

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

TESIS

ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS EN
MITOSIS, MEIOSIS; DETERMINACIÓN DEL
CONTENIDO DE ADN Y CONTENIDO TOTAL
DE NUCLEÓTIDOS DEL POPOYOTE
(Profundulus punctatus).

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA
Y MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS

PRESENTA:

FRANCISCO DE JESÚS DÍAZ CASTRO



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

TESIS

ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS EN
MITOSIS, MEIOSIS; DETERMINACIÓN DEL
CONTENIDO DE ADN Y CONTENIDO TOTAL
DE NUCLEÓTIDOS DEL POPOYOTE
(*Profundulus punctatus*).

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN **BIOLOGÍA MARINA Y
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS**

PRESENTA:

FRANCISCO DE JESÚS DÍAZ CASTRO

DIRECTOR:

MC. ARKADY USCANGA MARTÍNEZ

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS – CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

ASESORES:

DR. LENIN ARIAS RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO, DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MC. JOSÉ REYES DÍAZ GALLEGOS

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS – CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y guiarme siempre en mi sendero. Por darme la fortaleza y la bendición de lograr todas mis metas para seguir de pies y siempre de frente.

A mis Padres y mis Hermanas, por regalarme su amor y apoyo incondicional, por dedicarme el sacrificio de gran parte de su vida y tiempo en mi formación. Le debo mucho y sé que no podré pagarles todos los lujos, por eso solo me queda decirles:... Gracias, **MIL GRACIAS**.

A mí Mamá Candita, por su amor, su apoyo y motivación a diario. Porque es la única mujer aparte de mis papas, que siempre ha estado conmigo en todo momento y ha sabido ganarse mi amor eterno con hecho.

Agradezco a mí director de tesis el Mtro. Arkady Uscanga Martínez, por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de su comunidad estudiantil, regalándome su preciada amistad, confianza y perseverancia. Por apoyarme y aconsejarme en todo momento.

Agradezco especialmente a mi Sensei el **Dr. Lenin Arias Rodríguez**, de la universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por brindarme (materiales y equipos), también por regañarme y brindarme su enseñanza a diario. Por confiar en mí y dedicarme parte de su tiempo para la realización de este trabajo. También a **sus padres**, quienes me acogieron en su hogar y me obsequiaron alimentación en mi estancia.

Agradezco a mí compañera la Lic. En Biol. Adriana Osorio Pérez, Por su amistad, por dedicarme su tiempo y enseñanzas dentro del laboratorio durante mi estancia.

A mis compañeros de la UJAT, Ana Karen, Wilbert (Chipilín), Sac-Nithe, Josué y Mayra, por brindarme su amistad, tiempo y consejos dentro de mi estancia, por compartir momentos buenos que se quedan grabados para siempre.

A mis compañeros del CEICO, Francisco Vidal Bello y Gilberto Toledo, quienes se aventuraron conmigo y me apoyaron en todo momento, aconsejaron y motivaron en a culminar esta etapa de mi meta.

Agradezco al biólogo William, a la Mtra. Natalia Perales por su apoyo, consejos y motivación constante en mi formación académica para terminar esta etapa de mi vida.

También agradezco a una personita muy especial en mi vida, que siempre me ha apoyado, me ha motivado a seguir adelante día a día. Yazmin Guadalupe Mendoza Antonio, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas...

Estas palabras sé que no bastan para agradecer todo lo que han hecho hacia mi persona, pero espero que noten lo importante y el cariño que les tengo a todos ustedes.

DEDICATORIA

A mis padres, **Azael Díaz Chang & María Ángela Castro González** por ser los dos pilares más importantes en mi vida. Por regalarme cada consejo, por regalarme cada regaño que ayudaron en mi formación y que también me enseñaron a ser una persona responsable y humilde. Por el sacrificio de ayudarme a llegar hasta aquí. Agradezco su amor y su apoyo incondicional, porque nunca me han dejado caer y sé que nunca lo harán.

A mis hermanitas, **Margarita Concepción & Valeria del Carmen Díaz Castro** por ser las dos personas que me motivaron a terminar una etapa de mi vida y por estar siempre conmigo en todo momento y confiar plenamente en mí.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
RESUMEN	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEORICO	4
2.1 Citogenética	4
2.2 Anomalías cromosómicas	4
2.3 Inhibidores del uso celular	5
2.4 Descripción y clasificación taxonómica del popoyote <i>P. punctatus</i>	6
2.5 Taxonomía General de la Especie:	7
2.6 <i>P. punctatus</i>	7
III. ANTECEDENTES	9
3.1 Estudios realizados en la familia Profundulidae	9
3.2 Citogenética en peces	10
3.3 Determinación del tamaño total del genoma y contenido de ADN en peces	12
IV. OBJETIVOS	13
4.1 General	13
4.2 Específicos	13
V. HIPÓTESIS	14
VI. MÉTODOS	15
6.1 Obtención de ejemplares	15
6.2 Preparación de los frotis sanguíneos y medición de las células eritrocitas para determinar el contenido de ADN y tamaño total del genoma	15

6.3 Experimentos realizados, adecuación de la técnica en el organismo	18
6.4 Tratamiento citológico para la obtención de metafases	19
6.5 Elaboración de las preparaciones citológicas mediante la técnica por goteo ...	21
6.6 Tinción de las muestras citológica	22
6.7 Análisis microscópico, toma de microfotografías y conteo de campos cromosómicos	23
VII. RESULTADOS	24
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. CONCLUSIÓN	38
X. REFERENCIAS DOCUMENTALES	39

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1.- Ejemplar macho adulto del popoyote (<i>p. punctatus</i>).	6
Figura 2.- Disección de especímenes (A), e hidratación de los órganos extraídos; bazo, riñón, branquias, gónada.	20
Figura 3.- Frecuencias de los números cromosómicos en mitosis, de 6 especímenes del popoyote (<i>p. punctatus</i>), mostrando especímenes con número cromosómico bimodal con $2n = 48$, $2n = 36$ (B, C, D, E, F) y número cromosómico unimodal con $2n = 48$ (A).	25
Figura 4.- Frecuencias de los números cromosómicos en mitosis, de 6 especímenes del popoyote (<i>p. punctatus</i>), mostrando especímenes con número cromosómico bimodal con $2n = 48$, $2n = 36$ (G, H, I, J) y número cromosómico unimodal con $2n$ $= 48$ (k, l).	26
Figura 5.- Frecuencia global de los numeros cromosómicos en mitosis y meiosis observados en el <i>p. punctatus</i> , con número bimodal en mitosis $2n = 48$, $2n = 36$ (A) y número unimodal en meiosis con $1n = 24$ elementos cromosomicos (B). .	27
Figura 6.- Cariotipo típico en mitosis del <i>p. punctatus</i> , caracterizado por $2n = 48$ cromosomas de tipo birrámeos subtlocéntrico-telocéntricos (par I-III), monorrámeos telocéntricos (par IV-XIII), monorrámeos acrocéntricos (par XIV- XXIV) (A) y célula branquial en metafase (B).	29

Figura 7.- Panorama de las células meioticas en profase del *p. punctatus* (A, B), metafase en meiosis I con $2n = 48$ cromosomas bivalentes (C) y metafase en meiosis II con $1n = 24$ cromosomas monovalentes (D). 30

Figura 8.- representan las medidas de las diferentes células encontradas en el *p. punctatus*, células pequeñas, grandes y $4n$, comparadas con el valor estándar 5.5 de la trucha arcoíris (*o. mykiss*). (A). 32

Figura 9.- paisaje de las células hematologicas del *p. punctatus*, donde es posible observar células con núcleos pequeños ($1.5n$), mediano ($2n$, normales) y grandes ($4n$,), (A, B), panorama de campos mitoticos con número cromosomicos $2n=36$ (C), $2n=48$ (D)..... 34

ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1.- Proporción de colchicina aplicada a los organismos	19
Tabla 2.- Parámetros citogenéticos típicos del cariotipo en mitosis del popoyote <i>p. punctatus</i> , caracterizado por 24 pares de cromosomas, de los cuales tres pares son birrámeos (msm) y 21 pares de cromosomas monorrámeos (t).	28
Tabla 3.- Medidas en μm del área de los núcleos de los eritrocitos del popoyote <i>p. punctatus</i> que representan células con nivel de ploidía.	33

RESUMEN

En el presente estudio se determinó el cariotipo típico, el contenido total de ADN y tamaño total del genoma del popoyote (*Profundulus punctatus*). Se aplicaron técnicas citogenéticas para la obtención del material celular, utilizados en el estudio de los cromosomas y el resto de los análisis fueron basados bajo las técnica de Denton, (1973) misma que fue ajustada al organismo estudiado. La clasificación cromosómica se empleó los criterios de Levan et al. (1964). Los resultados de este estudio, indican que el cariotipo particular del popoyote (*P. punctatus*), en estadio mitótico está constituido por $2n = 48$ cromosomas, identificados en tres pares de cromosomas birrámeos de tipo metacéntricos-submetacéntricos (msm) y 21 par de cromosomas monorrámeos de tipo acrocéntricos (T). Por otro lado, el cariotipo en meiosis I está constituido por $2n = 48$ cromosomas bivalentes y en meiosis II, está constituido por $1n = 24$ cromosomas monovalentes. De igual manera el estudio de contenido total de ADN y tamaño total del genoma. En los cromosomas analizados, no se notaron diferencia alguna, pero si se presentaron algunas anomalías significativas entre los tamaños de células eritrocitas provenientes del tejido branquial, la contaminación del cuerpo de agua es un factor influyente en la presencia de estas. En conclusión se determinó que el cariotipo de esta especie concuerda en número y morfología cromosómica con especies de la misma familia.

Palabras clave: Popoyote (*P. punctatus*), Cromosomas, Mitosis, Meiosis, ADN, Genoma.

I. INTRODUCCIÓN

Los peces son organismos con alta demanda comercial, por ello la distribución dentro de los mercados nacionales e internacionales. Esto se debe principalmente a que es un producto significativo nutricionalmente en la alimentación humana (Günther, 1867). Así mismo, es importante destacar que los peces también son utilizados como ornato en diferentes lugares debido a los colores y formas que estos presentan (Miller et al. 2005).

Este es el grupo más extenso que representa más de la mitad de las 55, 000 especies de vertebrados existentes (Helfman, 2009). En lo que respecta a los peces, se tienen identificadas 33, 065 especies (Eschmeyer y Fong, 2014), y el registro anual indica que existe una tendencia a que los descubrimientos de nuevas especies se incrementen. Sin embargo, en el sureste de México la fauna de peces nativos ha sido señalada como una de las más diversificadas y ricas del continente americano (Hubbs, 1924 y Nelson, 2006), siendo así, el grupo más representativo.

Tomando en cuenta que la abundancia de las especies acuáticas dentro de un ecosistema es variable, debido a la importancia o la función que genera cada una de las especie en un determinado lugar habitable, por ello; la ciencia, la tecnología y las técnicas de muchos científicos se han establecido como parámetros necesarios, para estudiar a las especies a nivel celular para obtener datos precisos que nos permitan saber las descendencias de estas especies o los linajes que abarca cada una de ellas en la descendencia a través de los tiempos.

Sabemos que existen diversas herramientas no tan convincentes que se utilizan para la identificación de organismos, una de ellas son las conocidas claves dicotómicas, mismas que se basa en la definición de los caracteres morfológicos, macroscópicos o microscópicos; de la especie. Otras técnicas relevantes en la ciencia, son las que se encargan del estudio de los organismos a nivel molecular estudiando diversas partes del organismo que cuenten con células vivas, como lo es la genética, biología molecular y la citogenética.

La citogenética es la parte de la genética que se encarga del estudio cromosómico de los sistemas vivos (es el estudio minucioso de los cromosomas), a través de varios aspectos como: la composición, estructura, función, comportamiento y de qué manera se transmiten a la descendencia y correlaciones con enfermedades cromosómicas (Galán, 2002).

Sabemos que los cromosomas son la estructura que se encuentran en el citoplasma del núcleo de las células de todo ser vivo. Mismos que están formado por ADN y proteínas, estos cuentan con la mayor parte de la información genética del individuo. Los cromosomas se nombran metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos y telocéntrico. Esto mediante la ubicación del centrómero de cada cromosoma (Levan, 1964).

De esta manera se dice que los estudios citogenéticos son efectivos dentro del campo de la biología (Savage, 1995), ya que las técnicas del análisis de los cromosomas siguen siendo vigentes. Esto se utiliza actualmente para responder incógnitas que se abren a los investigadores que tratan de conocer más de su importancia ecológica, estructura, su ciclo de vida, y primordialmente la descendencia de los organismos.

Y aunque se trata de una ciencia relativamente joven a comparación de otras, la citogenética ha tenido una gran cantidad de avances y aportaciones importantes que han permitido el desarrollo de los estudios citogenéticos en peces con mayor frecuencia, de esta manera se han obtenido detecciones de alteraciones genéticas y estructurales en los cromosomas de algunas especies, (Miller, 1955).

La familia Profundulidae consta de un sólo género nominal, el género *Profundulus*, dividido en dos subgéneros: subgénero *Profundulus* (Hubbs, 1924), con 6 especies descritas, *P. balsanus* (Ahl, 1935), *P. scapularis* (Fowler, 1936), *P. punctatus* (Günther, 1866), *P. guatemalensis* (Günther, 1866), *P. pachycephalus* (Günther, 1866) y *P. oaxacae* (Meek, 1902); y el subgénero Tlaloc con 4 especies *P. candalarius* (Hubbs, 1924), *P. hildebrandi* (Miller, 1950), *P. mexicanus* (Álvarez y Carranza, 1951) y *P. labialis* (Günther, 1866).

En la presente investigación se desarrolla un estudio citogenético del Popoyote (*P. punctatus*), especie con importancia ecológicas dentro del ecosistema acuático su alimentación es depredadora; a pesar de que se alienta de nutrientes que se encuentran en la materia orgánica del fondo, también se puede alimentar de otros organismos de menor tamaño, esto ayuda a tener una regularización del ecosistema.

Dada la carencia de conocimiento de esta especie, las técnicas y metodología que se aplican al estudio de este organismo, fueron ajustadas para poder determinar el cariotipo del (*P. punctatus*).

El interés de estudiar los cromosomas en esta especie, es para tener conocimientos biológicos dentro del campo de la genética, taxonomía y evolución para su conservación mediante técnicas actuales de cultivo, ya que los estudios de citogenética en peces ha sido un área activa de investigación en los últimos años.

De esta manera, el estudio de esta especie amplía el conocimiento científico para generaciones nuevas de investigadores, sabiendo que este grupo de organismos se encuentran con alto rango de amenaza de extinción, debido a la extensión de los asentamientos urbanos que amenazan su hábitat natural.

II. MARCO TEORICO

2.1 Citogenética

La citogenética es un estudio que se le realiza a los cromosomas. Se sabe que los cromosomas son estructuras complejas que se ubican en el núcleo de las células, compuestas por DNA, histonas y otras proteínas, RNA y polisacáridos. Normalmente los cromosomas no se pueden ver con un microscopio óptico, pero durante la división celular se condensan lo suficiente en metafase de esta manera se pueden analizar fácilmente a 1.000 aumentos. Para obtener células con cromosomas en estado condensado, se expone a un inhibidor de la mitosis, que bloquea la formación del uso mitótico y detiene la división celular en la etapa de metafase (Dave, 2002).

2.2 Anomalías cromosómicas

Las anomalías cromosómicas implican la pérdida o la ganancia de uno o varios cromosomas completos, y pueden afectar tanto a autosomas como a cromosomas sexuales. Las células que han perdido un cromosoma presentan monosomía para ese cromosoma, mientras que aquellas con un cromosoma extra muestran trisomía para el cromosoma implicado.

Generalmente, la pérdida de cromosomas en un individuo tiene mayor repercusión que la ganancia, aunque ésta también puede tener consecuencias graves. Casi todas las monosomías autosómicas llevan a la muerte poco después de la concepción y sólo unas pocas trisomías permiten llegar al nacimiento.

La triploidía en peces presenta variaciones cromosomales numéricas que alteran la cantidad de cromosomas provocando el aumento del número de juegos cromosómicos presente en cada una de las células. Esto se debe a que el segundo cuerpo polar queda dentro de un huevo fertilizado, mismo que adquiere tres núcleos

haploides (n). Los dos juegos de cromosomas de la madre y uno del padre se fusionan para formar un cigoto con un núcleo triploide (3n), (Chrisman et al., 1983; Pandian & Varadaraj 1990; Tave, 1990).

2.3 Inhibidores del uso celular

Sustancia o preparación química con la capacidad de despolimerizar las estructuras de los microtúbulos que se forman a nivel molecular, actúa principalmente en la desunión a y b de la tubulina, evita la polimerización del microtúbulos, esto ayuda a que si está formado los desnaturaliza el citoesqueleto para anclarse en fase mitótica, sino está formado evita la formación de este.

La colchicina, es un alcaloide derivado del *colchicum autumnale*. Inhibe la mitosis evitando la polimerización de los microtúbulos. Su mecanismo de acción se ha denominado "subestequiométrico", y consiste en su adición en el extremo. (Williams, 2002).

Los taxanos son terpenos complejos producidos por las plantas del género *Taxus* (tejos). Originalmente se aislaron de *taxus brevifolia*, aunque actualmente son sintetizados de modo artificial. Su mecanismo principal de acción es la alteración de la función de los microtúbulos celulares mediante la estabilización de su formación (Wilson, 1965).

Los alcaloides vinca, son aminas producidas por plantas *catharanthus roseus* plantas alucinógenas, mismas que también son utilizadas como inhibidores del uso celular, ejemplo: vinblastina, utilizado en el tratamiento de la leucemia, el linfoma de hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama y cáncer de testículo. También es uno de los componentes de muchos regímenes de quimioterapia.

2.4 Descripción y clasificación taxonómica del popoyote *P. punctatus*

El género *Profundulus* mismo al que pertenece *P. punctatus*, es uno de los grupos de peces más antiguos, distribuidos al norte de América Central en México, Guatemala y Honduras. Se consideró que este taxón está dividido en dos grandes grupos como subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc* (Hubbs, 1924).

Investigaciones recientes han revelado alto grado de diferenciación entre ambos taxones y algunas de sus especies, esto permite que se asocien a cambios morfológicos, en las comparaciones osteológicas que se han realizado entre los subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc* (González et al., 2014).



Figura 1.- Ejemplar macho adulto del popoyote (*P. punctatus*).

2.5 Taxonomía General de la Especie:

- **Reino:** Animalia
- **Filo:** Chordata
 - **Subfilo:** Vertebrata
 - **Superclase:** Osteichthyes
 - **Clase:** Actinopterygii
 - **Subclase:** Neopterygii
 - **Infraclase:** Teleostei
 - **Superorden:** Acanthopterygii
 - **Orden:** Cyprinodontiforme
 - **Suborden:** Cyprinodontoidei
 - **Familia:** Profundulidae
 - **Género:** *Profundulus*
 - **Especie:** *Profundulus punctatus*

2.6 *P. punctatus*

Son organismo bentopelagicos de aguas tropicales pertenecientes a la familia Profundulidae (Hoedeman y Brunner, 1951), es un pez que habita en las vertientes del atlántico, en la cabecera del río Coatzacoalcos en Oaxaca y en el río Grijalva en Chiapas y parte de Guatemala; también se localizan en las vertientes del pacífico, desde el rio Aguacatillo, Tributario de la laguna de tres palos, cerca de Acapulco, Gro., y al este hasta las cercanías de Chiquimulilla, Santa Rosa, Guatemala, (Miller, 1955).

Este pez habita en remansos rápidos de ríos y afluentes con altitud 115 a 1550 m., sobre el nivel del mar con una temperatura de 22 a 26 °C, predominan en aguas claras lodosas (con componentes del sustrato arenoso, limo, lodo, grava, rocas y cantos rodados), se encuentran a una profundidad considerada a 1.7 m; con vegetación ausente, sin embargo, se encuentran algunas algas verdes y algunas charas (Günther, 1866).

Es una especie dulce acuícola de la región tropical mexicana, este grupo de peces realiza labores ecológicas muy importante dentro de la cadena trófica en los ecosistemas hídricos, ya que sirve como alimento de otras especies, eso ha repercutido directamente sobre las poblaciones silvestres, (Hubbs, 1924).

El origen de este subgénero está asociado a la compleja historia geológica y diversidad ecológica del sur de México y norte de Centroamérica. Tres de las especies, (*P. punctatus*, *P. guatemalensis* y *P. labialis*), muestran una variación considerable entre ellas, en cuanto a caracteres morfológicos se refiere. Esta plasticidad fenotípica puede ser una respuesta a variaciones medioambientales (Miller, 1955).

Mediante un estudio de contenido estomacal, (Langdon, 1982), aprueba que el *P. punctatus* se alimenta de organismos vivos de menor tamaño como lo son algunas almejas esféricas y caracoles (Melaneidae).

Esta especie es ovípara con fecundación externa, tiene una aleta dorsal formada de uno a tres radios rudimentarios y de 10 a 16 radios principales, con escamas en series laterales de 31 a 36, (Miller, 1955). La especie cuenta con una clasificación taxonómica, (Günther, 1866).

Actualmente con el incremento de los asentamientos humanos en los márgenes de los ríos y lagunas de las zonas tropicales que suelen ser el hábitat de la fauna Ictica, han creado cambios en la distribución de especies en las cuencas donde se distribuyen actualmente.

III. ANTECEDENTES

3.1 Estudios realizados en la familia Profundulidae

La familia Profundulidae forma parte del orden *Cyprinodontiformes*, se trata de un grupo representativo de la ictiofauna centroamericana. Estos peces se conocen comúnmente como “*killifishes*”, escamudos o popoyotes, son de tamaño pequeño, en estado adulto miden de 70 a 90 mm de longitud total (LT) y en algunos casos pueden alcanzar hasta 120 mm. Habitan ríos de montañas con altitudes entre 500 a 2250 msnm; aunque algunas especies pueden encontrarse hasta los 300 m de altura. En las regiones con mayor altitud son los únicos peces nativos, ocupando además hábitat muy restringidos (Hubbs, 1924).

El investigador Miller, quien fue encargado del Museo de Michigan, donde se alberga la colección de peces más grande del mundo, describió la especie del género *Profundulus* en 1950 posteriormente la registró como nueva y diferente.

En la Revista Nature, se publicó el estudio realizado por Uyeno (1971), el cual habla de los Múltiples cromosomas sexuales en un pez mexicano perteneciente al orden Cyprinodontidae, mencionando que los peces de este género cuentan con 48 cromosomas, a excepción de *Lucina parva* con (46), *L. interioris* (36) y *Adinia xenica* (32) mismos que pertenecen al grupo *Fundulus*.

En (2014), González realizó un estudio de diferenciaciones osteológicas entre Subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc* (Teleostei: *Profundulidae*). Comparando las seis especies, demostró que al interior de los subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc*, no existen diferencias cualitativas evidentes y se presenta un patrón de variación constante.

Al realizar una revisión bibliográfica se ha observado que existen muy pocos estudios de citogenética en el orden cyprinodontidae. Sin embargo, podemos mencionar que Arias-Rodríguez (2008), estableció el desarrollo y la caracterización

citogenética del pez tropical de agua (*P. labialis*), mismo que fue publicado en la revista de la semana de divulgación de la universidad Juárez autónoma de tabasco.

Chen (1970), realizó un estudio comparativo de veinte *Killis* del genero *Fundulus*, pertenecientes al grupo Cyprinodontidae, en el cual menciona que el número de cromosómico en células ováricas varían entre 32 y 48 cromosomas.

3.2 Citogenética en peces

De acuerdo a los estudios realizados en citogenética se encuentran los del pez tropical de agua dulce *Parachromis managuensis* (Pisces: Cichlidae), donde obtuvo campos mitóticos y meióticos a partir del epitelio de branquias y gónadas respectivamente. En este sentido Denton; Kligerman y Bloom (1964) determinaron que las dispersiones cromosómicas seleccionadas para establecer el cariotipo, se identifican tres pares de cromosomas birrámeos, metacéntricos-submetacéntricos.

De esta forma Muñoz (2006), describe el cariotipo de *Odonthestes regia* (Teleostei: Atheriniformes: Atherinopsidae), donde obtuvo como resultado un par de cromosomas submetacéntricos (par 1), 16 pares Subtelocéntricos (pares 2 al 17) y 7 pares acrocéntricos (pares 18 al 24).

Arias-Rodríguez y colaboradores (2006) analizo el cariotipo y variación cromosómica del pejelagarto tropical (*A. tropicus*), en larvas y adultos con la finalidad de establecer la variación del número diploide de cromosomas. El complemento cromosómico típico del cariotipo promedio de $2n = 56$ cromosomas, se clasificó en ocho pares de cromosomas metacéntricos (m) y cuatro pares de submetacéntricos (sm) ambos del tipo birrámeos, mientras que ocho pares de cromosomas fueron clasificados como teocéntricos y los últimos ocho pares del cariotipo se describieron como microcromosomas de tipos telocéntricos (t). Los resultados obtenidos en el trabajo antes mencionado concuerdan con lo realizados por Molina (2008).

En (2010) Grozeva, realizó la caracterización citogenética de tres *Balistoidae* peces del Atlántico (*Cantherhines macrocerus*, *Cantherhines pullus*, *Melichthys niger*) mismos que infieren diferencias cromosómicas evolutivas en ambas familias *Monacanthidae* y *Balística*. Los cariotipos de las tres especies poseen un número de cromosomas diploides muy similares $2n = 40$, están compuesto exclusivamente acrocéntricos; Así mismo López (2008), encontró diferencias en *Brycon henni* (*Pisces: Characidae*) donde obtuvo el cariotipo con un número diploide $2n = 50$ cromosomas birrámeos por medio de la técnica de cultivo de linfocitos, evita el sacrificio de los animales.

En (2011) Scacchetti, realizó la descripción de la diversidad Cariotípica en cuatro especies del Género (*Gymnotus linnaeus*), (teleósteos, *Gymnotiformes*, *Gymnotidae*): cartografía física de los genes ribosómicos y secuencias teloméricas en la que hubo una variación expresiva del número diploide de las especies, a pesar de la función Cariotípica entre los representantes de las poblaciones. *G. sylvius* presentó 40 cromosoma y *G. pantherinus* presenta 52 cromosomas. El resultado fue que no se detectaron polimorfismo numérico y que las poblaciones de *G. sylvius* mostraron señales en la región intersticial en los brazos cortos de par cromosoma 2.

Se destaca el estudio de Valente (2012), en el cual realizó la comparación citogenética de diez especies de Ciclidos (*Teleostei, Cichlidae*) de Brasil, obteniendo como resultado nueve especies con el mismo número de cromosomas de $2n=48$ descartando a *Araguaia* que mostró un número diploide de $2n = 44$ diferente a las anteriores.

3.3 Determinación del tamaño total del genoma y contenido de ADN en peces

Oliveira, (2014) determinó el contenido de ADN y el número de cromosomas para caracterizar los niveles de ploidía en *Brachiararia spp* teniendo como resultado el análisis de 15 genotipos, en el cual el contenido de ADN varió con los niveles de ploidía (2x, 3x y 4x) y entre especies y / o taxones. El contenido promedio de ADN fue de 1.74 pg (2x) en *B. ruzizensis*, 3.74 Pg (4x) en *B. decumbens* y 3.52 pg (4x) para *B. brizantha*. Para el genotipo 86, se obtuvieron 2,57 pg de ADN y $2n = 3x = 27$, lo que indica una accesión triploide, probablemente un híbrido natural. La variación en el contenido total de ADN permitió la diferenciación de *Brachiararia ruzizensis* ($2n = 2x = 18$) de las especies tetraploides *Brachiararia Brizantha* y *Brachiararia decumbens* ($2n = 4x = 36$), así como el probable triploide híbrido ($2n = 3x = 18$) de estas especies.

Jara en el (2008), determino el contenido de ADN nuclear en galaxias maculatus (teleostei: Osmeriformes: Galaxiidae) un pez con importancia comercial, usando microdensitometría de núcleos de eritrocitos sometidos a tinción de Feulgen, utilizando como estándar eritrocitos de trucha arco iris con un valor 2C conocido. El valor 2C de *G. maculatus* fue $2,21 \pm 0,12$ pg y su valor C, es equivalente a 1,105 pg (1.082,9 pMb). Este valor C está dentro del rango registrado para otras especies de osmeriformes (0,62-3,2 pg).

En (1998), Carvalho, realizo un estudio de determinación del contenido de ADN nuclear en 53 especies de peces Characiformes de la región Neotropical. El número diploide varió de $2n = 48$ en *Astyanax fasciatus*, *Gymnocorymbus ternetzi* y *Hyphessobrycon griemi* a $2n = 102$ en *potamorhina squamoralevis* con un número modal de 54 cromosomas. El contenido de ADN nuclear osciló entre $1,70 \pm 0,04$ pg de ADN por núcleo diploide en *Acestrorhynchus pantaneiro* 3.94 ± 0.09 pg en *Tetragonopterus chalceus*. Un análisis general mostró un valor medio de 2,9 pg de ADN por núcleo diploide. Los valores de contenido de ADN muy similares se han observado en las especies de la familia Cynodontidae, que muestran una variación del 3% entre los dos géneros estudiados.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

- Determinar el tamaño del genoma y el contenido total de AND en las células sanguíneas y armar el cariotipo en mitosis del popoyote (*P. punctatus*).

4.2 Específicos

- Determinar el número de cromosomas modal diploide y haploide
- Establecer la posición del centrómero de los cromosomas
- Determinar el cariotipo típico en mitosis
- Determinar el tamaño del genoma y contenido total del ADN nuclear de las células sanguíneas

V. HIPÓTESIS

Nula

- Los cromosomas del Popoyote (*P. punctatus*), tienen el mismo número de cromosomas y las mismas características que los demás organismos de la misma familia.

Alternativa

- Los cromosomas del Popoyote (*P. punctatus*), presentan número de cromosomas diferentes en sus campos mitóticos al resto de la familia.

VI. MÉTODOS

6.1 Obtención de ejemplares

Los especímenes de *P. punctatus*, fueron localizados y capturados en la parte media del río Sabinal en la colonia Juan Crispín, de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

La colecta se llevó a cabo a la 1:30 de la tarde, con coordenadas de ubicación, N 16° 76' 06", Ho 93° 20' 11" con latitud 534, utilizando una red de chinchorro, con espesor de luz de malla 1 cm², misma que se sumergió en forma de arrastres, por el caudal del río.

Posteriormente se llevó a cabo la identificación y separación de los especímenes en contenedores con aireación constante, para su traslado al área de estudio.

6.2 Preparación de los frotis sanguíneos y medición de las células eritrocitas para determinar el contenido de ADN y tamaño total del genoma

Con ayuda de un porta objetos previamente limpio, mismo que se rotulo en la parte lateral, el espécimen sacrificado es tomado y frotado sobre el porta objetos, esto para que la sangre del pez se adhiera al mismo. Esto se dejó secar por un tiempo estimado a 15 minutos, posteriormente la muestra de sangre en el porta objetos se metió a tinción por 5 minutos en una caja copli con solución de giemsa al 10%, mismas que fue preparada con una solución amortiguadora de buffer de fosfatos (0.01 M) a pH 7.0, todo a partir de una solución madre o stock (Denton, 1973).

Una vez cumplido los 5 minutos de tinción, se retiró el porta objetos de la caja Copli para lavar con agua destilada. Después de 10 minutos tiempo que se dio para que secase al aire la muestra fue observada al Microscopio Axio Scope. A1 (Carl Zeiss®), equipado con una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss) y en conjunto con el programa SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011). En él se observaron infinidad de células las cuales se digitalizaron con un objetivo de 40 X +1.25 del objetivo.

Se contabilizaron 500 células mismas que fueron empleando para su medición con el programa SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011).

Se utilizó contour (Spline), herramienta del programa SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011), misma que sirvió para delimitar el límite del núcleo de las células para obtener el diámetro del núcleo en μm (micrómetros). Posteriormente se realizó una base de datos en el programa de la paquetería office (Excel) en él se calculó el promedio y desviación estándar.

El contenido total de nucleótidos (ADN total), fue cálculo siguiendo la fórmula ajustada en acuerdo con Hartley y Horne, (1985); Tiersch et al. (1989), (1998), (1992), 1994), (2003); Hardie *et al.* (2004), para determinar el contenido **(2C = diploide) de ADN nuclear eritrocito diploide (pg)** = (contenido de ADN del control diploide en picogramos de las células sanguíneas de *O. mykiss*) x (Promedio del área de los eritrocitos [grandes y/o pequeños] de *P. punctatus*) / (Promedio del área de los eritrocitos de *O. mykiss*).

Por ejemplo:

Eritrocitos 4n

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= $(5.5) \times (21.6) / (21.85)$

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= $(118.8) / (21.85)$

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= 5.437070938

Eritrocitos grandes

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= $(5.5) \times (11.8) / (21.85)$

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= $(64.9) / (21.85)$

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= 2.9702517

Eritrocitos pequeños

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= $(5.5) \times (9.27) / (21.85)$

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= $(50.985) / (21.85)$

Contenido (**2C=diploide**) de ADN (**pg**)= 2.3334096

El valor 2-C de 5.5 picogramos fue estimado como estándar para la trucha arco iris *O. mykiss* (Hartley y Horne, 1985; Tiersch *et al.* 1989) y fue empleado como muestra de referencia para el cálculo del contenido diploide del ADN en el Popoyote.

El tamaño del genoma o valor – C en picogramos (o masa de ADN en picogramos), que representa una copia de la información genética nuclear (equivale a 1C), fue determina considerando que 1 pg de ADN es igual a 0.978×10^9 pares de bases (bp) (Doležel *et al.* 2003); por lo anterior el tamaño del genoma o valor – C en picogramos, fue calculado empleando la fórmula propuesta por Doležel *et al.* (1992), (1994), (1998), (2003). **El tamaño del genoma del *P. punctatus* en pares de bases (bp)= (0.978×10^9) (contenido de ADN en pg de *P. punctatus*).**

6.3 Experimentos realizados, adecuación de la técnica en el organismo

Se trabajó con 12 organismos los cuales fueron sacrificados para correr diversos experimentos con la finalidad de adecuar una técnica de citogenética apropiada para esta especie.

Primer experimento: Fue el siguiente, Se tomaron cinco especímenes ambos sexos, a los cuales se administró una solución concentrada de Colchicina al 0.01 % + Citrato de sodio al 0.01%. , cada porción inyectada tenía una concentración de 1 µg de Colchicina diluida en 1 µl de Citrato de sodio, así mismo los organismos fueron clasificados por tamaño para poder ser inyectados con 100 µg de Colchicina a los peces chicos (3 cm), 200 µg a los medianos (4 cm) y 300 µg a los grandes (5 cm). Los tiempos se programaron a dos, tres y cuatro horas, según el tamaño del organismo y la concentración administra.

Segundo experimento: Concentración 0.05 gr de Colchicina + 2.5 gr de CaCl₂ diluido en 500 µl de H₂O. Se utilizó un espécimen macho el cual fue inyectado por tres minutos con 100 µg de Colchicina, diluida en 100 µl de CaCl₂.

Tercer experimento: La concentración cambio a 0.01 gr de Colchicina + 0.01 gr de CaCl₂ + 0.01 gr de Citrato de Sodio, agregando 2 µl DMSO (Dimetil sulfoxido), Diluido en 20 ml de H₂O. Se utilizaron dos organismos, los cuales se inyectaron con 100 µg de Colchicina por cinco horas y media y 200 µg por tres horas. Cada unidad de la jeringa se diluyo en 100 µl de la solución compuesta.

Cuarto experimento: cultivo In-vitro de Fibroblastos, se realizó un cultivo de tejido sólido. Se tomaron tres especímenes los cuales se anestesiaron para poder extraer mediante un corte un trozo de tejido perteneciente a la aleta caudal, el cual se cultivó en medio de cultivo por seis días a una temperatura de 36 °C.

Después de las técnicas antes mencionada, se llevó a cabo el Quinto experimento; la cual fue ajustada en tiempo y concentraciones óptimas para la obtención de células en metafase. Se utilizó una concentración de 0.02 gr colchicina + 0.01 CaCl₂ + 0.01 Citrato de Sodio + 2 µl de DMSO diluido en 17 ml de H₂O.

Misma que en la cual se trabajó con cuatro especímenes, lo cuales fueron inyectados con 200 µg de colchicina por un tiempo de tres horas, misma que se diluyo en 200 µl de solución compuesta.

6.4 Tratamiento citológico para la obtención de metafases

Los especímenes fueron tratados con una solución en proporción de cloruro de calcio, citrato de sodio, 2 µl de DMSO (Dimetil sulfoxido) y 0.002 gr de colchicina al 0.2% inyectando 10, 20 o 30 unidades vía abdominal según el tamaño de los peces, mediante el empleo de una jeringa de insulina marca (DL, de 0.4 ml con aguja de 31Gx8mm). (Antes de cada tratamiento, los peces se anestesiaron con Aceite de clavo con la finalidad de evitar su estrés). De acuerdo con la dosificación recomendada por (Subrahmanyam, 1976), citado de (Denton, 1973).

Tabla 1.- Proporción de colchicina aplicada a los organismos

| Longitud del pez en (cm) | Dosis Inyectada |
|---------------------------------|------------------------|
| Chico (3 cm) | 10 cc. |
| Mediano (4 cm) | 20 cc. |
| Grande (5 cm) | 30 cc. |

cm=centímetros, cc= centímetro cubico (unidad de medida)

El pretratamiento con CaCl₂, Citrato de Sodio, DMSO (Dimetil sulfoxido) y colchicina se dejó actuar en los peces por un lapso de tres horas. En un recipiente de 19 litros sin aireación, una modificación en la técnica mencionada por (Arias-Rodríguez et al., 2005). Después del pretratamiento los organismos fueron disecados (Figura 2A). Del cual se les extrajo branquias, gónadas e intestino (Arias-Rodríguez et al., 2005).

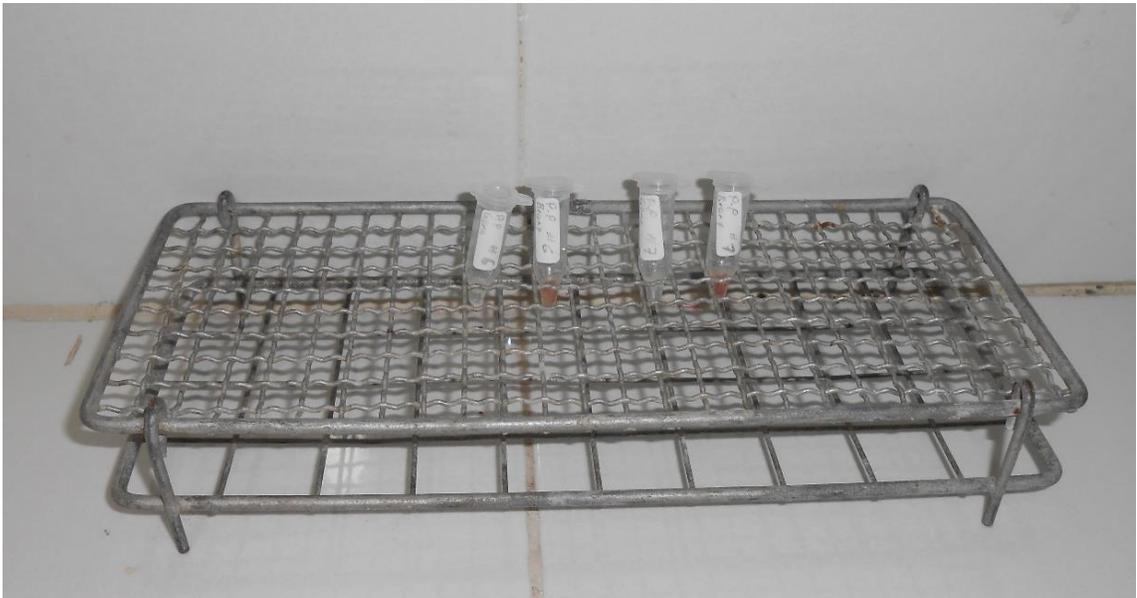
A**B**

Figura 2.- Disección de especímenes (A), e hidratación de los órganos extraídos; Bazo, Riñón, Branquias, Gónada.

Después de la extracción de los tejidos, estos fueron separados individualmente en tubos de 1.5 µl, posteriormente se dejó hidratar con 100 µl de citrato de sodio al 1% (La hidratación de los tejidos debe ser al instante de ser retirados para evitando la descomposición y muerte de las células) (Figura 2B). El tiempo de hidratación es de una hora a temperatura ambiente (Arias-Rodríguez et al., 2005).

Después del periodo de hidratación, el tejido branquial fue disgregado suavemente, con el propósito de separar el epitelio de los filamentos branquiales, y poder desechar el tejido cartilaginoso (Arias-Rodríguez et al., 2005).

Después del tiempo antes mencionado, se agregó 1000 µl de Fijador 4:1 (ácido acético glacial y metanol) para el prefijado del tejido, dejando reposar por un lapso 24 horas (Arias-Rodríguez et al., 2008). La técnica fue modificada y ajustada a un tiempo de reposo de 15 minutos.

Se prosiguió a la centrifugación de los tejidos durante 5 minutos a 5,000 R.P.M en la centrifuga (Zentrifugen Hettich MIKRO 220R); luego con ayuda de una pipeta Pasteur, se eliminó el sobrenadante cuidando de no tocar ni retirar el tejido y se procedió a la adición del nuevo fijador fresco, mismo que se dio un reposo a los tejidos por 10 minutos, luego se centrifugado bajo las condiciones antes señaladas.

La operación de cambio de fijador y centrifugado se realizó dos veces, hasta que el material celular tomo coloración blanquecino. Subsiguientemente, el material celular se conservó en refrigeración a 4 °C (Arias-Rodríguez et al., 2005).

6.5 Elaboración de las preparaciones citológicas mediante la técnica por goteo

Para la elaboración de las muestras citológicas, se siguieron las siguientes actividades: si el material celular fue mantenido más de 24 horas en refrigeración y se permitió su adecuación a la temperatura necesaria, el tejido solo se resuspende y se centrifuga durante 5 minutos para hacer el recambio de fijador.

Por otro lado, si el tejido tiene 15 minutos de refrigeración a una temperatura de 4 °C., después del último recambio de fijador, solo se agito el tubo con el tejido, esto para poner las partículas celulares en resuspensión y poder ser utilizado.

Con una micropipeta se tomaron 25 µl de la muestra preparada misma que se dejó caer de una altura de 2 metros en un porta objetos colocado sobre una placa de hielo (Cooler). Posteriormente se dejó secar al aire durante 5 minutos, técnica común para realizar preparaciones cromosómicas de animales (Denton, 1973).

El propósito de esta técnica es para permitir que las células al impactar con el cubre objetos previamente frio se dispersen las células, mostrando campos cromosómicos visibles a través de un microscopio óptico, la reacción de la técnica produce una reacción de patín o barrido haciendo que las células se esparzan (Arias-Rodríguez et al., 2005).

6.6 Tinción de las muestras citológica

Después de tener las preparaciones citológicas listas, las laminillas fueron teñidas con una tinción específica para cromosomas de animales: solución de Giemsa al 10%, mismas que fue preparada con una solución amortiguadora de buffer de fosfatos (0.01 M) a pH 7.0, todo a partir de una solución madre o stock (Denton, 1973).

Las muestras fueron sometidas a tinción durante 10 minutos en una caja Copli a 34 °C. Posteriormente las muestras se retiraron de la caja para ser lavadas administrando agua destilada con ayuda de una piseta, de esta manera se retiran los residuos de Giemsa que pueden ocultar la visibilidad a través del microscopio.

6.7 Análisis microscópico, toma de microfotografías y conteo de campos cromosómicos

Las preparaciones Citológicas, se observaron bajo el microscopio óptico Axio Scope. A1 (Carl Zeiss®), equipado con una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss) y en conjunto con el programa SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011). Las mejores dispersiones celulares se digitalizaron con el objetivo 25X y 40 X +1.25 del optovar.

La frecuencia del número de células por cada fase en mitosis, se determinó por conteo directo sobre las imágenes empleando los programas SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011) y Photoshop® cs 8.0 (Adobe®).

Las microfotografías donde se presentan las mejores metafases, fueron utilizadas para poder contabilizar el número de cromosomas utilizando el programa ZEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011).

VII. RESULTADOS

Se analizaron 12 especímenes de *P. punctatus* de los cuales se hicieron análisis de 100 preparaciones cromosómicas en mitosis, en el cual 500 campos cromosómicos mitóticos fueron contabilizados, debido a que presentaron una mejor dispersión estas provenientes de tejido branquial. Por otra parte, en meiosis se analizaron 50 preparaciones cromosómicas en las cuales se encontraron 100 campos meióticos, provenientes de tejido gonádico.

En mitosis se observaron campos cromosómicos de las especies en estudio que van de 30 a 48 cromosomas (Figura 3, Figura 4), se muestra la presencia de un número bimodal en algunos organismos. En mitosis la frecuencia cromosómica con número bimodal es de $2n = 48$ mismos que representan el 76% y $2n = 36$ cromosomas, con representación del 13% del total de campos analizados (Figura 5A).

En meiosis se encontraron campos que van de 16 a 36 cromosomas, en el cual el número modal con más frecuencia fue de $1n = 24$ cromosomas, el cual represento el 82% del total de campos contabilizados (Figura 5B).

El cariotipo típico del *P. punctatus*, en estadio mitótico se compone de $2n=48$ cromosomas. En el cual se encontraron tres pares de cromosomas birrámeos metacéntricos-submetacéntricos y 21 pares de cromosomas monorrámeos de tipo telocéntricos (Figura 6A, 6B).

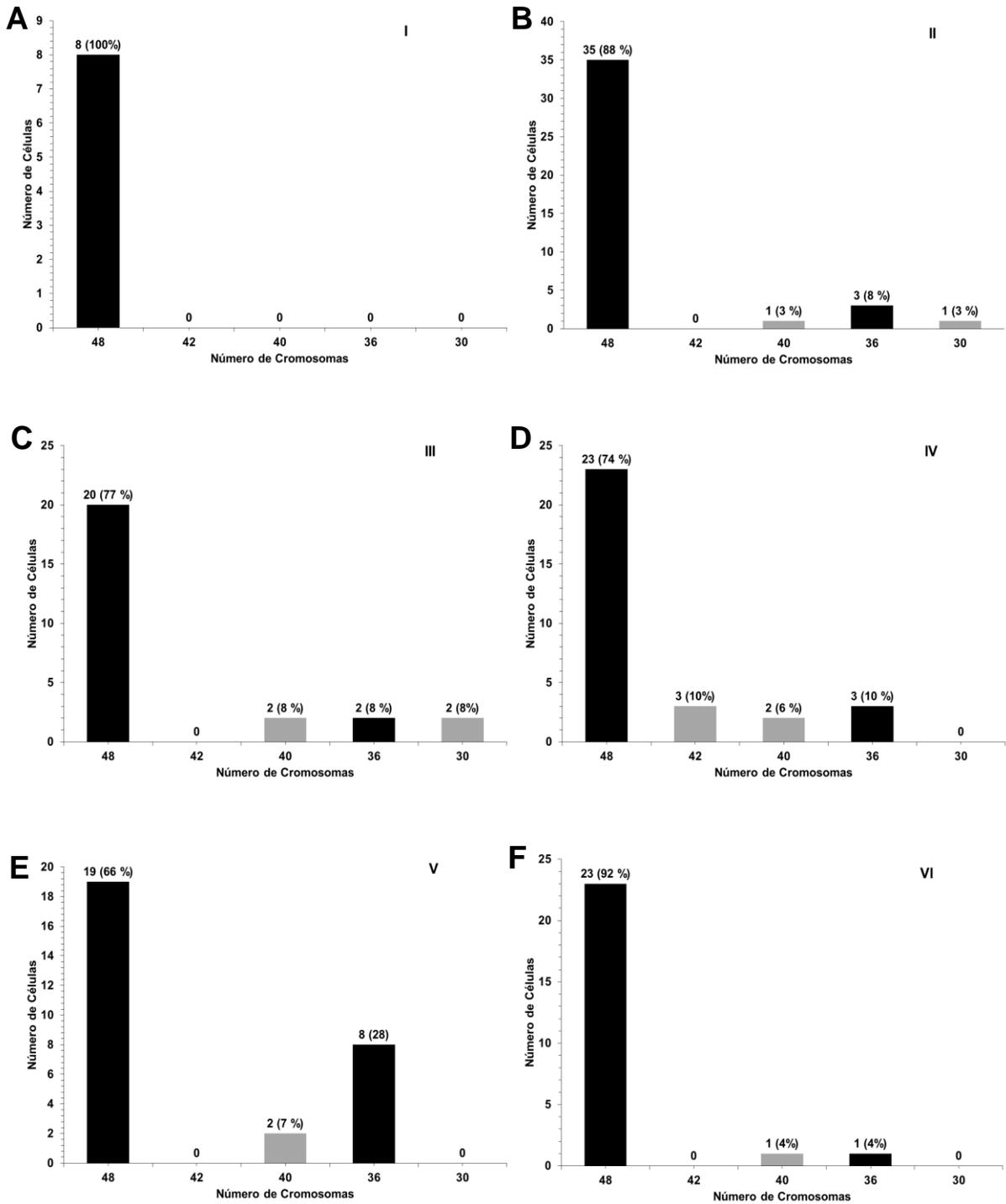


Figura 3.- Frecuencias de los números cromosómicos en mitosis, de 6 especímenes del popoyote (*P. punctatus*), mostrando especímenes con número cromosómico bimodal con $2n = 48$, $2n = 36$ (B, C, D, E, F) y número cromosómico unimodal con $2n = 48$ (A).

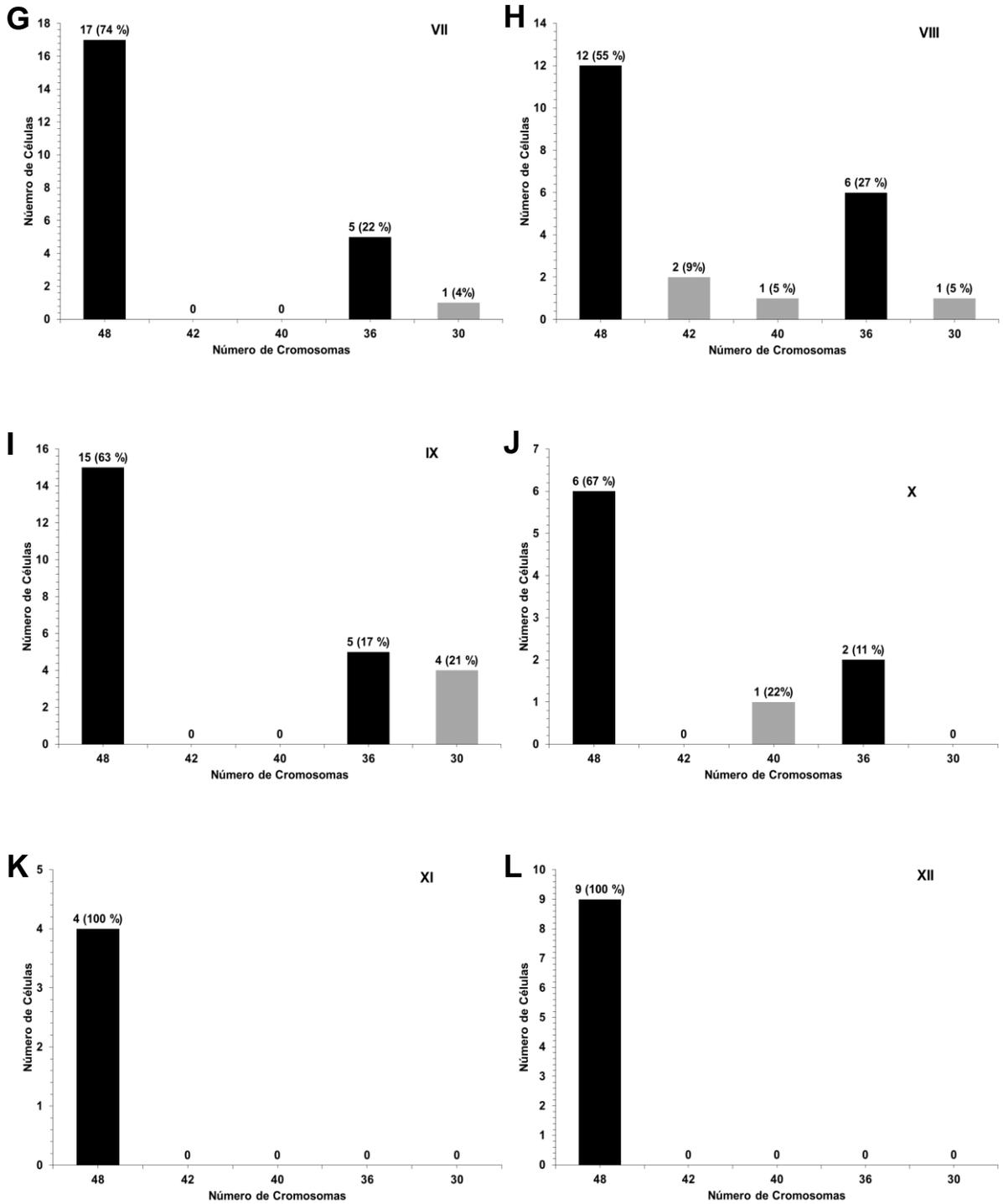


Figura 4.- Frecuencias de los números cromosómicos en mitosis, de 6 especímenes del popoyote (*P. punctatus*), mostrando especímenes con número cromosómico bimodal con $2n = 48$, $2n = 36$ (G, H, I, J) y número cromosómico unimodal con $2n = 48$ (K, L).

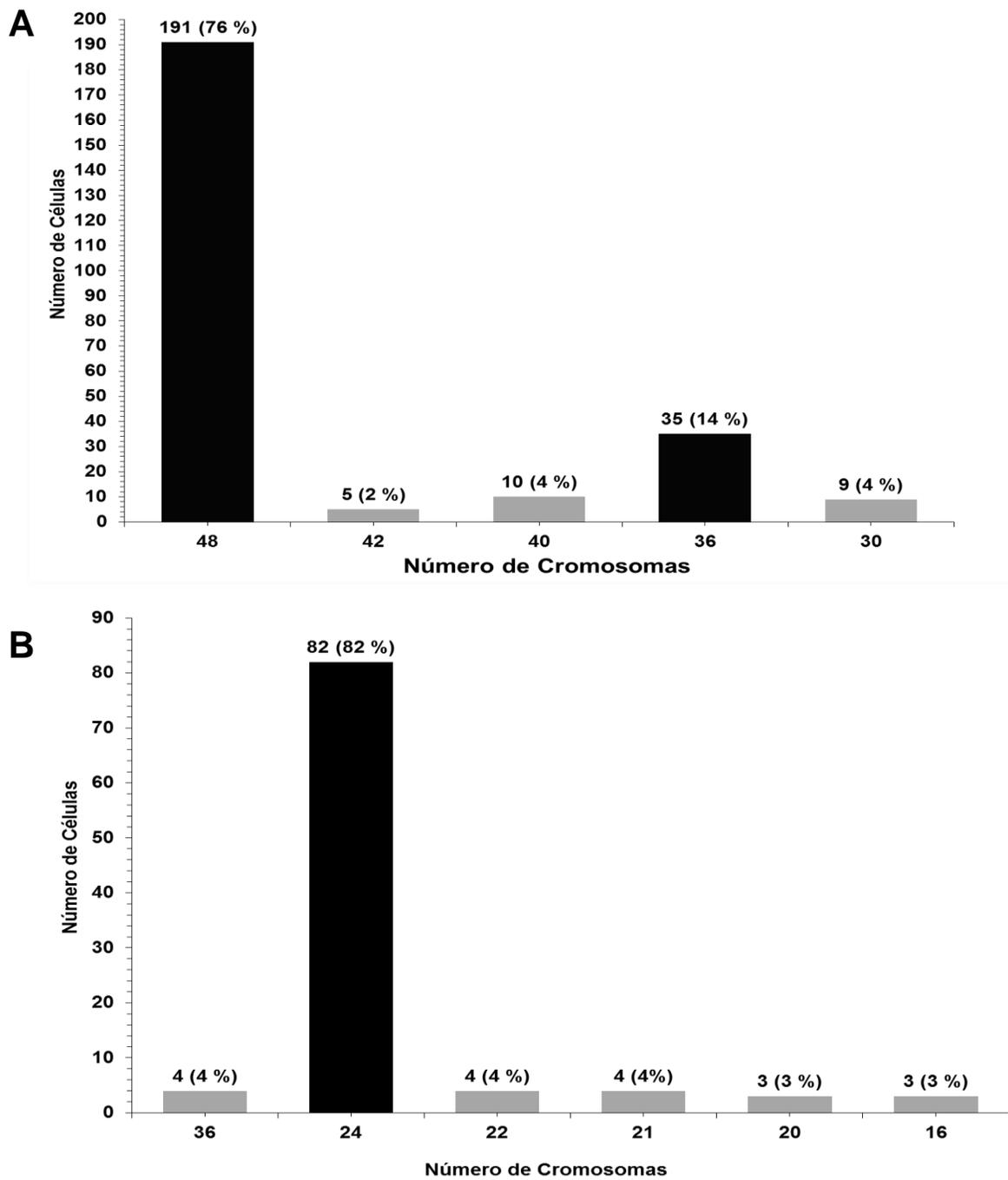


Figura 5.- Frecuencia global de los números cromosómicos en mitosis y meiosis observados en el *P. punctatus*, con número bimodal en mitosis $2n = 48$, $2n = 36$ (A) y número unimodal en meiosis con $1n = 24$ elementos cromosómicos (B).

El cariotipo típico del *P. punctatus* en mitosis está constituido por 48 cromosomas, de los cuales el primer par cromosómico mostró un promedio de $2.80 \pm 0.03 \mu\text{m}$, con respecto a la longitud media del último par cromosómico de veinticuatro $1.04 \pm 0.01 \mu\text{m}$ (Tabla 2).

Los cromosomas del cariotipo en mitosis del *P. punctatus*, son cromosomas monorrámeos y birrámeos, mismos que fueron clasificados según (Levan al. et., 1964) en el tipo metacéntricos-submetacéntricos (msm) y acrocéntricos (T), (Figura 5).

En meiosis se observaron algunas profases (Figuras 7A, 7B) y se analizaron campos con particularidades propias del organismo, se encontraron metafases en meiosis I de $2n = 48$ con cromosomas bivalentes (Figuras 7C) y metafases en meiosis II con $1n = 24$ cromosomas monovalentes (Figuras 7D).

Tabla 2.- Parámetros citogenéticos típicos del cariotipo en mitosis del *P. punctatus*, caracterizado por 24 pares de cromosomas, de los cuales tres pares son birrámeos (msm) y 21 pares de cromosomas monorrámeos (T).

| Par Cromosómico | Longitud promedio en μm de $p \pm \text{D.E}$ | Longitud promedio en μm de $q \pm \text{D.E}$ | Longitud relativa promedio de $p \pm \text{D.E}$ | Longitud relativa promedio de $q \pm \text{D.E}$ | Promedio de $r=q/p$ | Promedio de $i=100p/p+q$ | Promedio de $d=r-1(10)/r+1$ | Clasificación |
|-----------------|--|--|--|--|---------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------|
| 1 | 2.54±0.17 | 2.80±0.03 | 2.58±0.17 | 2.84±0.03 | 1.10±0.06 | 47.5±1.42 | 0.49±0.28 | msm |
| 2 | 2.38±0.04 | 2.51±0.04 | 2.41±0.04 | 2.55±0.04 | 1.05±0.00 | 48.6±0.03 | 0.26±0.01 | msm |
| 3 | 2.05±0.04 | 2.45±0.03 | 2.07±0.04 | 2.49±0.03 | 1.20±0.01 | 45.4±0.14 | 0.90±0.03 | msm |
| 4 | | 2.33±0.04 | | 2.36±0.04 | | | | T |
| 5 | | 2.27±0.01 | | 2.30±0.01 | | | | T |
| 6 | | 2.23±0.02 | | 2.26±0.02 | | | | T |
| 7 | | 2.19±0.01 | | 2.22±0.01 | | | | T |
| 8 | | 2.15±0.04 | | 2.18±0.04 | | | | T |
| 9 | | 2.10±0.03 | | 2.13±0.03 | | | | T |
| 10 | | 1.97±0.06 | | 2.00±0.06 | | | | T |
| 11 | | 1.90±0.01 | | 1.93±0.01 | | | | T |
| 12 | | 1.84±0.04 | | 1.86±0.04 | | | | T |
| 13 | | 1.80±0.00 | | 1.83±0.00 | | | | T |
| 14 | | 1.69±0.05 | | 1.71±0.05 | | | | T |
| 15 | | 1.54±0.05 | | 1.56±0.05 | | | | T |
| 16 | | 1.43±0.04 | | 1.45±0.04 | | | | T |
| 17 | | 1.33±0.00 | | 1.35±0.00 | | | | T |
| 18 | | 1.30±0.03 | | 1.32±0.03 | | | | T |
| 19 | | 1.17±0.02 | | 1.18±0.02 | | | | T |
| 20 | | 1.09±0.00 | | 1.11±0.00 | | | | T |
| 21 | | 1.09±0.01 | | 1.10±0.01 | | | | T |
| 22 | | 1.08±0.00 | | 1.10±0.01 | | | | T |
| 23 | | 1.07±0.01 | | 1.08±0.01 | | | | T |
| 24 | | 1.04±0.01 | | 1.05±0.01 | | | | T |

D.E=Desviación estándar, p=Brazo corto, q=Brazo largo, r=Proporción de brazos, i=Índice centromérico, d=Diferencia entre brazos, msm= Metacéntrico sub-metacéntrico, T=Telocéntrico.

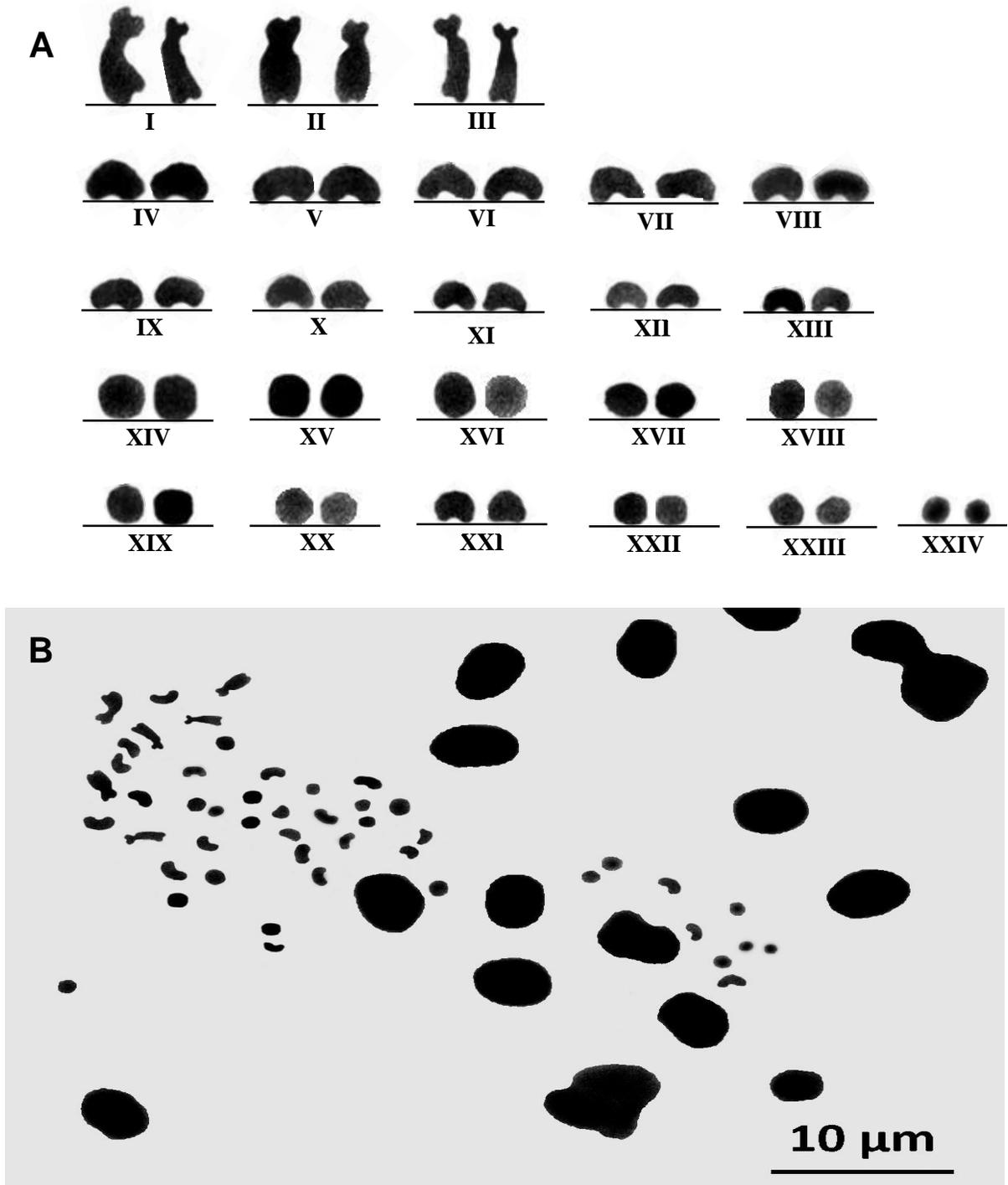


Figura 6.- Cariotipo típico en mitosis del *P. punctatus*, caracterizado por $2n = 48$ cromosomas de tipo birrámeos subtelocéntrico-telocéntricos (par I-III), monorrámeos telocéntricos (par IV-XIII), monorrámeos acrocéntricos (par XIV-XXIV) (A) y célula branquial en metafase (B). Foto tomada a 40X con ayuda de un microscopio óptico Axio Scope. A1 (Carl Zeiss®).

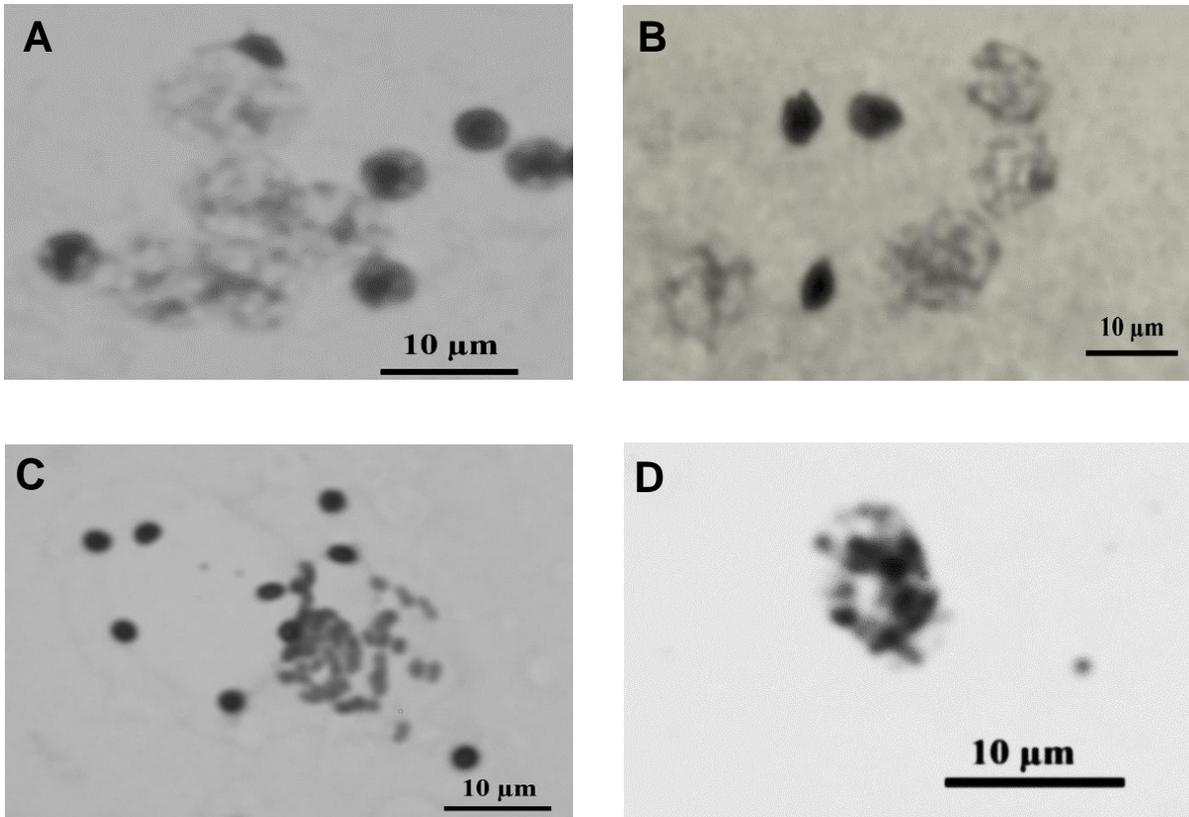


Figura 7.- Panorama de las células meioticas en profase del *P. punctatus* (A, B), metafase en meiosis I con $2n = 48$ cromosomas bivalentes (C) y metafase en meiosis II con $1n = 24$ cromosomas monovalentes (D). Foto tomada a 40X con ayuda de un microscopio óptico Axio Scope. A1 (Carl Zeiss®), equipado con una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss) y en conjunto con el programa SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011).

Se analizaron 20 frotis sanguíneos provenientes de 10 especímenes de los cuales se fotografiaron y se midieron 500 células leucocitas para determinar el tamaño total del genoma: determinando el contenido de ADN y el contenido total de nucleótidos, tomando como estándar el valor C de 5.5 picogramos, tamaño del área de las células de *O. mykiss* (Figura 8A), de esta manera se obtuvieron tres diferentes medidas de las áreas de las células (Figura 9A, 9B), esto determino que 7 de los 10 especímenes presentan poliploidia (Tabla 3).

Se midieron 228 células con presencia de núcleos relativamente chicos que representan el 46% del total de las células medidas. Con promedio total del área igual a $9.85 \pm 0.68 \mu\text{m}^2$ con un contenido total de ADN de 2.48 (Pg) y 24.6 (bp) el tamaño del genoma.

254 Células presentan núcleos de tamaño normal representan el 51% mismo que cuenta con un promedio total de $11.8 \pm 0.59 \mu\text{m}^2$ con un contenido de ADN total de 2.98 (Pg) y 29.1 (bp), el tamaño del genoma y el 13% pertenecen a las células tetraploides con promedio de los núcleos grandes equivalentes $21.2 \pm 1.74 \mu\text{m}^2$ con un contenido de ADN total de 5.33 (Pg) y el tamaño del genoma en (bp) es de 35.9 (Tabla 3).

Las células chicas presentan núcleos con un área de $10.582 \mu\text{m}^2$, se consideran $1.5n = 36$ cromosomas las células medianas presentan núcleos con medidas de $13.920 \mu\text{m}^2$ consideradas como $2n = 48$ cromosomas y las células tetraploides de $4n = 96$ cromosomas con núcleo relativamente grande con área de $20.717 \mu\text{m}^2$ (Figura 9B).

A

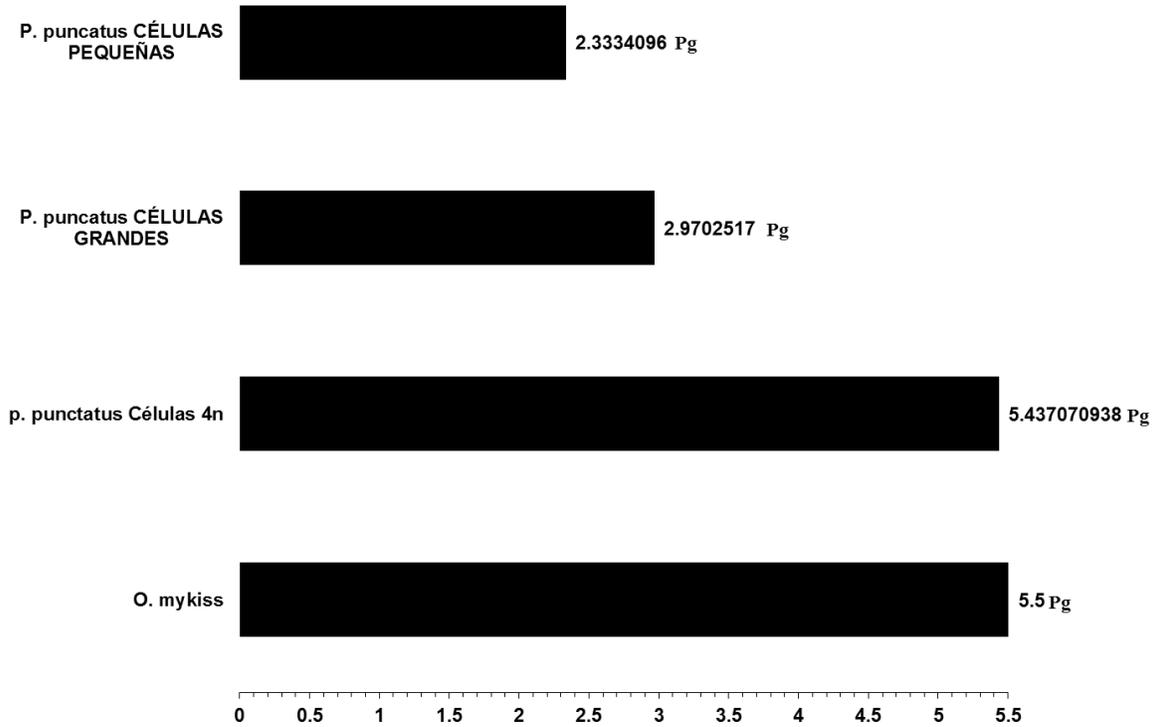


Figura 8.- Representan las medidas de las diferentes células encontradas en el *P. punctatus*, células pequeñas, grandes y 4n, comparadas con el valor estándar 5.5 de la trucha arcoíris (*O. mykiss*). (A).

Tabla 3.- Medidas en μm del área de los núcleos de los eritrocitos del *P. punctatus* que representan células con nivel de ploidía.

| Número de espécimen | Número de Células (%) | Área promedio en μm del núcleo ($\pm\text{D.E}$) | Contenido de ADN en (Pg) | Tamaño del genoma en bp | Nivel de ploidía |
|---------------------|-----------------------|---|--------------------------|-------------------------|------------------|
| 1 | 11 (22) | 10.5 \pm 0.33 | 2.65 | 2.58 | 1.5n |
| | 35 (70) | 11.7 \pm 0.42 | 2.94 | 2.91 | 2n |
| | 4 (8) | 22.0 \pm 2.36 | 5.55 | 5.43 | 4n |
| 2 | 33 (66) | 9.75 \pm 0.54 | 2.45 | 2.40 | 1.5n |
| | 12 (24) | 11.3 \pm 0.21 | 2.84 | 2.84 | 2n |
| | 5 (10) | 21.6 \pm 1.73 | 5.44 | 5.32 | 4n |
| 3 | 39 (78) | 9.77 \pm 0.71 | 2.46 | 2.40 | 1.5n |
| | 8 (16) | 11.6 \pm 0.50 | 2.91 | 2.93 | 2n |
| | 3 (6) | 21.4 \pm 1.64 | 5.40 | 5.28 | 4n |
| 4 | 15 (30) | 10.3 \pm 0.69 | 2.59 | 2.53 | 1.5n |
| | 33 (66) | 12.1 \pm 0.59 | 3.04 | 2.99 | 2n |
| | 2 (4) | 19.5 \pm 0.41 | 4.90 | 4.79 | 4n |
| 5 | 18 (36) | 9.49 \pm 0.58 | 2.39 | 2.33 | 1.5n |
| | 31 (62) | 12.3 \pm 0.63 | 3.09 | 3.03 | 2n |
| | 1 (2) | 21.5 \pm 0.00 | 5.42 | 5.30 | 4n |
| 6 | 22 (44) | 10.0 \pm 0.54 | 2.52 | 2.46 | 1.5n |
| | 28 (56) | 11.9 \pm 0.63 | 3.00 | 2.93 | 2n |
| 7 | 39 (78) | 9.27 \pm 0.43 | 2.33 | 2.28 | 1.5n |
| | 9 (18) | 11.9 \pm 0.47 | 2.99 | 2.97 | 2n |
| | 2 (4) | 20.2 \pm 1.31 | 5.08 | 4.97 | 4n |
| 8 | 7 (14) | 10.4 \pm 0.56 | 2.62 | 2.56 | 1.5n |
| | 42 (84) | 11.7 \pm 0.30 | 2.94 | 2.88 | 2n |
| | 1 (2) | 19.4 \pm 0.00 | 4.89 | 4.78 | 4n |
| 9 | 19 (38) | 10.1 \pm 0.70 | 2.55 | 2.49 | 1.5n |
| | 31 (62) | 12.0 \pm 0.68 | 3.02 | 2.95 | 2n |
| 10 | 25 (50) | 10.2 \pm 0.62 | 2.57 | 2.51 | 1.5n |
| | 25 (50) | 11.7 \pm 0.72 | 2.94 | 2.87 | 2n |
| Total | 228 (46) | 9.85 \pm 0.68 | 2.48 | 24.6 | 1.5n |
| | 254 (51) | 11.8 \pm 0.59 | 2.98 | 29.1 | 2n |
| | 18 (3) | 21.2 \pm 1.74 | 5.33 | 35.9 | 4n |

%=Porcentaje, μm =Micrómetros, D.E=Desviación estándar, Pg=Picogramos, bp=pares de bases.

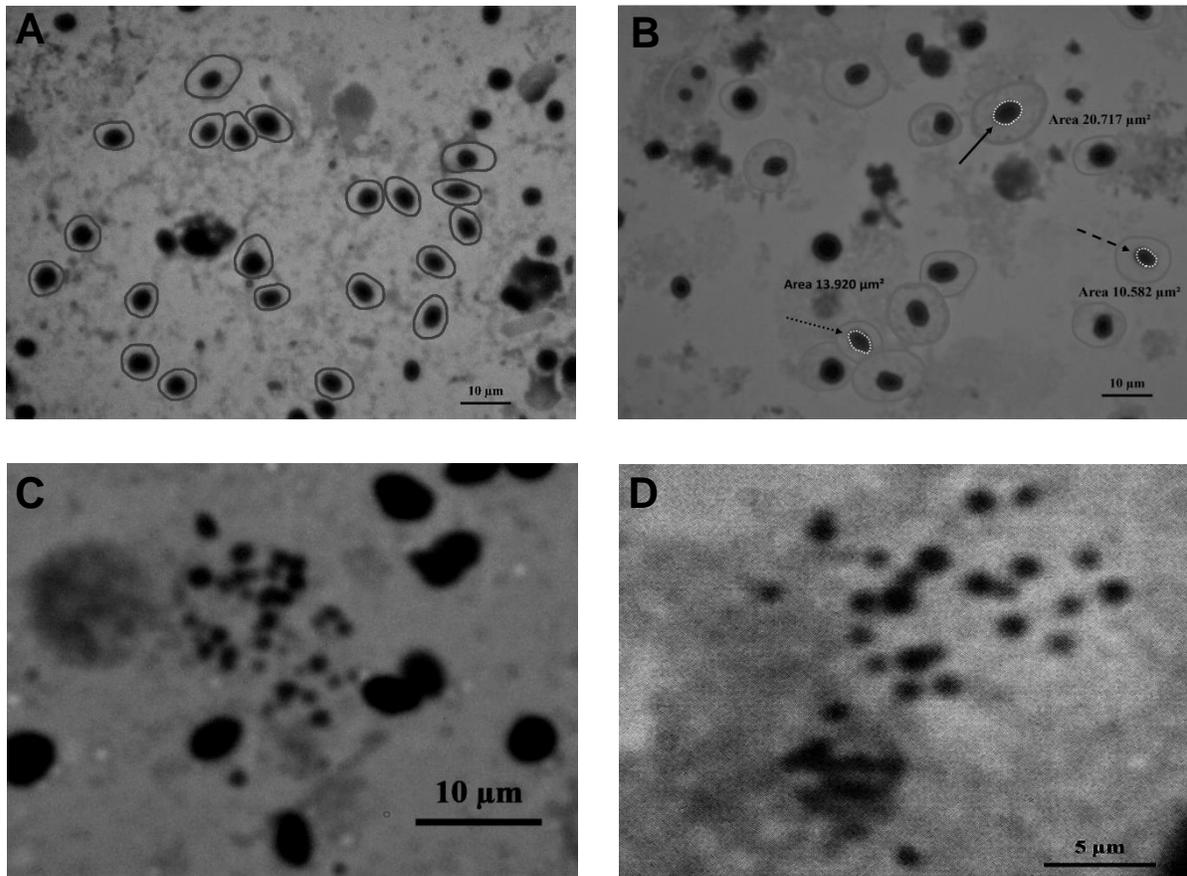


Figura 9.- Paisaje de las células hematológicas del *P. punctatus*, donde es posible observar células con núcleos pequeños ($1.5n$ —▶), mediano ($2n$, normales▶) y grandes ($4n$, —▶), (A, B), panorama de campos mitóticos con número cromosómico $2n=36$ (C), $2n=48$ (D). Foto tomada a 40X, 100X, con ayuda de un microscopio óptico Axio Scope. A1 (Carl Zeiss®), equipado con una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss) y en conjunto con el programa SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011).

VIII. DISCUSIÓN

El cariotipo para el *P. punctatus* en mitosis está formado por 48 cromosomas, tres pares de cromosomas (birrámeos) metacéntricos-submetacéntricos y 21 par de cromosomas (monorrámeos) telocéntricos. Comparando los resultados encontrados, con los obtenidos en (2008) por Arias-Rodríguez, dada la apariencia se observó que el número de cromosomas de ambas especies son idénticos, presentando el mismo número y clasificación de los tipos de cromosomas.

Estudios anteriores reportan que los cariotipos de este grupo son de características citotaxonómicas, ya que la mayoría de los peces pertenecientes a la familia ciprinodontidae cuentan con $2n = 48$ cromosomas (Chen y Ruddle, 1970; Chen, 1971) como es el caso para la especie en estudio.

El número cromosómico haploide para la especie *P. punctatus* es de $1n=24$ cromosomas, aunque se encontraron células en meiosis I de $2n = 48$ con cromosomas bivalentes y metafases en meiosis II con $1n = 24$ cromosomas monovalentes, características propias del organismo, aunque es poco probable encontrar estos estadios en meiosis, ninguno reportado anteriormente para esta especie. En este caso la presencia de estos estadios fue relacionado al minucioso análisis, los resultados obtenidos coinciden con los reportados por (Chen y Ruddle, 1970; Chen, 1971), el cual realizó un estudio cromosómico en especies del género killifish *Fundulus* pertenecientes al orden cyprinodontidae. Sin embargo, no podemos decir que pertenecen al mismo clan, ya que estudios morfométricos y osteológicos detallados realizados anteriormente, colocan ambas especies en subgéneros diferentes pertenecientes a la misma familia (Günther, 1866 y Hubbs, 1924).

Los análisis efectuados en los frotis sanguíneos para determinar el área total del núcleo de las células del *P. punctatus*, en el cual 500 células fueron medidas, mismas que se separaron en células chicas, células grandes y células tetraploides.

Las células medidas con presencia de núcleos relativamente chicos representando el 46% del total de las células medidas. En este, el promedio total del área es de 9.85 ± 0.68 con un contenido de ADN total de 2.48 (Pg) y el tamaño del genoma 24.6 (bp). El 51% pertenecieron a células de tamaño normal, mismo que cuenta con un promedio total de 11.8 ± 0.59 con un contenido de ADN total de 2.98 (Pg) y el tamaño del genoma 29.1 (bp) y el 13% pertenecen a las células tetraploides con núcleos grandes con un promedio igual a 21.2 ± 1.74 , con un contenido de ADN total de 5.33 (Pg) siendo el tamaño del genoma de 29.1 (bp).

En este caso, los organismos fueron silvestres y la presencia de ploidía en estos organismos, es considerada una anomalía presente en las células de los peces de este grupo. Los estudios minuciosos realizados mostraron algunos organismos con células tetraploides de gran tamaño, presentándose en baja proporción en algunos ejemplares. En este caso Gil (2012), realizó un trabajo donde determina que la calidad del agua es factor influyente en alteraciones anormales en un organismo, reportando que los niveles altos de DDT, heptacloro y Atrazina pueden producir efectos adversos en los organismos acuáticos.

Caso similar es el reportado para el Río Sabinal donde fueron extraídos los organismos para este estudio, ya que el agua presenta al alto nivel de contaminación debido a las descargas de drenajes, plagas, incendios y deforestación debido al crecimiento demográfico (SEMAHN, 2013).

Sabemos que la poliploidía es un suceso anormal en peces, por naturaleza, su presencia se da en plantas y algas, a excepción de algunos organismos que son expuestos a factores alterantes que deterioran o modifican su estructura celular.

Por otro lado, la ploidía también es considerada una estrategia factible en la acuicultura, ya que en algunas especies presentan casos estériles. Debido a dicha característica, la triploidía ha sido útil en algunas especies para el control de sobrepoblación de los estanques, en adición también se pueden emplear para controlar el crecimiento de plantas acuáticas, principalmente mediante el uso de carpas triploides (Alcantar, 2010). También se ha observado que los triploides tienen

mejor supervivencia, ya que en muchas ocasiones se observan mortalidades relacionadas con la maduración gonádica en individuos diploides, como en el caso de la trucha común (*Salmo trutta*) y el turbot (*Scophthalmus maximus*) (Benfey, 1999; FAO, 2005; Cal et al., 2005).

Se utilizó una técnica de medición y determinación de los núcleos de las células eritrocitas distinta a la que mencionan Pierrez y Ronot (1991) en su trabajo., en el cual ellos; mediante citometría de flujo pudieron determinar triploidía en la especie estudiada, mientras que este estudio se realizó mediante microfotografías y llevando acabo las mediciones manualmente empleada con herramientas del programa Sen/2011. De esta manera también se calculó el contenido de ADN y nucleótidos totales.

Las técnicas reportadas para el análisis y determinación de ADN total en una especie encontramos que Härtel en el (2005), Identifico di- y triploidización mediante un análisis multiparamétrico de imágenes. Nuevo método de cuantificación de la tasa de triploidización en trucha arcoíris (*O. mykiss*).

Debido a que no se encuentran trabajos realizados en este grupo podemos decir que este es el primero de esta especie. Sin embargo, comparando el análisis realizado con los antes mencionados la mayoría de estudios, toman como referencia y medida estándar el 5.5 pg de las células de la trucha arcoíris (*O. mykiss*).

IX. CONCLUSIÓN

- El *P. punctatus*, es una especie dentro del ecosistema que juega un papel muy importante como toda especie. En los últimos años, estos organismos se ha visto afectados debido a contaminación de cuerpos de agua a causa de descargas de aguas residuales y al crecimiento demográfico mismos. Esto ha puesto a la especie en un índice de peligro de extinción.
- El cariotipo típico del *P. punctatus*, en mitosis quedo integrado de $2n = 48$ cromosomas, mismos que fueron clasificados en tres pares de cromosomas birrámeos del tipo Subtelocéntricos-telocéntricos y 21 par de cromosomas monorrámeos del tipo acrocéntricos.
- En meiosis, solo se constituyó el numero modal cromosómico quedando con $1n = 24$ cromosomas.
- El contenido de ADN mostrado en el popoyote (*P. punctatus*) se establece y se documenta una tendencia variable debido a la presencia de tres tamaños de células diferentes:
 - $1.5n$ células pequeñas igual a $9.85 \mu\text{m}$, con contenido de ADN de 2.48 pg y 24.6 pb el tamaño del genoma,
 - $2n$ (medianas) con un área de $11.8 \mu\text{m}$ las células, con contenido de ADN de 2.98 pg y tamaño del genoma de 29.1 bp
 - $4n$ (células grandes) tetraploides es de $21.2 \mu\text{m}$ con un contenido de ADN equivalente a 5.33 pg , y su tamaño del genoma de 35.9 bp .

X. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Jorgensen A. O., L. Subrahmanyam, C. Turnbull, & V. I. Kalnins. (1976). Localization of the neurofilament protein in neuroblastoma cells by immunofluorescent staining. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 73, No. 9, pp.3192-3196. Cell Biology.
- Alcantar Vázquez J. P. (2010). Evaluación de los efectos de la triploidía en las diferentes etapas del desarrollo de la cabrilla Arenera. Tesis de doctorado. Centro interdisciplinario de ciencias marinas, Instituto politécnico nacional. La paz, Baja california, México.
- Gonzalez A. A., Edmundo Díaz, Pardo., Miriam Soria, Barreto & Emilio Martínez, Ramírez (2014). Diferencias osteológicas entre los subgéneros *Profundulus* y *tlaoloc* (teleostei: Profundulidae). Versión on – line. ISSN 0717-9502.
- Álvarez, J & J. Carranza. (1951). Descripción de un género y especie nueva de peces ciprinodontidos procedentes de Chiapas, (México). Ciencia 11: 40-42.
- Andrew D. Kligerman and, Stephen E. Bloom (1964). Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34 (2): 266-269.
- Arias (2005) Caracterización citogenética del pez tropical de agua dulce *Parachromis managuensis* (Pisces: Cichlidae). División Académica de Ciencias Biológicas.
- Arias (2008) Cariotipo del Pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) y variación cromosómica en sus larvas y adultos. División Académica de Ciencias Biológica.

- Arias Rodríguez, (2005). Los cromosomas mitóticos y meióticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae). División Académica de Ciencias Biológicas.
- Arias-Rodríguez, L., S. Páramo-Delgadillo & A.L. Durán- González. (2006). Caracterización citogenética del pez tropical de agua dulce *Parachromis managuensis* (Pisces: Cichlidae). Rev. Biol. Trop. 54: 35-42.
- Arias-Rodríguez, L: Ibarra-Castro, L. y Páramo-Delgadillo, S. (2008). Los cromosomas mitóticos y meióticos de la mojarra *Petenia splendida* (Pisces: Cichlidae). Revista de Biología Tropical (Int. J. Trop. Biol.) 52:1-16.
- Benfey T. (1999). The physiology and behavior of triploid fishes. Reviews in Fisheries science 7(1):39-67. New Brunswick, Canadá.
- C. U. Grozeva (2010). Genome-wide association study of CNVs in 16,000 Cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. Nature, 464 (7289), 713-720.
- Cal, R. M., S. Vidal, C. Gómez, B. Álvarez-Blázquez, P. Martínez & F. Piferrer. (2005). Growth and gonadal development in diploid turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 251: 99-108.
- Carvalho, L. & Neves, J. (1998). Toxic Shock síndrome in a neonate? Acta paediatr. 87: 699-701. Portugal.
- Chen, A. H. Y. (1970). A model of warrant pricing in a dynamic market. The Journal of Finance, 25 (5), 1041-1059.
- Chen, T.R. & A.W. Ebeling. (1971). Chromosomes of the goby fishes in the genus *Gillichthus*. Copeia.1: 171-174.

- Chrisma, D. A. & buras, E. M. (1983). The dynamic mechanical properties of human skin in vivo. *Journal of biomechanics*, 16 (6): 365-372.
- Craig A. Cooney, Apurva A. Dave, George L. Wolff (2002). Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *The Journal of nutrition*, Vol. 132, Issue 8, pag. 2395-2400s.
- Darcy B. Wilson (1965). Quantitative studies on the behavior of sensitized lymphocytes in vitro. *Journal of experimental medicine*, 122 (1), 167-1772.
- Denton, T E. (1973). *Fish chromosome methodology*. Thomas. United States of America. 22, 35, 38 pp.
- Doležel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*, 51: 127-128.
- Eschmeyer, W. N., C. J. ferraris, Jr. M. Hoang y D. J. Long (1998). Species of fishes, Vols. 1 and 2, in W. N. eschmeyer (ed.) *Catalogo of fishes*, vol. 1-3 california Academy of science, San Francisco.
- F. Kong, G. Fao (2005). Hypothesis on cyanobacteria Bloom-forming mechanism in large shallow eutrophic lakes. *Institutes of geography and limnology, chinese academy of Sciences, Nanjing 210008, china*.
- Fowler, H. W. (1936). Zoological results of the George vanderbilt african expedition of 1934. Part 3. The freshwater fishes. *P. acad. Nat. Sci. Philand.*, 88, 243-335.
- Günther A. (1866). *Catalogue of the fishes in the collections of the british museum* 6: i- xv, 1-368, ilustr.

- Günther, A. (1867). On the fishes of the states of Central America, founded upon specimens collected in fresh and marine waters of various parts of that 75 country by Messrs. Salvin, Godman and Capt. J.M. Dow., Proc. Zool. Soc. Lond. 1866(3): 600-604.

- Hardie, D.C. and P.D.N Hebert (2004). Genome-size evolution in fishes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 61:1636-1646.

- Härtel, S. (2005). Identificación de di y triploidización por análisis multiparamétrico de imágenes: Un nuevo método para la cuantificación de la tasa de triploidización en la trucha arcoíris, (*O. mykiss*). Arturo Prat. 514, Valdivia, Chile.

- Hartley, S.E. and M.T. Horne. (1985). Cytogenetic techniques in fish genetics. J. Fish Biol., 26:575-582.

- Hoedeman, J. J. y Bronner, F. J. (1951). De orde van de tandkarpertjes. VI. Cyprinodontiformes Berg. 1940. Het aquarium, 1, 1-3.

- Hubbs, C. L. (1924). A studies of the fishes of the order cyprinodontes. I-IV. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan 13: 1-31, 4 lams.

- J. Doležal (2003). Analysis and surting of rye (*secale cereale* L.) chromosomes using flow cytometry. Genome 46 (5): 893-905.

- J. Doležal, J. Greilhuber, S. Lucretti, A. Meister, M. A. Lysak, L. Nardi, R. Obermayer. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. Annals of botany, Vol. 82. Issue Suppl-1,1. Pag. 17-26.

- J. Doležel, M. Doleželová, F. J. Novák (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia plantarum*, 36 (3), 351-357.
- J.S. Nelson. *Fishes of the World*, 4th Edition. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, (2006). XIV + 601 p. ISBN 0-471-25031-7.
- Jara. P. (2008). Contenido de ADN nuclear en *Galaxias maculatus* (Teleostei: Osmeriformes; Galaxiidae). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 36 (1): 87-91.
- Jaroslav Doležel, Sergio Sgorbati, Sergio Lucretti (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia plantarum*, 85 (4), 625-631.
- Jonathan Helfman (2009). System and method for clipping, repurposing, and augmenting document content US 7, 519, 573 B2.
- Jose A. Jamangape O. (2016). Validity and redescription of *Profundulus balsamus* (Ahl, 1963) (Cyprinodontiformes: Profundulidae). *Zootaxa* 4173 (1):055–065.
- José Pierrez, Xavier Ronot (1991). Use of diploid and triploid trout erythrocytes as internal standards in flow cytometry. *Cytometry*, 12 (3), 275-278.
- K. Varadaraj. T.J Paradian (1990). Production of allfemale sterile-triploid *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* vol. 84, Issue 2. Pages. 117-123.
- Klebe, R. J. Chen, T. Ruddle, F. H. (1970). Controlled production of proliferating somatic cell hybrids. *Cell*, 45: (1): 74-82.

- Kyle E. Cordova, Cury Valente (2012). Large-pore apertura in a series of metal-organism frameworks. *Science*. Vol. 336, Issue 6084, pp.1018-1023.
- Levan. A., K. F. and A.A.S. (1964). Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. Institute of Genetics Lund, Sweden, and Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, N. Y., U.S.A.
- Lloyd G. Williams (2002). A method for the performance assessment of software architectures. Rome Italy – Wosp '02. López (2008) Caracterización citogenética del pez neotropical *Brycon henni* (Pisces: Characidae). Universidad de Antioquia.
- Meek, S. E. (1902). A contribution to the ichthyology of México. *Field columbian Mus. Publ.* 65, zool. Ser. 3 (6): 63-128, láms. 14-31.
- Miller, R. R. (1950). *Profundulus hildebrandi*, a new Cyprinodontid fish from Chiapas, México. *Copeia* 1950 (1): 22-30.
- Miller, R. R. (1955). A systematic review of the middle american fishes of the museum of zoology, university of michigan 92: 1-64.
- Miller, R. R. Minckley W. L. and Norris, S. M. (2005). Freshwater fishes of México. University of Chicago press, Chicago and London.490 p.
- Molina (2008) Determinación de los cromosomas del pejelagarto, *Atractosteus tropicus* GILL, 1863. Semana de Divulgación y Video Científico.
- Molina, B. 1982. Reproducción inducida de la Sabaleta. Seminario presentado como requisito parcial para optar al título de Zootecnista, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

- Muñoz (2006) Cytogenetic characterization of the silverside fish *Odontesthes regia* (Humboldt, 1833) (Teleostei: Atheriniformes: Atherinopsidae) from Iquique, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Pag 41(1): 57

- Pedro R. Gil-Monte (2002). Psychosocial risks at work and occupational health. *Rev. Sci Elo*. 21; 46010 valencia, España.

- Prakash Loungani, Mark Rush, William Tave (1990). Stock market dispersión and unemployment. *Journal of monetary economics* Vol. 25, Issue 3, Pages 367-388.

- Ron Galant & Sean B. Carroll (2002). Evolution of a transcriptional repression domain in an insect hox protein. *Nature* 415, 910-913.

- Savage, J. R. K. (1995). Frecuencias of complex chromosome Exchange aberiations induced by 238 Pu- α particles and detected by flourecence in situ hybridizacion using single chromosome-Specific probes. *International Journal of radiation biology*, 67 (4), 431-439.

- Scacchetti (2011). Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus Linnaeus*, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. Department of morphologic.

- SEMAHN (2013). El Rio Sabinal.
http://www.semahn.chiapas.gob.mx/portal/educacion_ambiental/rio_sabinal.
 Consultado el 3 de octubre del 2018.

- T.R. Chen. (1970) A Comparative Chromosome Study of Twenty Killifish Species of the Genus *Fundulus* (Teleostei: Cyprinodontidae). (*Berl.*) 32, 436-453).

- Terence G. Langdon (1982). Deformation at high temperatures. Pages. 1105-1120.

- Tiersch, T.R., Chandler, R. W., Wachel, S. S., and Elias, S. (1989). Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry*, 10: 706-710.

- Uyeno. T. (1971). Multiple Sex Chromosomes in a Mexican Cyprinodontid Fish. Ann Arbor, Michigan 48104. *Nature* Vol. 231.

- William. M. C. (2006). octava edición. conceptos de genética. p.23