

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 dos especies de salamandras ecuatorianas del género  
*Bolitoglossa* (Caudata: Plethodontidae)

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

VERÓNICA ESTEFANÍA ANDRADE MONTERO

Quito, 2017

Certifico que la disertación de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Verónica Estefanía Andrade Montero ha sido confluída 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, 14 de Agosto del 2017

*Para mis compañeras de vida:  
A mi madre y hermana*

## AGRADECIMIENTOS

A Miryan Rivera y Ailin Blasco que con mucho entusiasmo y afecto inspiraron la idea de mi tema de disertación y posteriormente guiaron la realización de la misma. A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el apoyo financiero.

A los integrantes y amigos del Laboratorio de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) por el soporte técnico. En especial a Migue Llumiquinga y Mabe Trujillo.

A Stanley K. Sessions por el tiempo brindado y el conocimiento impartido en la técnica de la citogenética. A Sergio Siqueira-Jr del departamento de Biología Celular del Instituto de Biología de la UNICAM por el diseño de matrices para los análisis cromosómicos.

A Yerka Sagredo, Francisca Hervas y a todos aquellos que forman parte del Museo de Herpetología de la PUCE que contribuyeron con la colecta e identificación de especímenes. Al Ingeniero Julio Sánchez y a Ana Lucia Moncayo por su colaboración en los análisis de datos; de igual forma, a Jaime Costales, Anita Villacis y Mario Grijalva por sus valiosas sugerencias y comentarios.

A toda mi familia por su apoyo incondicional y amor infaltable, en especial a mi madre, hermana y prima durante este proceso y en todo momento de mi vida.

Finalmente pero no menos importante, a mis amigas y amigos que contribuyeron con su grandiosa amistad y consejo desde cualquier parte del mundo en donde se encuentren. Gaby Morán, Bel Veintimilla, Gabo Egas y Jose Tinajero.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
3.1. OBJETIVOS.....	6
<b>3.1.1. Objetivo general</b> .....	6
<b>3.1.2. Objetivos específicos</b> .....	6
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
4.1. MATERIAL EXAMINADO.....	7
4.2. MANTENIMIENTO DE INDIVIDUOS .....	7
4.3 PREPARACIONES CROMOSÓMICAS .....	8
<b>4.3.1. Procesamiento de la muestra</b> .....	8
4.3.1.1 Inhibición mitótica (colchinización) .....	8
4.3.1.2 Obtención del tejido .....	9
4.3.1.3 Hipotonización .....	9
4.3.1.4 Fijación.....	9
4.3.1.5 Squash cromosómico.....	9
<b>4.3.2 Tratamiento para cromosomas fijados en las placas</b> .....	10
4.3.2.1 Tinción con Giemsa.....	10
4.3.2.2 Bando C (heterocromatina constitutiva).....	10
4.3.2.3 Bando NOR (Impregnación Argéntica).....	10
4.3.2.4 Tinción DAPI (4-6 diamidino-2-fenilindol).....	10
4.4 OBSERVACIÓN DE METAFASES EN EL MICROSCÓPIO .....	11
4.5 ELABORACIÓN DE CARIOTIPOS E IDIOGRAMAS.....	11
<b>4.5.1. Edición de imágenes</b> .....	11
<b>4.5.2. Medición de cromosomas e identificación morfológica</b> .....	11
<b>4.5.3. Elaboración del ideograma</b> .....	12

4.6. CÁLCULOS ESTADÍSTICOS DE CROMOSOMAS .....	12
<b>5. RESULTADOS</b> .....	13
5.1 NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA.....	13
<b>5.1.1. Morfología cromosómica de <i>Bolitoglossa aff. sima</i></b> .....	13
<b>5.1.2. Morfología cromosómica de <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i></b> .....	13
5.1.2.1 <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> sp.1, localidad Cononaco.....	14
5.1.2.2 <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> sp.2, localidad Tiputini .....	14
5.1.2.2.1. <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> sp.3, localidad Tiputini .....	14
5.1.2.2.2 <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> Tiputini sp.3.....	14
5.2. BANDEO CROMOSÓMICO .....	15
<b>5.2.1. Bando-C</b> .....	15
5.2.1.1. Patrón de distribución de Bandas-C en <i>Bolitoglossa aff. sima</i> .....	15
5.2.1.2. Patrón de distribución de Bandas-C en <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> .....	15
5.2.1.2.1. <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> sp.1, Cononaco.....	15
5.2.1.2.2. <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> sp.2, Tiputini.....	15
5.2.1.2.3. <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> sp.3, Tiputini.....	16
<b>5.2.2. Bando DAPI</b> .....	16
5.2.2.1. Patrón de distribución de Bandas DAPI en <i>Bolitoglossa aff. sima</i> .....	16
5.2.2.2. Patrón de distribución de Bandas DAPI en <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> .....	16
<b>5.2.3. Bando Ag-NOR</b> .....	16
5.2.2.1. Patrón de distribución de bandas-NOR en <i>Bolitoglossa aff. sima</i> .....	16
5.2.2.1. Patrón de distribución de bandas-NOR en <i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> .....	17
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	18
6.1. TÉCNICA DE SQUASH CROMOSÓMICO .....	18
6.2. NÚMERO CROMOSÓMICO .....	18
6.3. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA.....	19
6.4. BANDEO C.....	20
6.5. BANDEO DAPI.....	22

6.6. BANDEO NOR.....	22
6.7. Diversidad de <i>Bolitoglossa</i> aff <i>peruviana</i> sp.2 y sp.3 Tiputini .....	23
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>24</b>
7.1. RECOMENDACIONES .....	25
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>26</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa del Ecuador.....	31
<b>Figura 2.</b> Especímenes. ....	33
<b>Figura 3.</b> Cariotipos de <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>sima</i> .....	35
<b>Figura 4.</b> Cariotipo de <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> sp.1 Cononaco/Orellana. ....	36
<b>Figura 5.</b> Cariotipo de <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> sp.2 Tiputini.. ....	37
<b>Figura 6.</b> Cariotipos de <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> sp.3 Tiputini.....	39
<b>Figura 7.</b> Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>sima</i> .. .....	40
<b>Figura 8.</b> Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> sp.2 Tiputini.. .....	41
<b>Figura 9.</b> Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> sp.3 Tiputini.. .....	43

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1. Datos de la colección de los individuos analizados de <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>sima</i> y <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 2. Datos cromosómicos de los cariotipos correspondientes a <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>sima</i>, <i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> .....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Comparación de las técnicas de suspensión celular y squash, e individuos utilizados ...	47
<b>Anexo 2.</b> Parámetros para la determinación de la morfología cromosómica.....	48
<b>Anexo 3.</b> Cariotipo de <i>Bolitoglossa paraensis</i> reportado por Barata da Silva, Suárez, Nagamachi, Carter, Pieczarka, (2014). A) Tinción Giemsa; B) heterocromatina constitutiva; C) Tinción DAPI. .....	49
<b>Anexo 4.</b> Mapa de Brasil. Punto de colecta de <i>Bolitoglossa paraensis</i> reportado por Barata da Silva, Suárez, Nagamachi, Carter, Pieczarka, (2014). .....	50

## 1. RESUMEN

En el Ecuador y Sudamérica habitan salamandras pertenecientes al género *Bolitoglossa*, las más abundantes de la familia Plethodontidae. Algunas salamandras del género *Bolitoglossa* en Centro y Sudamérica han sido determinadas citogenéticamente. Sin embargo hay poca información citogenética de otras especies del género, especialmente en el Ecuador. En el presente trabajo, se caracterizaron citogenéticamente dos especies de salamandras, *Bolitoglossa* aff. *sima* y *Bolitoglossa* aff. *peruviana*; a esta última se la dividió en tres grupos por las diferentes localidades de colecta. Se determinó la estructura cariotípica, distribución de la heterocromatina constitutiva y ubicación de las regiones del organizador nucleolar. Los hallazgos citogenéticos revelan que a pesar de la similitud en cuanto al número cromosómico ( $2n=26$ ) entre las especies analizadas, existen diferencias morfológicas y a nivel de bandeos (Bandeo-C y NOR). Se sugiere que los individuos *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp. 1 Cononaco y los de la localidad de Tiputini, por diferencias en morfología cromosómica y a nivel del fenotipo, son especies distintas, *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 y *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3. Por lo tanto, se demuestra que la caracterización de especies de *Bolitoglossa* con técnicas citogenéticas es una herramienta útil y complementaria a estudios moleculares que permite poner a prueba hipótesis sobre límites de especies en salamandras del género *Bolitoglossa*.

**Palabras clave:** Bandeo-C, *Bolitoglossa*, DAPI, NOR, Plethodontidae.

## 2. ABSTRACT

Few species of *Bolitoglossa* salamanders inhabit in Ecuador and in South America. This genus is the largest and the most diverse of the Plethodontidae family. Some salamander species of Central and South America have been cytogenetically characterized. However, there is little information about the cytogenetics of other species of the genus, especially in Ecuador. In the present study, two species of salamanders, *Bolitoglossa* aff. *sima* and *Bolitoglossa* aff. *peruviana* were characterized. These salamanders were separated by the mountain range of the Andes; individuals of *Bolitoglossa* aff. *peruviana* were divided in three groups by the different localities of collection. The karyotype structure, distribution of the constitutive heterochromatin and location of the nucleolar organizer regions were determined. The cytogenetic findings reveal that in spite of the similarity in the chromosomal number ( $2n = 26$ ) within the analyzed species, there are morphological differences at the chromosome banding level, (C-band & NOR). It is suggested that the individuals from Tiputini (*Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 y *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3) and *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.1 Cononaco are different species after observing variances in the chromosome morphology and in the phenotype. Thus, it is clear that the *Bolitoglossa* species characterization with cytogenetic techniques is a useful and complementary tool for molecular studies. Moreover, cytogenetics studies in *Bolitoglossa* salamanders could allow the test of hypothesis about the limits of the mentioned genus.

**Key words:** Bando-C, *Bolitoglossa*, DAPI, NOR, Plethodontidae.

### 3. INTRODUCCIÓN

En el mundo existen 7.720 especies de anfibios aproximadamente, de los cuales el 9.1% corresponde al orden Caudata (AmphibiaWeb, 2017); equivalente a 705 especies de salamandras (Frost, 2017). Existen 10 familias de salamandras de las cuales la familia Plethodontidae se caracteriza por no poseer pulmones, por lo que reciben el nombre común de “salamandras sin pulmones”. Adicionalmente esta familia también se caracteriza por tener surcos naso-labiales (AmphibiaWeb, 2017).

Dentro de la familia Plethodontidae se encuentra el género *Bolitoglossa* con la mayor diversidad de especies en el Neotrópico y en general dentro del grupo de las salamandras (132 spp.) (AmphibiaWeb, 2017). Este género está distribuido desde el noreste de México hasta la cuenca Amazónica en Brasil y las montañas de Bolivia central (Parra-Olea, G., García-París, M., & Wake, 2004; Barata da Silva, Suárez, Nagamachi, Carter, y Pieczarka, 2014; Frost, 2017). La mayoría de las especies de *Bolitoglossa* se encuentran en Centro América y solo 28 especies formalmente descritas habitan en Sudamérica, especialmente en Colombia; su diversidad disminuye hacia el sur y este de Sudamérica (Elmer, Bonett, Wake, y Loughheed, 2013).

En el Ecuador en particular, el género *Bolitoglossa* consta de 8 especies: *B. altamazonica*, *B. bisseriata*, *B. chica*, *B. equatoriana*, *B. medemi*, *B. palmata*, *B. peruviana* y *B. Sima*, las que están clasificadas en base a caracteres morfológicos (Ron, Guayasamín, Yanez-Muñoz, Merino-Viteri, Ortiz y Nicolalde, 2017). Este género se encuentra principalmente distribuido al Noroccidente (zona del Chocó), región Andina (Bosque Montano y Piemontano) y al Oriente del país, desde los 20 m.s.n.m. hasta los 2.200 m.s.n.m. (Ron et al., 2017).

La diversidad de este grupo de salamandras cubre evidentemente un amplio rango biogeográfico. Se ha determinado que a pesar de que hay diferenciación fenotípica entre estos individuos existen dificultades en la identificación de algunas especies debido a su alta diversidad críptica (Elmer et al., 2013). Dicha diversidad se atribuye en parte a las características de vida de los anfibios en Sudamérica porque habitan en áreas topográficas complejas, y se observa que presentan distancias genéticas grandes en rangos de

distribución muy cortos (Wake y Lynch, 1976; Wake, Papenfuss y Lynch, 1992). Esto sugiere que la diversidad de especies de salamandras en América del Sur y en el Ecuador están subestimadas, de manera particular en la Amazonía, los Andes y la Zona del Chocó (Hervas, 2016).

Caracteres genéticos y morfológicos son usualmente utilizados para realizar estudios de tipo taxonómico y filogenético. Sin embargo, los estudios citogenéticos son considerados como un aporte en la resolución de problemas sistemáticos de estos grupos con grado alto en diversidad como las salamandras (Green y Sessions, 1991). Este grupo de organismos se utilizó como primer modelo para iniciar estudios cromosómicos en anfibios y fue el Dr. James Kezer incorporó la citogenética como herramienta para la resolución de problemas taxonómicos (Green y Sessions, 1991).

El realizar análisis citogenéticos implica una observación minuciosa de la organización, el comportamiento y la estructura de los cromosomas (Lacadena, 1996), lo que permite efectuar comparaciones físicas basándose en un alto grado de coherencia que existe entre ellos (Córdova y Lamas, 1997), por lo que de acuerdo con O'Connor (2014) los cambios en los cromosomas están relacionados con fenómenos de especiación durante la evolución.

Otra herramienta de gran valor comparativo en sistemática es la medición del tamaño del genoma. Este hecho fue inicialmente probado en plantas angiospermas de diferentes grupos, en donde se pudo constatar que el tamaño del genoma era diferente no solo a nivel interespecífico sino también a nivel intraespecífico (Ohri, 1998); es así, que se extendió su uso a organismos de otros reinos. Concretamente, en el caso de los anfibios, es un instrumento con validez en cuanto a la caracterización de especies de individuos que pueden presentar o no cripticidad (Matsuba y Melila, 2006), como es el caso de las salamandras de Sudamérica pertenecientes al género *Bolitoglossa*.

Aunque el conocimiento del tamaño del genoma de diferentes especies proporciona información biológica comparable es importante mencionar que no solo es estudiado por sí solo, sino que también sirve como información de contraste para la clasificación de organismos en estudios cromosómicos (Sessions, 2008; Hardie et al, 2002).

En el trabajo conjunto realizado por Green y Sessions (1991) y por (Sessions, 1989), se caracterizó citogenéticamente salamandras de Centroamérica: *Bolitoglossa subpalmata*, *B. helmrichi*, *B. rostrata*, *B. flaviventris*, *B. dofleini*, *B. engelhardii*, *B. franklini* y una salamandra de Suramérica: *Bolitoglossa adspersa*. En este estudio se sugiere que no hay variación en el número ( $2n = 26$ ) y tamaño de los cromosomas, pero sí en la posición del NOR y en el tamaño del genoma medido a partir de células de eritrocitos. No se realizaron estudios en cuanto al patrón de bandas de heterocromatina constitutiva. Por otra parte, *Bolitoglossa paraensis*, que también se encuentra en Sudamérica, tampoco tiene variación en número cromosómico ( $2n=26$ ) aunque si se observan diferencias en cuanto al tamaño y a la posición del NOR en comparación con las salamandras de América Central (Barata da Silva et al., 2014).

Las especies de salamandras de Centro América y *Bolitoglossa adspersa* ocurren desde los 1.058 m.s.n.m. hasta los 3.366 m.s.n.m. (Sessions, 1989) y *Bolitoglossa paraensis* que está en Sudamérica se encuentra a 26 m.s.n.m. (Barata da Silva et al., 2014); por lo que casi no existen registros cromosómicos ni de tamaño genómico en especies que se encuentren por debajo de los 1.000 m.s.n.m.

Por lo tanto, es necesario caracterizar los cariotipos de especies de altitudes menores a 1.000 m.s.n.m., que estén separadas por barreras geográficas considerables como la cordillera de los Andes; más aun tomando en cuenta el hecho de que las tierras bajas en el Ecuador representan el 56.2% de la superficie continental del país donde habitan 260 especies de anfibios, de las cuales el 97% están presentes en el bosque húmedo tropical (Ron et al., 2017).

En correspondencia, este estudio propone caracterizar y comparar la diversidad cromosómica entre una especie de la zona noroccidental del Chocó ecuatoriano (*Bolitoglossa* aff. *sima*) y otra especie de la parte oriental amazónica (*Bolitoglossa* aff. *peruviana*). Cabe mencionar que *Bolitoglossa* aff. *sima* y *Bolitoglossa* aff. *peruviana* son especies que están distantes genéticamente según la filogenia de Hervas (2016) y se esperaría que exista variación citogenética. Por ello, los resultados que se obtengan en este estudio contribuirán, no solo con la descripción cromosómica de las salamandras del género *Bolitoglossa*, sino que además constituirán un complemento para investigaciones

que permitan clarificar la taxonomía sistemática de las salamandras de Sudamérica (Elmer et al., 2013; Barata da Silva et al., 2014).

### 3.1. OBJETIVOS

#### 3.1.1. Objetivo general

Caracterizar los cromosomas mitóticos de dos especies de salamandras ecuatorianas del género *Bolitoglossa*, familia Plethodontidae, que habiten en altitudes menores a los 1000 m.s.n.m.

#### 3.1.2. Objetivos específicos

- Detectar bandas de heterocromatina y la región del organizador nucleolar (NOR) en cromosomas de salamandras del género *Bolitoglossa*.
  
- Determinar el cariotipo base de cada una de las especies de salamandras a analizar.
  
- Establecer diferencias y/o semejanzas entre los cariotipos de las especies de salamandras propuestas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron los cromosomas de cuatro individuos de la especie *Bolitoglossa* aff. *sima* provenientes de la provincia de Esmeraldas y cinco individuos de la especie *Bolitoglossa* aff. *peruviana* colectados en la provincia de Orellana. Los especímenes fueron identificados en base a información genética y morfológica (Hervas, no publicado). Al parecer ambas especies no están descritas por lo que su denominación denota la especie descrita más cercana. Los especímenes de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* de la localidad de Tiputini fueron subdivididos en dos grupos debido a diferencias morfológicas (Fig. 2 ; Tabla 1). Los especímenes fueron procesados y depositados en el museo QCAZ de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

### 4.1. MATERIAL EXAMINADO

Los especímenes de *B.* aff. *sima* fueron colectados en los alrededores del Lodge Tundaloma, 01° 2' 31" N; 78° 37' 32" W, ubicado en la parroquia Durango en la provincia de Esmeraldas (Fig. 1; Tabla 1). Por otro lado, los especímenes de *B.* aff. *peruviana* fueron colectados en diferentes localidades de la provincia de Orellana: los individuos con serie QCAZ 68459 y QCAZ 68463 provienen del Bloque 16 perteneciente al cantón Aguarico, localidad Cononaco, 1° 00' 40.11" S 76° 11' 07.94" W. Los individuos QCAZ 68492, QCAZ 68506 y QCAZ 68497 pertenecen al Bloque 43 del cantón Aguarico, localidad Tiputini 0° 47' 19.49" S 75° 31' 41.31" W. Estos especímenes fueron colectados en diferentes puntos de colecta: El individuo QCAZ 68492 fue colectado en Tambococha B (Río Salado), el individuo QCAZ 68506 fue colectado en la Comunidad Boca Tiputini, sector San Carlos y el individuo QCAZ 68497 fue recolectado en la línea de conducción, kilómetro 12 (Fig. 1; Tabla 1).

### 4.2. MANTENIMIENTO DE INDIVIDUOS

Todos los individuos colectados fueron transportados vivos dentro de un cooler hasta el Laboratorio de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) del Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) en la PUCE, en tarrinas plásticas perforadas y humedecidas que permitieron mantener la cantidad adecuada de temperatura,

humedad y oxígeno. Ya en el laboratorio, las salamandras fueron colocadas en terrarios individuales de 12 cm x 20 cm y se les proporcionó una dieta basada en grillos provenientes del bioterio de la Balsa de los Sapos PUCE.

#### 4.3 PREPARACIONES CROMOSÓMICAS

Para la obtención de los cromosomas se probó el protocolo estándar de preparaciones cromosómicas directas del intestino de anfibios por medio de suspensión celular realizado por Ailín Blasco-Zúñiga (modificación del protocolo descrito por Schmid, 1978). Se experimentó con la variable hipotónica de dicho protocolo estándar, pero no se pudieron observar cromosomas mitóticos (Anexo 1a y b).

Por este motivo, se probó el método de squash cromosómico empleado por (Sessions, 1980). Donde de todos los individuos procesados (Anexo 1c), únicamente nueve fueron analizados citogenéticamente (Tabla 1).

##### **4.3.1. Procesamiento de la muestra**

Antes de realizar los preparados cromosómicos se confirmó que las salamandras hayan ingerido el alimento proporcionado. De este modo, se aseguró que las células del duodeno hayan estado en constante división mitótica para incrementar la posibilidad de encontrar núcleos metafásicos y obtener preparaciones cromosómicas óptimas.

##### **4.3.1.1 Inhibición mitótica (colchinización)**

Se pesó a cada individuo y se le inyectó intraperitonealmente 0,1 ml de colchicina al 0,1% diluida en ringer de anfibios por cada 0,1g de peso. Los individuos colchinizados fueron mantenidos de 2 a 3 días en temperatura ambiente (19°-21°C). Después de este procedimiento, los individuos fueron sacrificados mediante la aplicación de loción anestésica tópica de marca Topex con benzocaína al 20%.

#### 4.3.1.2 Obtención del tejido

Con la ayuda de un estereoscopio se disectó, en la parte ventral-lateral izquierda, a cada individuo donde se extrajo el duodeno y se lo abrió de manera longitudinal para eliminar los desechos del interior lavándolo con rínger de anfibios. Adicionalmente, se obtuvieron muestras de genoma (hígado y músculo) que fueron depositadas en el museo QCAZ de la PUCE.

#### 4.3.1.3 Hipotonización

Una vez limpio, el tejido fue colocado en una caja Petri con agua destilada durante 10 minutos a temperatura ambiente.

#### 4.3.1.4 Fijación

Se retiró al intestino del tratamiento de hipotonía y se lo colocó en un tubo ependorf de 2ml de fijador recién preparado (metanol-ácido acético, en proporción 3:1) durante 10 minutos. De esta manera también se puede mantener el tejido guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  si no va a ser procesado enseguida.

#### 4.3.1.5 Squash cromosómico

Se cortó al intestino en fragmentos pequeños como fuese necesario para optimizar el uso de la muestra. Cada fragmento fue colocado en un porta objetos respectivamente con una gota de ácido acético al 45% por 2 minutos. Se colocaron cubre objetos recubiertos con silicón y con la ayuda de papel bibulosa se presionó fuertemente con los dedos pulgares. A continuación se colocan las placas en  $\text{CO}_2$  en estado sólido por 15 minutos, se retira el cubre objetos y se sumergen las placas en etanol al 100%.

### **4.3.2 Tratamiento para cromosomas fijados en las placas**

#### 4.3.2.1 Tinción con Giemsa

Las placas preparadas con squash cromosómico fueron sometidas por 10 minutos a una solución de Giemsa al 5% modificado (Sigma-Aldrich) diluido en agua destilada en una proporción de 1:20. Luego se lavó las placas con abundante agua destilada y se las puso a secar a temperatura ambiente.

#### 4.3.2.2 Bando C (heterocromatina constitutiva)

Este procedimiento fue basado en el protocolo de Sumner (1986) modificado por Schmid (1978). Se dejó madurar las placas por un periodo de 7 días o se las colocó en el horno a 60° C por 4 días. Después, se las expuso a solución saturada de Ba (OH)<sub>2</sub> a 35 °C por 5 minutos; se las enjuagó con HCl al 0,1%, agua destilada y se las introdujo una sola vez en etanol al 100%. Seguidamente, se las sometió a una solución salina concentrada (2XSSC) durante 60 minutos a una temperatura de 65 °C en baño maría y finalmente se lavan con agua destilada.

#### 4.3.2.3 Bando NOR (Impregnación Argéntica)

Para este bando se utilizó el protocolo empleado por Howell y Black (1980) con modificaciones. Se colocó en cada placa 1 gota de nitrato de plata (50% + Agua destilada) y 2 gotas de ácido fórmico al 1% más gelatina al 2%. Las placas fueron sometidas al calor a 80 °C por 90 segundos donde adquirieron una coloración marrón. Posteriormente, las placas fueron lavadas con agua Milli-Q y se las secó a temperatura ambiente.

#### 4.3.2.4 Tinción DAPI (4-6 diamidino-2-fenilindol)

La tinción DAPI de fluorescencia fue realizada de acuerdo al protocolo de Schweizer (1980) con modificaciones. Las placas fueron sumergidas en tampón McILvaine por 1 minuto. Después, se las expuso a la solución DAPI por 15 minutos. Al finalizar el proceso se colocó una gota de Vecta Shield, de igual manera en cada placa.

#### 4.4 OBSERVACIÓN DE METAFASES EN EL MICROSCÓPIO

Las metafases sometidas a tinción Giemsa, bandeó-C, y bandeó NOR fueron fotografiadas con una cámara digital Canon PowerShot modelo A640 de 10 megapíxeles, adaptada a un microscopio Zeiss modelo Axioscop 2 plus – HAL 100. Las imágenes fueron tomadas con los lentes objetivos 63X y 100X, y los optobares de 1,6X y 2,5X.

Para las metafases sometidas a tinción DAPI se empleó una cámara modelo DP72 incorporada a un fotomicroscopio Olympus BX51 modelo U-TV0.5XC-3 y se utilizó el objetivo de 100X. Adicionalmente, se empleó un cubo de excitación UV para el fluorocromo DAPI.

#### 4.5 ELABORACIÓN DE CARIOTIPOS E IDIOGRAMAS

##### **4.5.1. Edición de imágenes**

Las imágenes obtenidas fueron editadas con el software Adobe Photoshop CS versión 2014 para Windows. Se realizaron arreglos pertinentes al contraste y brillo de cada una de las fotografías. Posteriormente, se recortó y ordenó los cromosomas de cada una de las metafases en función de la longitud relativa promedio de forma descendente y se los transfirió a un nuevo lienzo con las dimensiones apropiadas dependiendo del tamaño de las imágenes. Se guardó la nueva imagen tentativa de modelo de cariotipo en formato PSD y JPEG.

##### **4.5.2. Medición de cromosomas e identificación morfológica**

Las medidas de los cromosomas fueron tomadas con el software Axio Vision versión 4.4 para PC (Zeiss, 2005). Para la toma de medidas se consideró el siguiente orden: brazo pequeño (p)-brazo largo (q) empezando desde el comienzo del brazo corto hasta el centrómero y a partir de este punto se midió el brazo largo. Los datos obtenidos a partir de estas medidas se ingresaron en matrices en Excel. Para calcular el índice centromérico (IC), el radio centromérico (RC) y la longitud relativa (LR) de cada uno de

los cromosomas de acuerdo con la nomenclatura establecida por Green y Sessions (1991) (Anexo 2). Finalmente, se emparejó los cromosomas para obtener los cariotipos de cada especie.

#### **4.5.3. Elaboración del ideograma**

El ideograma fue diseñado en el programa Adobe Illustrator CS versión 2017 para Windows. Se utilizaron los valores de la longitud relativa promedio (LR) de los cariotipos finales. Posteriormente, se ordenaron los cromosomas de manera descendiente de acuerdo a la longitud relativa de cada par de cromosomas. Se ilustró el patrón de bandas y constricciones secundarias según los datos obtenidos mediante las tinciones y bandeos.

#### **4.6. CÁLCULOS ESTADÍSTICOS DE CROMOSOMAS**

Se trabajó con cuatro especímenes de *Bolitoglossa* aff. *sima* y con cinco de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* (cuatro especímenes pertenecientes a *Bolitoglossa* aff. *peruviana* I y uno perteneciente a *Bolitoglossa* aff. *peruviana* II). Se analizaron diez metafases de la especie *Bolitoglossa* aff. *sima*, cuatro metafases de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* I y una de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* II; de las cuales se establecieron el radio centromérico (RC), índice centromérico (IC) y la longitud relativa (LR). De estos datos se obtuvo la media y la desviación estándar de cada uno de los pares cromosómicos de los individuos mencionados y de cada especie.

## 5. RESULTADOS

Para este estudio se analizaron citogenéticamente 4 especímenes de *Bolitoglossa* aff. *sima* de la región Costa y 5 de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* de la región Oriental (Fig. 1; Tabla 1). Por cada ejemplar estudiado, se analizó un total de 5 núcleos, dando un total de 45 cariotipos. Como resultado de la eficiencia de las técnicas citogenéticas empleadas se observó que la de squash cromosómico fue exitosa para la obtención de cromosomas mitóticos provenientes del intestino de las salamandras.

### 5.1 NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA

Todos los especímenes tanto de *Bolitoglossa* aff. *sima* como de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* tuvieron un número cromosómico de  $2n=26$ . Todos los cariotipos coincidieron en poseer 6 pares de cromosomas grandes y 7 medianos. La morfología varía entre metacéntricos y submetacéntrico, dependiendo de la población y especie de salamandras analizadas (Tabla 2).

#### 5.1.1. Morfología cromosómica de *Bolitoglossa* aff. *sima*

El cariotipo de *Bolitoglossa* aff. *sima* se determinó mediante el análisis de 4 individuos colectados en la provincia de Esmeraldas (Tabla 1). Se obtuvo la longitud relativa promedio (LR) de cada par cromosómico, lo que permitió ordenarlos de manera descendente (Tabla 2). Se evidencia la agrupación de seis pares de cromosomas grandes y siete pares de cromosomas medianos (Fig. 3a). Los pares cromosómicos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 son metacéntricos y los pares 1 y 5 son submetacéntricos (Figs. 3a y 7; Tabla 2). Se evidenció que en los brazos cortos (p) del par cromosómico 2 presentan una constricción secundaria.

#### 5.1.2. Morfología cromosómica de *Bolitoglossa* aff. *peruviana*

Los individuos de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* fueron colectados en la provincia de Orellana: dos especímenes en la localidad de Cononaco y tres especímenes en la localidad de Tiputini (Fig. 1; Tabla 1).

#### 5.1.2.1 *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.1, localidad Cononaco

El cariotipo de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp1. ( $2n=26$ ) fue elaborado en base a la longitud relativa promedio de cada par cromosómico de los dos individuos colectados en el Cantón Aguarico, localidad Cononaco y fueron ordenados de manera descendiente (Tabla 2). De igual manera se organizó el cariotipo en un grupo de 6 pares de cromosomas grandes y otro de 7 medianos (Fig. 4). Los pares 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 y 13 corresponden a la morfología metacéntrica mientras que los pares 6 y 12 pertenecen a la morfología submetacéntrica (Fig. 4; Tabla 2).

#### 5.1.2.2 *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2, localidad Tiputini

Para realizar el análisis citogenético de los especímenes de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* de la localidad de Tiputini se dividió a los individuos en dos grupos, de acuerdo a las diferencias fenotípicas detectadas por Francisca Hervas. Museo de QCAZ de la PUCE.

##### 5.1.2.2.1. *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3, localidad Tiputini

Para los individuos QCAZ 68492 y QCAZ 68506 de esta localidad se organizó el cariotipo en 6 pares de cromosomas grandes y 7 medianos (Fig. 5). Los pares 1, 2, 6, 8, 9, 10, 11 y 12 corresponden a la morfología metacéntrica mientras que los pares 3, 4, 5, 7 y 13 pertenecen a la morfología submetacéntrica (Figs. 5 y 8; Tabla 2). Se observó también que en los brazos largos (q) del par cromosómico 1 y en los brazos cotos (p) del par cromosómico 7 presentan una constricción secundaria.

##### 5.1.2.2.2 *Bolitoglossa* aff. *peruviana* Tiputini sp.3

Para el individuo QCAZ 68497 de la localidad de Tiputini se evidencia la agrupación de 6 pares de cromosomas grandes y 7 pares de cromosomas medianos (Fig. 6a). Se determinó que los pares cromosómicos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 11 son metacéntricos

y los pares 7, 9 y 12 son submetacéntricos. (Figs. 6a y 9; Tabla 2). No se evidenciaron constricciones secundarias.

## 5.2. BANDEO CROMOSÓMICO

### 5.2.1. Bando-C

#### 5.2.1.1. Patrón de distribución de Bandas-C en *Bolitoglossa aff. sima*

En esta especie se observa un fuerte efecto de esta técnica en las zonas centroméricas de todos los cromosomas. Adicionalmente, se detectó la presencia de bandas C positivas ubicadas en los telómeros de los brazos largos (q) de los pares 1, 6, 8, 9, 12 y 13. En el par 13 también existe presencia de bandas C en los telómeros de los brazos cortos (p) (Figs. 3b y 7). Por otro lado, se encontraron bandas intercalares en brazos cortos y largos de los pares cromosómicos 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Los pares cromosómicos 2, 4 y 5 no contienen bandas C de ningún tipo a excepción de las zonas centroméricas (Figs. 3b y 7).

#### 5.2.1.2. Patrón de distribución de Bandas-C en *Bolitoglossa aff. peruviana*

##### 5.2.1.2.1. *Bolitoglossa aff. peruviana* sp.1, Cononaco

No se pudo observar patrones de Bandas-C debido a la calidad de las muestras

##### 5.2.1.2.2. *Bolitoglossa aff. peruviana* sp.2, Tiputini

Se observó una fuerte tinción en los centrómeros de todos los pares cromosómicos. Se observaron bandas C en los telómeros del brazo corto de par 4 y de los brazos cortos y largos del par 6. Adicionalmente, el par cromosómico 6 posee en los brazos cortos bandas pericentroméricas. Los pares 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 poseen bandas pericentroméricas en brazos cortos y/o largos. El par 10 posee bandas pericentroméricas dobles en brazos cortos y largos y el par 11 en brazos cortos. Con respecto al par 5, no presenta bandas-C intercalares ni pericentroméricas (Figs. 5 y 8).

### 5.2.1.2.3. *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3, Tiputini

Se observó la presencia de heterocromatina constitutiva centromérica en todos los pares cromosómicos. Hubo bandas C en las zonas teloméricas de los brazos largos de los pares 4, 5, 6 y 11; se observaron bandas pericentroméricas en brazos cortos y largos de todos los pares cromosómicos. Las bandas pericentroméricas del par 13 son dobles (Figs. 6b y 9).

## 5.2.2. Bando DAPI

### 5.2.2.1. Patrón de distribución de Bandas DAPI en *Bolitoglossa* aff. *sima*

Todos los individuos analizados correspondientes a esta especie evidenciaron tinción DAPI-positivo en el centrómero de todo el set cromosómico. La posición de las bandas DAPI en los cromosomas coincidieron con las de las bandas C (Figs. 3c y 7).

### 5.2.2.2. Patrón de distribución de Bandas DAPI en *Bolitoglossa* aff. *peruviana*

No se pudo confirmar la existencia de bandas DAPI. Sin embargo para el grupo de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3 Tiputini se comprobó la presencia de bandas DAPI+, las mismas que coincidieron con la posición de las bandas C (Figs. 6c y 9).

## 5.2.3. Bando Ag-NOR

### 5.2.2.1. Patrón de distribución de bandas-NOR en *Bolitoglossa* aff. *sima*

Los cariotipos examinados correspondientes a la especie evidenciaron la región del organizador nucleolar (NOR) en el par 11, de morfología metacéntrica, perteneciente al grupo de los cromosomas medianos. La ubicación del NOR se observa en los telómeros de los brazos largos (q). Sumado a esta evidencia, en algunas metafases se observó la presencia de NOR en un cromosoma adicional en el cariotipo, que en este caso es el primer cromosoma del par 13 perteneciente a los cromosomas medianos (Figs. 3a y 7). El NOR

en este cromosoma se encuentra en las partes teloméricas tanto en los brazos pequeños (p) como en los brazos largos (q).

#### 5.2.2.1. Patrón de distribución de bandas-NOR en *Bolitoglossa* aff. *peruviana*

Para las salamandras *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.1 pertenecientes a Cononaco y *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 Tiputini, no se pudo confirmar la existencia de la región del organizador nucleolar NOR. Por otro lado, en *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3 Tiputini, se corroboró la posición de estas bandas en uno de los cromosomas del par cromosómico 3 y en uno de los cromosomas del par 5, ubicados en el grupo de cromosomas grandes. La ubicación del NOR se observa en los telómeros de los brazos largos (q) (Figs. 6a y 9).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. TÉCNICA DE SQUASH CROMOSÓMICO

Los estudios cromosómicos en salamandras de la familia Plethodontidae del género *Bolitoglossa* han sido clave para el entendimiento de su taxonomía. Se conoce que los cromosomas presentes en estos individuos son grandes en su tamaño “macro cromosomas” (Sessions, 2008), por lo que el haber establecido modificaciones de la técnica de squash cromosómico para la obtención de cariotipos fue importante.

Cabe mencionar que con esta técnica se pierde mucho material celular de análisis. Sin embargo, fue con la cual se logró la obtención y visualización de cromosomas mitóticos de las salamandras analizadas en esta investigación.

### 6.2. NÚMERO CROMOSÓMICO

En el presente trabajo se evidenció que las salamandras: *Bolitoglossa* aff. *simá*, *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.1 Cononaco y *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 y sp.3 Tiputini, independientemente de la localidad de donde provienen (Tabla 1), tienen un número cromosómico diploide  $2n=26$  (Figs. 3, 4, 5 y 6). Este número cromosómico fue previamente reportado en salamandras de América Central: *Bolitoglossa subpalmata*, *B. helmrichi*, *B. rostrata*, *B. flaviventris*, *B. dofleini*, *B. engelhardii*, *B. franklini* y en dos especies de salamandras de Sudamérica: *Bolitoglossa adspersa* y *B. paraensis*, por lo que este carácter cromosómico es altamente conservado (Sessions y Kezer, 1987; Sessions, 2008; Green y Sessions, 1991; Barata da Silva, Suárez, Nagamachi, Carter, y Pieczarka, 2014; Sessions, 1989). Esto quiere decir que la cantidad de cambios genéticos a nivel evolutivo que se refleje en el número cromosómico, en general, es modesta para el género y al mismo tiempo se prueba que si no existen cambios en dicha información genética ésta es esencial, eficiente y no ha tenido competencia con alguna forma variante superior que pueda implicar una ventaja adaptativa. (Green y Sessions, 1991; Macgregor, 1993). Sin embargo, es interesante el hecho de que las salamandras del género *Bolitoglossa* tengan la mayor cantidad de especies en comparación al resto de géneros que conforman la familia Plethodontidae; tomando en cuenta que para otros géneros de salamandras como aquellas

del género *Karsenia* y *Aneides* (familia: Plethodontidae ambas) existen casos de poliploidias (Sessions, Stöck, Vieites, Quarles, Min, Wake, 2008; Sessions y Kezer, 1987). Esto se podría atribuir a ligeros arreglos en inversiones y translocaciones cromosómicas relacionadas a una variedad en características que incluyen a aquellas que cumplen un rol en la evolución adaptativa (Hoffmann y Rieseberg, 2008); como en el caso de las ranas dendrobátidos, donde el complemento cariotípico también es conservado (Vásquez, 2014).

### 6.3. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA

A pesar de que todos los individuos analizados presentan un mismo número en su cariotipo, estos cromosomas pueden ser distinguibles por la morfología (Figs. 3, 4, 5 y 6; Tabla 2). Todos los cariotipos coincidieron en poseer 6 pares de cromosomas grandes y 7 medianos. La morfología varía entre metacéntricos y submetacéntrico, dependiendo del grupo de individuos de salamandras analizados (Tabla 2).

Esta morfología submetacéntrica no ha sido reportada en *Bolitoglossa* de Centro América estudiadas por Sessions (1989), por el contrario se sabe que estos individuos incluyendo *Bolitoglossa adspersa* que es de Sudamérica, poseen en sus 13 pares cromosómicos la morfología metacéntrica. No obstante, se conoce que la morfología de los cromosomas en general de la familia Plethodontidae si incluye cromosomas metacéntricos y submetacéntricos (Mizuno y Macgregor, 1974). Por otro lado, Barata Da Silva et al. (2014) reporta morfologías submetacéntricas a nivel de los pares 9 y 12 del cariotipo de *Bolitoglossa paraensis* que se encuentran en Brasil (Anexo 3 y 4). Esta similitud en morfología submetacéntrica se observa particularmente con *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3 Tiputini en Ecuador debido a que coinciden en morfología en los pares 9 y 12 según los datos de IC Y RC (Figs. 6; Tabla 2). Esta similitud morfológica cromosómica podría estar revelando la cercanía a nivel filogenético y taxonómico de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3 Tiputini y *B. paraensis* debido a que las dos especies pertenecen al clado Eladinea (Parra-Olea, García-París y Wake, 2004).

Algunos cromosomas de los cariotipos analizados presentan constricciones secundarias. Este tipo de morfología también es considerada como un carácter que se puede presentar, depende del organismo, a nivel de género o de especie como en el caso de

ranas del género *Ameerega* cuyas constricciones secundarias son características compartidas por el género (Vásquez, 2014; Aguiar, Lima, Giaretta y Recco-Pimentel, 2002). En el caso de las salamandras del género *Bolitoglossa* no hay reportes en cuanto al carácter antes mencionado. Sin embargo, en esta investigación se observó que en *B. aff. sima* hay constricciones secundarias en los brazos cortos del par 2 y en *B. aff. peruviana* sp.2 Tiputini están en los brazos largos del par cromosómico 1 y brazos cortos del par cromosómico 7. En *B. aff. peruviana* sp.1 Cononaco y en *B. aff. peruviana* sp.3 Tiputini no se observan constricciones secundarias (Figs. 3, 4, 5 y 6).

Convencionalmente, las constricciones secundarias en anfibios son relacionadas con la zona del organizador nucleolar NOR por su posición. Sin embargo, no siempre es así (Macgregor, 1993) debido a que no se ha constatado aún que en las salamandras del género *Bolitoglossa* exista tal relación. La posición del NOR es discutida más adelante.

#### 6.4. BANDEO C

El hecho de haber encontrado bandas -C positivas implica que hay una coincidencia con la distribución de ADN altamente repetitivo (Lacadena, 1996). Esta técnica reveló la presencia de heterocromatina constitutiva en todas las regiones centroméricas, en diferentes áreas intercalares, pericentroméricas y teloméricas para todas las salamandras analizadas excepto en *Bolitoglossa aff. peruviana* sp.1 de la población de Cononaco por la baja calidad de la muestra (Figs. 3, 5, 6, 7, 8 y 9). Pese a que existe cierta uniformidad cariotípica en cuanto al número y la morfología, las regiones de heterocromatina constitutiva determinaron un patrón único de bandas intercalar y teloméricas. Esto se observa no solo en salamandras del género *Bolitoglossa* sino que está presente también en salamandras del género *Hydromantes*: familia Plethodontidae (Sessions et al., 2008).

Por consiguiente, en las salamandras analizadas de *Bolitoglossa aff. sima* claramente se puede observar que presenta bandas de tipo intercalar en los pares 1, 3, 6 y 11 (Figs. 3 y 7) contrariamente a las otras especies analizadas en este estudio, que no poseen bandeo intercalar heteropicnótico. Más bien *Bolitoglossa aff. peruviana* sp.2 y sp.3 Tiputini, presentan una tendencia similar en cuanto a bandas heterocromáticas de tipo pericentromérico (Figs. 5, 6, 8 y 9). Este patrón de bandeo se ha observado que es común pero aun así comparable entre bolitoglosas (Sessions, 2008). Por ejemplo, la tendencia de

bandeo- C pericentromérico entre las especies *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 y sp.3 Tiputini y *Bolitoglossa paraensis* de Brazil son parecidas en su posición en brazos cortos (p) y en brazos largos (q), aunque entre *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3 y *B. paraensis* se observa mayor similitud (Figs. 5, 6, 8, y 9; Anexo 3). Adicionalmente, se notó que entre *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 y sp.3 Tiputini hay una variación en la posición de bandas dobles pericentroméricas. En *B. aff. peruviana* sp.2 Tiputini están ubicadas en los pares 10 y 11; y en *B. aff. peruviana* sp.3 Tiputini están ubicadas en el par 13 (Figs. 5, 6, 8 y 9).

Al realizar una comparación del par 13 entre *B. aff. peruviana* sp.2 y sp.3 Tiputini, se observó que el par 13 de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 no presenta bandas-C dobles y su morfología es submetacéntrica. Lo que no sucede con en *B. aff. peruviana* sp.3 donde se observan bandas-C dobles y su morfología es metacéntrica. Esta observación, da paso a que se pueda reportar un posible caso de delección a nivel de heterocromatina constitutiva (Macgregor, 1993). Esto en particular con el par 13 de *B. aff. peruviana* sp.2, donde pudo haber existido presencia de una banda doble. La evidencia de esta conjetura esta justamente en la diferencia de morfologías. El par 13 de *B. aff. peruviana* sp.2 es más pequeño (sm) que el par 13 en *B. aff. peruviana* Tiputini sp.3 (m) (Tabla 2).

La heterocromatina de origen pericentromérico en el orden Caudata está relacionada con DNA satélite (Barata da Silva et al., 2014; Sessions, 2008). De acuerdo con Macgregor Sessions (1986), el crecimiento y la dispersión del DNA satélite ubicado en el centrómero esta en relación con las bandas C pericentroméricas. Bajo esta conjetura, el DNA satélite podría estar acumulado en el centrómero por duplicaciones en tandem y eventualmente sufriría inversiones o/e intercambios desiguales en estos sitios que son propensos a rupturas al azar causando la dispersión del DNA satélite a lo largo de los brazos cromosómicos. Esto quiere decir que la edad de DNA satélite esta relacionado por la posición en el cromosoma.

Los resultados observados de heterocromatina constitutiva en los cromosomas de *B. aff. peruviana* sp.2 y sp.3 Tiputini en comparación con *B. paraensis* de Brazil evidencian cercanía evolutiva, lo cual concuerda con la posición filogenética planteada por Hervas (2016). A pesar de que *B. aff. sima* no concuerda con los otros especímenes mencionados en cuanto a la posición de bandas- C es comprensible debido a que existe una distancia filogenética considerable con los individuos de *B. aff. peruviana*. Hay que considerar

también que las especies de *B. aff. sima* están separadas por la cordillera de los Andes con respecto a las bolitoglosas de la región Oriental en el Ecuador (Fig. 1).

#### 6.5. BANDEO DAPI

Para las salamandras *Bolitoglossa aff. peruviana* sp.1 Cononaco y *Bolitoglossa aff. peruviana* sp.2 Tiputini no se pudo confirmar la existencia de bandas DAPI. Sin embargo para el grupo de *Bolitoglossa aff. sima* y *Bolitoglossa aff. peruviana* sp.3 Tiputini se comprobó la presencia de bandas DAPI+, las mismas que coincidieron con la posición de las bandas-C (Figs. 3c, 6c, 7 y 9). La heterocromatina constitutiva de las zonas pericentroméricas, teloméricas e intersticiales es muy rica en secuencias A-T en el caso de especies del orden Caudata a diferencia de la mayoría de los anuros (Green y Sessions, 1991; King, 1993). La realización de esta técnica ayudó a corroborar bandas-C + en los cromosomas analizados.

#### 6.6. BANDEO NOR

La técnica de impregnación argéntica Ag-NOR, en este estudio, permitió la identificación de la posición del complejo de genes ribosomales 18s y 28s de las salamandras del género *Bolitoglossa* (Schmid, 1978). Se ha constatado que la región NOR en estos individuos es característica por estar posicionada generalmente en las partes teloméricas en los brazos cortos o largos de un par cromosómico y/o en otros cromosomas que se los considera como secundarios (Sessions, 2008; Sessions, 1989). Esto se observa claramente en el cariotipo de *B. aff. sima* en el par 11 y en el cromosoma adicional (secundario) del par 13 (Figs. 3 y 7); *B. aff. peruviana* sp.3 Tiputini, por otro lado, presenta el NOR en dos cromosomas que pertenecen a pares distintos, al par 3 y al par 5 (Figs. 6 y 9). Estas regiones NOR en los cromosomas de estas salamandras son casi imperceptibles o pequeñas como se observa en la figuras 1 y 4 respectivas a cada especie.

Esta dinámica de distribución con respecto al carácter del NOR en los cromosomas de algunos anfibios resulta ser común (Macgregor, 1993). Es decir que puede ocurrir emparejamientos no homólogos en la mitosis y ocasionar un intercambio desigual de los genes ribosomales que pueden resultar en duplicaciones y deleciones del NOR, aunque no se descarta la posibilidad de que también puedan ocurrir otros mecanismos de rompimiento

desigual de las cromátides hermanas, finalmente generando que el fragmento saliente tenga afinidad con otro sitio en otra cromátide de otro par cromosómico (Kasahara, 2009).

Las discontinuidades en la posición del NOR no solo se observaron en los individuos mencionados en este estudio sino que también Green y Session (1991) reportan dichas diferencias en *Bolitoglossa* de Centro América.

En general, la detección del NOR en los cromosomas de anfibios es una herramienta útil para establecer diferencias interespecíficas entre individuos a pesar de las discontinuidades en la posición de la región del organizador nucleolar en los cariotipos. A nivel de citotaxonomía es esencial pues se puede saber si se trata de un patrón especie-específico o población-específica (Kasahara, 2009).

#### 6.7. Diversidad de *Bolitoglossa aff peruviana* sp.2 y sp.3 Tiputini

La identificación fenotípica (Hervas, no publicado) y los resultados de los análisis a nivel de morfología cromosómica, bandeo-C y NOR, de las salamandras *B. aff. peruviana* sp.2 y sp.3, sugieren la posibilidad de dos especies coexistiendo y que aparentemente son individuos no descritos. Estas dos especies de salamandras habitan en una misma área geográfica (Fig.1) si pueden presentar especiación. Esto se debe a que las salamandras *Bolitoglossa* poseen baja vagilidad, alta filopatría y rangos cortos de hábitat donde puede estar ocurriendo diferenciación local (Elmer et al., 2013). Por este motivo, también se sugiere completar la información, con respecto a estas salamandras, con estudios a nivel molecular para corroborar lo sugerido en este estudio.

## 7. CONCLUSIONES

El número cromosómico para *Bolitoglossa* aff. *sima*, *Bolitoglossa* aff. *peruviana* SP.1 Cononaco y *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 y sp.3 es de  $2n=26$ , que confirma su naturaleza uniforme y conservada.

Las salamandras del género *Bolitoglossa* analizadas en este trabajo tienen la morfología metacéntrica (m) y submetacéntrica (sm) característica de la familia Plethodontidae.

Las salamandras *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3 Tiputini coinciden en la citotaxonomía con *Bolitoglossa paraensis* de Brasil.

El análisis de bandeo C en salamandras bolitoglosas resulta ser útil a nivel interespecífico y también informativo a nivel especie-específico y población-específico.

La detección del NOR en los cromosomas de las salamandras estudiadas es una herramienta útil para establecer diferencias interespecíficas entre individuos a pesar de las discontinuidades en la posición de la región del organizador nucleolar en los cariotipos.

La técnica de squash cromosómico resultó eficiente para la observación de cromosomas mitóticos en salamandras.

## 7.1. RECOMENDACIONES

Realizar análisis citogenéticos en salamandras del género *Bolitoglossa* con un número de individuos mayor a cinco, debido a que queda demostrado que se puede obtener resultados interesantes en la morfología cromosómica que presenta esta especie en el Ecuador.

Incrementar el estudio de las salamandras a nivel citogenético clásico y molecular en el Ecuador debido a que queda demostrado que se obtiene información valiosa para futuros estudios.

Realizar estudios moleculares de las salamandras procesadas en esta investigación.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, O., Lima, A. P., Giaretta, A. A., & Recco-Pimentel, S. M. (2002). Cytogenetic analysis of four poison frogs of the epipedobates genus (anura: dendrobatidae). *Herpetologica*, 58(3), 293–303. [https://doi.org/10.1655/0018-0831\(2002\)058\[0293:CAOFFP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1655/0018-0831(2002)058[0293:CAOFFP]2.0.CO;2).

AmphibiaWeb. (2017). Worldwide Amphibian Declines. Retrieved April 16, 2017, de <http://www.amphibiaweb.org/declines/declines.html>.

Barata da Silva, J., Suárez, P., Nagamachi, C. Y., Carter, T. F., & Pieczarka, J. C. (2014). Cytogenetics of the Brazilian *Bolitoglossa paraensis* (Unterstein, 1930) salamanders (Caudata, Plethodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, 37(3), 526–529. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014000400008>.

Córdova, J., & Lamas, G. (1997). Citogenética, filogenia, clasificaciones naturales y evolución de las especies. UNMSM. Fondo Editorial, 95–112. Obtenido de [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/Alma\\_Mater/1997\\_n13-14/citogenetica.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/Alma_Mater/1997_n13-14/citogenetica.htm).

Elmer, K. R., Bonett, R. M., Wake, D. B., & Lougheed, S. C. (2013). Early Miocene origin and cryptic diversification of South American salamanders. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-59>

Frost, D. R. (2017). Amphibian Species of the World. Retrieved January 1, 2017, from <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.

Green, D. M., & Sessions, S. K. (1991). Amphibian cytogenetics and evolution. San Diego, California: Academic Press.

Hervas, F. (2016). Cryptic diversity and biogeographic history of South American salamanders. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Hoffmann, A. A., & Rieseberg, L. H. (2008). Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(2008), 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173532>.

Howell, W. M., & Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizerregions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36(8), 1014–1015. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>.

Kasahara, S. (2009). *Introducción a la investigación en citogenética de vertebrados*. (R. Preto, Ed.). Brasil: Sociedade Brasileira de Genética.

King, M. (1993). *Species Evolution the role of chromosome change*. New York USA: Press Syndicate of the University of Cambridge.

Lacadena, J. R. y Juan R. (1996). *Citogenética*. Complutense.

Macgregor, H. C. (1993). *An introduction to animal cytogenetics*. London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman and Hall.

Macgregor, H. C., & Sessions, S. K. (1986). The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus *Triturus*: an evolutionary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 312(1154), 243–259. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0005>.

Mizuno, S., & Macgregor, H. C. (1974). Chromosomes, DNA sequences, and evolution in salamanders of the genus *Plethodon*. *Chromosoma*, 48(3), 239–296. <https://doi.org/10.1007/BF00326507>.

O'Connor, C. (2014). Chromosomes and Cytogenetics | Learn Science at Scitable. Retrieved September 8, 2017, from <https://www.nature.com/scitable/topic/chromosomes-and-cytogenetics-7>

Olympus corporation. (2008). OLYMPUS : Global Homepage. Retrieved July 22, 2017, from <https://www.olympus-global.com/>

Ohri, D. (1998). Genome Size Variation and Plant Systematics. *Japanese Journal Of Breeding*, 82(Table 1), 75–83. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0765>.

Parra-Olea, G., Mario García-París, & Wake, D. B. (2004). Molecular diversification of salamanders of the tropical American genus *Bolitoglossa* (Caudata: Plethodontidae) and its evolutionary and biogeographical implications. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81(3), 325–346. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2003.00303.x>

Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. (2017). *AmphibiaWebEcuador*. Retrieved January 1, 2016, from <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios>.

Schmid, M. (1978). Chromosome banding in Amphibia. *Cytogenetic and Genome Research*, 66(1–2), 361–388. <https://doi.org/10.1159/000133929>

Sessions, S. K. (1989). *Cytogenetics and evolution in salamanders*. University of California, Berkeley.

Sessions, S. K. (2008). Evolutionary cytogenetics in salamanders. *Chromosome Research*, 16(1), 183–201. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1205-3>.

Sessions, S. K., & Kezer, J. (1987). Cytogenic evolution in the plethodontid genus *Aneides*. *Chromosoma*, 95, 17–30.

Sessions, S. K., Stöck, M., Vieites, D. R., Quarles, R., Min, M. S., & Wake, D. B. (2008). Cytogenetic analysis of the Asian Plethodontid salamander, *Karsenia koreana*: Evidence for karyotypic conservation, chromosome repatterning, and genome size evolution. *Chromosome Research*, 16(4), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s10577-008-1197-7>.

Sessions, S. K. (1980). Evidence for a highly differentiated sex chromosome heteromorphism in the salamander *Necturus maculosus* (Rafinesque). *Chromosoma*, 77(2), 157–168. <https://doi.org/10.1007/BF00329541>.

Sumner, A. T. (1986). 304 Preliminary notes 11., 246(1971), 1971–1973.

Tiago, Ferreira y Wayne, R. (2012). ImageJ User Guide - IJ 1.46r. Retrieved from <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/>.

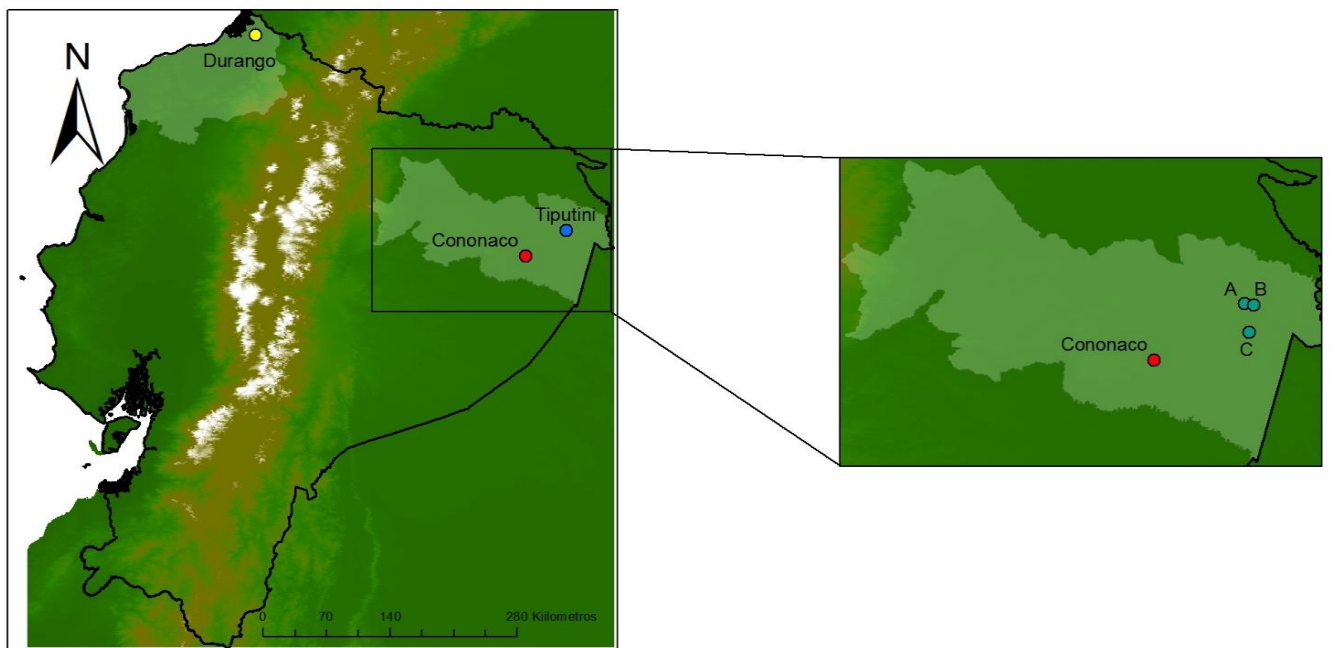
Vásquez, E. (2014). Análisis de cromosomas mitóticos de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli* (Anura:Dendrobatidae) de la Estación Científica Yasuní. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Wake, D. B., Lynch, J. F. (1976). The distribution, ecology and evolution history of plethodontid salamanders in tropical America. Nat. Hist. Museum Los Angeles City. Sci. Bull, 25, 1–65.

Wake, D. B., Papenfuss, T. J., & Lynch, J. F. (1992). Distribution of salamanders along elevational transects in Mexico and Guatemala. Tulane Studies in Zoology and Botany, (Suppl. 1), 303–319.

Zeizz, C. (2005). Axio Vision 4.4 Software. Gottingen-Alemania.

## **9. FIGURAS**



**Figura 1.** Mapa del Ecuador. Localidades de colecta de los especímenes de *Bolitoglossa* aff. *sima*, (punto amarillo); *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.1 Cononaco (punto rojo); *Bolitoglossa* aff. *peruviana* Tiputini punto azul. Puntos de colecta azules en Tiputini. Puntos B y C (*Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2; QCAZ 68492 y QCAZ 68506); punto A (*Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3; QCAZ 68497).

a)



© Verónica Andrade M.

b)



© Verónica Andrade M.

c)



© Gustavo Pazmiño

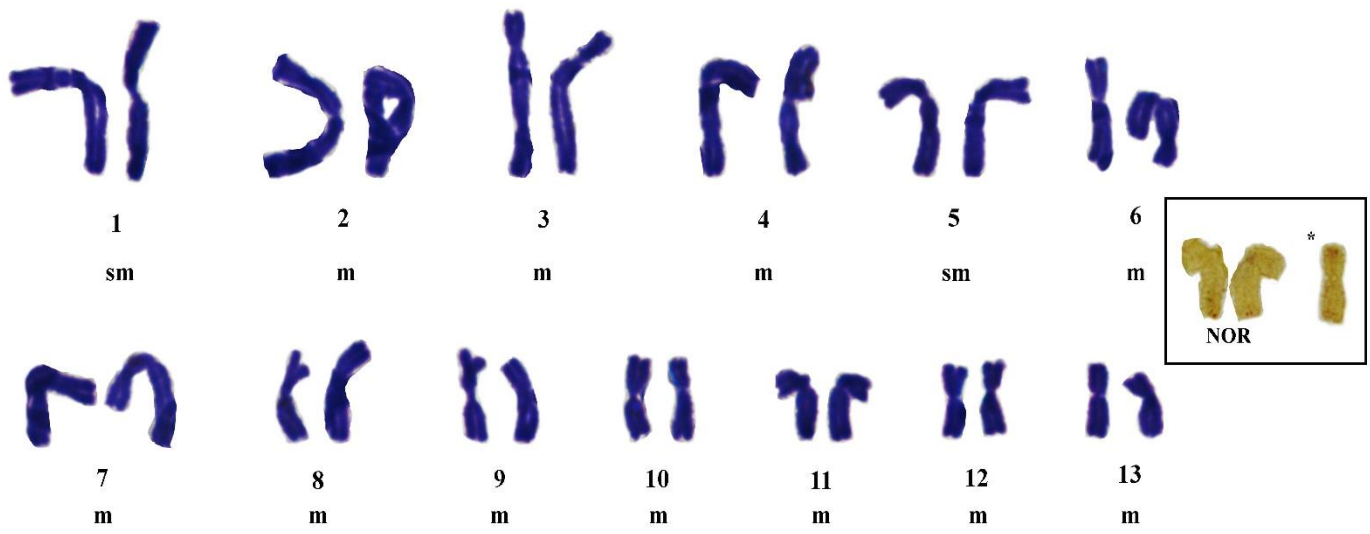
d)



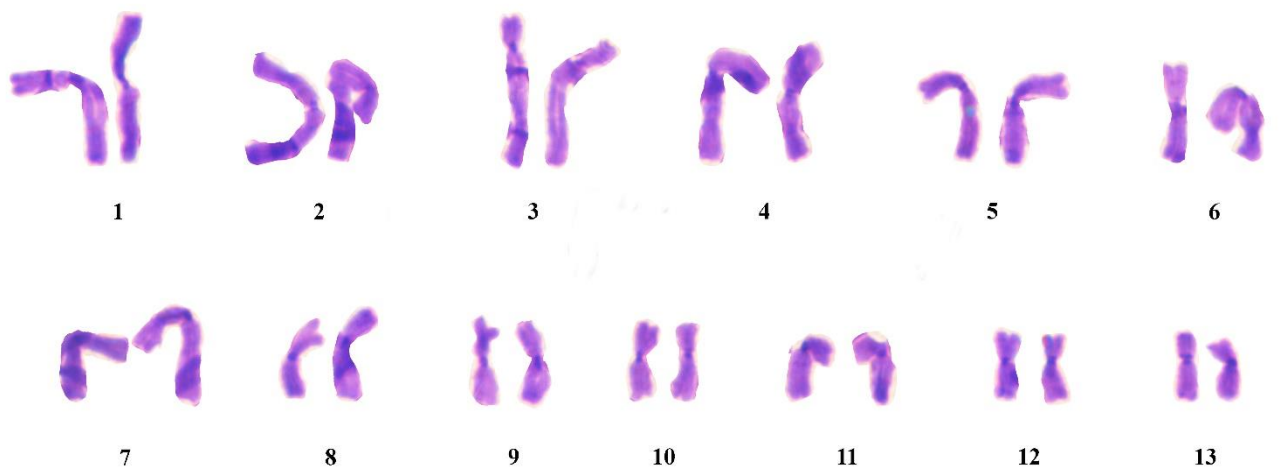
© Gustavo Pazmiño

**Figura 2.** Especímenes de a) *Bolitoglossa* aff. *sima*; b) *Bolitoglossa* aff. *Peruviana* sp.1 Cononaco; c) *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 Tiputini; d) *Bolitoglossa* aff. *Peruviana* sp.3 Tiputini.

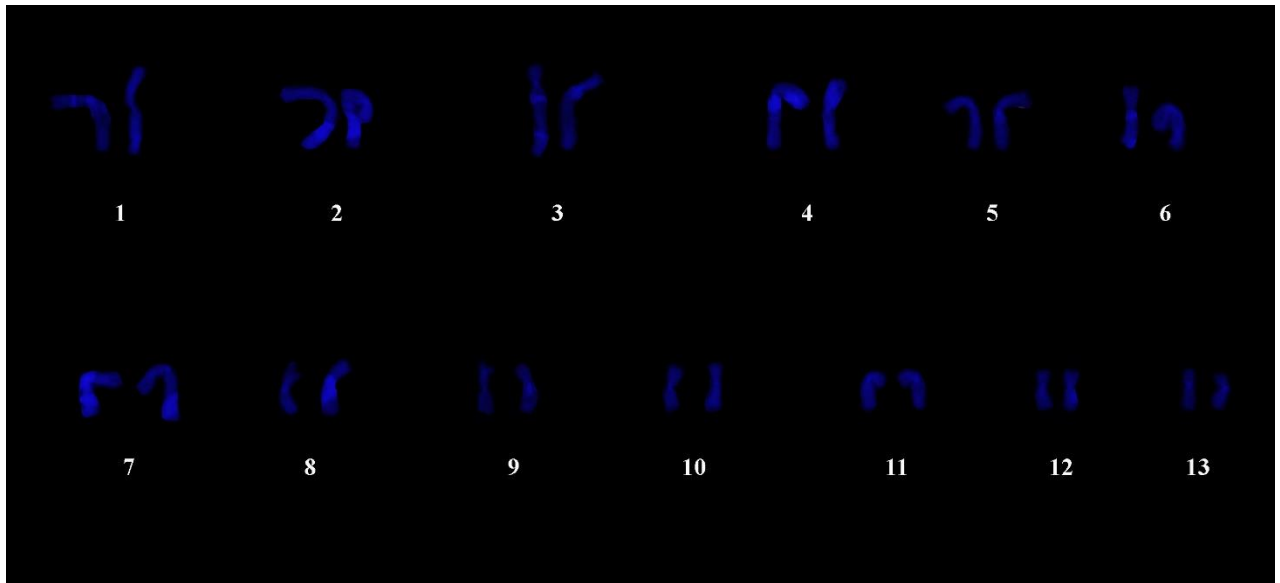
a)



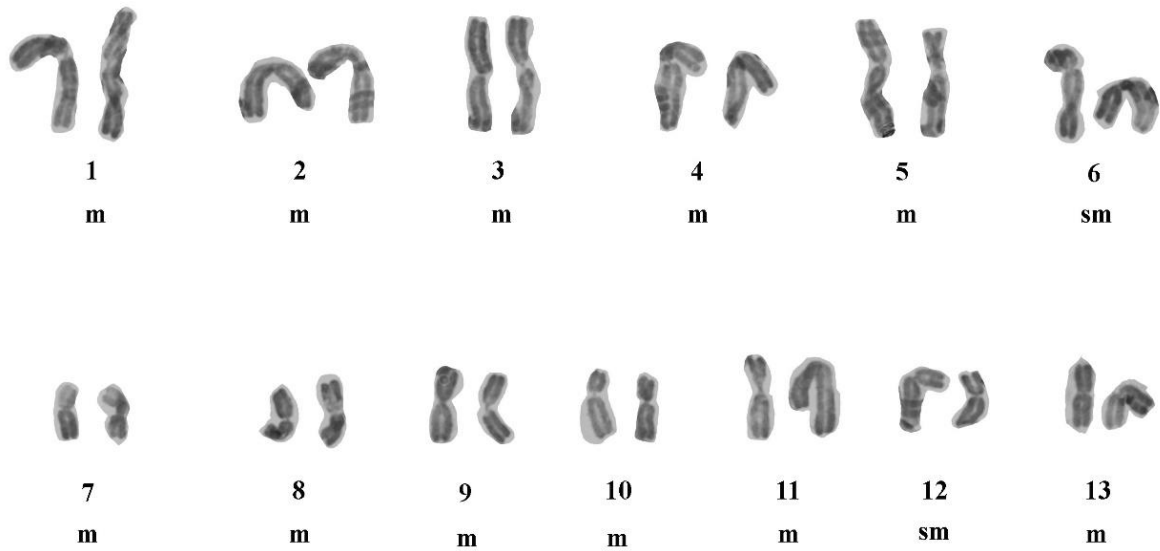
b)



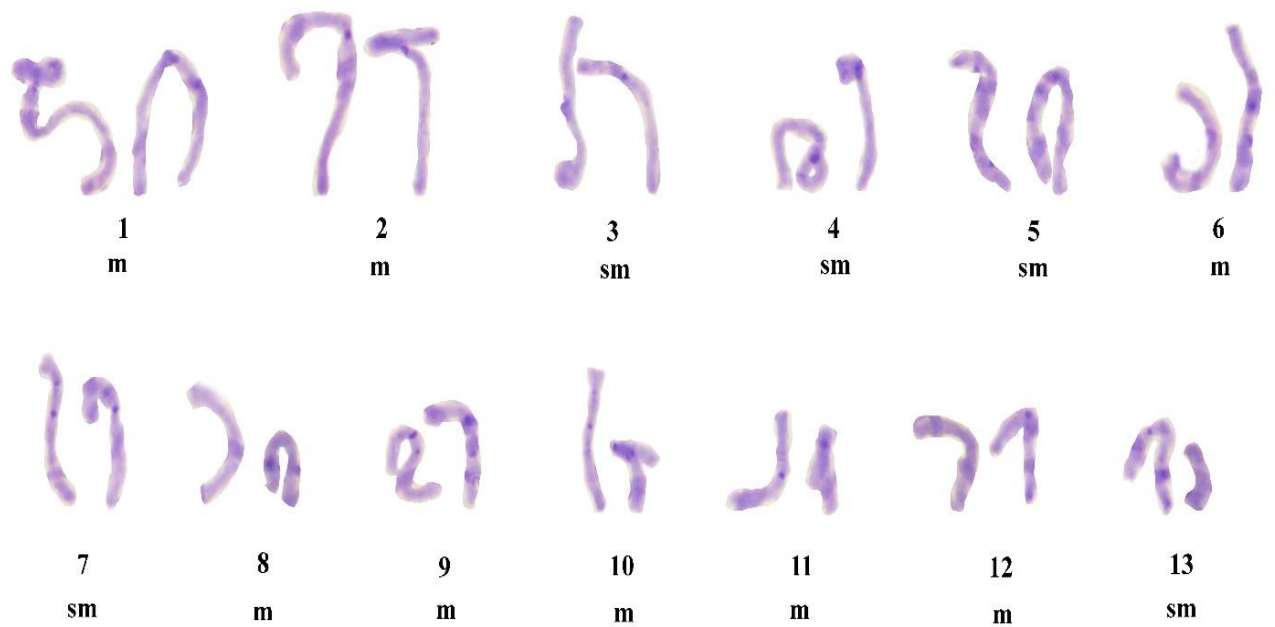
c)



**Figura 3.** Cariotipos de *Bolitoglossa* aff. *simi*. a) Tinción con Giemsa, el par y el cromosoma aislados a la derecha revelan los cromosoma que contiene NOR, par 11 y 13; b) Bando-C, bandas púrpura más oscuras representan la heterocromatina teñida; c) Técnica de bandeo DAPI, las áreas azules con mayor tinción revelan las regiones heterocromáticas ricas en A-T; m=metacéntrico, sm=submetacéntrico. El asterisco (\*) indica la presencia de un cromosoma extra con NOR del par 13.

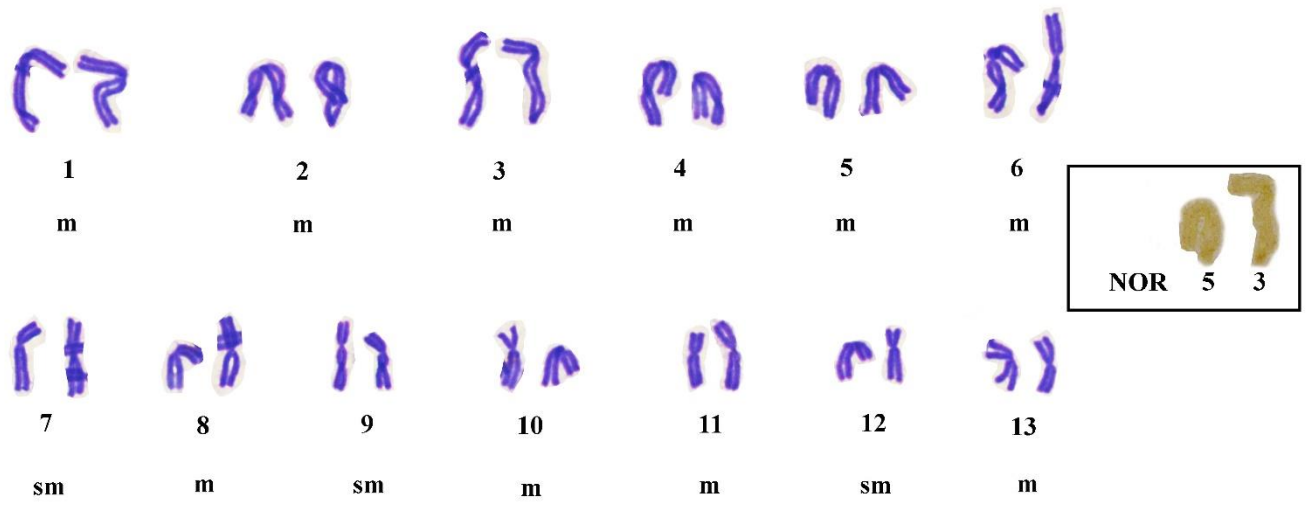


**Figura 4.** Cariotipo de *Bolitoglossa aff. peruviana* sp.1 Cononaco/Orellana. Tinción con Giemsa, m=metacéntrico, sm=submetacéntrico.

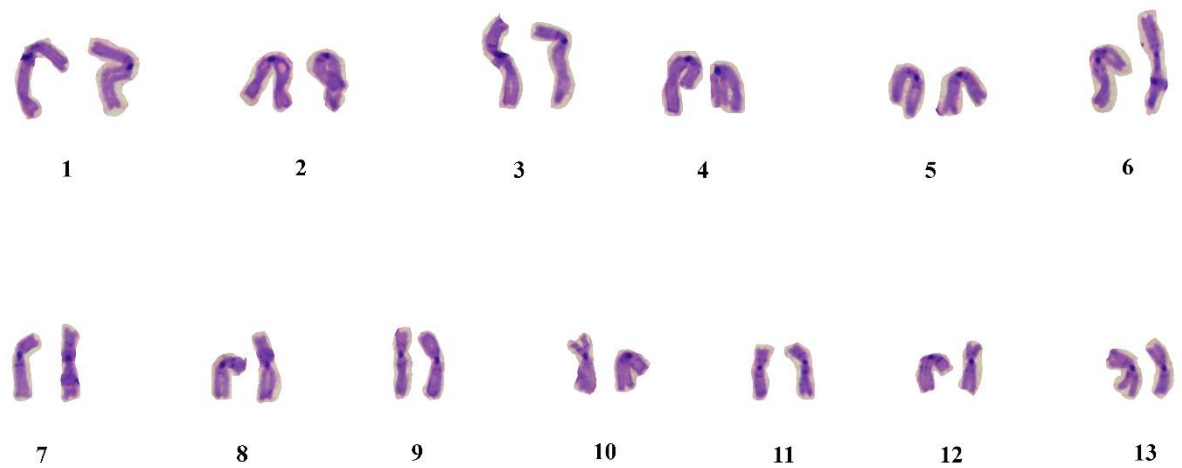


**Figura 5.** Cariotipo de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 Tiputini. Bando-C, bandas púrpura más oscuras representan la heterocromatina teñida, m=metacéntrico, sm=submetacéntrico.

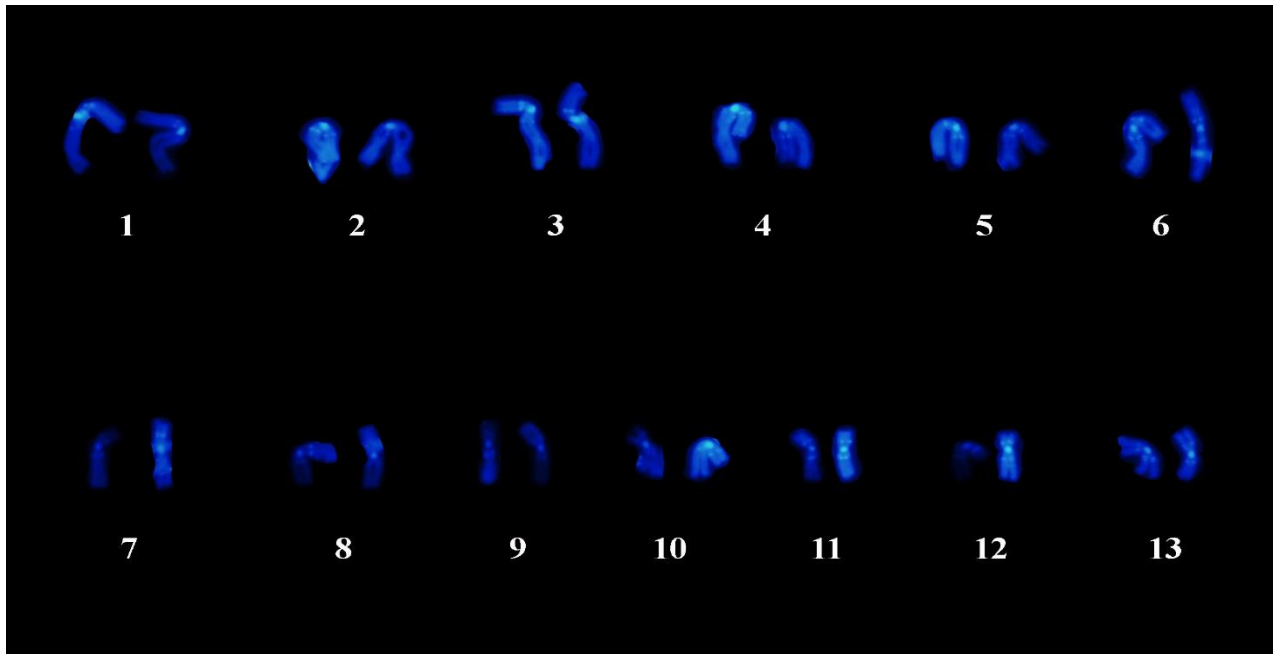
a)



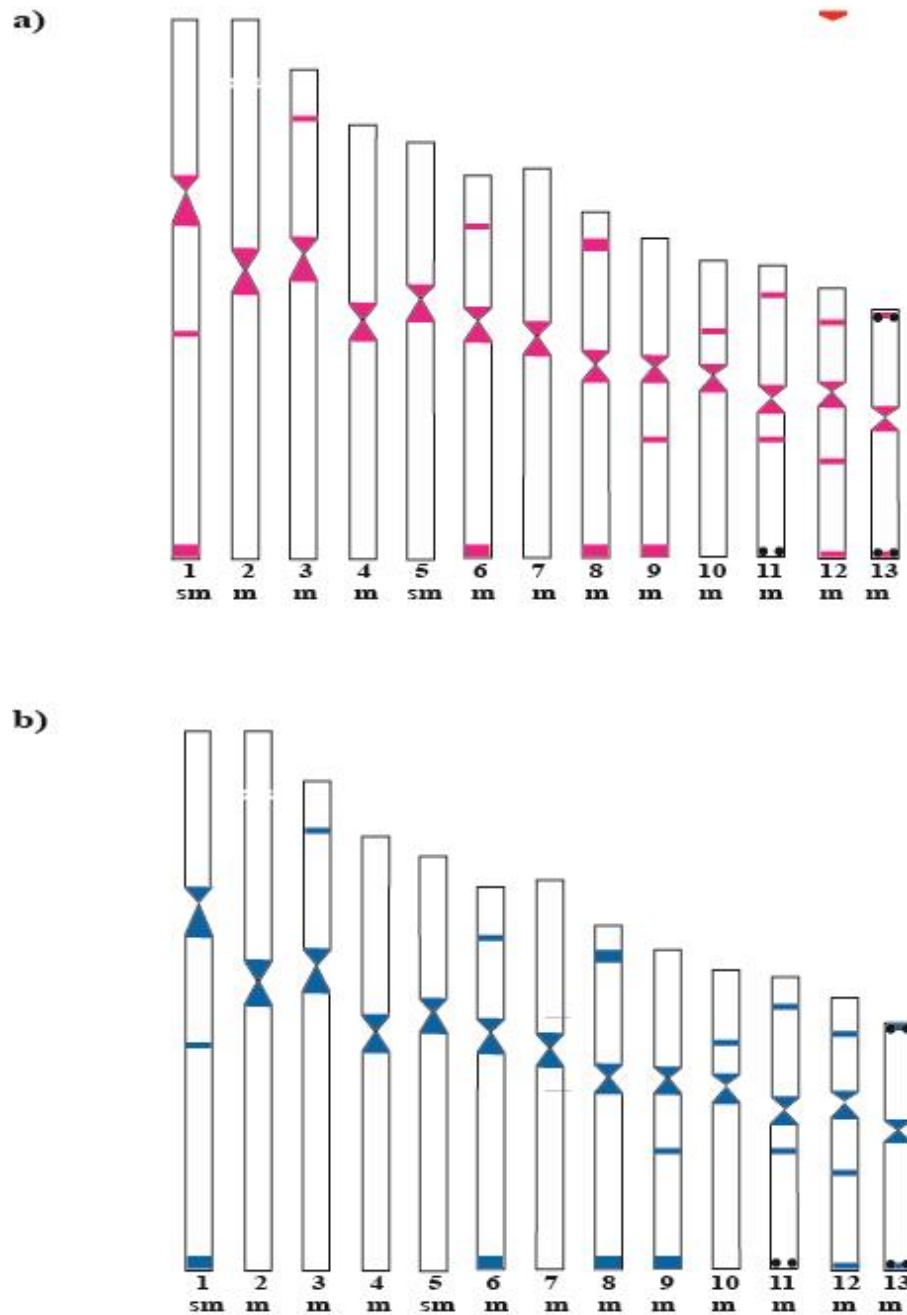
b)



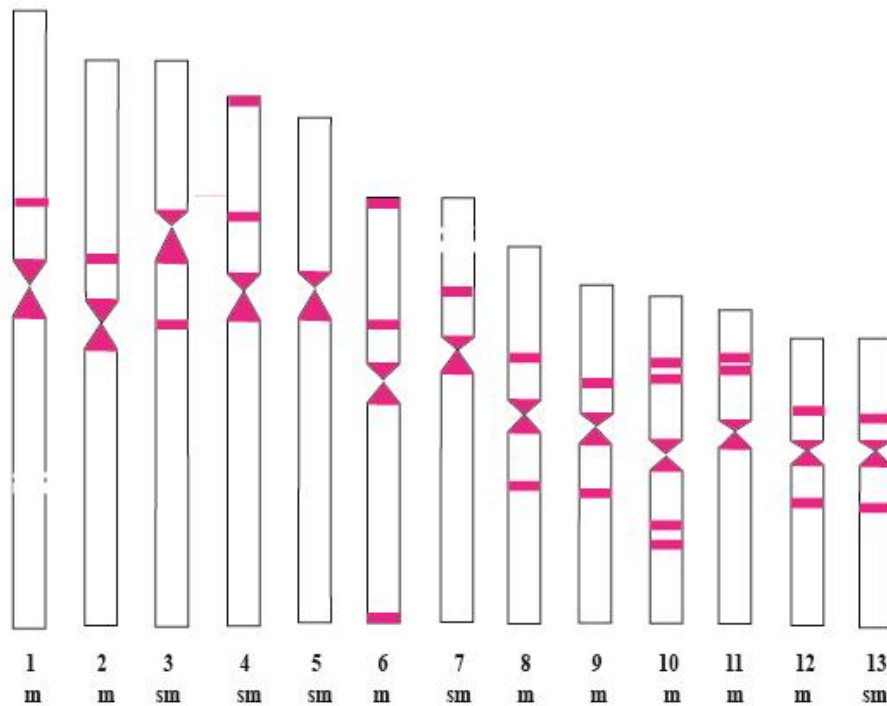
c)



**Figura 6.** Cariotipos de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3 Tiputini. a) Tinción con Giemsa, el par de cromosomas aislados a la derecha revelan los cromosomas que contienen NOR; b) Bando-C, bandas púrpura más oscuras representan la heterocromatina teñida; c) Técnica de bandeo DAPI, las áreas azules con mayor tinción revelan las regiones heterocromáticas ricas en A-T; m=metacéntrico, sm=submetacéntrico.

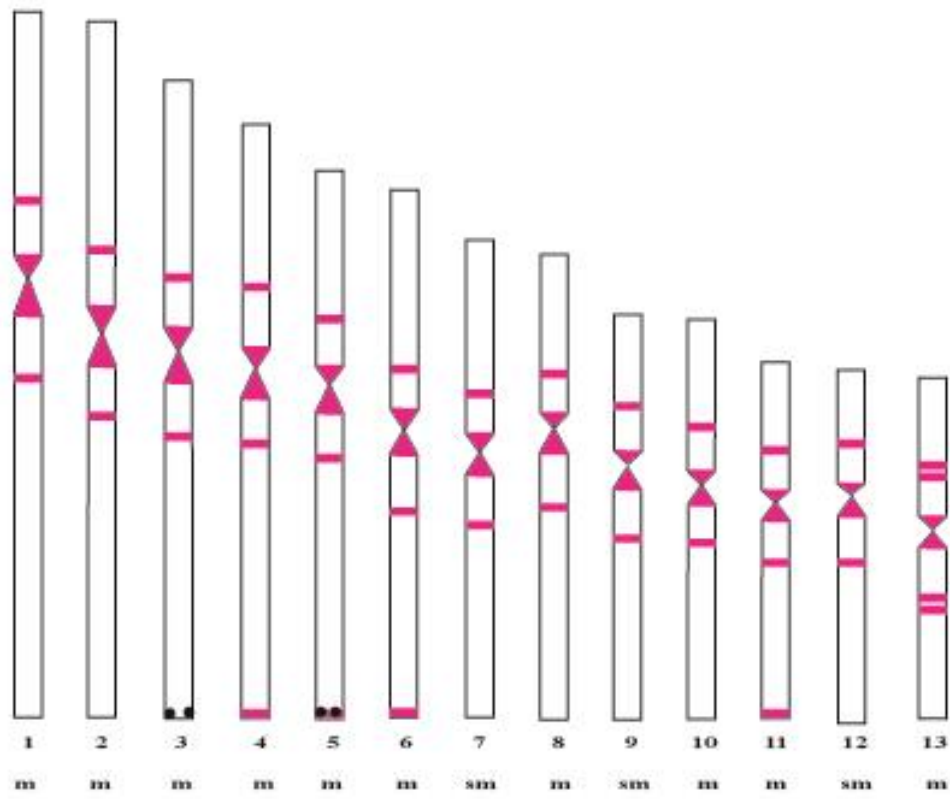


**Figura 7.** Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de *Bolitoglossa* aff. *sima*. Detalle del número de cromosomas, constricciones secundarias, posición del NOR el patrón de a) bandas-C y b) bandas-DAPI. Las regiones fucsias demuestran las regiones marcadas de heterocromatina para bandeado-C. Las regiones azul claras señalan las regiones marcadas de heterocromatina marcada con bandeado-DAPI. Los círculos oscuros representan a la posición del NOR. Líneas entrecortadas marcan las zonas de constricción secundaria. m= metacéntrico, sm= submetacéntrico.

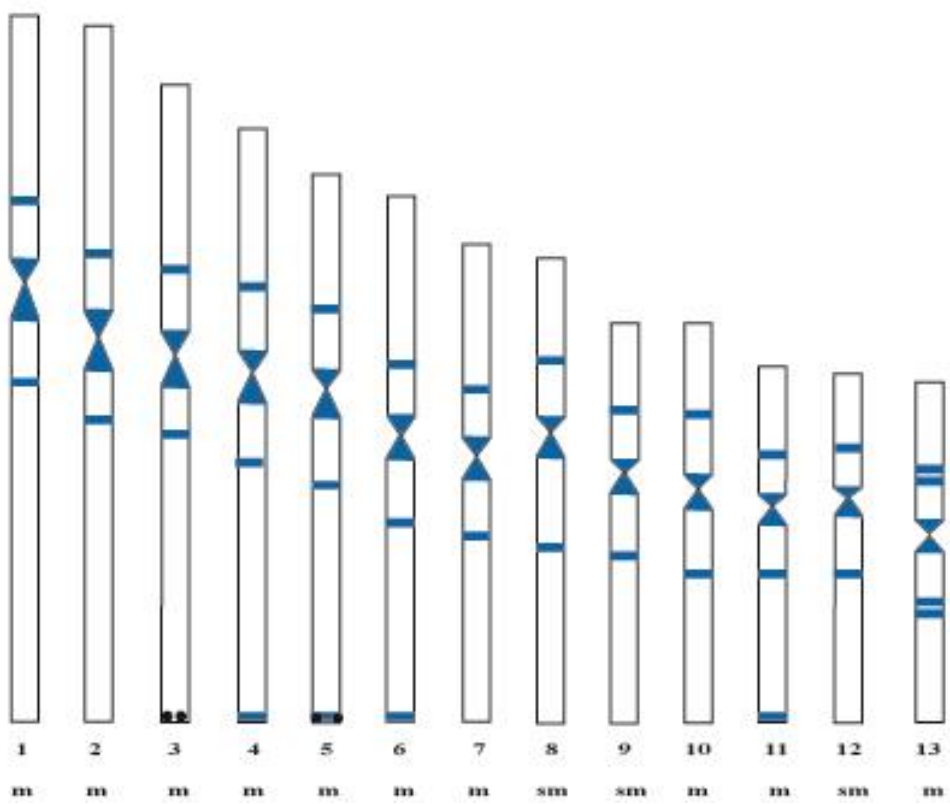


**Figura 8.** Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.2 Tiputini. Detalle del número de cromosomas y constricciones secundarias. Bandas-C regiones marcadas de fucsia para heterocromatina. Líneas entrecortadas marcan las zonas de constricción secundaria. m= metacéntrico, sm= submetacéntrico.

a)



b)



**Figura 9.** Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de *Bolitoglossa* aff. *peruviana* sp.3 Tiputini. Detalle del número de cromosomas, posición del NOR el patrón de a) bandas-C y b) bandas-DAPI. Las regiones fucsias demuestran las regiones marcadas de heterocromatina para bandeo-C. Las regiones azul claras señalan las regiones marcadas de heterocromatina marcada con bandeo-DAPI. Los círculos oscuros representan a la posición del NOR, en este caso en uno de los cromosomas de los pares correspondientes. m= metacéntrico, sm= submetacéntrico.

## **10. TABLAS**

**Tabla 1. Datos de la colección de los individuos analizados de *Bolitoglossa aff. sima* y *Bolitoglossa aff. peruviana***

<i>Especie</i>	<i>Localidad</i>	<i>QCAZ</i>	<i>Altura m.s.n.m.</i>	<i>Sexo</i>
<i>Bolitoglossa aff. sima</i>	Durango/ Esmeraldas	68457	90	M
		68453	48	M
		68512	48	M
		68455	48	H
<i>Bolitoglossa aff. peruviana</i>	Cononaco/ Orellana	68459	234	H
		68463	260	H
	Tiputini/ Orellana	68492	203	M
		68506	201	M
		*68497	125	M

\* Individuo donde se encontró variación cromosómica en relación a los demás individuos de Tiputini/Orellana

M= macho

H= hembra

**Tabla 2. Datos cromosómicos de los cariotipos correspondientes a *Bolitoglossa aff. sima*, *Bolitoglossa aff. peruviana*.** Los valores de longitud cromosómica son dados en porcentaje, los valores promedio pertenecen a la cantidad de cromatina por cariotipo; Los datos de morfología cromosómica se refieren a posiciones del centrómero según la nomenclatura de Green y Sessions, 1991 (Ver anexo 2).

<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>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b><i>Bolitoglossa aff. sima</i> n=4</b>													
<b>LR (%)</b>	11.02 $\sigma=6.93$	10.65 $\sigma=7.31$	9.76 $\sigma=6.42$	8.88 $\sigma=5.75$	8.54 $\sigma=5.42$	7.79 $\sigma=5.00$	7.72 $\sigma=6.31$	7.05 $\sigma=4.63$	6.58 $\sigma=4.26$	6.05 $\sigma=3.93$	5.65 $\sigma=3.94$	5.28 $\sigma=3.63$	5.02 $\sigma=3.29$
<b>RC</b>	2.14 $\sigma=0.44$	1.16 $\sigma=0.13$	1.66 $\sigma=0.60$	1.22 $\sigma=0.18$	1.68 $\sigma=0.34$	1.63 $\sigma=0.68$	1.33 $\sigma=0.24$	1.26 $\sigma=0.19$	1.49 $\sigma=0.35$	1.60 $\sigma=0.39$	1.20 $\sigma=0.19$	1.63 $\sigma=0.43$	1.32 $\sigma=0.22$
<b>IC</b>	0.32 $\sigma=0.05$	0.46 $\sigma=0.03$	0.38 $\sigma=0.06$	0.45 $\sigma=0.03$	0.37 $\sigma=0.06$	0.38 $\sigma=0.08$	0.43 $\sigma=0.04$	0.44 $\sigma=0.04$	0.40 $\sigma=0.05$	0.38 $\sigma=0.05$	0.45 $\sigma=0.04$	0.38 $\sigma=0.06$	0.43 $\sigma=0.04$
<b>MC</b>	<b>sm</b>	m	m	m	<b>sm</b>	m	m	m	m	m	m	m	m
<b><i>Bolitoglossa aff. peruviana</i> sp.1 n=2</b>													
<b>Cononaco</b>													
<b>LR (%)</b>	11.39 $\sigma=7.31$	9.93 $\sigma=6.52$	9.83 $\sigma=6.40$	9.19 $\sigma=6.33$	8.59 $\sigma=6.27$	8.22 $\sigma=5.76$	7.30 $\sigma=4.99$	6.91 $\sigma=4.78$	5.99 $\sigma=4.08$	6.30 $\sigma=3.82$	5.68 $\sigma=3.69$	5.60 $\sigma=3.62$	5.06 $\sigma=3.63$
<b>RC</b>	1.41 $\sigma=0.35$	1.04 $\sigma=0.02$	1.47 $\sigma=0.20$	1.27 $\sigma=0.09$	1.57 $\sigma=0.22$	1.78 $\sigma=0.04$	1.25 $\sigma=0.11$	1.34 $\sigma=0.03$	1.15 $\sigma=0.01$	1.54 $\sigma=0.09$	1.15 $\sigma=0.09$	1.74 $\sigma=0.02$	1.13 $\sigma=0.01$
<b>IC</b>	0.42 $\sigma=0.05$	0.49 $\sigma=0.01$	0.41 $\sigma=0.03$	0.44 $\sigma=0.02$	0.39 $\sigma=0.04$	0.36 $\sigma=0.01$	0.44 $\sigma=0.02$	0.43 $\sigma=0$	0.46 $\sigma=0$	0.39 $\sigma=0.01$	0.47 $\sigma=0.02$	0.36 $\sigma=0$	0.47 $\sigma=0$
<b>MC</b>	m	m	m	m	m	<b>sm</b>	m	m	m	m	m	<b>sm</b>	m

Tabla 2. Datos cromosómicos de los cariotipos correspondientes a *Bolitoglossa* aff. *sima*, *Bolitoglossa* aff. *peruviana* (continuación...)

	<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>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b><i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> sp.2 n=2</b>													
<b>Tiputini</b>													
<b>LR (%)</b>	11.26 $\sigma=2.29$	10.23 $\sigma=2.13$	10.22 $\sigma=2.12$	9.65 $\sigma=1.97$	9.08 $\sigma=1.88$	7.66 $\sigma=1.58$	7.54 $\sigma=1.65$	6.86 $\sigma=1.41$	6.10 $\sigma=1.25$	5.88 $\sigma=1.21$	5.64 $\sigma=1.18$	5.29 $\sigma=1.07$	4.58 $\sigma=0.94$
<b>RC</b>	1.25 $\sigma=0.08$	1.15 $\sigma=0.14$	2.43 $\sigma=1.52$	1.73 $\sigma=0.29$	1.97 $\sigma=0.06$	1.32 $\sigma=0.43$	1.80 $\sigma=0.09$	1.25 $\sigma=0.32$	1.39 $\sigma=0.37$	1.06 $\sigma=0.09$	1.58 $\sigma=0.35$	1.56 $\sigma=0.09$	2.39 $\sigma=0.08$
<b>IC</b>	0.45 $\sigma=0.02$	0.46 $\sigma=0.03$	0.29 $\sigma=0.11$	0.37 $\sigma=0.04$	0.34 $\sigma=0.01$	0.43 $\sigma=0.08$	0.36 $\sigma=0.01$	0.44 $\sigma=0.06$	0.42 $\sigma=0.06$	0.48 $\sigma=0.02$	0.39 $\sigma=0.05$	0.39 $\sigma=0.01$	0.30 $\sigma=0.01$
<b>MC</b>	m	m	<b>sm</b>	<b>sm</b>	<b>sm</b>	m	<b>sm</b>	m	m	m	m	m	<b>sm</b>
<b><i>Bolitoglossa</i> aff. <i>peruviana</i> sp.3 n=1</b>													
<b>Tiputini</b>													
<b>LR (%)</b>	10.97	10.69	9.87	9.11	8.46	8.23	7.17	7.15	6.17	6.09	5.50	5.40	5.19
<b>RC</b>	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64
<b>IC</b>	0.38	0.45	0.42	0.42	0.39	0.45	0.37	0.45	0.37	0.41	0.39	0.35	0.45
<b>MC</b>	m	m	m	m	m	m	<b>sm</b>	m	<b>sm</b>	m	m	<b>sm</b>	m

LR (%) = longitud relativa, RC= radio centromérico, IC= índice centromérico, MC= morfología cromosómica, m= metacéntrico, sm= submetacéntrico, n = número de individuos analizados,  $\sigma$  = desviación estándar.

## **11. ANEXOS**

**Anexo 1.** Comparación de las técnicas de suspensión celular y squash, e individuos utilizados

<b>Hipotonía</b>	<b>Suspensión celular</b>	<b>Squash cromosómico</b>
<b>Concentración de solución hipotónica</b>	H2O, Ringer de anfibios (4:1) H2O, Ringer de anfibios (3:1) 100% H2O	100% H2O
<b>Tiempo</b>	30 minutos 10 minutos	10 minutos
<b>Temperatura</b>	37°C 25°C temperatura ambiente	25°C temperatura ambiente

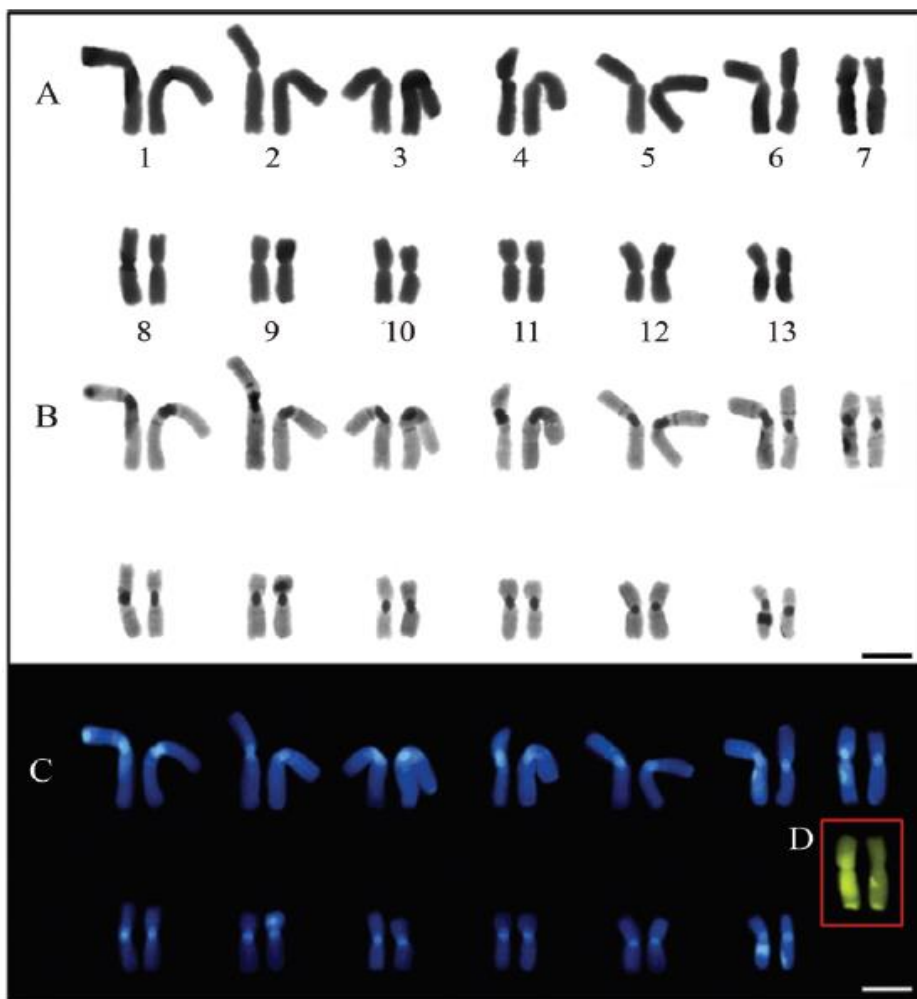
- a) Comparación de variable hipotónica para la técnica de suspensión celular y squash
- b) Individuos utilizados para la comparación de la técnica de suspensión celular y squash: QCAZ 56320, QCAZ 68470, QCAZ 57703, QCAZ 57704, QCAZ 57705, QCAZ 57706.
- c) Individuos procesados con el método de squash cromosómicos:  
 QCAZ 68453, QCAZ 68468, QCAZ 68512, QCAZ 68467, QCAZ 68455, QCAZ 62946, QCAZ 62944, QCAZ 62945, QCAZ 62948, QCAZ 62942, QCAZ 62947, QCAZ 62943, QCAZ 62941, QCAZ 62949, QCAZ 68460, QCAZ 68462, QCAZ 68463, QCAZ 68465, QCAZ 68461, QCAZ 68459, QCAZ 68466, QCAZ 68456, QCAZ 68458, QCAZ 68457, QCAZ 68464, QCAZ 68451, QCAZ 68454, QCAZ 68500, QCAZ 68498, QCAZ 68506, QCAZ 68492, QCAZ 68507, QCAZ 68502, QCAZ 68501, QCAZ 68493, QCAZ 68491, QCAZ 68497.

**Anexo 2.** Parámetros para la determinación de la 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	7.01 - $\infty$	0.124 – 0.000

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

**Anexo 3.** Cariotipo de *Bolitoglossa paraensis* reportado por Barata da Silva, Suárez, Nagamachi, Carter, Pieczarka, (2014). A) Tinción Giemsa; B) heterocromatina constitutiva; C) Tinción DAPI.



**Figure 1** - Sequential karyotypes of a male specimen of *Bolitoglossa paraensis*: A) conventional Giemsa staining, B) C-banding pattern, C) DAPI staining; D) NOR CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> staining. Bar = 10 μm.

**Anexo 4.** Mapa de Brasil. Punto de colecta de *Bolitoglossa paraensis* reportado por Barata da Silva, Suárez, Nagamachi, Carter, Pieczarka, (2014).

