10.58	1.58	-	t
8	-	-	9.58	1.38	9.58	1.38	-	t
9	-	-	9.54	1.56	9.54	1.56	-	t
10	-	-	8.40	1.45	8.40	1.45	-	t
11	-	-	8.10	1.34	8.10	1.34	-	t
12	-	-	7.61	1.30	7.61	1.30	-	t
13	-	-	7.32	1.08	7.32	1.08	-	t
14	-	-	6.86	1.25	6.86	1.25	-	t
15	-	-	6.49	1.24	6.49	1.24	-	t
16	-	-	6.27	0.92	6.27	0.92	-	t
17	-	-	6.00	1.15	6.00	1.15	-	t
18	-	-	5.88	0.96	5.88	0.96	-	t
19	-	-	5.46	1.18	5.46	1.18	-	t
20	-	-	5.40	0.85	5.40	0.85	-	t
22	-	-	5.01	0.90	5.01	0.90	-	t
21	-	-	4.74	0.89	4.74	0.89	-	t
23	-	-	3.82	0.82	3.82	0.82	-	t
X	3.94	0.76	11.43	2.04	14.43	2.49	22.81	st
Y	1.68	0.22	3.44	0.17	5.13	0.05	32.78	sm

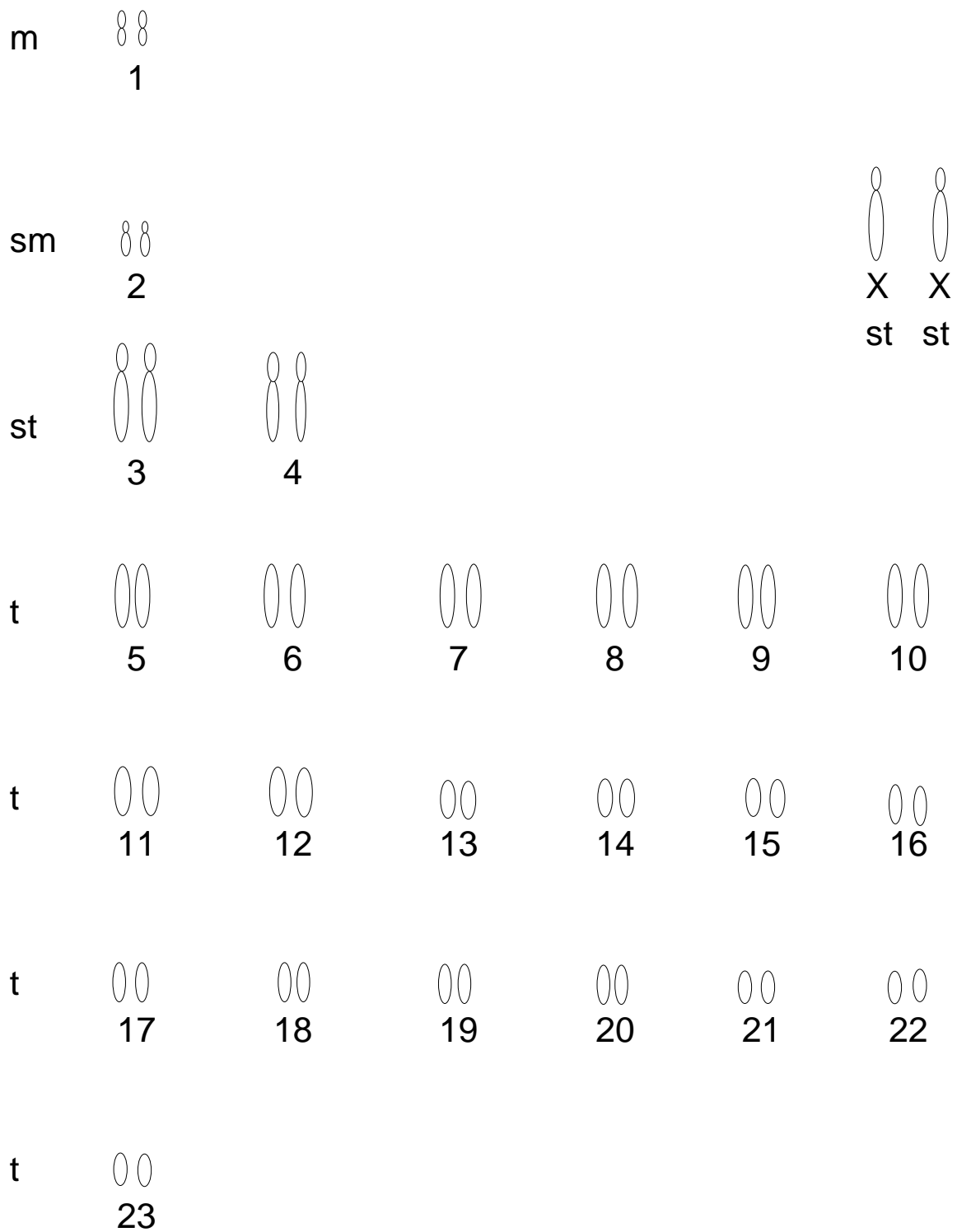


Figura 9. Idiograma del cariotipo convencional de ejemplar hembra de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

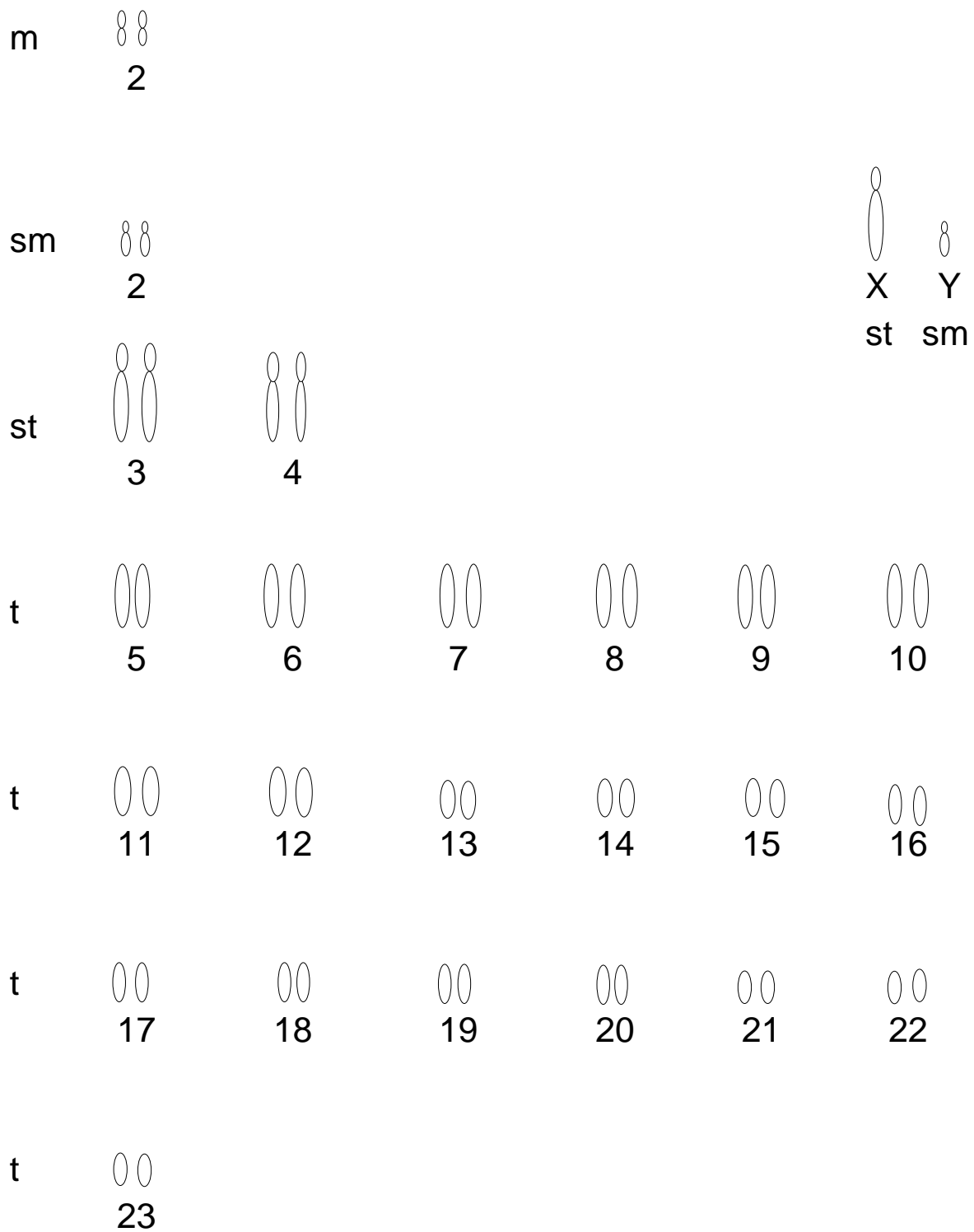


Figura 10. Idiograma del cariotipo convencional de ejemplar macho de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla.

El patrón de bandas cromosómicas G de *Peromyscus gratus* muestra que los cromosomas grandes presentan entre 7 a 11 bandas de eucromatina claras y oscuras en total, en los autosomas medianos tienen un rango de cuatro a seis bandas de eucromatina claras y oscuras en total, y en los autosomas pequeños entre una a tres bandas de eucromatina claras y oscuras en total (Figura 11).

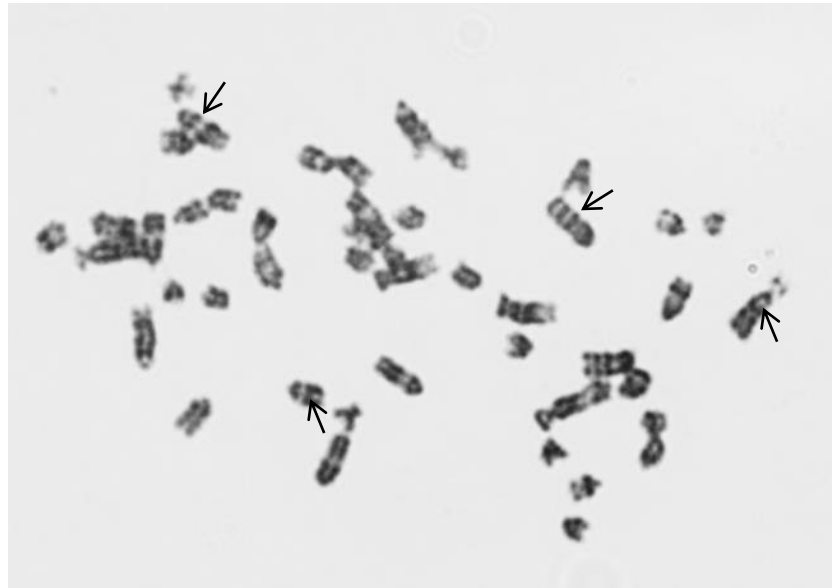


Figura 11. Campo mitótico (100X) con bandas cromosómicas G de *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla. Las flechas indican bandas oscuras de eucromatina.

Con respecto al patrón de bandas cromosómicas C de *Peromyscus gratus* se encontró que la heterocromatina constitutiva se distribuye en las regiones centroméricas de los autosomas (Figura 12).

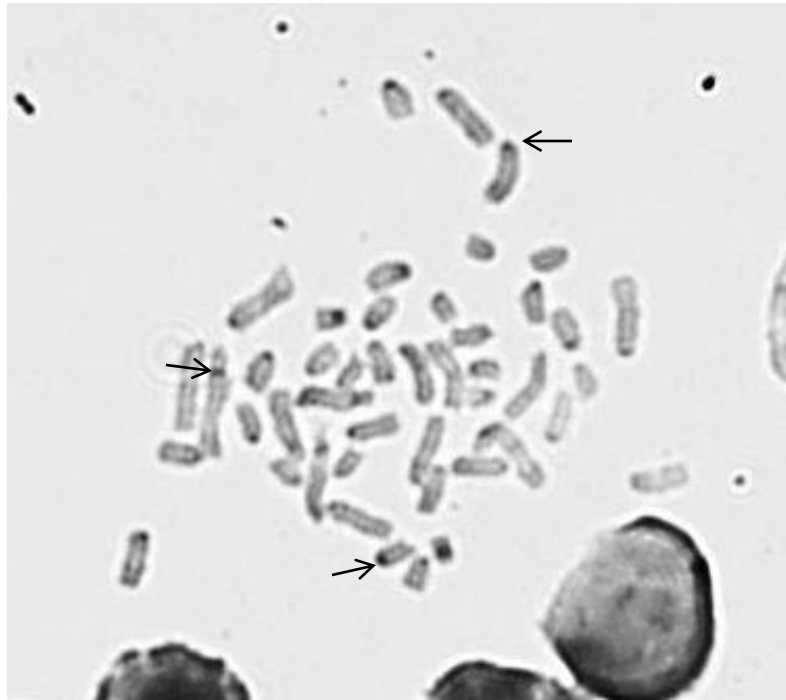


Figura 12. Campo mitótico (100X) con bandas cromosómicas C de hembra *Peromyscus gratus* de Tecamachalco, Puebla. Las flechas indican heterocromatina constitutiva en la región centromérica.

8. DISCUSIÓN

El cariotipo del ratón piñonero *Peromyscus gratus* del Municipio de Tecamachalco, Puebla, tiene un número diploide $2n=48$ que se presenta de manera constante en las especies del género *Peromyscus* (Robbins y Baker, 1981).

En el presente estudio se obtuvo un número fundamental $NF=54$, cuatro pares de autosomas birrámeos y 19 pares de autosomas monorrámeos (telocéntricos) los cuales son similares con los reportados para poblaciones de *P. gratus* de Coahuila (Lee et al., 1972), Chihuahua, Durango (Zimmerman et al., 1975) y Nuevo México Hsu y Arrighi (1968), Modi y Lee (1984). Aunque no se especifica la morfología de los autosomas birrámeos en otros estudios, se menciona que dos pares son pequeños y dos pares van de medianos a grandes, similares a lo reportado para *P. gratus* de Tecamachalco, Puebla. Lo cual indica que *P. gratus* no presenta variación cariotípica en las constantes cromosómicas y la morfología del complemento autosómico; posiblemente se debe a que están conectados por una cierta cantidad de migración o que su diversificación haya sido relativamente recientemente (Awise et al., 1979), como ocurre con el grupo *Peromyscus boylii*, el cual se ha sugerido que su distribución en México es resultado de una invasión relativamente reciente (Plioceno), proveniente del norte (posiblemente de los que hoy es Arizona o Utah), que resultó en la ocupación de lo que hoy es la Mesa del Norte, Mesa Central y Planicie Costera del Pacífico (López, 2013); asimismo, Álvarez-Castañeda y González-Ruiz (2008) mencionan que hubo una radiación rápida o simultánea entre los grupos de especies de *P. aztecus*, *P. boylii* y *P. truei*.

Con respecto a la morfología del par sexual, se obtuvo el cromosoma sexual X subteloicéntrico grande y el cromosoma sexual Y submetacéntrico pequeño, a diferencia de lo reportado para la población de Nuevo Mexico donde se obtuvo el cromosoma sexual X submetacéntrico grande y el cromosoma sexual Y metacéntrico pequeño (Cuadro 2; Hsu y Arrighi, 1968; Modi y Lee, 1984). Esto puede deberse a inversiones pericéntricas que se reconocen como polimorfismo en los cromosomas sexuales, ya que no todas las reorganizaciones cromosómicas

producen gametos desequilibrados. En algunas especies de primates y en roedores del género *Ctenomys* se han observado numerosos cambios cromosómicos intraespecíficos que se conservan como polimorfismos y que parecen no tener consecuencias que provoquen aislamiento reproductivo (García *et al.*, 1979; Ponsá *et al.*, 1995; García *et al.*, 2000), por tanto esto puede estar ocurriendo con la poblaciones de *P. gratus*, ya que fue la única variación cariotípica observada, comparando poblaciones de Estados Unidos y México.

Cuadro 2. Comparación cromosómica entre las poblaciones de *Peromyscus gratus*.

Taxa	Lugar	2n	NF	Birrám- meos	m	sm	st	t	X	Y	Autor
<i>Peromyscus gratus</i>	Nuevo Mexico	48	54	4				19			Hsu y Arrighi (1968)
<i>Peromyscus gratus</i>	Coahuila	48	54	4				19	st		Lee <i>et al</i> (1972)
<i>Peromyscus gratus</i>	Chihuahua Durango	48	54	4				19			Zimmerman (1975)
<i>Peromyscus gratus</i>	Nuevo Mexico	48	54	4				19	sm	m	Modi y Lee (1984)
<i>Peromyscus gratus</i>	Puebla	48	54	4	1	1	2	19	st	sm	Presente estudio

En el género *Peromyscus* existe gran variación inter e intraespecífica respecto al número de brazos autosómicos, y en la morfología de los cromosomas sexuales X y Y. Dentro del grupo de especies de *P. truei* se puede observar que el número fundamental va de NF= 50-62, presentándose de dos a ocho pares de autosomas birrámeos y de 15 a 21 pares de autosomas telocéntricos (Cuadro 3), estas variaciones cariotípicas pueden deberse a diversos rearrreglos cromosómicos como las adiciones o deleciones de heterocromatina constitutiva en los brazos cromosómicos (Lawlor, 1974), así como las fusiones e inversiones pericéntricas que se han identificado como los factores responsables de convertir los cromosomas monorrámicos en birrámeos (Patton y Rogers, 1993).

P. truei y *P. gratus* son especies hermanas en ellas se ha observado que los reordenamientos cromosómicos han jugado un papel importante en el aislamiento reproductivo pero con poco desarrollo en cambios morfológicos y génicos, sin embargo con estudios bioquímicos la especiación en el género *Peromyscus* y los roedores en general parece estar ocurriendo con cambios importantes hacia diferentes zonas adaptativas con cambios morfológicos asociados y a menudo cambios cromosómicos (Zimmerman *et al.*, 1978).

Cuadro 3. Comparación cromosómica de especies del grupo *P. truei*.

Taxa	2n	NF	Birrámicos	m	sm	st	t	X	Y	Autor
<i>Peromyscus gratus</i>	48	54	4	1	1	2	19	st	sm	Presente estudio
<i>Peromyscus attwateri</i>	48	56	5				18	sm	sm	Robbins y Baker (1981)
<i>Peromyscus difficilis</i>	48	50	2	1		1	21	sm	st	Alonso (2009)
<i>Peromyscus pectoralis</i>	48	58	6				17	st	m	Robbins y Baker (1981)
<i>Peromyscus truei</i>	48	62	8				15	st	t	Hoffmeister (1981); Robbins y Baker (1981); Modi y Lee (1984)

Respecto al patrón de bandas cromosómicas G, en *P. gratus* de Nuevo Mexico se reportó de 10 a 13 bandas en cromosomas grandes, de tres a ocho bandas en cromosomas medianos y de tres a cuatro bandas en cromosomas pequeños, a diferencia de *P. gratus* de Tecamachalco en donde se obtuvo en cromosomas grandes de 7 a 11 bandas, en cromosomas medianos de cuatro a seis bandas y en cromosomas pequeños de una a tres bandas de eucromatina claras y oscuras. Esta variación puede ocurrir debido a la cantidad y distribución de eucromatina que contengan los cromosomas así como a posibles rearrreglos estructurales, sin embargo hay diversos factores que pueden provocar variación en el patrón de bandeado G (Cortés, 1984).

En cuanto al patrón de bandas cromosómicas C, la heterocromatina constitutiva se localizó en la región centromérica de los cromosomas de *P. gratus* de Tecamachalco Puebla, así como para las demás poblaciones de la especie; estos mismos resultados se han reportado para las demás especies que integran el grupo *P. truei*, lo que indica que es un rasgo conservado en la evolución del grupo.

9. CONCLUSIÓN

Peromyscus gratus no presenta variación cariotípica ya que tiene un número diploide de $2n=48$, y un número fundamental $NF= 54$, con cuatro pares de cromosomas birrámeos y 19 pares telocéntricos, sin embargo hay diferencia en la morfología del par sexual con respecto a las poblaciones de Nuevo Mexico donde se reportó el cromosomas sexual X submetacéntrico y el cromosomas Y metacéntrico, obteniéndose en el presente estudio el cromosoma sexual X subteloicéntrico y el cromosoma sexual Y submetacéntrico.

En cuanto al patrón de bandas cromosómicas G se observó que los autosomas grandes se presentan entre 7 a 11 bandas totales, los autosomas medianos de cuatro a seis bandas en total y los autosomas pequeños de una a dos bandas de eucromatina claras y oscuras totales.

El patrón de bandas cromosómicas C se observó que la heterocromatina constitutiva se localiza en las regiones centroméricas de los cromosomas, similar a lo descrito anteriormente para la especie *Peromyscus gratus* y para otras especies del género *Peromyscus*.

10. LITERATURA CITADA

- Aiassa, D., Bosch, B., Gentile, N., Mañas, F. y Gorla, N. 2015. Citogenética, teoría y práctica: manual. CEPYD. Primera edición. Argentina. 171 pp.
- Alonso, C. 2009. Descripción cromosómica de *Peromyscus difficilis* de Tlajomulco del Municipio de Ixtacamaxtitlan, Puebla. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, BUAP. 38 p.
- Álvarez-Castañeda, S. T. y González-Ruiz, N. 2008. Análisis preliminar de las relaciones filogenéticas entre los grupos de especies del género *Peromyscus*. Pp. 5-26. En: Avances en el estudio de los mamíferos de México. Publicaciones especiales vol. II. CIB y Asociación Mexicana de Mastozoología A.C. México.
- Avise, J. C., Smith, M. H. y Selander, R. K. 1979. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus* VII. Geographic differentiation in members of the truei and maniculatus species groups. *Journal of Mammalogy*, 60(1), 177-192.
- Baker, R. J. y Qumsiyeh, M. B. 1988. Methods in chiropteran mitotic chromosomal studies. Pp. 425-435. En: Ecological and behavioral methods for the study of bats (T.H. Kunz, ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C,
- Ceballos, G. 2014. Mammals of Mexico. Johns Hopkins University Press. 974 pp.
- Ceballos, G. y Oliva, G. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. México D.F. 986 pp.
- Cortés, F. 1984. Bando de cromosomas. *Investigación y Ciencia*, 97:20-29.
- Drets, M. E. 2002. Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandedo cromosómico. Significado y proyección bio-médica. *Revista Médica del Uruguay*, 18(2):107-121.
- Durish, N. D., Halcomb, K. E., Kilpatrick, C. W. y Bradley, R. D. 2004. Molecular systematics of the *Peromyscus truei* species group. *Journal of Mammalogy*, 85(6):1160-1169.
- Garay, L. A. 1988. Genética de poblaciones y evolución. Eón Editores. México, 248 pp.

- García, L., Ponsá, M., Egozcue, J. y García, M. 2000. Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(1):103-120.
- García, M., Miró, R., Ponsá, M., y Egozcue, J. 1979. Chromosomal polymorphism and somatic segregation in *Saimiri sciureus*. *Folia primatologica*, 31(4):312-323.
- Gardner, J. E. 2003. Principios de genética. Edit. Limusa. México 649 pp.
- Garmendia, C. A., Cano, S. Z. y Chávez, T. J. 2009. Distribución y abundancia de roedores en ciudad universitaria, D.F., con énfasis en *Peromyscus gratus* (muridae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Global Biodiversity Information Facility GBIF Secretariat. Mammal Species of the World. Checklist Dataset <https://doi.org/10.15468/csfquc> accessed via GBIF.org on 2018-02-12.
- Greenbaum, I. F. y Baker, R. J. 1978. Determination of the primitive karyotype for *Peromyscus*. *Journal of Mammalogy*, 59(4):820-834.
- Greenbaum, I. F., Gunn, S. J., Smith, S. A., McAllister, B. F., Hale, D. W, Baker, R. J., Engstrom, M. D., Hamilton, M. J., Modi, W S., Robbins, L. W, Rogers, D. S., Ward, O. G., Dawson, W. D., Elder, F. F. B., Lee, M. R., Pathak, S. y Stangl Jr., F. B. 1994. Cytogenetic nomenclature of deer mice, *Peromyscus* (Rodentia): revision and review of the standardized karyotype. Report of the Committee for the Standardization of chromosomes of *Peromyscus*. *Cytogenetic Cell Genetic* 66:181-195.
- Hoffmeister, D. F. 1981. *Peromyscus truei*. *Mammalian Species*, 161:1-5.
- Hsu, T. C., y Arrighi, E. 1968. Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetics*, 7:417-466.
- INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tecamachalco. Puebla.
- Janecek, L.L.1990. Genic variation in the *Peromyscus truei* group (Rodentia: Cricetidae). *Journal of Mammalogy*, 71(3):301-308.

- Lacher, T., Timm, R. y Álvarez-Castañeda, S.T. 2016. *Peromyscus gratus*. (errata version published in 2017). The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T16663A115136134. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T16663A22360083.en>. Downloaded on 28 June 2017.
- Lacadena, J. R. 1996. Citogenética. Editorial Complutense. Madrid España. 824 pp.
- Lawlor, T. E. 1974. Chromosomal evolution in *Peromyscus*. *Evolution*, 28(4):689-692.
- Lee, M. R. 1969. A widely applicable technic for direct processing of bone marrow for chromosomes of vertebrates. *Stain technology*, 44(3):155.
- Lee, M. R., Schmidly, D.J. y Huheey, C. C. 1972. Chromosomal variation in certain populations of *Peromyscus boylii* and its systematic implications. *Journal of Mammalogy*, 53(4):697-707.
- León T.M.A. 2014. Los roedores múridos de México: los pequeños mamíferos exitosos. CONABIO. *Biodiversitas*, 113:8-11.
- Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2):201-220.
- López González, C. 2013. Mamíferos de Chihuahua y Durango II: Diversidad del Género *Peromyscus* (Rodentia). Informe proyecto SIP.CIIDIR Unidad Durango.
- Modi, W. S. y Lee, M. R. 1984. Systematic implications of chromosomal banding analyses of populations of *Peromyscus truei* (Rodentia: Muridae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 97(4):716-723.
- Núñez-Garduño, A. 2005. Los mamíferos silvestres de Michoacán, diversidad, biología e importancia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo/Secretaría de Difusión Cultural y Extensión Universitaria, Morelia, Michoacán, México.
- Patton, J. L. y Rogers, D. S. 1993. Cytogenetics. Pp. 236–258. En: Genoways, H. H. and Brown, J. H. (eds.). Biology of the Heteromyidae, Special Publication. The American Society of Mammalogists, 10:1–719.

- Pierce, B. 2009. *Genética: Un enfoque conceptual*. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. España. 832 pp.
- Ponsá, M., García, M., Borell, A., García, F., Egozcue, J., Gorostiaga, M. A., Delprat, A. y Mudry, M. 1995. Heterochromatin and cytogenetic polymorphisms in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). *American Journal of Primatology*, 37(4):325-331.
- Ramírez-Pulido, J., González-Ruiz, N., Gardner, A. L. y Arroyo-Cabrales, J. 2014. List of recent land mammals of Mexico. 2014. *Special publication Museum of Texas Tech University*, 63:1-69.
- Robbins, L. W. y Baker, R. J. 1981. An assessment of the nature of chromosomal rearrangements in 18 species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 31(4):194-202.
- Santos, M. J. A. y Hortelano, Y. 1997. La variación en mamíferos: una revisión de los enfoques metodológicos actuales. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 70:13-34.
- Zimmerman, E. G., Hart, B. J. y Kilpatrick, C. W. 1975. Biochemical genetics of the truei and boylei groups of the genus *Peromyscus* (Rodentia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 52(4):541-545.
- Zimmerman, E. G., Kilpatrick, C. W. y Hart, B. J. 1978. The genetics of speciation in the rodent genus *Peromyscus*. *Evolution*, 32(3):565-579.

ANEXO

SOLUCIÓN HIPOTÓNICA

0.075M KCl

Se pesan 0.56 gr de KCl y se afora en 100ml de agua destilada.

Se puede utilizar máximo dos días si no está contaminada y se guarda en refrigeración.

FIJADOR DE CARNOY

Proporción 3: Metanol

1: Ácido acético

Se debe preparar 30 minutos antes de ser utilizado, manteniéndolo en el congelador (-20°C) usándose 2 o 3 horas después de preparado.

COLORANTE GIEMSA PARA TINCIÓN CONVENCIONAL

Solución amortiguadora

10 M NaH_2PO_4

Se pesa 1.38 gr del reactivo y se afora a 100 ml de agua destilada. Solución A.

Se utilizan 15 ml.

10M Na_2HPO_4

Se pesa 1.42 gr del reactivo y se afora a 100 ml de agua destilada. Solución B.

Se utilizan 10 ml.

Esta solución se puede mantener en refrigeración (4°C) hasta que no se observe contaminada.

Solución concentrada de Giemsa (Microlab) 1 ml. Se puede mantener al ambiente indefinidamente.

Solución amortiguadora (pH 6.5-6.8) 2 ml.

Agua destilada 47 ml.

Se puede usar un día conservándola a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN STOCK 10XSSC PARA BANDAS C

NaCl 1.5M

Se pesan 8.7675 gr de este reactivo

Citrato de sodio 0.15 M

Se pesan 4.4117 gr de este reactivo.

Las dos sales se diluyen en 100 ml de agua destilada. Esta solución debe permanecer en refrigerador (4°C). Tomar 10 ml de 10XSSC y 40 ml de agua destilada para obtener una solución 2XSSC. Esta solución sólo se utiliza durante un día.

GIEMS 4% CON BUFFER DE FOSFATO DE SODIO PARA BANDAS C

NaH₂PO₄ 0.01 M

Se pesan 0,1419 gr de este reactivo y se diluyen en 100 ml de agua destilada.

Combinar en proporción: 68ml del primero y 100 ml del segundo.

Tomar 2 ml de Giemsa (Microlab) y 48 ml de este buffer para teñir.

Este buffer se puede utilizar durante un día a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN DE ÁCIDO CLORHIDRICO 0.2N

Preparar solución stock de HCl 5N.

Tomar 2 ml de 5N y 48 ml de agua destilada para obtener 0.2N. La solución stock se mantiene a temperatura ambiente hasta que no se observe contaminada y la solución 0.2N se puede conservar durante un día a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN SATURADA DE HIDROXIDO DE BARIO

5 gr

50 ml de agua destilada.

Se mantiene a temperatura ambiente durante 2 semanas.

BUFFER GIEMSA 2% PARA BANDAS G

1 ml 0.14 M de buffer de fosfato de sodio

Se pesan 3.725 gr de NaH_2PO_4 y se diluye en 100 ml de agua destilada con pH 9.0.

Se puede conservar a temperatura ambiente hasta que se observe contaminado.

1 ml de Giemsa (Microlab).

48 ml de agua destilada

Esta solución sirve para 10 u 11 laminillas y se debe preparar cuando se va usar.

Debe agitarse hasta que salga espuma antes de usarse y puede mantenerse a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN STOCK DE TRIPSINA

0.05 gr de tripsina Difco (1.250)

50 ml de Buffer de fosfato salino (PBS)

Se pesa 4 gr de NaCl, 0.1 gr de KCl, 0.575 gr de Na_2HPO_4 , 0.1 gr de KH_2PO_4 y se diluyen en 500 ml de agua destilada. Este Buffer debe mantenerse en refrigeración a 4°C.

La solución stock de tripsina debe permanecer en el congelador y puede ser usada mientras no se observe la aparición de hongos o bacterias.

Diluir una parte de la solución "stock" de tripsina con tres partes de PBS para obtener una concentración final 0.25% solamente debe utilizarse un día.