

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis cariotípico de cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica*
(Anura: Dendrobatidae)

Disertación previa a la obtención del Título de
Licenciado en Ciencias Biológicas

CARLOS ANDRÉS VELÁZQUEZ ZAMBRANO

Quito, 2012

Certifico que la tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Carlos Andrés Velázquez Zambrano ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Miryan Rivera I.

Directora de la Disertación

Quito, a 5 de diciembre del 2012

A mis Padres,

A mis hermanos y mi sobrina

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Miryan Rivera por el apoyo y la confianza depositada durante el desarrollo de esta investigación. A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y al SENESCYT por el apoyo financiero que permitió la ejecución del presente trabajo.

Un agradecimiento especial a quienes conformaron y conforman el Laboratorio de Citogenética de Anfibios de la PUCE, en especial a Ailín Blasco por su ayuda y guía brindadas durante el tiempo que realicé este estudio.

Al Museo de Zoología (QCAZ), principalmente a Luis A. Coloma e Ítalo Tapia.

Al Ing. Julio Sánchez, Diego Torres, Hugo Mogollón, y a todas las personas que estuvieron involucrados en este estudio, principalmente a Paola Santacruz por su tiempo y ayuda al contribuir con sus conocimientos y principalmente por su amistad leal e incondicional.

A Gaby, por haber estado junto a mí en momentos importantes de mi vida, gracias por todos esos años de apoyo.

A Diego, Renato, Juan Carlos, Michael, Jean Pierre, Monse, Fernando y Mirty, amigos que estuvieron junto a mí, los cuales me alentaron y ayudaron de una u otra manera.

A mis Padres y Hermanos, por todo el apoyo durante mi carrera, y durante el transcurso de nuestras vidas.

TABLA DE CONTENIDOS

| | | |
|--|--|------|
| LISTA DE FIGURAS. | | x |
| LISTA DE TABLAS. | | xii |
| LISTA DE ANEXOS. | | xiii |
| 1 RESUMEN. | | 1 |
| 2 ABSTRACT. | | 2 |
| 3 INTRODUCCIÓN. | | 3 |
| 3.1 OBJETIVOS. | | 8 |
| 3.1.1 Objetivo General | | 8 |
| 3.1.2 Objetivos Específicos. | | 8 |
| 4 MATERIALES Y MÉTODOS. | | 9 |
| 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO. | | 9 |
| 4.1.1 <i>Oophaga sylvatica</i> . Población 1 | | 9 |
| 4.1.2 <i>Oophaga sylvatica</i> . Población 2 | | 10 |
| 4.1.3 <i>Oophaga sylvatica</i> . Población 3 | | 10 |
| 4.1.4 <i>Oophaga sylvatica</i> . Población 4 | | 10 |
| 4.2 PREPARACIONES CROMOSÓMICAS. | | 10 |
| 4.2.1 Procesamiento de las muestras. | | 10 |
| 4.2.2 Bando cromosómico. | | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.3 Montaje de cariotipos..... | 14 |
| 4.2.4 Análisis de datos. | 16 |
| 5 RESULTADOS..... | 19 |
| 5.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE <i>Oophaga sylvatica</i>..... | 19 |
| 5.1.1 Determinación del número y morfología de los cromosomas mitóticos de <i>Oophaga sylvatica</i> , Población 1 (Laguna de Cube). | 19 |
| 5.1.2 Determinación del número y morfología de los cromosomas mitóticos de <i>Oophaga sylvatica</i> , Población 2 (Quingüe)..... | 20 |
| 5.1.3 Determinación del número y morfología de los cromosomas mitóticos de <i>Oophaga sylvatica</i> , Población 3 (Guadual de Lita)..... | 20 |
| 5.1.4 Determinación del número y morfología de los cromosomas mitóticos de <i>Oophaga sylvatica</i> , Población 4 (Durango). | 21 |
| 5.2 BANDEO CROMOSÓMICO..... | 21 |
| 5.2.1 Bando C (heterocromatina constitutiva). | 21 |
| 5.2.2 Bando NOR (región del organizador nucleolar). | 23 |
| 5.3 ANALISIS ESTADÍSTICO..... | 24 |
| 6 DISCUSIÓN..... | 25 |
| 6.1 NÚMERO CROMOSÓMICO. | 26 |
| 6.2 MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA Y LONGITUD RELATIVA PROMEDIO..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 6.3 BANDEO C. | 30 |
| 6.4 UBICACIÓN DEL ORGANIZADOR NUCLEOLAR (NOR) | 31 |
| 6.5 RELACIONES INTERPOBLACIONALES. | 32 |
| 7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES. | 34 |
| 8 LITERATURA CITADA. | 36 |
| 9 FIGURAS. | 43 |
| 10 TABLAS. | 55 |
| 11 ANEXOS. | 59 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Patrones de coloración de las poblaciones de *Oophaga sylvatica* analizadas: (a) Laguna de Cube; (b) Quingüe; (c) Guadual de Lita; (d) Durango. 44
- Figura 2.** Mapa de la provincia de Esmeraldas-Ecuador, mostrando la distribución de los fenotipos de las poblaciones de *Oophaga sylvatica* analizadas: a). Laguna de cube; b). Quingüe, c). Guadual de Lita; d). Durango..... 45
- Figura 3.** Cariotipos de las cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica*: a). Población 1, Laguna de Cube; b). Población 2, Quingüe; c). Población 3, Guadual de Lita; d). Población 4, Durango..... 46
- Figura 4.** Idiogramas representativos de la morfología de los cromosomas mitóticos de las cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica*: a). Población 1, Laguna de Cube; b). Población 2, Quingüe; c). Población 3, Guadual de Lita; d). Población 4, Durango. 47
- Figura 5.** Cariotipo (a) e Idiograma (b) representativos de distribución de Bandas C y localización de NOR de *Oophaga sylvatica*, Población 1, Laguna de Cube..... 48
- Figura 6.** Cariotipo (a) e Idiograma (b) representativos de distribución de Bandas C y localización de NOR de *Oophaga sylvatica*, Población 2, Quingüe..... 49
- Figura 7.** Cariotipo (a) e Idiograma (b) representativos de distribución de Bandas C y localización de NOR de *Oophaga sylvatica*, Población 3, Guadual de Lita..... 50
- Figura 8.** Cariotipo (a) e Idiograma (b) representativos de distribución de Bandas C y localización de NOR de *Oophaga sylvatica*, Población 4, Durango.. 51
- Figura 9.** Medias marginales estimadas de Longitud Relativa Promedio (LR%) de los pares cromosómicos..... 52
- Figura 10.** Medias marginales estimadas de Radio Centromérico (RC) de los pares cromosómicos.. 53

| | |
|--|----|
| Figura 11. Análisis gráfico de componentes principales, tomando en cuenta la Longitud Relativa Promedio (LR%) y el Radio Centromérico (RC). | 54 |
|--|----|

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Análisis morfométrico de los cromosomas de cuatro poblaciones de la especie <i>Oophaga sylvatica</i> (Clasificación según Green y Sessions 1991)..... | 56 |
| Tabla 2. Valores de significancia del ANOVA Factorial en DCA para la variable dependiente (RC) Radio Centromérico..... | 57 |
| Tabla 3. Valores de significancia del ANOVA Factorial en DCA para la variable dependiente (LR%) Longitud Relativa Promedio..... | 58 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Formas y Patrones de Coloración de la especie <i>Oophaga sylvatica</i> (Photobucket Corporation, 2012)..... | 60 |
| Anexo 2. Ringer de Anfibios..... | 61 |
| Anexo 3. Solución Salina Altamente Concentrada (2XSSC)..... | 61 |
| Anexo 4. Solución Giemsa..... | 61 |
| Anexo 5. Proceso de Revelado de Películas en Blanco y Negro (135 mm)..... | 62 |
| Anexo 6. a). Fórmulas para determinar la Morfología Cromosómica, b). Nomenclatura cromosómica según la posición del centrómero en cromosomas mitóticos, según Green & Sessions, 1991..... | 63 |
| Anexo 7. Datos de colección de las cuatro poblaciones de <i>Oophaga sylvatica</i> analizadas. | 64 |
| Anexo 8. Lista de especies de Dendrobátidos para las que se ha establecido Número Cromosómico (2n) (Reinoso-Recalde, 2008).. | 66 |

1 RESUMEN

El género *Oophaga* (Anura: Dendrobatidae) se distribuye desde Nicaragua hasta las zonas andinas de Colombia y Ecuador. La coloración aposemática típica en este género, es muy llamativa y advierte a los posibles depredadores del potente veneno neurotóxico en la piel. *Oophaga sylvatica* es una especie con una amplia variedad de patrones de coloración en su piel a lo largo de su rango de distribución, aspecto que motivó la realización del presente trabajo. Éste tuvo como objetivo central, la descripción cariotípica de cuatro poblaciones de *O. sylvatica* que habitan en las llanuras de la provincia de Esmeraldas en Ecuador, para determinar si esta diversidad de morfotipos responden o no, a rearrreglos cromosómicos. En él se detallan: el número, morfología y longitud relativa promedio de los cromosomas mitóticos, así como el patrón de bandas C y la posición del organizador nucleolar NOR. Se estableció que el número cromosómico para las cuatro poblaciones de *O. sylvatica* es de $2n = 20$. De acuerdo a la longitud relativa promedio, los cariotipos de estas especies tienen dos grupos de cromosomas claramente diferenciados: cromosomas grandes (seis pares cromosómicos), y cromosomas pequeños (cuatro pares cromosómicos). En cuanto a la morfología cromosómica de las cuatro poblaciones de *O. sylvatica*, se pudieron distinguir 5 pares metacéntricos (M) (pares 1, 2, 7, 8 y 10), 3 submetacéntricos (SM) (pares 3, 5 y 6) y 2 pares subtelocéntricos (ST) (pares 4 y 9). Las cuatro poblaciones de esta especie, presentan la región NOR en el par cromosómico 4 (ST). Así mismo, éstas cuatro poblaciones presentaron zonas de heterocromatina constitutiva en los centrómeros de todos los pares cromosómicos, y además bandas C intercalares, en los brazos largos del par cromosómico 2 (SM). Los resultados indican, que no existen diferencias cromosómicas entre los individuos de estas cuatro poblaciones, lo que nos hace pensar que los patrones de coloración disímiles, se deben posiblemente a eventos epigenéticos, como respuesta al ambiente en el que vive cada una de las poblaciones de *Oophaga sylvatica* analizadas.

2 ABSTRACT

The genus *Oophaga* (Anura: Dendrobatidae) is distributed from Nicaragua to the Andean region of Colombia and Ecuador. The typical aposematic coloration in this genus is very striking and warns potential predators of potent neurotoxic venom into the skin. *Oophaga sylvatica* has a wide variety of color patterns on their skin, that motivated the present work. It had as its central objective, the karyotypic description of four populations of *O. sylvatica* inhabiting the plains of the Esmeraldas province in Ecuador, to determine whether this diversity of morphotypes responds or not, to chromosomal rearrangements. It details: the number, morphology and average relative length of mitotic chromosomes and the banding C pattern and the NOR nucleolar organizer position. It was established that the chromosome number of the four populations of *O. sylvatica* is $2n = 20$. According to the average relative length, the karyotypes of these species have two distinct sets of chromosomes: large chromosomes (six chromosome pairs) and small chromosomes (four chromosome pairs). The chromosome morphology of the four populations of *O. sylvatica* showed that: 5 pairs could be distinguished as metacentric (M) (pairs 1, 2, 7, 8 and 10), 3 as submetacentric (SM) (pairs 3, 5 and 6) and 2 pairs as subtelocentric (ST) (pairs 4 and 9). The four populations of this species showed the region NOR in chromosome pair 4 (ST). Also, these four populations showed areas of constitutive heterochromatin in the centromeres of all chromosome pairs, plus intercalary C bands in the long arms of chromosome pair 2 (SM). The results indicate that there are no chromosomal differences between individuals of these four populations, which suggests that dissimilar color patterns are possibly due to epigenetic events, in response to the environment where each *Oophaga sylvatica* population analyzed lives.

3 INTRODUCCIÓN

La Citogenética es la ciencia que estudia la organización y el comportamiento de los cromosomas, como material hereditario organizado, bajo cualquier nivel o dimensión. Esta organización garantiza la función de conservar la información genética entre las células de un organismo pluricelular, transmitirla de padres a hijos y expresarla de forma ordenada para controlar las funciones celulares y el desarrollo del organismo (Lacadena, 1996).

El estudio de las características morfológicas de los cromosomas (forma, tamaño y número) se lleva a cabo ordenando los pares de cromosomas homólogos en relación con su tamaño y forma, lo que se denomina cariotipo. La representación gráfica simplificada del cariotipo constituye el idiograma (Lacadena, 1996). Según Levitsky, el cariotipo es el aspecto fenotípico de los cromosomas somáticos, en contraste con su genotipo. La evolución del cariotipo en muchos géneros se lleva a cabo a través de una serie de alteraciones en la morfología de los cromosomas (Sharma y Sen., 2002).

Los cromosomas son la base física de los genes, por esta razón son considerados como elementos fundamentales de estudio de procesos, tales como la herencia, la variación, la mutación, en consecuencia de la evolución de los organismos. Justamente, se ha propuesto que los cambios en la estructura cromosómica son los principales responsables en procesos de especiación rápida (Rivera, 2006). White (1978) sugiere que hasta un 98% de los fenómenos de especiación están relacionados con cambios cariotípicos. Los reordenamientos cromosómicos juegan un rol esencial en la divergencia inicial, de igual manera, estos rearrreglos cromosómicos pueden conducir a procesos de

especiación o solamente constituirse en polimorfismos intra e interpoblacionales (Rivera, 2006).

El establecimiento de polimorfismos en una especie puede expresar diferentes fenotipos. Polimorfismo viene del griego (*poly* = muchas, *morphos* = forma) y significa “muchas formas”. Según Dobzhansky (2006), una especie polimórfica es aquella que se caracteriza por la presencia de diferentes formas o tipos de colores en organismos individuales o entre organismos de una misma especie. Un claro ejemplo de polimorfismos se presenta en anfibios, especialmente en dendrobátidos que muestran diversidad de colores, hasta el punto que dos poblaciones cercanas de la misma especie, pueden presentar fenotipos totalmente diferentes entre sí; tal es el caso de *Oophaga pumilio* que presenta más de 20 patrones de coloración totalmente diferentes (Hagemann y Pröhl, 2007; Rudh *et al.*, 2007).

La familia Dendrobatidae incluye anfibios del Orden Anura, de la Superfamilia *Ranoidea*. Es un grupo estrictamente neotropical, que se caracteriza por la presencia de dos escudos supradigitales en el extremo distal de los dedos, y por la presencia de veneno en la piel, de tipo alcaloide. La familia se distribuye a lo largo de las regiones tropicales de Centroamérica y Sudamérica en concreto en Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Guyana Francesa, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y Paraguay. Desde el nivel del mar hasta 3000 msnm en zonas montañosas de Ecuador (Jangala, 2010; Grant *et al.*, 2006).

Aproximadamente, una cuarta parte de las especies de dendrobátidos muestra una coloración aposemática, acompañada de potentes alcaloides en la piel, además de presentar

polimorfismo intraespecífico, que ha sido bien documentado, y que a su vez ha provocado serios problemas para el estudio taxonómico en el grupo (Symula *et al.*, 2001; Summers *et al.*, 2003 y Lötters *et al.*, en prensa).

Actualmente se plantea una nueva clasificación que divide a las especies antiguamente consideradas Dendrobatidae en dos familias. Una de ellas continúa con el mismo nombre *Dendrobatidae* agrupando los géneros: *Adelphobates*, *Ameerega*, *Colostethus*, *Dendrobates*, *Epipedobates*, *Hyloxalus*, *Minyobates*, *Oophaga*, *Phyllobates*, *Ranitomeya* y *Silverstoneia*; y, la otra tomaría el nombre de *Aromobatidae*, agrupando los siguientes géneros: *Allobates*, *Anomaloglossus*, *Aromobates*, *Mannophryne* y *Rheobates*. (Grant *et al.*, 2006). Así, la familia Dendrobatidae incluye 179 especies y la familia Aromobatidae 104 especies descritas (Frost, 2011).

El género *Oophaga*, objeto de este estudio, se distribuye desde Nicaragua pasando el Chocó colombiano hasta el norte de Ecuador, en elevaciones por debajo de los 1200 msnm (Grant *et al.*, 2006). El clado *Oophaga* es uno de los más visibles y conocidos dentro de Dendrobatoidea, gracias a su llamado tipo chirrido, la morfología de los renacuajos y el comportamiento reproductivo (Grant *et al.*, 2006).

En general, los anuros muestran características morfológicas conservadas, que hacen que el uso exclusivo de éstas sea difícil en los posicionamientos taxonómicos y filogenéticos (Hillis, 1991), por lo que se requieren otros métodos, tales como los moleculares y citogenéticos, para clarificarlos. Como por ejemplo, la identificación de los números cromosómicos, la morfología, y la disponibilidad de diferentes técnicas de tinción diferenciales (bandeos), han proporcionado nuevos datos para volver a evaluar la

sistemática de anuros (King, 1980; Miura, 1995; Lourenço *et al.*, 1999; Busin *et al.*, 2001). La información citogenética disponible para la familia Dendrobatidae se limita al número de cromosomas y la morfología del cariotipo. Sin embargo, estudios de bandeo cromosómico, publicados recientemente, han ayudado a aclarar algunas de las relaciones inter e intragenéricas (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003; Blasco-Zúñiga, 2007 y Reinoso-Recalde, 2008).

La realización de estudios citológicos en los anfibios es muy útil, pues se considera que estos son organismos idóneos, debido a que poseen cromosomas relativamente grandes. La mayor parte del trabajo en citogenética de anfibios se ha realizado con tinciones convencionales de cromosomas. Esto permite la determinación del tamaño de los cromosomas, la posición del centrómero y las constricciones secundarias (Duellman y Trueb, 1994).

En Ecuador, la familia Dendrobatidae ha sido objeto de varios estudios, sobre aspectos relacionados a su biología, encontrándose entre los más frecuentes: etología, morfología, morfometría, bioacústica, biología del desarrollo, bioquímica, biología molecular y citogenética, para en conjunto esclarecer problemas taxonómicos (Santos *et al.*, 2003). El aporte de la citogenética, así como el de otras áreas de la genética, contribuye enormemente al conocimiento de las relaciones evolutivas, y en la caracterización de especies con el objeto de delimitarlas y conocer su variación intra e interespecífica, más aun en casos como los del género *Oophaga* en donde el patrón de coloración es muy amplio (Anexo 1), lo cual dificulta su ubicación taxonómica y el establecimiento de sus relaciones filogenéticas. Esto también es necesario para el desarrollo de estrategias de

conservación adecuadas. Todos estos estudios tienen como objetivo, entender cómo se relacionan estas especies entre sí e investigar procesos de especiación (Santos *et al.*, 2003).

Considerando que hasta el momento no existe ningún estudio previo relacionado con los cromosomas del clado *Oophaga*, este trabajo caracterizó el cariotipo de *Oophaga sylvatica* por primera vez, y que esta especie presenta patrones de coloración muy variables (Figura 1), resulta interesante analizar si esta gran diversidad en los morfotipos de *O. sylvatica* se debe o no, a rearrreglos cromosómicos.

3.1 OBJETIVOS.

3.1.1 Objetivo general.

Caracterizar y comparar los cromosomas mitóticos de cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica* (Anura: Dendrobatidae).

3.1.2 Objetivos específicos.

- Determinar el número cromosómico y describir las características cariotípicas de cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica*.
- Determinar el patrón de distribución de bandas C y la ubicación de la región del organizador nucleolar (NOR) para cada una de las poblaciones analizadas.
- Elaborar el idiograma para los cariotipos de cada una de las poblaciones de *O. sylvatica* estudiadas.
- Analizar las posibles relaciones entre el patrón de coloración de cada una de las poblaciones de *O. sylvatica* con los respectivos cariotipos obtenidos.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Este estudio se realizó con cuatro poblaciones de la misma especie, *Oophaga sylvatica*, perteneciente a la familia Dendrobatidae. Todos los especímenes fueron recolectados en la provincia de Esmeraldas (Figura 2). Se analizaron varios individuos de las poblaciones de Laguna de Cube, Quingüe, Durango y Guadual de Lita. En total se analizaron treinta y tres individuos de esta especie.

Los especímenes, luego de ser colectados, fueron llevados al Laboratorio de Citogenética de Anfibios, donde se mantuvieron en terrarios, los cuales contenían: agua, piedras, hojarasca, plantas pequeñas y cocos secos o envases de rollos fotográficos para su refugio. Todos fueron semanalmente alimentados con grillos.

Las identificaciones fueron realizadas por Luis A. Coloma. Los especímenes testigo fueron depositados en la colección del Museo de Zoología (QCAZ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

4.1.1 *Oophaga sylvatica*. Población 1.

Se analizaron nueve individuos de la localidad de la Laguna de Cube - Esmeraldas, a 360 msnm (Figuras 1a y 2a).

4.1.2 *Oophaga sylvatica*. Población 2.

Se analizaron nueve individuos de la localidad de Quingüe - Esmeraldas, a 150 msnm (Figuras 1b y 2b).

4.1.3 *Oophaga sylvatica*. Población 3.

Se analizaron cuatro individuos de la localidad del Guadual de Lita - Esmeraldas, a 534 msnm (Figuras 1c y 2c).

4.1.4 *Oophaga sylvatica*. Población 4.

Se analizaron nueve individuos de Durango – Esmeraldas, a 104 msnm (Figuras 1d y 2d).

4.2 PREPARACIONES CROMOSÓMICAS.

4.2.1 Procesamiento de las muestras.

Todos los individuos de las cuatro poblaciones con los que se realizó el estudio, fueron procesados en el Laboratorio de Citogenética de Anfibios de la PUCE.

Para el procesamiento de los especímenes se siguieron los protocolos descritos por Egozcue (1971), Schmid (1978), King y Rofe (1976) con ciertas modificaciones, las cuales están expuestas en los puntos a continuación.

4.2.1.1 Obtención de las muestras.

A los especímenes con los que se realizó el estudio en el laboratorio, se los alimentó continuamente hasta el día de su sacrificio, para estimular la división mitótica del duodeno, órgano de cuyas microvellosidades se obtuvo la suspensión de células epiteliales.

Para la fase de inhibición en metafase mitótica, se utilizó colchicina al 2%. Antes de inyectar este inhibidor se pesó a los individuos, ya que la relación debe ser proporcional al peso del animal; es decir, por cada 0,1 gramos de peso se inyectó intraperitonealmente 0,1 ml de solución de colchicina al 2% diluida en Ringer de anfibios.

Luego de ser inyectados con colchicina, los animales fueron incubados *in vivo* de 4 a 5 horas a temperatura ambiente, y luego sacrificados mediante hipotermia o en cámaras de éter.

Una vez muertos los individuos, se procedió a disectarlos bajo un estereomicroscopio y a extraer el intestino delgado, el cual fue abierto longitudinalmente y lavado con Ringer de anfibios, para eliminar los restos de alimento de su interior.

4.2.1.2 Hipotonía.

Para la fase de hipotonía, luego que el intestino fue limpiado, se lo trasladó a una solución de Ringer de anfibios (Anexo 2), en proporciones 4:1; es decir: cuatro medidas de agua destilada vs. 1 medida de Ringer, durante 30 minutos aproximadamente, en una incubadora con temperatura constante de 37°C.

4.2.1.3 Fijación.

El proceso de fijación del tejido, se lo realizó retirando el intestino de la solución hipotonizadora y transfiriéndolo al fijador (metanol + ácido acético, en proporciones 3:1). El intestino fue sumergido en esta solución fijadora durante diez minutos, luego de esto se reemplazó la solución por una nueva, en la cual se realizaron raspados del tejido, desprendiendo las microvellosidades de la pared interna del intestino, con lo cual se consiguió segregar el material requerido. Este tejido disgregado se colocó en un tubo cónico y se lo resuspendió en fijador helado y fresco, con la ayuda de una pipeta plástica, por aproximadamente 10 minutos, hasta conseguir una muestra uniforme.

4.2.1.4 Lavados.

Posteriormente, el material pipeteado fue centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se conservó el pelet, el cual fue resuspendido con fijador nuevo. Este proceso se lo realizó dos o tres veces, con la finalidad de eliminar cualquier residuo de Ringer u otras impurezas de la muestra. Finalmente, esta suspensión fue almacenada en un congelador a -20 °C.

4.2.1.5 Extensión.

Para la extensión del tejido, se realizaron goteos desde aproximadamente 1.5 a 2 metros de altura sobre portaobjetos nuevos, los cuales fueron previamente lavados con etanol al 70%, secados y rotulados. Se dejó caer dos o tres gotas de la muestra fría sobre cada placa, la cual con anterioridad fue colocada sobre un vaso de precipitación lleno de agua caliente, con lo cual el vapor de agua calentaba cada placa, produciéndose un shock

térmico que facilita la extensión de la muestra. Se dejó secar las placas a temperatura ambiente para posteriormente ser teñidas.

4.2.1.6 Tinción.

Previamente las placas fueron sumergidas en metanol durante 5 minutos, para humedecerlas. Al mismo tiempo se realizó una dilución de Giemsa en agua destilada en proporción 1:20 (Anexo 3). A continuación, se sumergieron totalmente a las placas en la solución de Giemsa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo de tinción, se enjuagaron las placas en abundante agua destilada y finalmente se las dejó secar a temperatura ambiente.

4.2.2 Bando cromosómico.

4.2.2.1 Bando C (heterocromatina constitutiva).

Para lograr observar Bandas C, a todas las placas se las preparó siguiendo el protocolo de Sumner (1972), haciendo varias modificaciones. Para el tratamiento de hidratación se utilizó ácido clorhídrico (HCl) 0,2 N, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego se lavaron las placas con abundante agua destilada y se las dejó secar al ambiente.

Consecutivamente se trasladaron las placas a la solución de hidróxido de bario [Ba (OH)₂] al 5%, por un período de 45 segundos a 55°C, inmediatamente se hicieron varios lavados a las placas con HCl 0,2 N y con agua destilada, para eliminar cualquier residuo; y, nuevamente se las puso a secar al ambiente.

Posteriormente se colocaron las placas en un coplin de vidrio que contenía solución salina concentrada (2xSSC) (Anexo 4), y se las incubó en baño María a una temperatura constante de 65°C por 30 minutos. Luego de terminado este tiempo, se lavaron las placas con abundante agua destilada, se secaron a temperatura ambiente y finalmente se realizó de nuevo el proceso de tinción con Giemsa.

4.2.2.2 Bando NOR (Región del Organizador Nucleolar).

Para realizar este bando se siguió el protocolo descrito por Howell & Black (1980) con algunas modificaciones. En todas las placas se puso solución de nitrato de plata (AgNO_3) al 50%, y una solución de gelatina al 2% en proporción de 2:1. Posteriormente las placas fueron incubadas en un horno a 60°C durante un tiempo variable de 8 a 10 minutos. Finalmente, se lavaron las placas con abundante agua milli-Q y luego se secaron a temperatura ambiente.

4.2.3 Montaje de cariotipos.

4.2.3.1 Revisión de placas.

Se inspeccionó cada una de las placas para ubicar células en metafase, para lo cual se utilizó un microscopio de contraste de fase modelo Axioscope ZEISS. Se registraron las coordenadas de las mejores metafases.

Las mejores células en metafase, de cuyos cromosomas mostraron un buen grado de condensación y presentaron su número cromosómico completo, fueron fotografiadas.

4.2.3.2 Fotografía.

Para este proceso se utilizaron dos formas:

4.2.3.2.1 Fotografía en película de 35 mm.

Se utilizó una cámara análoga de marca ZEISS MC 80 DX con una película Kodak 35 mm technical palm, ISO 25 blanco y negro. Las películas fueron reveladas con revelador Kodak y fijadas con Fotoflo (Anexo 5). Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente.

4.2.3.2.2 Cámara fotográfica digital.

Para registrar las metafases se utilizó también una cámara digital Canon PowerShot A640 de 10 megapíxeles.

4.2.3.3 Digitalización.

Para la digitalización de los negativos se utilizó un equipo Scanner HP ScanJet 8250. Las imágenes digitalizadas fueron editadas en Adobe PhotoShop Versión 9.0 (Adobe Systems Incorporated, 2005).

4.2.3.4 Elaboración de Cariotipos.

Para la elaboración de los cariotipos se requirió, en primer lugar, recortar digitalmente cada uno de los cromosomas, a partir de la fotografía original, utilizando el software Photoshop Versión 9.0 (Adobe Systems Incorporated, 2005). Luego de esto fueron ordenados en parejas de manera descendente de acuerdo a su longitud relativa promedio.

4.2.4 Análisis de datos.

4.2.4.1 Análisis citogenético.

La evaluación citogenética se la hizo, utilizando el software de medición Axio Vision 4.0 (Carl Zeiss, 2005), el cual permite medir las imágenes en su escala real. Las medidas de cada brazo fueron tomadas desde el centrómero hasta el final del brazo, el telómero.

Estos datos de las medidas de cada uno de los cromosomas, fueron transferidos a una matriz previamente diseñada en Excel. Esta nos ayudó a ordenar los pares de cromosomas de acuerdo a su longitud relativa promedio (LR%) y morfología cromosómica, tomando en cuenta la ubicación del centrómero, determinándose así el índice centromérico (IC) y radio centromérico (RC) (Anexo 6). La morfología cromosómica fue determinada según la nomenclatura propuesta por Green y Sessions (1991) (Anexo 6).

Los datos de los pares cromosómicos, hechos en base al radio centromérico y longitud relativa promedio, fueron ingresados en una segunda matriz diseñada en Excel y proporcionada por Sergio Siqueira-Jr (UNICAMP, Instituto de Biología, Departamento de Biología Celular, Campinas, SP, Brazil), donde los cariotipos finales de cada individuo fueron analizados y comparados en una sola matriz.

Consecutivamente se elaboraron también idiogramas para establecer patrones de distribución de bandas C y bandas NOR. Adicionalmente, se consideró la media de los

cariotipos de cada individuo para obtener el idiograma final de cada población. Para finalizar, éste fue ordenado según la longitud relativa de cada par en forma descendente.

4.2.4.2 Análisis estadístico.

4.2.4.2.1 ANOVA Factorial de 4 x 10 en DCA (Diseño Completamente al Azar).

Se realizó el ANOVA Factorial en DCA, para establecer variaciones intraespecíficas, esto es, para determinar si existieron diferencias entre los cariotipos de cada una de las poblaciones estudiadas.

Los factores que se usaron para las pruebas fueron la longitud relativa promedio (LR%) y el radio centromérico (RC). Para los ANOVAs, se tomaron las variables: poblaciones y pares cromosómicos.

4.2.4.2.2 Análisis de Componentes Principales (PCA) y Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS).

Se realizó además un Análisis de Componentes Principales (PCA), para establecer las relaciones entre las variables analizadas en la determinación de morfología de cada par cromosómico del cariotipo de cada una de las poblaciones de *O. sylvatica*: longitud relativa promedio (LR%) y radio centromérico (RC);

Con estos dos componentes establecidos, independientes entre sí, se pudo determinar el grado de variación intraespecífica; y adicionalmente se facilitó la representación gráfica de estas relaciones, analizando las unidades de muestreo establecidas (poblaciones) en base a la dispersión de éstas sobre los dos componentes utilizados.

Igualmente se realizó un Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS), que es una técnica multivariante de interdependencia, para representar gráficamente las proximidades existentes entre los componentes escogidos. El NMDS es un método de ordenación adecuado para datos que no son normales o que están en una escala discontinua o arbitraria.

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE *Oophaga sylvatica*.

Se evaluaron cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica*, todas localizadas en la provincia de Esmeraldas. La primera en la Laguna de Cube, la segunda en Quingüe, la tercera en Guadual de Lita y la cuarta población en Durango (Figuras 1 y 2) (Anexo 7).

Para las cuatro poblaciones de *O. sylvatica* se encontró una dotación cromosómica de $2n = 20$. En cada uno de los individuos, de las cuatro poblaciones, se seleccionaron metafases de buena calidad y dispersión para identificar la morfología de los cromosomas, siguiendo las normas propuestas por la metodología, para la caracterización de los cariotipos. De acuerdo a su longitud relativa promedio, se pudo constatar la existencia de seis pares cromosómicos grandes y cuatro pares pequeños, en todas las poblaciones analizadas.

5.1.1 Determinación del número y morfología de los cromosomas mitóticos de *Oophaga sylvatica*. Población 1 (Laguna de Cube).

Fueron estudiados ocho individuos de la primera población (Anexo 7), de los cuales: tres fueron identificados como machos y los cinco restantes con sexo indeterminado. Se obtuvo un total de 63 células en metafase, de las cuales se cariotiparon todas.

El número cromosómico diploide encontrado fue de $2n = 20$. Se confirmó la presencia de seis pares cromosómicos grandes y cuatro pares cromosómicos pequeños, de

los cuales cinco pares son metacéntricos (M) (pares 1, 2, 7, 8 y 10), tres son submetacéntricos (SM) (pares 3, 5 y 6) y dos pares son subtelocéntricos (ST) (pares 4 y 9) (Figuras 3a y 4a).

5.1.2 Determinación del número y morfología de los cromosomas mitóticos de *Oophaga sylvatica*. Población 2 (Quingüe).

Se estudiaron a nueve especímenes de la segunda población (Anexo 7), de los cuales: cuatro fueron identificados como machos y los cinco restantes como hembras. Se observó un total de 78 células en metafase, de las cuales se cariotiparon todas.

Igualmente, el número cromosómico diploide encontrado fue de $2n = 20$. Los cromosomas fueron agrupados como grandes y pequeños; es decir, seis pares cromosómicos están dentro del grupo de cromosomas grandes y cuatro pares cromosómicos en el grupo de cromosomas pequeños. De los cuales cinco pares son metacéntricos (M) (pares 1, 2, 7, 8 y 10), tres son submetacéntricos (SM) (pares 3, 5 y 6) y dos pares son subtelocéntricos (ST) (pares 4 y 9) (Figuras 3b y 4b).

5.1.3 Determinación del número y morfología de los cromosomas mitóticos de *Oophaga sylvatica*. Población 3 (Guadual de Lita).

Fueron analizados cuatro individuos de la tercera población (Anexo 7), de los cuales: dos fueron identificados como machos y dos fueron identificados como hembras. Se obtuvo un total de 23 células en metafase, de las cuales se cariotiparon todas.

De igual manera el número cromosómico diploide encontrado fue de $2n = 20$. Asimismo, los cromosomas fueron agrupados como grandes y pequeños: seis pares

grandes y cuatro pares pequeños. De los cuales cinco pares son metacéntricos (M) (pares 1, 2, 7, 8 y 10), tres son submetacéntricos (SM) (pares 3, 5 y 6) y dos pares son subtelocéntricos (ST) (pares 4 y 9) (Figuras 3c y 4c).

5.1.4 Determinación del número y morfología de los cromosomas mitóticos de *Oophaga sylvatica*. Población 4 (Durango).

Fueron estudiados nueve individuos de la cuarta población (Anexo 7), de los cuales: seis fueron identificados como machos y los tres individuos restantes hembras. Se obtuvo un total de 76 células en metafase, de las cuales se cariotiparon todas.

El número cromosómico diploide encontrado fue de $2n = 20$. Los cromosomas fueron agrupados como grandes y pequeños. De los seis pares cromosómicos grandes y cuatro pares cromosómicos pequeños, 5 son metacéntricos (M) (pares 1, 2, 7, 8 y 10), tres son submetacéntricos (SM) (pares 3, 5 y 6) y dos pares son subtelocéntricos (ST) (pares 4 y 9) (Figuras 3d y 4d).

5.2 BANDEO CROMOSÓMICO.

5.2.1 Bando C (heterocromatina constitutiva).

Se aplicó la técnica de bandedo C a todas las placas, siendo exitosa en la mayoría de ellas, gracias a esto se observaron regiones de heterocromatina constitutiva definidas a nivel centromérico y patrones de bandas C intercalares, como se describe a continuación.

5.2.1.1 Patrón de distribución de bandas C para *Oophaga sylvatica*. Población 1 (Laguna de Cube).

Se observó claramente zonas de heterocromatina constitutiva en las regiones centroméricas de todos los cromosomas. Se localizó heterocromatina intercalar únicamente en los brazos largos del par cromosómico 2 (SM) (Figura 5).

5.2.1.2 Patrón de distribución de bandas C para *Oophaga sylvatica*. Población 2 (Quingüe).

El patrón de heterocromatina constitutiva en las regiones centroméricas, es constante en todos los cromosomas. Al igual que las bandas intercalares únicamente en los brazos largos del par cromosómico 2 (SM) (Figura 6).

5.2.1.3 Patrón de distribución de bandas C para *Oophaga sylvatica*. Población 3 (Guadual de Lita).

De igual manera la localización de bloques con heterocromatina constitutiva es clara en las regiones centroméricas de todos los cromosomas. Las bandas intercalares se localizan en los brazos largos del par 2 (SM) (Figura 7).

5.2.1.4 Patrón de distribución de bandas C para *Oophaga sylvatica*. Población 4 (Durango).

Igualmente se observan paquetes de heterocromatina constitutiva en las regiones centroméricas de todos los cromosomas. Nuevamente se localizó heterocromatina intercalar únicamente en los brazos largos del par cromosómico 2 (SM) (Figura 8).

5.2.2 Bando NOR (Región del organizador nucleolar).

Para localizar la región del organizador nucleolar (NOR) se realizó la técnica de bando Ag-NOR a todas las placas, la cual resultó exitosa, ya que esta región fue ubicada en los cromosomas de 4 poblaciones de *O. sylvatica* analizadas. Se observó además que la calidad del bando NOR fue mejor en las placas con menor tiempo de maduración, ya que en placas con más de dos meses, los resultados fueron negativos.

5.2.2.1 Localización de bandas NOR para *Oophaga sylvatica*. Población 1 (Laguna de Cube).

La región del organizador nucleolar para esta población se ubicó dentro del grupo de cromosomas grandes, en el par subtelocéntrico (ST) 4. Esta región NOR se observó en los brazos cortos de este par (Figura 5).

5.2.2.2 Localización de bandas NOR para *Oophaga sylvatica*. Población 2 (Quingüe).

De igual manera, la región del organizador nucleolar se ubicó dentro del grupo de los cromosomas grandes, en los brazos cortos del par subtelocéntrico (ST) 4 (Figura 6).

5.2.2.3 Localización de bandas NOR para *Oophaga sylvatica*. Población 3 (Guadual de Lita).

Para esta población, la región del organizador nucleolar se localizó igualmente dentro del grupo de cromosomas grandes, en el par subtelocéntrico (ST) 4. Dicha región está presente en los brazos cortos de este par (Figura 7).

5.2.2.4 Localización de bandas NOR para *Oophaga sylvatica*. Población 4 (Durango).

Finalmente la región del organizador nucleolar para esta población, se ubicó dentro del grupo de cromosomas grandes, en los brazos cortos del par subtelocéntrico (ST) 4 (Figura 8).

5.3 ANALISIS ESTADÍSTICO.

El ANOVA Factorial de 4 X 10 en DCA aplicado, permitió determinar que no existen diferencias significativas intra ni interpoblacionales entre los individuos de las cuatro localidades.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la variable morfológica dependiente LR% (longitud relativa promedio) entre individuos de las cuatro poblaciones (Tabla 1) (Figura 9).

Para la variable RC (radio centromérico), los valores de significación fueron por debajo de $p= 0,05$ (Tabla 2). Lo que nos indica que no existen diferencias significativas entre ninguna de las cuatro poblaciones estudiadas (Figura 10).

En el análisis de componentes principales (PCA) representado gráficamente (Figura 11), se puede apreciar y analizar que no existen variaciones para cada par cromosómico del cariotipo de las cuatro poblaciones de *O. sylvatica*, sobre los componentes de LR% y RC.

6 DISCUSIÓN

El trabajar en biología o genética de Eucariotes usando técnicas moleculares y desconociendo las características y el comportamiento de sus cromosomas, nos puede llevar a errores en la interpretación de causa y efecto de muchos fenómenos (Poggio y Naranjo, 2004). Por ello, la citogenética evolutiva se centra en el estudio de las formas cromosómicas de las especies actuales, y mediante la comparación de sus cariotipos, hace inferencias sobre los cambios cromosómicos que se han podido producir a lo largo del proceso evolutivo de los diferentes grupos taxonómicos, sean o no estos, la causa del proceso de divergencia de las especies. Por lo tanto, los análisis cariotípicos son importantes ya que éstos nos pueden conducir a la resolución de problemas sistemáticos, es decir, al establecimiento de relaciones de parentesco y descendencia de un grupo ancestral entre diferentes conjuntos de organismos, a fin de obtener una clasificación natural de los mismos (Rivera, 2006).

En general, los análisis filogenéticos en anuros, resultan complejos, ya que estos organismos pueden mostrar características morfológicas conservadas, que hacen que el uso de estos caracteres, sean difíciles e insuficientes en las investigaciones taxonómicas (Hillis, 1991). Por el contrario, existen casos en los que se presentan características morfológicas diferentes, dentro del mismo grupo. Tal es el caso de *Oophaga sylvatica* (Anura: Dendrobatidae), cuyos miembros presentan patrones de coloración notoriamente disímiles (Anexo 1). Por los aspectos antes mencionados, se requiere la aplicación de otros métodos que permitan realizar análisis taxonómicos y filogenéticos más precisos.

Así, los estudios citogenéticos han permitido realizar valiosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo y modos de especiación

(Poggio y Naranjo, 2004). La aplicación de técnicas citogenéticas convencionales y la disponibilidad de diferentes métodos de tinción y bandeos cromosómicos específicos, han proporcionado nuevos datos para volver a evaluar la sistemática de anuros (King, 1980; Miura, 1995; Lourenço *et al.*, 1999; Busin *et al.*, 2001). La información citogenética disponible para la familia Dendrobatidae se limita al número y morfología de los cromosomas. Sin embargo, estudios de bandedo cromosómicos publicados por Aguiar Jr. *et al.*, 2002 han ayudado a aclarar algunas de las relaciones inter e intragenéricas en esta familia. (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003).

Los anfibios son organismos excepcionalmente apropiados para los estudios citológicos porque la mayoría tienen cromosomas relativamente grandes. La mayor parte del trabajo en citogenética de anfibios se ha realizado convencionalmente con la tinción de cromosomas, lo que permite determinar: la forma, la posición del centrómero, las constricciones secundarias y la longitud relativa promedio de los mismos. Adicionalmente, se han desarrollado técnicas de bandedo, que facilitan la obtención de información mucho más minuciosa de la localización de la heterocromatina constitutiva centromérica e intercalar, de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR), y de los genes de ARN ribosomal (Duellman y Trueb, 1994).

6.1 NÚMERO CROMOSÓMICO.

Con el objetivo de comprobar si los diferentes patrones de coloración registrados en *Oophaga sylvatica* tienen un origen cromosómico, en la presente investigación se analizó el número, la longitud relativa promedio y la morfología de los cromosomas mitóticos de cuatro poblaciones de esta especie, localizadas en la provincia de Esmeraldas: Laguna de Cube, Quingüe, Guadual de Lita y Durango (Figura 2). Mediante este análisis, se

determinó que los individuos de estas cuatro poblaciones de *O. sylvatica*, poseen un número diploide de $2n = 20$ cromosomas a partir de células del duodeno, lo cual resulta ser recurrente en las especies del género *Oophaga* hasta el momento cariotipadas (Anexo 8). Con coloración convencional Giemsa no se pudo encontrar cromosomas relacionados con la determinación del sexo, siendo los cariotipos iguales, tanto en machos como en hembras.

Estudios citogenéticos previos, han revelado, que el número cromosómico conservado para la familia Dendrobatidae es de $2n = 24$ (Aguiar Jr., 2004; Blasco-Zúñiga, 2007; Reinoso-Recalde, 2008), por lo que la reducción de $2n = 20$, reportada en esta investigación, podría ser una característica derivada de este género. De acuerdo con estudios previos, especies menos basales que pertenecen a la subfamilia Dendrobatinae tienden a reducir el número cromosómico (Bogart, 1991; Grant *et al.*, 2006), como por ejemplo de los géneros: *Dendrobates* ($2n=18$), *Adelphobates* ($2n=20$), *Oophaga* ($2n=20$) y *Ranitomeya* ($2n=22$) (Rassoto, *et al.*, 1987; Bogart, 1991). Esto indicaría que estas especies de Dendrobatinae son más especializadas. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que el número cromosómico puede ser una característica que, en ciertos casos, se deriva de manera independiente (Bogart, 1991).

Los cambios en el número cromosómico podrían surgir como consecuencia de la intervención de mecanismos tales como fusiones y fisiones céntricas, mismos que están asociados a la presencia de cromosomas telocéntricos. Estos procesos, obtienen por ejemplo, un incremento en el porcentaje de cromosomas metacéntricos en los cariotipos de las especies que sufrieron una reducción en su dotación cromosómica debido a estos rearrreglos cromosómicos (Bogart y B.H.S., 1995; Green y Sessions, 1991; Macgregor, 1993).

Por lo general, en cariotipos de dendrobátidos, encontramos dos grupos cromosómicos definidos por el tamaño, muchas especies de esta familia incluyen seis pares de cromosomas grandes seguido de un número de pares pequeños que varía entre cuatro y seis (Veiga-Menoncello, 2003), característica que cumplen todos los individuos de las cuatro poblaciones de *O. sylvatica* con la que se realizó esta investigación.

Uno de los principales sustentos de la genética ecológica radica en que las poblaciones naturales se adaptan a sus ambientes físicos y biológicos, por mecanismos genéticos que podrían responder a cambios ambientales. Hay muchos relatos descriptivos de las diferencias fenotípicas de especies de anfibios expuestos a ambientes diferentes, pero los factores responsables de estas diferencias son conocidos sólo en algunos casos (Duellman y Trueb, 1994). Uno de estos factores podría ser la Epigenética, rama de la Biología que estudia las interacciones entre los genes y el ambiente. Los efectos heredables de esta interacción, determinan los distintos fenotipos pues involucran a factores que no afectan la secuencia de ADN de los genes, pero sí varían su expresión (Epigenetica.org, 2007).

6.2 MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA Y LONGITUD RELATIVA PROMEDIO.

Las cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica* comparten el mismo número y morfología cromosómica presentes en las células mitóticas del duodeno: doce cromosomas largos y ocho pequeños.

Con relación a morfología y longitud relativa promedio, no existieron diferencias cromosómicas obvias en las poblaciones muestreadas, aunque éstas exhibieron grandes

diferencias en los patrones de coloración. Según su distribución, el rango de coloración de fondo de *O. sylvatica* puede ser de marrón a negro, de beige a rojo pasando por amarillo y naranja (Funkhouser, 1956), cubierto total o parcialmente de manchas, puntos o reticulados en colores contrastados con el color de fondo (Jangala, 2010). De las especies estudiadas, entran en este rango las poblaciones de la Laguna de Cube, Quingüe y Durango, mientras que los individuos de la población del Guadual de Lita presentaron características fenotípicas diferentes, con un fondo en la gama descrita por Funkhouser, 1956, pero con manchas que van de un rango de tomate a verde.

Pese a esta diferencia en los patrones de coloración de las cuatro poblaciones estudiadas, los resultados del cariotipo no mostraron diferencias significativas en cuanto a morfología y longitud relativa promedio (Figura 9, Figura 10) (Tabla 1). Este hecho abre la posibilidad de que la presencia de morfotipos diferentes sean consecuencia de eventos mutacionales tales como inversiones, translocaciones, inserciones y/o deleciones (Bogart, 1995), fenómenos que, con la aplicación de las técnicas citogenéticas empleadas en este trabajo, no pueden detectarse, pero que podrían revelarse con la aplicación de técnicas moleculares. La ausencia de diferencias cariotípicas con relación a forma y tamaño, nuevamente podría sugerir la existencia de eventos epigenéticos, es decir la expresión génica diferencial como influencia del ambiente.

Sin embargo en el caso de análisis moleculares en *Allobates femoralis*, la divergencia en la coloración parece no estar relacionada con la distancia genética, pues esta resultó mínima, y puede ser parcialmente atribuida a las presiones selectivas locales (Amezquita *et al.*, 2009), aspectos que no se descartan en *Oophaga sylvatica* hasta no realizarse estudios más detallados. Por otro lado, *Oophaga pumilio* exhibe un patrón de

variación fenotípica la cual se encuentra altamente correlacionada a una distribución geográfica diferente aunque, poblaciones que son fenotípicamente distintas, ocurren en simpatria o parapatría. Esto incluye ejemplos de poblaciones distintas que se encuentran próximas sin ninguna barrera fisiogeográfica obvia, que no muestran evidencia de hibridización en términos de coloración. Los mecanismos y barreras que previenen la mezcla de fenotipos en poblaciones naturales son pobremente conocidos (Batista y Köhler, 2008).

6.3 BANDEO C.

El bandeo C muestra los sitios en donde la cromatina constitutiva se mantiene, producto de un tratamiento de baja alcalinidad (Sumner, 1972). Este bandeo cromosómico es una técnica que permite detectar y mostrar regiones con características cromatínicas específicas, mismas que se localizan indistintamente en los cromosomas. Concretamente, el bandeo C, revela cambios en la organización de la cromatina a nivel molecular y tiñe diferencialmente secciones ricas en el tipo de cromatina generalmente llamada heterocromatina constitutiva, misma que se caracteriza por tener secuencias génicas altamente repetitivas. Esta técnica de bandeo se ha usado también para estudiar las diferencias morfológicas entre los cromosomas sexuales en algunos anuros (Hanada, 2002).

Bloques de heterocromatina constitutiva pericentromérica en un par de cromosomas metacéntricos en los anuros, ha sido explicado como evidencia de la fusión Robertsoniana de dos pares de cromosomas telocéntricos grandes, a partir del complemento ancestral (King, 1990). Los procesos que aparentemente están implicados en la evolución de la heterocromatina en genomas de anfibios son: la adición de

heterocromatina en determinados sitios cromosómicos, la transformación de regiones eucromáticas en heterocromáticas y la evolución de múltiples sitios heterocromáticos (King, 1990).

En este estudio, utilizando la coloración CBG (Bandas C por hidróxido de bario utilizando Giemsa) (Rodríguez, 1995), se aprecia una distribución de heterocromatina constante en las regiones centroméricas de todos los pares cromosómicos, además de unas notables bandas C intercalares positivas, en los brazos largos del par cromosómico 2 (SM), en la región próxima al centrómero. Este patrón de bandas C es común para las cuatro poblaciones de *O. sylvatica*.

Se desconoce cómo podrían estar relacionados, la cantidad de heterocromatina y el grado evolutivo de las especies, sin embargo se ha reportado diferencias entre anuros antiguos y anuros derivados. La naturaleza de la evolución de la heterocromatina resulta ser bastante compleja. En anfibios, la tendencia evolutiva indica que ha habido un incremento en la cantidad de heterocromatina a partir de un complemento ancestral básico (Reinoso, 2008). En estudios realizados en anuros del suborden Archaeobatrachia, es común la presencia de cantidades relativamente pequeñas de heterocromatina, mientras que en anuros del suborden Neobatrachia, con una heterocromatina de una amplia distribución, la cantidad es mayor (King, 1990).

6.4 UBICACIÓN DEL ORGANIZADOR NUCLEOLAR (NOR).

La región del organizador nucleolar (NOR) es la región de los cromosomas implicada en la formación del nucléolo. En la transición de interfase a profase tardía, estas regiones pierden ADN, pero son ricos en el ARN (Duellman y Trueb, 1994). El

organizador nucleolar es una región diferenciada de cromatina (ADN), la cual, a través de la transcripción, produce dos piezas (pedazos) más grandes de ARN ribosomal 18S y 28S (ARNr), que son incorporados en los ribosomas. Sin embargo, otras regiones del genoma producen rRNA 5S y el código para las proteínas ribosomales (Duellman y Trueb, 1994).

Conjuntamente, esta región NOR, es el sitio cromosómico donde se localizan los clusters de genes ribosómicos que codifican para el ARN ribosómico y que está asociado a una constricción secundaria. Usualmente, la región NOR en anuros, está presente en un solo par cromosómico y éste está ubicado en el mismo par dentro de cariotipos de especies que están cercanamente relacionados (Aguiar, 2002). Sin embargo, NOR se puede localizar en un número de cromosomas que varía dependiendo de la especie, como se comprobó en estudios realizados con miembros del género *Epipedobates*, por Aguilar (2002), en donde la región del organizador nucleolar se localizó en diferentes pares cromosómicos. Así mismo, esta variación interespecífica también se ha visto en algunos hílidos y en algunas especies de bufónidos.

La región NOR para las cuatro poblaciones estudiadas en este trabajo, se ubicó en la región próxima al centrómero, en los brazos cortos del par cromosómico subtelocéntrico (ST) 4, dentro del grupo de cromosomas grandes.

6.5 RELACIONES INTERPOBLACIONALES.

Según los resultados obtenidos del análisis estadístico (ANOVA) de longitud relativa promedio (LR%) (Tabla 2) y radio centromérico (RC) (Tabla 3), no existieron diferencias significativas en la morfología de los cromosomas de las cuatro poblaciones con las que se trabajó, a pesar de las diferencias fenotípicas de las mismas, en especial la

población de Lita. En cuanto a los valores de radio centromérico, aunque éstos son aparentemente variables, no están fuera de los rangos a los que pertenecen. En consecuencia, estos datos de radio centromérico, no involucran cambios en la morfología cromosómica (Reinoso-Recalde, 2008).

En definitiva, la morfología y la longitud relativa promedio (LR) fueron constantes, al igual que la distribución de la heterocromatina constitutiva, pericentromérica e intercalar, y la posición de la región del organizador nucleolar (NOR). Esto nos permite afirmar que no hay diferencias cariotípicas entre las cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica* analizadas y que la diferencia en los patrones de coloración podría deberse a eventos epigenéticos.

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El número de cromosomas en *Oophaga sylvatica*, en condición diploide, es de $2n = 20$, de los cuales, doce cromosomas son largos y ocho son pequeños. Esta dotación cromosómica de $2n = 20$ para *O. sylvatica*, sería al parecer una característica derivada, ya que la familia Dendrobatidae posee cariotipos de $2n = 24$.

No existieron diferencias cromosomales obvias, en cuanto a morfología, en las poblaciones muestreadas, aunque estas poblaciones exhiben grandes diferencias en los patrones de coloración de su piel.

La distribución de heterocromatina constitutiva es constante en las regiones centroméricas, de todos los cromosomas analizados, y en las regiones intercalares, próximas al centrómero, de los brazos largos del par cromosómico 2 (SM) de todas las poblaciones estudiadas.

La región NOR, para las cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica* consideradas en este trabajo, se ubica en los brazos cortos del par cromosómico 4 (ST), el cual está dentro del grupo de cromosomas grandes.

Debido a que no existen estudios previos de la caracterización cariotípica de *O. sylvatica*, la presente investigación resulta pionera en estudios citogenéticos de esta especie, y al no existir diferencias cromosómicas entre las cuatro poblaciones estudiadas, se podría presumir que los patrones de coloración distintos que presentan podrían deberse a eventos epigenéticos. Sin embargo, para poder aseverar esta hipótesis, se recomienda

realizar detallados estudios moleculares, ecológicos y de la composición cromosómica en muchas más poblaciones de esta especie.

Por otro lado, resulta imperativo el realizar cruces interpoblacionales entre estos diferentes morfotipos cercanos de esta especie, para analizar si existen barreras reproductivas entre las diferentes poblaciones, si todavía existe flujo génico, o si estaría presentando un proceso de especiación.

8 LITERATURA CITADA

Adobe Systems Incorporated. 2005. Photoshop 9.0 Software. United States.

Aguiar Jr., O., Lima, A., Giaretta, A. A. y Recco-Pimentel, S. M. 2002. Cytogenetic analysis of four poison frogs of the *Epipedobates* Genus (Anura: Dendrobatidae). *Herpetologica* 58(3):293-303.

Aguiar Jr., O., Carvalho, K.A., Giaretta, A.A. y Recco-Pimentel, S. M. 2004. Cytogenetics of *Hylodes* and *Crossodactylus* species (Anura, Leptodactylidae) with comments on Hylodinae/Dendrobatidae relationships. *Genetica* 121: 43-53.

Amezquita, A., Lima, A. P., Jehle, R., Castellanos, L., Ramos, O., Crawford, A. J., Gasser, H. y Hödl, W. 2009. Calls, colours, shape, and genes: a multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog *Allobates femoralis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 826–838.

Batista, A. y Köhler, G. 2008. Variation in *Oophaga pumilio* (Amphibia: Anura: Dendrobatidae) in western Panama. *Salamandra*, 44 (4): 225-234.

Blasco – Zúñiga, A. 2007. Análisis de los cromosomas mitóticos de seis especies de anuros ecuatorianos de la familia Dendrobatidae. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

- Bogart J. P. 1991. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla*, and *Bufo* (Amphibia: Anura). *Chromosoma*, 103: 567-574. Heidelberg, Germany.
- Bogart J.P., y B.H.S. 1995. Rapid chromosome evolution in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *Journal of Zoology*, 9-31.
- Busin, C.S., Vinciprova, G. y Recco-Pimentel, S. M. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica* 110:131–141.
- Carl Zeiss. 2005. Axio Vision 4.0 Software. Göttingen, Germany.
- Dobzhansky, T. 2006. Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución. [en línea] <http://biologia-en-red.blogspot.com/2006/06/el-polimorfismo.html> (Consulta: Octubre 2011).
- Duellman, W. E. y Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. Johns Hopkins University Press, London, UK.
- Egozcue, J. 1971. *Técnicas en Citogenética*. Editorial Espaxs, Barcelona, España.
- Epigenetica.org. 2007. ABC de la Epigenética. [en línea] http://www.epigenetica.org/?page_id=150

- Frost, D. R. 2011. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31 January, 2011). [en línea]
<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php> American Museum of Natural History, New York, USA. (Consulta: Junio/2011).
- Funkhouser, J. W. 1956. New frogs from Ecuador and southwestern Colombia. *Zoologica* 41: 73-80
- Grant, T., Frost, D. R., Caldwell, J. P., Gagliardo, R., Haddad, C. F. B., Kok, P. J. R., Means D. B., Noonan, B. P., Schargel W. E. y Wheeler, W. C. 2006. Phylogenetic systematic of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 299: 1-262.
[en línea] <http://digitallibrary.amnh.org/dspace/handle/2246/5803>> (Consulta: Diciembre/2010).
- Green, M. y Sessions, K. 1991. Amphibian cytogenetics and evolution. Academia Press, Inc Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, California, USA.
- Hagemann, S. y Pröhl, H. 2007. Mitochondrial paraphyly in a polymorphic poison frog species (Dendrobatidae; *D. Pumilio*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45 (2): 740-747.
- Hanada, H. 2002. G and C banding show structural differences between the Z and W chromosomes in the frog *Buergeria buergeri*. *Hereditas* 136: 151–154.

- Hillis, D. M. 1991. The phylogeny of amphibians: current knowledge and the role of cytogenetics. *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, pp. 7–31.
- Howell W. & Black D. 1980. Controlled silver-staining of nucleous regions with a protective colloidal developer a one step method. *Experiencia*, 36: 1014-1015.
- Jangala Magazine. 2005-2010. La familia Dendrobatidae, guía visual de géneros y especies (parte I). [en línea]
<http://www.jangalamagazine.com/index.php?Itemid=40&catid=15&id=26:dendrobatidae&option=com_content&view=article> (Consulta: Diciembre/2010).
- King, M. 1980. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80:191–217.
- King, M. 1990. *Animal Cytogenetics, Chordata, Amphibia*. Gerbruder Borntraeger, Stuttgart and Berlin. Germany.
- King, M. & Rofe, R. 1976. Karyotypic variation in the Australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma* 54: 75–87.
- Lacadena, J. R. 1996. *Citogenética*. Primera Edición. Editorial Complutense, S.A. Madrid, España.

- Lötters, S., Glaw, F., Köhler, J. y Castro, F. 1999. On the geographic variation of the advertisement call of *Dendrobates histrionicus* Berthold, 1845 and related forms from north-western South America. *Herpetozoa* 12:23–38.
- Lourenço, L. B., Recco-Pimentel, S. M. y Cardoso, A. J. 1999. Two karyotypes, heteromorphic sex chromosomes and C-band variability in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). *Can. J. Zool.* 36: 301–306.
- Macgregor, H. C. 1993. *An Introduction to Animal Cytogenetics*. First Edition. Chapman & Hall, The Alden Press. Oxford, Great Britain.
- Miura, I., Niishioka, M., Bordikin, L. J. y Wu, Z. 1995. The origin of the brown frogs with $2n = 24$ chromosomes. *Experientia* 51:79–188.
- Photobucket Corporation. 2012. Morphs and Color Patterns within the species *Oophaga lehmanni*, *occultator* and *sylvatica*. [en línea] <http://s795.photobucket.com/albums/yy235/frogandtoadarefriends/Dart%20Frogs/?action=view¤t=LEHMANNIOCCULTATORSYLVATICAGUIDE.jpg>.
- Poggio, L. y Naranjo, C. A. 2004. *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal*. Cap. 5: Citogenética. pp. 69-79. INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Rasotto, M. B., Cardellini, P. y Sala, M. 1987. Karyotypes of Five Species of *Dendrobatidae* (Anura: Amphibia). *Herpetologica* 43: 177-182.

- Reinoso-Recalde, M. 2008. Análisis de los Cromosomas Mitóticos de Cuatro Especies de Ranas del Género *Hyloxalus* (Anura: Dendrobatidae). Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Rivera, M. 2006. La Citogenética: Un aporte más al conocimiento de los anfibios ecuatorianos. *Nuestra Ciencia*. Número 8, pp:28-30.
- Rodríguez, M. E. 1995. Cariotipo y Patrones de Bandas C en *Bufo spinulosus arequipensis* (Amphibia: Anura). *Rev. Ecol. Lat. Am.* 2(1-3): 5-11.
- Rudh, A., Rogell, B. y Höglund, J. 2007. Non-gradual variation in colour morphs of the strawberry poison frog *Dendrobates pumilio*: genetic and geographical isolation suggest a role for selection in maintaining polymorphism *Molecular Ecology* 16(20): 4284-4294.
- Santos, J. C., Coloma, L. A. y Cannatella, D. C. 2003. Multiple, recurring of aposematism and diet specialization in poison frogs. *Proceedings of the Natural Academy of Science* 100(22): 12792-12797.
- Schmid, M. 1978. Chromosome banding in amphibia. I: Constitutive heterocromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361-388.
- Sharma, A. y Sen, S. 2002. *Chromosome Botany*. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA.

- Summers, K., Cronin, T. W. y Kennedy, T. 2003. Variation in spectral reflectance among populations of *Dendrobates pumilio*, the strawberry poison frog, in the Bocas del Toro Archipelago, Panama. *J. Biogeogr.* 30:35–53.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Symula, R., Schulte, R. y Summers, K. 2001. Molecular phylogenetic evidence for a mimetic radiation in Peruvian poison frogs supports a Müllerian mimicry hypothesis. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 2415–2421.
- Veiga-Menoncello, A. C. P., Lima, A. P. y Recco-Pimentel, S. M. 2003. Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura - Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas* 139: 189–198.
- White, M.J.D., 1978. *Modes of speciation*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, C.A. U.S.A.

9 FIGURAS



Figura 1. Patrones de coloración de las poblaciones de *Oophaga sylvatica* analizadas: (a) Laguna de Cube; (b) Quingüe; (c) Guadual de Lita; (d) Durango.

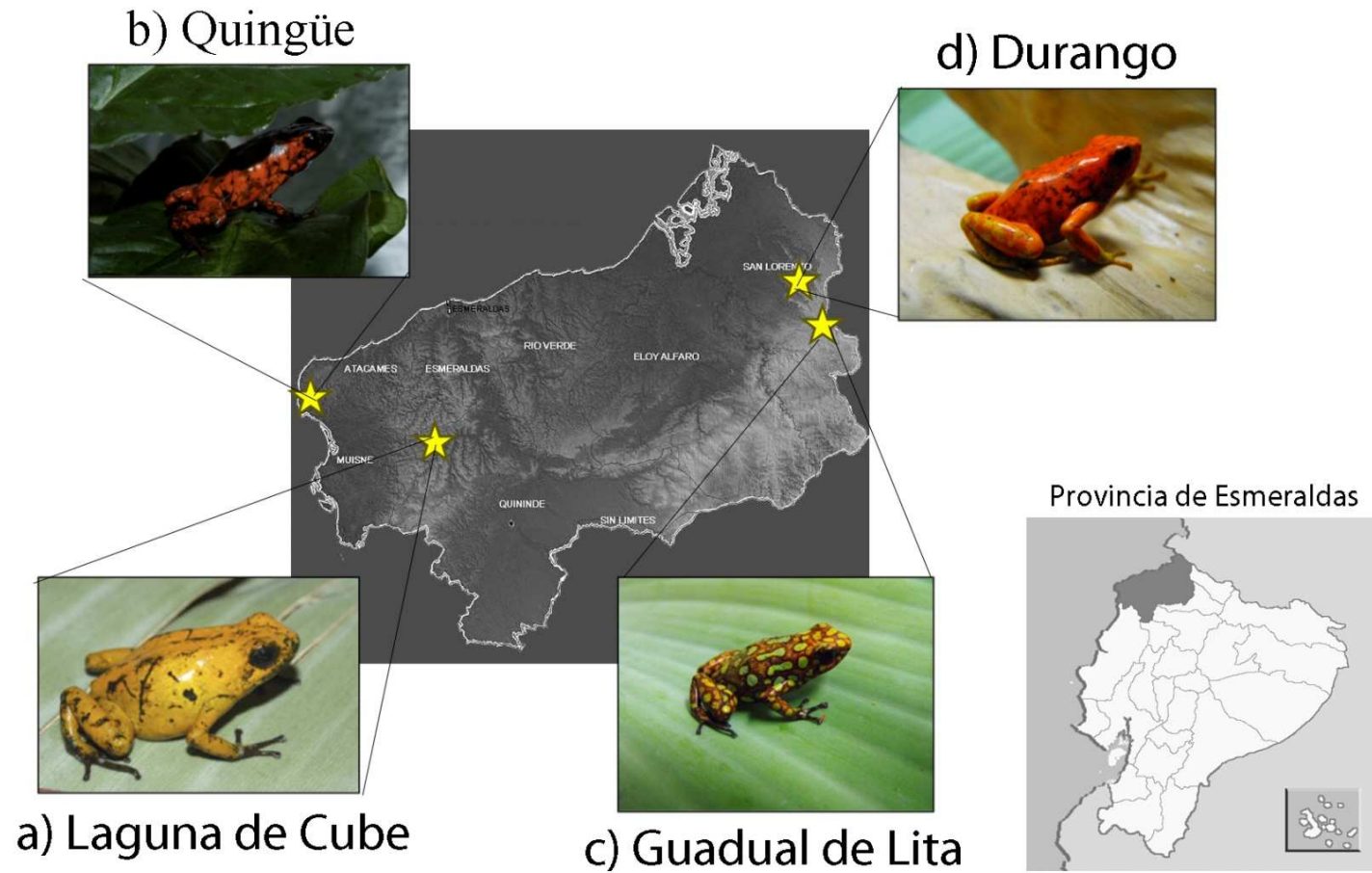


Figura 2. Mapa de la provincia de Esmeraldas-Ecuador, mostrando la distribución de los fenotipos de las poblaciones de *Oophaga sylvatica* analizadas: a). Laguna de Cube; b). Quingüe, c). Guadual de Lita; d). Durango.

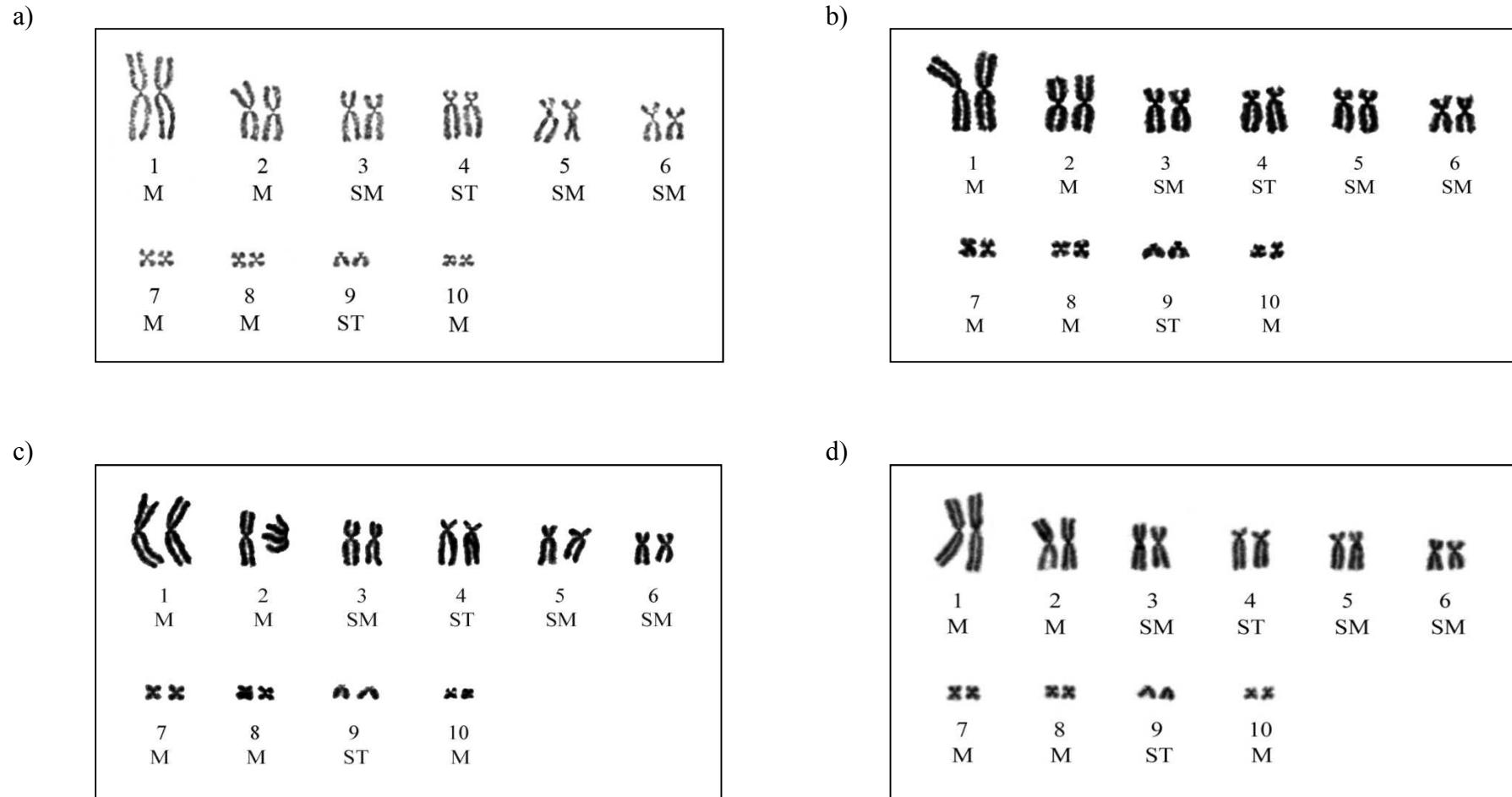


Figura 3. Cariotipos de las cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica*: a) Población 1, Laguna de Cube (QCAZ 47534); b) Población 2, Quingüe (QCAZ 47542); c) Población 3, Guadual de Lita (QCAZ 47548); d) Población 4, Durango (QCAZ 47549). (M = metacéntrico; SM = submetacéntrico; y, ST = subtelocéntrico).

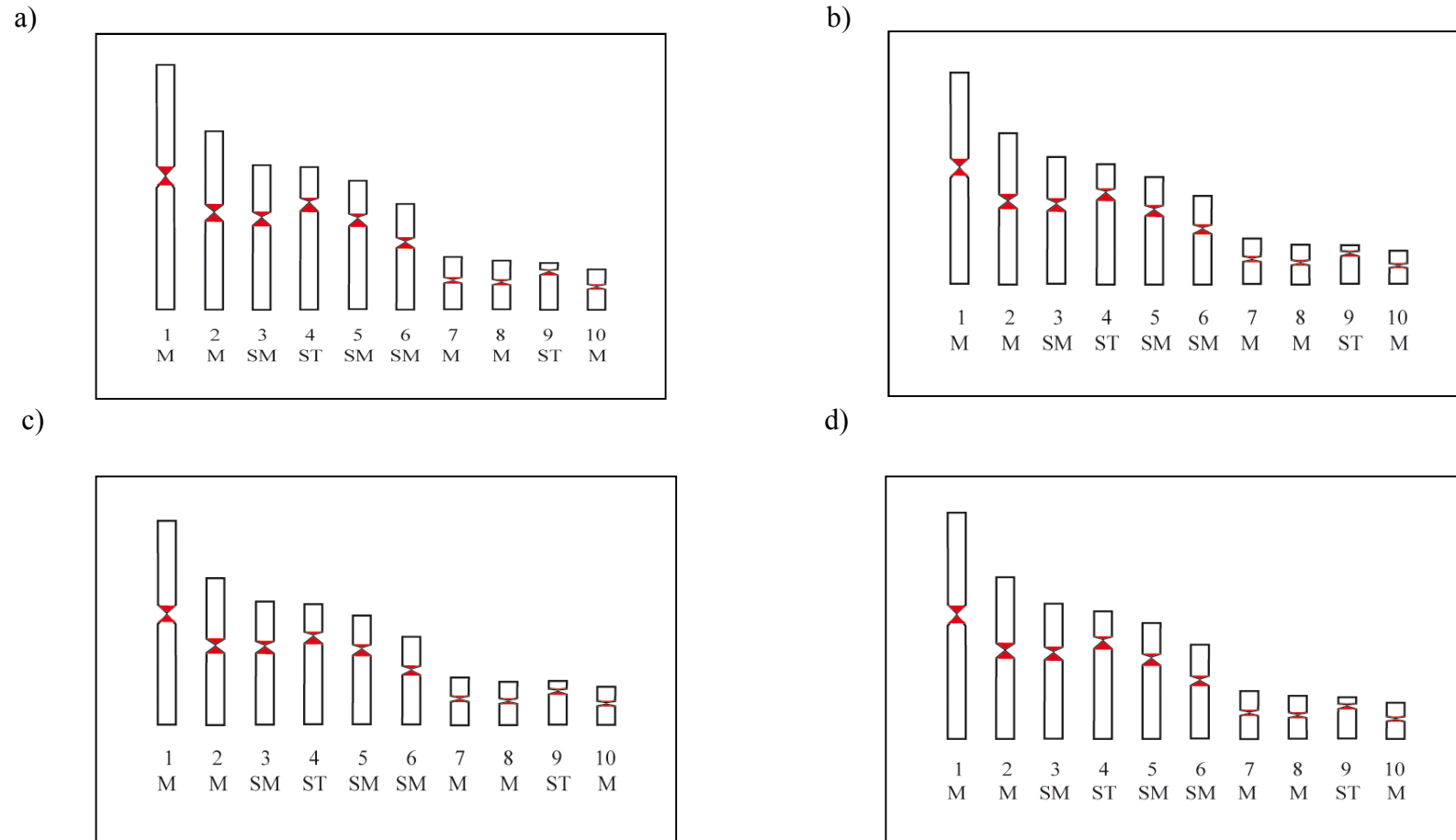
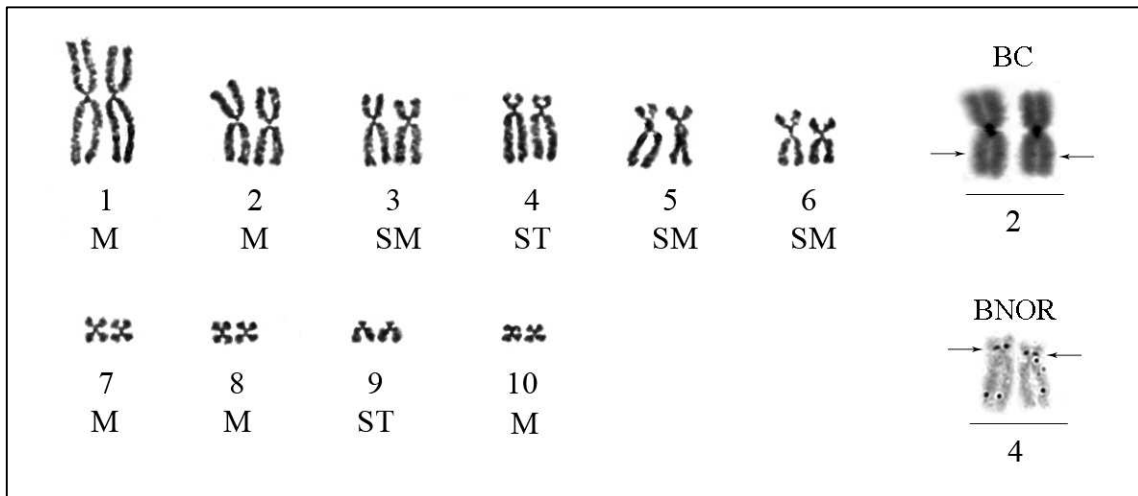


Figura 4. Idiogramas representativos de la morfología de los cromosomas mitóticos de las cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica*: a) Población 1, Laguna de Cube; b) Población 2, Quingüe; c) Población 3, Guadual de Lita; d) Población 4, Durango. (M = metacéntrico; SM = submetacéntrico; ST = subtelocéntrico).

a)



b)

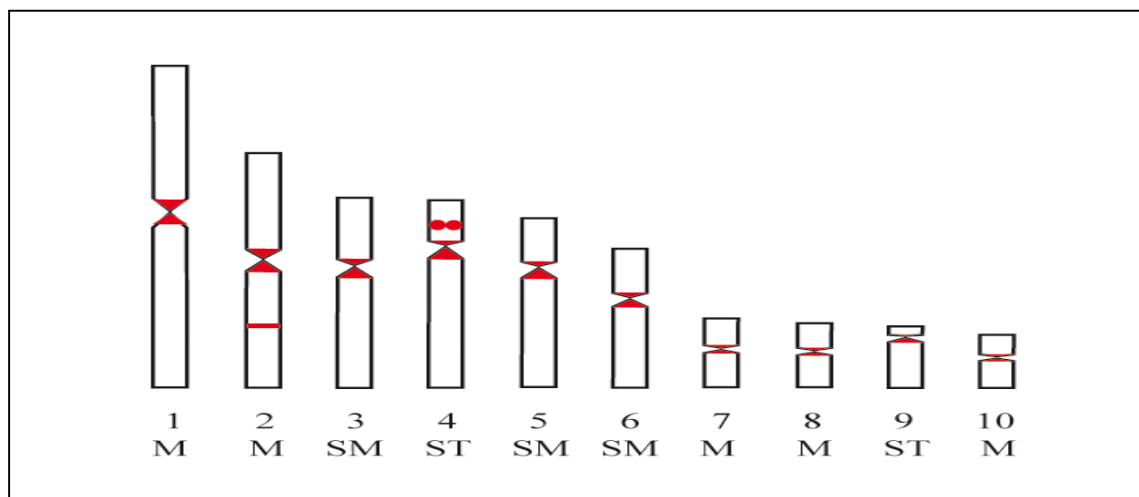
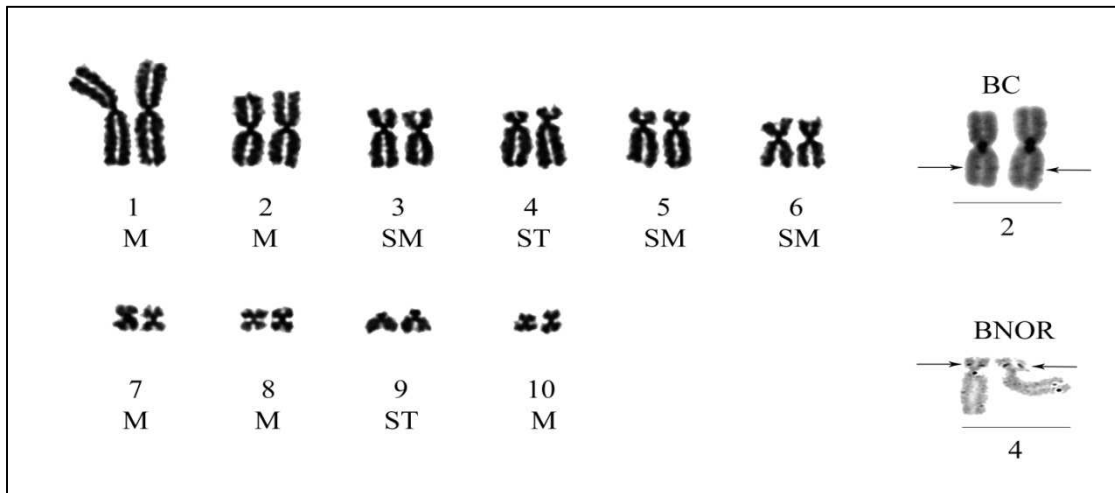


Figura 5. Cariotipo (a) e idiograma (b) representativos de distribución de bandas C y localización de NOR de *Oophaga sylvatica*, población 1, Laguna de Cube. Patrón de distribución de bandas C correspondientes a heterocromatina constitutiva (bloques de color rojo); localización de NOR (círculos rojos). Pares cromosómicos: 1, 2, 7, 8 y 10 Metacéntricos (M); 3, 5 y 6 Submetacéntricos (SM); 4 y 9 Subtelocéntrico (ST).

a)



b)

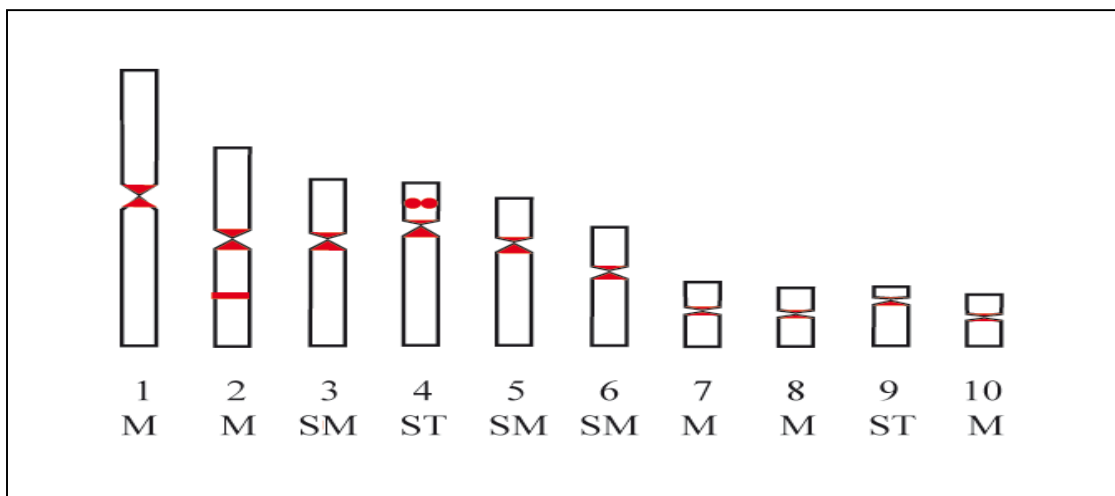
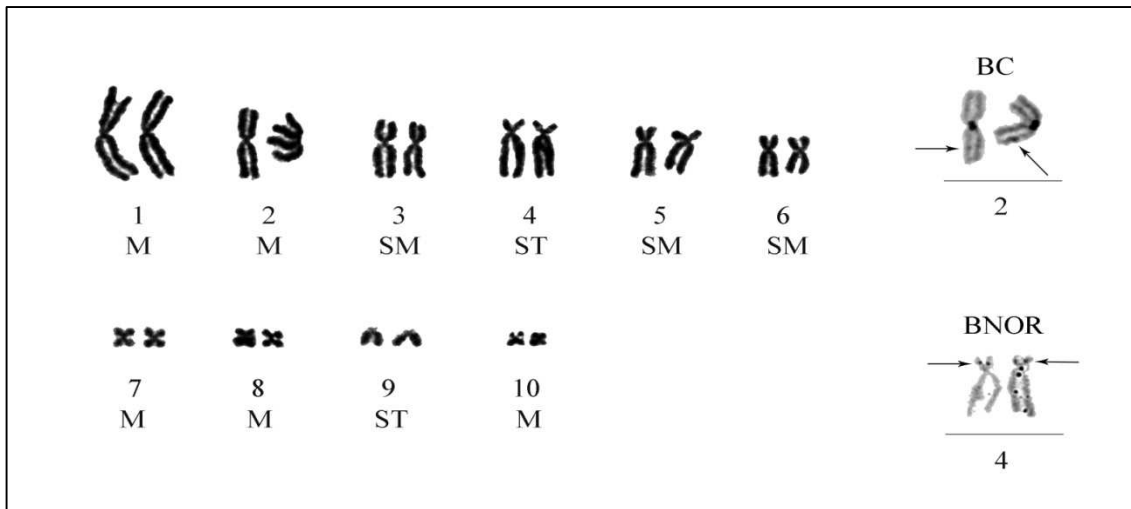


Figura 6. Cariotipo (a) e idiograma (b) representativos de distribución de bandas C y localización de NOR de *Oophaga sylvatica*, población 2, Quingüe. Patrón de distribución de bandas C correspondientes a heterocromatina constitutiva (bloques de color rojo); localización de NOR (círculos rojos). Pares cromosómicos: 1, 2, 7, 8 y 10 Metacéntricos (M); 3, 5 y 6 Submetacéntricos (SM); 4 y 9 Subtelocéntrico (ST).

a)



b)

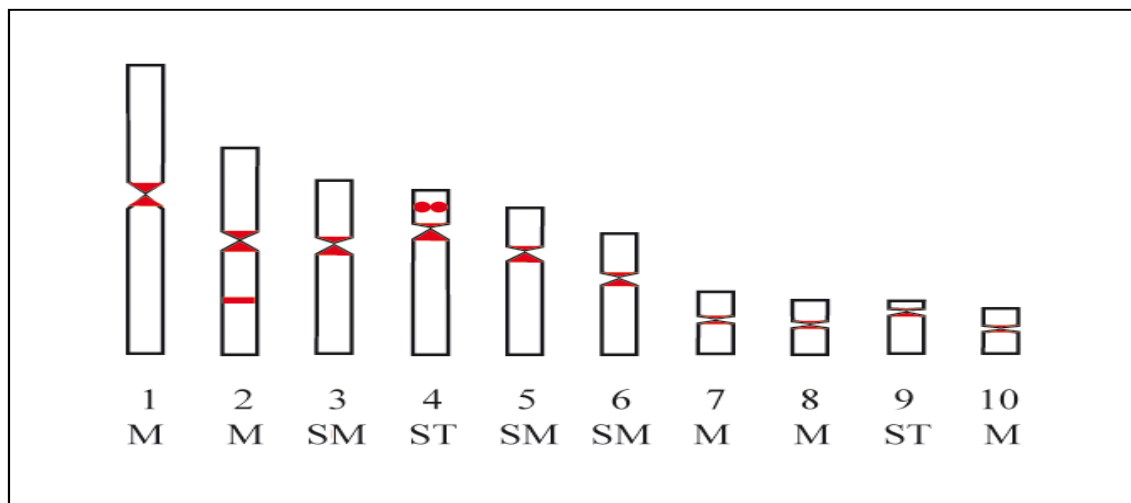
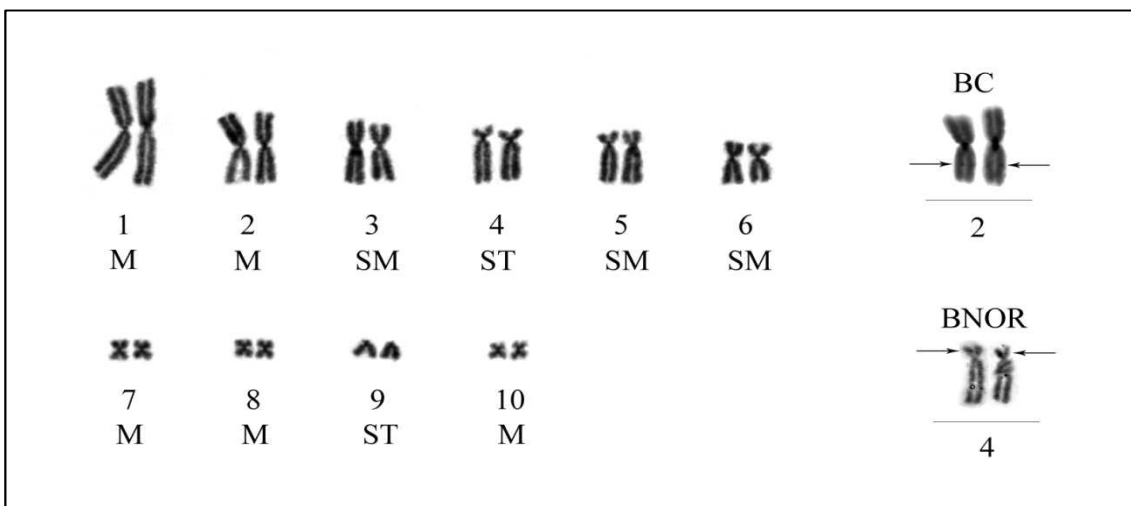


Figura 7. Cariotipo (a) e idiograma (b) representativos de distribución de bandas C y localización de NOR de *Oophaga sylvatica*, población 3, Guadual de Lita. Patrón de distribución de bandas C correspondientes a heterocromatina constitutiva (bloques de color rojo); localización de NOR (círculos rojos). Pares cromosómicos: 1, 2, 7, 8 y 10 Metacéntricos (M); 3, 5 y 6 Submetacéntricos (SM); 4 y 9 Subtelocéntrico (ST).

a)



b)

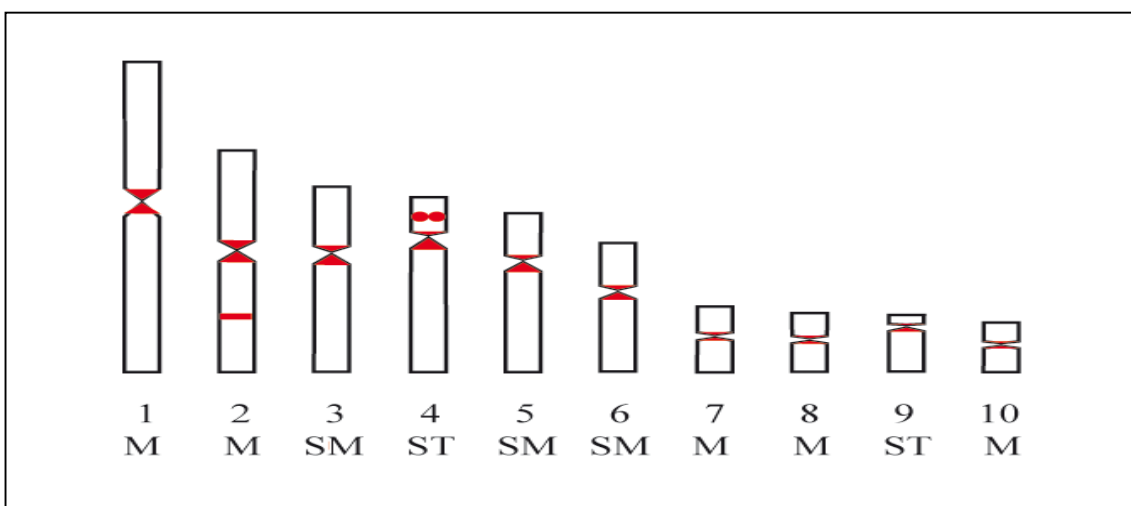


Figura 8. Cariotipo (a) e idiograma (b) representativos de distribución de bandas C y localización de NOR de *Oophaga sylvatica*, Población 4, Durango. Patrón de distribución de bandas C correspondientes a heterocromatina constitutiva (bloques de color rojo); localización de NOR (círculos rojos). Pares cromosómicos: 1, 2, 7, 8 y 10 Metacéntricos (M); 3, 5 y 6 Submetacéntricos (SM); 4 y 9 Subtelocéntrico (ST).

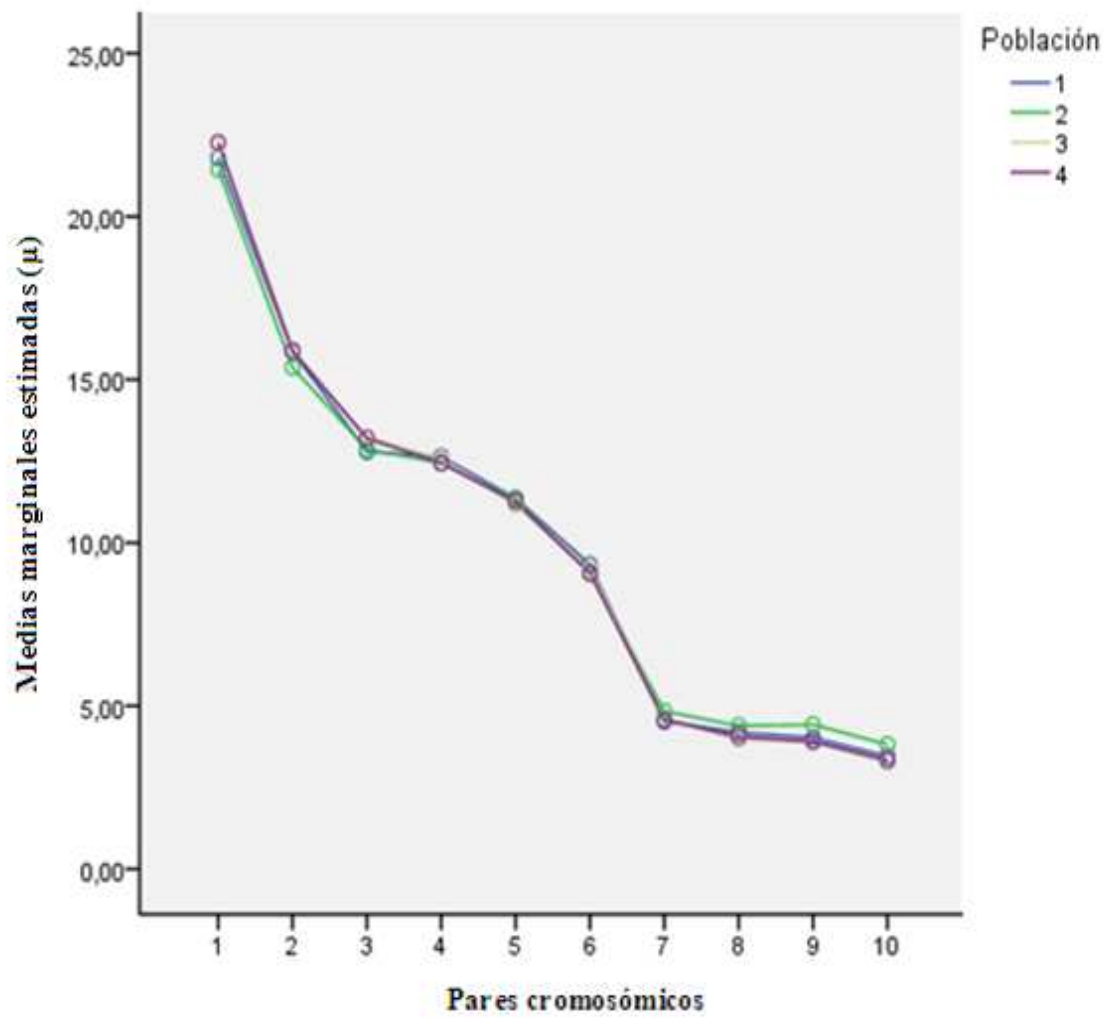


Figura 9. Medias marginales estimadas de longitud relativa promedio (LR%) de los pares cromosómicos.

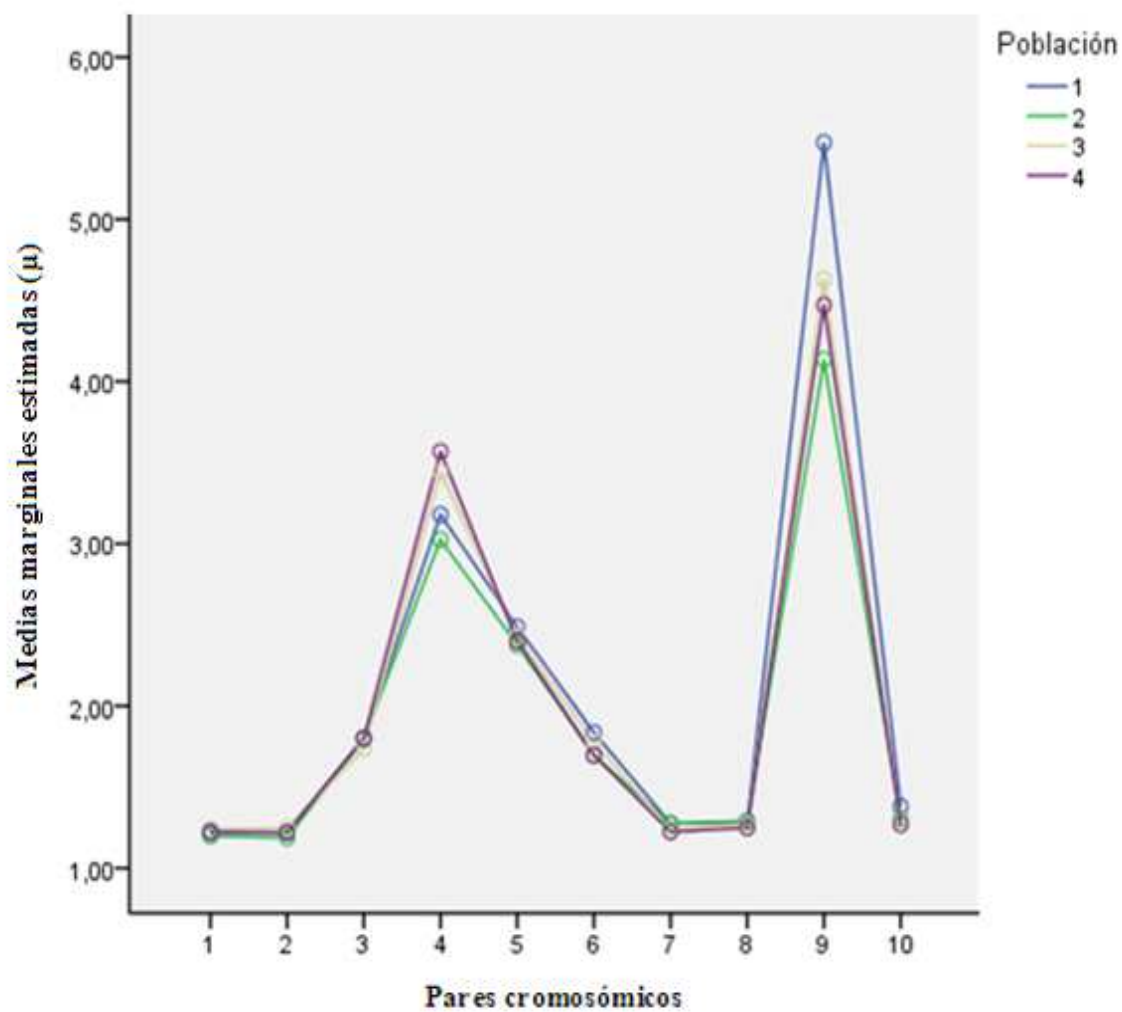


Figura 10. Medias marginales estimadas de radio centromérico (RC) de los pares cromosómicos.

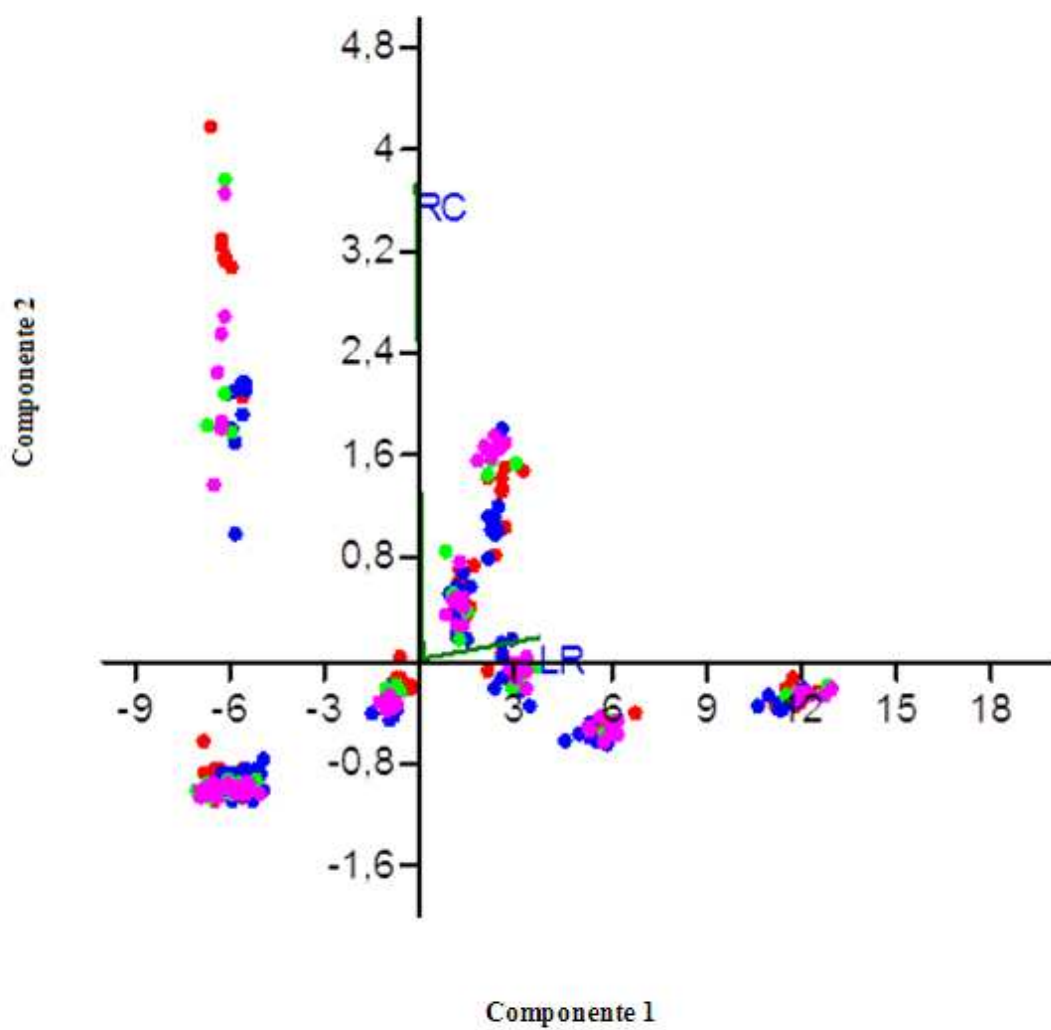


Figura 11. Análisis gráfico de componentes principales, tomando en cuenta la longitud relativa promedio (LR%) y el radio centromérico (RC).

10 TABLAS

Tabla 1. Análisis morfométrico de los cromosomas de cuatro poblaciones de la especie *Oophaga sylvatica*. (Clasificación según Green y Sessions 1991).

| | Cromosoma No. | | | | | | | | | |
|-----------|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | Población 1, Laguna de Cube | | | | | | | | | |
| LR | 21.80 | 15.88 | 12.80 | 12.64 | 11.36 | 9.33 | 4.52 | 4.19 | 4.03 | 3.46 |
| RC | 1.22 | 1.22 | 1.80 | 3.18 | 2.49 | 1.83 | 1.27 | 1.29 | 5.47 | 1.38 |
| PC | M | M | SM | ST | SM | SM | M | M | ST | M |
| | Población 2, Quingüe | | | | | | | | | |
| LR | 21.44 | 15.37 | 12.87 | 12.44 | 11.33 | 9.08 | 4.83 | 4.39 | 4.42 | 3.82 |
| RC | 1.20 | 1.19 | 1.80 | 3.03 | 2.38 | 1.70 | 1.27 | 1.28 | 4.14 | 1.30 |
| PC | M | M | SM | ST | SM | SM | M | M | ST | M |
| | Población 3, Guadual de Lita | | | | | | | | | |
| LR | 22.20 | 15.91 | 13.24 | 12.58 | 11.16 | 9.20 | 4.60 | 3.97 | 3.89 | 3.28 |
| RC | 1.24 | 1.25 | 1.74 | 3.44 | 2.43 | 1.78 | 1.24 | 1.27 | 4.63 | 1.27 |
| PC | M | M | SM | ST | SM | SM | M | M | ST | M |
| | Población 4, Durango | | | | | | | | | |
| LR | 22.27 | 15.89 | 13.20 | 12.44 | 11.26 | 9.07 | 4.59 | 4.06 | 3.91 | 3.33 |
| RC | 1.22 | 1.22 | 1.80 | 3.57 | 2.40 | 1.70 | 1.22 | 1.25 | 4.47 | 1.27 |
| PC | M | M | SM | ST | SM | SM | M | M | ST | M |

LR: longitud relativa (%), RC: radio centromérico, PC: posición del centrómero, M: metacéntrico, SM: submetacéntrico, ST: subtelocéntrico.

Tabla 2. Valores de significancia del ANOVA Factorial en DCA para la variable dependiente (LR%) Longitud Relativa Promedio.

Variable dependiente: Longitud Relativa % (LR)

| Origen | Suma de cuadrados | | Media | | |
|--------------------------|--------------------------|-----------|-------------------|-----------|-------------|
| | tipo III | GI | cuadrática | F | Sig. |
| Modelo | 39954,313 ^a | 40 | 998,858 | 13802,926 | ,000 |
| Población | 1,064E-5 | 3 | 3,546E-6 | ,000 | 1,000 |
| Pares | 8952,818 | 9 | 994,758 | 13746,267 | ,000 |
| Población * Pares | 11,057 | 27 | ,410 | 5,659 | ,000 |
| Error | 18,815 | 260 | ,072 | | |
| Total | 39973,128 | 300 | | | |

a. R cuadrado = 1,000 (R cuadrado corregida = 0,999)

Tabla 3. Valores de significancia del ANOVA Factorial en DCA para la variable dependiente (RC) Radio Centromérico.

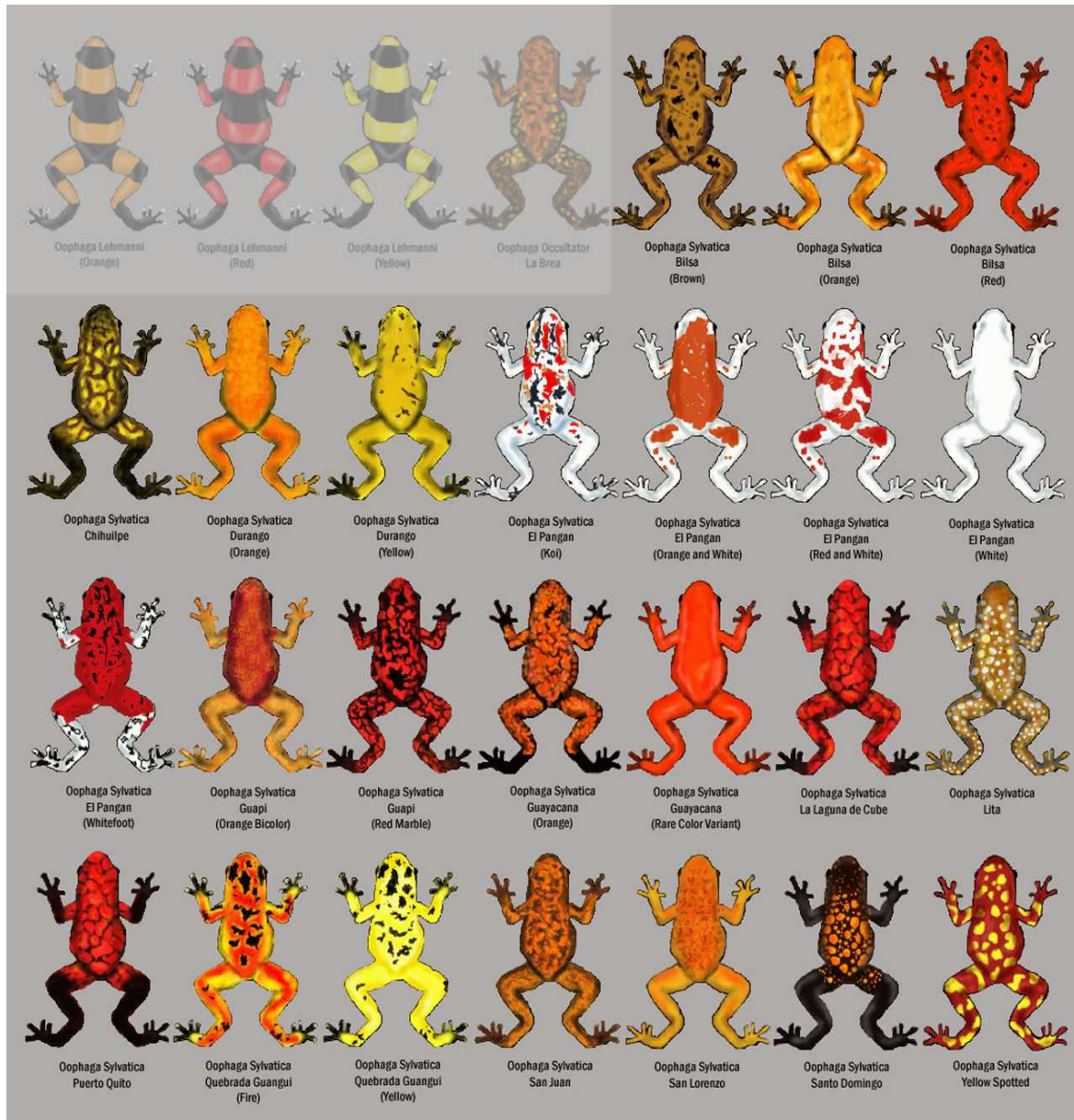
Variable dependiente: Radio Centromérico (RC)

| Origen | Suma de cuadrados tipo | | Media | | |
|--------------------------|------------------------|-----|------------|---------|------|
| | III | gl | cuadrática | F | Sig. |
| Modelo | 1583,825 ^a | 40 | 39,596 | 791,426 | ,000 |
| Población | 1,495 | 3 | ,498 | 9,960 | ,000 |
| Pares | 320,040 | 9 | 35,560 | 710,763 | ,000 |
| Población * Pares | 8,411 | 27 | ,312 | 6,226 | ,000 |
| Error | 13,008 | 260 | ,050 | | |
| Total | 1596,833 | 300 | | | |

a. R cuadrado = 0,992 (R cuadrado corregida = 0,991)

11 ANEXOS

Anexo 1. Formas y patrones de coloración de la especie *Oophaga sylvatica* (Photobucket Corporation, 2012).



Anexo 2. Ringer de anfibios.

| Ringer de Anfibios | |
|---------------------------|---------|
| NaCl | 6 g |
| KCl | 0,075 g |
| CaCl ₂ | 0,1 g |
| NaHCO ₃ | 0,1 g |

Diluido en 1 litro de agua destilada.

Anexo 3. Solución salina altamente concentrada (2xSSC).

| Solución salina altamente concentrada (2xSSC) |
|---|
| 3,5 gramos de Cloruro de Sodio (NaCl) |
| 1,76 gramos de Citrato de Sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇) |

Disolver: NaCl y Na₃C₆H₅O₇ en 200 ml de agua destilada.

Anexo 4. Solución Giemsa.

Giemsa Sigma 5%

Proporción 1:20

* (Solución Giemsa modified SIGMA y agua destilada respectivamente).

Anexo 5. Proceso de revelado de películas en blanco y negro (135 mm).**Revelador**

| | |
|----------------------------|---------|
| Revelador Microdol-X KODAK | 55,16 g |
| Agua Destilada 32°C a 38°C | 380 ml |

Fijador

| | |
|-------------------------|--------|
| Fijador (en polvo) | 68 g |
| Agua Destilada a 26,5°C | 380 ml |

Tiempos de Revelado

| TEMPERATURA | 17°C | 18°C | 19°C | 20°C |
|--------------------|---------|---------|--------|--------|
| Revelador | | | | |
| TIEMPO | 11 min. | 10 min. | 9 min. | 8 min. |
| Revelado | | | | |

Anexo 6. a) Fórmulas para determinar la morfología cromosómica, b) Nomenclatura cromosómica según la posición del centrómero en cromosomas mitóticos, según Green y Sessions, 1991.

a)

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

$$RC = \frac{q}{p}$$

Donde:

p = longitud brazo pequeño

q = longitud brazo largo

IC = índice centromérico

RC = radio centromérico

b)

| Tipo Cromosómico | Abreviación | Radio Centromérico RC | Índice Centromérico IC |
|-------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Metacéntrico | M | 1,00 - 1,67 | 0,500 - 0,375 |
| Submetacéntrico | SM | 1,68 - 3,00 | 0,374 - 0,250 |
| Subtelocéntrico | ST | 3,01 - 7,00 | 0,249 - 0,125 |
| Telocéntrico | T | 7,01 - ∞ | 0,124 - 0,000 |

Anexo 7. Datos de colección de las cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica* analizadas.

H, hembra; M, macho.

| Población | Sexo | Serie de Campo | QCAZ | Provincia | Altitud |
|------------------------|-------------|---------------------------|-------------|------------------|----------------|
| Laguna de Cube | M | 15417 | - | Esmeraldas | 360 m |
| | M | 15529 | 36286 | Esmeraldas | 360 m |
| | H | 15536 | - | Esmeraldas | 360 m |
| | M | 15602 | 36288 | Esmeraldas | 360 m |
| | M | 15603 | 36289 | Esmeraldas | 360 m |
| | H | 15816 | 44928 | Esmeraldas | 360 m |
| | H | 15866 | 47534 | Esmeraldas | 360 m |
| | M | 15867 | 47535 | Esmeraldas | 360 m |
| Quingüe | H | 15868 | 47536 | Esmeraldas | 150 m |
| | M | 15869 | 47537 | Esmeraldas | 150 m |
| | H | 15904 | 47538 | Esmeraldas | 150 m |
| | H | 15905 | 47561 | Esmeraldas | 150 m |
| | M | 15906 | 47539 | Esmeraldas | 150 m |
| | M | 15907 | 47540 | Esmeraldas | 150 m |
| | H | 15908 | 47541 | Esmeraldas | 150 m |
| | M | 15909 | 47542 | Esmeraldas | 150 m |
| | H | 15910 | 47543 | Esmeraldas | 150 m |
| | H | 15911 | 47544 | Esmeraldas | 150 m |
| Guadual de Lita | H | 26331 | 47545 | Esmeraldas | 534 m |
| | M | 26332 | 47546 | Esmeraldas | 534 m |
| | H | 26333 | 47547 | Esmeraldas | 534 m |

| | | | | | |
|----------------|---|-------|-------|------------|-------|
| | M | 26334 | 47548 | Esmeraldas | 534 m |
| Durango | M | 26337 | 47549 | Esmeraldas | 104 m |
| | M | 26338 | 47550 | Esmeraldas | 104 m |
| | M | 26339 | 47551 | Esmeraldas | 104 m |
| | M | 26340 | 47552 | Esmeraldas | 104 m |
| | H | 26341 | 47553 | Esmeraldas | 104 m |
| | H | 26342 | 47554 | Esmeraldas | 104 m |
| | M | 26343 | - | Esmeraldas | 104 m |
| | M | 26344 | - | Esmeraldas | 104 m |
| | H | 26345 | - | Esmeraldas | 104 m |

Anexo 8. Lista de especies de dendrobátidos para las que se ha establecido número cromosómico (2n) (Reinoso-Recalde, 2008).

| Familia | Especie | Número Cromosómico | Autor | Fuente - Año |
|---------------|------------------------------------|--------------------|---|---|
| Aromobatidae | <i>Allobates brunneus</i> | 24 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Aromobatidae | <i>Allobates caeruleodactylus</i> | 22 | Veiga-Menoncello A.C.P., <i>et al</i> | Hereditas/2003 |
| Aromobatidae | <i>Allobates chalcopis</i> | 22 | Kaiser, Hinrich, <i>et al</i> | Herpetologica/2003 |
| Aromobatidae | <i>Allobates femoralis</i> | 24 | Aguiar-Jr Odair, <i>et al</i> | Herpetologica/2002 |
| Aromobatidae | <i>Allobates marchesianus</i> | 22 | Veiga-Menoncello A.C.P., <i>et al</i> | Hereditas/2003 |
| Aromobatidae | <i>Allobates neblina</i> | 24 | Kaiser, Hinrich, <i>et al</i> | Herpetologica/2003 |
| Aromobatidae | <i>Allobates nidicola</i> | 22 | Veiga-Menoncello A.C.P., <i>et al</i> | Caryologia/2003 |
| Aromobatidae | <i>Allobates olfersioides</i> | 24 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Aromobatidae | <i>Allobates talamancae</i> | 24 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Dendrobatidae | <i>Ameerega flavopicta</i> | 24 | Aguiar-Jr Odair, <i>et al</i> | Herpetologica/2002 |
| Dendrobatidae | <i>Ameerega hahneli</i> | 24 | Aguiar-Jr Odair, <i>et al</i> | Herpetologica/2002 |
| Dendrobatidae | <i>Ameerega picta</i> | 24 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Dendrobatidae | <i>Ameerega trivittata</i> | 24 | Aguiar-Jr Odair, <i>et al</i> | Herpetologica/2002 |
| Aromobatidae | <i>Anomaloglossus stepheni</i> | 24 | Veiga-Menoncello A.C.P., <i>et al</i> | Caryologia/2003 |
| Aromobatidae | <i>Aromobates leopardalis</i> | 24 | Kaiser, Hinrich, <i>et al</i> | Herpetologica/2003 |
| Dendrobatidae | <i>Colostethus fraterdanieli</i> | 24 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Dendrobatidae | <i>Dendrobates auratus</i> | 18 | Rassotto Maria B., <i>et al</i> | Herpetologica/1987 |
| Dendrobatidae | <i>Dendrobates opisthomelas</i> | 22 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Dendrobatidae | <i>Dendrobates quinquevittatus</i> | 20 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Dendrobatidae | <i>Dendrobates truncatus</i> | 18 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Dendrobatidae | <i>Epipedobates anthonyi</i> | 24 | Blasco-Zúñiga A. | |
| Dendrobatidae | <i>Epipedobates boulengeri</i> | 24 | Blasco-Zúñiga A. | |
| Dendrobatidae | <i>Epipedobates machalilla</i> | 24 | Blasco-Zúñiga A. | |
| Dendrobatidae | <i>Epipedobates tricolor</i> | 24 | Blasco-Zúñiga A. | |
| Dendrobatidae | <i>Hyloxalus awa</i> | 24 | Reinoso-Recalde M. | |
| Dendrobatidae | <i>Hyloxalus bocagei</i> | 24 | Reinoso-Recalde M. | |
| Dendrobatidae | <i>Hyloxalus infraguttatus</i> | 24 | Reinoso-Recalde M. | |

| | | | | |
|---------------|-----------------------------------|----|---|---|
| Dendrobatidae | <i>Hyloxalus</i> sp. "Hola Vida" | 24 | Reinoso-Recalde M. | |
| Dendrobatidae | <i>Hyloxalus</i> sp. "Moraspungo" | 24 | Blasco-Zúñiga A. | |
| Dendrobatidae | <i>Hyloxalus subpunctatus</i> | 24 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Dendrobatidae | <i>Hyloxalus vertebralis</i> | 24 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Aromobatidae | <i>Mannophryne herminae</i> | 24 | Kaiser, Hinrich, <i>et al</i> | Herpetologica/2003 |
| Aromobatidae | <i>Mannophryne olmonae</i> | 24 | Kaiser, Hinrich, <i>et al</i> | Herpetologica/2003 |
| Aromobatidae | <i>Mannophryne trinitatis</i> | 24 | Kaiser, Hinrich, <i>et al</i> | Herpetologica/2003 |
| Dendrobatidae | <i>Oophaga granulifera</i> | 20 | Rassotto Maria B., <i>et al</i> | Herpetologica/1987 |
| Dendrobatidae | <i>Oophaga histriónica</i> | 20 | Rassotto Maria B., <i>et al</i> | Herpetologica/1987 |
| Dendrobatidae | <i>Oophaga pumilio</i> | 20 | Rassotto Maria B., <i>et al</i> | Herpetologica/1987 |
| Dendrobatidae | <i>Oophaga sylvatica</i> | 20 | Salazar, F. & Blasco, A. | |
| Dendrobatidae | <i>Dendrobates opisthomelas</i> | 22 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |
| Dendrobatidae | <i>Phyllobates lugubris</i> | 24 | Rassotto Maria B., <i>et al</i> | Herpetologica/1987 |
| Dendrobatidae | <i>Rheobates palmatus</i> | 24 | Bogart, James P. (cap. 11-Green and Sessions) | Amphibian Cytogenetics and Evolution - 1991 |

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Carlos Andrés Velázquez Zambrano, con C.I. 171189837-7, autor del trabajo de graduación “Análisis cariotípico de cuatro poblaciones de *Oophaga sylvatica* (Anura: Dendrobatidae)” previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Escuela Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, a 5 de diciembre del 2012

Sr. Carlos Andrés Velázquez Zambrano

C.I. 171189837-7