



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CROMOSOMAS DE *Peromyscus difficilis* DEL MUNICIPIO
DE TEPATLAXCO, PUEBLA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIÓLOGIA

PRESENTA
LUIS ARMANDO HUERTA ROBLES

DIRECTOR DE TESIS
DR. JESÚS MARTÍNEZ VÁZQUEZ



PUEBLA

NOVIEMBRE, 2025

DEDICATORIA

A mis abuelos Guadalupe Díaz Rodríguez y Hermilo Robles Tlacomulco, por su apoyo incondicional, sus consejos, palabras de aliento y por la confianza que siempre depositaron en mí.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por ser la institución donde pude llevar mi formación, así como a todos los profesores que contribuyeron a esta.

Al Dr. Jesús Martínez Vázquez, por permitirme realizar este proyecto, por todo el apoyo brindado en el mismo, por sus asesorías y más.

A la M. en C. Rosa María González Monroy, por el apoyo en laboratorio y sus correcciones para el mejoramiento del proyecto.

A la bióloga Judith Méndez Pacio, por el apoyo en el laboratorio y consejos.

Al M. en C. Héctor González Orea, por su amistad y apoyo incondicional.

A mis padres, Blanca Robles Díaz y Daniel Varona Flores, por su constante apoyo y confianza.

A mi familia y hermanos, por sus palabras de aliento y motivación.

A mis amigos María de la Luz González, María de Jesús Luciano y Luis Fernando Mota, por su amistad sincera.

A mis compañeros de laboratorio, por el intercambio de ideas y colaboración.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia biológica del cariotipo	2
1.2 Morfología cromosómica: clasificación de Levan <i>et al.</i> (1964)	2
1.3 Técnicas citogenéticas	3
1.4 Importancia del género <i>Peromyscus</i> como modelo	4
1.5 Biología de la especie	5
1.6 Descripción morfológica	5
1.7 Clasificación taxonómica	6
1.8 Distribución	7
2. ANTECEDENTES	8
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 Objetivo general	11
4.2 Objetivos particulares	11
5. ÁREA DE ESTUDIO	12
5.1 Ubicación	12
5.2 Extensión	13
5.3 Orografía	13
5.4 Clima	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 Trabajo en campo	14
6.2 Trabajo en laboratorio	14
6.3 Elaboración de laminillas	15
6.4 Construcción del cariotipo	15
6.5 Bando cromosómico G	16
6.6 Bando cromosómico C	17
7. RESULTADOS	18
8. DISCUSIÓN	28

9	CONCLUSIONES	31
10.	REFERENCIAS	32
11.	ANEXOS	37

RESUMEN

El análisis de los cromosomas es una herramienta útil en el estudio genético y sistemático de mamíferos, dado que proporciona información significativa sobre su evolución y taxonomía. Los análisis cromosómicos permiten conocer y comparar las diferencias y semejanzas en cuanto a la forma y tamaño de sus cromosomas. El presente estudio tuvo como objetivo describir el cariotipo de *Peromyscus difficilis* en Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla. Se colectaron dos ejemplares (un macho y una hembra) mediante trampas Sherman y se obtuvieron seis laminillas con células en metafase. A partir de ellas se identificaron 167 campos mitóticos, de los cuales se seleccionaron 30 para su análisis. Se construyó el cariotipo con base en la morfología cromosómica y se calcularon las longitudes relativas de los brazos cortos y largos de cada cromosoma, empleando el índice centromérico (IC). Se obtuvo un $2n = 48$, y $NF = 60$, conformado de siete pares de cromosomas birrámeos, un par metacéntrico (m) tres pares submetacéntricos (sm) y tres pares subtlocéntricos (st), 16 pares telocéntricos, el cromosoma sexual X fue subtlocéntrico y el sexual Y fue telocéntrico. Se utilizaron técnicas de bandeo cromosómico G y C las cuales sirven para complementar la identificación de los pares homólogos y la localización de heterocromatina constitutiva, respectivamente. En el análisis de bandeo G se observó un patrón de tinción diferencial que permitió identificar los pares homólogos mediante la distribución característica de regiones oscuras y claras en los brazos cromosómicos. Las regiones oscuras corresponden a zonas ricas en adenina y timina (A-T) y pobres en guanina y citosina (G-C), tiñéndose más intensamente por su alta condensación de eucromatina. En cambio, las regiones claras corresponden a zonas ricas en guanina y citosina (G-C) y pobres en adenina y timina (A-T), tiñéndose más débilmente debido a su menor condensación eucromatina, un tipo de cromatina menos densa que contiene genes activos y es responsable de la mayoría de las funciones transcripcionales del ADN. La heterocromatina constitutiva se localizó principalmente en las regiones centroméricas en los autosomas y en los cromosomas sexuales X y Y, en donde se observa mayor presencia de heterocromatina constitutiva para el cromosoma sexual Y en comparación con el cromosoma sexual X. Los resultados obtenidos aportan nueva información sobre la estructura cromosómica de *P. difficilis* de la localidad de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla. La variabilidad observada

en la morfología cromosómica, comparada con otras poblaciones del complejo *Peromyscus difficilis*, sugiere una posible evolución cromosómica diferenciada, posiblemente vinculada a procesos de aislamiento geográfico, reordenamientos cromosómicos o adaptación local.

Palabras clave: Bando cromosómico, cromosomas, ideograma, *Peromyscus difficilis*.

1. INTRODUCCIÓN

La citogenética es la disciplina que estudia la estructura, función y comportamiento de los cromosomas, así como sus aplicaciones en la genética y sistemática de los organismos (Gill y Friebe, 1998). Su desarrollo ha permitido un mayor entendimiento de la organización de los genomas (Herrera, 2007). A través de la citogenética se pueden identificar genes y regiones estructurales específicas dentro de los cromosomas, lo que resulta esencial para caracterizar especies desde una perspectiva genética.

En estudios sobre fauna silvestre, la citogenética ha sido una herramienta fundamental que sirve de apoyo para establecer relaciones filogenéticas y describir variabilidad intraespecífica mediante el análisis del número diploide y la morfología de los cromosomas (Barragán, 2005).

El género *Peromyscus*, conocido como “ratones ciervo”, incluye más de 50 especies distribuidas en América del Norte y Central (Musser y Carleton, 2005). Su diversidad genética, morfológica y ecológica ha convertido a este grupo en un modelo importante. Las primeras descripciones cariotípicas del género se realizaron mediante tinciones convencionales con colorante Giemsa, y posteriormente mediante técnicas de bandeado cromosómico, las cuales permiten identificar pares homólogos, detectar anomalías estructurales y reconocer variaciones inter e intrapoblacionales (Barragán, 2005).

Diversos estudios han sugerido que el cariotipo ancestral de *Peromyscus* se caracteriza por cromosomas con heterocromatina en la región centromérica, ¿y que la presencia de brazos cortos heterocromáticos? puede haberse originado de manera independiente en distintas especies del género, posiblemente como una adaptación con valor selectivo. Estas observaciones refuerzan la utilidad de los estudios citogenéticos en la delimitación de especies crípticas (Greenbaum, 1978).

El estudio de los cromosomas ha sido una herramienta fundamental en la sistemática. A través de los análisis cariotípicos, es posible identificar características específicas

de especies y subespecies, comprender mecanismos de especiación, así como, detectar reordenamientos cromosómicos que pueden tener implicaciones adaptativas o reproductivas (Sumner, 2003).

1.1 Importancia biológica del cariotipo

El cariotipo se define como el conjunto de cromosomas y sus características morfológicas de los cromosomas de una célula, observable durante la metafase de la mitosis. Estas características incluyen el número, el tamaño, la forma y la posición del centrómero de cada cromosoma. El análisis cariotípico permite establecer patrones cromosómicos que pueden utilizarse en la identificación de especies, la detección de aberraciones estructurales y el estudio de relaciones filogenéticas (Sumner, 2003).

En organismos diploides, el número cromosómico total se denomina número diploide (2n), e incluye tanto a los autosomas como al par sexual (XX o XY). A su vez, el número fundamental (NF) hace referencia al total de brazos de los autosomas únicamente, considerando que los cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y subtelocéntricos presentan dos brazos (p y q), mientras que los telocéntricos presentan un brazo (q; Levan *et al.*, 1964).

1.2 Morfología cromosómica: clasificación de Levan *et al.* (1964)

La posición del centrómero es un criterio esencial en la clasificación morfológica de los cromosomas. Levan *et al.* (1964) propusieron un sistema basado en el índice centromérico (IC), definido como:

$$IC = \frac{\text{brazo corto (p)}}{\text{brazo largo (q)} + \text{brazo corto (p)}} * 100$$

En función de este índice, es la clasificación de los cromosomas en:

- Metacéntricos (m): IC \geq 37.5
- Submetacéntricos (sm): IC entre 25.0 y 37.4

- Subtelocéntricos (st): IC entre 12.5 y 24.9
- Telocéntricos (t): IC < 12.5 (Levan *et al.*, 1964).

La clasificación cromosómica basada en la morfología, propuesta por Levan *et al.* (1964), es una herramienta ampliamente utilizada en citogenética comparada para analizar variabilidad cromosómica entre poblaciones o especies.

En este contexto, la elaboración de ideogramas resulta esencial para una representación gráfica. Estos esquemas gráficos permiten representar de forma estilizada la estructura organizada del cariotipo de una especie. Aunque no reproducen la forma física exacta de los cromosomas, los ideogramas resumen visualmente aspectos clave como la morfología general, la longitud relativa, la posición del centrómero y el patrón de bandas cromosómicas, obtenidas mediante técnicas específicas como las bandas (Thompson *et al.*, 2021). Su aplicación facilita la comparación entre poblaciones y contribuye significativamente al estudio sistemático.

1.3 Técnicas citogenéticas

Para el análisis cromosómico, es común el uso de preparaciones de células en metafase (mitosis) obtenidas a partir de médula ósea o tejidos con divisiones celulares activas. La aplicación de un tratamiento con colchicina permite detener la mitosis en metafase, así como la aplicación de una solución hipotónica provoca la entrada de agua a las células con el fin de aumentar su volumen. Una vez obtenidas las células se pueden fijar con una solución de Carnoy y se tiñen con colorantes como Giemsa, que permiten observar su morfología general (Lee, 1969).

Además, existen técnicas de bandeo cromosómico, como:

- Bando G (Tripsina + Giemsa): esta técnica permite visualizar un patrón de bandas oscuras y claras en los cromosomas, resultado del tratamiento con tripsina y la tinción con Giemsa. Las bandas oscuras revelan regiones ricas en adenina y timina (A-T), que son más condensadas, tardíamente replicantes y

contienen heterocromatina constitutiva o facultativa, mientras que las bandas claras corresponden a zonas ricas en guanina y citosina (G-C), que son menos condensadas, tempranamente replicantes y contienen principalmente eucromatina, donde se localizan muchos genes activos.

- Bando C: identifica regiones de heterocromatina constitutiva en los cromosomas, la heterocromatina se caracteriza por contener secuencias de ADN altamente repetidas, como el ADN satélite, principalmente centrómeros (Sumner, 2003).

Las bandas cromosómicas G ayudan para detectar reordenamientos como inversiones, traslocaciones o fusiones, y han sido ampliamente utilizadas en el estudio del género *Peromyscus* (Baker y Qumsiyeh, 1988).

1.4 Importancia del género *Peromyscus* como modelo

El género *Peromyscus* comprende más de 50 especies distribuidas principalmente en América del Norte y Central. Se ha consolidado como un modelo en estudios de genética, ecología y evolución debido a su diversidad y plasticidad adaptativa. Dentro del género *Peromyscus* el grupo *truei* al que pertenece *P. difficilis*, presenta una notable variabilidad en el NF, sin cambios en su número diploide ($2n = 48$), lo que sugiere procesos de evolución cariotípica derivados de reordenamientos estructurales. Entre ellos los más relevantes son: inversiones pericéntricas, fusiones y fisiones cromosómicas, translocaciones recíprocas, duplicaciones y deleciones, hibridación y reordenamientos estructurales asociados (Durish *et al.*, 2004).

1.5 Biología de la especie

1.6 Descripción morfológica

Peromyscus difficilis es un roedor cricétido comúnmente llamado ratón de roca del sur o venado zacatecano (Allen, 1891). Tiene un tamaño corporal mediano para el género (28-43 g), presenta orejas grandes y una cola larga uniformemente bicolor, la cual es más larga que la cabeza más la longitud del cuerpo. Es una de las 56 especies del género *Peromyscus* e incluye cinco subespecies (Ceballos y Arroyo, 2012; Figura 1).



Figura 1. *Peromyscus difficilis* (Allen, 1891), observada en México por Juan Cruzado Cortés.

1.7 Clasificación taxonómica

La clasificación es de acuerdo con Ramírez-Pulido *et al.* (2014).

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Mammalia

Orden: Rodentia

Familia: Muridae

Género: *Peromyscus*

Especie: *Peromyscus difficilis* (Allen, 1891)

1.8 Distribución

Peromyscus difficilis es una especie endémica de México la cual se encuentra a lo largo de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y las sierras adyacentes desde el suroeste de Chihuahua y sureste de Coahuila, al sur por Durango y Zacatecas. Su gama continúa hacia el sur desde Zacatecas hacia partes de San Luis Potosí y regiones montañosas de Guanajuato, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala y Veracruz, hacia el centro-norte de Oaxaca (Hall, 1981; Hoffmeister y de la Torre, 1961; Osgood, 1909; Figura 2).

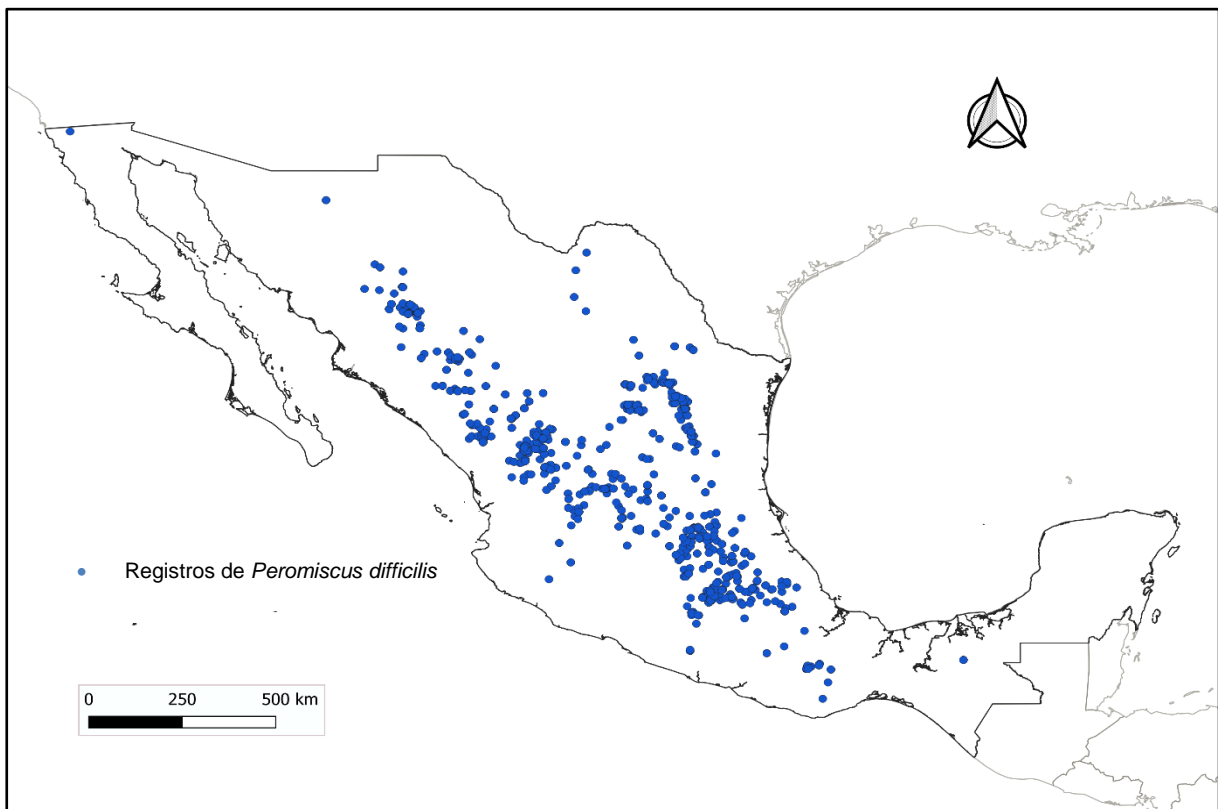


Figura 2. Distribución geográfica de *Peromyscus difficilis* en México. Elaboración con base en datos del Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB), obtenidos desde Enciclovida (<https://enciclovida.mx/especies/33816>), consultado en junio de 2025.

2. ANTECEDENTES

El género *Peromyscus* ha sido objeto de numerosos estudios debido a su amplia distribución en América del Norte y su relevancia en investigaciones ecológicas, evolutivas y genéticas. Dentro de este género, la especie *Peromyscus difficilis* destaca por presentar una notable variabilidad cariotípica, manteniendo un $2n = 48$, exhibiendo diferencias significativas en el número fundamental, atribuibles a reordenamientos estructurales de los cromosomas. Estas diferencias incluyen fusiones cromosómicas, donde dos cromosomas se combinan formando uno solo; fisiones, en las que un cromosoma se divide en dos; así como cambios en los centrómeros, que modifican la posición del punto de unión de las cromátidas y pueden alterar la forma y segregación de los cromosomas durante la meiosis. También se han documentado translocaciones, movimientos de segmentos cromosómicos entre cromosomas no homólogos. Estas reorganizaciones podrían estar asociadas con adaptaciones locales a distintos hábitats montañosos. Además, estudios sugieren que esta variabilidad cariotípica puede tener implicaciones en la reproducción y aislamiento genético de poblaciones geográficamente separadas, contribuyendo a la divergencia evolutiva dentro de la especie (Arellano-Meneses *et al.*, 2000; Robbins y Baker, 1975; Zimmerman *et al.*, 1975).

En México, se han documentado diversas descripciones cariotípicas en subespecies de *P. difficilis*:

- Arellano-Meneses *et al.* (2000) describieron a *P. difficilis amplus* (Totalco, Veracruz) con un cariotipo de $2n = 48$ y $NF = 66$, compuesto por dos pares de autosomas metacéntricos, ocho pares subtelocéntricos y trece pares telocéntricos, con cromosoma X subtelocéntrico y cromosoma Y telocéntrico.
- Robbins y Baker (1975) describieron a *P. difficilis difficilis* (El Salto, Durango) con un cariotipo de $2n = 48$ y $NF = 58$, compuesto por seis pares de cromosomas birrámeos (tres pares metacéntricos y tres pares submetacéntricos) y 17 pares de cromosomas monorrámeos telocéntricos.
- Zimmerman *et al.* (1975) describieron a *P. difficilis petricola* (Concepción del Oro, Zacatecas) con un cariotipo de $2n = 48$ y $NF = 56$, compuesto por dos

pares de cromosomas birrámeos (un par metacéntrico y un par submetacéntrico) y 22 pares de cromosomas monorrámeos telocéntricos.

- Mudespacher-Ziehl *et al.* (2005) describieron a *P. difficilis felipensis* (Estados de México, Morelos y Oaxaca) con un cariotipo de $2n = 48$ y $NF = 76$, compuesto por un par de autosomas metacéntricos, un par submetacéntrico, 13 pares subtlocéntricos y ocho pares telocéntricos, con cromosoma X subtlocéntrico y cromosoma Y metacéntrico.
- Rodríguez (2005) describió a *P. difficilis* en San Salvador Atoyatempan, Puebla, con un cariotipo de $2n = 48$ y $NF = 56$, compuesto por cinco pares de cromosomas birrámeos (dos pares metacéntricos pequeños, un par submetacéntrico grande y dos pares subtlocéntricos) y 18 pares de cromosomas telocéntricos, con X subtlocéntrico grande y Y telocéntrico pequeño.
- García (2018) describió a *P. difficilis* en San Pedro Atlixco Tianguismanalco, Puebla, con un cariotipo de $2n = 48$ y $NF = 52$, compuesto por dos pares de cromosomas birrámeos (un par metacéntrico y un par submetacéntrico) y 19 pares de cromosomas monorrámeos telocéntricos.
- Rodríguez (2005) describió a *P. difficilis* en Camotepec, Zacatlán, Puebla, con un cariotipo de $2n = 48$ y $NF = 52$, compuesto por cuatro pares de cromosomas birrámeos (dos pares metacéntricos y dos pares submetacéntricos) y 17 pares de cromosomas monorrámeos telocéntricos.

Los estudios anteriores reflejan la variabilidad de *P. difficilis* en Puebla, sugiriendo la influencia de factores geográficos y ecológicos en la variación cromosómica de la especie. La información recopilada proporciona un marco de referencia esencial para futuras investigaciones citogenéticas en la región.

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio citogenético constituye una herramienta para el análisis de especies, ya que permite identificar variaciones en el número, morfología y organización de los cromosomas, proporcionando evidencia valiosa para la sistemática y conservación de la diversidad biológica. En el caso del género *Peromyscus*, ampliamente distribuido en América del Norte y con una alta diversidad de especies y subespecies, se ha documentado una notable variabilidad cromosómica intra e interespecífica, lo cual ha permitido detectar posibles eventos de especiación. Entre los posibles eventos de especiación se incluyen la alopátrica, peripátrica, parapátrica, simpátrica y cromosómica, todas ellas asociadas a la separación genética o estructural que facilita la formación de nuevas especies.

Peromyscus difficilis, es una especie endémica de México incluye varias subespecies que presentan diferencias significativas en su número fundamental, pero comparten un número diploide constante $2n = 48$. Estas diferencias han sido reportadas en poblaciones de varias regiones del país, como Veracruz, Durango, Oaxaca y el Estado de México, sugiriendo procesos de diversificación genética compleja dentro de la especie.

En este contexto, el presente estudio contribuye al conocimiento citogenético de *P. difficilis* mediante la descripción del cariotipo de ejemplares en Tepatlaxco, Puebla, una localidad que hasta ahora no contaba con reportes citogenéticos. La generación de esta información no solo amplía el acervo científico sobre la variabilidad cromosómica de la especie, sino que también sienta las bases para futuras investigaciones taxonómicas, especialmente en un género tan diverso y complejo como *Peromyscus*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Describir el cariotipo de *Peromyscus difficilis* en Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.

4.2 Objetivos particulares

- Caracterizar la morfología cromosómica de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.
- Obtener el bandeo cromosómico G y C de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.

5. ÁREA DE ESTUDIO

5.1 Ubicación

El municipio de Tepatlaxco de Hidalgo se localiza en la región centro-norte del estado de Puebla. Sus coordenadas geográficas extremas son entre los 19°00' y 19°06' de latitud norte, y los 96°49' y 96°54' de longitud oeste (INEGI, 2020^a; Figura 3).

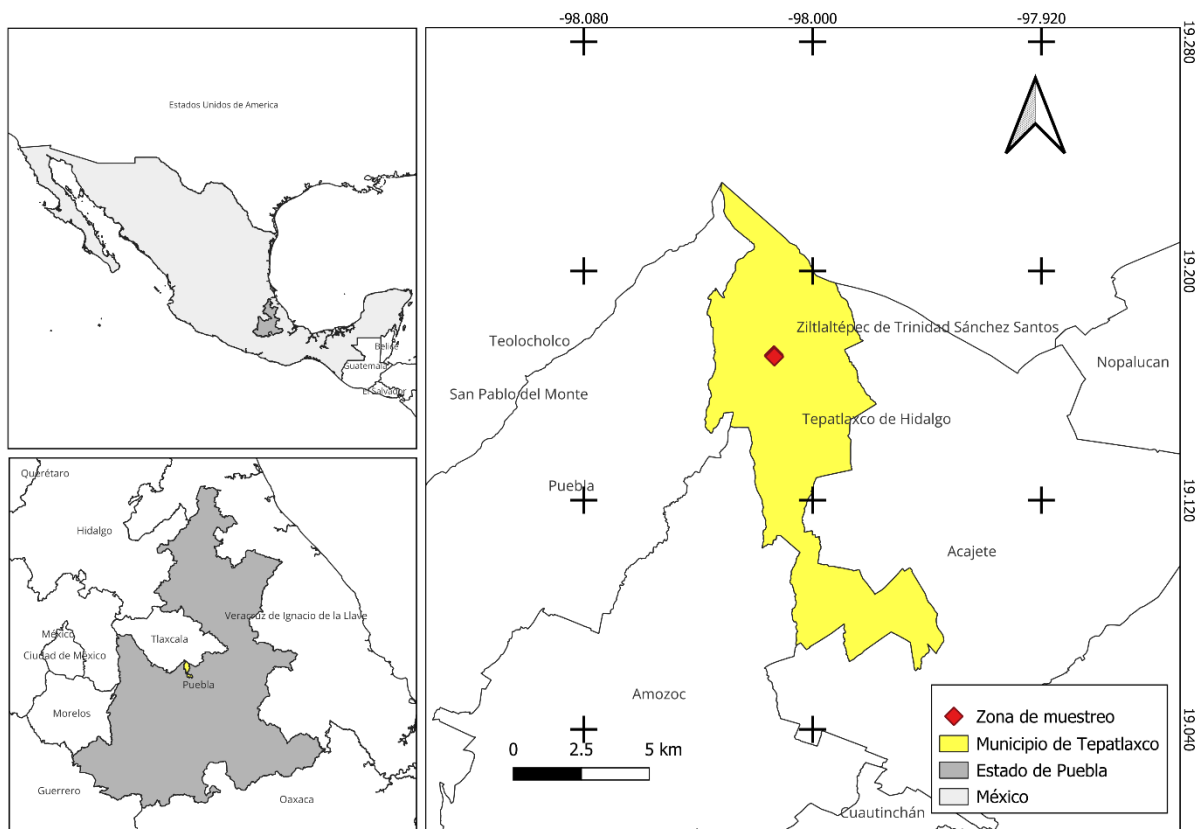


Figura 3. Ubicación geográfica del municipio de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla, y sitio de muestreo. Fuente: Elaboración con base en INEGI, 2025.

5.2 Extensión

Tepatlxco de Hidalgo cuenta con una superficie aproximada de 69.39 km², lo que representa el 0.18% del territorio estatal. Según el Censo de Población y Vivienda 2020, el municipio tiene una población total de 18,854 habitantes (INEGI, 2020b).

5.3 Orografía

El relieve del municipio es predominantemente montañoso, con altitudes que oscilan entre los 2,200 y 2,800 metros sobre el nivel del mar. Esta topografía forma parte de la transición entre el Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental, caracterizada por sierras y lomeríos intercalados por pequeños valles (INEGI, 2016).

5.4 Clima

El clima predominante en Tepatlaxco de Hidalgo es templado subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual varía entre 12 °C y 18 °C, y la precipitación anual se encuentra entre 800 y 1,200 mm (INEGI, 2016).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se dividió bajo las etapas que constan en trabajo en campo y laboratorio.

6.1 Trabajo en campo

Se realizó un muestreo sistemático mediante captura utilizando 40 trampas Sherman, colocadas en un transecto con intervalos de 10 metros entre cada trampa. Como cebo se utilizó una mezcla de avena y vainilla. Las trampas se colocaron por la tarde y se revisaron a la mañana siguiente. Para cada ejemplar capturado se registró la localidad, coordenadas geográficas, altitud y fecha de colecta (Rojas y Barboza, 2007).

6.2 Trabajo en laboratorio

Para la obtención del material celular se llevó a cabo la técnica de extracción de médula ósea de acuerdo con lo propuesto por Lee (1969); Baker y Qumsiyeh (1988). Todos los ejemplares recolectados fueron identificados sexualmente, posteriormente se obtuvo su peso utilizando una balanza tipo Pesola, inmediatamente se le aplicó una inyección intraperitoneal de colchicina 0.1 ml por cada 10 gramos de peso del ejemplar y se dejó actuar por 35 minutos, esto con la finalidad de inhibir la formación del huso acromático y detener la división celular durante la etapa de la metafase.

Cada ejemplar fue sacrificado por medio de dislocación cervical, se tomaron las medidas morfométricas convencionales (longitud total, longitud de la cola, longitud de la pata trasera, longitud de la oreja en milímetros, peso en gramos y sexo). Posteriormente, se procedió a la extracción de fémures y tibias, de los cuales se les cortó la epífisis en el extremo proximal. Con ayuda de una jeringa y solución hipotónica se realizó la extracción de la médula ósea la cual fue vaciada en tubos para centrífuga de 15 ml., el material se resuspendió con ayuda de una jeringa a los tubos hasta alcanzar un volumen de 5 ml, para la incubación la cual duró 40 minutos a 37°C. Tiempo después se centrifugaron los tubos a una velocidad de 800 rpm durante ocho minutos en una centrífuga Velab. Se eliminó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur y el paquete celular se suspendió con una solución fijadora Carnoy

(metanol-ácido acético en proporción 3:1), aplicándose lentamente por las paredes del tubo.

La solución fijadora Carnoy se preparó 30 minutos antes de ser utilizada para asegurar su efectividad. A todos los organismos recolectados se les realizó la taxidermia científica y fueron registrados en la base de datos y depositados en la colección de mamíferos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP.

6.3 Elaboración de laminillas

Para llevar a cabo la elaboración de laminillas, primero se lavaron los portaobjetos y se colocaron en un frasco de alcohol al 96% previamente refrigerado. Cada tubo con el material celular fue centrifugado nuevamente a 800 rpm durante ocho minutos, posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se suspendió suavemente el material con solución fijadora de Carnoy fresca en proporción al tamaño del botón celular. Enseguida con una pipeta Pasteur se tomó el material celular y desde una altura aproximada a tres metros se dejaron caer tres gotas distribuidas a lo largo del portaobjetos, inmediatamente después se les aplicó calor con el fin de provocar un choque de temperatura, así como un extendido de material celular con ayuda de aire comprimido y se dejó secar a temperatura ambiente.

Cada laminilla se tiñó con una solución Giemsa durante 10 minutos, pasado el tiempo se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar. Posteriormente, se observaron las laminillas en un microscopio óptico con los objetivos de 10X, 40X y 100X para ubicar los campos mitóticos en metafase, una vez localizados se identificaron los mejores campos para ser fotografiados.

6.4 Construcción del cariotipo

Se llevó a cabo una selección de campos mitóticos en donde los cromosomas que estuvieran separados y con mejor nitidez se fotografiaron utilizando un microscopio Leica DM1000 LED integrado a un equipo de cómputo, dichos campos cromosómicos se imprimieron en papel fotográfico. Posteriormente los cromosomas fueron recortados y ordenados por pares homólogos de acuerdo con su tamaño y posición del centrómero según la clasificación de Levan *et al.* (1964).

Los brazos cortos (p) y largos (q) se midieron de 10 cariotipos con ayuda del programa ImageJ y se obtuvieron los promedios correspondientes de dichos brazos para establecer la proporción entre ellos y se calculó el índice centromérico (IC). El cual se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$Ic = \frac{p}{q + p} * 100$$

Dónde:

IC = índice centromérico

p= longitud del brazo corto

q = longitud del brazo largo

Está dado por la longitud del brazo corto entre la longitud total del cromosoma y lo obtenido multiplicado por 100.

Para la construcción del cariotipo los cromosomas fueron ordenados siguiendo la nomenclatura de Levan *et al.* (1964). Estos se agruparon con base en su morfología (metacéntricos, submetacéntricos, subtelocéntricos y telocéntricos), y se organizaron en orden decreciente según su longitud. A partir de esta organización se determinaron las constantes cromosómicas que son el número diploide (2n) y número fundamental (NF). Una vez obtenido el cariotipo se llevó a cabo la elaboración del ideograma con el fin de obtener una visualización gráfica más clara del cariotipo obtenido (Figura 6).

6.5 Bando cromosómico G

Para la elaboración del bando cromosómico se realizó la técnica de Grouchy y Turleau (1977); Patton y Baker (1978). Se realizaron nueve laminillas las cuales se dejaron envejecer por un periodo de cinco días y después se colocaron en una estufa a una temperatura de 65°C durante 16 horas, esto con el fin de endurecer los cromosomas y así poder observar los patrones de bandas. Una vez listas se dejaron enfriar a temperatura ambiente para posteriormente sumergirlas en tripsina durante

un lapso de 60 segundos, transcurrido el tiempo se pasaron al amortiguador de fosfato salino (PBS) en dos vasos Coplin y se realizó un enjuague metiendo y sacando la laminilla 10 veces en cada uno de los vasos, después se tiñeron las laminillas en la técnica descrita por Urbina (2011) donde se colocaron primero dos minutos en Wright, después se colocaron en Giemsa por cuatro minutos, se enjuagaron en agua destilada y se secaron a temperatura ambiente para finalmente ser observadas en microscopio.

6.6 Bando cromosómico C

Para la elaboración del bando cromosómico C se utilizó el método descrito por Summer *et al.* (1971); Arright y Hsu (1971). Para este bando se utilizaron las mismas laminillas las cuales primero se destiñeron con Carnoy y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez desteñidas las laminillas se colocaron en un vaso de precipitado el cual contenía ácido clorhídrico al 2% (HCl) durante un lapso de 15 minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente, se colocaron dos minutos en una solución saturada de $Ba(OH)_2$, a 45°C, una vez transcurrido el tiempo se enjuagan en HCl solo una vez para luego enjuagar en agua destilada por tres veces y se dejaron secar a temperatura ambiente. Secas las laminillas se colocaron en una caja Petri, se pusieron de seis a ocho gotas de solución 2XSSC pH 7.0 y se les situaron los cubreobjetos, de igual manera se asentaron gotas de solución salina 2XSSC y en una caja de Petri se colocó un papel filtro previamente recortado y ajustado a la medida, este se humedeció con solución 2XSSC, encima se colocaron las laminillas y se metieron a la estufa por un tiempo de 16 horas. Una vez pasado el tiempo se sacaron las laminillas de la caja Petri y se retiraron los portaobjetos con ayuda de una ligera sacudida, se enjuagaron tres veces en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente meterlas en una solución de etanol al 70% durante cinco minutos. Para pasarse a una solución de etanol al 96% durante cinco minutos, pasado el tiempo se dejaron secar a temperatura ambiente para finalmente teñir con Giemsa al 4% durante ocho minutos y se enjuagaron en agua destilada tres veces, se dejaron secar y se observaron en el microscopio.

7. RESULTADOS

Durante el trabajo de campo se capturaron dos ejemplares de *Peromyscus difficilis*, un macho y una hembra, en la zona de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla. Se prepararon seis laminillas con material celular. De estas preparaciones, se obtuvieron 167 campos mitóticos en metafase, de los cuales 30 fueron seleccionados para su análisis, considerando criterios de cromosomas separados y claridad en la morfología (Figura 4).

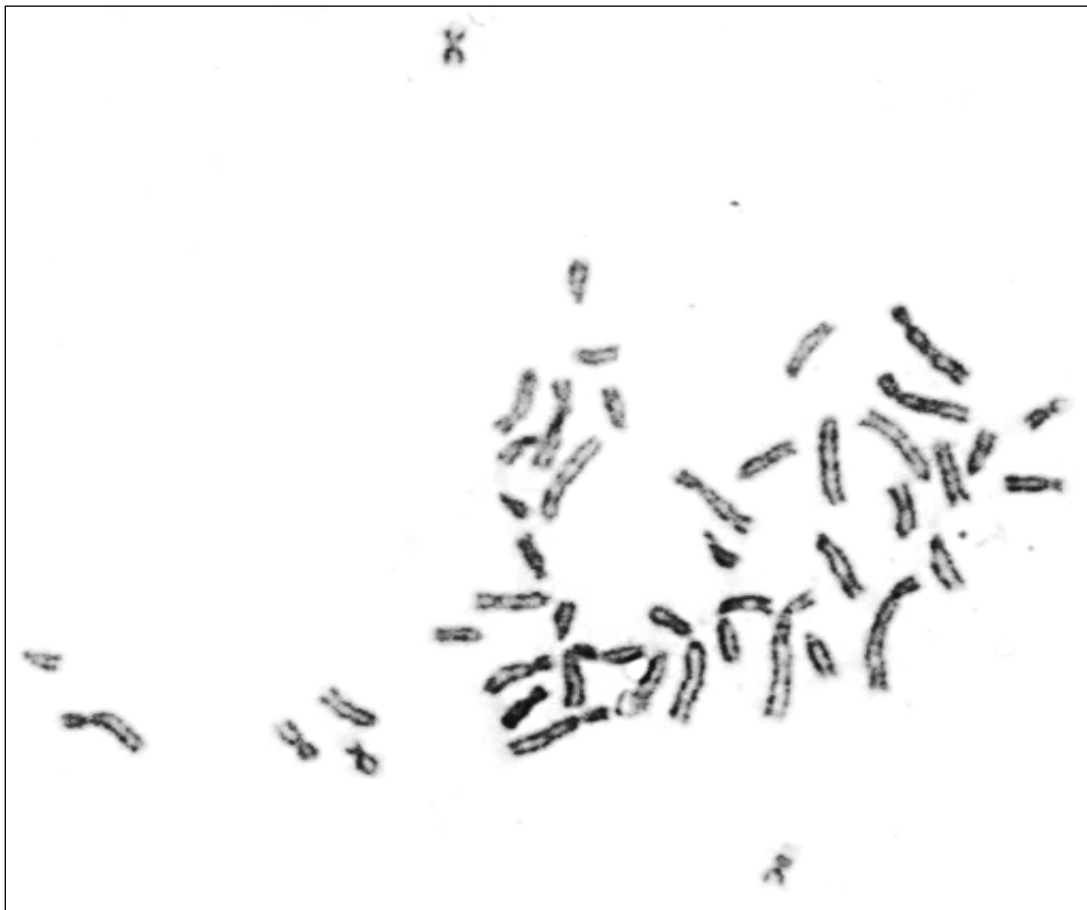


Figura 4. Campo cromosómico de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco, Puebla.

En *Peromyscus difficilis* se obtuvo un $2n = 48$, lo cual coincide con lo reportado previamente para la especie. Se observó al microscopio para distinguir cromosomas individuales, que fueron fotografiados y organizados conforme a la posición del centrómero y el tamaño relativo, siguiendo la nomenclatura de Levan *et al.* (1964).

El análisis cuantitativo de los brazos cromosómicos reveló la presencia de siete pares de cromosomas birrámeos y dieciséis pares de cromosomas monorrámeos, distribuidos según Levan *et al.* (1964) un par metacéntrico (m) tres pares submetacéntricos (sm) y tres pares subtlocéntricos (st) y 16 pares de cromosomas telocéntricos (t; Tabla 1). El número fundamental (NF) fue de 60, constituido por siete pares de cromosomas birrámeos y 16 pares de cromosomas monorrámeos (Figuras 5 y 6).

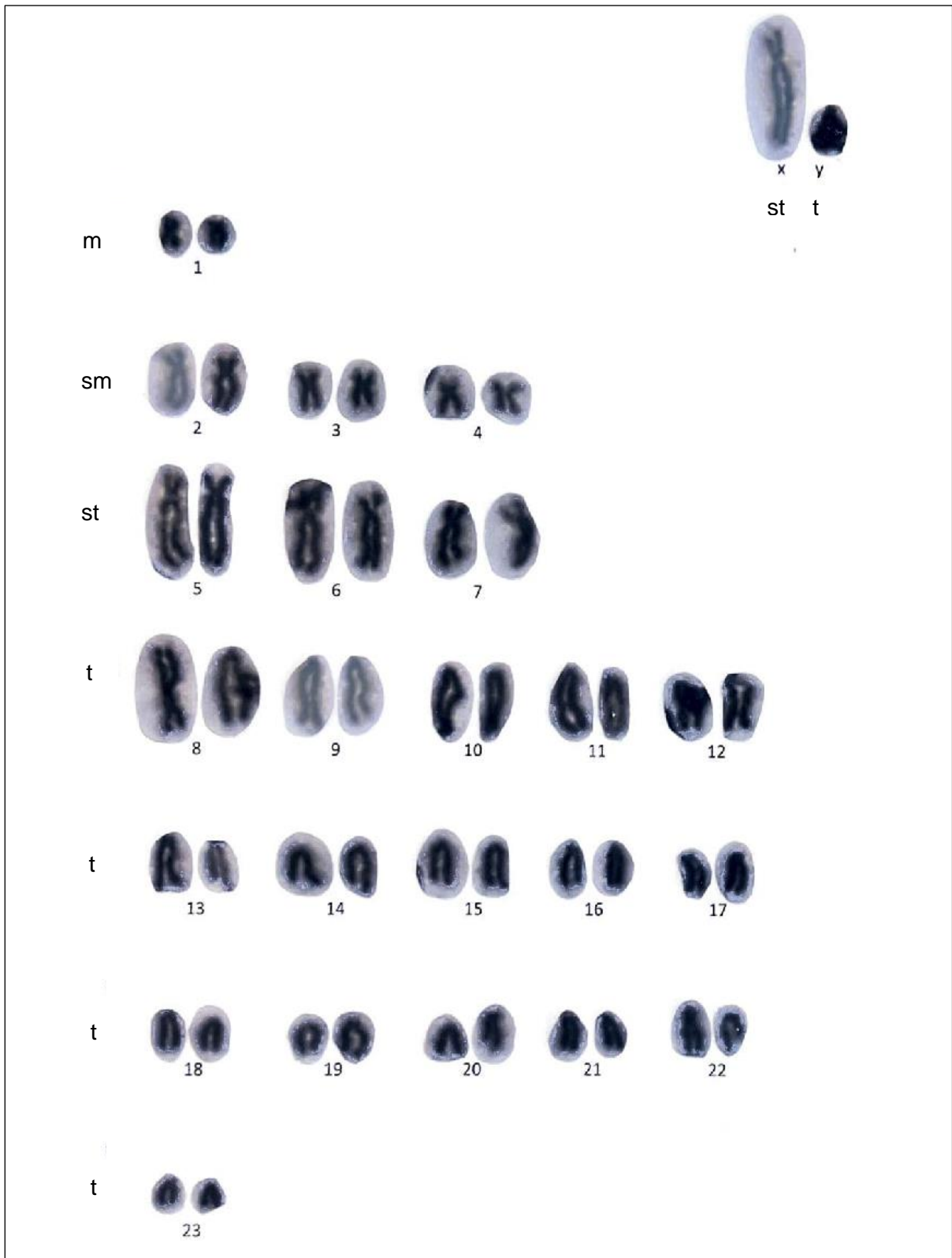


Figura 5. Cariotipo de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.

Tabla 1. Longitudes relativas de los brazos cromosómicos, índice centromérico y clasificación morfológica de los pares cromosómicos del ejemplar macho de *Peromyscus difficilis*. p = promedio del brazo corto; Ds p = desviación estándar del brazo corto; q = promedio del brazo largo; Ds q = desviación estándar del brazo largo; p + q = longitud total del cromosoma; Ds p + q = desviación estándar total; IC = índice centromérico. Clasificación según Levan *et al.* (1964): m = metacéntrico, sm = submetacéntrico, st = subtelocéntrico, t = telocéntrico.

Par	p	Ds p	q	Ds q	p+q	Ds p+q	IC	Clasificación de acuerdo a Levan <i>et al.</i> (1964)
1	0.214	0.040	0.322	0.039	0.535	0.051	39.806	m
2	0.314	0.051	0.756	0.206	1.070	0.242	30.167	sm
3	0.233	0.049	0.602	0.179	0.835	0.211	28.375	sm
4	0.207	0.036	0.406	0.066	0.612	0.077	33.868	sm
5	0.350	0.055	1.524	0.130	1.874	0.170	18.608	st
6	0.312	0.090	1.177	0.126	1.489	0.124	20.934	st
7	0.322	0.048	0.987	0.136	1.309	0.167	24.664	st
8			1.442	0.108	1.442	0.108		t
9			1.224	0.132	1.224	0.132		t
10			1.092	0.142	1.092	0.142		t
11			1.045	0.1	1.045	0.1		t
12			0.923	0.116	0.923	0.116		t
13			0.833	0.079	0.833	0.079		t
14			0.755	0.107	0.755	0.107		t
15			0.777	0.097	0.777	0.097		t
16			0.697	0.087	0.697	0.087		t
17			0.66	0.073	0.66	0.073		t
18			0.646	0.102	0.646	0.102		t
19			0.56	0.059	0.56	0.059		t
20			0.559	0.09	0.559	0.09		t
21			0.536	0.065	0.536	0.065		t
22			0.553	0.131	0.553	0.131		t
23			0.455	0.047	0.455	0.047		t
x	0.364	0.107	1.216	0.311	1.581	0.398	23.223	st
y			0.588	0.171	0.588	0.171		t

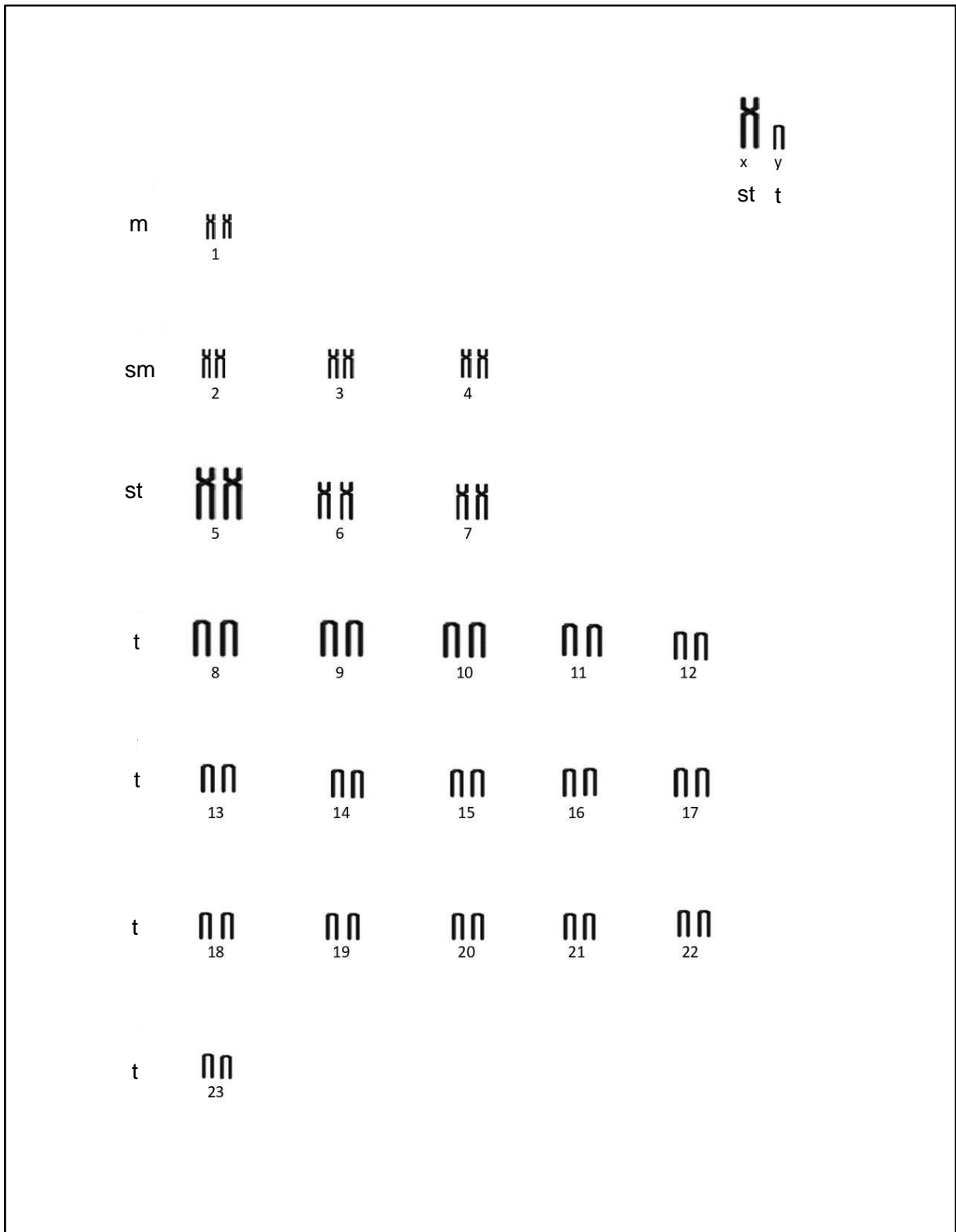


Figura 6. Ideograma de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.

Adicionalmente, se aplicaron técnicas de bandeo cromosómico para la identificación. El bandeo G permitió observar patrones de bandas oscuras y claras, facilitando la diferenciación de pares homólogos (Figuras 7 y 8).



Figura 7. Bando cromosómico G de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.

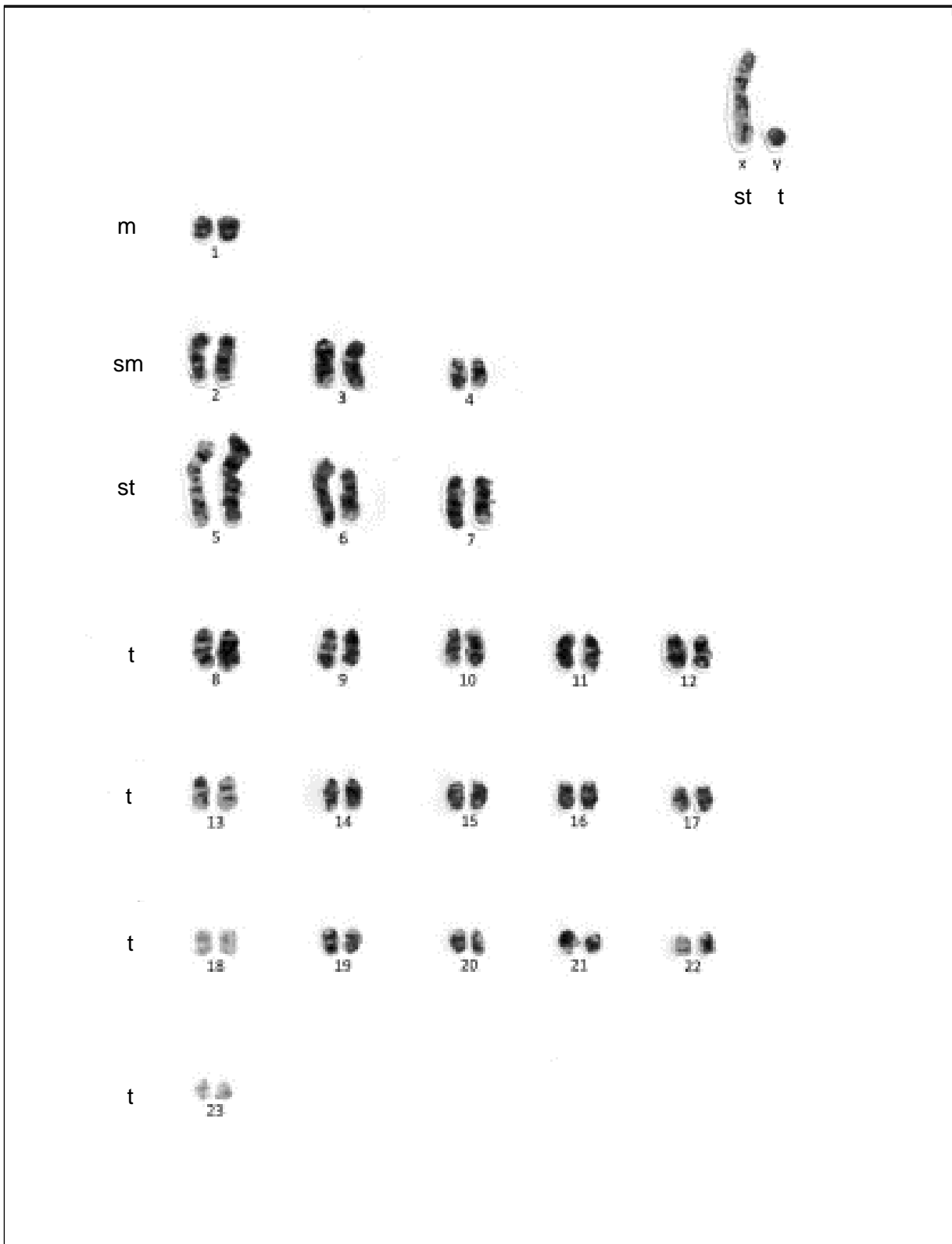


Figura 8. Cariotipo de bandeo cromosómico G del ejemplar macho de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.

Por su parte, el bandeo cromosómico C reveló la presencia de heterocromatina constitutiva en la región centromérica de los cromosomas, particularmente en telocéntricos y en el cromosoma sexual Y (Figuras 9, 10 y 11).

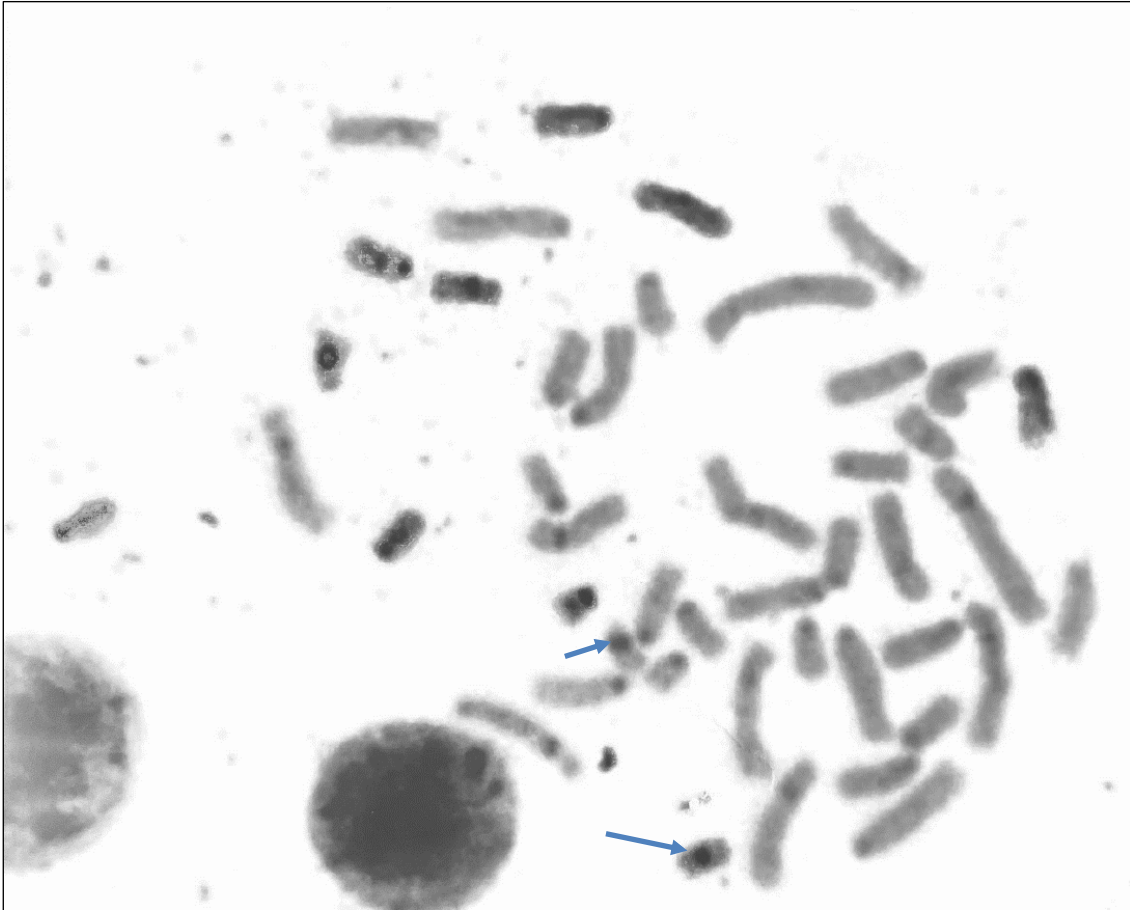


Figura 9. Campo mitótico con bandeo cromosómico C de *Peromyscus difficilis*, evidenciando regiones de heterocromatina centromérica (flecha azul).

Los resultados obtenidos permiten describir el cariotipo de *Peromyscus difficilis* en los ejemplares analizados, confirmando $2n = 48$ y aportando información sobre su NF = 60, derivado del conteo de brazos cromosómicos de los autosomas.

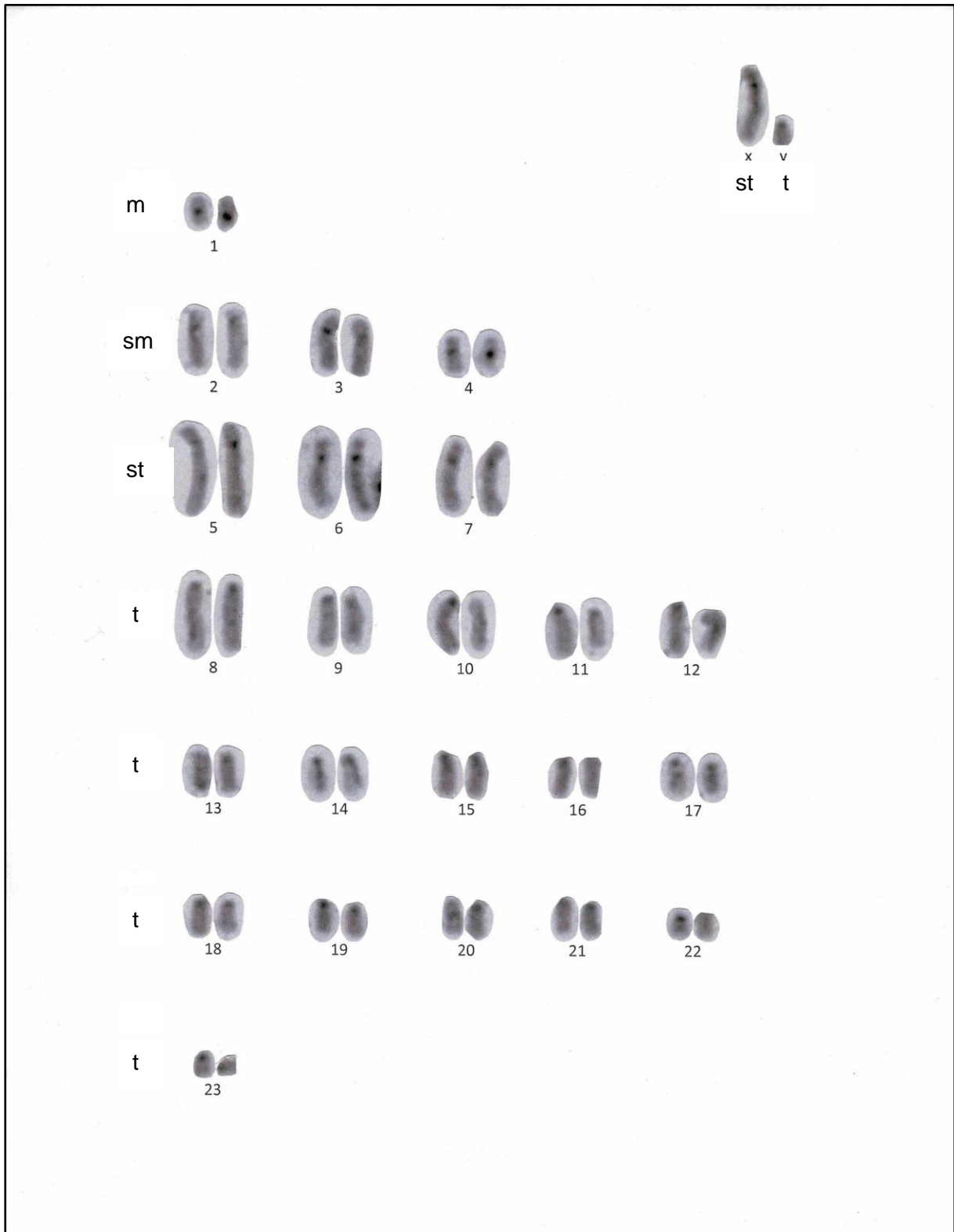


Figura 10. Cariotipo de bandeo C del ejemplar macho de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.

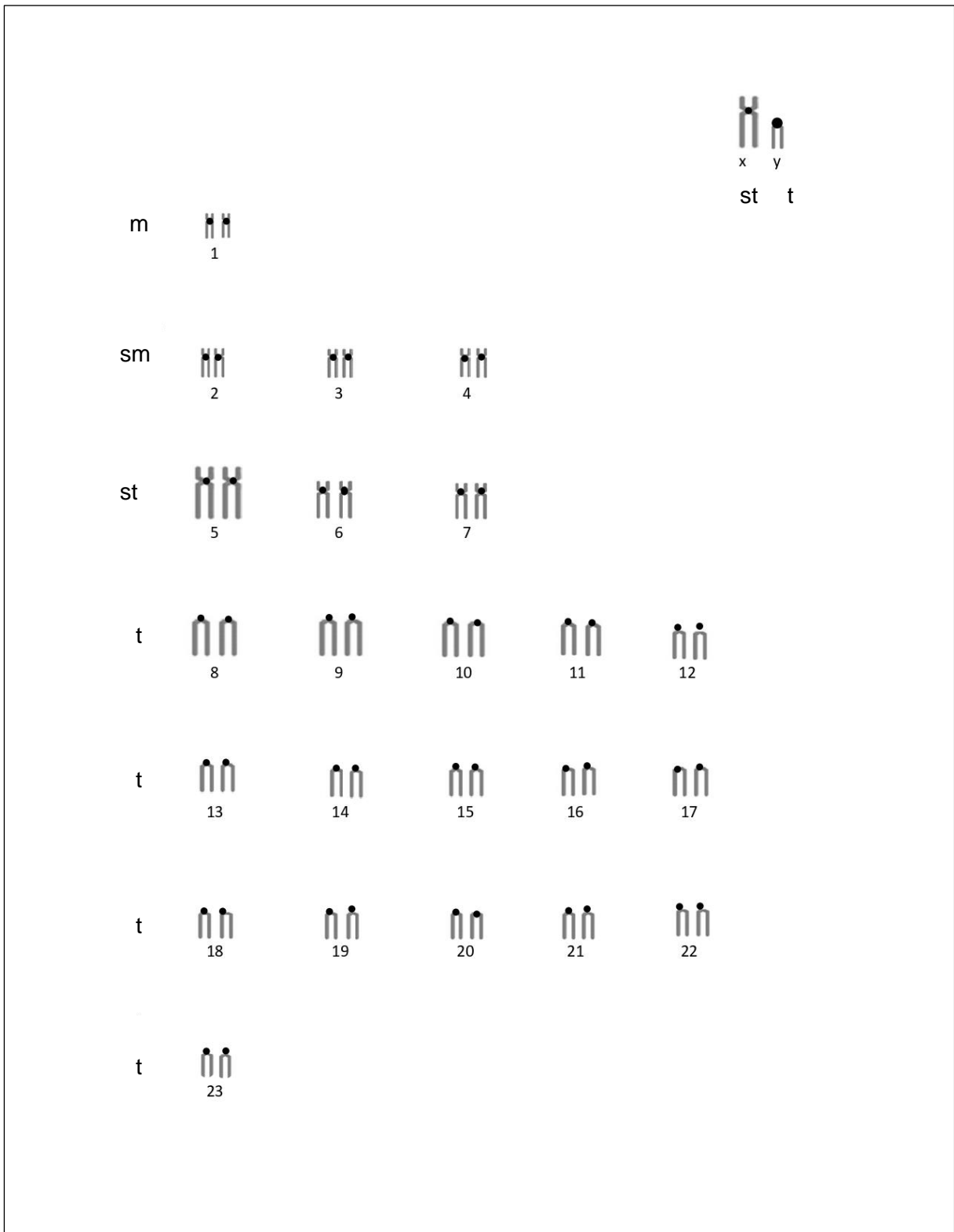


Figura 11. Ideograma de bandeo cromosómico C de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman que la población de *Peromyscus difficilis* analizada en Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla, presenta un $2n = 48$, como ha sido reportado en otras subespecies de este taxa (Arellano-Meneses *et al.*, 2000; Robbins y Baker, 1975; Mudespacher-Ziehl *et al.*, 2005). Sin embargo, se observó un $NF = 60$, lo cual representa una diferencia en comparación con otras poblaciones del país.

El análisis cromosómico reveló la presencia de siete pares de cromosomas birrámeos que corresponden a un par metacéntrico (m) tres pares submetacéntricos (sm) y tres pares subtlocéntricos (st)), así como, 16 pares telocéntricos. El cromosoma X fue subtlocéntrico y el Y fue telocéntrico. Esta composición es similar a la reportada por Rodríguez (2005) en ejemplares de Zacatlán, Puebla, aunque difiere de otras poblaciones como *P. difficilis amplus* de Veracruz, donde se reportó un $NF = 66$ (Arellano-Meneses *et al.*, 2000). Estas variaciones sugieren la posible presencia de reordenamientos cromosómicos como fusiones, inversiones pericéntricas o cambios en la cantidad de heterocromatina, mecanismos frecuentes en la evolución cromosómica de roedores (Baker y Qumsiyeh, 1988; Sumner, 2003).

La variabilidad observada entre poblaciones geográficamente cercanas apoya la hipótesis de que *P. difficilis* constituye un complejo de especies con diferenciación citogenética. Esta diferenciación, resumida en la tabla 2, podría estar relacionada con aislamiento geográfico o presiones selectivas locales, como ha sido planteado en estudios previos sobre el género *Peromyscus* (Durish *et al.*, 2004).

Tabla 2. Comparación citogenética entre poblaciones de *Peromyscus difficilis* en distintas localidades de Puebla y Veracruz. Se muestran los valores de número diploide (2n), número fundamental (NF), tipos de cromosomas (birrámeos y monorrámeos).

Población / Subespecie	Localidad	2n	NF	Birrámeos	Monorrámeos	X	Y
<i>P. difficilis</i> (este estudio)	Tepatlxco de Hidalgo, Puebla	48	60	7 pares (metacéntricos, submetacéntricos y subtelocéntricos)	16 pares	Subtelocéntrico	Telocéntrico
<i>P. difficilis</i> (Rodríguez, 2005)	Zacatlán, Puebla	48	—	—	—	Subtelocéntrico	Telocéntrico
<i>P. difficilis amplus</i> (Arellano-Meneses et al., 2000)	Veracruz	48	66	—	—	—	—

El bandeo cromosómico G facilitó la diferenciación de pares homólogos mediante el reconocimiento de bandas oscuras y claras, también es fundamental para detectar reordenamientos estructurales como inversiones, translocaciones, deleciones o duplicaciones, mientras que el bandeo C evidenció regiones de heterocromatina constitutiva, principalmente en zonas centroméricas y en el cromosoma sexual Y, lo cual es consistente con observaciones en otros roedores silvestres (Sumner, 2003).

Estos hallazgos amplían el conocimiento sobre la variabilidad cariotípicas de *P. difficilis* en Puebla, y contribuyen a la caracterización citogenética de una población que no había sido previamente documentada. La comparación con otras localidades cercanas como Atlixco, Atoyatempan y Zacatlán evidencia la importancia de continuar con estudios cariotípicos en roedores endémicos para comprender mejor su diversidad genética, evolución cromosómica.

9 CONCLUSIONES

- El análisis citogenético realizado en ejemplares de *Peromyscus difficilis* colectados en Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla, confirma un $2n = 48$ en concordancia con lo reportado para otras especies de *P. difficilis*.
- Se determinó $NF = 60$, resultado de la presencia de siete pares de cromosomas birrámeos, 16 pares monorrámeos, y un par sexual conformado por un cromosoma X subtelocéntrico y un cromosoma Y telocéntrico.
- La variabilidad en la morfología de los cromosomas observada entre esta población y otras previamente documentadas en localidades cercanas (como Atlixco, Atoyatempan y Zacatlán) refuerza la hipótesis de una evolución cromosómica diferenciada, posiblemente relacionada con procesos de aislamiento geográfico, reordenamientos cromosómicos o adaptación local.
- El bandeo cromosómico C evidenció la presencia de heterocromatina constitutiva en todos los autosomas y una mayor presencia en el cromosoma sexual Y, lo que coincide con resultados en otros roedores silvestres.
- Este estudio representa una aportación al conocimiento citogenético de *Peromyscus difficilis* en el estado de Puebla, y resalta la necesidad de continuar con investigaciones que integren herramientas citogenéticas para delimitar de manera más precisa la diversidad intraespecífica de este taxón.
- Los resultados obtenidos podrán servir como referencia para futuras investigaciones en sistemática y conservación genética de roedores silvestres del centro de México.

10. REFERENCIAS

- Arellano-Meneses, A. G., Hernández-Carbajal, L. A., Lira-Galera, I. E., Ruiz-Guzmán, G. y Müdespacher-Ziehl, C. 2000. Karyotypical studies on *Peromyscus difficilis amplus* (Rodentia: Muridae). *Cytologia*, 65(1):25–28.
- Arrighi, F. E. y Hsu, T. C. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10(2):81–86. <https://doi.org/10.1159/000130130>
- Baker, R. J. y Qumsiyeh, M. B. 1988. Methods in chiropteran mitotic chromosomal studies. In: Kunz, T. H. (ed.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., U.S.A.:425–435.
- Barragán, K. 2005. Citogenética en cérvidos, con énfasis en venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*). *Revista de la Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre*,1(1):3–9.
- Ceballos, G. y Arroyo, J. M. 2012. Los roedores como modelo en la investigación ecológica y evolutiva. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(2):345–356.
- 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.<https://doi.org/10.1644/BER-115.1>
- Enciclovida. 2025. Distribución de *Peromyscus difficilis* [Mapa]. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Recuperado el 26 de junio de 2025, de <https://enciclovida.mx/especies/33816>
- Esquivel, B. 2022. Descripción cromosómica de *Peromyscus difficilis* (Allen, 1891) de San Salvador Atoyatempan, Puebla. Tesis de licenciatura. Benemérita

Universidad Autónoma de Puebla. Repositorio Institucional BUAP.
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/d417adce-b32a-4cfc-94c0-98b8b6c5ef42>

- García, J. 2018. Análisis cromosómico de *Peromyscus difficilis* de San Pedro Atlixco Tianguismanalco, Puebla. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Repositorio Institucional BUAP.
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/b48495ee-4290-4bd1-8009-5ec4cb1ab19e>
- GBIF. (2024). *Peromyscus difficilis* (Allen, 1891) Observación de Juan Cruzado Cortés. Imagen obtenida de iNaturalist. Recuperado de <https://www.gbif.org/occurrence/4952916959>
- Gill, B. y Friebe, B. 1998. Citogenética vegetal en los albores del siglo XXI. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(2):109–115.
- Greenbaum, I. F. y Baker, R. J. 1978. Evolución cromosómica y modo de especiación en tres especies de *Peromyscus*. *Evolution*, 32(3):646–654.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1978.tb00649>.
- Grouchy, J. y Turleau, C. 1977. *Atlas des maladies chromosomiques*. 2ª edición. Expansion Scientifique Francaise, Paris.
- Hall, E. R. 1981. *The mammals of North America*. 2ª edición. Vols. 1–2. John Wiley and Sons.
- Herrera, J. C. 2007. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, 25(1):26–35.
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/14394>
- Hoffmeister, D. F. y de la Torre, L. 1961. Geographic variation in the mouse *Peromyscus difficilis*. *Journal of Mammalogy*, 42(1):1–13.

<https://doi.org/10.2307/1377341>

INEGI. (2016). *Síntesis geográfica, estadística y económica del estado de Puebla*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825078129>

- INEGI. (2020a). *Marco geoestadístico municipal 2020*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=889463807596>
- INEGI. (2020b). *Censo de Población y Vivienda 2020: Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2020/>
- INEGI. (2025). *Marco geoestadístico 2025*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=889463807596>
- Lee, M. R. 1969. A widely applicable technic for direct processing of bone marrow for chromosomes of vertebrates. *Stain Technology*, 44(3):155–158. <https://doi.org/10.3109/10520296909063343>
- Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2):201–220. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>
- Müdespacher-Ziehl, C., Espiritu-Mora, R., Martínez-Coronel, M. y Gaona, S. 2005. Chromosomal studies of two populations of *Peromyscus difficilis felipensis* (Rodentia: Muridae). *Cytologia*, 70(3):243–248. <https://doi.org/10.1508/cytologia.70.243>

- Musser, G. G. y Carleton, M. D. 2005. *Especies de mamíferos del mundo: Una referencia taxonómica y geográfica*. Johns Hopkins University Press.
- Osgood, W. H. 1909. Revision of the mice of the American genus *Peromyscus*. *North American Fauna*, 28:1–285. <https://doi.org/10.3996/nafa.28.0001>
- Patton, J. L. y Baker, R. J. 1978. Chromosomal evolution in the genus *Peromyscus*. *Journal of Mammalogy*, 59(4):711–723. <https://doi.org/10.2307/1379697>
- Ramírez-Pulido, J., González-Ruiz, N., Gardner, L. A. y Arroyo-Cabrales, J. 2014. List of recent land mammals of México. *Special Publications Museum of Texas Tech University*, 63:1–69.
- Robbins, L. W. y Baker, R. J. 1975. An assessment of the nature of chromosomal rearrangements in 18 species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 31:194–202.
- Rodríguez, M. 2005. Descripción cromosómica de *Peromyscus difficilis amplus* de Camotepec, Municipio de Zacatlán, Puebla. Tesis de licenciatura. Escuela de Biología, BUAP. Repositorio Institucional BUAP.
- Rojas, R. L. y Barboza, R. M. 2007. Ecología poblacional del ratón *Peromyscus mexicanus* (Rodentia: Muridae) en el Parque Nacional Volcán Poás, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 55(3–4):1037–1050. <https://doi.org/10.15517/rbt.v55i3-4.5976>
- Sumner, A. T. 2003. *Chromosomes: Organization and function*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470695975>
- Sumner, A. T., Evans, H. J. y Buckland, R. A. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology*,

232(27):31–32.

<https://doi.org/10.1038/newbio232031a0>

- Thompson, J. S., Thompson, M. W. y Thompson, R. E. 2021. *Genética en medicina*. 8ª edición. Elsevier.
- Urbina, S. I. 2011. *Variación cromosómica del género Reithrodontomys de bosque mesófilo de montaña* (Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana, México). Repositorio Institucional UAM. <https://bindani.izt.uam.mx/concern/tesiuams/r207tp489>
- Zimmerman, E. G., Hart, B. J. y Kilpatrick, C. W. 1975. Biochemical genetics of the *boyllyi* and *truei* species groups of the genus *Peromyscus* (Rodentia). *Comparative Biochemistry and Physiology, B. Comparative Biochemistry*, 52:541–545.

11. ANEXOS

Solución hipotónica (KCl 0.075 M):

- 0.56 g de KCl en 100 ml de agua destilada
- Se conservo en refrigeración y se utilizó máximo dos días consecutivos si no está contaminada

Fijador de Carnoy:

- 3 partes de metanol (15 ml)
- 1 parte de ácido acético glacial (5 ml)
- Se preparo 30 minutos antes de su uso. Y se utilizó en un máximo de 3 horas, se mantiene en refrigeración.

Preparación del colorante Giemsa para tinción convencional

Para su preparación se utilizaron:

- 2 ml de solución amortiguadora (AB)
- 47 ml de agua destilada
- 1 ml de solución concentrada de Giemsa (Microlab)

Solución amortiguadora AB:

- Solución A: Se pesaron 1.38 g de NaH_2PO_4 (10 M) y se diluyeron en 100 ml de agua destilada (se usaron 15 ml).
- Solución B: Se pesaron 1.42 g de NaH_2PO_4 (10 M) y se diluyeron en 100 ml de agua destilada (se usaron 10 ml).

La mezcla de 15 ml de la Solución A y 10 ml de la Solución B se mantiene en refrigeración a 4 °C mientras esté libre de contaminación.

Soluciones utilizadas en técnicas de bandeo cromosómico

Solución PBS (solución salina tamponada con fosfato):

- 2 g de NaCl
- 0.05 g de KCl
- 0.2785 g de Na_2HPO_4
- 0.05 g de KH_2PO_4
- Aforar a 250 ml con agua destilada

Soluciones para bandeó cromosómico

Solución stock de Wright. Buffer de Sörensen

- Se Pesaron 3.15 g de fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4
- Se Pesaron 1.28 g de fosfato de sodio dibásico anhidro Na_2HPO_4
- Se disolvio en 400 ml de agua destilada
- Se aforaro a 500 ml

Colorante de Gimsa

- Solución stock
- Colocar en un mortero 1 gr de Giemsa
- Agregar 6.6 ml de glicerina a 60°C
- Macerar hasta que quede disuelto el colorante
- Agregar 132 ml de metanol

- Agitar durante 4 horas
- Guardar en un frasco ámbar a temperatura ambiente

Colorante de Whright

Solución stock (100 ml)

- Colocar en un mortero 0.16 gr de colorante de Wright
- Agregar 10 ml de metanol
- Macerar hasta que quede disuelto el colorante
- Aforar a un volumen final de 100 ml con metanol
- Dejar agitando durante 3 horas
- Conservar en un frasco ámbar a temperatura ambiente

Solución stock de Tripsina

- 0.05 gr de tripsina Difco (1.250)
- 50 ml de buffer de fosfato salino (PBS)

Se pesaron 4 gr de NaCl, 0.1 gr de KCl, 0.57 gr de Na_2HPO_4 , 0.1 gr de KH_2PO_4 y se diluyeron en 500 ml de agua destilada. El buffer de fosfato salino debe mantenerse en refrigeración a 4°C.

La solución de Stock de Tripsina debe permanecer en el congelador

Se diluyo una parte de la solución de stock de Tripsina con 3 partes de PBS para obtener una concentración final de 0.25%.

Solución stock 10XSSC para bandas C:

- 8,7675 g de NaCl (1,5 M)
- 4,4117 g de citrato de sodio (0,15 M)

- Se disolvió en 100 ml de agua destilada
- Para preparar 2X SSC: mezclaron 10 ml de solución stock con 40 ml de agua destilada
- Se utilizó en el mismo día y se conservó en refrigeración

Soluciones adicionales para bandeó C

Giemsa 4% preparada con Buffer de Fosfato de Sodio para Bandas C

- Solución A: Se pesaron 1.38 g de Na_2HPO_4 (10 M) y se diluyeron en 100 ml de agua destilada (se usaron 15 ml).
- Solución B: Se pesaron 1.42 g de Na_2HPO_4 (10 M) y se diluyeron en 100 ml de agua destilada (se usaron 10 ml).
- Solución A + B: Se combinó en proporción de 68 ml de la solución A y 100 ml de la solución B.
- Se tomaron 2 ml de Giemsa (Microlab) y 48 ml de este buffer para teñir.

Ácido clorhídrico (HCl) 0.2 N:

- Se Preparó una solución stock de HCl 5 N
- Se tomaron 2 ml de HCl 5 N y se diluyeron en 48 ml de agua destilada para obtener una solución 0.2 N
- Se utilizó dentro del mismo día y se mantuvo a temperatura ambiente mientras no esté contaminada

Solución saturada de hidróxido de bario $[\text{Ba}(\text{OH})_2]$:

- Se pesaron 5 g de $\text{Ba}(\text{OH})_2$
- 50 ml de agua destilada
- Se puede conservar a temperatura ambiente hasta por dos semanas