



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DESCRIPCIÓN CROMOSÓMICA DE *Peromyscus difficilis*
(Allen, 1891) DE SAN SALVADOR ATOYATEMPAN, PUEBLA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

PRESENTA
BRENDA LIZBETH ESQUIVEL SÁNCHEZ

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



PUEBLA

JULIO, 2022

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------|-----|
| DEDICATORIA..... | i |
| AGRADECIMIENTOS..... | ii |
| RESUMEN..... | iii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Biología de la especie..... | 6 |
| Descripción morfológica..... | 6 |
| Distribución..... | 8 |
| ANTECEDENTES..... | 10 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 12 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 13 |
| Objetivos particulares..... | 13 |
| ÁREA DE ESTUDIO..... | 14 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 17 |
| Trabajo de campo..... | 17 |
| Trabajo de laboratorio..... | 17 |
| Obtención de cromosomas..... | 17 |
| Elaboración de laminillas..... | 18 |
| Construcción de cariotipo..... | 19 |
| RESULTADOS..... | 20 |
| DISCUSIÓN..... | 25 |
| CONCLUSIÓN..... | 28 |
| PROPUESTAS..... | 29 |
| LITERATURA CITADA..... | 30 |
| ANEXO..... | 36 |

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a mi hijo Farid Esquivel por motivarme e impulsarme, por su comprensión y sacrificio que esto conlleva, por ayudarme a construir mis memorias, mis logros y derrotas, basándome siempre en todo el amor que le tengo, esto lo hice por nosotros para poder crecer profesionalmente y para que el día de mañana tengas un buen ejemplo a seguir, teniendo en cuenta que no todas las cosas son fáciles, pero vale la pena demostrar que los límites son puestos por uno mismo gracias por todo tu amor y apoyo te amo hijo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a la M. en C. Rosa María González Monroy por su dedicación, asesoramiento, paciencia, apoyo y amistad brindado durante la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Jesús Martínez Vázquez por su ayuda en el laboratorio, la revisión y amistad.

A la Dra. Adriana Martínez Guevara por la revisión a este manuscrito.

A mi hijo Farid Esquivel por su sonrisa que me motivó cada mañana.

A mi esposo Luis Arenas por su amor, por su tiempo y apoyo incondicional.

A mis padres por su confianza indudable.

A mis compañeros del laboratorio de Mastozoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP por su amistad y apoyo en el trabajo de campo y de laboratorio.

A las autoridades del municipio de San Salvador Atoyatempan por las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A todos los docentes por su tiempo y esfuerzo en mi formación académica y profesional.

En memoria de Guadalupe Martínez Alonso.

GRACIAS

RESUMEN

El cariotipo es el patrón cromosómico de una especie expresado a través de un esquema ordenado de acuerdo con el número, tamaño, forma y morfología de los cromosomas. En el presente estudio se realizó la descripción del cariotipo y el análisis cromosómico de la especie *Peromyscus difficilis* del municipio de San Salvador Atoyatempan, Puebla. Se realizó la técnica de extracción de médula ósea para la obtención de los cromosomas y así describir el cariotipo convencional. Los resultados indicaron que *P. difficilis* presenta un número cromosómico diploide de 48 ($2n=48$) y un número fundamental de 56 ($NF=56$). Se identificaron cinco pares de cromosomas birrámeos que correspondieron a dos metacéntricos pequeños, un submetacéntrico grande y dos subtelocéntricos un par grande y el otro pequeño, 18 pares de cromosomas fueron telocéntricos de tamaño grande a pequeño; mientras que el cromosoma X subtelocéntrico grande y el Y telocéntrico pequeño.

INTRODUCCIÓN

México es un país privilegiado por su biodiversidad, ya que es el cuarto país megadiverso después de Brasil, Colombia e Indonesia. Aunque el territorio nacional es tan sólo el 1.4% de la superficie de la Tierra, alberga entre el 10% y el 12% de todas las especies del planeta (Ramamoorthy *et al.*, 1998). Esta asombrosa biodiversidad en México se debe a su posición biogeográfica pues, en el territorio se traslapan las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical (March y Flamenco, 1996). Otros factores que contribuyen a incrementar la biodiversidad son el intrincado relieve, la variedad climática y su compleja historia geológica (Ramamoorthy *et al.*, 1998; Sarukhán *et al.*, 2009).

En cuanto a la riqueza de especies de mamíferos, esta se encuentra estrechamente ligada con los 17 tipos de vegetación que se distribuyen en los diferentes estados de la república (March y Flamenco, 1996); está representada por 13 órdenes, 46 familias, 202 géneros y 545 especies, de las cuales 169 son endémicas del país (Ceballos, 2014), y el resto una combinación de componentes neárticos y neotropicales (Arita y Ceballos, 1997). El 77% son especies menores a cinco kilogramos y pertenecen, principalmente, a los órdenes Chiroptera, Soricomorpha y Rodentia (Sánchez *et al.*, 2014). Este último está conformado por 29 familias, 468 géneros y 2,052 especies (Ceballos, 2014).

Dentro del orden Rodentia se encuentra el género *Peromyscus*, siendo uno de los géneros de mamíferos más diversos en todo el mundo (Ceballos y Oliva, 2005), y de los mejor representados en el continente Americano, su distribución es muy amplia, pues se extiende desde Canadá hasta Panamá encontrándose en numerosos hábitats que van desde selvas lluviosas y tropicales, hasta entornos más cálidos, debido a sus características tanto internas y externas lo que los ha llevado a ser exitosos en casi todos los ecosistemas (Sánchez *et al.*, 2014). El género *Peromyscus* se caracteriza por ser un grupo altamente heterogéneo y complejo y con gran variación entre y dentro de las especies (Carleton, 1989; Ramírez *et al.*,

2005); con altas tasas evolutivas asociadas a sus breves lapsos de vida, a su especiación y sus múltiples camadas con numerosas crías, este grupo ofrece gran facilidad en su estudio (Ceballos y Arroyo, 2012), por lo cual *Peromyscus* se utiliza con más frecuencia en la investigación citogenética (Santos y Hortelano, 1997; Fig. 1).



Figura 1. Ejemplar de *Peromyscus* (Tomado de Ceballos, 2014).

Con respecto a la citogenética, esta es la disciplina que estudia las estructuras celulares y los eventos citológicos que intervienen en la formación hereditaria (Gardner, 2003). La citogenética trata de entender cómo funciona cada cromosoma; siendo este una estructura compuesta por ADN y proteínas básicas de carácter químico y de bajo peso molecular, como las histonas (Swanson *et al.*, 1968).

Los cromosomas son estructuras delgadas y alargadas constituidas por un brazo corto y otro largo separados por un estrechamiento o constricción primaria, llamada centrómero. El brazo corto se designa como p y el brazo largo como q , y están provistos de diversas estructuras como las cromátidas, el centrómero y telómeros (Silva *et al.*, 2008). El centrómero es el punto donde se une el huso mitótico y es

parte integral del cromosoma (Aiassa *et al.*, 2015). Este es esencial para el movimiento y segregación normales del cromosoma durante la división celular. Los cromosomas metafásicos presentan cuatro formas básicas y se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de los brazos corto y largo, así como por la posición del centrómero (Silva *et al.*, 2008).

De acuerdo con la posición del centrómero y la longitud de los brazos, los cromosomas se clasifican en: metacéntricos tienen los brazos corto y largo de aproximadamente la misma longitud, con el centrómero en el punto medio (Aiassa *et al.*, 2015). Los submetacéntricos tienen los brazos corto y largo de longitudes desiguales, con el centrómero más próximo a uno de los extremos. Los subtelo-céntricos tienen el centrómero muy cerca de un extremo, es decir en posición subtérmino, con un brazo corto muy pequeño y por último los telocéntricos con ausencia de un brazo corto (Levan *et al.*, 1964; Fig. 2).

Con frecuencia los cromosomas tienen constricciones secundarias en los brazos cortos, que conectan trozos muy pequeños del ADN llamados tallos y satélites. Los tallos contienen genes que codifican el ARN ribosómico (Aiassa *et al.*, 2015).

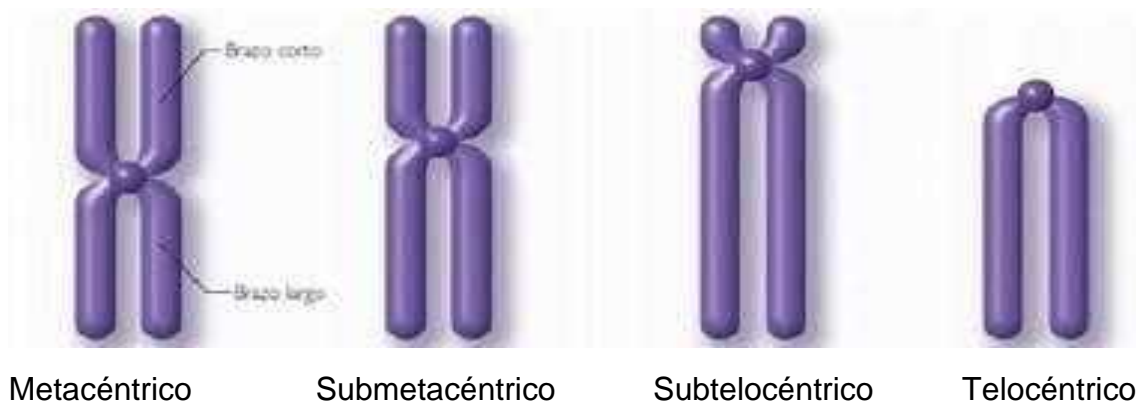


Figura 2. Tipos principales de cromosomas según la posición del centrómero (Tomada de www.morfologia de los cromosomas.com).

Para la realización de un análisis cromosómico es necesario que las células se encuentren en la metafase del ciclo celular (pues en esta se obtienen cromosomas condensados; (Swanson *et al.*, 1968). El ciclo celular es un proceso crítico para la genética porque a través de este las células progenitoras pasan a las células hijas la información genética con todas las características; esta consta de dos fases principales: la primera es la interfase, donde se lleva a cabo el crecimiento celular, ya que la célula duplica todos sus organelos y moléculas; esta a su vez se integra por la fase G1, fase S y fase G2 (Pierce, 2009). La segunda fase es: la fase M, que consta de dos procesos principales: la mitosis (división celular) y la citocinesis que incluye la división del citoplasma (Angulo *et al.*, 2012).

Existen diversas técnicas de bandeo cromosómico que han significado un considerable progreso en la citogenética, ya que al poder obtenerse imágenes reproducibles de la existencia de estructuras cromosómicas transversales (bandas cromosómicas) de diferente tamaño a lo largo de los cromosomas, fue posible disponer de una herramienta de identificación de cada cromosoma, así como los de un importante número de otros organismos tanto animales como vegetales (Drets, 2002). Adicionalmente esta metodología permitió observar cuales son los genes arreglados de modo lineal en estructuras nucleares que resultan de la condensación de la cromatina (Gardner, 2003), además de localizar los puntos de fractura observados en la mayoría de los reordenamientos estructurales y establecer qué cromosomas estaban involucrados en dichas modificaciones cromosómicas (Drets, 2002).

Existen modificaciones estructurales de los cromosomas, entre las alteraciones estructurales encontramos diversas anomalías: translocaciones, inserciones, inversiones, isocromosomas, duplicaciones, deleciones y reordenamientos complejos (Aiassa *et al.*, 2015). Se define como una translocación al intercambio de material genético entre cromosomas no homólogos, que pueden ser recíprocas o Robertsonianas (Gardner, 2003). Se denominan translocaciones recíprocas cuando las roturas suceden entre cromosomas diferentes y se produce un intercambio de

material (Cerezo *et al.*, 2007). Las translocaciones Robertsonianas ocurren entre los cromosomas acrocéntricos en este tipo de translocación, se pierden los brazos cortos de dos cromosomas no homólogos y los brazos largos se unen por el centrómero, formando un cromosoma único, no homólogos que pierden los brazos cortos (son muy cortos y contienen material genético no esencial) y los brazos largos se unen por los centrómeros (Arrighi *et al.*, 1976). La inserción es una anomalía cromosómica en la que el material de un cromosoma se inserta en otro cromosoma no homólogo (Cerezo *et al.*, 2007). La inversión consiste en dos roturas en un cromosoma y se inserta el fragmento perdido en sentido inverso, pueden ser pericéntricas, si incluyen el centrómero, o paracéntricas si no incluyen el centrómero (Drets, 2002; Cerezo *et al.*, 2007). Los isocromosomas resultan de la división de un cromosoma por el eje perpendicular a su eje de división habitual y consiste en que un brazo está duplicado (y forma dos brazos de igual longitud, con los mismos loci en secuencias invertidas) y el otro brazo está eliminado (Gardner, 2003; Cerezo *et al.*, 2007; Pierce, 2009). Las deleciones o duplicaciones consisten en una pérdida (deleción) o ganancia (duplicación) de un segmento cromosómico que genera un desequilibrio cromosómico (Gardner, 2003; Cerezo *et al.*, 2007). Los reordenamientos complejos se producen cuando se implican tres o más cromosomas y son raros en personas con fenotipo normal (Cerezo *et al.*, 2007).

Entre las principales técnicas de bandeo cromosómico se encuentra el bandeo cromosómico G, esta técnica permite teñir específicamente los segmentos heterocromáticos que se caracterizan por ser ricos en pares de bases adenina y timina, estos replican su ADN tardíamente durante el período de síntesis, condensarse tempranamente durante la mitosis y reflejan el patrón cronométrico de los cromosomas meióticos, en esta técnica se utiliza colorante Giemsa al 2% (Drets, 2002). Otra técnica de bandeo cromosómico es el C, el cual consiste en tratar las laminillas con una solución alcalina fuerte (Hidróxido de Bario) después de una breve exposición al ácido clorhídrico y finalmente con una solución salina a 60 °C, tiñendo por último en solución Giemsa (Cortés, 1984).

BIOLOGÍA DE LA ESPECIE

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

En México se reconocen 49 especies del género *Peromyscus*, tres de *Megadontomys*, seis de *Habromys* y una de *Osgoodomys* (Ramírez-Pulido *et al.*, 2001). En el género *Peromyscus* se encuentra el grupo *truei*, en el que se ubica *P. difficilis* (Allen, 1891), especie de abundante y amplia distribución geográfica y, por lo tanto, es una especie bien representada en las colecciones científicas (Hall, 1981). *Peromyscus difficilis* es una especie relativamente pequeña y es también conocido con el nombre común de “ratón de las rocas” (Allen, 1891).

Para poder distinguir a *Peromyscus difficilis* de las demás especies, se consideran las siguientes características; el pelaje típico del adulto varía de ocre a canela rojizo con la parte media dorsal ligeramente más oscura que los lados del cuerpo, con línea lateral ocre intenso definida, orejas pardas, vientre, patas y manos blancas, cola bicolor parda por arriba, blanca debajo. Algunos adultos y jóvenes comparten un pelaje que varía de pardo claro a amarillento con la parte media dorsal más oscura que los lados del cuerpo, corona de la cabeza parda oscura, una línea lateral ocrácea ausente en pocos ejemplares, vientre y miembros de coloración similar a los anteriores (Torres-Millan, 2003). Los jóvenes presentan un pelaje que varía de gris claro a gris plomizo con la parte media dorsal más oscura que los lados del cuerpo, la cola es bicolor dorsalmente varía de gris a pardo, ventralmente blanquecina sin línea lateral, vientre y miembros de coloración similar a los anteriores (Ceballos, 2014; Fig. 3). Las medidas externas para la longitud total (LOTA) son 110- 250 mm, longitud de la cola (LOCO) 75-141 mm; longitud de la pata trasera (LOPA) 19-32 mm, longitud de la oreja (LOOR) 14-29 mm. (TorresMillan, 2003).

Algunas características del cráneo son longitud de los nasales (LONA) 8.9-141 mm, las bulas auditivas globosas de tamaño variable 0.27-3.3 mm, el borde supra orbital es redondeado, los frontales ligeramente cóncavos (Torres-Millan, 2003).



Figura 3. *Peromyscus difficilis* (Tomada por Cruzado-Cortés, 2019).

La clasificación aquí presentada es de acuerdo con Allen (1891).

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Mammalia

Orden: Rodentia,

Familia: Muridae

Género: *Peromyscus*

Especie: *P. difficilis* (Allen,1891).

DISTRIBUCIÓN

El ratón de la roca, *Peromyscus difficilis* cuenta con una distribución en Norteamérica y México (Carleton, 1989; Hall, 1981; Fig. 4).

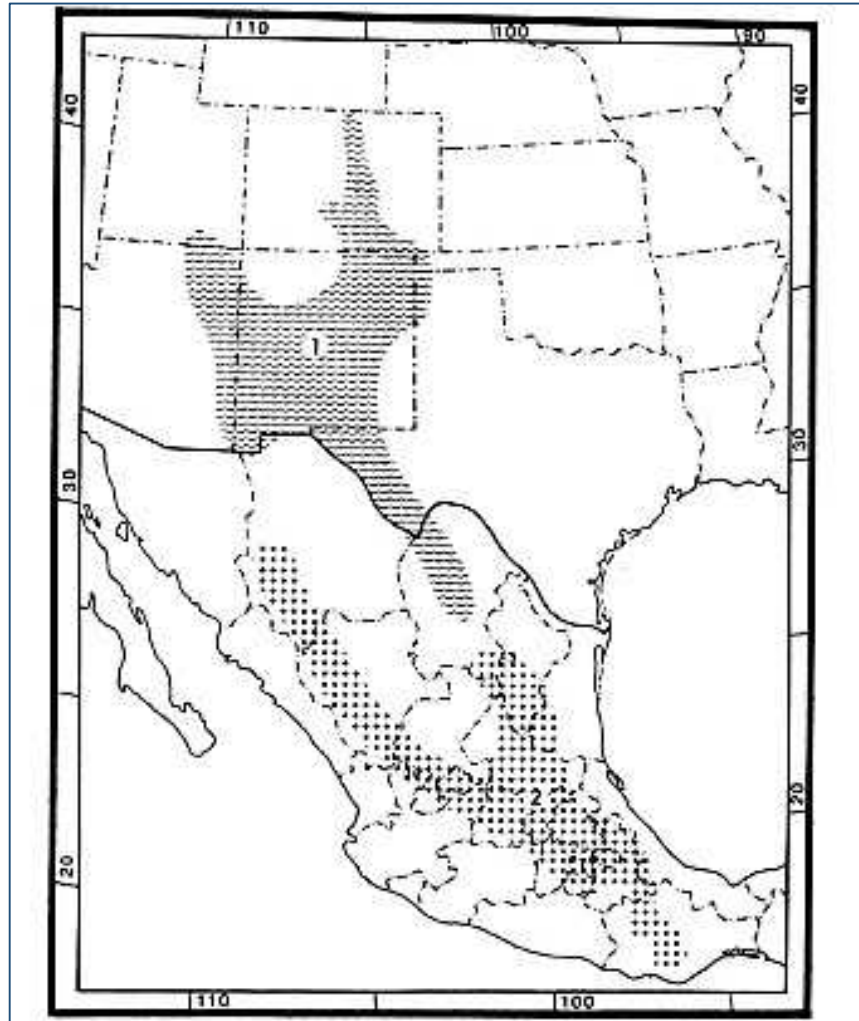


Figura 4. Distribución de *Peromyscus difficilis* (Tomado de Ramírez-Pulido *et al.*, 2001). 1. Distribución de *Peromyscus difficilis* en E.U.A. 2. Distribución de *Peromyscus difficilis* en México.

Esta especie ocupa las zonas áridas de los estados de México, Hidalgo, Distrito Federal, Tlaxcala, Puebla, Veracruz y Oaxaca.

Peromyscus difficilis, es endémico de México, 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). *P. difficilis* 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 (Hall, 1981).

REPRODUCCIÓN

El ratón de la roca se reproduce durante las épocas más húmedas del año, de junio a diciembre. La hembra puede producir hasta tres camadas en una temporada con un promedio de tres crías cada una (Ceballos y Galindo, 1984). Las hembras pueden alcanzar la madurez sexual dentro de los seis meses, por lo que algunas nacidas en la primera parte de la temporada de reproducción pueden producir sus propias crías antes de fin de año (Ceballos y Galindo 1984; Galindo y Krebs, 1997).

DIETA

Son omnívoros, se alimentan de pequeños invertebrados, semillas de pastos y otra vegetación local. Sus principales depredadores incluyen zorrillos, serpientes, búhos y gatos de cola anillada (Ceballos, 2014).

Peromyscus difficilis es una especie que cumple con importantes funciones como fuente de alimento para otras especies, posee un ciclo de vida corto, tamaño de camada grande, amplio potencial reproductivo, contribuye como dispersor de semillas y su amplia distribución geográfica (Ceballos, 2014).

ANTECEDENTES

El género *Peromyscus* se divide en grupos de especies, el grupo *P. truei* está conformado por seis especies: *P. attwateri*, *P. difficilis*, *P. gratus*, *P. nasutus*, *P. pectoralis* y *P. truei* (Durish *et al.*, 2004). El análisis genético ha demostrado que su pariente más cercano es el ratón de la roca del norte *P. nasutus*, que es lo suficientemente similar al ratón ciervo de Zacatecas como para haber sido considerado la misma especie hasta 1978 (Durish *et al.*, 2004).

Análisis de citogenética en el género *Peromyscus* presentan en su mayoría un $2n=48$ (Robbins y Baker, 1981). La variación cromosómica ocurre por eventos no Robertsonianos, que es reflejado en diferente número fundamental que es el número total de brazos autosómicos (Kingler, 1977).

Lee *et al.* (1972) reportaron para *P. gratus* de Coahuila un $2n=48$ y un $NF=54$, con dos pares de autosomas birrámeos de medianos a grandes, dos pares de autosomas birrámeos pequeños y 19 pares de autosomas acrocéntricos; el cromosoma sexual X fue subtlocéntrico grande.

Hall (1981) reportó para la localidad de Zacatecas, México que *Peromyscus difficilis* cuenta con un $2n=48$. Por su parte, Hsu y Arrighi (1968) reportan para esta misma especie la siguiente información: un $2n= 48$ y su $NF= 56$ con 38 autosomas acrocéntricos.

De acuerdo con Uribe (1977) *Peromyscus difficilis amplius* presente en la localidad de Zacatepec, Puebla muestra un $2n=48$ con cinco pares de autosomas birrámeos y 18 pares telocéntricos, $NF=56$ y el patrón de diferencia sexual fue XX/XY. El cromosoma sexual X subtlocéntrico y el Y metacéntrico.

Arellano-Meneses *et al.* (2000) reportaron para *P. difficilis amplius* de la localidad de Totalco, Veracruz un $2n=48$, con 10 pares de cromosomas birrámeos y 13 pares telocéntricos, su NF=66 el cromosoma X subtelocéntrico y el Y telocéntrico.

Alonso (2009) realizó un estudio cromosómico en Ixtacamaxtitlán, Puebla. Encontrando en *P. difficilis* un $2n=48$ y un NF=50, que corresponde a dos pares de cromosomas fueron birrámeos (un par submetacéntrico y un par subtelocéntrico) y 21 pares telocéntricos. El cromosoma sexual X submetacéntrico grande en donde se encuentra la heterocromatina constitutiva en el centrómero y el Y subtelocéntrico pequeño, heterocromático.

JUSTIFICACIÓN

Los roedores son un buen modelo para la investigación citogenética y en los últimos años han sido los más estudiados a nivel cromosómico, gracias a esto aportan la información necesaria para establecer o verificar relaciones en los diversos grupos, *Peromyscus difficilis* es una especie que cumple con importantes funciones como fuente de alimento para otras especies, posee un ciclo de vida corto, tamaño de camada grande, amplio potencial reproductivo, contribuye como dispersor de semillas y su amplia distribución geográfica. Sin embargo, en México se han realizado pocos trabajos citogenéticos sobre esta especie, por lo que en el presente trabajo tiene como objetivo, contribuir al conocimiento genético de *Peromyscus difficilis*, particularmente en San Salvador Atoyatempan, Puebla.

OBJETIVO GENERAL

Describir el cariotipo de *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan, Puebla.

Objetivos particulares

Obtener las constantes cromosómicas (número cromosómico y número fundamental) de *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan Puebla.

Obtener la morfología de los autosomas y la morfología del par sexual de *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan Puebla.

Comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con otros trabajos realizados para *Peromyscus difficilis* del estado de Puebla.

ÁREA DE ESTUDIO

El trabajo se realizó con cuatro ejemplares; un macho y tres hembras recolectados en el municipio de San Salvador Atoyatempan, Puebla (Fig. 5).



Figura 5. Sitio de muestreo de *Peromyscus difficilis* en el municipio de San Salvador Atoyatempan, Puebla.

Ubicación

El Municipio de San Salvador Atoyatempan se localiza en la parte central del Estado de Puebla, sus coordenadas son los paralelos 18° 45' y 18° 51' de latitud norte; los meridianos 97° 53' y 97° 56' de longitud oeste; altitud entre 1 700 y 2 000 m (INEGI, 2009). Colinda al norte con los municipios de Tecali de Herrera y Tlanepantla; al este con los municipios de Tlanepantla y Huitziltepec; al sur con los municipios de Huitziltepec, Molcaxac y Tzicatlacoyan; al oeste con los municipios de Tzicatlacoyan y Tecali de Herrera (INEGI, 2009; Fig. 6).

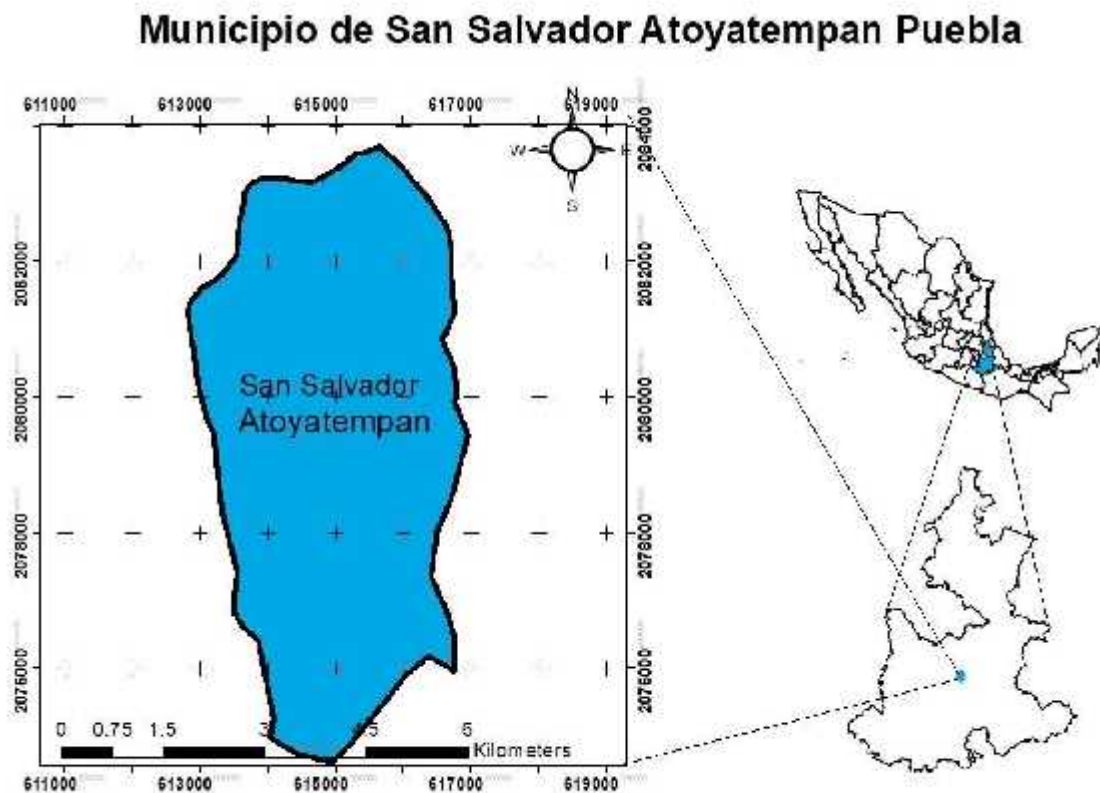


Figura 6. Ubicación del sitio de colecta del ratón *Peromyscus difficilis* del Municipio San Salvador Atoyatempan, Puebla (Imagen elaborada con Art map).

Extensión

El municipio de San Salvador Atoyatempan cuenta con una superficie de 26.56 Km², ocupando así el 0.1% de la superficie del estado. Cuenta con 20 localidades y una población total de 6,194 habitantes (INEGI, 2009).

Orografía

En el municipio confluye el Valle de Tepeaca, que abarca la zona septentrional y la depresión de Valsequillo, al sur (INEGI, 2009). Este Valle limita con las estribaciones de la Malinche, la Sierra del Tentzo, los Llanos de San Andrés y el Valle de Puebla y se caracteriza por su suelo eminentemente calizo, así como por los yacimientos de mármol que le han dado renombre al municipio de Tecali (INEGI, 2009). La depresión de Valsequillo se abre al pie de la Sierra del Tentzo, cuyo fondo le sirve de cauce al río Atoyac (INEGI, 2009).

El relieve del municipio muestra una topografía más o menos plana con un ligero declive norte-sur, en la parte septentrional; al centro el descenso cambia bruscamente de dirección, ahora de este a oeste, bajando más de 1.000 metros en un tramo menor de 500 metros, por donde pasa el río Atoyac (INEGI, 2009).

Clima

El rango de temperatura es de 16 – 18 °C y el intervalo de precipitación de 600 – 700 mm, con clima templado subhúmedo con lluvias en verano (INEGI, 2009).

Tipo de suelo

El suelo dominante es Chernozem (59%), Phaeozem (16%) y Leptosol (9%; INEGI, 2009).

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se dividió en dos etapas; trabajo de campo y trabajo de laboratorio.

Trabajo de campo

Obtención de ejemplares. La recolecta se realizó en la localidad San Salvador Atoyatempan, en donde se colocaron 30 trampas tipo Sherman, utilizando como cebo avena y vainilla a lo largo de un transecto, colocándose en un intervalo de 10 metros cada una. Las trampas se recogieron al siguiente día en la mañana. Se tomaron datos del sitio de muestreo como: localidad, coordenadas geográficas, altitud y fecha de recolecta. Se registraron un total de 13 ejemplares, de los cuales sólo cuatro (un macho y tres hembras) se transportaron al laboratorio de Mastozoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP para su procesamiento.

Trabajo de laboratorio Obtención de cromosomas

La técnica para la obtención del material celular se realizó mediante la técnica de extracción de médula ósea de acuerdo con lo propuesto por Lee (1969) y Baker y Qumsiyeh (1988). Los ejemplares fueron caracterizados sexualmente, posteriormente se pesaron usando una balanza marca Pesola, inmediatamente se les inyectó intraperitonealmente, 0.1 ml de Colchicina por cada 10 gramos de peso corporal del ejemplar y se dejó actuar durante 30 minutos, con la finalidad de inhibir la formación del huso acromático y detener la división celular en la etapa de la metafase.

Cada organismo fue sacrificado por dislocación cervical y se tomaron las medidas morfométricas convencionales (longitud total del cuerpo, longitud de la cola, longitud de la pata trasera, longitud de la oreja en mm, el peso en gramos y el sexo). Después, se procedió a extraer los fémures y las tibias, a los cuales se les cortó la epífisis en el extremo proximal. Con ayuda de una jeringa con solución hipotónica se extrajo la médula ósea y se vació en tubos de centrifuga de 15 ml. los cuales

contenían una solución hipotónica de KCl 0.075 M a 37°C, esta solución provocó la entrada de agua a las células, por lo tanto, el citoplasma aumentó su volumen y los cromosomas permanecieron flotando en su interior.

Se procedió a incubar durante 40 minutos a 37°C. Posteriormente, se centrifugó a 800 rpm durante ocho minutos, posteriormente, se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y el paquete celular se suspendió en solución fijadora de Carnoy (metanol-ácido acético en proporción 3.1), aplicándose lentamente por las paredes del tubo.

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

Elaboración de laminillas

Para la elaboración de laminillas, de manera previa se lavaron los portaobjetos posteriormente se colocaron en un frasco con alcohol al 95% previamente refrigerado. Cada tubo con el material celular se centrifugó nuevamente a 800 rpm durante ocho minutos, posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se suspendió suavemente con solución fijadora Carnoy fresca en proporción al tamaño del botón celular. Con una pipeta Pasteur se tomó el material celular, desde una altura aproximada de tres metros se dejaron caer tres gotas distribuidas a lo largo de portaobjetos, inmediatamente, se le aplicó calor con un encendedor para provocar un choque hipotérmico, después se agito la laminilla para apagar el fuego y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Cada laminilla se tiñó con Giemsa durante 10 minutos (47 ml de agua, 2 ml de buffer de Fosfatos y 1 ml de Giemsa), posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar. Después las laminillas fueron observadas en un microscopio

óptico con los objetivos de 10X, 40X y 100X, para buscar los campos mitóticos en metafase y después fueron fotografiados los mejores campos mitóticos.

Construcción del cariotipo

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

El índice centromérico se obtuvo con la siguiente fórmula Levan *et al.* (1964).

Donde:

IC= Índice centromérico

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

Longitud del brazo corto

_____ *100

q= Longitud del brazo largo

p+q

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

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

RESULTADOS

Se recolectaron cuatro ejemplares de *Peromyscus difficilis* correspondientes a un macho y tres hembras en la zona de San Salvador Atoyatempan. Con el material celular obtenido se elaboraron doce laminillas por individuo para la búsqueda de campos mitóticos de los cuales se fotografiaron los de mejor resolución (Fig. 7).



Figura 7. Campo cromosómico (100X) de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan, Puebla.

El cariotipo del ratón silvestre *P. difficilis* presentó un número cromosómico de $2n=48$ y un número fundamental $NF=56$. En cuanto a la descripción cariotípica, se identificaron cinco pares de cromosomas birrámeos que correspondieron a dos metacéntricos pequeños, un submetacéntrico grande y dos subtelocéntricos un par grande y el otro pequeño, 18 pares de cromosomas fueron telocéntricos correspondientes a telocéntricos de tamaño grande a pequeño; mientras que el cromosoma X fue subtelocéntrico grande y el Y telocéntrico pequeño (Cuadro 1; Fig. 8).

El Idiograma es un esquema de los cromosomas de una determinada especie. Puede mostrar información simple como el tipo de cromosoma, el tamaño de los brazos y las banderas. La representación del cariotipo puede ser un cariograma o un idiograma, y es éste quien proporciona la información sustancial para el establecimiento de las relaciones entre especies, con respecto a la organización de los cromosomas (Aiassa *et al.*, 2015 y Cerezo *et al.*, 2007; Fig. 9).

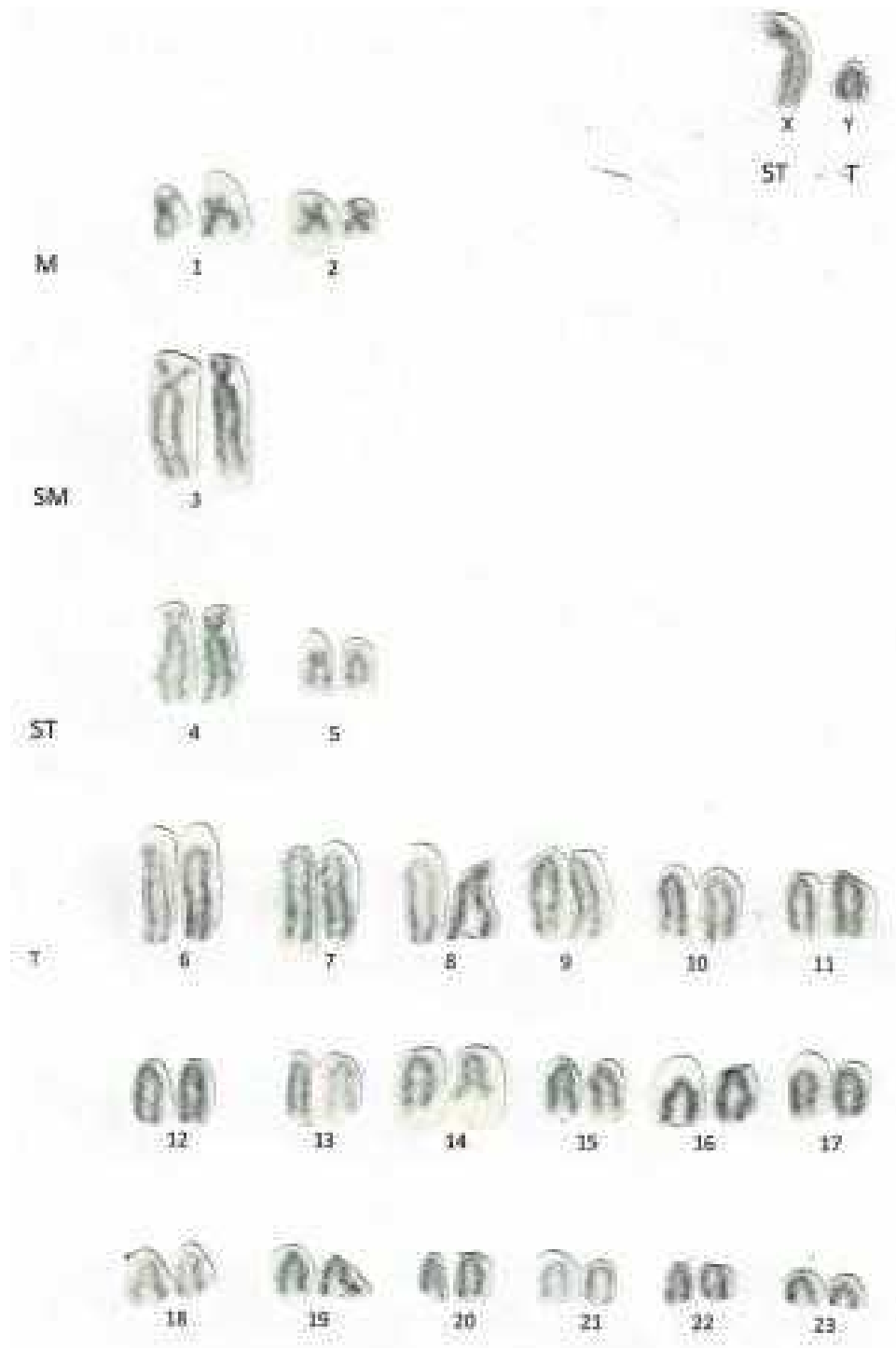


Figura 8. Cariotipo de ejemplar macho de *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan, Puebla.

Cuadro 1. Longitudes relativas y clasificación de los cromosomas. Según Levan *et al.* (1964), de *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan, Puebla.

IC= índice centromerico, LRp= Longitud relativa del brazo corto, LRq= Longitud relativa del brazo largo, DSp=Desviación estándar del brazo corto, DSq= Desviación estándar del brazo largo, m=metacéntrico, sm= submetacéntrico, t=telocéntrico, X=cromosoma sexual X, Y=cromosoma sexual Y.

| Par cromosómico | LRp | DSp | LRq | DSq | LRp+q | IC | Clasificación de Levan <i>et al.</i> (1964) |
|-----------------|------|------|-------|------|-------|-------|---|
| 1 | 2.65 | 0.73 | 3.98 | 1.68 | 6.63 | 39.96 | M |
| 2 | 2.88 | 1.21 | 4.91 | 1.3 | 7.3 | 39.45 | M |
| 3 | 3.06 | 0.65 | 9.43 | 3.41 | 12.49 | 26.63 | Sm |
| 4 | 4.06 | 0.61 | 13.7 | 2.62 | 17.76 | 22.86 | St |
| 5 | 4.37 | | 16.79 | 3.18 | 21.16 | 20.65 | St |
| 6 | | | 15.34 | 2.51 | 15.34 | | T |
| 7 | | | 14.07 | 1.84 | 14.07 | | T |
| 8 | | | 13.22 | 1.88 | 13.22 | | T |
| 9 | | | 12.18 | 1.72 | 12.18 | | T |
| 10 | | | 10.75 | 1.52 | 10.75 | | T |
| 11 | | | 10 | 1.04 | 10 | | T |
| 12 | | | 9.63 | 2.43 | 9.63 | | T |
| 13 | | | 9.51 | 0.08 | 9.51 | | T |
| 14 | | | 8.33 | 0.68 | 8.33 | | T |
| 15 | | | 7.89 | 0.82 | 7.89 | | T |
| 16 | | | 7.62 | 0.86 | 7.62 | | T |
| 17 | | | 7.02 | 0.75 | 7.02 | | T |
| 18 | | | 6.83 | 0.68 | 6.83 | | T |
| 19 | | | 6.59 | 0.7 | 6.59 | | T |
| 20 | | | 6.33 | 0.62 | 6.33 | | T |
| 21 | | | 6.11 | 0.62 | 6.11 | | T |
| 22 | | | 5.69 | 0.57 | 5.69 | | T |
| 23 | | | 4.96 | 0.6 | 4.96 | | T |
| X | 3.99 | 0.86 | 13.17 | 5.04 | 17.16 | 23.25 | St |
| Y | | | 5.52 | 0.73 | 5.52 | | T |

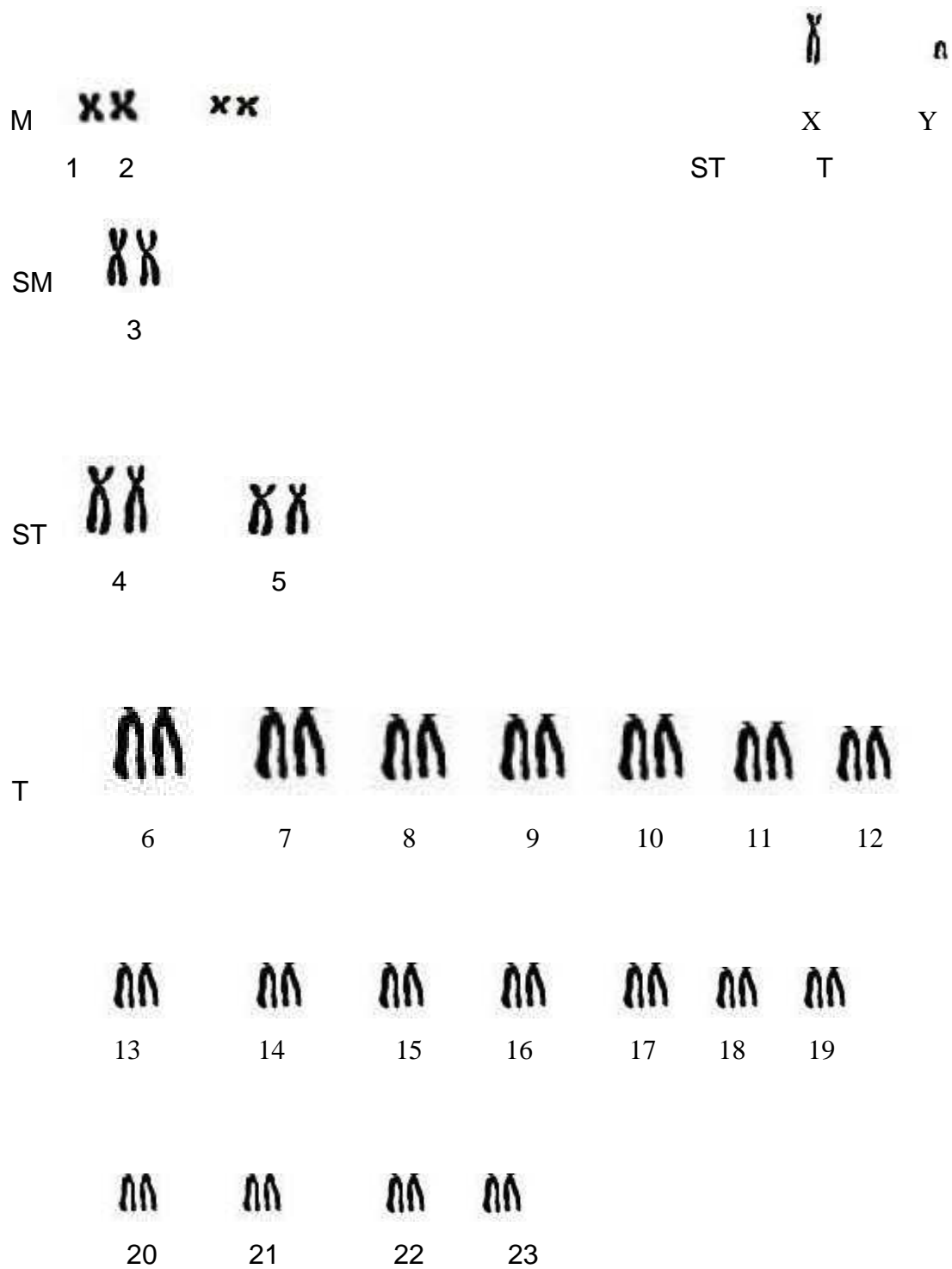


Figura 9. Ideograma de *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan, Puebla.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se obtuvo el cariotipo del ratón de la roca *Peromyscus difficilis*, el cual presentó un $2n=48$ y un número fundamental $NF=52$, lo que no muestra variación con respecto a otras especies dentro del género *Peromyscus*, como es el caso reportado para la localidad de Zacatlán, Puebla, donde se reportó para *P. leucopus* un $2n=48$ y $NF=52$ (Martínez, 2017). En otro caso, García-Vivar (2018), reportó para *P. difficilis amplius* de San Pedro Atlixco Tianguismanalco, Puebla, un $2n=48$ y $NF=52$, lo cual indica que no se presenta variación dentro del género *Peromyscus* con respecto a otras especies (Robbins y Baker, 1981).

En cuanto a la clasificación de los cromosomas de *P. difficilis*, la presentada en este trabajo, muestra un mismo número de pares de cromosomas birrameos sin diferencias morfológicas. Al igual, se obtuvo un mismo par de cromosomas monorrámeos. Estas similitudes se deben a los procesos de adaptación derivados de factores ambientales; actuando de manera análoga en ambas poblaciones, repercutiendo así en el cariotipo de cada una de ellas, lo cual coincide con lo reportado para la población de *P. difficilis* de Zacatepec, Puebla por Uribe (1997), donde se indica que *P. difficilis* no presenta variación cariotípica en las constantes cromosómicas y la morfología del complemento autosómico en las dos poblaciones del estado de Puebla.

Sin embargo, en el estudio realizado por Mudespacher-Ziehl *et al.* (2005). en la localidad de Morelos, México se registró un cariotipo de $2n=48$ y un $NF=76$, siendo 15 pares de cromosomas telocéntricos, a diferencia de los 18 encontrados en este trabajo; concibiéndoles un carácter de tendencia hacia un cariotipo más derivado; lo cual no ocurrió con el cariotipo obtenido en el presente estudio, por lo que se considera que se ha mantenido preservado, es decir, se presenta un cariotipo ancestral, siendo una de las principales causas el aislamiento geográfico que la

población de estudio reporta, el cual se encuentra posiblemente restringido geográficamente, impidiendo que exista flujo genético entre las otras poblaciones, por lo que existe variación con los *P. difficilis* del estado de Morelos. México.

Por lo tanto, estos tres cariotipos, el del presente trabajo, el de Uribe (1977) y el de Mudespacher-Ziehl *et al.* (2005), presentan un $2n$ idéntico, al igual que los cromosomas sexuales, X, Y. Se observaron variaciones en, el NF que da a conocer Mudespacher-Ziehl *et al.* (2005), en la morfología de los autosomas.

De igual manera, se ha observado que en el género *Peromyscus* existe variación inter e intraespecífica respecto al número de brazos autosómicos y en la morfología de los cromosomas sexuales X y Y. Dentro del grupo *P. truei* se puede observar que el número fundamental va de $NF= 50-62$, presentándose de dos a ocho pares de autosomas birrámeos y de 15 a 21 pares de autosomas telocéntricos, los cuales se pueden deber a los re arreglos cromosómicos, tales como las adiciones o deleciones de heterocromatina constitutiva en los brazos cromosómicos (Lawlor, 1974). Así como también las fusiones e inversiones pericéntricas que se han identificado como los factores responsables de convertir los cromosomas monorrámeos en birrámeos (Patton y Rogers, 1993). Estas variaciones en la estructura de los cromosomas han sido resultado de adaptaciones a diferentes tipos de hábitats, clima, barreras geográficas y de mutaciones (translocaciones, inversiones, deleciones y fusiones) producidas a través del tiempo desde la aparición de los roedores y su migración a Norteamérica (León, 2014).

Comparando los resultados obtenidos de *P. difficilis* en Ixtacamaxtitlán, Puebla por Alonso (2009) y los de *Peromyscus difficilis amplius* presente en la localidad de Zacatepec, Puebla (Uribe, 1977) con otras especies, se puede afirmar que *P. difficilis* presenta características cariotípicas primitivas conformadas en su mayoría por cromosomas telocéntricos, de acuerdo a lo descrito por Nadler y Sultton (1962) quienes establecen que un mayor número de cromosomas telocéntricos indican un cariotipo más primitivo.

En varios estudios realizados se reportó que los cambios en las estructuras cromosómicas se han propuesto como mecanismos importantes en la especiación, la mayoría de estos casos los reordenamientos cromosómicos desempeñan un papel primordial en la divergencia inicial (Baker y Bickham, 1986).

CONCLUSIÓN

Se describió el cariotipo del ratón de las rocas *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan, Puebla.

Peromyscus difficilis presente en San Salvador Atoyatempan mostró un número diploide 48, y un número fundamental 56.

La clasificación de los cromosomas de *Peromyscus difficilis* de San Salvador Atoyatempan, Puebla consta de, cinco pares de cromosomas birrámeos que correspondieron a dos metacéntricos pequeños, un par submetacéntrico grande y dos subtelocéntricos un par grande y el otro pequeño.

Para 18 pares de cromosomas telocéntricos de tamaño grande a pequeño; mientras que el cromosoma X fue subtelocéntrico grande y el cromosoma sexual Y fue telocéntrico pequeño el cromosoma sexual Y telocéntrico pequeño.

Los resultados obtenidos a partir de la comparación de las características cariotípicas de *P. difficilis* de San Salvador Atoyatempan, Puebla con otras especies del género *Peromyscus* permiten afirmar que dichas características son primitivas conformadas en su mayoría por cromosomas telocéntricos, preservando el cariotipo ancestral propuesto por Robbins y Baker en 1981.

PROPUESTAS

Es importante realizar más estudios citogenéticos en *Peromyscus difficilis* en diferentes regiones de distribución, para conocer si la distribución es un factor que causa variación de su cariotipo.

Se recomienda realizar un bandeo cromosómico G y C, lo que permitirá identificar los rearrreglos cromosómicos que ocurrieron en San Salvador Atoyatempan, Puebla.

LITERATURA CITADA

Aiassa, D., B. Bosch, N. Gentile, F. Mañas y N. Gorla. 2015. Citogenética, teoría y práctica manual. CEPYC. Primera Edición. Argentina 172 pp.

Allen, J. A. 1891. Notes on new or little--known North American mammals, based on recent additions to the Collection of Mammals in the American Museum of Natural History. Bulletin of the American Museum of Natural History, 3: 263--310.

Alonso, C. 2009. Descripción cromosómica de *Peromyscus difficilis* de Tlajomulco del Municipio de Ixtacamaxtitlán, Puebla. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, BUAP. 38 p.

Angulo, A. A., A. R. Galindo, R. C. Avendaño., y C. Pérez. 2012. Biología Celular. Editorial. Primera Edición. México 223 pp.

Arrighi, F. E., A. D. Stock y S. Pathak. 1976. Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). V. Evidence of pericentric inversions. Chromosomes Today, 5:323-329.

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

Arita, H. y G. Ceballos. 1997. The Mammals of Mexico: Distribution and conservation status, Revista Mexicana de Mastozoología 2: 33-71.

Baker, R. J. y M. B. Qumsiyeh. 1988. Methods in chiropteran mitotic chromosomal studies. *In*: Ecological and behavioral methods for the study of bats (T.H. Kunz, ed). Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. 435 pp.

Baker R. J y J. W. Bickham. 1986. Speciation by monobrachial centric fusions. Proc. Nat. Acad. Sci., 83:8245-8248.

Carleton, M. D. 1989. Systematic and evolution. In advances in the study of *Peromyscus*. (G. L. Kirland y J. N. Layne, eds.). Texas Tech University Press. 241 pp.

Ceballos, G. y C. Galindo. 1984. Mamíferos silvestres de la Cuenca de México. Editorial. Limusa, México, Distrito Federal, México. 345 pp.

Ceballos, G. y J. Arroyo. 2012. Lista actualizada de los mamíferos de México. Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época. 2(2): 27-80.

Ceballos, G. 2014. Mammals of Mexico. Johns Hopkins University Press. 974 pp.

Ceballos, G. y G. Oliva. (Coords.). 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para la Biodiversidad y la Conservación y Fondo de Cultura Económica. México, D.F, 986 pp.

Cerezo, C., A., M. Baiget, C. Cañadas, A. Carrillo, O. Diez, B. Ezquieta, M. Lucas, J. Molano, A. M. Sánchez, J. Oriola, y A. Romero. 2007. Transmisión de la información genética. Química clínica. 26(5) 265-271.

Cortés, F. 1984. Bando de cromosomas. Investigación y Ciencia. 97:20-29.

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

Durish, N. D., K. E., Halcomb, C. W., Kilpatrick, y Bradley, R. D. 2004. Molecular systematics of the *Peromyscus truei* species group. Journal of Mammalogy, 85 (6): 1160- 1169.

García-Vivar, J. U. 2018 Análisis cromosómico de *Peromyscus difficilis* de San Pedro Atlixco Tianguismanalco, Puebla. Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 47p.

Gardner, J. E. 2003. Principios de genética. Edit. Limusa. México 649 pp.

Galindo, L. C., y C. J. Krebs. 1997. Habitat structure and demographic variability of a habitat specialist: the rock mouse (*Peromyscus difficilis*). Revista Mexicana de Mastozoología 2: 72-89.

Hall, E. R. 1981. The mammals of North America. Vol. 2second edition John Wiley y Sons, New York. 57-660.

Hsu, T. C. y F. E., Arrighi. 1968. Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae) 1. Evolutionary trends in 20 species. Cytogenetics, 7:417-466.

INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. San Salvador Atoyatempan. Puebla.

Kingler, H. P. 1977. Standarized Karyotype of Deer mice. *Peromyscus*, Committee for standardization of chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia). Cytogenet Cell Genetic. 19: 38-43.

Lawlor, T. E. 1974. Chromosomal evolution in *Peromyscus*. *Evolution*, 28(4):689-692.

Lee, M. R. 1969. A widely applicable technic for direct processing of bone marrow for chromosomes of vertebrates. Stain technology. 44(3):155.

Lee, M. R., Schmidly, D. J. y C. Huheey, 1972. Chromosomal variation in certain populations of *Peromyscus boylii* and its systematic implications. *Journal of Mammalogy*, 53: 697-707.

León, T. M. A. 2014. Los roedores múridos de México: los pequeños mamíferos exitosos. *CONABIO. Biodiversitas*, 113:8-11.

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

March, I. J. y A. Flamenco. 1996. Evaluación rápida de la deforestación en las áreas naturales protegidas de Chiapas (1970-1993). Informe para: The Nature Conservancy. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. 123 pp.

Martínez, M. I. 2017. Análisis cromosómico de *Peromyscus leucopus* del estado de Zacatlán. Puebla. Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 40 p.

Montero, V., M. A. 2018. Análisis cromosómico de *Peromyscus gratus* del estado de Tecamachalco, Puebla. Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 45 p.

Mudespacher-Ziehl, C., R. Espiríto-Mora, M. Martínez-Coronel y S. Gaona. 2005. Chromosomal studies of two populations of *Peromyscus difficilis felipensis* (Rodentia: Muridae). *Cytologia*, 70:243-248.

Nadler, C. F. y D. A. Sutton 1962. Mitotic chromosomes of some North American Sciuridae. *Proc. Soc. Exp. Biol. New York*, 110:36-38.

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

Pierce, B. 2009. Genética: Un enfoque conceptual. Editorial Médica Panamericana. Tercera edición. España. 832 pp.

Ramamoorthy, T. P., R. Bye y J. Lot. 1998. Diversidad Biológica de México: Orígenes y distribución. México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 792 pp.

Ramírez-Pulido, J., A. Castro-Campillo y A. Salome-Méndez. 2001. Los *Peromyscus* (Rodentia: Muridae) en la colección de mamíferos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAMI) Acta Zoológica Mex. 83:83-114.

Ramírez, J., J. Arroyo, y A. Castillo. 2005. Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres México. Acta Zoológica Mexicana (n.s.) 21(1): 21-82.

Robbins, L. W. y R. J. Baker. 1981. An assessment of the nature of chromosomal rearrangements in 18 species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). Cytogenet. Cell Genet, 31:194-202.

Sánchez, V., F., Botello, J. Flores, R. Gómez, L. Guevara, G. Gutiérrez G y A. Rodríguez. 2014. Biodiversidad de Chordata (Mammalia) en Mexico Biodiversity of Chordata Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85:496-504.

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.

Sarukhán, J., P., Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, J. Llorente, B., G. Halffter, R. Gonzales, I. March, A. Mohar, y A. De la Maza. 2009. Capital Natural de México:

Conocimiento actual, evaluación y perspectivas de Sustentabilidad. Síntesis.
México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 104 pp.

Silva, T. C., N. Contreras, D. y J. Fonseca. 2008. The utility of cytogenetics in modern medicine. Historical view and application. *Acta Médica Colombiana*. 33(4): 309.

Swanson, P., T. Merz y J. Young. 1968. *Cytogenetics*. Editorial UTEHA. Primera edición México. 321 pp.

Torres-Millan, E. 2003. Análisis morfométrico de *Peromyscus difficilis* del estado de Tlaxcala. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. 44 p.

Uribe, M. 1977. Estudios citogenéticos en algunas especies de roedores y lagomorfos de México. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. UNAM. México. 169 p.

ANEXO

SOLUCIÓN HIPOTÓNICA

0.075M KCl

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

Se puede utilizar máximo dos días consecutivos únicamente si la solución no está contaminada, debe ser conservada en refrigeración.

Fijador Carnoy

Porción 3:1 Metanol

(15 ml).

Ácido acético (5 ml).

Preparación:

Debe ser preparado 30 minutos antes de ser utilizado manteniéndolo en refrigeración, utilización hasta 3 horas después de su preparación.

Giemsa para tinción convencional

Para su preparación se requiere de 2 ml de solución amortiguadora (AB), 47ml de agua destilada y 1 ml de solución concentrada de Giemsa (Microlab).

Preparación de la solución amortiguadora:

SOLUCIÓN A: Se pesan 1.38gr del reactivo 10M NaH_2PO_4 se diluyen en 100 ml de agua destilada (se utiliza 15ml).

SOLUCION B: Se pesan 1.42gr del reactivo 10M NaH_2PO_4 se diluyen en 100 ml de agua destilada (se utiliza 10 ml).

Para su obtención amortiguadora AB se diluyen las soluciones A y B (15 ml de la primera y 10 ml de la segunda). Esta se debe mantener en refrigeración a 4°C mientras esté libre de contaminación.

