BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGÍCAS

ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE *PEROMYSCUS DIFFICILIS AMPLUS* DE SAN PEDRO ATLIXCO TIANGUISMANALCO, PUEBLA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
JESSICA USIEL GARCÍA VIVAR

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESÚS MARTÍNEZ VÁZQUEZ

PUEBLA **SEPTIEMBRE, 2018**

DEDICATORIA

A mis padres Gabriela Vivar Tapia y Edgar Grover García Feria, por darme el apoyo incondicional, por sus consejos, y por ser mi guía siempre.

A mi hermano por estar siempre a mi lado y tolerarme, sobre todo por ser parte importante en mi vida y quererme.

A mis amigos compañeros de laboratorio que estuvieron conmigo durante este proyecto y me ayudaron de manera incondicional, por regalarme momentos de risa, los quiero mucho.

A mis familiares que estuvieron al pendiente de mí dándome palabras de aliento, consejos y demás.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Martínez Vázquez por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por apoyarme las veces que lo necesité y permitirme ser parte del laboratorio de Mastozoología.

A mis revisores de tesis, la M. en C. Rosa María González Monroy y al M. en C. Héctor Rafael Eliosa León por las revisiones para mejorar el presente trabajo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y a los profesores que fueron parte de mi formación como bióloga, a lo largo de la licenciatura.

A la M. en C. Montserrat Lucero Cuautle García y a mi compañera Azucena Milán Cantero, por el apoyo para la captura de los organismos.

ÍNDICE

DEDICATORIA
AGRADECIMIENTOS
RESUMEN
1. INTRODUCCIÓN…… 1
1.1. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE…… 4
1.2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA…… 4
1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA……... 5
1.4. ESTADO DE CONSERVACIÓN……..... 6
1.5. DISTRIBUCIÓN…… 7
2. ANTECEDENTES…… 9
3. JUSTIFICACIÓN…… 11
4. OBJETIVOS…… 12
4.1. GENERAL…… 12
4.2. PARTICULARES…… 12
5. ÁREA DE ESTUDIO…….. 13
6. METODOLOGÍA…… 16
6.1. TRABAJO DE CAMPO…… 16
6.2. TRABAJO DE LABORATORIO……..... 16
6.2.1. BANDEO CROMOSÓMICO G…….. 18
6.2.2. BANDEO CROMOSÓMICO C…….. 18
7. RESULTADOS……..... 20
7.1. BANDEO CROMOSÓMICO G……..... 24
7.2. BANDEO CROMOSÓMICO C…… 26
8. DISCUSIÓN……..... 29
9. CONCLUSIÓN…… 34
10. LITERATURA CITADA…… 35
11. ANEXO…….. 39

RESUMEN

La citogenética, es una rama de la biología que se encarga del estudio de la estructura cariotípica, eventos citológicos y análisis cariotípico que examina el número y morfología necesaria para observar las semejanzas y diferencias cromosómicas entre especies así como su posible relación con la especiación. Un proceso crucial en el análisis es la mitosis por ello es importante obtener un cariotipo en metafase, ya que es la fase en la que los cromosomas se caracterizan por mantener su morfología básica, el cariotipo es el conjunto de cromosomas ordenados que definen a cada especie, el cual se obtiene de células en división rotas por medios mecánicos. En lo que refiere a mamíferos en poblaciones silvestres se ha demostrado que los individuos son, en cierta forma heterocigotos. En algunos casos, los genes, aun siendo parecidos, pueden estar ordenados de manera distinta debido a las alteraciones en los segmentos cromosómicos. Estos cambios han desempeñado también un papel preponderante en el mecanismo de la formación de especies es por eso que el objetivo de este estudio fue describir el cariotipo y las bandas cromosómicas G y C de *Peromyscus difficilis amplus* en la localidad de San Pedro Tianguismanalco, Puebla. Se capturaron vivos los individuos utilizando trampas Sherman, se les realizó la técnica de extracción de médula ósea para la obtención del cariotipo convencional y se usó Tripsina para el bandeo cromosómico G y para las bandas C se empleó Hidróxido de Bario. Los resultados indican que el cariotipo de *Peromyscus difficilis amplus* presenta 2n=48 y NF=52 que corresponden a un par metacéntrico, dos subtelocéntricos y 20 pares telocéntricos. El cromosoma sexual X fue submetacéntrico y el sexual Y fue telocéntrico. El patrón de bandas cromosómicas G en los autosomas birrámeos presentan cinco bandas y los telocéntricos presentan de dos a tres bandas de eucromatina. Las bandas cromosómicas C, indican que la heterocromatina constitutiva se encontró en la región centromérica en los autosomas. En el cromosoma sexual X se encuentra la heterocromatina constitutiva en el centrómero y en el cromosoma Y fue heterocromatico. Comparando los resultados obtenidos con otras especies se puede afirmar que *Peromyscus difficilis amplus* presenta características cariotípicas primitivas conformado en su mayoría por cromosomas telocéntricos además de que los

resultados obtenidos son distintos a los estudios anteriores que se han hecho para esta especie.

1. INTRODUCCIÓN

La citogenética, es una rama de la biología que se encarga del estudio de la estructura cariotípica, las estructuras celulares y los eventos citológicos que intervienen en la formación hereditaria. Un proceso crucial en el análisis citogenético es la mitosis. La metafase es la etapa celular en la que aparecen los cromosomas (estructuras formadas con ADN y proteínas que constituyen la cromatina) en la cual los genes están arreglados de modo lineal en estructuras nucleares que resultan de la condensación de la cromatina. Los cromosomas tienen un brazo largo y un brazo corto separados por un estrechamiento o constricción primaria denominada centrómero. El brazo corto se denomina p y el brazo largo como q, el centrómero es el punto de unión del huso mitótico y es parte integral del cromosoma. Es esencial para el movimiento y segregación normal del cromosoma durante la división celular. También se define en un sentido amplio a la citogenética como aquella disciplina que trata sobre la estructura y el comportamiento de los cromosomas, así como de las implicaciones genéticas derivadas de su estudio (Herrera, 2007). La citogenética ha facilitado grandemente el entendimiento de la organización y estructura de los genomas, de ahí la importancia que ha empezado a tener en los proyectos de mapeo genético que se adelantan actualmente en distintas especies. Basados en el ordenamiento secuencial de grandes fragmentos cromosómicos y los mapas genéticos (derivados de los análisis genéticos o de ligamiento; Herrera, 2007).

La disponibilidad de un mapa citogénetico permite posicionar los genes y los marcadores ligados a éstos con respecto a los marcadores de tipo estructural propios de regiones cromosómicas específicas, por ejemplo, centrómeros, telómeros, constricciones secundarias. En consecuencia, una información citogenética detallada resulta indispensable para combinar de manera coherente, la información genética disponible con la estructura física de los cromosomas; de igual forma es útil en las enfermedades genéticas que son de cuatro tipos: enfermedades de herencia mendeliana o monogénica, enfermedades multifactoriales, enfermedades mitocondriales y enfermedades cromosómicas (Herrera, 2007).

También a pesar de su uso poco frecuente, los cromosomas son indudablemente caracteres poderosos para inferir relaciones filogenéticas. Así como también son una característica estable y ampliamente representativa del cariotipo filogenético es por ello que es importante que los cromosomas sean obtenidos en metafase, de células que se encuentren en división, rotas por medios mecánicos (Searle, 1984).

Este tipo de cromosomas se caracterizan por mantener su morfología básica, lo cual permite inferir de manera general la ubicación de las sondas en el genoma. Sin embargo, la elevada condensación de la cromatina que caracteriza la metafase reduce grandemente tanto la resolución como la sensibilidad obtenidas al utilizar este tipo de cromosomas. Ante tal limitante, la fijación de cromosomas mitóticos en estadios más tempranos (como la interfase) es una alternativa interesante dado el menor grado de condensación que presentan. Si bien la resolución mejora sensiblemente, la pérdida de la estructura cromosómica, a causa de la descondensación de la cromatina, impide la localización precisa de la sonda respecto al cromosoma (De Jong *et al*., 1999).

Ya que por su propia naturaleza (unidades hereditarias discretas de mutación responsables de la transmisión del genoma nuclear), dan testimonio directo de la historia evolutiva de los linajes existentes. En lo que refiere a mamíferos la citogenética ha sido utilizada para el estudio de cariotipos de diferentes especies porque ha establecido una serie de hechos de gran interés, tanto para el reino vegetal como para el animal. En poblaciones silvestres ha demostrado que los individuos son, en cierta forma heterocigotos. En algunos casos, los genes, aun siendo parecidos, pueden estar ordenados de manera distinta debido a las alteraciones en los segmentos cromosómicos. Estos cambios han desempeñado también un papel preponderante en el mecanismo de la formación de especies (Gardner, 1990).

El análisis cariotípico examina el número y la morfología de los cromosomas, el número brazos cromosómicos, la extensión y localización de segmento heterocromáticos, el organizador nucleolar, así como las constricciones secundarias donde la citotaxonomía evalúa las semejanzas y diferencias cromosómicas entre especies y su posible relación con la especiación (Cortés, 1984). El cariotipo es la construcción cromosómica de un individuo, un rasgo característico de cada especie

(Luque y Herraez, 2001). Todos los organismos de una especie tienen el mismo cariotipo, sin embargo especies similares pueden tener cariotipos muy diferentes. En el análisis cromosómico se usan como constantes cromosómicas el tamaño del cromosoma, la posición del centrómero, distribución de los cromosomas, entre otros.

También las diferentes técnicas de bandeo cromosómico han significado un considerable progreso tanto en citogenética humana como en citogenética general ya que, al poder obtenerse imágenes reproducibles de la existencia de estructuras cromosómicas transversales (bandas) de diferente tamaño a lo largo de los cromosomas, fue posible disponer de una herramienta de identificación de cada cromosoma humano, así como de un importante número de otros organismos tanto animales como vegetales (Drets, 2002).

El gran valor de los diversos patrones de bandeo es que caracterizan a cada cromosoma de diversas especies de entidades biológicas superiores, excepto los vertebrados inferiores que no las poseen. En los vertebrados y en las plantas superiores las bandas se originaron a través de prolongadísimos procesos evolucionarios acaecidos a distintos niveles evolutivos constituyendo los componentes cromosómicos observables actualmente (Drets, 2002).

Este tipo de estudios son una herramienta muy importante en el análisis genético y sistemático de los mamíferos, gracias a esto se ha permitido comprender su evolución y taxonomía, además de tener gran relevancia en el estudio entre las relaciones filogenéticas de los taxa (Beck y Kennedy, 1977).

Se han realizado varios estudios citogenéticos en roedores debido a su amplia distribución y al papel que desempeñan a nivel ecológico, además de que consta de una gran diversidad de especies, así como la facilidad que tienen para reproducirse todo el año y cabe mencionar, que son organismos que pueden mantenerse bajo las condiciones de laboratorio.

Los roedores son el orden más numeroso de los mamíferos ya que comprenden 33 familias 481 géneros y 2,277 especies (Wilson y Reeder, 2005). Este orden en México está representado por ocho familias y 243 especies (Ceballos, 2014).

1.1. BIOLOGIA DE LA ESPECIE

1.2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Peromyscus difficilis amplus es un roedor de tamaño mediano con orejas grandes y una cola larga, uniformemente bicolor que es ligeramente más larga que la longitud total de la cabeza y el cuerpo. La coloración dorsal varía de pardusca a negruzca, con pelos oscuros dispuestos en líneas finas. La coloración de los flancos es la misma que la de la espalda, excepto por la presencia de una línea lateral bien definida, y sus partes inferiores son de color blanco al negro, impregnadas de plata y las orejas son grandes, pero son más cortas que el pie trasero (Ceballos, 2014; Hall, 1981; Hoffmeister y De la Torre, 1961; Figura 1).

Peromyscus difficilis amplus tiene un anillo orbital negruzco, rostro largo con una fosa nasal de alrededor de 11 mm, bulas auditivas grandes y borde supraorbitario sin ángulos agudos. Los rangos de mediciones externas registradas fueron: longitud total de 180 a 260 mm, longitud de la cola 91 a 145 mm, longitud de la pata trasera 22 a 28 mm y longitud de la oreja 17.5 a 28.0 mm (Ceballos, 2014; Hall, 1981).

1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA (Ceballos, 2014).

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase Mammalia

Orden: Rodentia

Familia: Cricetidae

Subfamilia: Neotominae

Género: *Peromyscus*

Especie: *Peromyscus difficilis* (J. A. Allen, 1891).

Subespecie: *Peromyscus difficilis amplus* (Osgood, 1904)

Figura 1. Macho adulto de *Peromyscus difficilis* (Jesús A. Fernández).

1.4. ESTADO DE CONSERVACIÓN

Peromyscus difficilis amplus es considerado de Preocupación menor por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales. Esta especie no está considerada en ninguna categoría de riesgo por ninguna agencia de conservación mexicana o internacional (Castro-Arellano y Vázquez, 2016).

1.5. DISTRIBUCIÓN

Peromyscus difficilis amplus es endémico de México (Figura 2) y se encuentra en toda la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y montañas adyacentes desde el suroeste de Chihuahua y el sureste de Coahuila, al sur a través de Durango y Zacatecas continuando al sur hacia partes de San Luis Potosí y regiones montañosas de Guanajuato, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Veracruz y por último hacía el centro-norte de Oaxaca (Ceballos, 2014; Hall, 1981; Hoffmeister y De la Torre, 1961). *P. d. amplus* se distribuye en las montañas del sur de Hidalgo, la parte norte del estado de México, Tlaxcala, Puebla, el centro-norte de Oaxaca y el centro-oeste de Veracruz Y la subespecie *Peromyscus difficilis dificillis* se presenta en el oeste de Chihuahua, hacia el sur a lo largo de la Sierra Madre Occidental hacia Guanajuato. *P. d. petricola* se encuentra en la Sierra Madre Oriental, en el sureste de Coahuila, al suroeste de Tamaulipas y probablemente en el norte de San Luis Potosí y en el sur de Nuevo León (Hoffmeister y De la Torre, 1961). El rango de *P. d. felipensis* parece estar fragmentado; esta especie se encuentra en altas elevaciones (2,500 a 3,500 m) en las montañas que rodean el Valle de México y también se encuentra en elevaciones similares en las montañas al noreste de la ciudad de Oaxaca (Cerro San Felipe y cordilleras adyacentes). Finalmente, *P. d. saxicola* está restringida a Querétaro y al norte de Hidalgo (Ceballos, 2014; Goodwin, 1954; Hall, 1981; Hoffmeister y De la Torre, 1961; Villa-Ramírez, 1953).

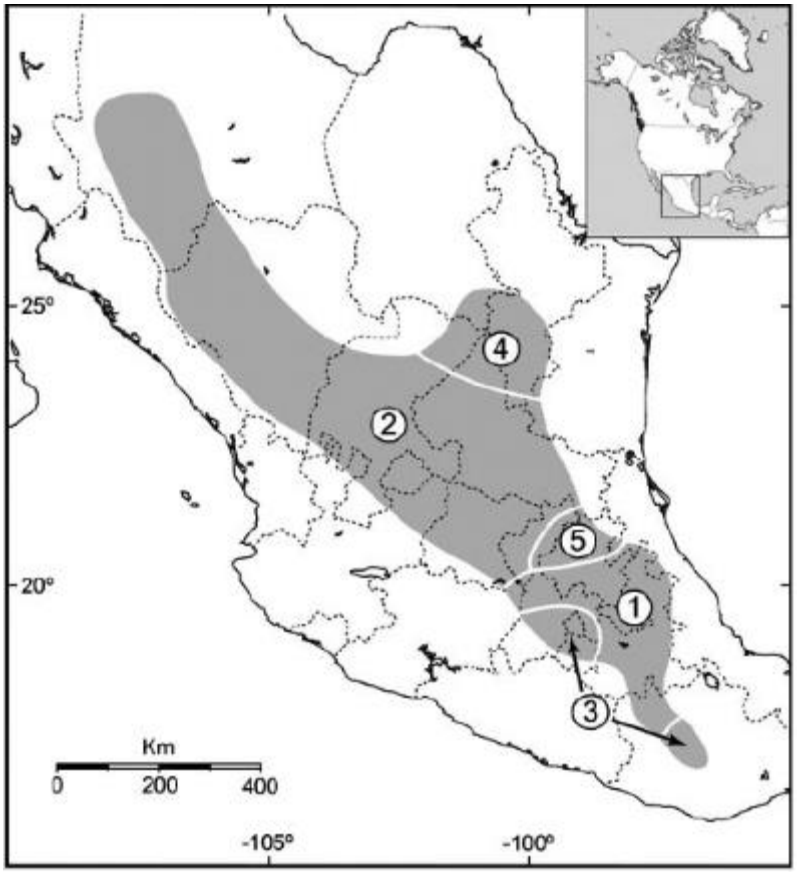

Figura 2. Distribución de las subespecies de *Peromyscus difficilis* en México, 1. *Peromyscus difficilis amplus,* 2. *P. difficilis difficilis,* 3. *P. difficilis felipensis,* 4. *P. difficilis petricola* y 5. *P. difficilis saxicola* (Hall, 1981).

2. ANTECEDENTES

El género *Peromyscus* constituye el grupo más diverso y con la distribución más amplia entre los mamíferos pequeños de Norteamérica (Chirhart *et al*., 2005) y Centroamérica (Reid, 1997). *Peromyscus difficilis* se extiende desde el norte de Colorado hacia el sur en Oaxaca, y comprende ocho subespecies, pero solo seis se distribuyen en México: *P. penicillatus*, *petricola, difficilis, amplus, felipensis* y *saxicola* (Carleton, 1989; Hall, 1981 Hoffmeister y De la Torre, 1961).

Dentro del grupo de roedores del género *Peromyscus* se han realizado trabajos sobre análisis citogenéticos. Todas las poblaciones de *Peromyscus difficilis* examinados presentan un número diploide (2n=48), como lo presentan todas las otras especies del género *Peromyscus* (Comité de estandarización de cromosomas 1977; Greenbaum *et al*., 1978). Sin embargo, el número fundamental (NF) varía dentro de *P. difficilis* usando la morfología cromosómica como referencia.

Alonso (2009) realizó la descripción del cariotipo de *Peromyscus difficilis* del municipio de Ixtacamaxtitlán, Puebla. Presenta un 2n=48 y NF=50, la morfología cromosómica corresponde a un par submetacéntrico, un par subtelocéntrico y 21 telocéntricos, el cromosoma sexual X fue submetacéntrico y el Y fuetelocéntrico.

Rodríguez (2005) examino el cariotipo de *Peromyscus difficilis amplus* de la localidad de Camotepec, en el municipio de Zacatlán, Puebla presenta un 2n=48 y NF=66 para ambos sexos, la morfología cromosómica corresponde a dos pares metacéntricos, ocho submetacéntricos y 13 telocéntricos, el cromosoma sexual X fue subtelocéntrico grande y el cromosoma Y fue telocéntrico pequeño. El bandeo cromosómico C demostró que la heterocromatina constitutiva se ubica en la región del centrómero.

Quiros (2003) reporta que *Peromyscus difficilis felipensis* cuenta con 2n=48 y un NF=76, presentando dos metacéntricos, 13 subtelocéntricos y ocho telocéntricos. El cromosoma sexual X fue subtelocéntrico y el Y fue metacéntrico. *Peromyscus difficilis amplus* de Totalco, Veracruz, presenta 2n=48 y NF=66, incluidos dos pares de autosomas metacéntricos, ocho pares subtelocéntricos y 13 pares telocéntricos El

cromosoma sexual X en *Peromyscus difficilis amplus* fue subtelocéntrico y el cromosoma sexual Y fue telocéntrico (Arellano-Meneses *et al*., 2000).

Peromyscus difficilis difficilis de El Salto, Durango, presenta 2n=48 y NF=58, con 17 acrocéntricos y seis pares birrámeos y la heterocromatina se localiza en regiones centroméricas (Robbins y Baker, 1981). *Peromyscus difficilis petricola* en Zacatecas, presenta 2n=48 y NF=56 (Zimmerman *et al*., 1975).

Finalmente, *Peromyscus difficilis felipensis* de los estados de México y Morelos tienen 2n=48 y NF=76 con un metacéntrico, un submetacéntrico, 13 autosomas subtelocéntricos y ocho telocéntricos, y otra población de la misma subespecie del sureste de Oaxaca presenta 2n=48 y NF=76 que corresponde a dos metacéntricos, 13 subtelocéntricos y ocho autosomas telocéntricos; el cromosoma sexual X fue subtelocéntrico y el cromosoma sexual Y fue metacéntrico (Müdespacher-Ziehl *et al*., 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio realizó el análisis cromosómico del cariotipo de *Peromyscus difficilis amplus* ya que corresponde a un género politípico en especies, es un organismo utilizado para la investigación debido a que puede mantenerse bajo condiciones de laboratorio, además de que los estudios citogenéticos de este grupo de roedores permite conocer las relaciones filogenéticas y evolutivas de los mismos, en las diferentes áreas geográficas de México, y en lo particular para esta especie que se distribuye a lo largo del país y es endémica de nuestro país, 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 re arreglos tal como inversiones, fisiones o fusiones y adiciones de heterocromatina. Aunque sean de la misma especie pero de distinta población además de que ayudará a conocer sus semejanzas y diferencias entre sí.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Describir el cariotipo de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.

4.2 PARTICULARES

- Obtener el número diploide, el número fundamental y la morfología del par sexual de los cromosomas de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.
- Obtener el patrón de bandas cromosómicas G y C de *Peromyscus difficilis amplus.*

5. ÁREA DE ESTUDIO

El municipio de Tianguismanalco se localiza en la parte centro oeste del estado de Puebla. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18º 57' 18'' y 19 º 03' 12'' de latitud norte y los meridianos 98º 24' 42'' y 98º 34' 00'' de longitud occidental. El municipio colinda al Norte con el municipio de San Nicolás de Los Ranchos, al Noreste con el municipio de Nealtican, al Sur con el municipio de Atlixco, al Sureste con el municipio de Santa Isabel Cholula y al Oeste con el municipio de Tochimilco (INAFED, 2010).

Tiene una superficie de 133.22 kilómetros cuadrados que lo ubica en el lugar 111º con respecto a los demás municipios del estado. En el municipio se presenta la transición de los climas templados del valle de Puebla, a los templados de la Sierra Nevada. Se identifican dos climas: Clima templado subhúmedo con lluvias en verano. Es el clima predominante, se presenta en la zona correspondiente al valle de Puebla. Clima semifrío subhúmedo con lluvias en verano. Se identifica en las faldas inferiores de la Sierra Nevada (INAFED, 2010).

La mayor parte del municipio presenta zonas dedicadas a la agricultura de temporal, zonas que han crecido a costa de la vegetación original. El malpaís de Nealtican y la ribera del arroyo la Leona están cubiertos por bosques de encinos, asociados a vegetación secundaria arbustiva. Las estribaciones de la Sierra Nevada, conservan bosques de encino y pino principalmente, del tipo hartwegii. Con respecto a la fauna, el municipio cuenta con las siguientes especies silvestres: culebras, coyotes, ardillas, mapaches, cacomixtles, y conejos de campo. En su territorio se identifican tres grupos de suelos: Suelo dominante Arenosol (72%), Regosol (14%), Phaeozem (8%), Andosol (5%) y Fluvisol (1%; INEGI, 2009).

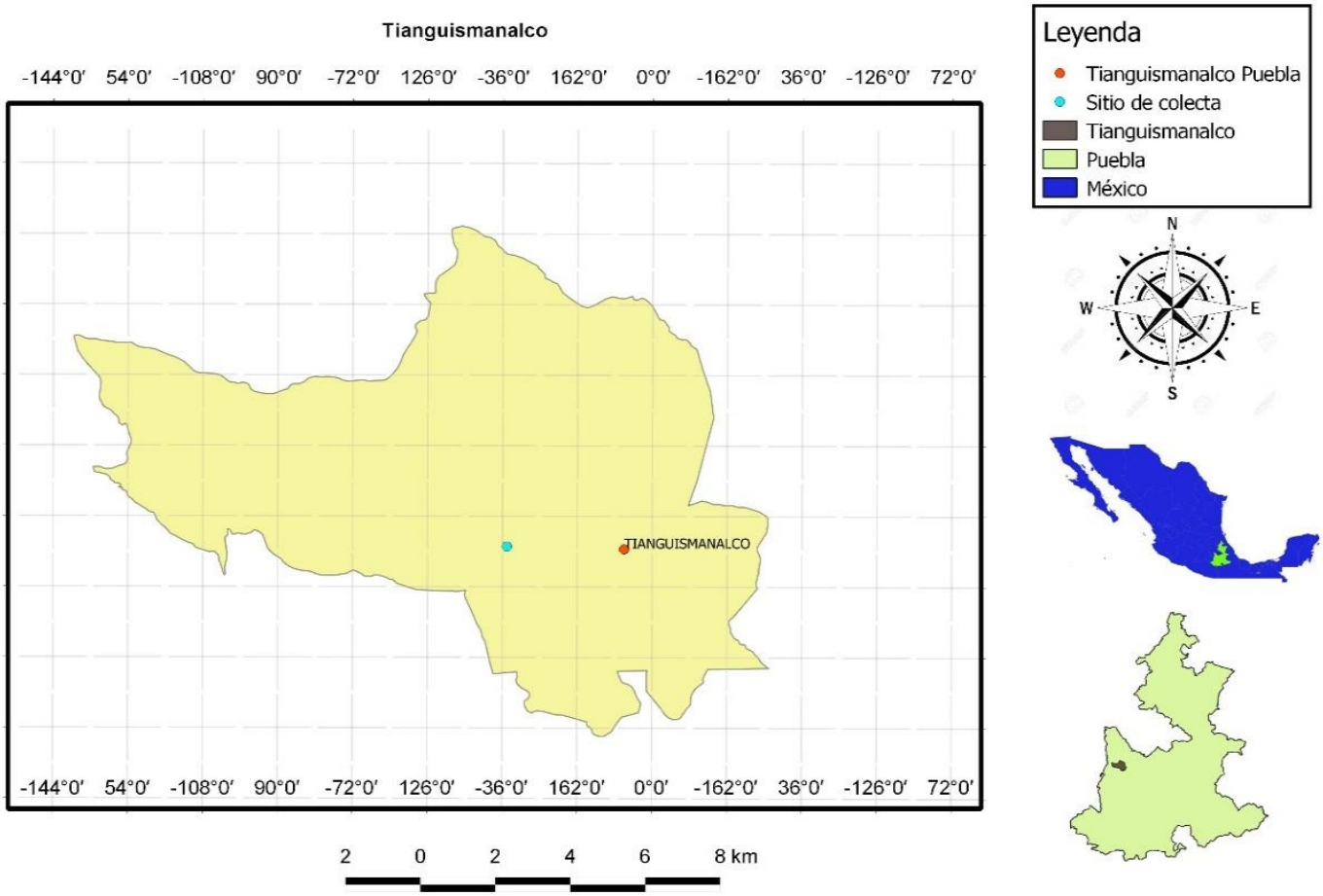

Figura 3. Sitio de colecta de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco del Estado de Puebla.

Figura 4. Sitio de colecta San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco del Estado de Puebla (Azucena Millán).

6. METODOLOGÍA

6.1. TRABAJO DE CAMPO

En San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco del Estado de Puebla. Se realizó la captura de dos organismos colocando trampas tipo Sherman, y fueron trasladados a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

6.2. TRABAJO DE LABORATORIO

Se capturaron dos organismos machos y se les realizó, la técnica de extracción de médula ósea para obtener el cariotipo y bandas cromosómicas C de acuerdo a Baker *et al*. (1982); Baker y Qumsiyeh (1998).

El procedimiento se realizó de la siguiente manera: a los ejemplares capturados fueron pesados y caracterizados sexualmente, posteriormente se le inyectó colchicina 40 minutos antes de ser sacrificados (Microlob) al 0.004 % en una proporción de 0.1 ml por cada 10 gramos de peso (Baker *et al*., 1982; Baker y Qumsiyeh, 1998).

Con la finalidad de inhibir el uso acromático y detener la mitosis en metafase. Una vez transcurrido el tiempo, los organismos fueron sacrificados por dislocación cervical posteriormente se llevó a cabo la toma de medidas de cada ratón, tales como: longitud total, longitud de la cola, de la pata y oreja; luego se realizó la técnica de extracción de médula ósea a cada organismo consiste 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 introdujo en tubos cónicos de 15 ml, que contenían 7 ml de solución hipotónica a 37°C, se agitaron y mezclaron con ayuda de una jeringa de 1 ml, se dejó incubar durante 40 minutos, procurando agitar suavemente cada 10 minutos (Baker *et al*., 1982: Baker y Qumsiyeh, 1998).

Enseguida el material celular se centrifugó a 800 rpm durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y nuevamente se suspendió con la misma cantidad que en el paquete celular del líquido fijador de Carnoy (Metanol y ácido acético en proporción 3:1 respectivamente) este fue aplicado suavemente por las paredes del tubo procurando

que no cayera directamente sobre las células, cabe mencionar que el fijador Carnoy se preparó 30 minutos antes de ser utilizado para evitar su hidratación

Fue indispensable realizar una taxidermia científica a los organismos con base en el método descrito por Martínez-Vázquez *et al*. (2006) para su identificación, e incorporación a la colección de mamíferos de la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP.

Para la elaboración de las laminillas (Baker y Qumsiyeh, 1988), primero se lavaron los portaobjetos hasta eliminar cualquier tipo de suciedad y grasa (con jabón y agua) y se colocaron en un frasco con alcohol al 96% previamente refrigerado. Posteriormente, se utilizaron pipetas Pasteur una por cada organismo con la cual se dejaron caer tres gotas aproximadamente sobre un portaobjetos con una inclinación de 35 grados a una distancia de dos metros y medio con el propósito de lograr el rompimiento de la membrana celular y la separación de los cromosomas, en los campos mitóticos.

Inmediatamente se realizó un extendido del material con aire comprimido y se dejó secar a temperatura ambiente durante varios minutos, una vez secos se etiquetaron con la fecha de elaboración, nombre de la especie, número del ejemplar y número consecutivo de cada laminilla.

Una vez secas las laminillas fueron teñidas con una solución de Giemsa al 4% (47 ml de agua, 2 ml de buffer de Fosfatos y 1 ml de Giemsa) durante 6 a 8 minutos. Posteriormente, se enjuagaron las laminillas con agua destilada con el fin de quitar el exceso de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente, más tarde se observaron en un microscopio óptico Marca Leica con los objetivos de 10X 40X y 100X, para buscar y ubicar los mejores campos mitóticos en metafase los cuales tuvieran un amplio esparcimiento de los cromosomas, se fotografiaron utilizando una cámara digital adaptada al microscopio óptico.

6.2. 1. BANDEO CROMOSÓMICO G

Para la elaboración de bandeo cromosómico G se utilizó la técnica de Grouchy y Turleau (1977); Paton y Baker (1978). Las preparaciones se dejaron envejecer de 5 a 7 días para después colocarlas en la estufa a una temperatura de 65°C durante 16 horas aproximadamente. Con el fin de endurecer los cromosomas y producir buenos patrones de bandas. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, luego se colocaron en Tripsina al 0.025% durante 80 segundos. Pasando este tiempo enseguida las laminillas se metieron en el amortiguador de Fosfato Salino (PBS) en dos vasos coplín y se realizó un enjuague metiendo y sacando la laminilla 5 veces en cada uno de los vasos Coplín, luego se sumergió la laminilla en un buffer para realizar la tinción con el colorante Giemsa al 2% previamente agitado en un vaso Coplín durante 10 minutos. Finalmente, se sacó la laminilla y con agua destilada se quitó el exceso de tinción, se dejó secar a temperatura ambiente para que se pueda observar al microscopio óptico marca Leica utilizando los objetivos 10X 40X y 100X.

6.2.2. BANDEO CROMOSÓMICO C

Para realizar el bandeo cromosómico C se utilizó el método descrito por Summer *et al*., (1971) y Arright y Hsu (1971). Se utilizaron las mismas laminillas con los campos mitóticos se dejaron envejecer durante 7 días, pasado ese lapso se colocaron las laminillas en un vaso de precipitado que contenía HCl al 2% durante 15 minutos, se lavaron con agua destilada tres veces y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las laminillas se colocaron en un vaso Coplin conteniendo solución saturada de Hidróxido de Bario ($Ba\ (HO)^2$) a 45^0C por un lapso de dos minutos, posteriormente se volvieron a meter y sacar de manera simultánea en HCl tres veces, enseguida se enjuagaron 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 una solución salina 2XSSC, pH 7.0). Se colocaron a lo largo de la preparación 6 gotas de 2XSSC con una pipeta Pasteur y se les colocó un cubreobjetos en la parte donde se encontraran los campos cromosómicos, enseguida

se metieron a incubar a 65°C durante 16 horas y al término de este lapso se retiró el cubreobjetos y las laminillas se enjuagaron 3 veces con agua destilada, una vez secas se mantuvieron en alcohol al 70% durante 5 minutos y al 95% también durante 5 minutos para ayudar a la deshidratación y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente, las laminillas se tiñeron con Giemsa al 4%, la tinción estaba preparada con un amortiguador salino Fosfato de Sodio con un pH 7.0 durante 20 minutos y se enjuagaron nuevamente con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

7. RESULTADOS

Para la obtención del cariotipo convencional de la especie de *Peromyscus difficilis amplus* se capturaron dos ejemplares de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla. Los cuales fueron machos de estos se elaboraron 42 laminillas analizando un total de 350 campos mitóticos en metafase y se tomaron fotografía de los mejores campos.

Peromyscus difficilis amplus presento un cariotipo con 2n=48 y NF=52 el cual está conformado por un par metacéntrico, dos pares subtelocéntricos y 21 pares telocéntricos y el par sexual cromosoma X con una morfología submetacéntrico grande y el cromosoma Y como telocéntrico pequeño (Figura 5).

Figura 5. Campo mitótico de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis amplus*.

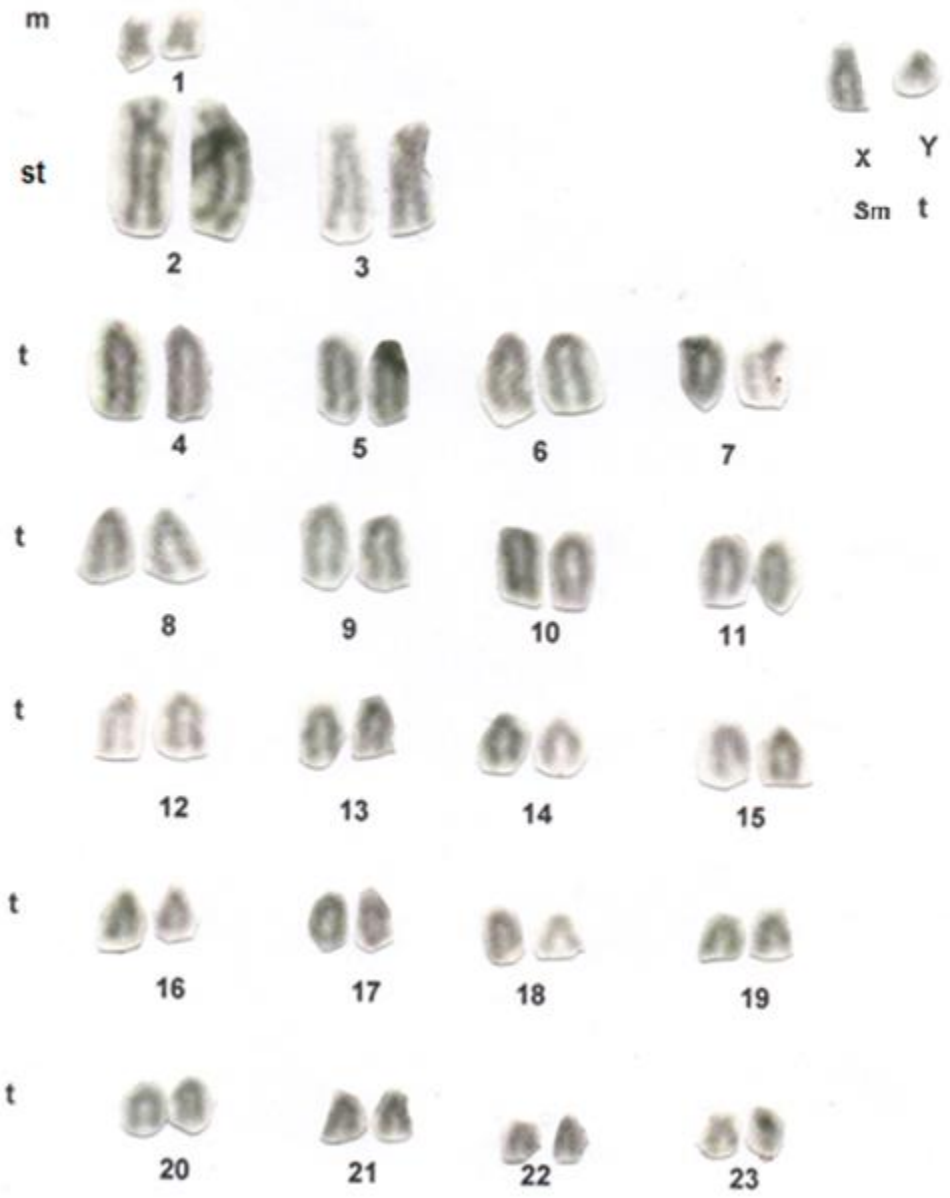

Figura 6. Cariotipo convencional de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco del Estado de Puebla.

Los datos promedio de las longitudes relativas de los pares cromosómicos del cariotipo convencional de *Peromyscus difficilis amplus* en orden descendente 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 *Peromyscus difficilis amplus*. p=Promedio del brazo corto, q=promedio del brazo largo. Dsp=Desviación estándar del brazo corto. Dsq=Desviación estándar del brazo largo. Ds p+q= Desviación estándar de la longitud total del cromosoma. IC= Índice centromérico. m=Metacéntrico (Centrómero en región media). sm=submetacéntrico (Centrómero en región submedia). st=subtelocéntrico (Centrómero en posición subterminal). t=Telocéntrico (Centrómero en posición terminal).

Par	**p**	**Ds p**	**q**	**Ds q**	**p+q**	**Ds p +q**	**IC**	**Clasificación de acuerdo a Levan *et al*. (1964)**
1	1.91	2.28	2.79	0.93	4.70	1.36	40.61	m
2	2.89	0.80	11.99	2.28	14.88	2.61	19.44	st
3	3.40	1.26	11.39	1.67	14.78	1.70	22.98	st
4			13.29	1.16	13.29	1.16		t
5			11.81	1.50	11.81	1.50		t
6			10.86	1.29	10.86	1.29		t
7			10.01	1.57	10.01	1.57		t
8			9.96	1.65	9.96	1.65		t
9			9.21	2.76	9.21	2.76		t
10			8.80	1.73	8.80	1.73		t
11			7.98	1.25	7.98	1.25		t
12			7.61	0.78	7.61	0.78		t
13			7.49	1.15	7.49	1.15		t
14			7.25	1.13	7.25	1.13		t
15			6.41	3.02	6.41	3.02		t
16			6.16	1.39	6.16	1.39		t
17			5.90	0.69	5.90	0.69		t
18			5.84	1.39	5.84	1.39		t
19			5.67	1.32	5.67	1.32		t
20			4.80	0.91	4.80	0.91		t
21			4.88	1.07	4.88	1.07		t
22			4.34	1.12	4.34	1.12		t
23			4.03	0.68	4.03	0.68		t
x	4.28	1.86	11.62	2.84	15.90	2.84	26.93	sm
y			3.84	0.76	3.84	0.76		t

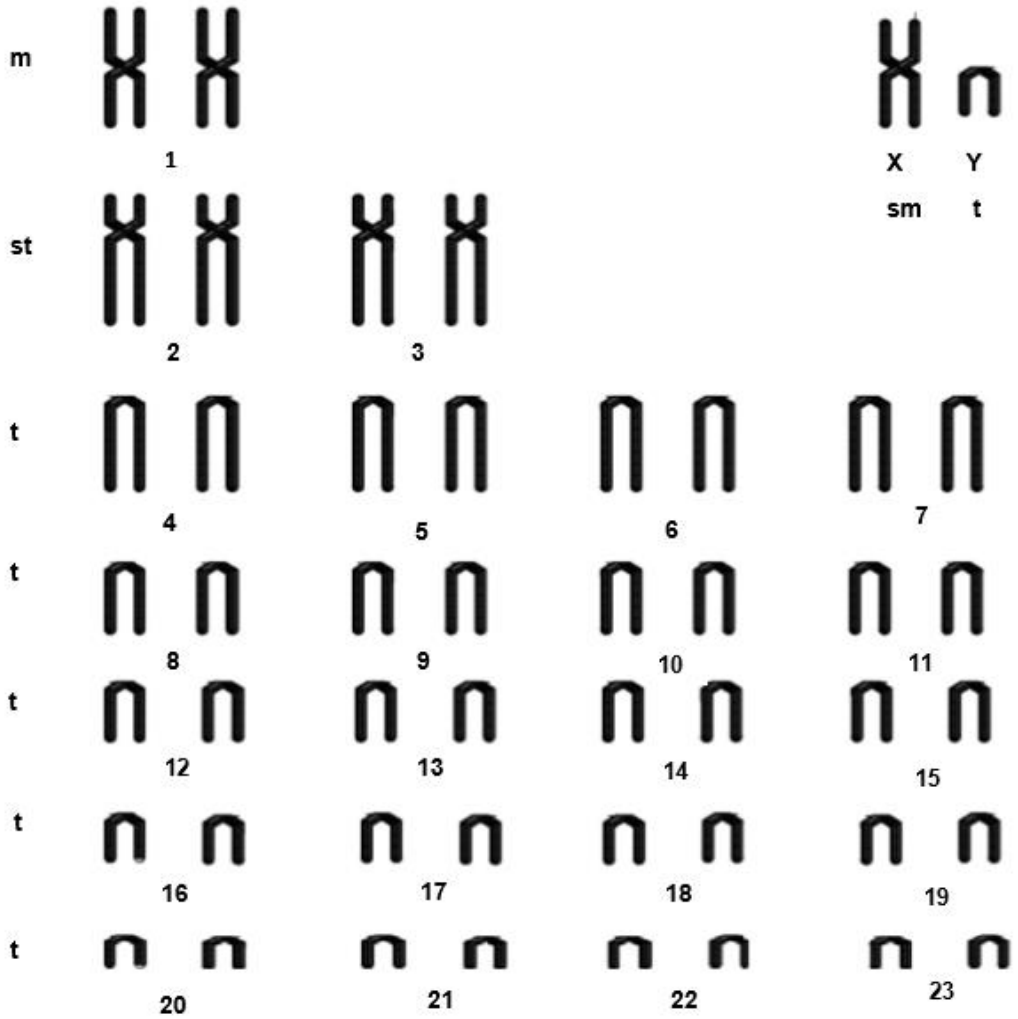

Figura 7. Ideograma del cariotipo convencional de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis amplus*.

7.1. BANDEO CROMOSÓMICO G

Se observó en el patrón de bandas cromosómicas G de *Peromyscus difficilis amplus* que la Eucromatina está presente formando cinco bandas en los pares birrámeos, y los telocéntricos que sólo presentan de dos a tres bandas (Figuras 8 y 9).

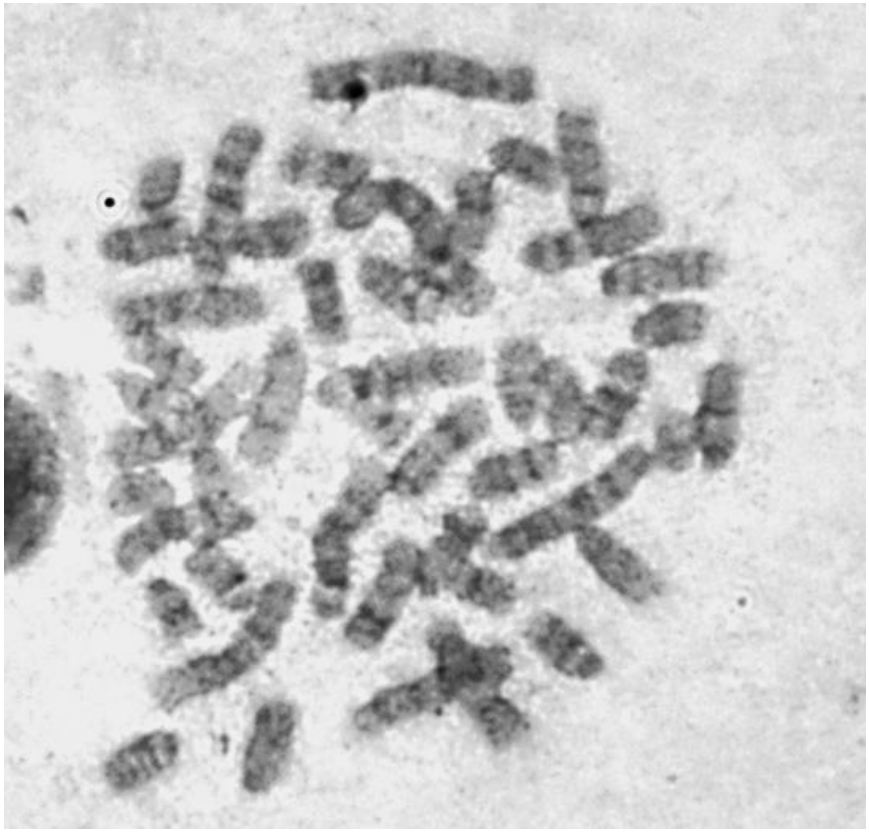

Figura 8. Campo mitótico de bandas G de *Peromyscus difficilis amplus.*

Figura 9. Cariotipo de bandas cromosómicas G de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.

7.2. BANDEO CROMOSÓMICO C

Al realizar el bandeo cromosómico C se observó que la presencia de la heterocromatina constitutiva se encuentra en la región del centrómero en los autosomas (Figuras 10, 11 y 12).

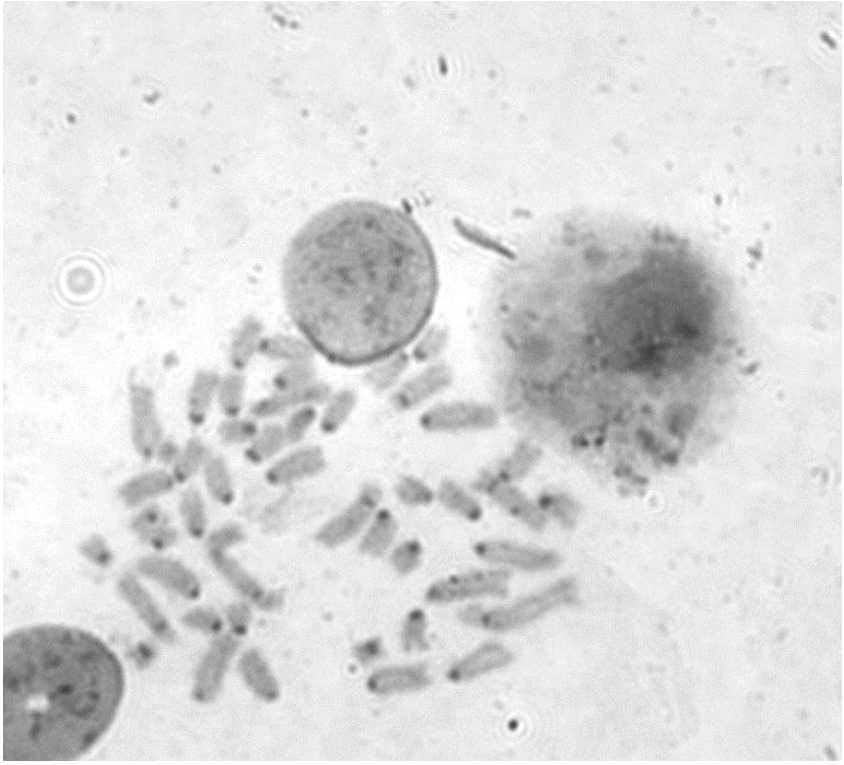

Figura 10. Cariotipo de bandas cromosómicas G de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.

Figura 11. Cariotipo de bandas cromosómicas C de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.

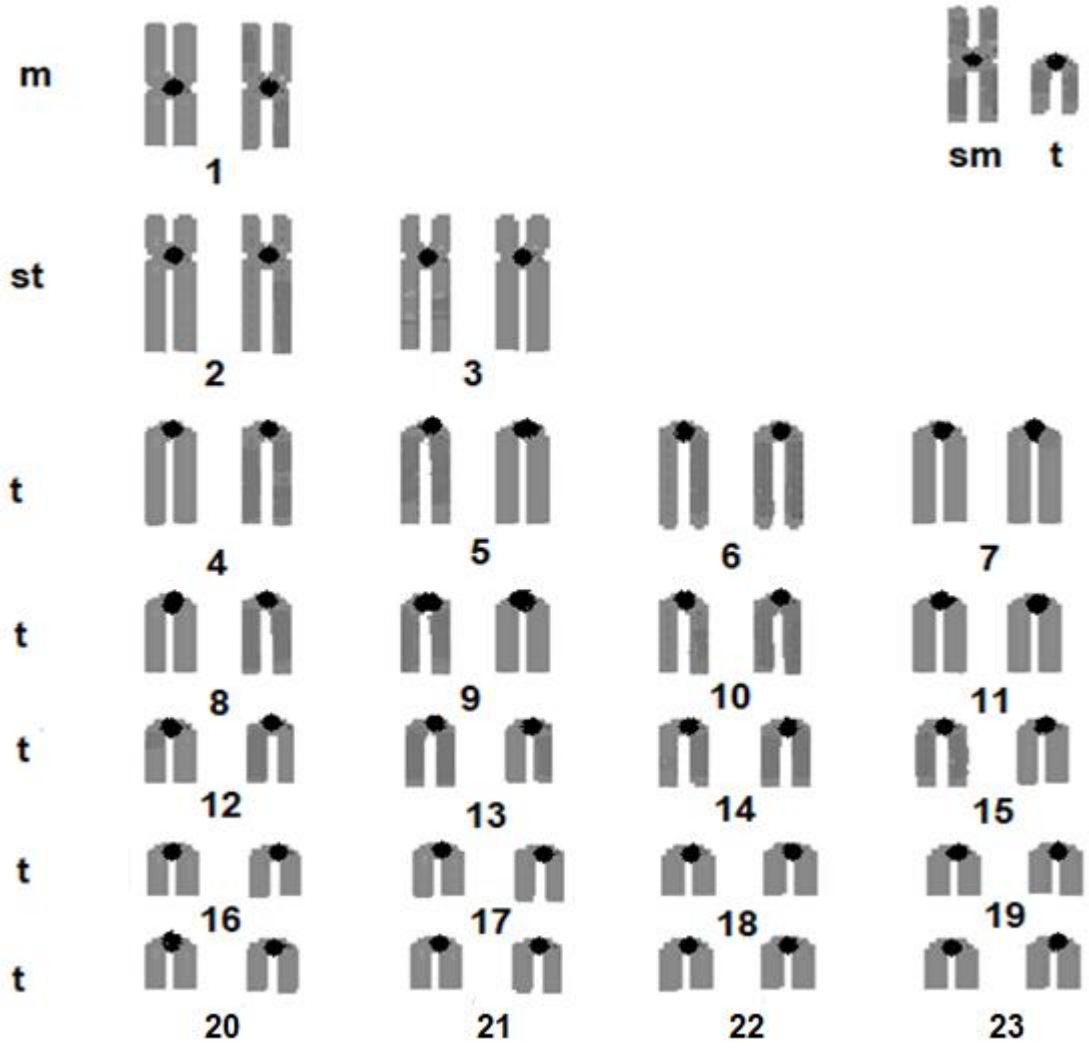

Figura 12. Ideograma del cariotipo de bandas cromosómicas C del ejemplar macho de *Peromyscus difficilis amplus* de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla.

8. DISCUSIÓN

El cariotipo del ratón *Peromyscus difficilis amplus* de la localidad de San Pedro Atlixco del municipio de Tianguismanalco, Puebla, presenta un 2n=48 al igual que las especies que conforman al género *Peromyscus* de tal manera que no se encontró diferencia en el número diploide, coincidiendo en el número diploide con estudios realizados para este género; sin embargo, se encontró variación en el número fundamental.

El presente estudio dio como resultado un NF=52 y al compararlo con estudios realizados en el estado de Puebla, en donde Rodríguez (2005) reporta para *Peromyscus difficilis amplus* del municipio de Zacatlán un NF=66, que corresponde a 10 pares birrámeos y 13 monorrámeos, la morfología del cromosoma sexual X fue subtelocéntrico y el cromosoma Y fue telocéntrico, otro estudio realizado por Alonso (2009) informó sobre la misma subespecie en el municipio de Ixtacamaxtitlán, Puebla, un NF=50, dos pares birrámeos y 21 pares telocéntricos, la morfología del cromosoma sexual X fue submetacéntrico y en cromosoma Y fue telocéntrico, esta variación que presenta dicha subespecie puede ser por los reordenamientos cromosómicos tales como inversiones pericéntricas o translocaciones lo que les permite tener una tendencia evolutiva, reflejándose en el número fundamental dado que el género *Peromyscus* al cual pertenece la subespecie *P. d. amplus* tiene la facilidad de adaptarse a distintos ecosistemas.

Por otro lado, en la zona centro del país Müdespacher-Ziehl *et al*. (2005) reportó para los estados de México y Morelos la subespecie *P.d. felipensis* la cual presentó para ambos estados un NF=76, que corresponden a 15 pares birrámeos, ocho pares monorrámeos y la morfología en el par sexual X fue subtelocéntrico y el Y fue telocéntrico. Al contrario de lo que reportó en el estado de Oaxaca para la subespecie de *P.d. felipensis* con un NF=76, 15 pares birrámeos ocho pares monorrámeos y la morfología del par sexual X fue subtelocéntrico y en el cromosoma Y fue telocéntrico, Sin embargo, al contrastar el presente estudio con otros que se han realizados en la parte sureste del país por ejemplo en el estado de Veracruz Arellano-Meneses *et al.* (2000) reportó para la subespecie *Peromyscus difficilis amplus* un NF=66, 10 pares

birrámeos y 13 pares monorrámeos, la morfología del cromosoma X fue subtelocéntrico y el Y fue telocéntrico (Cuadro 2 y 3).

Comparando la zona centro del país con la zona sur, se puede observar un incremento en el número fundamental esto es porque son dos subespecies distintas, con poblaciones alopátricas, es decir, son poblaciones semi-aisladas con un alto potencial de endogamia permitiendo los reordenamientos cromosómicos los cuales juegan un papel importante en el aislamiento reproductivo, otro posible factor por el cual se ve un aumento en el número fundamental es porque existe la posibilidad de que la población *P.d. felipensis* del estado de Oaxaca pertenezca a otra población u ancestro diferente, pero que responde de manera similar a las condiciones ambientales como lo hace la población del estado de Puebla *P. d. amplus (* Hoffmeister y De la Torre 1961).

Por otra parte, en el norte del país Robbins y Baker (1975) realizaron en el estado de Zacatecas un estudio cromosómico sobre la subespecie *P.d. difficilis* de la cual se reportó un NF=58, correspondientes a seis pares birrámeos y 17 pares monorrámeos. El número fundamental obtenido por Robbins y Baker (1975) fue mayor al que se obtuvo en este presente estudio, esto puede ser debido a que fueron subespecies distintas y la distribución de *P.d. diffcilis* es discontinua debido a la barrera geográfica por las altiplanicies en las que habita; además del aislamiento asociado a los cambios climáticos ocasionados por la glaciación del pleistoceno lo cual tuvo como consecuencia mayor restricción de flujo génico entre las poblaciones (Baker, 1968).

La variación del NF en las subespecies de *Peromyscus difficilis* puede ser por el papel que desempeñan las barreras geográficas ya que algunas subespecies no muestran una distribución continúa lo cual marca los límites de cada una de ellas (Hoffmeister y De la Torre, 1961).

Es por ello que la especie *Peromyscus difficilis* es considerada polimórfica de acuerdo a los cariotipos que se han analizado de sus subespecies, es importante mencionar que hasta el momento para *Peromyscus difficilis* no existe un cariotipo estándar (Hsu y Arrighi, 1968). Por otro lado, si se compara el cariotipo del presente estudio, con el cariotipo primitivo de *Peromyscus* el cual está conformado en su mayoría por la presencia de cromosomas telocéntricos demuestra que han tenido inversiones independientes, fusiones o translocaciones y gran variación en la presencia

de heterocromatina en los brazos cortos (Baker *et al*., 1979; Greenbaum y Baker, 1978; Robbins y Baker, 1981; Yates *et al*., 1979). También en algunos estudios se ha observado que algunos cromosomas homólogos muestran una diferencia en tamaño y forma, con pocas variaciones genéticas mostrando así diferencias cariotípicas y la distribución geográfica de los diversos grupos de *Peromyscus difficilis* que apuntan al comienzo de un conjunto de genes cambiantes.

Cuadro 2**.** Comparación de las constantes cromosómicas de *Peromyscus difficilis amplus* y *P. d*. *felipensis*.

TAXA	2n	NF	m	sm	st	t	X	Y	AUTOR
Peromyscus difficilis amplus	48	66	2		8	13	st	t	Arellano-Meneses *et al*. (2000).
Peromyscus difficilis amplus	48	66	2	8		13	st	t	Rodríguez (2005).
Peromyscus difficilis felipensis	48	76	2		13	8	st	m	Quiros (2003).
Peromyscus difficilis felipensis	48	76	1	1	13	8	st	m	Müdespacher-Ziehl *et al*. (2005).
	48	76	2		13	8	st	m	
Peromyscus difficilis	48	50		1	1	21	sm	t	Alonso (2009).
Peromyscus difficilis amplus	48	52	1		2	20	sm	t	Presente estudio.

Cuadro 3**.** Comparación de la variación de pares de autosomas birrámeos y monorrámeos de *Peromyscus difficilis*.

TAXA	2n	NF	AUTOSOMAS		PAR SEXUAL		ESTADO	AUTOR
			BIRRÁMEOS	MONORRÁMEOS	X	Y		
Peromyscus difficilis amplus	48	66	10	13	st	t	Veracruz	Arellano-Meneses *et al.* (2000).
Peromyscus difficilis amplus	48	66	10	13	st	t	Puebla	Rodríguez (2005).
Peromyscus difficilis felipensis	48	76	15	8	st	m	Oaxaca	Müdespacher-Ziehl *et al.* (2005).
		76	15	8	st	m	México /Morelos	
Peromyscus difficilis felipensis	48	76	15	8	st	m		Quiros (2003).
Peromyscus difficilis petricola	48	56					Zacatecas	Zimmerman *et al.* (1975).
Peromyscus difficilis difficilis	48	58	6	17			Durango	Robbins y Baker (1975).
Peromyscus difficilis	48	50	2	21	sm	t	Puebla	Alonso (2009).
Peromyscus difficilis amplus	48	52	3	20	sm	t	Puebla	Presente estudio.

9. CONCLUSIÓN

El cariotipo de *Peromyscus difficilis amplus* fue 2n=48 y NF=52.

Conformado por un par metacéntrico, dos pares subtelocéntricos y 20 pares de autosomas telocéntricos.

En caso particular para *Peromyscus difficilis amplus* tiene más cromosomas telocéntricos debido a los reordenamientos cromosómicos, tales como inversiones pericéntricas y translocaciones cromosómicas.

El cromosoma sexual X fue submetacéntrico y el cromosoma Y fue telocéntrico.

En el bandeo cromosómico G se observó que la eucromatina de los cromosomas están presentes de tres a cinco bandas claras y oscuras, los telocéntricos sólo presentan de dos a tres bandas.

Para el bandeo cromosómico C se observó que la presencia de la heterocromatina se concentra en la región del centrómero de los autosomas.

En el par sexual, el cromosoma X la heterocromatina se encuentra en el centrómero y el cromosoma Y fue heterocromático.

10. LITERATURA CITADA

Alonso, C. 2009. Descripción cromosómica de *Peromyscus difficilis* de Tlajomulco del municipio de Ixtamacatitlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 30 p.

Arellano-Meneses, A. G., Hernández-Carbajal, L. A., Lira-Galera, I. E., Ruiz-Guzmán, G. y Mudespacher-Ziehl, C. 2000. Karyotypical studies on *Peromyscus difficilis amplus* (Rodentia: Muridae). *Cytologia*, 65(1):25-28.

Arrighi, F.F. y T.C. Hsu. 1971. Localization of heterochromatic in human chromosomes, *Cytogenetics*, 10:81-86.

Baker, R. J., Qumsiyeh, M. B. y Rautenbach, I. L. 1988. Evidence for eight tandem and five centric fusions in the evolution of the karyotype of *Aethomys namaquensis* A. Smith (Rodentia: Muridae). *Genetica*, 76(3):161-169.

Beck, M. L. y M. L. Kennedy. 1977. Chromosome study of *Liomys pictus*. *Journal of the Tennessee academy of science*, 52(3):109-110.

Bush, G. L. 1975. Modes of animal speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 6(1):339-364.

Carleton, M. D. y Musser, G. G. 1989. Systematic studies of oryzomyine rodents (Muridae, Sigmodontinae): a synopsis of *Microryzomys*. *Bulletin of the AMNH*. No. 191.

Castro-Arellano, I. y Vázquez, E. 2016. *Peromyscus difficilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T16658A115135855.

Ceballos, G. y Chávez, C. 1998. Diversidad y estado de conservación de los mamíferos del estado de México. *Revista mexicana de mastozoología*, *3*:113-134.

Ceballos, G. y Galindo, C. 1984. Mamíferos silvestres de la cuenca de México. Editorial. Limusa, México, Distrito federal, México 299 pp.

Ceballos, G. 2014. Mammals of Mexico Johns Hopkins University Press Baltimore and London, 836 pp.

Chirhart, S. E., Honeycutt, R. L. y Greenbaum, I. F. 2005. Microsatellite variation and evolution in the *Peromyscus maniculatus* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(2):408-415.

COMMITEE FOR STANDARIZATION OF CHROMOSOMES *OF PEROMYSCUS*.1977. Standardized karyotype of deer mice, *Peromyscus* (Rodentia). *Cytogenetic Cell Genet.*, 19:38-43.

Cortés, F. 1984. Bandeo cromosómico. Investigación y ciencia, 97:20-29.

De Jong, J.H., Fransz P.F. y Zabel, P. 1999. High resolution fish in plants - techniques and applications. *Trends plant Sci*. 4:258-263.

De Grouchy, J. y Turleau, C. 1977. Clinical atlas of human chromosomes. John Wiley y Sons, New York, U.S.A. 27-271 pp

Drets, M. E. 2002. Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeo cromosómico. Significado y proyección bio-médica. *Revista Médica del Uruguay*, 18(2), 107-121.

Gardner, J. 1990. Principios de genética. Ed. Limusa, wiley. México.649 pp

Greenbaum, I. F., y Baker, R. J. 1978. Determination of the primitive karyotype for *Peromyscus*. *Journal of Mammalogy*, 59(4):820-834.

Greenbaum, I. F., Baker, R. J. y Ramsey, P. R. 1978. Chromosomal evolution and the mode of speciation in three species of *Peromyscus*. *Evolution*, *32*(3), 646-654.

Hall, E. R. 1981. The mammals of North America. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York. 147–156 pp.

Herrera, J. C. 2007. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, 25(1):26-35.

Hoffmeister, D. F. y l. De la Torre. 1961. Geographic variation in the mouse *Peromyscus difficilis*. *Journal of Mammalogy*, 42:1–13.

Hsu, T. C. y Arrighi, F. E. 1968. Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 7(6):417-446.

INEGI 2009. Prontuario de Información Geográfica de los Estados Unidos Mexicanos. Tianguismanalco, Puebla. Clave Geostadística 21175.

Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2):201-220.

Luque, J. y Herráez, A. 2001. Consideración del cromosoma. Pp.132-136. In: texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Ed. Harcourt, Madrid España.

Martínez, V. J., González, M. R. y Dávila, M. J. 2006. Manual de Métodos de recolecta de plantas y animales. Benemérita Autónoma de Puebla. Escuela de Biología. Dirección General de Fomento Editorial. 234 p.

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.

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

Patton, J. L. y Rogers, D. S. 1993. Cytogenetics. Pp. 236–258, In: Genoways, H. H. and Brown, J. H. (eds). Biology of the Heteromyidae, Special Publication. The American Society of Mammalogists, 10: 1–719.

Quiros, V. R. A. 2003 Cariotipo de *Peromyscus difficilis felipensis* (Rodentia: Muridae) de una población del estado de Oaxaca. México. Reporte de Servicio Social, Departamento de Biología, UAM, Unidad Iztapalapa. 44 pp

Qumsiyeh, M., Sanchez-Hernandez, C., Davis, S., Patton, J. y Baker, R. 1988. Chromosomal evolution in *Geomys* as revealed by G- and C-Band analysis. *The Southwestern Naturalist,* 33(1):1-13.

Reid, F. 1997. A field guide to the mammals of Central America and Southeast Mexico. Oxford University Press 202 pp.

Robbins, L. W. y Baker, R. J. 1981. An assessment of the nature of chromosomal rearrangements in 18 species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 31(4):194-202.

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 la localidad de Comatepec en el municipio de Zacatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 27 p.

Searle, J. B. 1984 Three Karyotipic races of the common sherew *Sorex araneus* (Mammalia: Insectivora) and a phylogeny. *Systematic Zoology*, 33:184-194.

Summer, A. T., H.J. Evans y R. Buckland. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology*, 232:31.32.

Villa-Ramírez, B. 1953. Mamíferos silvestres del Valle de México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, México* 23:269-492.

Wilson, D.E. y D.M. Reeder. 2005. Mammals Species of the world: A Taxonomic and Geographic Reference.3rd Ed, Johns Hopkins University Press, Baltimore MD. 198p.

Yates, T. L., Baker, R. J. y Barnett, R. K. 1979. Phylogenetic analysis of karyological variation in three genera of *Peromyscine* rodents. *Systematic Zoology*, 28:40-48.

Zimmerman, E. G., Hart B. J. y Kilpatrick, C. W. 1975. Biochemical genetics of the boylii and truei species groups of the genus *Peromyscus* (Rodentia). *Comparative Biochemistry and Physiology, B. Comparative Biochemistry*, 52:541–545.

Zimmerman, E. G., Kilpatrick, C. W. y Hart, B. J. 1978. The genetics of speciation in the rodent genus *Peromyscus*. *Evolution*, 32(3):565-579.

SITIOS DE INTERNET

www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/index.html. 26/06/2018

011. ANEXO

SOLUCIÓN STOCK TRIPSINA

0.05 gr de Tripsina Difco (1:250)

50 ml de buffer de Fosfato salino (PBS) se pesa 4 gr de NaCl, 0.1 gr de KCl, 0.575 gr de Na_2HPO_4, 0.1 gr de KHPO y se diluyen en 500 ml de agua destilada, una vez preparado el stock debe mantenerse en refrigeración a 4°C.

La tripsina debe permanecer en el congelador y puede ser usada mientras no se observe crecimiento bacteriano u de hongos. Diluir una parte del stock de Tripsina con tres partes de PBS para obtener la concentración final de 0.025% solo debe utilizarse el día que se elaboró.

SOLUCIÓN PBS

2 gr NaCl

0.05 gr KCl

0.2785 gr NaH_2PO_4

0.05 gr KH_2PO_4

250 ml de agua destilada.

BUFFER GIEMSA 2% PARA BANDAS G

Buffer Fosfato de Sodio 3.725 gr

NaH_2PO_4 diluir en 100 ml de agua destilada con pH 9.0.

SOLUCIÓN HIPOTÓNICA

0.075 M KCl

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

Se puede utilizar de dos como máximo sino está contaminada y se guarda en refrigeración.

FIJADOR CARNOY

Proporción 3: Metanol

1: Ácido acético

Debe ser preparado 30 minutos antes de usarse, manteniéndolo en el congelador (-10°C). Usándose dos o tres horas después de preparado.

COLORANTE GIEMSA PARA TINCIÓN CONVENCIONAL

Solución amortiguadora.

10 M NaH_2PO_4

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

Solución A se utilizan 15 ml

10 M NaH_2PO_4

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

Solución B

Se utilizan 10 ml.

Esta solución se puede mantener en refrigeración (4°C) mientras no esté contaminada.

Solución concentrada de Giemsa (Microlab) 1 ml.

Se puede mantener a temperatura ambiente indefinidamente.

Solución amortiguadora (pH 6.5-6.8) 2 ml

Agua destilada 47 ml

Se puede utilizar durante un día conservándola a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN STOCK 10XSSC PARA BANDAS C

NaCl 1.5 M

Se pesan 8.7675 gr.

Citrato de Sodio 0.15 M

Se pesan 4.4117 gr

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

SOLUCIÓN HCl 0.2N

Preparar solución stock de HCl 5 N

Tomar 2 ml de 5 N y 48 ml de agua destilada para obtener 0.2 N la solución stock se mantiene a temperatura ambiente mientras no se contamine y la solución al 0.2 N se puede mantener sólo un día a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN SATURADA DE Ba $(OH)_2$

Pesar 5 gr

Aforar a 50 ml

Se puede mantener a temperatura ambiente durante dos semanas.

BUFFER GIEMSA AL 2% PARA BANDA G

1ml 0.14 M de buffer de Fosfato de Sodio

Se pesan 0.725 gr de NaH_2PO_4 y se diluye en 100ml de agua destilada con un pH 9.0

Se puede conservar a temperatura ambiente mientras no se observe contaminada

1ml de Giemsa (Microlab)

48 ml de agua destilada

Se agita hasta que se observe espuma antes de usarse y puede mantenerse a temperatura ambiente.