



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE *Microtus mexicanus*
DE CAMOTEPEC, ZACATLÁN, PUEBLA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA
VALERIA SARAHÍ HERNÁNDEZ PALACIOS

DIRECTORA
M. EN C. ROSA MARÍA GONZÁLEZ MONROY

PUEBLA

FEBRERO, 2025



ÍNDICE	
DEDICATORIA _____	i
AGRADECIMIENTOS _____	ii
RESUMEN _____	iii
INTRODUCCIÓN _____	1
Descripción de la especie _____	5
Clasificación taxonómica _____	5
Distribución _____	7
Estado de conservación _____	7
ANTECEDENTES _____	8
JUSTIFICACIÓN _____	10
OBJETIVOS _____	11
Objetivo general _____	11
Objetivos particulares _____	11
METODOLOGÍA _____	12
Área de Estudio _____	12
Trabajo en campo _____	15
Trabajo de laboratorio _____	15
Bandeo cromosómico G _____	16
Bandeo cromosómico C _____	17
RESULTADOS _____	18
DISCUSIÓN _____	25
CONCLUSIÓN _____	28
REFERENCIAS _____	29
ANEXO _____	33

Índice de Figuras

Figura 1. Proceso de la mitosis (Modificado de Gersen y Keagle, 2013).	1
Figura 2. Partes del cromosoma.	2
Figura 3. Clasificación cromosómica (Levan <i>et al.</i> , 1964).	2
Figura 4. <i>Microtus mexicanus</i> (Martínez-Fonseca, 2016).	6
Figura 5. Distribución de <i>Microtus mexicanus</i> . IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2008.	7
Figura 6. Ubicación de colecta de <i>Microtus mexicanus</i> de Camotepec, Zacatlán, Puebla.	13
Figura 7. Sitios de colecta de <i>Microtus mexicanus</i> en Camotepec, Zacatlán, Puebla. Fotografías de Diana Laura Vázquez Cozátl.	14
Figura 8. Campo mitótico del ejemplar macho de <i>Microtus mexicanus</i> .	18
Figura 9. Cariotipo convencional de <i>Microtus mexicanus</i> de Camotepec, Zacatlán, Puebla.	19
Figura 10. Bando cromosómico G de <i>M. mexicanus</i> de Camotepec, Zacatlán, Puebla.	21
Figura 11. Ideograma del bando cromosómico G de <i>M. mexicanus</i> de Camotepec, Zacatlán, Puebla.	22
Figura 12. Bando cromosómico C de <i>Microtus mexicanus</i> de Camotepec, Zacatlán, Puebla.	23
Figura 13. Ideograma del bando cromosómico C de <i>Microtus mexicanus</i> de Camotepec, Zacatlán, Puebla.	24

DEDICATORIA

A mi abuelo José Pascual, a quien le prometí terminar una carrera profesional.

A mis padres José Pascual Hernandez Jiménez y Ana Lilia Palacios Carabarán, por darme su apoyo incondicional, sus consejos y guiarme siempre que me llegue a sentir perdida.

A mis hermanas Regina y Liliana por tolerarme y siempre estar a mi lado cuando más lo necesitaba y darme esos momentos de alegría.

A mi sobrino Eiden Abdiel quien se convirtió en la alegría de mi vida.

A mis amigos: Any, Natalia, Chemita, Fernando, gracias a todos ustedes por permitirme formar parte de su vida universitaria, por compartir momentos tanto de diversión como de estrés. Conocerlos es algo por lo que siempre estaré agradecida y deseo conservar su amistad para siempre.

A Luis, Kari y Oliver a quienes conozco desde hace mucho tiempo, gracias por ser parte fundamental de mi vida y darme su apoyo siempre.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Rosa María González Monroy, gracias por ser quien confió en mí para este proyecto, me permitió aprender cosas totalmente nuevas, por guiarme de la mejor manera y estar abierta a resolver mis dudas en cada parte del proceso.

Al Dr. Jesús Martínez Vázquez, gracias por guiarme tanto en el trabajo de laboratorio siempre con una actitud comprensiva para resolver mis dudas.

A la Biol. Judith Méndez Pacio, por apoyarme y guiarme siempre que tuve una duda, mil gracias.

A la pasante de Biología Diana Laura Vázquez Cozátl, quien realizo la captura de los organismos que se utilizaron en este trabajo y los dono al laboratorio de Mastozoología.

Compañeros del laboratorio de Mastozoología: Viri, Joss, Ray, Ricardo y Yolo, Gracias por siempre apoyarme en la dinámica del laboratorio, por las tardes compartidas en convivios o haciendo nuestro trabajo, y la motivación que me brindaron durante todo el trabajo

RESUMEN

En la citogenética el proceso de la mitosis es fundamental debido a que en la metafase es posible observar los cromosomas condensados donde presentaran su morfología básica que permitirá clasificarlos y construir un cariotipo con base en las constantes cromosómicas. La constitución cromosómica de un individuo es un rasgo característico de cada especie y todos los organismos de una especie presentan el mismo cariotipo no obstante, hay especies que pueden variar en alguna de las características del cariotipo, estos cambios cromosómicos pueden deberse a rearrreglos tal como inversiones, translocaciones, fisiones o fusiones, deleciones o duplicaciones, lo que origina que las especies del mismo género e individuos de una sola especie presenten diferencias en el tamaño y forma de los cromosomas, por lo que el objetivo de este estudio fue describir el cariotipo y bandas cromosómicas G y C de *Microtus mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla. Se capturaron cinco organismos vivos utilizando trampas Sherman, posteriormente se realizó la técnica de extracción de médula ósea utilizando colchicina como inhibidor mitótico para la obtención del cariotipo convencional, se usó Tripsina para el bandeo cromosómico G y para el bandeo cromosómico C se empleó Hidróxido de bario. Los resultados obtenidos mostraron que el cariotipo de *M. mexicanus* presentó un $2n=48$ y $NF=58$ que corresponden a cuatro pares metacéntricos, dos pares submetacéntricos y 17 pares telocéntricos. El cromosoma sexual X corresponde a un telocéntrico grande y el cromosoma Y a un telocéntrico pequeño. El patrón de bandas cromosómicas G presentó de una a seis bandas de eucromatina. Las bandas cromosómicas C mostraron que la heterocromatina constitutiva se encuentra en la región centromérica de los cromosomas. El cromosoma sexual X y el cromosoma sexual Y presentan mayor porción de heterocromatina. Comparando los resultados con estudios anteriores se puede afirmar que *M. mexicanus* presenta variaciones cromosómicas en sus poblaciones.

INTRODUCCIÓN

La citogenética es una disciplina que estudia la estructura de los cromosomas y sus eventos citológicos. Un proceso crucial en el análisis citogenético es la mitosis (Herrera, 2007; Tamar *et al.*, 2008). La mitosis consiste en la división nuclear por el cual los cromosomas replicados se segregan en dos núcleos hijos (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2014). La división mitótica tiene cinco fases principales: Interfase, profase, metafase, anafase y telofase. Una de las etapas con mayor relevancia para estudios citogenéticos es la metafase, etapa en la cual se presenta el material genético (ADN) condensado formando la estructura de los cromosomas (McIntosh, 2016; Figura 1).

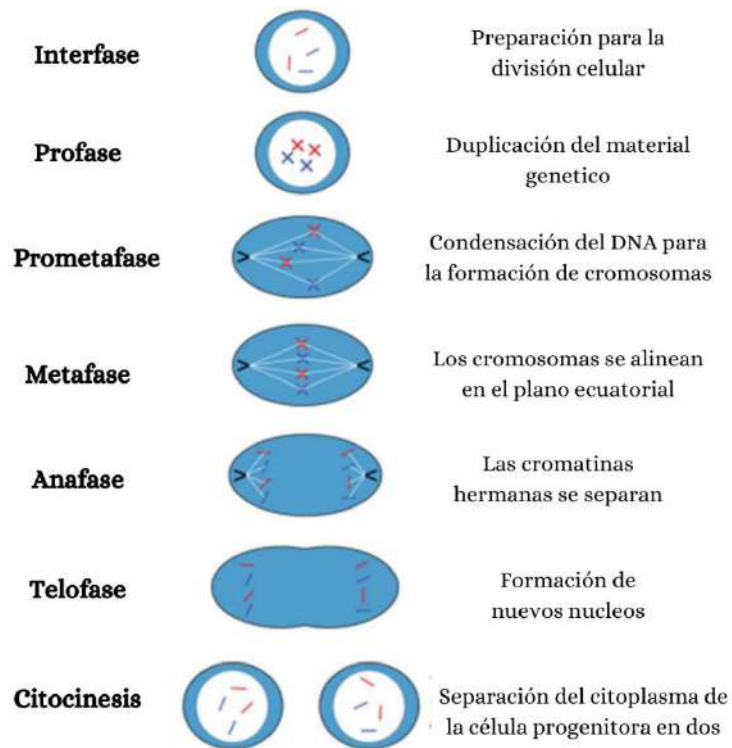


Figura 1. Proceso de la mitosis (Modificado de Gersen y Keagle, 2013).

Los cromosomas están constituidos por la condensación de ADN y proteínas que conforman la cromatina. Los cromosomas presentan una morfología caracterizada por un brazo largo (q) y un brazo corto (p) que se encuentran separados por una constricción primaria denominada centrómero (punto de unión de uso mitótico) (Figura 2). Conforme a la ubicación del centrómero, así como la longitud del brazo

corto (p) y brazo largo (q) se pueden diferenciar cuatro tipos de cromosomas: Metacéntrico, Submetacéntrico, Subtelocéntrico y Telocéntrico (Levan *et al.*, 1964; Figura 3).

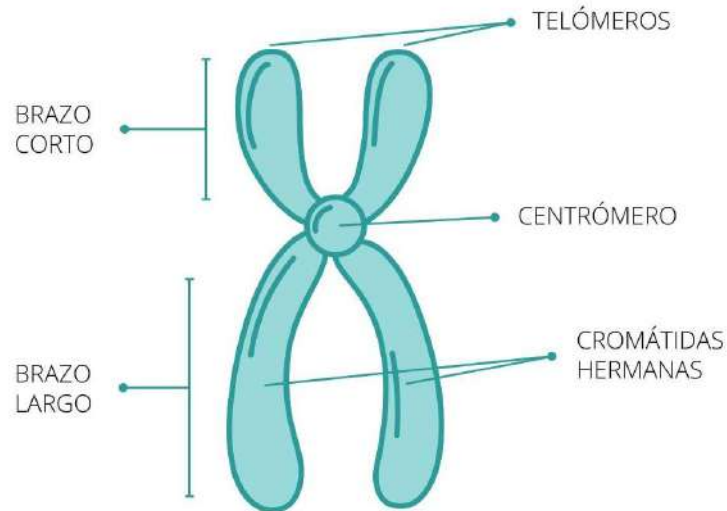


Figura 2. Partes del cromosoma.

Metacéntrico: centrómero en la mitad del cromosoma, proporcionando dos brazos iguales.

Submetacéntrico: el centrómero se encuentra de tal manera que un brazo es ligeramente más corto que otro.

Subtelocéntrico; el centrómero se encuentra de manera que se diferencia un brazo más corto que el otro.

Telocéntrico: centrómero se encuentra en la parte superior del cromosoma.

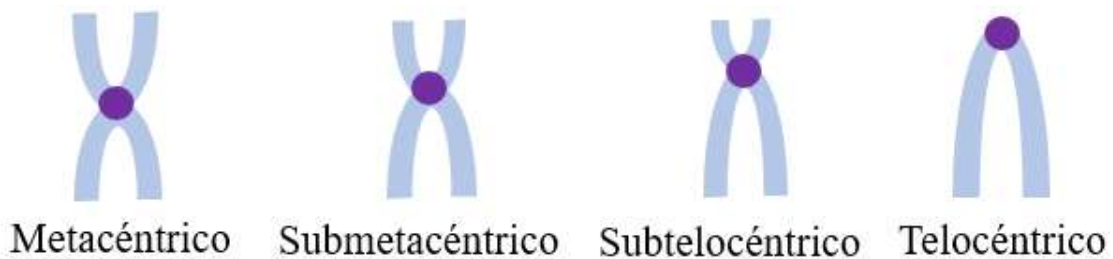


Figura 3. Clasificación cromosómica (Levan *et al.*, 1964)

La clasificación morfológica de los cromosomas permitirá construir un cariotipo, que es el conjunto de los cromosomas de un individuo, y por tanto toma en cuenta el número, la morfología, el número de brazos p y q, la localización de segmentos heterocromáticos, y constricciones secundarias, la construcción cromosómica de un individuo es un rasgo característico de cada especie (Luque y Herráez, 2001) y todos los organismos de una especie presentan el mismo cariotipo, no obstante especies similares pueden variar en alguna de las características del cariotipo.

Las investigaciones sobre el estudio del cariotipo han generado el entendimiento de la organización y estructura de los genomas en distintos campos científicos permitiendo posicionar los genes y marcadores que están ligados a secuencias de ADN (Herrera, 2007). Mientras que estudios de las similitudes y diferencias entre especies o grupos por medio de las características de los cariotipos permiten brindar grandes aportes y detalles de los procesos evolutivos, volviendo estos datos referentes directos de la historia evolutiva de los linajes existentes (Córdova y Gerardo, 1997; Garner, 1990). Por tanto, los cromosomas son un carácter importante para futuras investigaciones de relaciones filogenéticas, ya que al ser una característica estable y representativa es importante que sean obtenidos en la etapa celular de la metafase (Patton, 2006).

Los estudios citogenéticos se han desarrollado gracias a los constantes avances en las técnicas moleculares, como son las técnicas de bandeo cromosómico. La técnica consiste en la obtención de imágenes de estructuras cromosómicas transversales (Bandas) existentes de diferentes tamaños, haciendo posible la identificación de cada cromosoma humano, animal y vegetal (Drets, 2002).

El bandeo cromosómico G proporciona un patrón de bandas oscuras y claras, las bandas oscuras son secciones ricas en enlaces de AT (Adenina, Timina) estas regiones están compuestas por pocos genes cuya replicación es tardía, por otro lado, las bandas claras denotan secuencias ricas en enlaces de CG (Citocina, Guanina) estas regiones están compuestas por muchos genes, teniendo una replicación temprana (Drets, 2002; Solari, 2004). Este tipo de bando permite

diferenciar los pares cromosómicos y sus regiones por medio de la eucromatina, así como la identificación de algún tipo de rearrreglo cromosómico.

El bandeo cromosómico C permite identificar las regiones de heterocromatina constitutiva, estas regiones son secuencias de ADN altamente repetitivas y se localizan en el centrómero (Solari, 2004).

Los estudios citogenéticos en mamíferos han permitido establecer o verificar las relaciones filogenéticas en varios niveles taxonómicos (Van Gelder, 1969). Los roedores son uno de los órdenes más representativos de los mamíferos en México representado por ocho familias y 243 especies (Ceballos, 2014). En Puebla se encuentran nueve ordenes de mamíferos silvestres. El orden Rodentia es el segundo orden mejor representado con 51 especies (CONABIO, 2011).

En roedores se han observado cambios en los cromosomas de algunos géneros con los estudios citogenéticos, estos organismos son utilizados con mayor frecuencia en la investigación debido a su grado de evolución adaptativa y especiación, además de sus características biológicas como su tamaño corporal, ciclo de vida, además de tener similitudes fisiológicas con los humanos (Santos y Hortelano, 1997).

El género *Microtus* en su evolución cariotípica se caracteriza por la reducción del número diploide mediante eventos robertsonianos y rearrreglos cromosómicos, como inversiones pericéntricas para la formación de cromosomas birrámeos (Gaines, 1985; Uribe, 1977).

Descripción de la especie

Microtus mexicanus o ratón meteorito mexicano, es un roedor robusto con ojos pequeños y patas cortas, habitan en zonas áridas como pastizales, bosque de pino y pino-encino (Whilhelm, 1982). No presentan dimorfismo sexual, tiene una longitud de 123 -144 mm, la longitud de la cola es 25 - 34 mm y tiene un peso entre 18 y 42 g. Este roedor tiene un potencial reproductivo bajo en comparación de otras especies, las hembras pueden quedar preñadas hasta con seis embriones, no obstante, la media se encuentra entre 2 a 4 embriones. Esto es razonable tomando en cuenta que solo presenta dos glándulas mamarias en lugar de cuatro (Wilson y Ruff, 1999; Figura 4).

Clasificación taxonómica

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Clase Mammalia

Orden Rodentia

Familia Cricetidae

Subfamilia Arvicolinae

Género *Microtus*

Especie *Microtus mexicanus* (Saussure, 1861)



Figura 4. *Microtus mexicanus* (Martínez-Fonseca, 2016).

Distribución

Microtus mexicanus se distribuye en gran parte de Norte América, desde Nuevo México y Arizona, sur de Utah y Colorado hasta la parte céntrica del territorio mexicano, ocupando la sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental y el Eje Neovolcánico (Hall, 1981; Judd,1980; Figura 5).



Figura 5. Distribución de *Microtus mexicanus*. IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2008.

Estado de conservación

Microtus mexicanus es una especie que no se encuentra registrada en la norma mexicana NOM-059 SEMARNAT- 2010, por lo que no se encuentra en alguna categoría de riesgo dentro del territorio mexicano, mientras que en IUCN (International Union for Conservation of Nature) se encuentra categorizada en preocupación menor.

ANTECEDENTES

En el orden Rodentia se encuentra el género *Microtus*. En este género se han realizado estudios que han permitido encontrar su origen evolutivo, por lo que es sumamente importante estudiar diferentes poblaciones de este género, como lo es *Microtus mexicanus*.

El posible ancestro de los Arvicólidos presentaba un $2n=56$, presentando una morfología cromosómica constituida de cromosomas monorráneos (Matthey 1957). La reducción en el número cromosómico en el grupo de los Arvicólidos son principalmente las fusiones céntricas y las inversiones pericéntricas (Modi, 1987b).

En 1957 Matthey al estudiar especímenes del noreste de Nuevo México encontró un $2n=44$ y un $NF=54$ consta de seis pares birráneos y 15 pares acrocéntricos, el cromosoma sexual X fue submetacéntrico y el cromosoma Y fue acrocéntrico.

Las poblaciones examinadas por Lee y Elder (1977) para ejemplares de los estados de Jalisco y Durango presentaron un $2n= 48$ y un $NF= 57$ o 58 , consta de ocho cromosomas birráneos grandes a medianos, cuatro cromosomas birráneos pequeños y 36 cromosomas acrocéntricos grandes a pequeños. El cromosoma X fue acrocéntrico y el cromosoma Y fue acrocéntrico pequeño.

Uribe (1977) realizó la descripción del cariotipo de *Microtus mexicanus* en el sur del valle de México donde obtuvo un $2n=48$ y $NF=57$ o 58 , consta de seis pares birráneos y 17 pares monorráneos, el cromosoma sexual X consiste en acrocéntrico grande y el cromosoma Y fue acrocéntrico pequeño.

Por otra parte, Wilhelm (1982) describió para organismos de Nuevo México un cariotipo que consiste en dos pares metacéntricos, cuatro pares submetacéntricos y 15 pares acrocéntricos correspondientes a un $2n=44$ y $NF=54$.

En ejemplares de Jalisco, Volcán de Colima, Modi (1987a) encontró un $2n=48$ y un $NF=58$, consta de seis pares birráneos, 17 pares monorráneos. El par sexual corresponde a dos acrocéntricos grandes.

En San Juan Atepec, Oaxaca, la población estudiada por Martínez (1991) encontró un $2n=48$ y $NF=58$, que consiste en cuatro pares metacéntricos, dos pares submetacéntricos y 17 telocéntricos. El par sexual corresponde a dos cromosomas telocéntricos.

En Querétaro, México, Veracruz y Tlaxcala, González (1992) encontró un $2n=48$ y $NF=58$ en todas las poblaciones, la población de Tlaxcala, México y Veracruz el cariotipo consiste en cuatro pares metacéntricos, dos pares submetacéntricos y 17 telocéntricos, no obstante, la población de Querétaro presentó un cambio en la morfología de los cromosomas, siendo que en vez de tener dos pares submetacéntricos presentó un par submetacéntrico y un par subtlocéntrico en comparación con las otras poblaciones estudiadas. El par sexual en las cuatro poblaciones fueron cromosomas telocéntricos, siendo el cromosoma X telocéntrico grande y el cromosoma Y telocéntrico pequeño.

En Libres, Puebla, Pozos *et al.* (2022) encontraron un $2n=48$ y $NF=54$, consta de cuatro pares submetacéntricos y 19 pares telocéntricos, el par sexual está conformado por telocéntricos.

Al ser una especie que presenta poblaciones aisladas y polimorfismo cromosómico, es necesario estudiar esta especie en otras localidades dentro de su distribución en el territorio mexicano.

JUSTIFICACIÓN

Los estudios citogenéticos de roedores permiten aportar información sobre las variaciones en las diferentes áreas geográficas de México, cabe mencionar que los individuos son pequeños y en su gran mayoría representan un número diploide de 48, sin embargo, presenta una notable variación en la morfología del cariotipo y en el número fundamental lo cual ha sido de gran interés ya que diversos estudios mencionan que pueden existir cambios cromosómicos debido a los rearrreglos tal como inversiones, translocaciones, deleciones o adiciones de cromatina, lo que origina que las especies presenten diferencias en los cromosomas, el presente estudio realizó el análisis cromosómico de *Microtus mexicanus*, ya que corresponde a un género politípico, por lo que es importante conocer las semejanzas y diferencias entre poblaciones de *Microtus mexicanus* en México.

OBJETIVOS

Objetivo general

Describir el cariotipo de *Microtus mexicanus* de Camotepec del municipio de Zacatlán, Puebla.

Objetivos particulares

Obtener el patrón de bandas cromosómicas G y C de *Microtus mexicanus* de Camotepec del municipio de Zacatlán, Puebla.

Comparar el cariotipo de *Microtus mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla con otras localidades estudiadas del territorio mexicano.

Comparar el bandeo cromosómico G y C de *Microtus mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla con otras localidades estudiadas del territorio mexicano.

METODOLOGÍA

Área de Estudio

EL municipio de Zacatlán está localizado en el estado de Puebla (Figura 5). Tiene una superficie de 489.33 kilómetros y se encuentra en las coordenadas geográficas 20° 02' 48" latitud norte y meridianos 97° 51' y 98° 04' de longitud oeste. Zacatlán colinda al Noroeste con Ahuatepec, al Norte con Huauchinango, Chiconautla, Noreste: Ahuacatlán, Este: Tepetzintla y Tetela de Ocampo, Oeste: Hinojosa del Estado de Hidalgo y Ahuazotepec, Sur: Aquixtla; Suroeste: Chignahuapan (INEGI, 2010).

En el municipio se presenta el clima templado húmedo con abundantes lluvias en verano siendo uno de los principales climas de la región, no obstante, también se encuentran los climas templado subhúmedo y semicálido húmedo (INEGI, 2010).

La mayor parte del municipio presenta zonas dedicadas a la agricultura de temporal, que probablemente crecieron a costa de la flora nativa, presenta bosques y pastizales menores en comparación con las zonas agrícolas de todo el territorio. Se encuentra dentro del eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental. Presentando los siguientes tipos de suelos: andosol 40.40%, Luvisol 26.44%, Durisol 15.53%, Phaeozem 6.47%, Vertisol 3.96% y Cambisol 3.26% (INEGI, 2010).

Camotepec es una localidad que pertenece al municipio de Zacatlán, se encuentra a una altitud de 2467 metros, el sitio de colecta es cerca de Piedras Encimadas (Figura 6).

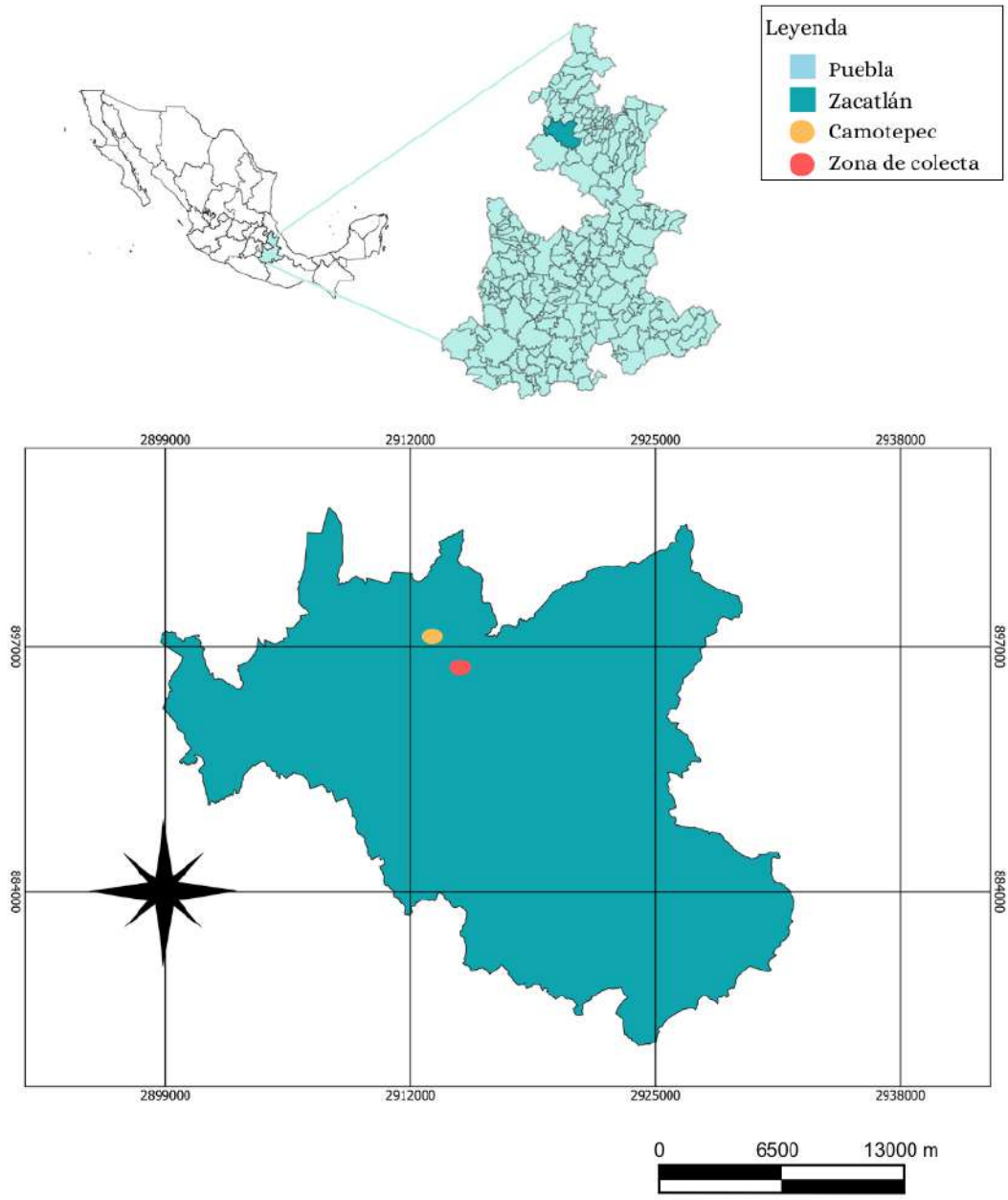


Figura 6. Ubicación de colecta de *Microtus mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla.



Figura 7. Sitios de colecta de *Microtus mexicanus* en Camotepec, Zacatlán, Puebla. Fotografías de Diana Laura Vázquez Cozátl.

Trabajo en campo

Se realizó la captura de los organismos colocando 30 trampas tipo Sherman, con un cebo de hojuelas de avena y vainilla. Al ser capturados se realizó una identificación primaria, posteriormente se trasladaron los ejemplares al Laboratorio de mastozoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Trabajo de laboratorio

Una vez capturados los organismos se realizó la técnica de extracción de médula ósea para la obtención de cariotipo y bandas cromosómicas de acuerdo a Baker y Qumsiyeh (1998).

El procesamiento del ejemplar para la obtención de la médula ósea se realizó de la siguiente manera: los ejemplares capturados fueron caracterizados sexualmente y pesados, posteriormente se utilizó colchicina al 0.04% 40 minutos antes del sacrificio (Baker *et al.*, 1988). La colchicina es un agente que inhibe el huso acromático, deteniendo el ciclo celular en la metafase.

Pasando el tiempo antes mencionado los organismos fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se tomaron las medidas morfométricas de cada organismo; longitud total, longitud de cola, longitud de la pata y longitud de la oreja; la técnica de la extracción de médula ósea en cada organismo consistió en retirar los fémures y las tibias, eliminando el músculo de los huesos, cortando las epífisis en el extremo proximal. Con una jeringa se extrajo la médula ósea y se colocó en tubos de 15ml, los cuales contenían 7ml de solución hipotónica a 37°C, en donde se incubó durante 40 minutos (Baker *et al.*, 1998).

Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 800 rpm durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y nuevamente se suspendió en la misma cantidad de líquido fijador Carnoy, este tuvo que ser aplicado resbalando por la pared del tubo para que no toque el material celular.

A la piel de los organismos se le realizó una taxidermia descrita por Martínez *et al.* (2006) para su identificación e incorporación a la Colección de mamíferos de la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP.

Para la elaboración de laminillas, se utilizó material previamente lavado. Posteriormente con una pipeta Pasteur para cada organismo, con la cual se tomó material celular y se dejaron caer gotas en el portaobjetos desde una distancia de dos metros y medio con el propósito de lograr el rompimiento de la membrana celular. Se realizó la técnica de fuego-aire, donde en la parte inferior de la laminilla se aplicó fuego con un serillo y posteriormente se realizó el extendido del material con aire comprimido y se dejó secar durante varios minutos, una vez secas estas laminillas fueron rotuladas con la fecha de elaboración, nombre de la especie de estudio, número del ejemplar y número consecutivo de cada laminilla.

Posteriormente se tiñeron con una solución de Giemsa al 4% durante ocho minutos. Al termino se enjuagaron con agua destilada para quitar el exceso de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente, después de un tiempo las laminillas se analizaron bajo un microscopio óptico con los diferentes objetivos de 10X 40X y 100X buscando los mejores campos mitóticos en metafase que fueron fotografiados empleando una cámara digital adaptable.

Bandeo cromosómico G

Para la elaboración del bandeo cromosómico G se utilizó la técnica modificada de Grouchy y Turleau (1997); Paton y Baker (1978); Urbina (2011). Las preparaciones se dejaron envejecer en un periodo de siete días para colocarlas a una temperatura de 65°C durante 16 horas, esto con el fin de endurecer los cromosomas y obtener un patrón de bandas. Una vez transcurrido el proceso anterior se dejaron enfriar a temperatura ambiente para posteriormente se colocaron las laminillas en tripsina al 0.025% durante 80 segundos. Pasando este tiempo las laminillas se metieron en solución de amortiguador de fosfato salino (PBS) en dos vasos Coplin, realizando enjuagues por 10 veces en cada vaso Coplin, posteriormente se sumergieron las laminillas en el colorante de Wright durante dos minutos, después en Giemsa al 2% durante ocho minutos, se retiraron las laminillas y con agua destilada se eliminó el

exceso de tinción y se dejaron secar a temperatura para después observar al microscopio óptico.

Bandeo cromosómico C

Para el bandeo se utilizó la técnica descrita por Summer *et al.* (1971); Arrighi y Hsu (1971). Las laminillas de campos mitóticos se dejaron envejecer en un lapso de siete días, pasando este tiempo las laminillas se colocaron en una solución de HCl al 2% durante 15 minutos, se lavaron con agua destilada tres veces y se dejaron secar. Las laminillas se colocaron en un vaso de Coplin con una solución saturada de Ba (HO)₂ (Hidróxido de Bario) a una temperatura de 45°C por dos minutos, posteriormente se sacaron de manera simultánea en HCl tres veces, una vez completado este ciclo se retiraron los residuos con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Después se colocaron en cámaras húmedas (cajas Petri con papel filtro en la base, el cual se humedeció con 2XSSC, pH 7.0). Se colocaron a lo largo de la preparación seis gotas de 2XSSC y se les colocó un portaobjetos en la parte donde se encuentran los campos cromosómicos, enseguida se metieron a incubar a una temperatura de 65°C durante 16 horas, posteriormente se retiraron los cubreobjetos y las laminillas se enjuagaron tres veces con agua destilada, se dejaron secar nuevamente para colocarlos en alcohol al 70% y al 95% durante cinco minutos en cada uno. Nuevamente se dejaron secar las laminillas a temperatura ambiente para finalmente teñir con Giemsa al 4%, la tinción se preparó con un amortiguador PBS durante 20 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente, para posteriormente observarlas con el microscopio óptico.

RESULTADOS

Se realizaron 29 laminillas correspondientes, de las cuales se obtuvieron un total de 1809 campos mitóticos, de los cuales se seleccionaron 120, que fueron los mejores y se fotografiaron (Figura 8).

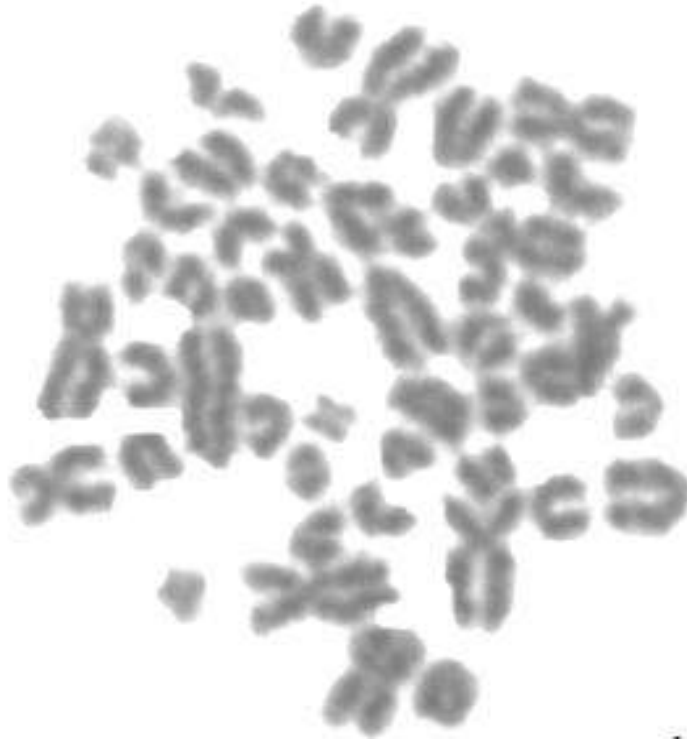


Figura 8. Campo mitótico del ejemplar macho de *Microtus mexicanus*.

Para el cariotipo convencional de *Microtus mexicanus* (Figura 9) presentó un $2n=48$ y $NF=58$, el cual estuvo conformado por cuatro pares metacéntricos, dos pares submetacéntricos y 17 pares telocéntricos, el par sexual está conformado por ser el cromosoma X fue un cromosoma telocéntrico grande y el cromosoma Y fue un telocéntrico pequeño.

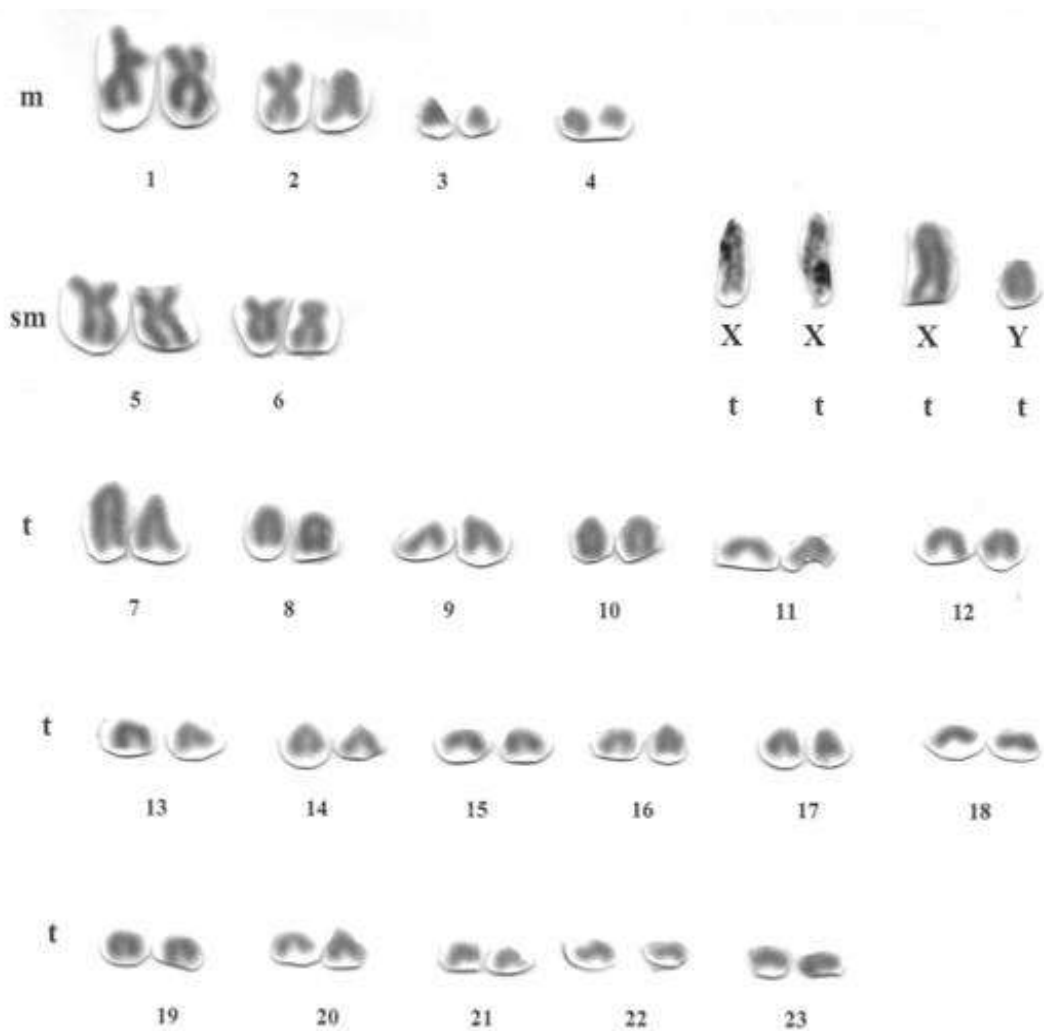


Figura 9. Cariotipo convencional de *Microtus mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla.

Los datos promedio de las longitudes relativas de los pares cromosómicos del cariotipo convencional de *Microtus mexicanus* se presentan en orden descendiente de tamaño y categoría basándose en la posición del centrómero (Levan *et al.*, 1964; Cuadro 1).

Cuadro 1. Longitudes relativas de los pares cromosómicos de *Microtus mexicanus*.

Par	p+q	Ds p+q	p	Ds p	q	Ds q	IC	Clasificación según Levan et al. (1964)
1	1.59	0.39	0.78	0.19	0.80	0.20	49.2	m
2	1.27	0.28	0.61	0.14	0.66	0.14	48.0	m
3	0.47	0.15	0.22	0.08	0.24	0.07	47.8	m
4	0.37	0.06	0.18	0.03	0.2	0.03	46.6	m
5	1.74	0.29	0.69	0.11	1.09	0.21	37.3	sm
6	1.24	0.39	0.45	0.15	0.78	0.25	36.6	sm
7	1.64	0.35			1.64	0.35		t
8	1.13	0.29			1.13	0.29		t
9	0.97	0.21			0.97	0.21		t
10	0.85	0.20			0.85	0.20		t
11	0.75	0.16			0.75	0.16		t
12	0.67	0.14			0.67	0.14		t
13	0.62	0.14			0.62	0.14		t
14	0.56	0.13			0.56	0.13		t
15	0.55	0.1			0.55	0.1		t
16	0.52	0.1			0.52	0.1		t
17	0.5	0.1			0.5	0.1		t
18	0.5	0.1			0.5	0.1		t
19	0.47	0.1			0.47	0.1		t
20	0.44	0.9			0.44	0.09		t
21	0.41	0.9			0.41	0.09		t
22	0.39	0.9			0.39	0.09		t
23	0.34	0.9			0.34	0.09		t
X	1.295	0.39			1.29	0.39		t
Y	0.725	0.41			0.72	0.41		t

p+q= Longitud total

DS p+q= desviación estándar de la longitud total del cromosoma

p= promedio de brazo corto

Ds q= desviación estándar del brazo corto

q= promedio de brazo largo

DS q= desviación estándar del brazo largo

IC= índice centromérico

m= metacéntrico, sm= submetacéntrico, st= subtlocéntrico, t= telocéntrico

La eucromatina en el bandeo cromosómico G mostró un patrón de bandas presentando en los cromosomas de uno a seis bandas (Figuras 10 y 11).

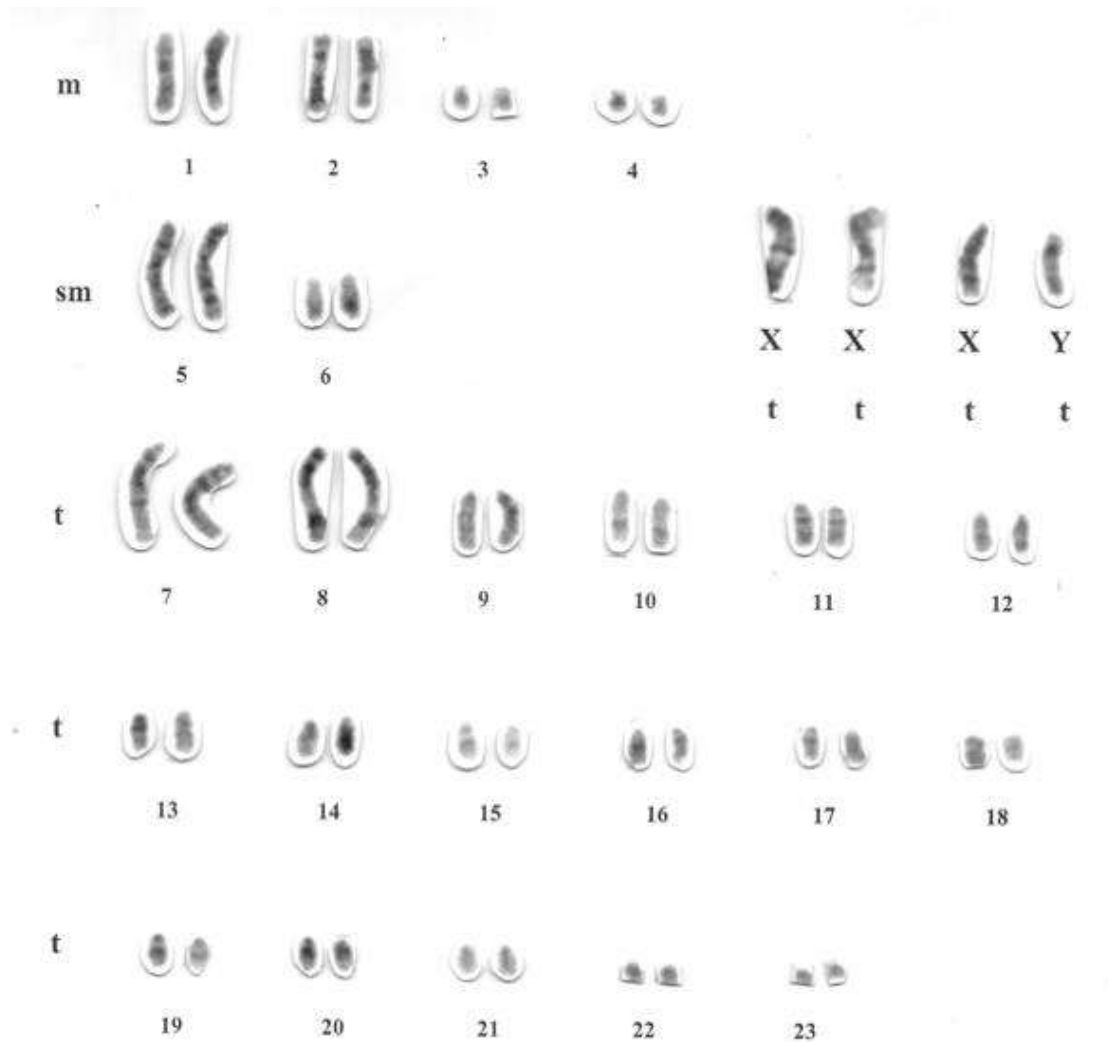


Figura 10. Bando cromosómico G de *M. mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla.

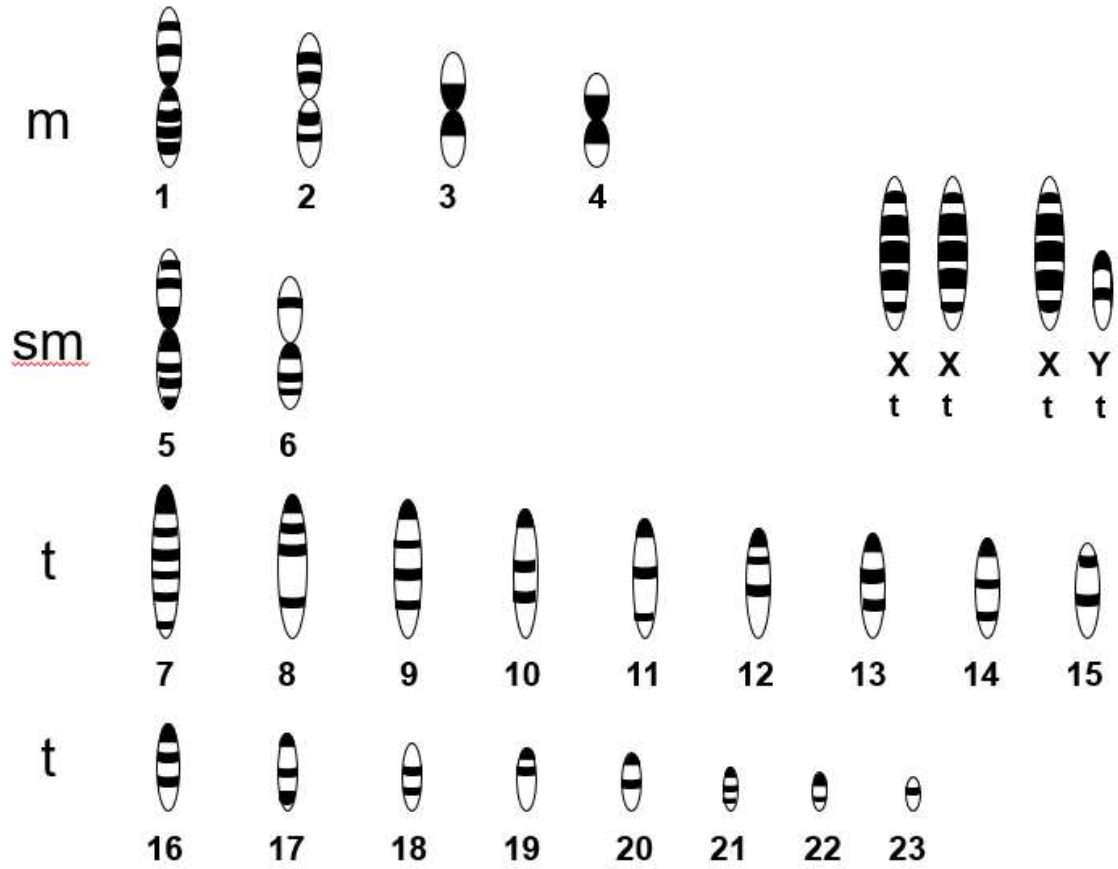


Figura 11. Ideograma del bandeo cromosómico G de *M. mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla.

El bandeo cromosómico C mostró que la heterocromatina constitutiva se encuentra en la región centromérica y en los cromosomas sexuales la heterocromatina se presenta en mayor proporción que en los autosomas (Figuras 12 y 13).

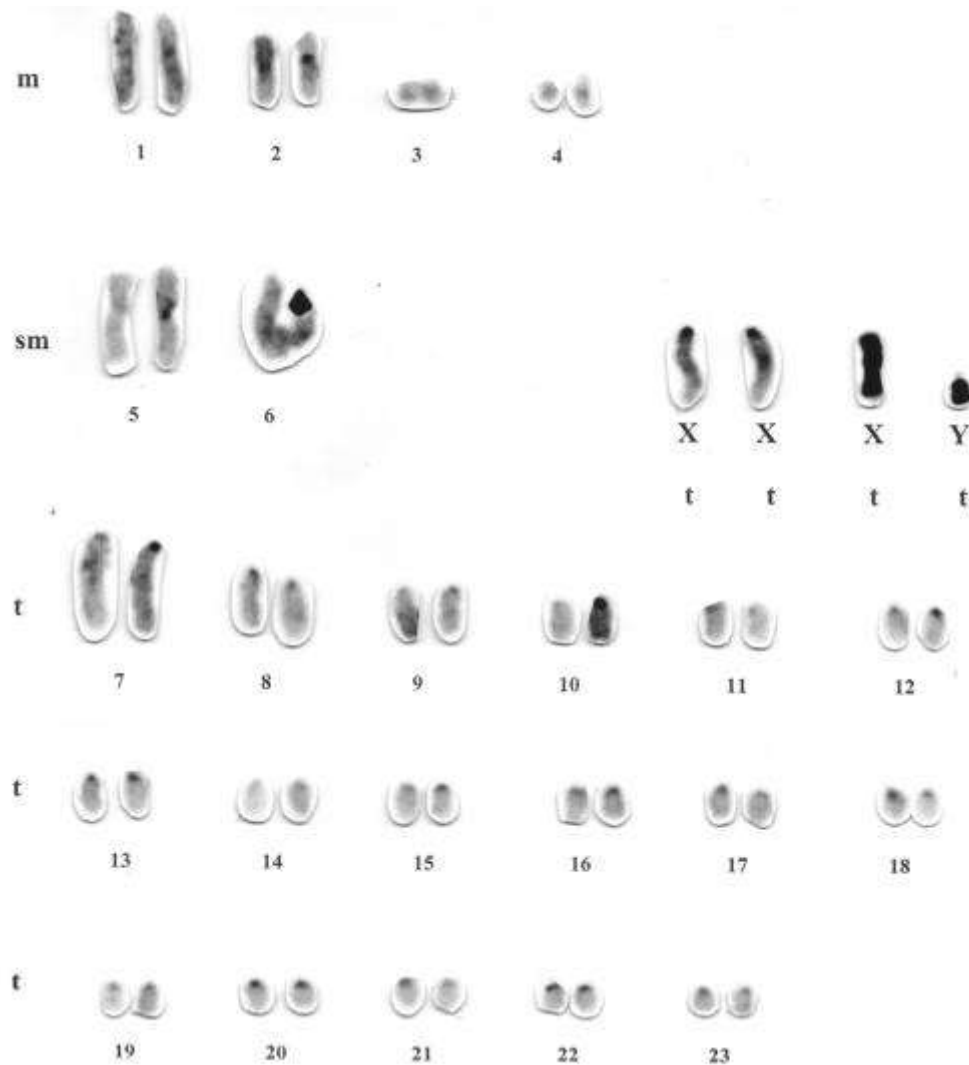


Figura 12. Bando cromosómico C de *Microtus mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla.

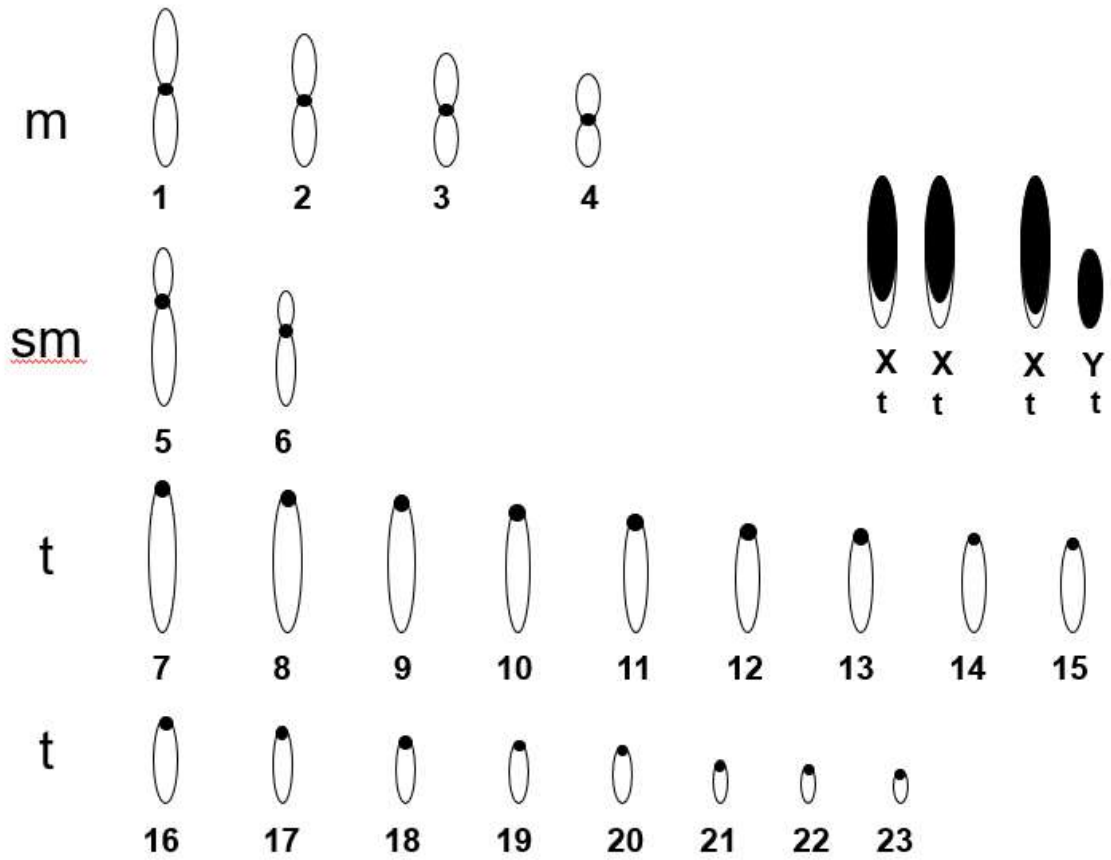


Figura 13. Ideograma del bandeo cromosómico C de *Microtus mexicanus* de Camotepec, Zacatlán, Puebla.

DISCUSIÓN

El cariotipo del ratón *Microtus mexicanus* de la localidad de Camotepec del municipio de Zacatlán, Puebla, presentó un $2n=48$ que coincide con las poblaciones estudiadas en el territorio mexicano. Se obtuvo como resultado un $NF=58$ lo cual concuerda con el estudio realizado por Lee y Elder (1977) para individuos de Jalisco y Durango en donde se describen cuatro cromosomas birrámeos largos, dos cromosomas birrámeos cortos y 17 pares de cromosomas acrocéntricos pequeños, el par sexual fue acrocéntrico, mientras que en el presente estudio se encontraron seis pares birrámeos y 17 pares monorrámeos, concordando en el número de pares birrámeos y monorrámeos obtenidos, así como en el par sexual.

En la población de Santa Ana, D.F. México estudiada por Uribe (1977); la población de Acatepec, Oaxaca analizada por Martínez (1991) y la población de Texcoco, México, Tlaxcala, y Perote, Veracruz estudiadas por González (1992) concuerdan en la obtención del número diploide y el número fundamental con el presente trabajo, presentando una morfología en su cariotipo de cuatro pares metacéntricos, dos pares submetacéntricos y 17 pares telocéntricos, el cromosoma sexual X fue telocéntrico grande y el cromosoma sexual Y fue telocéntrico pequeño.

Por otro lado, en la población de Querétaro analizada por González (1992) presentó un cambio estructural, con un cariotipo conformado por cuatro pares metacéntricos, un par submetacéntrico, un par subtlocéntrico y 17 pares telocéntricos, por lo que las modificaciones morfológicas estructurales en esta población fueron identificadas como una doble duplicación y adición de eucromatina.

Pozos *et al.*, (2022) analizaron una población de *Microtus mexicanus* en Libres, Puebla reportaron un $NF=54$ que corresponde a cuatro pares submetacéntricos y 19 pares telocéntricos, esta es una gran variación presentando una reducción en el número fundamental por lo que dicha población podría presentar reordenamientos cromosómicos tales como inversiones pericéntricas o translocaciones como planteó Whilhem (1977) y Uribe (1977).

El posible ancestro de los Arvicólidos presentaba un $2n=56$ considerando la tendencia evolutiva de la reducción del número diploide por medio de rearrreglos cromosómicos, los más frecuentes en Arvicólidos son: fusiones céntricas e inversiones pericéntricas (Matthey 1957; Modi, 1987b). Por lo que las poblaciones estudiadas por Matthey (1957) y Wilhem (1977) en Nuevo México presentan un $2n=44$, mientras que las poblaciones estudiadas en México presentan un $2n=48$ siendo el número diploide un rasgo característico primitivo.

Los estudios realizados en las poblaciones dentro del eje Neovolcánico transversal han mostrado que *Microtus mexicanus* es una especie conservada, no obstante, presentó cambios cromosómicos estructurales solamente en dos poblaciones que son Querétaro y Libres, Puebla (Cuadro 2). Esto debido a los diferentes tipos de vegetación, clima, ciertas barreras como montañas, cerros, lagos, ríos, que son factores que aportan variabilidad genética a los sujetos de estudio (Gobierno de Canarias, 2019).

La población estudiada de *Microtus mexicanus* de Camotepec mostró ser una población altamente conservada, por lo que en el patrón de bandeo cromosómico G no se llegó a detectar ningún tipo de rearrreglo cromosómico, sin embargo, se requieren de más estudios en el territorio poblano para saber cómo se encuentran las demás poblaciones.

En algunos roedores del género *Microtus* se presenta poca cantidad de heterocromatina constitutiva como es el caso de *M. ochrogaster* (Modi, 1987b). El cromosoma X presentó distribución homogénea de heterocromatina y el cromosoma Y fue heterocromático, por lo que no presentan una diferenciación con las poblaciones anteriormente mencionadas.

Cuadro 2. Comparación de las constantes cromosómicas de *Microtus mexicanus*.

Localidad/Autor	2n	NF	M	Sm	St	A	X	Y
Nuevo México Matthey (1957)	44	54-56	2	4	-	15	sm	A
Santa Ana, D.F. México Uribe (1977)	48	58	4	2	-	17	A	A
Atepec, Oaxaca Martínez (1991)	48	58	4	2	-	17	T	T
Malinche, Tlaxcala González (1992)	48	58	4	2	-	17	T	T
Querétaro González (1992)	48	58	4	1	1	17	T	T
Libres, Puebla Pozos <i>et al.</i> , (2022)	48	54	-	4	-	19	T	T
Presente Estudio	48	58	4	2	-	17	T	T

A = T donde A= acrocéntrico, T= telocéntrico.

CONCLUSIÓN

El cariotipo de *Microtus mexicanus* de Camotepec, del municipio de Zacatlán, Puebla presenta un $2n=48$ y un $NF=58$, la morfología corresponde a cuatro pares metacéntricos, dos pares submetacéntricos y 17 pares telocéntricos, en cuanto al par sexual el cromosoma X fue telocéntrico grande y el cromosoma Y fue telocéntrico pequeño.

En el bandeo cromosómico G se observó que la eucromatina en los cromosomas presenta de cinco a seis bandas en cromosomas grandes, de cuatro a tres bandas en cromosomas medianos y en los cromosomas pequeños presenta de una a tres bandas claras y oscuras.

La heterocromatina constitutiva en el bandeo cromosómico C muestra que se encuentra en la región centromérica, mientras que en los cromosomas sexuales presenta mayor porción heterocromática.

El presente estudio demostró que las constantes cariotípicas de *M. mexicanus* en Camotepec concuerdan con la mayoría de los estudios realizados en las diferentes poblaciones analizadas de la especie en el territorio mexicano, no obstante, presentan variaciones cromosómicas.

REFERENCIAS

- Arrighi, F. E. y T. C. Hsu. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 1 February 1971; 10 (2): 81–86. <https://doi.org/10.1159/000130130>
- Baker, R.J., M.B. Qumsiyeh, y I. L. Rautenbach. (1988). Evidence for eight tandem and five centric fusions in the evolution of the karyotype of *Aethomys namaquensis* A. Smith (Rodentia: Muridae). *Genetica* **76**, 161–169. <https://doi.org/10.1007/BF00140220>
- Beck, M. L., y M. L. Kennedy. (1977). Chromosomal study of *Liomys pictus*. *Journal of the Tennessee Academy of Science*. 52(3):109-110.
- Ceballos, G. (2014). *Mammals of Mexico*. Johns Hopkins University Press. <https://books.google.com.mx/books?id=UrvxBQAAQBAJ>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2011. *La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado*. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 163-164.
- Córdova, J. H., y L. Gerardo. (1997). Citogenética, filogenética, Clasificaciones naturales y evolución de Especies. *ALMA MATER*, 95-112. Obtenido de https://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/alma_mater/1997_n13-14/citogenetica.htm
- Drets, M. E. (2002). Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeado cromosómico, significado y protección bio-medica. *Revista Médica de Uruguay*, 18 (2), 107-121.
- Garner, J. (1990). *Principios de genética*. Limusa, Wiley. México. 659.
- Gaines, M. S. (1985). Genetics. [In: *Biology of New World Microtus*. R. H. Tamarin, ed]. Special Publication No.8, American Society of Mammalogists, Lawrence, Kansas:84-115.

- Gobierno de Canarias. (2019). Biología y Geología 4. <http://www3.gobiernodecanarias.org/medusa/ecoblog/mafogonl/files/2019/10/89094650-b-y-g-4o.pdf>
- González, M. R. M. (1992). Variación cromosómica del ratón metorito *Microtus mexicanus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/158336>
- Grouchy, J y C. Turleau. (1977). Clinical atlas of human chromosomes. John Wiley y Sons, New York 27-271
- Hall, E. R. (1981). The Mammals of North America. Second ed. John Wiley & Sons, New York.
- Herrera, J. C. (2007). La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 26-35.
- INEGI. (2010). Compendio de Información Geográfica Municipal Zacatlán, Puebla. Obtenido de https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21208.pdf
- Judd, S. R. (1980). Observations of the chromosome variation in *Microtus mexicanus* (Rodentia:Microtinae). *Mamm. Chromosome Newsl*, 21(3), 110-113.
- Lee, M. R. y F. F. B. Elder. (1997). Karyotypes of eight species of mexican rodents (Muridae). *Journal Mammalogy* 58(4): 479-487. <https://doi.org/10.2307/1379996>
- Levan, A., K. Fredga, y A. A. Sandberg. (1964). Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, 52:201-220.
- Luque, J., y A. Herráez. (2001). Consideración del cromosoma. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética; conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud, 132-136.

- Martínez, V. J., R. M. González, y M. J. Dávila. (2006). Manual de Métodos de recolecta de plantas y animales. Benemérita Autónoma de Puebla. Escuela de Biología. Dirección general de Fomento editorial. 234 p.
- Martínez, V. J. (1991). Comparación cromosómica y morfométrica entre *Microtus mexicanus fulviventer* y *Microtus oaxacensis*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3445870>
- Matthey, R. (1957). Cytologie comparee, systematique et phylogenie des Microtinae (Rodentia-Muridae. Revue Suisse Zoologie, 48:27-37.
- Modi, W. S. (1987a). Phylogenetic analyses of chromosomal banding patterns among the Nearctic Arvicolidae (Mammalia: Rodentia). Systematic Zoology 36: 109–136.
- Modi, W. S. (1987b). C banding analyses and the evolution heterochromatin among arvicolid rodents. Journal of Mammalogy, 68 (3): 704-714. <https://doi.org/10.2307/1381612>
- McIntosh JR. (2016). Mitosis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Sep 1;8(9): a023218. doi: 10.1101/cshperspect.a023218.PMID: 27587616; PMCID: PMC5008068.
- Patton, J. C. y R. J. Baker. (1978). Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. Systematic Zoology, 27:449-462.
- Pozos, M. N., N. Martínez, R. M. González, y J. Martínez, (2022). Cariotipo de *Microtus mexicanus* de Libres, Puebla. Memorias del XXV Congreso Nacional de Zoología.
- Santos, M. J. A. y Y. Hortelano. (1997). La variación en mamíferos: una revisión de los enfoques metodológicos actuales. Acta Zoológica Mexicana, Nueva Serie, 70: 13-34.
- Summer, A. T. H. J, Evans, y R. Buckland. (1971). New Technique for distinguishing between human chromosomes. Nature New Biology. 232:31-32.

- Solari, A. J. (2004). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 376-378.
- Tamar, S. C., N. C. Contreras, y J. D. Fonseca. (2008). Utilidad de la citogenética en la medicina actual visión histórica y aplicación. *Acta Medica Colombiana*, 33(4), 309-316. Retrieved October 24, 2024, http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482008000400009&lng=en&tlng=es.
- Uribe, M. (1997). Estudios citogenéticos en algunas especies de roedores y lagomorfos de México. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM, México. 169 p.
- Urbina, S. I. (2011). Variación cromosómica del género *Reithrodontomys* de bosque mesófilo de montaña. Pag 49-53.
- Van Gelder, R.G. (1969). Voucher Specimens in Comparative Cytogenetic Studies. In: Benirschke, K. (eds) *Comparative Mammalian Cytogenetics*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85943-4_26.
- Wilhelm, D. E. (1982). Zoogeographic and evolutionary relationships of selected populations of *Microtus mexicanus*. *Zoogeographic and Evolutionary Relationships of Selected Populations of Microtus mexicanus*, 75: 1--30. <https://www.biodiversitylibrary.org/part/282151>
- Wilson, D. E. y S. Ruff. (1999). *The Smithsonian Book of North American Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, USA. Pag 634-635.

ANEXO

Solución Hipotónica

0.075 M KCl

Se pesan 0.56 g. y se afora en 100ml de agua destilada. Esta solución se puede utilizar dos días máximo sino presenta contaminación y se guarda en refrigeración.

Fijador Carnoy

Proporción 3:1. Metanol 15 ml y Ácido acético 5 ml

Se debe preparar 30 minutos antes de ser utilizado manteniéndolo en refrigeración. Puede ser utilizado hasta tres horas después de ser preparado.

Colchicina al 0.04%

Se utiliza en una proporción de 1 ml por cada 10 g de peso del roedor.

Tinción convencional Giemsa

Solución amortiguadora

- 10 M NaH_2PO_4

Se pesan 1.38 g de reactivo y se afora con 100 ml de agua destilada.

Solución A: Se utilizan 15 ml

- 10 M Na_2HPO_4

Se pesan 1.42 g de reactivo y se afora con 100 ml de agua destilada.

Solución B: se utilizan 10 ml

La solución A y B se diluyen juntas para formar la solución amortiguadora AB.

Esta solución se puede mantener en refrigeración a -4°C hasta que no se observe que la solución presente contaminación.

- Solución de Giemsa concentrada (Microlab) 1 ml
- Agua destilada 47 ml
- Solución amortiguadora (AB) 2 ml

Esta preparación se puede usar durante un día, conservándola a temperatura ambiente.

Solución Buffer de Fosfato Salino (PBS)

Se pesan los siguientes reactivos:

2 g NaCl

0.05 g KCl

0.2875 g NaH₂PO₄

0.05 g KH₂PO₄

Una vez pesados se diluyen en 250 ml de agua destilada. El buffer de fosfato se debe mantener en refrigeración a 4°C.

Solución Stock de Tripsina

0.05 gr de Tripsina Difco (1.250)

50 ml de buffer de fosfato salino (PBS)

Una vez pesada la Tripsina Difco se diluye en 50 ml de la solución PBS. Esta solución debe permanecer en refrigeración y puede ser usada mientras no se observe contaminación.

Para la concentración de Tripsina al 0.25% se utiliza una proporción 3:1, es decir, por tres partes de PBS es una parte de tripsina.

Buffer de Sörensen

Pesar 3.315 g de KH_2PO_4 y pesar 1.28 g NaH_2PO_4

Se disuelven en 400 ml de agua destilada y se afora a 500 ml.

Solución Stock Wright

En un mortero se coloca 0.16 g de colorante Wright y se colocan 10 ml de metanol. Se macera hasta que el colorante quede disuelto. Y se afora con metanol hasta obtener un volumen final de 100 ml. Posteriormente se agita durante tres horas. Finalmente se conserva en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Colorante Wright (Solución de trabajo para Bandas G)

12 ml de solución Stock Wright

36 ml de Buffer de Sörensen (pH 6.8)

Solución Stock Giemsa

Colocar en un mortero 1 g de Giemsa, se agregan 66 ml de glicerina a 60°C mientras se macera hasta quedar disuelto el colorante y posteriormente se agregan 132 ml de metanol y se agita durante 4 hrs. Finalmente se guarda en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Colorante Giemsa (Solución de trabajo para Bandas G)

6 ml de Solución de Stock Giemsa

44 ml de Buffer de Sörensen (pH 6.8)

Solución de Ácido clorhídrico

Solución stock de HCl al 0.2 N

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

La solución stock se mantiene a temperatura ambiente mientras no se observe contaminación y se puede conservar durante un día a temperatura ambiente.

Solución de Hidróxido de Bario

5 g de Hidróxido de Bario

50 ml de agua destilada

Se diluye el Ba (OH)₂ en el agua destilada y se mantiene a temperatura ambiente durante dos semanas.

Solución Stock 10XSSC para Bandas C

NaCl 1.5 M

Se pesan 8.7675 g de este reactivo.

Citrato de sodio 0.15 M

Se pesan 4.4117 g de este reactivo.

Los dos reactivos se diluyen en 100 ml de agua destilada, esta solución debe permanecer en refrigeración a 4°C.

Se toman 10 ml de 10XSSC y 40 ml de agua destilada para obtener una solución de 2XSSC. Esta solución debe permanecer en refrigeración y solo se utiliza un día.

Giemsa al 4% en Buffer de Fosfato de Sodio para Bandas C

- 0.01 M de NaH₂PO₄

Se pesan 0.1379 g de este reactivo y se diluyen en 100 ml de agua destilada.

Solución A: se utilizan 68ml

- 0.01 M de Na₂HPO₄

Se pesan 0.1419 g de este reactivo y se diluyen en 100 ml de agua destilada.

Solución B: se utilizan 100 ml

La solución A y B se diluyen juntas para formar la solución AB. Este buffer puede ser utilizado un día a temperatura ambiente.

Se tomarán 48 ml del buffer y 2 ml de Giemsa (Microlab).