

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Centro de Investigación para la Salud en América Latina  
(CISeAL)**

**Caracterización citogenética de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas*  
(Anura: Centrolenidae)**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias  
Biológicas.**

**MARÍA BELÉN TRUJILLO TORRES**

**Quito, 2018**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata María Belén Trujillo Torres 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, 2 de Enero de 2018

A mis padres  
por su amor, trabajo y sacrificio.

## AGRADECIMIENTOS

A mis Padres por el amor y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, se han convertido en mi gran ejemplo de vida.

A la Mtr. Miryan Rivera y Ailin Blasco por el apoyo, afecto, confianza y dirección brindada a lo largo del presente estudio.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por el apoyo financiero mediante el proyecto “Caracterización Citogenética de anfibios de las familias Centrolenidae y Plethodontidae” el cual permitió la elaboración del presente estudio.

Al Museo de Zoología de Vertebrados de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) por su contribución con las identificaciones taxonómicas.

A Yerka Sagredo, Nicolás del Castillo, Santiago García por su enorme ayuda brindada en las salidas al campo.

A mis compañeros de laboratorio Vero, Vale y Migue por sus consejos, apoyo y risas compartidas.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	<b>X</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>3.1. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
3.1.1. OBJETIVO GENERAL	6
3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>7</b>
<b>4.1. COLECTA DE ESPECÍMENES</b>	<b>7</b>
<b>4.2. MANTENIMIENTO DE ESPECÍMENES</b>	<b>7</b>
<b>4.3. PREPARACIONES CROMOSÓMICAS</b>	<b>8</b>
4.3.1. INHIBICIÓN MITÓTICA	8
4.3.2. HIPOTONIZACIÓN	8
4.3.3. FIJACIÓN	8
4.3.4. SUSPENSIÓN CELULAR	9
<b>4.4. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS</b>	<b>9</b>
4.4.1. GOTEIO DE SUSPENSIÓN CELULAR	9
<b>4.5. TRATAMIENTO DE LAS PLACAS</b>	<b>9</b>
4.5.1. TINCIÓN CON GIEMSA	9
4.5.2. BANDEO C	10
4.5.3. TINCIÓN DAPI	10
4.5.4. BANDEO NOR	10
<b>4.6. REVISIÓN DE PLACAS</b>	<b>11</b>
4.6.1. REVISIÓN DE PLACAS EN TINCIÓN GIEMSA	11
4.6.2. REVISIÓN DE PLACAS EN BANDEO C Y NOR	11
4.6.3. REVISIÓN DE PLACAS EN TINCIÓN DAPI	11
<b>4.7. OBTENCIÓN DE IMÁGENES</b>	<b>11</b>

<b>4.8. ELABORACIÓN DE CARIOTIPOS E IDEOGRAMAS</b>	<b>12</b>
4.8.1. EDICIÓN DE IMÁGENES	12
4.8.2. MEDICIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA	12
4.8.3. ELABORACIÓN DEL IDEOGRAMA	13
<b>4.9. MUESTREO CELULAR</b>	<b>13</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>14</b>
<b>5.1. MORFOLOGÍA Y NÚMERO CROMOSÓMICO</b>	<b>14</b>
5.1.1. NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA DE <i>Teratohyla ameliae</i> .	14
5.1.2. NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA DE <i>Teratohyla midas</i>	14
<b>5.2. LONGITUD RELATIVA PROMEDIO</b>	<b>15</b>
<b>5.3. BANDEO CROMOSÓMICO</b>	<b>15</b>
5.3.1. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE BANDAS C.	15
5.3.2. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE TINCIÓN DAPI EN <i>Teratohyla ameliae</i> .	15
5.3.3. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE TINCIÓN DAPI EN <i>Teratohyla midas</i> .	15
5.3.4. PATRÓN DE BANDAS NOR.	16
<b>5.4. MUESTREO CELULAR</b>	<b>16</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>17</b>
<b>6.1. NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA</b>	<b>17</b>
<b>6.2. BANDEOS CROMOSÓMICOS</b>	<b>19</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>22</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>23</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>24</b>
<b>10. FIGURAS</b>	<b>30</b>
<b>11. TABLAS</b>	<b>30</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Especímenes de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas*.

**Figura 2.** Mapa del Ecuador.

**Figura 3.** Cariotipos con tinción Giemsa de a. *Teratohyla ameliae* y b. *Teratohyla midas*.

**Figura 4.** Cariotipos con Bando C de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas*.

**Figura 5.** Cariotipos y núcleos de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas* en bando fluorescente DAPI.

**Figura 6.** Cariotipos y núcleo de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas* con tinción argéntica (NOR).

**Figura 7.** Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de *Teratohyla ameliae*.

**Figura 8.** Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de *Teratohyla midas*.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Datos de colección de los individuos analizados de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas*.

**Tabla 2.** Datos morfométricos de los cromosomas de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas*.

**Tabla 3.** Valores promedio de longitudes relativas de los cromosomas mitóticos de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas*.

**Tabla 4.** Comparación morfológica de cromosomas mitóticos del clado *Teratohyla*.

**Tabla 5.** Ubicación de la Región del Organizador Nucleolar (NOR) en los pares cromosómicos del clado *Teratohyla*.

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Protocolos para preparar las diferentes soluciones utilizadas.

**Anexo 2.** Fórmulas para determinar índice centromérico (IC) y radio centromérico (RC)

**Anexo 3.** Parámetros para la determinación de morfología cromosómica.

**Anexo 4.** Tabla de peso de los individuos *Teratohyla ameliae* y *T. midas* al momento de colchinizarse.

**Anexo 5.** Filogenia de la familia Centrolenidae.

**Anexo 6.** Especies de las familias Centrolenidae y Allophrynidae examinadas citogenéticamente por Schmid y colaboradores (2014).

**Anexo 7.** *Teratohyla pulverata*. Cariotipo y ubicación de la banda NOR.

**Anexo 8.** *Teratohyla spinosa*. Cariotipo y ubicación de la banda NOR.

## 1. RESUMEN

El Ecuador es uno de los países más biodiversos del mundo, posee aproximadamente dos especies de anfibios por cada 1000 km cuadrados y cuenta con 592 especies de anuros agrupadas en 15 familias. Entre ellas la familia Centrolenidae está representada en Ecuador por 58 de las 155 especies descritas en el mundo. Estudios cromosómicos en Centrolenidae están disponibles tan solo para 19 especies. La presente investigación se enfocó en caracterizar citogenéticamente a *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas* (Anura: Centrolenidae). Para ello se determinó el número y morfología de los cromosomas mitóticos, ubicación de la región del organizador nucleolar (NOR), distribución de bandas C y DAPI. Las especies analizadas poseen 20 cromosomas en estado diploide, número cromosómico conservado para la familia Centrolenidae. En ambas especies se determinaron 9 pares cromosómicos metacéntricos además de un par submetacéntrico; en cuanto al bandeo C y DAPI se encontró variación en la región NOR: en *T. ameliae* se localizó en el par 4 y en *T. midas* en el par 2. La distribución del NOR en distintos pares cromosómicos sugiere que ocurrieron inversiones y translocaciones de genes posteriores a la divergencia entre ambas especies. Con los datos cromosómicos obtenidos se ratifica la importancia de la citogenética como herramienta para la caracterización, clarificación o ratificación de la taxonomía y filogenia de las especies.

Palabras clave: Centrolenidae, cromosomas, citogenética, bandas C y DAPI

## 2. ABSTRACT

Ecuador is one of the most biodiverse countries in the world, has approximately two species of amphibians per 1000 square km and has 592 species of anurans grouped into 15 families. Among them the family Centrolenidae is represented in Ecuador by 58 of the 155 described species in the world. Chromosome studies in Centrolenidae are available for only 19 species. The present investigation focused on cytogenetically characterizing *Teratohyla ameliae* and *Teratohyla midas* (Anura: Centrolenidae). For this, the number and morphology of the mitotic chromosomes, location of the nucleolar organizer region (NOR), distribution of C and DAPI bands were determined. The analyzed species possess 20 chromosomes in a diploid state, a chromosome number conserved for the family Centrolenidae. In both species, 9 metacentric chromosomal pairs were determined in addition to a submetacentric pair; as for the C and DAPI banding, variation was found in the NOR region: in *T. ameliae* it was located in pair 4 and in *T. midas* in pair 2. The distribution of NOR in different chromosomal pairs suggests that inversions and translocations of genes after the divergence between both species. With the obtained chromosomal data, the importance of cytogenetics as a tool for the characterization, clarification or ratification of the taxonomy and phylogeny of the species is ratified.

Key words: Centrolenidae, chromosomes, cytogenetic, C and DAPI banding

### 3. INTRODUCCIÓN

Ecuador, uno de los países más diversos del mundo (Bravo, 2013), representa el 1.5% de la superficie de América del Sur (Sierra, Campos, y Chamberlin, 2002). En los últimos años se ha empezado a usar el término megadiversidad para países que cuentan con los índices más altos de diversidad biológica del planeta. De acuerdo a la Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, existen más de 17 países donde se encuentra cerca del 70% de la biodiversidad del planeta, encontrándose en regiones tropicales como África, Asia y América Latina (Bravo, 2013).

El continente americano al extenderse de norte a sur abarca gran extensión y posee variedad de regiones biogeográficas que concentran una amplia diversidad biológica como es el caso del Ecuador, cuya biodiversidad se debe a la convergencia de diferentes regiones biogeográficas. (Sierra et al., 2002).

En los últimos años se ha visto que a pesar de la biodiversidad del Ecuador su estado de conservación es crítico a nivel global, por lo que Sierra y colaboradores (2002) sugieren usar un taxón como indicador de la diversidad general; sin embargo, se hace necesario tomar en cuenta que la alta diversidad de un grupo no necesariamente coincidirá con la alta diversidad de otros grupos. Aún así, por su distribución, alta diversidad e incluso por encontrarse amenazados, los anfibios representan un taxón de indicadores válido para la biodiversidad (Sierra et al., 2002).

El Ecuador posee aproximadamente dos especies de anfibios por cada 1000 km cuadrados, teniendo la tercera anfibiofauna con mayor número de especies a nivel mundial. Posee 592 especies reportadas, de las cuales 560 son anuros, por lo que éste constituye el orden de anfibios más numeroso del Ecuador (Ron, Yáñez – Muñoz, Merino – Viteri, Ortiz, 2017).

Por la sensibilidad de los anfibios frente a alteraciones del hábitat (mayor susceptibilidad a radiación ultravioleta, destrucción y fragmentación del hábitat, introducción de especies no nativas, lluvia ácida, contaminación ambiental, entre otras) ocurren declinaciones poblacionales que conllevan a la disminución de la biodiversidad de especies de anuros (Piñero Bonilla, 2003). Mientras mayor conocimiento se tenga sobre

este importante grupo taxonómico se podrá contribuir de mejor manera a su conservación. Es por ello que ciencias como la Citogenética, proporcionan datos que permiten incrementar información sobre su biología.

La Citogenética, ciencia que estudia los cromosomas y los fenómenos celulares (Green y Sessions, 1991a; Blasco, 2007) permite comprender mejor el proceso evolutivo de una especie (Lacadena, 1996) ya que aborda el análisis de divergencias y determinación del tamaño del genoma, caracterización de número cromosómico; identificación de alteraciones cromosómicas; historia cariológica de los taxa; esclarecimiento en taxonomías y relaciones filogenéticas de un grupo (Lacadena, 1996).

El uso de la Citogenética como herramienta para la caracterización de especies, es de gran ayuda en casos en que los datos morfológicos resultan insuficientes en el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas de taxa específicos (Sáez y Cardoso, 1978). Tal es el caso de la familia Centrolenidae, cuya filogenia basada en datos morfológicos fue revisada usando evidencia genética (Guayasamin, Castroviejo-Fisher, Ayarzagüena, Trueb, y Vilà, 2008) los mismos que podrían reforzarse, con estudios citogenéticos.

Las ranas de la familia Centrolenidae, conocidas como ranas de cristal, están distribuidas en el neotrópico, desde el norte de México hasta Bolivia, encontrándose un grupo aislado en el sureste de Brasil hasta el noreste de Argentina (Guayasamin, et al., 2009). Habitan en tierras bajas a orillas de riachuelos, dentro de bosque húmedo o nublado en ambos flancos de la Cordillera de los Andes (Ron et al., 2017). Suelen depositar sus huevos en el margen, en el haz, el envés, o en la punta de las hojas, o en rocas cercanas a cascadas y riachuelos (Guayasamin et al., 2009).

De acuerdo a estudios morfológicos se han descrito hasta el momento, 155 especies de centrolénidos en el mundo (Frost, 2016) y 58 en el Ecuador (Ron et al., 2017). Del total de ellas, se han realizado estudios cromosómicos únicamente en 19 especies.

Los miembros de esta familia tienen varios caracteres compartidos que incluyen: transparencia ventral parcial o completa, fusión entre la tibia y la fíbula parcial o completa y la presencia de T o Y terminal de las falanges (Guayasamin et al., 2009). Dichos

caracteres dificultan su clasificación morfológica, por lo que datos citogenéticos podrán ayudar a clarificar su filogenia.

En la familia Centrolenidae se encuentra el género *Teratohyla* descrito en 1951 por Taylor (Frost, 2016), distribuido en tierras bajas (con alturas < 1000 m) de América Central y el Pacífico, además en la Amazonía de Sur América (Guayasamin et al., 2009). Al ocurrir el levantamiento de Los Andes y formarse esta barrera vicariante, ocurrió especiación en la formación del lado oriental de la cordillera lo que fue decisivo para especies de tierras bajas durante el plioceno temprano (Guayasamin et al., 2009). A pesar de poseer este aislamiento la morfología general (ausencia de espina humeral, membrana moderada o extensa entre falanges III y IV, huesos de verde oscuro a pálido, peritoneo ventral blanco o completamente transparente) para *Teratohyla* se mantiene, lo que también sugiere que su nicho ha sido conservado (Guayasamin et al., 2009).

El clado *Teratohyla*, está conformado por cinco especies, de las cuales, cuatro están presentes en el Ecuador (Frost, 2016) y únicamente en dos de ellas: *Teratohyla spinosa* y *T. pulverata* se han realizado estudios citogenéticos que reportan un número cromosómico  $2n = 20$  (García, 2013).

Ya que existe poca información sobre los cromosomas del género *Teratohyla*, la presente investigación pretende aportar datos citogenéticos de las otras dos especies ecuatorianas: *Teratohyla midas* y *T. ameliae*. Estas especies presentan similitud fenotípica, lo que dificulta estudios taxonómicos, por lo que la información citogenética, que incluya la identificación del número y la morfología cromosómica, presencia de diferentes tipos de heterocromatina, etc., será una herramienta útil para conocer las relaciones evolutivas de este clado.

### 3.1. OBJETIVOS

#### 3.1.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar citogenéticamente a *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas* (Anura: Centrolenidae).

#### 3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la longitud relativa promedio, el número y morfología de los cromosomas mitóticos de *Teratohyla ameliae* y *T. midas*.
- Determinar la distribución de heterocromatina constitutiva y de la región del organizador nucleolar mediante bandeo C, DAPI e impregnación argéntica.
- Comparar los cariotipos de *Teratohyla ameliae* y *T. midas* con la información cromosómica de las otras especies del género *Teratohyla* (*T. spinosa* y *T. pulverata*).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Entre los especímenes analizados se encuentran cinco individuos de *Teratohyla amelie* y cuatro de *Teratohyla midas* (Figura 1), provenientes de la provincia de Pastaza. Los individuos fueron identificados en el Museo de Zoología de Vertebrados de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ), donde fueron depositados (Tabla 1) después de ser procesados en el Laboratorio de Investigación de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) del Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) de la PUCE.

### 4.1. COLECTA DE ESPECÍMENES

Los individuos fueron colectados en Ecuador, provincia de Pastaza, *Teratohyla amelie* se colectó en la localidad de Zanja Arajuno 1° 21' 6" S; 7° 7,51' 9" W en un remanente boscoso de la alta Amazonía, y *Teratohyla midas* en la localidad de Zanja Arajuno 1° 35' 8" S; 7° 7,86' 0" W en el sendero Oglán Alto dentro de la Estación Científica Juri Juri Kaswaiy (Figura 2).

Cada individuo fue transportado en tarrinas plásticas con condiciones óptimas de humedad y temperatura, hasta las dependencias del LICBA.

### 4.2. MANTENIMIENTO DE ESPECÍMENES

En el Laboratorio de Investigación de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios de la PUCE, se mantuvo a los individuos en tarrinas plásticas individuales, con humedad constante, a temperatura aproximada de 24 °C. Se los alimentó con grillos (*Grillus sp.*) tipo 2.

### **4.3. PREPARACIONES CROMOSÓMICAS**

Cada individuo fue alimentado 2 veces por semana continuamente hasta confirmar que hayan defecado por lo menos una vez cada dos días, para asegurar que las células del tracto digestivo estuvieran en constante división mitótica y poder realizar los preparados cromosómicos.

#### **4.3.1. INHIBICIÓN MITÓTICA**

Para inhibir la división celular de las microvellosidades intestinales en metafase, se inyectó intraperitonealmente 0,1 ml de colchicina al 2% en Ringer de anfibios (Anexo 1), por cada 0,1 g de peso del animal. Al cabo de 4 horas los individuos colchicinados fueron sacrificados mediante hipotermia.

Se disectaron los individuos bajo el estereomicroscopio Zeiss modelo Stemi 1000; se extrajo el duodeno y abriéndolo de manera longitudinal, se eliminaron los desechos de su interior lavándolo con Ringer de anfibios.

Al terminar de limpiar los desechos del intestino, se procedió a la hipotonización y fijación, usando los protocolos de Egozcue (1971), Schmid (1978) con modificaciones.

#### **4.3.2. HIPOTONIZACIÓN**

Una vez que se obtuvo el tejido limpio, se lo colocó en una caja Petri. Allí fue sometido a la solución hipotonizadora (Ringer de anfibios-agua destilada, en proporción 1:4) a 37 °C durante 35 minutos.

#### **4.3.3. FIJACIÓN**

Al retirar la solución hipotonizadora, el intestino fue transferido a una caja Petri con 2 ml fijador (metanol : ácido acético 3:1) recién preparado y frío por 10 minutos. Se desechó el fijador usado y se colocó nuevamente 2 ml de solución fijadora nueva.

#### **4.3.4. SUSPENSIÓN CELULAR**

Utilizando dos paletas plásticas, se raspó el interior del intestino previamente sometido a la solución fijadora para separar las microvellosidades que fueron colocadas en un tubo cónico de 15 ml con 5 ml más de solución fijadora, posteriormente se pipeteó el contenido del tubo hasta que las células se separaron, obteniendo una solución uniforme.

Se centrifugó la muestra por diez minutos a 1500 rpm y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, el contenido celular fue trasladado a un tubo eppendorf de 2 ml y conservado en solución fijadora a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS**

##### **4.4.1. GOTEADO DE SUSPENSIÓN CELULAR**

Se lavaron varias placas portaobjetos nuevas con jabón y metanol absoluto, para eliminar cualquier tipo de impurezas que pudieran interferir con el análisis, posteriormente, las placas se secaron en el horno a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Las placas rotuladas fueron colocadas sobre un vaso de precipitación de 250 ml con agua caliente y con ayuda de una pipeta Pasteur se goteó de 3 a 4 gotas de suspensión celular por placa a una altura de 1,5 m. Finalmente se dejó secar las placas a temperatura ambiente.

#### **4.5. TRATAMIENTO DE LAS PLACAS**

##### **4.5.1. TINCIÓN CON GIEMSA**

Para la tinción se sumergieron las placas durante 10 minutos en Giemsa diluido en agua destilada en proporción 1:20 (Anexo 1). Se enjuagó con abundante agua destilada y se secó a temperatura ambiente.

Las placas se dejaron madurar por un mínimo de 7 días a temperatura ambiente para proseguir con los protocolos correspondientes.

#### **4.5.2. BANDEO C**

Se trabajó en base al protocolo de Sumner (1972) con modificaciones. Las placas sin tinción fueron colocadas en cupplins con HCL al 0,2 N a temperatura ambiente, por 15 minutos y posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada. Las placas fueron sometidas a una solución saturada de hidróxido de bario por un tiempo de 30 segundos a 1 minuto (dependiendo de la especie) a 58 °C, para luego ser lavadas con la solución de HCL al 0,2 N. Por último, se colocaron a las placas en solución 2xSSC (Anexo 1) en baño maría a 60 °C por 30 minutos y se enjuagaron en agua destilada para su posterior tinción con Giemsa.

#### **4.5.3. TINCIÓN DAPI**

Se siguió el protocolo de Schweizer (1980) con modificaciones. A cada placa se la sometió durante 1 minuto al tampón McILvaine. Seguidamente, se las colocó en la solución DAPI (4-6 diamidino-2- fenilindol) por 15 minutos. se enjuagaron con abundante agua destilada durante 3 minutos, para posteriormente colocar una gota de solución de sacarosa saturada (Vecta Shield).

#### **4.5.4. BANDEO NOR**

Se trabajó con el protocolo de Howell y Black (1980) con modificaciones. Una vez desteñidas con fijador, en cada placa se colocó solución de nitrato de plata al 50% y solución de gelatina al 2%, en proporciones 2:1 respectivamente. Las muestras preparadas se incubaron a 60 °C por aproximadamente 8 minutos o hasta obtener una coloración marrón ámbar. Cuando se obtuvo el tono deseado en la solución que cubre a la placa, se lavó con abundante agua milli Q y se secó a temperatura ambiente.

El tiempo requerido en cada procedimiento de bandeo cromosómico es diferente para cada especie.

## **4.6. REVISIÓN DE PLACAS**

### **4.6.1. REVISIÓN DE PLACAS EN TINCIÓN GIEMSA**

Se utilizó el microscopio Zeiss modelo Axioskop 2 plus - HAL 100 de contraste de fase. Para la exploración de metafases, se utilizaron los lentes objetivos de 10X y 20X así como el optobar de 1,6X. En los núcleos metafásicos encontrados, se estableció el número de cromosomas que poseía cada núcleo, y se registró dicho dato en cada placa.

### **4.6.2. REVISIÓN DE PLACAS EN BANDEO C Y NOR**

La localización de bandas cromosómicas C y NOR, se efectuó en el microscopio de contraste de fases antes mencionado, utilizando el lente objetivo 63X y los optobares de 1,6X y 2,5X. Se llevó el respectivo registro fotográfico de cada metafase encontrada.

### **4.6.3. REVISIÓN DE PLACAS EN TINCIÓN DAPI**

Para la ubicación de bandas DAPI+ en los cromosomas, se utilizó un fotomicroscopio de fluorescencia Olympus DP72 modelo U-TV0.5XC-3. Se utilizaron los lentes objetivos de 10X, 40X y 100X y filtro de fluorescencia DAPI. En la foto respectiva, se registraron las bandas encontradas.

## **4.7. OBTENCIÓN DE IMÁGENES**

Las mejores metafases encontradas de cada individuo en tinción Giemsa, bandeo C y bandeo NOR, se fotografiaron con la cámara Cannon PowerShot A640 de 10 megapíxeles adaptada al microscopio Zeiss modelo Axioskop 2 plus - HAL 100, utilizando el objetivo 63X y los optobares 1,6X y 2,5X además se usaron los filtros azul y verde. Se fotografiaron las metafases que ostentaban el set cromosómico completo.

Para la realización de imágenes sometidas a tinción DAPI se utilizó una cámara incorporada al fotomicroscopio Olympus DP72 modelo U-TV0.5XC-3, empleando el

objetivo de 100X. Se fotografiaron las metafases que tenían el set cromosómico completo y se las almacenó en una computadora acoplada al microscopio.

## **4.8. ELABORACIÓN DE CARIOTIPOS E IDEOGRAMAS**

### **4.8.1. EDICIÓN DE IMÁGENES**

Las fotografías se editaron mediante el software Adobe Photoshop CC 2017 para Macintosh. Se efectuaron arreglos en el contraste y brillo de cada fotografía dependiendo de cada imagen. Se recortaron los cromosomas de las metafases fotografiadas y se los trasladó a un documento en formato PSD. Se organizaron los cromosomas de manera descendente conforme a su longitud. Consecutivamente, se realizó una copia en formato JPG del documento.

### **4.8.2. MEDICIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA**

Se utilizó el software AxioVision versión 4.4 para PC (Zeizz, 2005) con las escalas correspondientes previamente ingresadas en el programa. Las medidas fueron tomadas a partir del centrómero en el orden: brazo pequeño – brazo largo de cada cromosoma, la medida del brazo pequeño (p) se obtuvo a partir del comienzo del brazo hasta el centrómero, mientras que la medida del brazo largo (q) se obtuvo midiendo desde el centrómero hasta el final del brazo. El documento previamente obtenido, se importó a formato JPG.

Se ingresaron las medidas cromosómicas obtenidas en matrices anteriormente diseñadas en Excel. En dichas matrices se determinó el índice centromérico (IC), el radio centromérico (RC) y longitud relativa promedio (LR) de cada cromosoma según la nomenclatura propuesta por Green y Sessions (1991b) (Anexo 2). Se equiparó la morfología cromosómica con la nomenclatura propuesta por Green y Sessions (1991b) (Anexo 3) y se estableció el cariotipo de cada especie.

### **4.8.3. ELABORACIÓN DEL IDEOGRAMA**

Para la construcción del ideograma representativo de cada especie, se usaron los valores de longitud relativa promedio (LR) de cada par cromosómico ordenándolos de manera descendente; además, se incluyó el patrón de bandas C, DAPI y la ubicación del NOR. Para el efecto, se diseñó el ideograma en el programa Adobe Illustrator CC 2017 para Macintosh.

### **4.9. MUESTREO CELULAR**

Se trabajó con cinco especímenes de *Teratohyla ameliae* y cuatro de *Teratohyla midas*. Se examinaron 15 núcleos por individuo en cada especie, de los que se obtuvieron las correspondientes medidas del radio centromérico (RC), índice centromérico (IC) y longitud relativa promedio (LR). En cada especie se analizó al menos un macho y una hembra para verificar si existía variación cariotípica según el sexo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. MORFOLOGÍA Y NÚMERO CROMOSÓMICO

Tanto *Teratohyla ameliae* y *T. midas*, presentaron un número cromosómico de  $2n = 20$ ; es decir, los cariotipos de cada especie están constituidos por diez pares de cromosomas (Figura 3). Las dos especies no mostraron cromosomas heteromórficos, es decir, no se localizaron diferencias cromosómicas entre sexos.

#### 5.1.1. NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA DE *Teratohyla ameliae*.

De los cinco individuos colectados de *Teratohyla ameliae*, cuatro presentaron cromosomas con características similares por lo que el cariotipo estándar de esta especie se estableció en base a ellos.

Se pudo determinar que en el cariotipo de los cuatro individuos de *Teratohyla ameliae* ( $2n=20$ ) todos los pares cromosómicos son metacéntricos, excepto el par 6 que es submetacéntrico (Tabla 2; Figura 3), mientras que el otro individuo (QCAZ A66663) se obtuvo un cariotipo distinto, siendo los pares 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 metacéntricos y los pares 2, 4 y 6 submetacéntricos.

#### 5.1.2. NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA DE *Teratohyla midas*

El cariotipo de *Teratohyla midas* ( $2n=20$ ) fue establecido de acuerdo a las características cromosómicas de 1 hembra y 2 machos (QCAZ A66665, A66666, A66667), un macho (QCAZ A66664) presentó morfología cromosómica diferente.

Todos los pares cromosómicos de *Teratohyla midas* tienen una morfología metacéntrica, excepto el par 7 que es submetacéntrico (Tabla 2; Figura 3).

El individuo QCAZ A66664 presentó un cariotipo distinto, pues los pares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 9 son metacéntricos, mientras que los pares 7 y 10 son submetacéntricos.

## **5.2. LONGITUD RELATIVA PROMEDIO**

En las dos especies analizadas, la longitud relativa va disminuyendo de forma gradual en los 8 primeros pares de cromosomas homólogos, mientras que los pares 9 y 10 son evidentemente más pequeños que el resto de cromosomas (Tabla 3).

## **5.3. BANDEO CROMOSÓMICO**

### **5.3.1. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE BANDAS C.**

En *T. ameliae* este bandeo expuso una fuerte tinción en la región centromérica de todos los pares cromosómicos (Figuras 4 y 7). En los cinco individuos analizados no hubo presencia de bandas intercalares ni teloméricas.

En *T. midas*, el área centromérica mostró una fuerte reacción al bandeo C, expresando al centrómero como única región con heterocromatina constitutiva (Figuras 4 y 8).

En los cuatro individuos analizados no se observó bandas intercalares ni teloméricas.

### **5.3.2. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE TINCIÓN DAPI EN *Teratohyla ameliae*.**

Los individuos analizados confirmaron una región de tinción DAPI-positiva en la región centromérica del set completo de cromosomas. Se observó la presencia reiterada de una banda-DAPI en los centrómeros de los 10 pares cromosómicos. La ubicación de las regiones-DAPI coincidieron con el lugar de las bandas-C centroméricas de todos los cromosomas. (Figuras 5a y 7). No se observaron bandas intercalares ni teloméricas.

### **5.3.3. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE TINCIÓN DAPI EN *Teratohyla midas*.**

Se reafirmó la presencia de bandas DAPI-positivas en los centrómeros de todos los cromosomas de *Teratohyla midas*. Además se observó la presencia constante de una

banda-DAPI intercalar en los brazos largos (q) del par cromosómico 8. Las bandas-DAPI concordaron con la ubicación de las bandas-C centroméricas, excepto la banda-DAPI del brazo largo del par 8 que no posee su banda-C correspondiente. Bandas intercalares y teloméricas no se observaron dentro del cariotipo de esta especie (Figuras 5b y 8).

#### **5.3.4. PATRÓN DE BANDAS NOR.**

Al aplicar la técnica de impregnación argéntica (Ag – NOR) las dos especies mostraron tener solamente un par cromosómico con NOR pero con ubicación distinta.

En los cinco individuos de *Teratohyla ameliae*, todos los cariotipos examinados presentaron la región del organizador nucleolar (NOR) en el par 4, de morfología metacéntrica. La banda NOR se ubicó en los brazos cortos (p), en la región pericentromérica (Figuras 6a y 7).

En los cuatro individuos de *T. midas*, la región del organizador nucleolar (NOR) estuvo en el par 2. La banda NOR se encontró en los brazos cortos (p) de este par cromosómico (Figuras 6b y 8).

#### **5.4. MUESTREO CELULAR**

Se obtuvieron un total de 135 cariotipos, de los cuales 75 eran de *Teratohyla ameliae* y 60 de *Teratohyla midas*, 15 por cada individuo analizado. Con los datos obtenidos se logró calcular las medias de longitud relativa promedio (LR), índice centromérico (IC), y radio centromérico (RC) para cada par cromosómico de las respectivas especies (Tabla 2). Además fueron calculadas las respectivas desviaciones estándar, las cuales se encontraron en un rango entre 0,10 y 2,68 (Tabla 2).

La desviación estándar es una medida de dispersión, que fue utilizada con datos cuantitativos y con un intervalo determinado, la información obtenida permitió determinar la diferencia de RC y LR dentro de cada par cromosómico, lo que permitió analizar las posibles causas de dichas diferencias.

## 6. DISCUSIÓN

Los miembros de la familia Centrolenidae comparten varios caracteres entre los que se encuentran: transparencia ventral parcial o completa, una fusión parcial o completa entre la tibia y la fíbula, presencia de T o Y terminal de las falanges, etc. (Guayasamin, et al., 2009). Pese a haberse estudiado ampliamente la morfología de los centrolénidos estos caracteres aún dificultan su clasificación, por lo que estudios cariotípicos son oportunos para realizar análisis sistemáticos que pueden ayudar a clarificar su filogenia, pues la citogenética contribuye con datos esenciales para complementar el conocimiento de las especies. Como lo explican Sáez y Cardoso (1978) el cariotipo es considerado una forma ordenada de presentar a los cromosomas, estructuras en las que se conserva la información genética que permite comparaciones a tal punto de clarificar la taxonomía y las relaciones filogenéticas.

Schmid y colaboradores (2014) han estudiado minuciosamente varias especies de centrolénidos analizando los cromosomas mitóticos y meióticos detallando el número, longitud y morfología cromosómica, además del patrón de bandas C, DAPI, Q y NOR. Sin embargo, hasta el momento se han realizado estudios citogenéticos en tan solo 19 de las 155 especies de centrolénidos descritos hasta el momento (Frost, 2016). Es por ello, que este estudio contribuye con el análisis cromosómico de dos especies de ranas de cristal del Ecuador: *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas*.

### 6.1. NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA

En el presente trabajo se evidenció que las especies *Teratohyla ameliae* y *T. midas*, tienen un número cromosómico diploide  $2n = 20$  (Figuras 3, 7 y 8). Estas especies pertenecen al mismo clado junto con *Teratohyla pulverata* y *T. spinosa* (Anexo 5), especies que según lo reportado por García (2013), también poseen éste número cromosómico. De *Teratohyla adenocheira*, otro miembro de este clado, se desconoce su número cromosómico pues no existen reportes citogenéticos de esta especie.

El número de  $2n = 20$  también ha sido reportado para *Hyalinobatrachium fleischmanni*, *H. colymbiphylum*, *H. durantei*, *H. fragile*, *H. orientale*, *H. Valerioi*, *Vitreorana eurygnatha*, *V. antisthenesi*, *Sachatamia albomaculata*, *Cochranella*

*granulosa*, *Espadarana prosoblepon*, (León, 1970; Duellman y Cole, 1965; Duellman, 1967; Bogart, 1973; Schmid et al., 1989; Schmid et al., 2014) (Anexo 6); las especies antes mencionadas se encuentran distribuidas en cinco clados distintos.

En relación al número cromosómico de las especies de centrolénidos ecuatorianos, Blasco - Zuñiga et al., 2011 reportan que *Centrolene ballux*, *Espadarana prosoblepon*, *Hyalinobatrachium fleischmanni*, *Nymphargus anomalus*, *N. griffithsi*, *N. siren*, *Sachatamia albomaculata*, especies distribuidas en cinco clados diferentes, también poseen en condición diploide 20 cromosomas.

Todos estos resultados nos permiten concluir que el número cromosómico  $2n = 20$  es conservado para la familia Centrolenidae, pues se manifiesta en todas las especies analizadas, pertenecientes a ocho de los diez clados mayores de la familia.

Al analizar la historia evolutiva de la superfamilia Hyloidea, en la que se incluye a los centrolénidos, se puede constatar que el número cromosómico de éstos ( $2n=20$ ) se diferencia de los otros miembros de esta superfamilia, como Dendrobatidae, Aromobatidae, Leptodactylidae, Brachycephalidae, Hylidae (San Mauro, 2016), que poseen generalmente un número cromosómico de  $2n = 24$ , considerado como un carácter ancestral (Aguiar et al., 2002; Bogart, 1995; Bogart, 1991; Veiga - Menoncello et al. 2003). Por ejemplo, si se toma en cuenta el caso de la familia Leptodactylidae, distintos estudios bibliográficos reportan que el número cromosómico predominante para los miembros de esta familia es  $2n = 26$ , mientras que algunas especies ya muestran una reducción pues pocas tienen 24 e incluso 22 pares cromosómicos (Ananias, Recco, 2004; Lourenço, Garcia, Recco, 2003).

Esto sugiere que la disminución del número cromosómico a  $2n = 20$ , constituiría un carácter derivado en ésta superfamilia, que podría responder a fusiones centroméricas. Así pues, tal como King, M. (1991), Meyne y colaboradores (1990) reportan, este tipo de fenómenos se han registrado en distintos grupos de vertebrados, incluidos los anfibios, en los que incluso las fusiones céntricas, no solo han llevado a la disminución del número cromosómico si no también a la pérdida de heterocromatina pericentromérica (King, 1991; Meyne et al., 1990).

Con respecto al tamaño que muestran los 20 cromosomas de *Teratohyla ameliae* y *T. midas*, se observa que el patrón de decrecimiento gradual de los pares 1 al 8 y la disminución drástica en el tamaño de los pares 9 y 10 es común para todos los controlénidos analizados hasta el momento (Blasco, 2011; García, 2013; Schmid et al., 2014).

En relación a la forma de los cromosomas mitóticos de las especies de controlénidos analizadas hasta el momento (Blasco, 2011; García, 2013; Schmid et al., 2014), se puede verificar que presentan una morfología mayormente metacéntrica. En las dos especies de *Teratohyla* estudiadas en este trabajo se encontraron cromosomas submetacéntricos en los par 6 en *T. ameliae* y el par 7 *T. midas* (Tablas 2, 3, 4). La morfología submetacéntrica aquí descrita, también fue detectada por García (2013) para *Teratohyla pulverata* en los pares 3, 7 y 8 y para *T. spinosa* en los pares 7, 8 y 10. Esta coincidencia en la morfología de los cromosomas, ratifica la filogenia planteada por Guayasamin y colaboradores (2009), para este clado.

Se hace imprescindible mencionar que en uno de los individuos de *T. midas* analizados en este trabajo, se detectó que los pares 7 y 10 son submetacéntricos, lo que estaría denotando un polimorfismo intrapoblacional en relación a estos pares cromosómicos. Coincidentalmente la morfología de estos cromosomas también es submeraciéntrica en *T. spinosa*, especies que de acuerdo al árbol filogenético propuesto por Guayasamin y colaboradores (2009) son hermanas. Esto nos lleva a pensar que este hecho confirmaría, junto con la ubicación del NOR, su estrecha relación filogenética.

Resultó interesante que también esta morfología submetacéntrica de los pares 2, 4 y 6 se presentó en uno de los individuos de *T. ameliae* lo cual pone de manifiesto la existencia de un polimorfismo morfocromosómico intrapoblacional.

## **6.2. BANDEOS CROMOSÓMICOS**

El análisis minucioso de los cromosomas de una especie se consigue mediante técnicas de tinción diferencial, mismas que constituyen los bandeos cromosómicos. Para este trabajo se aplicaron los bandeos C, DAPI y NOR, bandeos que permitieron

caracterizar citogenéticamente a las especies de centrolénidos *Teratohyla ameliae* y *T. midas*.

Las bandas-C y bandas-DAPI tiñen fuertemente las regiones de heterocromatina constitutiva de los cromosomas, es decir, porciones de cromatina inactiva con función básicamente estructural. Estas se encuentran principalmente en las regiones centroméricas y/o teloméricas, e incluso en regiones intercalares.

Al aplicar la técnica de bandeo C se pudo detectar regiones de heterocromatina constitutiva exclusivamente en la región centromérica de todos los pares cromosómicos de las dos especies de centrolénidos analizadas (Figuras 4, 7 y 8).

Cabe mencionar que al aplicar el bandeo C, el tiempo que las placas fueron sometidas a la solución de hidróxido de bario para obtener bandas de buena calidad, no fue el mismo para las dos especies, por lo que es necesario tomar en cuenta que la diversidad de las bandas C según Erdtmann (1982), puede responder a la desnaturalización cromosómica, a diferentes afinidades de tinción, a la maduración de las placas o el estado de condensación de los cromosomas. En este caso, las condiciones experimentales de temperatura, concentración de solventes y tiempo de maduración de placas fueron homogéneas, no así el tiempo en hidróxido de bario que tiene como función desnaturalizar el ADN. Esto nos permite deducir que el grado de compactación de la región centromérica es diferente para las dos especies.

Tal como se menciono anteriormente, el bandeo DAPI también permite observar regiones de heterocromatina constitutiva (Figura 5). En efecto, en los cromosomas de las dos especies analizadas se detectó este tipo de heterocromatina en las regiones centroméricas, que coinciden con las bandas C (Figuras 7 y 8). Sin embargo, en *Teratohyla midas* se observó la presencia de una banda DAPI distinta, localizada en el brazo largo (q) del cromosoma 8 (Figuras 5 y 8). En varios estudios se demuestra que regularmente las bandas DAPI y las bandas C son similares y se encuentran en la misma posición (Lavanaia et al., 2010; Murray et al., 2011; Nascimento et al., 2010; Sousa et al., 2009). Sin embargo, no todas las bandas C tienen su correspondiente banda DAPI, ya que la tinción fluorescente detecta regiones de heterocromatina ricas en A – T (Adenina – Timina) (Schweizer, 1980; Silva y Guerra, 2010). Por lo tanto, la presencia de esta banda DAPI en

el par cromosómico 8 de *T. midas* denota una diferencia en la calidad de heterocromatina constitutiva entre las dos especies estudiadas.

Por otro lado, la ubicación del NOR es considerado un importante marcador citogenético para la caracterización de especies, razón por la que fue aplicada en el presente trabajo. La técnica que permite detectar la región del organizador nucleolar (NOR), es decir, el complejo de genes ribosómicos, es la técnica de impregnación argéntica Ag-NOR. Ésta permitió detectar que en las dos especies analizadas el NOR está en un único par homólogo: en *Teratohyla ameliae*, en la región paracentromérica del brazo corto en el par cromosómico 4 y en *Teratohyla midas* en la región paracentromérica del brazo corto del par 2. El hecho de encontrar el NOR en un solo par homólogo es común para el orden anura. Específicamente a lo que centrolénidos respecta, han sido encontrados en los pares cromosómicos 1, 2, 4, 8, 9 u 11 indistintamente (García, 2013; Schmid et al., 2014)

*T. ameliae* y *T. midas* son especies pertenecientes a un mismo clado y están cercanamente relacionadas, ambas especies presentan el NOR en distintos pares cromosómicos, lo que podría sugerir arreglos específicos de las bandas NOR entre cromosomas sin causar cambios o alteraciones en su morfología (Schmid et al., 2014). Estas variaciones cromosómicas interespecíficas se hacen aún más visibles al momento de contrastar los resultados obtenidos en el estudio realizado previamente por García (2013) con *Teratohyla pulverata* y *T. spinosa* (Tabla 5) donde la presencia de la región del organizador nucleolar se observa en los pares cromosómicos 9 y 2 respectivamente.

Schmid y colaboradores reportaron en 1989 y recientemente confirmado en 2014 que *Vitreorana antisthenesi* posee el NOR en el par cromosómico 2, lo cual coincide con lo obtenido con García (2013) para *Teratohyla spinosa* y lo obtenido en el presente estudio para *Teratohyla midas* sustentando de esta forma la relación filogenética que fue propuesta por Guayasamin y colaboradores en 2009, donde los géneros *Vitreorana* y *Teratohyla* poseen un ancestro común.

Con los datos cromosómicos expuestos en este trabajo se incrementa la comprensión de este clado, y se ratifica la importancia de la citogenética como herramienta útil para la caracterización, clarificación o ratificación de la taxonomía y filogenia de las especies.

## 7. CONCLUSIONES

*Teratohyla ameliae* y *T. midas* conservan el número cromosómico característico de los miembros de la familia Centrolenidae, hasta el momento descritas, poseen en condición diploide, 20 cromosomas.

La morfología cromosómica presentada en ambas especies ratifican su ubicación en un mismo clado, pues todos los pares cromosómicos de ellas son metacéntricos excepto el par 6 de *T. ameliae* y el par 7 de *T. midas* que son submetacéntricos. Las probables causas de estas diferencias pudieran ser deleciones o inserciones de cromatina.

La similitud en morfología cromosómica entre *Teratohyla ameliae*, *T. pulverata*, *T. midas* y *T. spinosa*, corroboran las relaciones filogenéticas de éstas especies dentro del clado.

Las dos especies presentan una variación en la calidad de heterocromatina constitutiva pues *T. midas* presenta de una banda DAPI intercalar en el brazo largo del par 8 que está ausente en *T. ameliae*

Un parámetro diferencial entre las dos especies estudiadas es la variación en la calidad de heterocromatina constitutiva pues *T. midas* presenta de una banda DAPI intercalar rica en A- T en el brazo largo del par 8, que está ausente en *T. ameliae*, mientras que la heterocromatina constitutiva centromérica es común en las dos especies, pues tienen la misma distribución de bandas C y DAPI.

La variabilidad en la ubicación del NOR, denota la posibilidad de que hayan ocurrido rearrreglos cromosómicos que ocasionaron que en *Teratohyla ameliae* esté en el par cromosómico 4 y *T. midas* en el par 2.

Se ratifican las relaciones filogenéticas entre el clado *Teratohyla* y *Vitreorana* por la presencia del NOR en el par cromosómico 2, en las especies hermanas *Teratohyla spinosa* y *T. midas* y en *Vitreorana antisthenesi*, ratificándose que son clados que poseen un ancestro común.

## 8. RECOMENDACIONES

Para tener una mejor comprensión del clado *Teratohyla* se recomienda aplicar las técnicas de bandeo C y DAPI al estudio previamente realizado en *Teratohyla pulverata* y *T. spinosa* para detectar la ubicación y cantidad de heterocromatina constitutiva.

Ya que se encontró que la región del organizador nucleolar de *Teratohyla ameliae* y *T. pulverata* se encuentran en distintos pares cromosómicos, sería bueno realizar un estudio en los cromosomas de *T. adenocheira* para de esta forma percibir de mejor manera la dinámica dentro de este clado.

Se recomienda incrementar datos mediante citogenética molecular con la aplicación de técnicas como la de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Esto permitiría identificar los segmentos que hayan sufrido deleciones y/o inserciones que podrían ser responsables de la variación de la ubicación del NOR en las especies estudiadas.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Jr., O., Lima, A. y Guareta, A. (2002). Cytogenetic analysis of four poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura - Dendrobatidae). *Herpetológica*, (58) 293- 303.
- Ananias, F., & Recco-Pimentel, S. M. (2004). Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 363-372
- Blasco - Zúñiga, A. (2007). Análisis de los cromosomas mitóticos de seis especies de anuros ecuatorianos de la familia Dendrobatidae (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Blasco - Zúñiga, A., García - Iturralde, S. y Rivera, M. (2011). Estudios cromosómicos de ranas de cristal ecuatorianas (Anura: Centrolenidae). En Memorias XXXV Jornadas nacionales de Biología. Sociedad Ecuatoriana de Biología, Núcleo Pichincha. Quito, Ecuador.
- Bogart, J. (1973). Evolution of anuran karyotypes. *Evolutionary biology of Anurans*, 337-349.
- Bogart J. (1991). The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. En: *Amphibian cytogenetics and evolution*. Chapter 11. (Green, D. y Sessions, S.) pp 299-331. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, USA.
- Bogart, J. y Hedges, D. (1995). Rapid chromosome evolution in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *J. Zool. Lond.* 235: 9-31.
- Bonilla, J. P. (2003). Propuesta para la realización de proyectos integrados basados en los estudios ecológicos de los anuros como estrategia pedagógica en la educación ambiental. *Tópicos en Educación Ambiental*, 5(13), 81-92.
- Bravo Velásquez, E. (2013). *Apuntes sobre la biodiversidad del Ecuador*. Abya-Yala/UPS.

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2017). *Biodiversidad. Biodiversidad Mexicana*. Recuperado de <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees.html>
- Duellman, W. E. (1967). Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Systematic Zoology*, 16(1), 38-43.
- Duellman, W. E., & Cole, C. J. (1965). Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Systematic Zoology*, 14 (2), 139-143.
- Egozcue, J. (1971), *Técnicas de Citogenética*. Editorial Espaxs, Barcelona, España.
- Erdtmann, B. (1982). Aspects of Evaluation, Significance, and Evolution of Human C-Band Heteromorphism. *Human Genetics*, (61) 281 – 294.
- Frost, Darrel R. (2016). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Versión 6.0 (Octubre, 2017). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- García Iturralde, S. (2013). *Análisis de los cromosomas mitóticos de cuatro especies de anuros de la familia Centrolenidae* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Green, D. y Sessions, S. (1991a). The Phylogeny of Amphibians: Current Knowledge and the Role of Cytogenetics. En: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Chapter 1. (Green, M. and Sessions, S. eds.) pp.1 – 6. Academia Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, California, USA.
- Green, D. y Sessions, K. (1991b). *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press. Inc. Harcourt Brace Jovanovich. U.S.A. 456 pp.

- Guayasamin, J., Castroviejo-Fisher, S., Ayarzagüena, J., Trueb, L., y Vilà, C. (2008). Phylogenetic relationships of glassfrogs (Centrolenidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Molecular filogenetic and evolution*, 574-595.
- Guayasamin, J. M., Castroviejo-Fisher, S., Trueb, L., Ayarzagüena, J., Rada, M., y Vilà, C. (2009). Phylogenetic systematics of glassfrogs (Amphibia: Centrolenidae) and their sister taxon *Allophryne ruthveni*. *Zootaxa*, 4-97.
- Howell, W. y Black, D. (1980). Controlled Silverstaining of Nucleolus Organizer Regions with a Protective Colloidal Developer: a 1-Step Method. *Experientia*, (36) 1014 – 1015.
- King, M. (1991). The Evolution of Heterochromatin in the Amphibian Genome. En: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Chapter 15. (Green, M. and Sessions, K. eds.) pp. 359-389. Academia Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, California, USA.
- Lacadena, J. R. (1996). *Citogenética*, Editorial Complutense, Madrid, España.
- Lavania, U., Kushwaha, J., Lavania, S. y Basu, S. (2010). Chromosomal Localization of rDNA and DAPI Bands in Solanaceous Medicinal Plant *Hyoscyamus niger* L. *Journal of Genetics*, (89) 493 – 496.
- León, P. E. (1970). Report of the chromosome numbers of some Costa Rica anurans. *Revista de Biología Tropical*, 17 (1), 119-124.
- Lourenço, L. B., Garcia, P. C., & Recco-Pimentel, S. M. (2003). Cytogenetics of a new species of *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae), with the description of an apparent case of pericentric inversion. *Amphibia-Reptilia*, 24(1), 47-55.
- Meyne, J., Baker, R., Hobart, H., Hsu, T., Ryder, O., Ward, O., y otros. (1990). Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma Springer-Verla*, 3-10.

- Murray, B., Wong, C. y Hammett, K. (2011). The Karyotype of *Clivia Mirabilis* Analyzed by Differential Banding and Fluorescence in-situ Hybridization. *Plant Systematics and Evolution* doi: 10.1007/s00606-011-0440-4.
- Nascimento, J., Serra, D., Quinderé, Y., Recco-Pimentel, S., Lima, J. y Lourenço, L. (2010). Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). *Genética*, (138) 1127 – 1132.
- Ron, S. R., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. 2017. Anfibios del Ecuador. Version 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>>, fecha de acceso 26 de abril, 2017.
- Sáez, F., y Cardoso, H. (1978). *Citogenética Básica y Biología de los Cromosomas*. Montevideo, Uruguay: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos.
- San Mauro, D. (2012). Anfibios. En P. Vargas y R. Zardoya (Eds). *El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos* (pp 400- 407). Madrid: Impulso Global Solutions, S. A.
- Schmid, M. (1978). Chromosome banding in amphibia. I: Constitutive heterocromatin and nucleolus organizer region in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, (66) 361-388.
- Schmid, M. (1989). Chromosome banding in Amphibia. XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). *Chromosoma*, (97) 434-438.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W., & Bogart, J. (2014). Chromosome Banding in Amphibia. XXXI. The Neotropical Anuran Families Centrolenidae and Allophrynidae. *Cytogenetic and Genome Research* , 1-18.

- Schweizer, D. (1980). Simultaneous Fluorescent Staining of R-bands and Specific Heterochromatic Regions (DA/DAPI bands) in Human Chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, (27) 190 – 193.
- Sierra, R., Campos, F., y Chamberlin, J. (2002). Assessing biodiversity conservation priorities: ecosystem risk and representativeness in continental Ecuador. *Landscape and Urban Planning*, 59 (2), 95-110.
- Silva, A. y Guerra, M. (2010). The Meaning of DAPI Bands Observed After C-Banding and FISH Procedures. *Biotechnic & Histochemistry*, (85) 115 – 125.
- Sousa, S., Siva, P., Torres, G. y Lyderson, F. (2009). Chromosome Banding and Essential Oils Composition of Brazilian Accessions of *Lippia alba* (Verbenacea). *Biología*, (64) 711 – 715.
- Sumner, A. (1972). A Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterochromatin. *Experimental Cell Research*, (75) 304 – 306.
- Veiga-Menoncello, A., Lima, A., y Recco-Pimentel, S. (2003). Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas*, (139) 189–198
- Zeizz, C. (2005). Axio Vision 4.4 Software. Göttingen - Alemania.

## **10. FIGURAS**

a.



b.

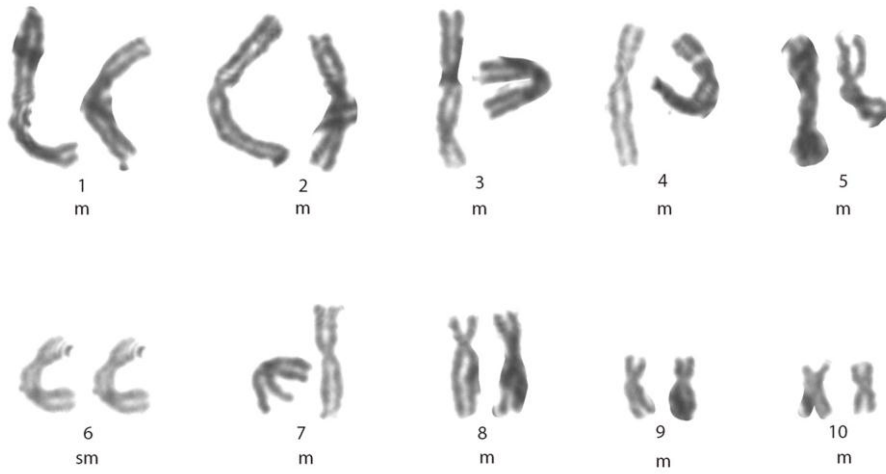


**Figura 1.** Especímenes de a. *Teratohyla amelie* y b. *Teratohyla midas*, Santiago R. Ron, FaunaWebEcuador, bajo licencia CC(BY- NC3.0).



**Figura 2. Mapa del Ecuador.** El punto rojo representa la localidad de colecta de los especímenes *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas* - Pastaza, Ecuador.

a.



b.

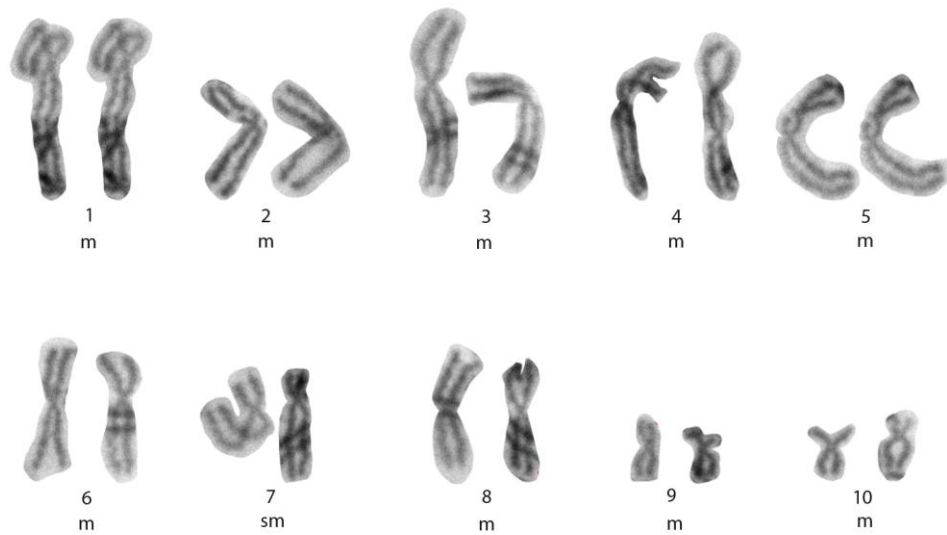


Figura 3. Cariotipos con tinción Giemsa: a. *Teratohyla ameliae* y b. *Teratohyla midas*.

a.

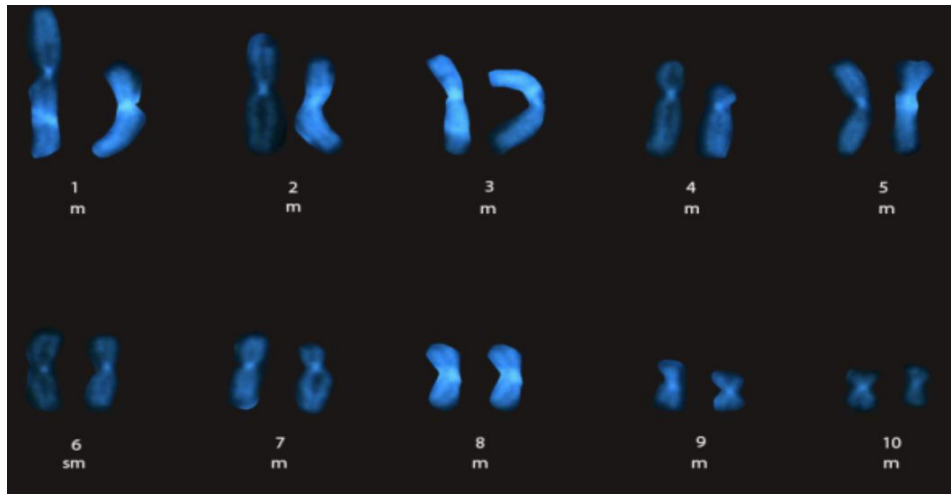


b.

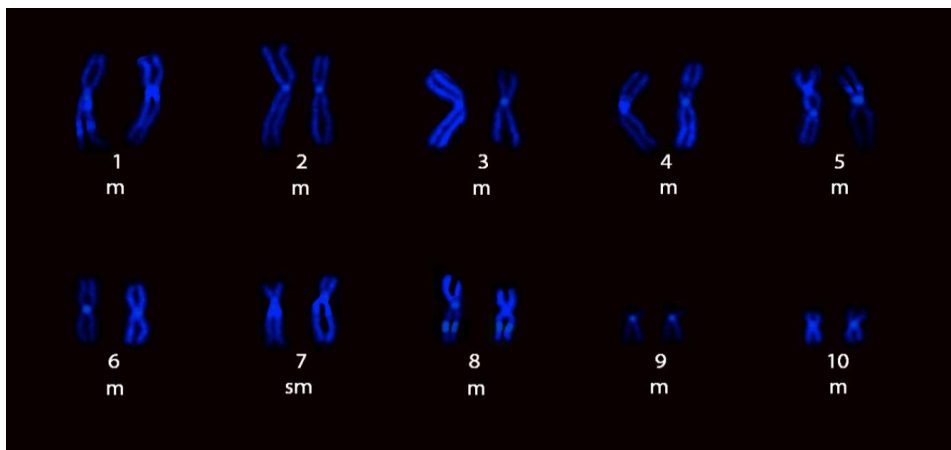


**Figura 4. Cariotipos con Bando C: a. *Teratohyla ameliae* y b. *Teratohyla midas*. Heterocromatina constitutiva fuertemente teñida en la región centromérica en ambas especies.**

a.

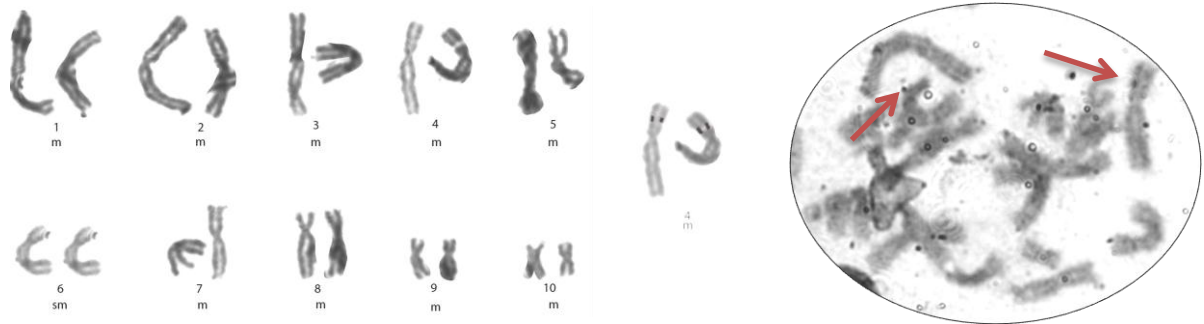


b.



**Figura 5. Cariotipos y núcleos de a. *Teratohyla ameliae* y b. *Teratohyla midas* en bandeado fluorescente DAPI. Las áreas azules más fluorescente representan las regiones heterocromáticas ricas en A – T. En *Teratohyla midas* se observan una banda DAPI+ en el brazo largo (q) del par cromosómico 8.**

a.

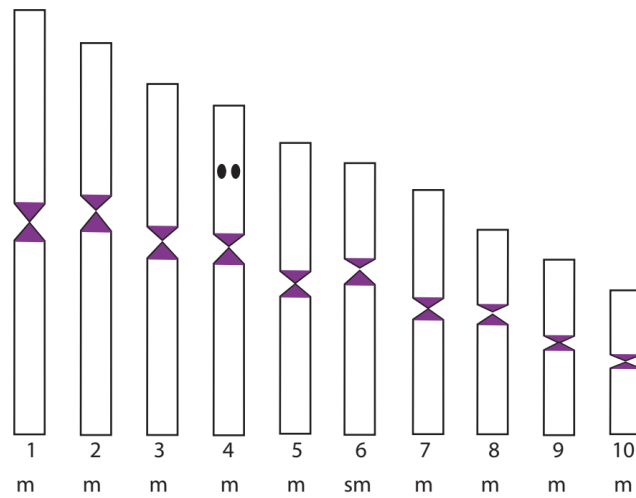


b.

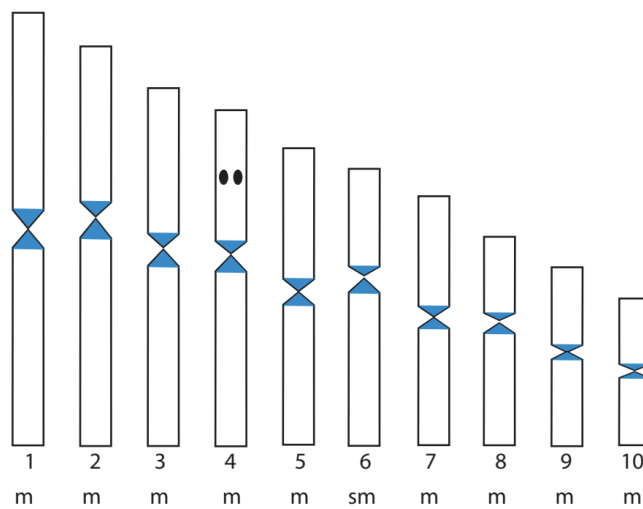


**Figura 6. Cariotipos y núcleo de a. *Teratohyla ameliae* y b. *Teratohyla midas* con tinción argéntica (NOR). El par aislado a la derecha revela el cromosoma que contiene el NOR; las flechas rojas muestran en cada núcleo su ubicación dentro del núcleo.**

a.



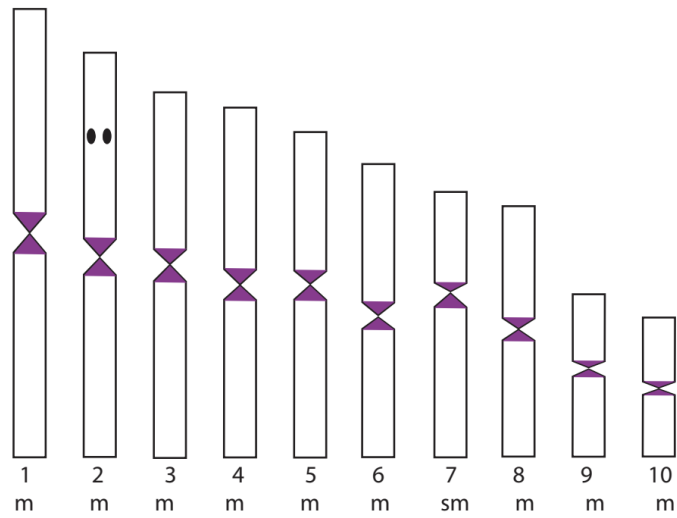
b.



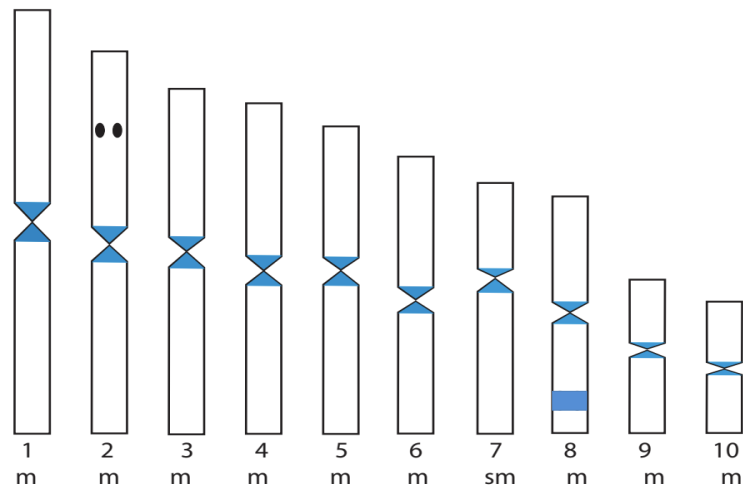
**Figura 7. Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de *Teratohyla ameliae*.** Se detalla el número de cromosomas, localización del NOR y el patrón de **a.** bandas-C y **b.** bandas-DAPI. Las áreas moradas indican la heterocromatina fuertemente marcada para bandeo C. Las áreas azul clara señalan heterocromatina marcada en el bandeo DAPI. Los óvalos oscuros muestran la localización del NOR.

m = metacéntrico, sm = submetacéntrico.

a.



b.



**Figura 8. Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de *Teratohyla midas*.**

Se detalla el número de cromosomas, localización del NOR y el patrón de **a.** bandas-C y **b.** bandas-DAPI. Las áreas moradas indican la heterocromatina fuertemente marcada para bandeado C. Las áreas azul claras señalan heterocromatina marcada en el bandeado DAPI. Los óvalos oscuros muestran la localización del NOR.

m = metacéntrico, sm = submetacéntrico

## **11. TABLAS**

**Tabla 1. Datos de colección de los individuos analizados de *Teratohyla amelie* y *Teratohyla midas* (Anura: Centrolenidae).**

<b>Especie</b>	<b>Serie de campo</b>	<b>QCAZ</b>	<b>Sexo</b>	<b>Localidad</b>
<i>Teratohyla amelie</i>	26997	A66657	M	Zanja Arajuno, Pastaza, Remanente Boscoso, alta Amazonía
	26998	A66658	H	Zanja Arajuno, Pastaza, Remanente Boscoso, alta Amazonía
	26999	A66659	M	Zanja Arajuno, Pastaza, Remanente Boscoso, alta Amazonía
	27084	A66662	J	Zanja Arajuno, Pastaza, Remanente Boscoso, alta Amazonía
	27067	A66661	J	Zanja Arajuno, Pastaza, Remanente Boscoso, alta Amazonía
	27000	A66660	M	Zanja Arajuno, Pastaza, Remanente Boscoso, alta Amazonía
	27688	A66663	J	Zanja Arajuno, Pastaza, Sendero Oglán Alto, Estación Científica Juri Juri Kaswaiy
<i>Teratohyla midas</i>	43905	A66664	M	Zanja Arajuno, Pastaza, Sendero Oglán Alto, Estación Científica Juri Juri Kaswaiy
	43908	A66667	M	Zanja Arajuno, Pastaza, Sendero Oglán Alto, Estación Científica Juri Juri Kaswaiy
	43906	A66665	H	Zanja Arajuno, Pastaza, Sendero Oglán Alto, Estación Científica Juri Juri Kaswaiy
	43907	A66666	M	Zanja Arajuno, Pastaza, Sendero Oglán Alto, Estación Científica Juri Juri Kaswaiy

M= macho  
H= hembra  
J= juvenil

**Tabla 2. Datos morfométricos de los cromosomas de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas* (clasificación centromérica de acuerdo a Green y Sessions, 1991b).**

CROMOSOMAS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Teratohyla ameliae</i> n=5										
<b>LR</b>	15,14 $\sigma=1,46$	13,92 $\sigma=1,82$	12,37 $\sigma=2$	11,75 $\sigma=1,11$	10,24 $\sigma=1,72$	9,65 $\sigma=1,05$	8,63 $\sigma=1,24$	7,19 $\sigma=1,38$	6,07 $\sigma=0,96$	5,05 $\sigma=0,70$
<b>RC</b>	1,12 $\sigma=0,10$	1,5 $\sigma=0,30$	1,39 $\sigma=0,16$	1,5 $\sigma=0,29$	1,2 $\sigma=0,13$	1,76 $\sigma=0,57$	1,19 $\sigma=0,13$	1,65 $\sigma=0,38$	1,35 $\sigma=0,19$	1,15 $\sigma=0,14$
<b>IC</b>	0,47	0,4	0,42	0,4	0,45	0,36	0,46	0,38	0,43	0,47
<b>MC</b>	m	m	m	m	m	sm	m	m	m	m
<i>Teratohyla midas</i> n=4										
<b>LR</b>	14,91 $\sigma=2,79$	13,44 $\sigma=1,89$	12,25 $\sigma=1,93$	11,62 $\sigma=1,96$	10,93 $\sigma=1,64$	9,7 $\sigma=1,27$	8,96 $\sigma=2,03$	8,26 $\sigma=2,49$	5,42 $\sigma=1,31$	4,51 $\sigma=1,18$
<b>RC</b>	1,26 $\sigma=0,21$	1,23 $\sigma=0,11$	1,42 $\sigma=0,11$	1,23 $\sigma=0,16$	1,43 $\sigma=0,31$	1,17 $\sigma=0,12$	2,08 $\sigma=0,54$	1,31 $\sigma=0,29$	1,51 $\sigma=0,23$	1,21 $\sigma=0,15$
<b>IC</b>	0,44	0,45	0,41	0,45	0,41	0,46	0,32	0,43	0,4	0,45
<b>MC</b>	m	m	m	m	m	m	sm	m	m	m

LR= Longitud relativa; RC= Radio centromérico; IC= Índice centromérico; MC= Morfología cromosómica

m= metacéntrico ; sm = submetacéntrico.

n= número de individuos analizados.

**Tabla 3. Valores promedio de longitudes relativas de los cromosomas mitóticos de *Teratohyla ameliae* y *Teratohyla midas*.**

<b>CROMOSOMAS</b>										
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<i>Teratohyla ameliae</i> n=5										
<b>LR</b>	13,006	13,258	12,12	11,265	10,481	9,832	8,877	7,674	6,537	5,437
<b>MC</b>	m	m	m	m	m	sm	m	m	m	m
<i>Teratohyla midas</i> n=5										
<b>LR</b>	14,645	13,62625	12,51	11,635	10,6025	9,77125	8,87375	7,72875	5,73625	4,87
<b>MC</b>	m	m	m	m	m	m	sm	m	m	m

n= número de individuos analizados

LR= Longitud relativa

MC= Morfología cromosómica

m= metacéntrico

sm = submetacéntrico

**Tabla 4. Comparación morfológica de cromosomas mitóticos del clado *Teratohyla*.**

ESPECIE	CROMOSOMAS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Teratohyla ameliae</i>	m	m	m	m	m	sm	m	m	m	m
<i>Teratohyla midas</i>	m	m	m	m	m	m	sm	m	m	m
<i>Teratohyla pulverata</i>	m	m	sm	m	m	m	sm	sm	sm - t	m
<i>Teratohyla spinosa</i>	m	m	m	m	m	m	sm	sm	m	sm

m = metacéntrico

sm= submetacéntrico

t = telocéntrico

**Tabla 5. Ubicación de la Región del Organizador Nucleolar (NOR) en los pares cromosómicos del clado *Teratohyla*.**

POSICIÓN DEL NOR	
ESPECIE	PAR CROMOSÓMICO
<i>Teratohyla ameliae</i>	par 4
<i>Teratohyla midas</i>	par 2
<i>Teratohyla pulverata</i>	par 9
<i>Teratohyla spinosa</i>	par 2

## **12. ANEXOS**

**Anexo 1.** Protocolos para preparar las diferentes soluciones utilizadas.

## Ringer de Anfibios (Humason, Animal Tissue Techniques).

NaCl	6 g
KCl	0,075 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 g

- Diluido en un litro de agua destilada.

## Solución Giemsa.

Giemsa al 5%- Sigma	1 parte
Agua destilada	20 partes

- Proporción 1:20

## Solución Salina Altamente Concentrada (2xSSC)

Cloruro de Sodio	3,5 g
Citrato de Sodio	1,76 g

- Disolver en 200ml de Agua destilada.

**Anexo 2.** Fórmulas para determinar índice centromérico (IC) y radio centromérico (RC)

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

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

donde:

IC= índice centromérico

RC= radio centromérico

q = longitud del brazo largo

p = longitud del brazo corto

**Anexo 3.** Parámetros para la determinación de morfología cromosómica.

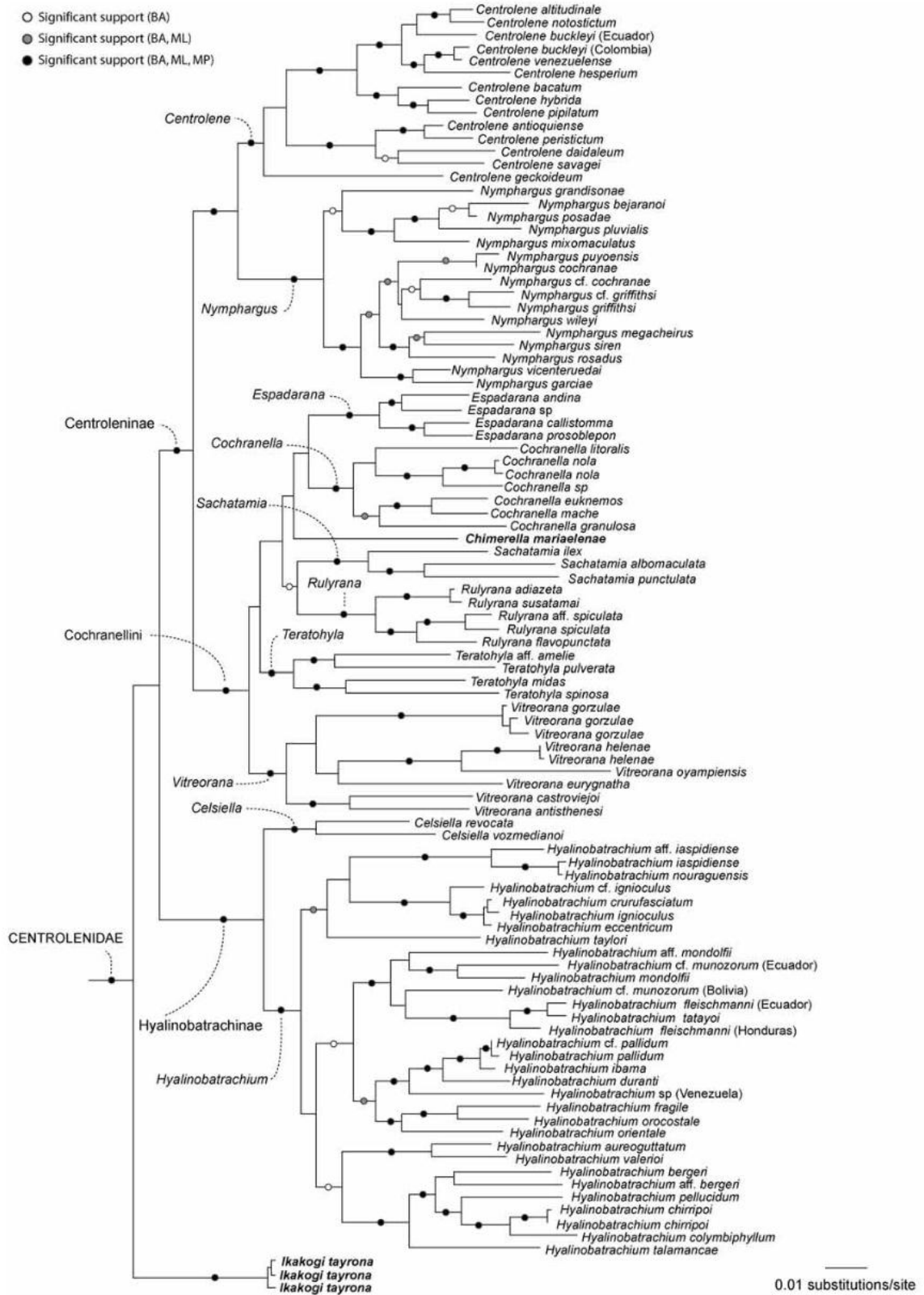
<b>Tipo cromosómico</b>	<b>Abreviación</b>	<b>Radio centromérico</b>	<b>Índice centromérico</b>
Metacéntrico	m	1,00 – 1,67	0,500 – 0,375
Submetacéntrico	sm	1,68 – 3,00	0,374 – 0,250
Subtelocéntrico	st	3,01 – 7,00	0,249 – 0,125
Telocéntrico	t	7,00 - $\infty$	0,124 – 0,000

- Clasificación de acuerdo a la posición del centrómero (Green y Sessions, 1991b).

**Anexo 4.** Tabla de peso de los individuos *Teratohyla ameliae* y *T. midas* al momento de colchinizar.

	<b>SC</b>	<b>QCAZ</b>	<b>PESO</b>
	26788	A6663	0,563 g
	26997	A66657	0,449 g
<i>Teratohyla ameliae</i>	26998	A66658	0,435 g
	26999	A66659	0,465 g
	27000	A66660	0,445 g
	43905	A66664	0,456 g
<i>Teratohyla midas</i>	43906	A66665	0,395 g
	43907	A66666	0,387 g
	43908	A66667	0,465 g

Anexo 5. Filogenia de la familia Centrolenidae. Obtenida de Guayasamin et al. (2009)



## Anexo 6. Especies de las familias Centrolenidae y Allophryniidae examinadas citogenéticamente por Schmid y colaboradores (2014).

Species <sup>a</sup>	Country	Specimens <sup>b</sup>	Locality <sup>c</sup>	Geographical coordinates <sup>d</sup>	2n/FN <sup>e</sup>
<b>Family Centrolenidae, subfamily Centroleninae</b>					
<i>Cochranella granulosa</i> *					
Present study	Costa Rica	1♂ 1♂	Carara National Park, Puntarenas Province Río Sucio, Braulio Carrillo National Park, Limón Province	09°44'N/84°37'W 10°09'N/83°58'W	20/40 20/40
Duellman, 1967	Nicaragua	2♂	Finca Tepeyac, 10.5 km N, 9 km E Matagalpa, 960 m, Matagalpa Department	11°58'N/86°05'W	20 <sup>†</sup> /n.i.
<i>Espadarana prosoblepon</i> *					
Present study	Costa Rica	7♂ 1♀	Alto de la Palma, Limón Province	10°02'N/83°59'W	20/40
León, 1970 & pers. commun.	Costa Rica	n♂	Campus of the University, San José	09°56'N/84°02'W	20 <sup>†</sup> /n.i.
Duellman, 1967	Panama	1♂	Finca Ojo de Agua, SE slope of Cerro la Pelota, 1440 m, Chiriqui Province	08°54'N/82°42'W	20 <sup>†</sup> /n.i.
<i>Sachatamia albomaculata</i>					
Duellman, 1967	Panama	1♂	Southern slope of Cerro La Campana, 850 m, Veraguas Province	08°26'N/81°17'W	20 <sup>†</sup> /n.i.
<i>Vitreorana antiisthenesi</i>					
Present study	Venezuela	19♂ 4♀	Henri Pittier National Park, small mountain stream at km 29 on road to Ocumare de la Costa, 650 m, Aragua State	10°24'N/67°45'W	20/40
Schmid et al., 1989	Venezuela	2♂ 2♀	Henri Pittier National Park, small mountain stream at km 29 on road to Ocumare de la Costa, 650 m, Aragua State	10°24'N/67°45'W	20/40 <sup>†</sup>
<i>Vitreorana eurygnatha</i>					
Present study; Bogart, 1973	Brazil	1♂ 1u	Tijuca forest at Bom Retiro, Guanabara, Rio de Janeiro State Teresópolis, Serra dos Órgãos National Park, Rio de Janeiro State	22°53'S/43°13'W 22°22'S/42°45'W	20/40 20/40
<b>Family Centrolenidae, subfamily Hyalinobatrachinae</b>					
<i>Hyalinobatrachium colymbiphylum</i> *					
Present study	Costa Rica	13♂ 3♀ 1♂	Tropical Science Center, Rincón de Osa, 20 m, Puntarenas Province Carara National Park, Puntarenas Province	09°35'N/85°04'W 09°44'N/84°37'W	20/40 20/40
<i>Hyalinobatrachium duranti</i> *					
Present study	Venezuela	2♂	Monte Zerpa, 2200 m, Mérida State	08°37'N/71°10'W	20/40
<i>Hyalinobatrachium fleischmanni</i> *					
Present study	Costa Rica	2♂ 1u	Paraíso, Valle de Oroqui, Cartago Province	09°48'N/83°51'W	20/40
León, 1970 & pers. commun.	Costa Rica	n♂	Campus of the University, San José	09°56'N/84°02'W	20 <sup>†</sup> /n.i.
Duellman and Cole, 1965	Nicaragua	2♂ 1♂	Finca Tepeyac, 10.5 km N, 9 km E Matagalpa, 960 m, Matagalpa Department 16 km S Matagalpa, 660 m, Matagalpa Department	11°58'N/86°05'W 11°55'N/86°05'W	20 <sup>†</sup> /n.i. 20 <sup>†</sup> /n.i.
<i>Hyalinobatrachium fragile</i> *					
Present study	Venezuela	1♂ 2u	Henri Pittier National Park, small mountain stream at km 29 on road to Ocumare de la Costa, 650 m, Aragua State	10°24'N/67°45'W	20/40
<i>Hyalinobatrachium orientale</i> *					
Present study	Tobago	3♂ 7u	1.5 km SW Charlotteville	11°19'N/60°32'W	20/40
<i>Hyalinobatrachium valerioi</i> *					
Present study	Costa Rica	1♂	Tropical Science Center, Rincón de Osa, 20 m, Puntarenas Province	09°35'N/85°04'W	20/40
<b>Family Allophryniidae</b>					
<i>Allophryne ruthveni</i> *					
Present study	Brazil	6♂	near A-Ukre on the Rio Xingu, Pará State	07°39'N/51°21'W	20/40

<sup>a</sup> Mitotic chromosomes of the species labeled with \* are published here for the first time. The identification of *Hyalinobatrachium duranti* is not confirmed. The specimens of *Vitreorana eurygnatha* published by Bogart [1973] are included in the present study.

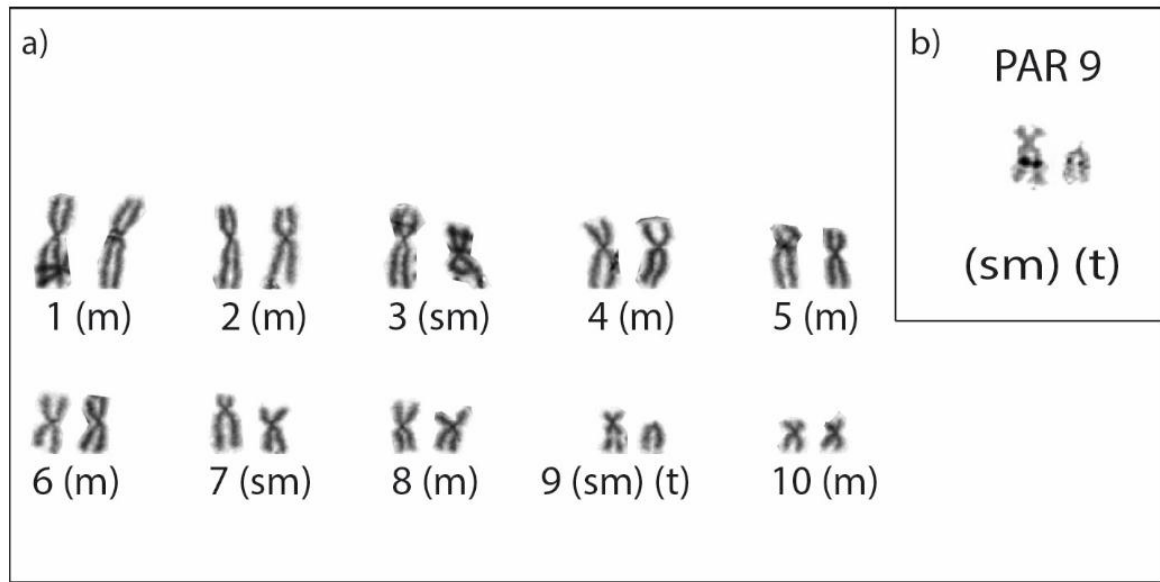
<sup>b</sup> n = Unknown number of male specimens; u = sex unknown.

<sup>c</sup> Localities of specimens were obtained from collector's field books, personal communication with the collectors, as well as information from museums where the cytogenetically examined voucher specimens are deposited. m = Meters above sea level.

<sup>d</sup> Geographic coordinates were determined either directly in the field using Global Positioning Systems (GPS), or by consulting the 'Directory of Cities and Towns in World' database (<http://www.fallingrain.com/world/>), Google Earth, or are based on extrapolations from geographical maps.

<sup>e</sup> n.i. = Not indicated. <sup>†</sup> Diploid chromosome number inferred from chromosome counts in meiosis. <sup>†</sup> The fundamental number is not explicitly mentioned in the text of the corresponding publication but inferred from the chromosome illustration or text.

**Anexo 7.** *Teratohyla pulverata*. a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica; b) Pareja y ubicación de la banda NOR. Obtenido de la tesis de García (2013)



**Anexo 8.** *Teratohyla spinosa*. a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica  
b) Banda NOR del par cromosómico 9. Obtenido de la tesis de García (2013).

