



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

Análisis de los Cromosomas Mitóticos de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli*  
(Anura: Dendrobatidae) de la Estación Científica Yasuní.

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

ELIZABETH VÁSQUEZ VILLALBA

Quito, 2013

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Elizabeth Vásquez Villalba 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, 26 de Abril del 2013

*A mis padres  
y hermano*

## AGRADECIMIENTOS

A Miryan por el afecto, confianza y dirección brindada no sólo durante el desarrollo de este estudio, sino también a lo largo de mi trabajo en el laboratorio. A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), particularmente a la Dirección General Académica (DGA) por el apoyo financiero que, mediante el proyecto “Caracterización Química y Citogenética de Anuros Ecuatorianos”, permitió la ejecución del presente estudio.

A Ailín por su amistad, guía y ayuda incondicional ofrecida en todo momento. A todos aquellos que formaron y forman parte del laboratorio de Citogenética de Anfibios; especialmente a Miguel quien contribuyó en la realización de este estudio.

A Simón Lobos, Andrea Narváez y Oscar Pérez que colaboraron en la colecta de especímenes. A Ana Troya, Pablo Menéndez y Nicolás Tinoco por su ayuda en los análisis estadísticos. A Andrés Merino por sus comentarios y sugerencias. Adicionalmente, a todos los que conforman el Museo de Herpetología y la Balsa de los Sapos quienes estuvieron siempre prestos a ayudar durante la elaboración de este trabajo.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermano por el amor y apoyo incondicional que me han brindado durante el transcurso de mi vida. También, a todos mis amigos y amigas por su cariño y amistad absoluta, por brindarme soporte y entusiasmo en todo momento.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	xii
<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
3.1. OBJETIVOS .....	9
3.1.1. <b>Objetivo General</b> .....	9
3.1.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	9
<b>4. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b> .....	10
4.1. LOCALIDAD DE COLECTA .....	10
4.2. MANTENIMIENTO DE INDIVIDUOS .....	11
4.3. PREPARACIONES CROMOSÓMICAS .....	11
4.3.1. <b>Procesamiento de la muestra</b> .....	11

4.3.1.1.	Inhibición mitótica (colchinización) .....	11
4.3.1.2.	Disección y obtención del tejido.....	12
4.3.1.3.	Hipotonización.....	12
4.3.1.4.	Fijación .....	12
4.3.1.5.	Suspensión celular .....	12
<b>4.3.2.</b>	<b>Preparación de las placas .....</b>	<b>13</b>
4.3.2.1.	Lavado de placas nuevas.....	13
4.3.2.2.	Goteo de placas .....	13
4.4.	TRATAMIENTO PARA CROMOSOMAS FIJADOS EN LAS PLACAS .....	14
<b>4.4.1.</b>	<b>Tinción simple con Giemsa .....</b>	<b>14</b>
<b>4.4.2.</b>	<b>Bandeo cromosómico .....</b>	<b>14</b>
4.4.2.1.	Bandeo C.....	14
4.4.2.2.	Tinción DAPI.....	15
4.4.2.3.	Bandeo NOR .....	15
4.5.	REVISIÓN DE PLACAS.....	15
<b>4.5.1.</b>	<b>Revisión de placas sometidas a tinción Giemsa .....</b>	<b>15</b>
<b>4.5.2.</b>	<b>Revisión de placas sometidas a los bandeos C y NOR .....</b>	<b>16</b>
<b>4.5.3.</b>	<b>Revisión de placas sometidas al bandeo DAPI .....</b>	<b>16</b>

4.6.	OBTENCIÓN DE IMÁGENES EN EL MICROSCOPIO.....	16
4.7.	ELABORACIÓN DE CARIOTIPOS E IDEOGRAMAS.....	17
4.7.1.	Edición de imágenes .....	17
4.7.2.	Medición de cromosomas e identificación morfológica .....	17
4.7.3.	Elaboración del ideograma.....	18
4.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	18
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
5.1.	NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA .....	20
5.1.1.	Número y morfología cromosómica de <i>Ameerega bilinguis</i> .....	20
5.1.2.	Número y morfología cromosómica de <i>Ameerega hahneli</i> .....	21
5.2.	BANDEO CROMOSÓMICO .....	22
5.2.1.	Bandeo-C.....	22
5.2.1.1.	Patrón de distribución de Bandas-C en <i>Ameerega bilinguis</i> .....	22
5.2.1.2.	Patrón de distribución de Bandas-C en <i>Ameerega hahneli</i> .....	23
5.2.2.	Bandeo-DAPI.....	23
5.2.2.1.	Patrón de distribución de bandas-DAPI en <i>Ameerega bilinguis</i> .....	23
5.2.2.2.	Patrón de distribución de bandas-DAPI en <i>Ameerega hahneli</i> .....	24
5.2.3.	Bandeo Ag-NOR.....	24
5.2.3.1.	Patrón de bandas-NOR en <i>Ameerega bilinguis</i> .....	24

5.2.3.2. Patrón de bandas-NOR en <i>Ameerega hahneli</i> .....	24
5.3. VARIACIÓN INTRA E INTERESPECÍFICA .....	25
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
6.1. NÚMERO CROMOSÓMICO .....	28
6.2. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA .....	30
6.3. BANDEO C .....	33
6.4. BANDEO DAPI .....	36
6.5. BANDEO NOR .....	37
6.6. CROMOSOMAS SEXUALES .....	39
6.7. CONCLUSIONES.....	41
6.8. RECOMENDACIONES .....	43
<b>7. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>44</b>
<b>8. FIGURAS</b> .....	<b>58</b>
<b>9. TABLAS</b> .....	<b>71</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa del Ecuador. Localidad de colecta de los especímenes de <i>Ameerega hahneli</i> y <i>Ameerega bilinguis</i> .....	59
<b>Figura 2.</b> Especímenes de <i>Ameerega bilinguis</i> y <i>Ameerega hahneli</i> .....	60
<b>Figura 3.</b> Cariotipos de <i>Ameerega bilinguis</i> . Tinción convencional, bandas C, NOR y DAPI ...	61
<b>Figura 4.</b> Cariotipos de <i>Ameerega hahneli</i> . Tinción convencional, bandas C, NOR y DAPI .....	63
<b>Figura 5.</b> Cariotipos comparativos de individuos hembra y macho de <i>Ameerega bilinguis</i> .....	65
<b>Figura 6.</b> Cariotipos comparativos de individuos hembra y macho de <i>Ameerega hahneli</i> .....	66
<b>Figura 7.</b> Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de <i>Ameerega bilinguis</i> .....	67
<b>Figura 8.</b> Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de <i>Ameerega hahneli</i> .....	68
<b>Figura 9.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de la morfología cromosómica de <i>Ameerega bilinguis</i> y <i>Ameerega hahneli</i> .....	69
<b>Figura 10.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de la morfología cromosómica de <i>Ameerega hahneli</i> de las poblaciones de Manaos y Yasuní .....	70

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Datos de colección de los individuos analizados de <i>Ameerega bilinguis</i> y <i>Ameerega hahneli</i> .....	72
<b>Tabla 2.</b> Datos morfométricos de los cromosomas de <i>Ameerega bilinguis</i> y <i>Ameerega hahneli</i> .....	73
<b>Tabla 3.</b> Valores obtenidos del Análisis de Variancia en Una-Vía realizado entre los cromosomas 10 de las especies <i>Ameerega bilinguis</i> y <i>Ameerega hahneli</i> .....	74
<b>Tabla 4.</b> Valores obtenidos del Análisis de Variancia en Una-Vía realizado entre los cromosomas 10, 11 y 12 de <i>Ameerega hahneli</i> de las poblaciones de Yasuní y Manaos .....	75

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Datos morfométricos de los cromosomas de <i>Ameerega hahneli</i> – Manaus.....	77
<b>Anexo 2.</b> Protocolos para preparar las diferentes soluciones utilizadas para este estudio.....	78
<b>Anexo 3.</b> Fórmulas para determinación del índice centromérico (IC) y radio centromérico (RC) .....	79
<b>Anexo 4.</b> Parámetros para la determinación de la morfología cromosómica .....	80

## 1. RESUMEN

En el Ecuador, la familia Dendrobatidae está representada por 46 especies y la Estación Científica Yasuní (ECY) alberga a diez de éstas, de las cuales sólo *Hyloxalus sauli* e *Hyloxalus yasuní* han sido citogenéticamente analizadas. La presente investigación tuvo como objetivo la caracterización de los cromosomas mitóticos de dos especies de la familia Dendrobatidae presentes en la ECY: *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli*. Se determinó su estructura cariotípica, la ubicación de las respectivas regiones del organizador nucleolar (NOR), así como la distribución de heterocromatina constitutiva, mediante la aplicación de impregnación argéntica Ag-NOR y bandeo-C y DAPI, respectivamente. Este trabajo reveló que ambas especies analizadas presentaron 24 cromosomas en condición diploide,  $2n=24$ . No obstante, a pesar de presentar un número cromosómico conservado para la familia Dendrobatidae, la morfología del cromosoma diez fue diferente para ambas especies: submetacéntrica en *A. bilinguis* y subtelocéntrica en *A. hahneli*. El patrón de bandeo-C y de bandeo-DAPI reveló variación entre las especies, lo que parece evolucionar como un rasgo específico de cada una de ellas. Las especies examinadas mostraron regiones NOR en diferentes cromosomas: *A. bilinguis* en el par once y *A. hahneli* en el par cuatro. Se sugiere que la localización variable de las regiones NOR indica algunos mecanismos de rearrreglos cromosómicos que se han llevado a cabo durante la historia evolutiva del grupo, ya que Dendrobatidae es considerado un taxón monofilético. Al comparar los cromosomas de *A. hahneli* de Manaos con la población de Yasuní, se encontraron diferencias en la morfología y en el patrón de bandas C, lo que sugiere que se trata de especies crípticas.

**Palabras clave:** *Ameerega*, Bando-C, Cariotipo, DAPI, Dendrobatidae, NOR.

## 2. ABSTRACT

In Ecuador, the Dendrobatidae family is represented by 46 species, and the Yasuní Scientific Station (ECY) hosts ten of them; however, just *Hyloxalus sauli* and *Hyloxalus yasuní* have been cytogenetically examined. This investigation had the aim of characterize the mitotic chromosomes of two dendrobatid species from the ECY: *Ameerega bilinguis* and *Ameerega hahneli*. This study determined their overall karyotypic structure, positions of nucleolus organizer regions (NOR), as well as the distribution of constitutive heterochromatin by using AgNOR-staining, C- and DAPI-banding techniques, respectively. This study showed that both species have 24 chromosomes in diploid condition ( $2n=24$ ). Even though, despite a conserved chromosome number within the Dendrobatidae family, morphological differences were seen in the chromosome ten of both species: submetacentric in *A. bilinguis* and subtelocentric in *A. hahneli*. The C- and DAPI-banding pattern revealed variation between species that seems to evolve as a species-specific trait. Both species examined had NOR regions on different chromosomes: *A. bilinguis* on pair eleven and *A. hahneli* on pair four. It is suggested that, in the monophyletic group Dendrobatidae, during its evolutionary history, some rearrangement mechanisms have taken place and have caused NOR region location variability. Some differences in morphology as well as in C-banding pattern were found by comparing *A. hahneli* from Manaus with *A. hahneli* from Yasuní, which raise the likelihood of being cryptic species.

**Key words:** *Ameerega*, C-banding, DAPI, Dendrobatidae, Karyotype, NOR.

### 3. INTRODUCCIÓN

El Ecuador es considerado una de las áreas más biodiversas del planeta tomando en cuenta la extensión de su territorio (Bass *et al.*, 2010; Coloma, 2005-2009). Aquí habitan el 8% de los anfibios del mundo, convirtiéndose en uno de los países que posee la mayor diversidad por unidad de área de este grupo (Coloma, 2005-2009). Hasta el momento, han sido descritas formalmente 531 especies de anfibios, 500 de éstas son anuros; por lo tanto, Anura constituye el orden más numeroso del Ecuador (Ron *et al.*, 2013).

Las tierras bajas del Ecuador representan el 56.2% de la superficie continental del país; esta región acoge a 251 especies de anfibios, de las cuales el 97% están presentes en el bosque húmedo tropical (Ron *et al.*, 2013). Particularmente, el Parque Nacional Yasuní y sus áreas aledañas ubicadas en la zona norte de la Amazonía ecuatoriana, presentan el mayor pico de biodiversidad de la región amazónica (Read, 2000). En Yasuní se encuentra la más alta diversidad de anuros por unidad de área que en cualquier otro lugar de América del Sur, y al ser el área protegida más grande de la Amazonía occidental, es considerada como la de mayor significado para la conservación (Bass *et al.*, 2010; Save America's Forest, 2005). Esta superficie alberga alrededor de 97 especies de anfibios, 93 de éstas pertenecen al orden Anura (Ron, 2001-2011); por lo tanto, Yasuní representa un importante refugio principalmente para la clase Amphibia (Save America's Forest, 2005).

Dentro de los anuros, la familia Dendrobatidae se encuentra entre los grupos más diversos del mundo (Frost, 2013). Los dendrobátidos ocupan varios tipos de hábitats desde Nicaragua

hasta Bolivia y el bosque Atlántico de Brasil, y desde la costa del Pacífico de Sudamérica hasta Martinique en las Antillas Francesas (Grant *et al.*, 2006). Esta familia se encuentra representada por 175 especies incluidas en 3 subfamilias: Colostethinae con 62 especies, Dendrobatinae con 54 especies e Hyloxalinae con 59 especies (Frost, 2013). Dendrobatidae también representa una de las familias más diversas del Ecuador ya que incluye a 46 especies (Ron *et al.*, 2013), diez de éstas se encuentran distribuidas en Yasuní (Ron, 2001-2011), de las cuales dos han sido citogenéticamente analizadas: *Hyloxalus sauli* e *Hyloxalus yasuní* (Reinoso, en preparación).

Concretamente, el género *Ameerega* (Anura: Dendrobatidae: Colostethinae) comprende a 31 especies que se distribuyen a lo largo de la vertiente oriental andina y la cuenca del Amazonas (Twomey y Brown, 2009). En el Ecuador han sido registradas cuatro especies: *A. bilinguis*, *A. erythromos*, *A. hahneli* y *A. parvula* (Azevedo-Ramos *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2004; Cisneros-Heredia *et al.*, 2004; Icochea *et al.*, 2004).

*Ameerega bilinguis*, se distribuye a lo largo de la cuenca amazónica ecuatoriana, desde los bosques húmedos del Napo en la zona tropical oriental, y en Colombia, en el departamento de Putumayo, entre los 200 y 700 m.s.n.m. (Castro *et al.*, 2004). Mientras que, *Ameerega hahneli* tiene un rango de distribución más amplio: tierras bajas amazónicas de Colombia, Ecuador, Perú, noreste de Bolivia, las Guayanas y Brasil, hasta los 1500 m.s.n.m. (Azevedo-Ramos *et al.*, 2010). Ambas especies se encuentran en estado de conservación de preocupación menor (Azevedo-Ramos *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2004).

Por otro lado, la caracterización de la diversidad incluye estudios taxonómicos y filogenéticos (Nei y Kumar, 2000). Herramientas como la biología molecular y la morfometría

son usualmente utilizadas para dicho fin, ya que brindan valiosa información tanto para diferenciar especies, así como para reconstruir la historia evolutiva de los diferentes clados (Frost *et al.*, 2006; Gould *et al.*, 1974; Grant *et al.*, 2006). Adicionalmente, los estudios cromosómicos son considerados como un gran aporte en la resolución de problemas sistemáticos de grupos altamente diversos como los anfibios, ya que ayudan a clarificar sus relaciones evolutivas (Green y Sessions, 1991a; Hillis, 1991).

La citogenética implica el análisis y explicación de cómo la estructura y comportamiento de los cromosomas garantizan las funciones de conservar la información genética entre las células de un organismo pluricelular, transmitirla de padres a hijos y liberarla de forma ordenada para controlar las funciones celulares y el desarrollo del individuo (Lacadena, 1996). Estudia los controles y variaciones, sus consecuencias genéticas e implicaciones evolutivas en los organismos (Lacadena, 1996; Rivera, 2006). White (1978) afirma que los cambios del cariotipo están relacionados con alrededor del 90% de los fenómenos de especiación, es decir, los reordenamientos cromosómicos juegan un rol primordial en la divergencia inicial (Rivera, 2006).

El cariotipo – “complemento cromosómico particular de un individuo o de un grupo de individuos relacionados, definido por el número, morfología y tamaño de los cromosomas metafásicos mitóticos” (Ferreira *et al.*, 2005) – permite la constatación de algunas particularidades como: constricciones secundarias, presencia de satélites, alteraciones numéricas, etc. que evidencian rearrreglos cromosómicos estructurales intra e interespecíficos, los cuales han sido frecuentemente relacionados con eventos evolutivos (Kasahara, 2009; Zarco, 1986).

Sin embargo, para optimizar estos estudios y permitir la realización de análisis y comparaciones más precisas, se requiere de métodos que identifiquen cromosomas o segmentos cromosómicos homólogos del organismo (Sumner, 2003). Particularmente, las técnicas de bandeo cromosómico - bandas C, DAPI, NOR - permiten observar un patrón característico para cada cromosoma de cada especie (Paniagua *et al.*, 1999). Consiguientemente, el patrón de bandas permite la identificación y descripción detallada de los cromosomas, la detección de rearrreglos estructurales, la localización de marcadores y la comparación cromosómica entre especies o entre grupos cercana o lejanamente relacionados (Hayes, 2000).

Los anfibios comienzan a ser citogenéticamente estudiados desde 1930; el primero en incursionar en este campo fue el Dr. James Kezer, quien analizó la variación cromosómica de las salamandras pletodóntidas e incorporó a la citogenética como herramienta para la resolución de problemas taxonómicos (Green y Sessions, 1991a). Hoy se conoce que, particularmente, los anfibios anuros demuestran una rápida evolución cariotípica (Bogart, 1991).

La información citogenética ha probado ser una herramienta valiosa para estudios filogenéticos y taxonómicos en anuros (Rodrigues *et al.*, 2011). Se han empleado análisis cariotípicos para deducir los rearrreglos cromosómicos que han sufrido las especies a lo largo del tiempo, especialmente aquellos que incluyen detalles morfológicos de los cromosomas, permitiendo así la formulación de hipótesis concernientes a su filogenia y siendo éstos de gran utilidad en la sistemática de anfibios (Aguiar *et al.*, 2002; Kaiser *et al.*, 2003).

En 1967, Duellman fue el primero en cariotipar dendrobátidos, describiendo el cariotipo de *Oophaga pumilio* ( $2n = 20$ ) (Kaiser *et al.*, 2003). Actualmente, 53 especies pertenecientes a

Dendrobatidae han sido citogenéticamente caracterizadas (Aguiar *et al.*, 2002; Blasco-Zúñiga, 2007; Bogart, 1991; Kaiser *et al.*, 2003; Rassotto *et al.*, 1987; Reinoso, 2008; Reinoso, en preparación; Rodrigues *et al.*, 2011, 2012; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003a, 2003b, 2006; Velásquez, 2012), y sus datos se han incorporado a estudios que aportan al entendimiento de la evolución cromosómica y consiguientemente a la historia evolutiva de la familia (Aguiar *et al.*, 2002). En definitiva, la información cariotípica ha mostrado ser una herramienta taxonómica útil que contribuye a la aclaración de las interrogantes filogenéticas del clado (Rodrigues *et al.*, 2011). No obstante, hace falta mayor información citogenética que contribuya con el entendimiento de las relaciones entre los géneros y especies de dendrobátidos (Hillis, 1991; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003b). Aguilar *et al.* (2002) sugiere que un análisis citogenético extensivo, usando un mayor número de especies y géneros, sería útil para el entendimiento de la historia evolutiva de los dendrobátidos y ayudaría a resolver relaciones intra e intergenéricas. Por lo tanto, es necesario adquirir un conocimiento detallado de su filogenia para poder explicar el origen evolutivo de las características del grupo y proveer un panorama que guíe futuras investigaciones (Grant *et al.*, 2006).

Hasta la fecha, solamente cinco especies de *Ameerega* han sido citogenéticamente analizadas: *A.braccata* (Rodrigues *et al.*, 2012), *A. flavopicta* (Aguiar *et al.*, 2002), *A.hahneli* (Aguiar *et al.*, 2002; Bogart, 1991), *A. picta* (Aguiar *et al.*, 2002; Bogart, 1991) y *A. trivitatta* (Aguiar *et al.*, 2002; Bogart, 1991). No obstante, para elucidar los rearrreglos que resultan en distintos números de cromosomas submetacéntricos/telocéntricos de *Ameerega*, Rodrigues *et al.* (2012) sugiere que es necesario cariotipar más especies congéneras. Más caracterizaciones cromosómicas de especímenes de este género facilitarían las investigaciones acerca de hipótesis de homologías entre sus cromosomas pequeños principalmente (Rodrigues *et al.*, 2012).

Por lo tanto, con el ánimo de aportar nuevos datos para el entendimiento de los patrones de variación de los cromosomas y contribuir a la resolución de las relaciones intra e intergenéricas en Dendrobatidae, el presente estudio se centra en la caracterización de los cromosomas mitóticos de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli* procedentes de la Estación Científica Yasuní, Orellana – Ecuador. Adicionalmente, debido a que existen registros de variaciones cariotípicas interpoblacionales en especies de ranas venenosas, por ejemplo: *Epipedobates anthonyi* y *Mannophryne trinitatis* (Blasco-Zúñiga *et al.*, en preparación.; Kaiser *et al.*, 2003); y a que la Amazonía varía en su riqueza y composición florística de un sitio a otro (Araujo-Murakami *et al.*, 2005), este trabajo además compara los cariotipos de *A. hahneli* – Yasuní con la población de *A. hahneli* – Manaus descrita en el estudio de Aguiar *et al.* (2002) con el objeto de establecer semejanzas y diferencias existentes entre los cromosomas de ambas poblaciones y detectar una posible divergencia a nivel cromosómico.

### 3.1. OBJETIVOS

#### 3.1.1. Objetivo General

Caracterizar los cromosomas mitóticos de dos especies del género *Ameerega*: *A. biliguis* y *A. hahneli* (Anura: Dendrobatidae: Colostethinae) procedentes de la Estación Científica Yasuní.

#### 3.1.2. Objetivos Específicos

- Determinar el número y morfología cromosómica de *Ameerega biliguis* y *A. hahneli* de la Estación Científica Yasuní.
- Detectar la presencia y distribución de heterocromatina constitutiva centromérica e intercalar mediante bandeo C y DAPI en los cromosomas de las especies estudiadas.
- Ubicar la región del organizador nucleolar (NOR) en el cariotipo de cada una de las especies analizadas a través de la técnica de impregnación argéntica (Ag-NOR).
- Establecer semejanzas y diferencias entre los cariotipos de las dos especies analizadas.
- Comparar el cariotipo de *A. hahneli* población de Yasuní con *A. hahneli* de Manaos que se reporta en la literatura.

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Se analizaron ocho individuos correspondientes a la especie *Ameerega bilinguis* y siete a *Ameerega hahneli* (Anura: Dendrobatidae: Colostethinae) provenientes de la Estación Científica Yasuní (ECY), Orellana - Ecuador. Los especímenes fueron identificados por personal del Museo de Zoología de Vertebrados de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ), y luego de ser procesados, fueron depositados en la colección del museo antes mencionado (Tabla 1). Adicionalmente, se trabajó con los datos cromosómicos de *Ameerega hahneli* obtenidos del artículo de Aguiar *et al.* (2002) (Anexo1). En aquel estudio se había analizado a diez individuos, ocho machos y dos hembras, que fueron colectados en las épocas lluviosas de los años 1997 y 1999 en el Km 12 de la vía a Autazes, Manaus - Brasil (Aguiar *et al.*, 2002).

### 4.1. LOCALIDAD DE COLECTA

Se trabajó con organismos de *A. bilinguis* y *A. hahneli* colectados en la Estación Científica Yasuní (ECY), 7 ° 24' 1,8 '' W; 0° 40' 16,7'' S, ubicada dentro del Parque Nacional Yasuní (PNY), provincia de Orellana (Figura 1, Tabla 1), a una altura de 216msn. Los organismos fueron colocados en recipientes individuales y mantenidos a una humedad y temperatura adecuadas para su supervivencia durante la estadía en la estación y su traslado al laboratorio, en Quito.

## 4.2. MANTENIMIENTO DE INDIVIDUOS

Ya en el Laboratorio de Citogenética de Anfibios de la PUCE, se colocó a los individuos, clasificados por especie (Figura 2), en terrarios de 12cm x 20cm a una temperatura de 24,5°C. Se los alimentó con moscas de la fruta (*Drosophila melagonaster*) y grillos (*Grillus* sp.) tipo 1 por un periodo de tres semanas.

## 4.3. PREPARACIONES CROMOSÓMICAS

### 4.3.1. Procesamiento de la muestra

Los especímenes fueron alimentados continuamente hasta confirmar que hayan defecado diariamente o por lo menos una vez cada dos días. De esta forma, se aseguró que las células del tracto digestivo estén en constante división mitótica para realizar los preparados cromosómicos.

#### 4.3.1.1. Inhibición mitótica (colchinización)

La cantidad de colchicina a inyectarse debió ser proporcional al peso del animal; por lo tanto, se pesó a cada individuo y se les inyectó intraperitonealmente 0,1ml de colchicina al 2% diluida en ringer de anfibios por cada 0,1g de su peso (Anexo 2). Los organismos, después de incubar *in vivo* colchicina durante 4 horas a temperatura ambiente, fueron sacrificados mediante hipotermia, exposición a la cámara de éter o mediante la aplicación de loción anestésica tópica de la marca Topex que contiene benzocaina al 20%.

#### 4.3.1.2. Disección y obtención del tejido

Se disectó a cada individuo bajo un estereoscopio Zeiss modelo Stemi 1000. Se extrajo el duodeno y se lo abrió de manera longitudinal para posteriormente eliminar los desechos de su interior lavándolo con rínger de anfibios.

#### 4.3.1.3. Hipotonización

El tejido limpio fue colocado en una caja petri. Allí fue sometido a la solución hipotonizadora (rínger de anfibios-agua destilada, en proporción 1:4) a 37°C durante 30 minutos.

#### 4.3.1.4. Fijación

Se retiró la solución hipotonizadora. Se añadió 2ml de fijador recién preparado (metanol-ácido acético, en proporción 3:1) durante 10 minutos. Se desechó el fijador usado y se colocó 2ml de solución fijadora nueva al tejido para continuar con el procedimiento.

#### 4.3.1.5. Suspensión celular

Con ayuda de dos paletas plásticas, se raspó el interior del duodeno previamente sometido a la solución fijadora para separar las microvellosidades que contenían las células con las que se trabajó. Las células intestinales obtenidas mediante el raspado del duodeno fueron colocadas en un tubo cónico de 15ml. Se agregó 5ml más de solución fijadora. Se pipeteó el contenido del tubo hasta que las células se hayan disgregado y haya quedado una solución uniforme. Luego, se

centrifugó la muestra por diez minutos a 1500rpm y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, el contenido celular fue trasladado a un microtubo de 2ml y conservado en solución fijadora a -20°C.

#### **4.3.2. Preparación de las placas**

##### 4.3.2.1. Lavado de placas nuevas

Se lavó placas portaobjetos nuevas con jabón para cristal y metanol absoluto, de esta forma se eliminó aceite e impurezas que interfieran con el análisis de las metafases. Posteriormente, se secó las placas en el horno a 35°C.

##### 4.3.2.2. Goteo de placas

Se rotularon las placas y se las colocó sobre un vaso de precipitación de 250ml que contenía agua caliente, para ocasionar shock térmico. Con una pipeta Pastéur plástica se tomó el preparado cromosómico y se esparció 3 gotas de esta solución en cada placa portaobjetos a una distancia aproximada de 1,5m. Se dejó secar a las placas a temperatura ambiente.

#### 4.4. TRATAMIENTO PARA CROMOSOMAS FIJADOS EN LAS PLACAS

##### 4.4.1. Tinción simple con Giemsa

Para la tinción de placas se utilizó Giemsa modificado (Sigma-Aldrich) diluido en agua destilada en una proporción de 1:20 (Anexo 2). Las placas fueron sometidas a esta solución por 10 minutos, se las enjuagó con abundante agua destilada y se las puso a secar a temperatura ambiente.

##### 4.4.2. Bando cromosómico

Se dejó madurar las placas durante un tiempo mínimo de 7 días y máximo de 1 mes a una temperatura ambiente para proseguir con los protocolos correspondientes.

###### 4.4.2.1. Bando C

Se siguió el protocolo de Sumner (1972) con modificaciones. Se incubó a las placas en HCl 0,2N por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se las expuso a la solución de Ba(OH)<sub>2</sub> al 5% a una temperatura de 55°C durante el tiempo determinado para cada especie. Seguidamente, se las sometió a la solución salina concentrada (2xSSC) durante 30 minutos a una temperatura de 60°C (Anexo 2).

#### 4.4.2.2. Tinción DAPI

Se siguió el protocolo de Schweizer (1980) con modificaciones. Cada placa fue sometida por 1 minuto al tampón McILvaine. Después, se las expuso a la solución DAPI (4-6 diamidino-2-fenilindol) por 15 minutos, y finalmente se colocó la solución Vecta Shield sobre las placas.

#### 4.4.2.3. Bando NOR

Se siguió el protocolo de Howell y Black (1980) con modificaciones. Se goteó en cada placa la solución de nitrato de plata al 50% y solución de gelatina al 2%, en proporciones 2:1 respectivamente. Las placas fueron sometidas a una temperatura de 60°C durante el tiempo necesario para que la solución tomara una coloración marrón, el cual fue diferente para cada especie (alrededor de 8 minutos). Las placas fueron lavadas con abundante agua Milli-Q y se las secó a temperatura ambiente.

### 4.5. REVISIÓN DE PLACAS

#### 4.5.1. Revisión de placas sometidas a tinción Giemsa

Se utilizó un microscopio de contraste de fase Zeiss modelo Axioskop 2 plus - HAL 100. Para la búsqueda de metafases, se utilizaron los lentes objetivos de 10X, 20X y 40X así como el optobar de 1,6X. En los núcleos metafásicos encontrados, se identificó el número de cromosomas que poseía cada uno, y se registró dicho dato en cada placa. Adicionalmente, se anotó las constricciones secundarias observadas.

#### **4.5.2. Revisión de placas sometidas a los bandeos C y NOR**

La detección de bandas cromosómicas C y NOR, se realizó en el microscopio de contraste de fases antes mencionado, utilizando los lentes objetivos 63X y 100X así como los optobares de 1,6X y 2,5X. Se registró cada banda en la respectiva foto.

#### **4.5.3. Revisión de placas sometidas al bandeo DAPI**

Se utilizó un fotomicroscopio de fluorescencia Olympus DP72 modelo U-TV0.5XC-3. Se manejó los lentes objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X así como el filtro DAPI para la detección de bandas DAPI+ de los cromosomas. En la foto respectiva, se registraron las bandas encontradas.

### **4.6. OBTENCIÓN DE IMÁGENES EN EL MICROSCOPIO**

Para la obtención de imágenes de palcas sometidas a tinción Giemsa, bandeo-C y bandeo-NOR se utilizó una cámara digital Canon PowerShot modelo A640 de 10 megapíxeles, adaptada al microscopio Zeiss modelo Axioskop 2 plus - HAL 100. Se utilizaron los lentes objetivos de 63X y 100X, y los optobares de 1,6X y 2,5X. Se fotografiaron las metafases que poseían el set cromosómico completo. Las imágenes se almacenaron en una computadora la cual estaba sincronizada con la cámara.

Para la obtención de imágenes sometidas a tinción-DAPI se utilizó una cámara incorporada al fotomicroscopio Olympus DP72 modelo U-TV0.5XC-3, utilizando el objetivo de 100X. Se utilizó el cubo de excitación UV para el fluorocromo DAPI, el cual tiene una longitud de

onda de absorción de 345nm y 455nm de emisión, y que se encuentra adaptado a dicho microscopio. Se fotografiaron las metafases que poseían el set cromosómico completo y se las almacenó en una computadora acoplada al microscopio.

#### 4.7. ELABORACIÓN DE CARIOTIPOS E IDEOGRAMAS

##### **4.7.1. Edición de imágenes**

Las fotografías se editaron mediante el software Adobe Photoshop.cs versión 8,0 para Macintosh. Se realizaron arreglos en el brillo y contraste de cada fotografía dependiendo de la demanda de cada imagen. Se recortaron los cromosomas de cada una de las metafases fotografiadas y se los transfirió a un documento nuevo en formato PSD. Se ordenaron a los cromosomas en forma descendente de acuerdo a su longitud. Posteriormente, se realizó una copia en formato JPG del documento que se encontraba en formato PSD.

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

Se trabajó con el software AxioVision versión 4.4 para PC (Zeiss, 2005). Se importó el documento en formato JPG previamente obtenido. Se tomaron las medidas en el siguiente orden: brazo pequeño - brazo largo. El brazo pequeño (p) fue medido desde el comienzo del brazo hacia el centrómero, mientras que el brazo largo (q) fue medido desde el centrómero hasta el final del brazo.

Se ingresaron las medidas cromosómicas en matrices diseñadas en Excel, las cuales fueron proporcionadas por Sergio Siqueira-Jr, investigador del Departamento de Biología Celular del Instituto de Biología de la UNICAMP – Campinas, Brazil. Se determinó el índice centromérico (IC), el radio centromérico (RC) y longitud relativa (LR) de cada cromosoma (Anexo 3) mediante las matrices prediseñadas. Se identificó la morfología cromosómica según la nomenclatura propuesta por Green y Sessions (1991b) (Anexo 4) y se procedió a emparejar los para establecer el cariotipo de cada especie.

#### **4.7.3. Elaboración del ideograma**

Se diseñó el ideograma en el programa Adobe Illustrator versión CS5.1 para Macintosh. Se utilizaron los valores de longitud relativa (LR) de los cariotipos finales. Se ordenaron a los cromosomas de manera descendente de acuerdo a la longitud relativa de cada par de cromosomas. Se añadió el patrón de bandas y constricciones secundarias de acuerdo a los datos obtenidos mediante las tinciones y bandeos.

#### **4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Se trabajó con ocho especímenes de *Ameerega bilineata* y con siete de *Ameerega hahnli*. Se analizaron diez núcleos por individuo en cada especie, de los cuales se obtuvieron medidas para determinar el radio centromérico (RC), índice centromérico (IC) y longitud relativa (LR). Se calculó la media de estos valores, tanto para los individuos analizados como para cada especie, además de sus respectivas desviaciones estándar. Cabe recalcar que, para cada especie se

analizaron individuos machos y hembras para verificar si existía variación cariotípica según el sexo de cada organismo (Tabla 1).

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA), utilizando las medias del RC y LR de cada especie, que permitió visualizar gráficamente la distribución de las morfologías de los pares cromosómicos de las especies *A. bilinguis* y *A. hahneli*. Adicionalmente, se utilizó la media del RC de los individuos de cada especie para corroborar la diferencia morfológica del par cromosómico 10 entre *A. bilinguis* y *A. hahneli* mediante un análisis de variancia (ANOVA) en una-vía.

Para ambas especies, mediante reglas de tres, se calculó el porcentaje de heterocromatina que constituyen los brazos corto “p” y largo “q” del cromosoma 10, en relación a la totalidad de dicho par. Se utilizó la media del tamaño de todos los cariotipos conespecíficos, además el porcentaje total de cromatina del cromosoma 10 en relación con todo el cariotipo.

Se efectuó un PCA utilizando los valores de las medias del RC y LR de cada población, que demostró la distribución de las morfologías cromosómicas para las poblaciones de *A. hahneli* – Manaos y *A. hahneli* – Yasuní. Además, se realizó un ANOVA de una-vía, basado en la media del RC de cada población, para confirmar la existencia de diferencias morfológicas de los pares cromosómicos 10, 11 y 12 entre las poblaciones de *A. hahneli* – Manaos y *A. hahneli* – Yasuní.

## 5. RESULTADOS

Para este estudio se analizó un total de 15 individuos, de los cuales ocho pertenecen a *Ameerega bilinguis* y siete a *Ameerega hahneli*. En ambas especies se examinaron tanto especímenes machos como hembras (Tabla 1). Por cada ejemplar estudiado se analizó un total de diez núcleos, dando un total de 150 cariotipos realizados: *A. bilinguis* (80) y *A. hahneli* (70).

### 5.1. NÚMERO Y MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA

Las dos especies tuvieron una conformación cromosómica de  $2n = 24$ . Los cariotipos de ambas consistieron en seis pares de cromosomas grandes y seis pares de cromosomas pequeños (Figuras 3 y 4). Con excepción del par 10, que en *A. bilinguis* fue submetacéntrico y *A. hahneli* fue subtelocéntrico, la morfología cromosómica entre estas especies es igual (Figuras 5 y 6; Tabla 2), presentando cromosomas metacéntricos (pares: 1, 2, 7 y 8), submetacéntricos (pares: 3, 4 y 6) y subtelocéntricos (pares: 5, 9, 11 y 12) (Figuras 7 y 8; Tabla 2). Las dos especies analizadas no evidenciaron dimorfismo sexual a nivel cromosómico, es decir, no se encontraron cromosomas heteromórficos relacionados al sexo del individuo (Figuras 5 y 6).

#### 5.1.1. Número y morfología cromosómica de *Ameerega bilinguis*

La disposición del cariotipo de *Ameerega bilinguis* ( $2n=24$ ) fue determinada por la longitud relativa (LR) promedio de cada par cromosómico de los ocho especímenes conespecíficos y fueron ordenados de manera descendente (Tabla 2). Se agruparon seis pares de

cromosomas grandes y seis pares de cromosomas pequeños (Figura 3). Se determinó que los pares cromosómicos 1, 2, 7 y 8 son metacéntricos, los pares 3, 4, 6 y 10 son submetacéntricos y los pares 5, 9, 11 y 12 son subtelocéntricos (Figuras 5 y 7; Tabla 2). Los brazos largos (q) de los pares cromosómicos 1, 2 y 4 presentan una constricción secundaria intercalar.

El cromosoma 10 mostró una longitud de  $0,14\mu\text{m} \pm 0,02$ , medida proporcionada por la suma de las medias de ambos brazos, y representó al 4,75% del total de la cromatina del cariotipo. El brazo corto del cromosoma 10 reveló una longitud de  $0,05\mu\text{m}$  con  $\pm 0,01$  y el brazo largo una longitud de  $0,09\mu\text{m} \pm 0,01$ , representando al 35,57% y 64,43% de la cromatina de éste cromosoma respectivamente.

### **5.1.2. Número y morfología cromosómica de *Ameerega hahneli***

El cariotipo de *Ameerega hahneli* ( $2n=24$ ) fue organizado en base a la longitud relativa (LR) promedio de cada par cromosómico de los siete especímenes conespecíficos y fueron ordenados de manera descendente (Tabla 2). Se asociaron seis pares de cromosomas grandes y seis pares de cromosomas pequeños (Figura 4). Los pares 1, 2, 7 y 8 corresponden a la morfología metacéntrica, los pares 3, 4 y 6 son submetacéntricos y los pares 5, 9, 10, 11 y 12 son subtelocéntricos (Figuras 6 y 8; Tabla 2). Se evidenció la presencia de una constricción secundaria en el centro de los brazos largos (q) de los pares cromosómicos 1, 2, 3 y 4.

El cromosoma 10 tiene una longitud de  $0,36\mu\text{m} \pm 0,04$ , medida proporcionada por la suma de las medias de ambos brazos, y representó al 4,38% del total de la cromatina del cariotipo. El brazo corto del cromosoma 10 exhibió una longitud de  $0,05\mu\text{m} \pm 0,01$  y el brazo largo una

longitud de  $0,31\mu\text{m} \pm 0,03$ , representando al 13,88% y 86,12% de la cromatina de éste cromosoma, respectivamente.

## 5.2. BANDEO CROMOSÓMICO

Las bandas-C y bandas-DAPI exhiben un patrón determinado para cada especie. Ambas especies mostraron tener únicamente un par cromosómico con NOR. Las bandas NOR están ubicadas en distintos pares cromosómicos según la especie, y se encuentran cercanamente relacionadas a constricciones primarias - *A. bilinguis* - y constricciones secundarias - *A. hahneli* - (Figuras 3, 4, 7 y 8).

### 5.2.1. Bando-C

#### 5.2.1.1. Patrón de distribución de Bandas-C en *Ameerega bilinguis*

La aplicación de la técnica de bando C en esta especie reveló la presencia de una fuerte tinción de la región centromérica de todos los cromosomas. Se detectaron además, bandas C positivas tenues ubicadas en los telómeros de los brazos largos (q) de los pares cromosómicos 3, 4, 5 y 9, las mismas que aparecieron de manera constante en los cariotipos observados (Figuras 3 y 7). Sin embargo, se detectó una variación intraespecífica en relación a la distribución del patrón de bandas-C intercalares, mostrando diferencias en el número, localización, tamaño e intensidad de tinción de las mismas. Estas bandas intercalares inconstantes se registraron en los brazos cortos (p) de los pares 1, 2, 3 y 4; y también en los brazos largos (q) de los pares 3, 4, 7, 8, 9 y 10.

#### 5.2.1.2. Patrón de distribución de Bandas-C en *Ameerega hahneli*

El área centromérica y pericentromérica de todos los cromosomas mostró una fuerte tinción. Adicionalmente, se evidenció la presencia reiterada de una banda intercalar tenue en el brazo corto (p) del par cromosómico 1, al igual que en los brazos largos (q) de los pares 6, 9, 10, 11 y 12 (Figuras 4 y 8). Por otro lado, se observó variación intraespecífica de la disposición, número, tamaño e intensidad de tinción de bandas-C intercalares de los brazos cortos (p) en los pares 2, 3, 4 y 6, así como las bandas de los brazos largos (q) en los pares 1, 2, 3 y 4.

### 5.2.2. Bando-DAPI

#### 5.2.2.1. Patrón de distribución de bandas-DAPI en *Ameerega bilineis*

Todos los individuos analizados evidenciaron una región de tinción DAPI-positiva en los centrómeros del set completo de cromosomas. Además, se observó la presencia reiterada de una banda-DAPI en los telómeros de los brazos largos (q) del par cromosómico 5. La localización de las regiones-DAPI coincidieron con la ubicación de las bandas-C centroméricas de todos los cromosomas, así como con la banda-C telomérica del par 5. A pesar del avistamiento de bandas-DAPI intercalares en los brazos cortos (p) y largos (q), no fueron tomadas en cuenta para la elaboración del ideograma debido a su inconstancia en todos los individuos examinados (Figuras 3 y 7).

#### 5.2.2.2. Patrón de distribución de bandas-DAPI en *Ameerega hahneli*

Se confirmó la existencia de áreas DAPI-positivas en los centrómeros y regiones pericentroméricas de todos los cromosomas de *Ameerega hahneli*. Se observó la presencia constante de una banda-DAPI intercalar para los brazos cortos (p) del par cromosómico 1, así como para los brazos largos (q) de los pares 5, 6, 9, 10, 11 y 12. Todas las bandas-DAPI coincidieron con la ubicación de las bandas-C del cariotipo, excepto la banda-DAPI del brazo largo del par 5 que no posee su banda-C correspondiente. Otras bandas intercalares y teloméricas, que se observaron, fueron omitidas del análisis debido a su presencia inconstante (Figuras 4 y 8).

### 5.2.3. Bando Ag-NOR

#### 5.2.3.1. Patrón de bandas-NOR en *Ameerega bilineis*

Todos los cariotipos examinados presentaron la región del organizador nucleolar (NOR) en el par 11, de morfología subtelocéntrica, ubicado en el grupo de cromosomas pequeños. La banda NOR se ubicó en los brazos cortos (p), en la región pericentromérica (Figuras 3 y 7).

#### 5.2.3.2. Patrón de bandas-NOR en *Ameerega hahneli*

La totalidad de las metafases analizadas exhibieron la región del organizador nucleolar (NOR) en el par 4, de morfología submetacéntrica, ubicado en el grupo de cromosomas grandes. La banda NOR se situó en los brazos largos (q), y coincide con una constricción secundaria (Figuras 4 y 8).

### 5.3. VARIACIÓN INTRA E INTERESPECÍFICA

Se obtuvieron un total de 150 cariotipos, de los cuales 80 fueron de *Ameerega bilinguis* y 70 de *Ameerega hahneli*, diez por cada individuo analizado, con los cuales se calcularon las medias del índice centromérico (IC), radio centromérico (RC) y longitud relativa (LR) para cada par cromosómico de las respectivas especies (Tabla 2). Adicionalmente, se calcularon las respectivas desviaciones estándar, las cuales se encontraron en un rango entre 0 y 0,8 (Tabla 2).

El análisis de componentes principales (PCA), realizado con las medias de RC y LR de *A. bilinguis* y *A. hahneli*, mostró gráficamente que los pares cromosómicos de las dos especies difieren entre sí. Sin embargo, los cromosomas 10 de ambas especies se encuentran separados por una mayor distancia, indicando la formación de dos grupos distintos, ya que cada especie muestra una morfología diferente para dicho par (Figura 9). Además, el análisis de variancia (ANOVA) en una-vía realizado con las medias de los cromosomas 10 de *A. bilinguis* y *A. hahneli*, fue altamente significativo ( $P = 0,001$ ), lo que evidencia que este par cromosómico tiene una morfología que corresponde a cada especie (Tabla 3).

Por otro lado, el PCA realizado con las medias de RC y LR de las poblaciones de *A. hahneli* – Manaos y *A. hahneli* – Yasuní evidenció que los cromosomas son distintos para cada población. Concretamente, los pares 10, 11 y 12, debido a que exhiben morfologías cromosómicas distintas para cada población, fueron reunidos en dos grupos según su localidad (Figura 10). Adicionalmente, el ANOVA de una vía desarrollado con las medias de los cromosomas 10, 11 y 12 de las poblaciones de *A. hahneli* – Manaos y *A. hahneli* – Yasuní fue

significativo ( $P = 0,026$ ), con lo cual se comprobó la existencia de diferencias morfológicas entre estos cromosomas para ambas poblaciones (Tabla 4).

## 6. DISCUSIÓN

Los aspectos biológicos de la familia Dendrobatidae han sido ampliamente estudiados debido a que los miembros de su familia exhiben características llamativas como colores aposemáticos, producción de toxinas, comportamiento parental, etc. Sin embargo, su filogenia permanece pobremente entendida (Grant *et al.*, 2006). Se conoce que los estudios cariotípicos son útiles para la realización de análisis sistemáticos que ayudan a formular supuestos que impulsan la elaboración de filogenias de algunos grupos, pues sirven para analizar y deducir los rearrreglos cromosómicos e incorporarlos en el curso de su historia evolutiva (Aguilar *et al.*, 2002).

La familia Dendrobatidae es considerada ideal para la realización de estudios citogenéticos debido a que sus cromosomas son relativamente grandes (Bogart, 1991). Adicionalmente, este clado representa un buen modelo para probar hipótesis de variación cromosómica relacionadas a las estrategias de vida, es decir, para comprobar que la evolución cromosómica y la variación cariotípica son inherentes a factores ecológicos y etológicos (Bogart, 1991; Lande, 1979).

Por otro lado, los dendrobátidos han mostrado diversos resultados en relación a sus estudios cromosómicos. Particularmente, Velázquez (2012) observó que 4 poblaciones de *Oophaga sylvatica*, cada una de diferente morfotipo, poseen cariotipos iguales. Mientras que, Blasco-Zúñiga *et al.* (en preparación) señalan que diferentes poblaciones de *Epipedobates anthonyi*, a pesar de ser reconocidas como una misma especie, muestran variaciones en la conformación de su cariotipo, especialmente en la posición del NOR.

Considerando que los análisis citogenéticos proporcionan valiosa información que contribuyen notoriamente a la clarificación y entendimiento de la filogenia de diversos grupos taxonómicos, Aguiar *et al.* (2002), Rodrigues *et al.* (2011, 2012), Veiga-Menoncello *et al.* (2003a) y Kaiser *et al.* (2003) estiman que incrementar el número de análisis citogenéticos de los dendrobátidos sería útil para la comprensión de la historia evolutiva de este grupo y para la resolución de problemas taxonómicos y filogenéticos de la familia. Consecuentemente, a fin de favorecer al entendimiento de los patrones de variación de los cromosomas y contribuir a la aclaración de las relaciones intra e intergenéricas de dendrobátidos, este estudio se enfocó en la caracterización de los cariotipos de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli* provenientes de la Estación Científica Yasuní mediante las técnicas de bandeado C, DAPI y NOR que proporcionaron información detallada de cada cariotipo.

### 6.1. NÚMERO CROMOSÓMICO

El presente trabajo evidenció que las poblaciones de la Estación Científica Yasuní (ECY) – Ecuador de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli*, tienen un número cromosómico diploide  $2n = 24$  (Figuras 3 y 4). Este número cromosómico fue previamente observado en otras especies de *Ameerega* distribuidas en el continente: *A. picta* poblaciones de Perú y de Brasil (Bogart, 1991; Rodrigues *et al.*, 2011), *A. trivittata* poblaciones de Perú y de Brasil (Aguiar *et al.*, 2002; Bogart, 1991), *A. flavopicta* de Brasil (Aguiar *et al.*, 2002), y *A. braccata* de Brasil (Rodrigues *et al.*, 2012). El número de  $2n=24$  también fue reportado para la población de *A. hahneli* de Manaus – Brasil en un estudio realizado por Aguiar *et al.* en el 2002 (Anexo 1).

La información cariotípica de este grupo disponible hasta la fecha sugiere que el número  $2n = 24$  es ancestral para la familia Dendrobatidae (Bogart, 1991; Kaiser *et al.*, 2003). Pues, como reportan Bogart (1991) y Aguiar *et al.* (2004), este complemento cromosómico es el más común dentro de la familia. Cabe mencionar que incluso la mayoría de especies pertenecientes a la superfamilia Dendrobatoidea, que incluye a Aromobatidae y Dendrobatidae, exhiben números cromosómicos de  $2n = 24$  (Grant *et al.*, 2006). Es más, *Rheobates*, género basal de Aromobatidae, también presenta este número diploide de cromosomas (Grant *et al.*, 2006).

Como claramente lo discuten Grant *et al.* (2006), la familia Dendrobatidae puede derivarse cromosómicamente de un ancestro leptodactílido de 26 cromosomas, por lo que la reducción en el número cromosómico de  $2n = 26$  a  $2n = 24$  ha ocurrido como parte de la evolución que originó a esta familia de anuros venenosos (Kuramoto, 1990; Bogart, 1991; Grant *et al.*, 2006).

El complemento cariotípico de dendrobátidos basales es conservado evolutivamente; las ligeras alteraciones esencialmente se deben a rearrreglos cromosómicos como inversiones y translocaciones, los cuales pueden estar asociados a una variedad de características que incluyen a aquellas que cumplen un rol en la evolución adaptativa, particularmente en relación a los gradientes ambientales (Bogart, 1991; Hoffmann y Reiseberg, 2008; Kaiser *et al.*, 2003). Adicionalmente, otros mecanismos evolutivos, como fusión y fisión céntrica, han logrado cambios en el número cromosómico en Dendrobatidae (Bogart, 1991; Bogart y Hedges, 1995). Sin embargo, la restructuración del cariotipo de especies relacionadas a *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli* parecen haber ocurrido sin alterar el número de cromosomas de  $2n = 24$  (Aguiar *et al.*, 2002).

## 6.2. MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA

Las dos especies examinadas exhiben un cariotipo bimodal compuesto de dos grupos cromosómicos determinados por su longitud (Figuras 3 y 4). Lo mismo se ha observado en otras especies de la familia, donde el cariotipo generalmente se compone de seis pares de cromosomas grandes, seguidos de un número entre tres y seis pares de cromosomas pequeños (Aguiar *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2004; Blasco-Zúñiga, 2007; Reinoso, 2008; Rodrigues *et al.*, 2011, 2012).

Aunque las dos especies tienen el mismo número de cromosomas, éstas pueden ser distinguidas por variaciones en la morfología cromosómica (Figuras 7 y 8; Tabla 2). La variabilidad cariotípica registrada para este género, también reportada por Rodrigues *et al.* (2011), sugiere que existe un considerable tiempo de divergencia entre las especies que lo conforman pues, las diferencias cromosómicas registradas en este género considerado como monofilético por Grant *et al.* (2006), son distinguibles visualmente al microscopio.

La configuración morfológica de los cromosomas de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli* es compartida entre todos los pares a excepción del par 10 (Figuras 5, 6, 7, 8 y 9), que en el análisis de variancia (ANOVA) en una-vía arrojó una significación de  $P = 0,001^{**}$  (Tabla 3). Este par cromosómico en *A. bilinguis* presenta morfología submetacéntrica, y en *A. hahneli* exhibe forma subtelocéntrica. Los datos de longitud del cromosoma 10 de *A. bilinguis* indicaron que sus brazos cortos representan el 37,57% de la cromatina total de dicho cromosoma, mientras que los brazos cortos (p) de este par en *A. hahneli* constituyen el 13,88%. Consecuentemente, esta variación podría ser explicada mediante dos probables mecanismos: por un lado, pudo deberse a

una inserción de material genético en los brazos "p" del cromosoma 10 de *A. bilinguis*, o por otro, a una deleción en los brazos "p" del par 10 de *A. hahneli* (Paniagua *et al.*, 1999).

El cariotipo de *Ameerega hahneli* obtenido en este trabajo es semejante al descrito por Aguiar *et al.* (2002). Las poblaciones de Yasuní y Manaos comparten la misma morfología de los pares cromosómicos del 1 al 5 y del 7 al 9; sin embargo, los cromosomas 6, 10, 11 y 12 difieren ligeramente en su forma (Figuras 6, 8 y 10, Tabla 2, Anexo 1). El cromosoma 6 de *A. hahneli* – Yasuní posee morfología submetacéntrica ya que presenta 1,72 de radio centromérico (RC) y 0,37 de índice centromérico (IC) (Tabla 2), mientras que *A. hahneli* – Manaos posee morfología metacéntrica ya que tiene un RC de 1,16 (Anexo 1). Sin embargo, la morfología del par 6 de *A. hahneli* – Yasuní se encuentra en el límite entre la morfología metacéntrica y submetracéntrica según la clasificación propuesta por Green y Sessions (1991) (Anexo 4); además, la diferencia del RC entre las dos poblaciones es mínima (0,56). Por lo tanto, el par cromosómico 6 no fue considerado diferente entre las dos poblaciones, ya que la variación de su morfología no es relevante. Por otro lado, los especímenes de Brasil, presentan tres cromosomas pequeños telocéntricos: pares 10, 11 y 12 (Anexo 1), mientras que los de los individuos de Ecuador son subtelocéntricos según sus datos de IC y RC (Tabla 2). Los análisis de ANOVA en una-vía que tomaron en cuenta los valores de RC de los cromosomas 10, 11 y 12 de ambas especies arrojaron un  $P = 0,026^*$  (Tabla 4). Por lo tanto, queda en evidencia que las diferencias no pueden estar dadas debido a los diferentes grados de condensación de la cromatina o a la forma de medición y percepción de los cromosomas. Estos datos muestran una señal de divergencia poblacional, adicionalmente abren la posibilidad de que se traten de especies crípticas como en el caso reportado por Kaiser *et al.* (2003) en las poblaciones de *Mannophryne trinitatis*.

Se observaron constricciones secundarias en los brazos largos de los cromosomas 1, 2 y 4 de *A. bilinguis* así como en los cromosomas 1, 2, 3 y 4 de *A. hahneli* – Yasuní (Figuras 7 y 8), constricciones que no fueron detectadas en los individuos de *A. hahneli* – Manaos (Aguiar *et al.*, 2002). Especies cercanamente relacionadas, como *A. picta* - Perú y *A. trivittata* – Perú, también evidenciaron presencia de constricciones secundarias en los brazos largos de los cromosomas 1, 4 y 5; por consiguiente, las constricciones secundarias de los cromosomas grandes podrían ser características compartidas del género, y podrían ser rastreadas desde un cariotipo ancestral común (Aguiar *et al.*, 2002; Bogart, 1991).

Las dos especies estudiadas en este trabajo exhibieron una condición metacéntrica para el par 1 (Figuras 7 y 8), al igual que todas las especies de *Ameerega* cariotipadas hasta el momento (Bogart, 1991; Aguiar *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2011, 2012). El par 1 metacéntrico está presente en todos los miembros de la familia Dendrobatidae, es decir, que se podría afirmar que es un carácter altamente conservado (Aguiar *et al.*, 2002; Blasco-Zúñiga, 2007; Bogart, 1991; Reinoso, 2008).

Se han planteado hipótesis que explican la variabilidad de los cariotipos de los dendrobátidos en relación a su comportamiento (Bogart, 1991). Bogart (1991) y Lande (1979) mencionan que la diferenciación de los cromosomas está ligada a la historia evolutiva de las especies, y que especialmente está vinculada con el tamaño de la población y sus modos de reproducción. Las especies que producen poca cantidad de huevos o que demuestran comportamiento territorial son más susceptibles a una variación cromosómica substancial (Bogart, 1991), como es el caso de los dendrobátidos, que han reportado comportamiento territorial y producen una reducida cantidad de huevos debido a que exhiben un cuidado parental

exhaustivo (Crump, 1972; Weygoldt, 1987; Zimmermann, 1990; AmphibiaWeb, 2012). Por lo tanto, los factores etológicos y ecológicos podrían estar altamente relacionados con la variabilidad de la morfología cromosómica encontrada en las especies analizadas *A. bilinguis* y *A. hahneli* (Bogart, 1991).

### 6.3. BANDEO C

La técnica de bandeo-C demostró la presencia de heterocromatina constitutiva en todas las regiones centroméricas, y en diferentes áreas intercalares y teloméricas tanto en el cariotipo de *Ameerega bilinguis* como en el de *Ameerega hahneli* (Figuras 3, 4, 7 y 8), lo cual implica que éstas contienen secuencias de ADN altamente repetitivo (Imai, 1991).

Los cariotipos de las dos especies de *Ameerega* analizadas en este trabajo presentaron variación en el número y la distribución de bandas de heterocromatina constitutiva (Figuras 3, 4, 7 y 8). Varios trabajos examinados hasta la fecha indican versatilidad del patrón de bandas-C – variación en tinción y distribución de bandas-C positivas – en *Anura* (Cuevas y Formas, 2005); inclusive, se ha reportado inconstancia de la presencia de estas bandas para los cromosomas de mamíferos (Vistorin *et al.*, 1976), con lo que se evidencia la variabilidad de la composición de la heterocromatina constitutiva (Schmid, 1978; Aguiar *et al.*, 2002).

Erdtmann (1982) señala que, la versatilidad de las bandas-C puede deberse a factores como a la desnaturalización cromosómica, las diferentes afinidades de tinción del cromosoma, la edad de las placas o al estado de condensación de los cromosomas. Adicionalmente, otras de las causas pueden ser las variaciones metodológicas, ya que los pequeños cambios al estandarizar las

técnicas pueden ser decisivos para tener una buena tinción (Erdtmann, 1982). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se trate de polimorfismos cromosómicos característicos de cada especie, los mismos que podrían ser corroborados mediante la utilización de técnicas moleculares como FISH, que permitirían detectar genes específicos en los cromosomas (Liehr y Pallestor, 2009).

*A. bilinguis* y *A. hahneli* mostraron, tal como se esperaba, una concentración significativa de heterocromatina constitutiva en el área del centrómero (Figuras 3, 4, 7 y 8). Al igual que los resultados obtenidos en esta investigación, otros estudios realizados a diferentes especies y poblaciones de *Ameerega* también han revelado que la región centromérica de los cromosomas de este género exhibe una presencia constante y conspicua de heterocromatina constitutiva (Aguiar *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2011). Adicionalmente, ambas especies estudiadas exhibieron bandas-C intercalares y teloméricas tenues. La tinción específica de estas zonas está dada por la presencia de heterocromatina rica en A-T o G-C sumamente condensada, las secciones heterocromáticas corresponden a ADN altamente repetitivo o también llamado ADN satélite (Paniagua *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2002).

En Archaeobatraquia, ranas primitivas, la suma de heterocromatina es relativamente reducida; pequeñas cantidades de heterocromatina son encontradas en las regiones paracentroméricas de sus cariotipos (King, 1991). Por otro lado, Neobatrachia, taxón que incluye a Dendrobatidae, exhibe bandas-C oscuras en las áreas paracentroméricas y también bandas-C tenues teloméricas e intersticiales (King, 1991). Al parecer, en gran parte del reino animal, la mayor parte de heterocromatina constitutiva se localiza en el centrómero (Paniagua *et al.*, 1999). Consecuentemente, la presencia de la heterocromatina centromérica es el estado ancestral de este

carácter (King, 1991; Aguiar *et al.*, 2002). Además, se observa que existe una tendencia evolutiva a aumentar la cantidad de heterocromatina a partir de la distribución en el ancestro (King, 1991).

Procesos como adición de bloques de heterocromatina-C a los brazos cromosómicos y la transformación de eucromatina a heterocromatina son los causantes de la variación en cantidad y distribución de bandas-C en los individuos (King, 1991; Aguiar *et al.*, 2002). King (1991) sugiere que un bloque de heterocromatina cercano a un sitio genéticamente significativo prevendrá la formación de quiasmas en esa región, por lo tanto, se asegura la integridad genética del área, explicando la existencia de bloques heterocromáticos entre la eucromatina. Es probable que, la transformación de segmentos eucromáticos a heterocromáticos juegue un papel de separación entre de las especies (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003b). Adicionalmente, dentro de *Ameerega*, género que presenta grados de diferenciación morfológica cariotípica, se exhibe la presencia de patrones de bandas-C definidos para cada especie, sugiriendo que la transformación de eucromatina fue un proceso independiente, es decir, probablemente no estuvo relacionado con la diferenciación de la morfología (Cuevas y Formas, 2005).

Especies estudiadas de *Ameerega* y de otros anuros neobatraquios manifiestan patrones de bandas-C únicos. La diferenciación entre cariotipos morfológicamente similares es posible gracias a la variación de la distribución de bandas, en especial bandas-C (Aguiar *et al.*, 2002; Cuevas y Formas, 2005). Los polimorfismos de bandas son buenos indicadores de la evolución independiente y divergente de las especies (Kaiser *et al.*, 2003). Sin embargo, la notable variación interespecífica del patrón de heterocromatina en el cariotipo de *Ameerega* podría dificultar el reconocimiento de sinapomorfías entre ellos; por lo que es necesario la inclusión de datos del patrón de bandas C, y de otros caracteres citogenéticos como morfología, número

cromosómico, detección de genes específicos, etc. a los análisis fenotípicos, morfométricos, moleculares, etológicos, etc. existentes, para que en conjunto, permitan clarificar su filogenia.

La población de *Ameerega hahneli* del Yasuní difiere de la de Manaos en la cantidad y distribución de bandas-C. Es posible que las variaciones de las porciones de heterocromatina jueguen un rol adaptativo proveyendo ventaja genotípica para las condiciones ambientales cambiantes (Martirosyan y Stepanyan, 2009). La diferencia de la cantidad de heterocromatina de las especies de la Amazonía puede estar relacionada con la ocupación de distintos tipos de hábitat (Aguilar *et al.*, 2002). Los bosques húmedos tropicales, incluyendo el bosque Amazónico, varían en la riqueza y composición de especies florísticas y animales de un lugar a otro, ya que dependen de la distribución de factores como: geomorfología, variación edáfica o topográfica, etc. que generan un patrón espacial en la composición de la comunidad tropical (Araujo-Murakami *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2008)

#### 6.4. BANDEO DAPI

Se observó que, las dos especies de *Ameerega* analizadas en este trabajo además de diferenciarse morfológicamente entre sus estructuras cromosómicas, también varían en cuanto a la distribución y cantidad de heterocromatina. La técnica de bandeo-C reveló vagamente la localización de heterocromatina constitutiva extracentromérica; por lo tanto, la técnica de bandeo fluorescente DAPI ayudó a corroborar la presencia de las secuencias repetitivas en forma contigua - tándem - a lo largo de los cromosomas (Hass-Jacobus y Jackson, 2005) (Figuras 3, 4, 7 y 8).

La mayoría de las bandas-C observadas en los cromosomas de *A. bilinguis* y *A. hahneli* concuerdan con el bloque DAPI+ en la misma localización. Estudios han demostrado que por lo general la totalidad de bandas DAPI son similares y tienen la misma posición que las del bandeado-C (Lavanaia *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2009). Sin embargo, no todas las bandas-C tuvieron su correspondiente banda-DAPI debido a que ésta técnica de tinción fluorescente solamente revela las regiones heterocromáticas que poseen ADN redundante rico en AT (Schweizer *et al.*, 1978; Silva y Guerra, 2010).

Las regiones centroméricas del complemento cromosómico y la región telomérica del brazo largo (q) del cromosoma 5 de *Ameerega bilinguis* evidenciaron los mismos patrones para ambos bandeos. Por otro lado, *Ameerega hahneli* exhibió un patrón de bandas similar para los dos tratamientos; adicionalmente, se observó la presencia de una banda DAPI-exclusiva localizada intersticialmente en el brazo largo (q) del cromosoma 5 (Figuras 3, 4, 7 y 8). Por lo tanto, se trata de una región de ADN en las cuales el fluorocromo AT específico 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, por sus siglas en inglés) se ha unido, permitiendo así la caracterización de las regiones heterocromáticas DAPI+ (Schweizer *et al.*, 1978; Silva y Guerra, 2010).

## 6.5. BANDEO NOR

La técnica de impregnación argéntica Ag-NOR, distinguida por su procedimiento simple y rápido, permitió la identificación de la posición del complejo de genes ribosomales 18s y 28s en los pares cromosómicos 11 y 4 de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli*, respectivamente (Schmid, 1982). Se conoce que los rearrreglos cromosómicos que involucren a los NORs, incluyendo la variabilidad interespecífica de la localización de esta región, brindan información

acerca de su sistemática y filogenia (Amemiya y Gold, 1988). Por lo tanto, esta técnica constituye un excelente marcador para la caracterización de especies, es por ello que en este trabajo se realizó este bandeo.

Los individuos de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli* muestran el NOR en un solo par de cromosomas, lo que coincide con lo propuesto por Schmid (1982), quien indica que la mayoría de anuros, tanto primitivos como altamente evolucionados, presentan un solo par cromosómico con bandas NOR. Adicionalmente, diferentes estudios cariotípicos han demostrado que la localización de NOR en los cromosomas está vinculada estrechamente con la presencia de constricciones secundarias de los brazos cromosómicos (Aguiar *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 2003; Martirosyan y Stepanyan, 2009; Schmid, 1978; Silva *et al.*, 2000; Siqueira-Jr *et al.*, 2004). Esto se corrobora con el hecho de que la disposición de la región del organizador nucleolar de *Ameerega hahneli* coincide con la constricción secundaria de los brazos largos del cromosoma 4, mientras que, en *Ameerega bilinguis* el NOR está en los brazos cortos del par 11, muy cerca de la región centromérica (Figuras 3, 4, 7 y 8).

Generalmente, los cariotipos de especies que están cercanamente relacionadas tienen el NOR en la misma región cromosómica (Schmid, 1982). Sin embargo, a pesar de pertenecer al mismo género, la región del organizador nucleolar de las dos especies estudiadas están presentes en distintos pares cromosómicos. Esta variabilidad interespecífica de la localización de NOR indica que ocurrieron rearrreglos cromosómicos en los segmentos relacionados con la región del organizador nucleolar durante la evolución (Schmid, 1982). A pesar de que las especies de *Ameerega* comparten un ancestro común, la distribución de la región organizadora del nucleolo en diferentes cromosomas sugiere que, los mecanismos implicados en la transferencia del NOR

se dieron por inversiones y translocaciones de paquetes completos de los genes de esta región (Aguiar *et al.*, 2002; Amemiya y Gold, 1990; Grant *et al.*, 2006).

Así como la diferencia de bandas C entre las dos especies analizadas, la variación interespecífica de la distribución del NOR en distintos cromosomas también permitiría reforzar la hipótesis de que ha ocurrido un considerable tiempo de divergencia entre las especies que integran el género monofilético *Ameerega* (Rodrigues *et al.*, 2011). Así pues, *A. braccata*, *A. flavopicta* y *A. picta* poseen el NOR en el cromosoma 12, *A. bilinguis* en el cromosoma 11, *A. trivittata* en el cromosoma 9 y *A. hahneli* en cromosoma 4 (Aguiar *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2011, 2012).

#### 6.6. CROMOSOMAS SEXUALES

No se encontró dimorfismo sexual cromosómico en ninguna de las dos especies estudiadas. Hembras y machos de ambas especies no presentaron heteromorfismo cromosómico en cuanto a la morfología, ni al patrón de bandas C, DAPI y NOR de cada cromosoma (Figuras 3, 4, 5 y 6). Trabajos anteriormente realizados con individuos pertenecientes a *Ameerega* tampoco han reportado diferencia cromosómica relacionada al sexo (Aguiar *et al.*, 2002; Bogart, 1991; Rodrigues *et al.*, 2011, 2012).

La ausencia de cromosomas sexuales heteromórficos en las dos especies de *Ameerega* analizadas en este trabajo, concuerda con estudios cariotípicos reportados hasta el momento para toda la familia Dendrobatidae (Aguiar *et al.*, 2002; Bogart, 1991; Rodrigues *et al.*, 2011, 2012;

Kaiser *et al.*, 2003). En general, un número reducido de especies de anfibios muestran cromosomas heteromórficos asociados al sexo; algunas especies de Urodela y Anura poseen cromosomas sexuales asociados con el sistema X y Y como *Triturus alpestris* (Urodela: Salamandridae), *Gastrotheca riobambae* (Anura: Hemiphractidae) y *Egystomops petersi* (Schmid *et al.*, 1991; Targueta *et al.*, 2010). A diferencia de esto, especies como *Aneides ferreus* (Urodela: Plethodontidae), *Xenopus laevis* (Anura: Pipidae) y *Engystomops coloradorum* (Anura: Leptodactylidae) poseen el sistema W y Z, y *Leiopelma hochstetteri* (Anura: Leiopelmatidae), entre otros, tienen el sistema O y W (Schmid *et al.*, 1991; Targueta *et al.*, 2012).

## 6.7. CONCLUSIONES

El número cromosómico para *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli* provenientes de la Estación Científica Yasuní es de  $2n = 24$ , que confirma que tienen el número cromosómico ancestral para la familia Dendrobatidae.

Ambas especies comparten la misma morfología cromosómica de todos los pares excepto en el par 10, el cual en *A. bilinguis* es submetacéntrico, mientras que en *A. hahneli* es subtlocéntrico; inserciones o deleciones de fragmentos de cromatina pueden ser los responsables de dichas diferencias.

Las dos especies estudiadas no presentan dimorfismo sexual cromosómico; trabajos anteriormente realizados en Dendrobatidae afirman que los cromosomas sexuales de este grupo permanecen en estado homomórfico, es decir, sin diferenciarse.

El patrón de bandas C y DAPI es característico para cada especie. Las bandas C, en su mayoría, tienen su correspondiente banda DAPI, evidenciando la presencia de heterocromatina constitutiva. La diferenciación de la localización de bandas heterocromáticas indicaría que la variación en la cantidad de heterocromatina constitutiva es independiente de la variación morfológica del cariotipo.

La ubicación del NOR es diferente para cada especie: *A. bilinguis* en el cromosoma 11 y *A. hahneli* en el cromosoma 4. La variabilidad interespecífica de la localización de NOR indicaría que durante la historia evolutiva han ocurrido rearrreglos cromosómicos relacionados con estos

segmentos. Por otro lado, *A. hahneli* – Manaos y *A. hahneli* – Yasuní poseen el NOR en el mismo par cromosómico ya que están más cercanamente relacionadas.

Las poblaciones de *A. hahneli* – Manaos y *A. hahneli* – Yasuní comparten la misma morfología en los cromosomas grandes; no obstante, los cromosomas 10, 11 y 12 de la población de Manaos exhiben morfología telocéntrica y los del Yasuní son subtelocéntricos. Consecuentemente, estos datos indican la existencia de diferencias poblacionales con lo que se abre la posibilidad de que se trate de especies crípticas.

Los patrones de bandas C de los individuos de Manaos y de Yasuní son distintos. Se sugiere que las variaciones de heterocromatina dentro del cariotipo juegan un rol importante en la adaptación de los organismos a las condiciones ambientales ya que posiblemente proveen ventaja genotípica.

## 6.8. RECOMENDACIONES

Se recomienda la realización de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para identificar la localización de los segmentos que han sufrido inserciones o deleciones, y que serían las responsables del cambio de morfología cromosómica de las especies estudiadas. Así mismo, para corroborar la presencia de las bandas heterocromáticas detectadas con los bandeos C y DAPI de ambas especies analizadas.

Implementar estudios de distinta índole (mofológicos, morfométricos, etológicos, moleculares, citogenéticos, etc.) que permitan corroborar si las poblaciones de *Ameerega hahneli* de Manaos y de Yasuní son o no especies crípticas.

Ejecutar estudios adicionales de los cariotipos de *Ameerega*, de diferentes especies y diferentes localidades, que probarán o no las hipótesis de homología de los cromosomas pequeños de estas especies. Además, con ellos se esclarecerán los rearrreglos cromosómicos que originaron el cambio morfológico de los cromosomas pequeños especialmente.

Desarrollar más caracterizaciones cromosómicas de Dendrobatidae para inferir la filogenia de la familia (relaciones intra e intergenéricas) utilizando las similitudes y diferencias de cada cariotipo; y adicionalmente, poder trazar un cariotipo ancestral común de este linaje monofilético.

## 7. LITERATURA CITADA

Aguiar, O., Carvalho, K., Giaretta, A. y Recco-Pimentel, S. 2004. Cytogenetics of *Hylodes* and *Crossodactylus* Species (Anura, Leptodactylidae) with Comments on Hylodinae/Dendrobatidae Relationships. *Genetica* 121: 43 – 53.

Aguiar, O., Lima, A., Giaretta, A. y Recco-Pimentel, S. 2002. Cytogenetic Analysis of Four Poison Frogs of the *Epipedobates* Genus (Anura: Dendrobatidae). *Herpetologica* 58 (3): 293 – 303.

Amemiya, C. y Gold, J. 1988. Chromosomal NORs as Taxonomic and Systematic Characters in North American Cyprinid Fishes. *Genetica* 76: 81 – 90.

Amemiya, C. y Gold, J. 1990. Cytogenetic Studies in North American Minnows (Cypridae): XVII. Chromosomal NOR Phenotypes of 12 Species, With Comments on Cytosystematic Relationships Among 50 Species. *Hereditas* 112: 231 – 247.

AmphibiaWeb. 2012. Information on Amphibian Biology and Conservation. Berkeley, California: AmphibiaWeb. <<http://amphibiaweb.org/lists/Dendrobatidae.shtml>> [Consulta: Octubre del 2012].

Araujo-Murakami, A., Bascopé, F., Cardona-Peña, V., De la Quintana, D., Fuentes, A., Jørgensen, P., Maldonado, C., Miranda, T., Paniagua-Zambrana, N. y Seidel, R. 2005.

Composición Florística y Estructura del Bosque Amazónico Preandino en el Sector del Arroyo Negro, Parque Nacional Madidi, Bolivia. *Ecología en Bolivia* 40: 281 – 303.

Azevedo-Ramos, C., Coloma, L., Ron, S., Castro, F. y Gascon, C. 2010. *Ameerega hahneli*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. [Consulta: Diciembre del 2012].

Bass, M., Finer, M., Jenkins, C., Kreft, H., Cisneros-Heredia, D., McCracken, S., Pitman, N., English, P., Swing, K., Villa, G., Di Fiore, A., Voigt, C. y Kunz, T. 2010. Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. *PLoS ONE* 5(1): e8767. doi:10.1371/journal.pone.0008767.

Blasco-Zúñiga, A. 2007. Análisis de los Cromosomas Mitóticos de Seis Especies de Anuros Ecuatorianos de la Familia Dendrobatidae. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Bogart, J. 1991. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. En: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Chapter 11. (Green, M. and Sessions, K. eds) pp.233 – 258. Academia Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, California, USA.

Bogart, J. y Hedges, S. 1995. Rapid Chromosome Evolution in Jamaican Frogs of the Genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *Journal of Zoology* 235: 9 – 31.

- Castro, F., Rueda, J., Bolívar W., Estupiñan, R., Coloma, L., Ron, S. y Almendáriz, A. 2004. *Ameerega bilinguis*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. [Consulta: Diciembre del 2012].
- Cisneros-Heredia, D., Almendáriz, A., Yáñez-Muñoz, M., Coloma, L. y Ron, S. 2004. *Ameerega erythromos*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. [Consulta: Diciembre del 2012]
- Coloma, L. 2005–2009. Anfibios de Ecuador. [en línea]. Ver. 2.0 (29 Octubre 2005). Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. <<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/amphibiawebec/anfibiosecuador/index.html>> [Consulta: Junio del 2011].
- Crump, M. 1972. Territoriality and Mating Behavior in *Dendrobates granuliferus* (Anura: Dendrobatidae). *Herpetologica* 28: 195 – 198.
- Cuevas, C. y Formas, R. 2005. Novel Diploid Number and Chromosomal Formula in a South American Frog of the Genus *Alsodes* (Amphibia, Leptodactylidae). *Italian Journal of Zoology* 72: 87 – 91.
- Erdtmann, B. 1982. Aspects of Evaluation, Significance, and Evolution of Human C-Band Heteromorphism. *Human Genetics* 61: 281 – 294.

- Fernández, R., Barragán, M., Bullejos, M., Marchal, J., Díaz de la Guardia, R. y Sánchez A. 2002. New C-Band Protocol by Heat Denaturation in the Presence of Formamide. *Hereditas* 137: 145 – 148.
- Ferreira, V., Szpiniak, B. y Grassi, E. 2005. Manual de Genética: Tomo I. Universidad Nacional de Río Cuarto. Segunda Edición. Río Cuarto, Argentina.
- Frost, D., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R., Haas, A., Haddad, C., De Sá, R., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S., Raxworthy, C., Campbell, J., Blotto, B., Moler, P., Drewes, R., Nussbaum, R., Lynch, J., Green, D. y Wheeler, W. 2006. The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297: 1 – 370.
- Frost, D. 2013. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January, 2013). American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database accessible at < <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>> [Consulta: Febrero del 2013].
- Gould, S., Woodruff, D. y Martin, J. 1974. Genetics and Morphometrics of *Cerion* at Pongo Carpet: A New Systematic Approach to this Enigmatic Land Snail. *Systematic Biology* 23: 518 – 535.
- Grant, T., Frost, D., Caldwell, J., Gagliardo, R., Haddad, C., Kok, P., Means, D., Noonan, B., Schargel, W. y Wheeler, W. 2006. Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and their Relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American*

Museum of Natural History. Central Park West at 79<sup>th</sup> Street, New York, USA. Number 299, 262pp.

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, M. y Sessions, K. 1991b. Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic Press. Inc. Harcourt Brace Jovanovich. U.S.A. 456 pp.

Hass-Jacobus, B. y Jackson, S. 2005. Physical Mapping of Plant Chromosomes. En: The Handbook of Plant Genome Mapping. Chapter 6. (Meksem, K. and Kahl, G. eds) pp. 133 – 146. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Alemania.

Hayes, H. 2000. Chromosome Banding Techniques. En: Techniques in Animal Cytogenetics, Chapter 2. (Popescu P., Hayes H., and Dutrillaux B. eds) pp. 25 – 68. Springer and INRA Editions. Berlin, Alemania. pp 229.

Hillis, D. 1991. The Phylogeny of Amphibians: Current Knowledge and the Role of Cytogenetics. En: Amphibian Cytogenetics and Evolution, Chapter 2. (Green, M. and Sessions, S. eds) pp.233 – 258. Academia Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, California, USA.

- Hoffmann, A. y Reiseberg, L. 2008. Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation? *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39: 21 – 42.
- 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.
- Icochea, J., Coloma, L., Ron, S., Jungfer, K. y Cisneros-Heredia, D. 2004. *Ameerega parvula*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. [Consulta: Diciembre del 2012].
- Imai, H. 1991. Mutability of Constitutive Heterochromatin (C-Bands) During Eukaryotic Chromosomal Evolution and Their Cytological Meaning. *Japanese Journal of Genetics* 66: 635 – 661.
- Jones, M., Tuomisto, H., Borcard, D., Legendre, P., Clark, D. y Olivas, P. 2008. Explaining Variation in Tropical Plant Community Composition: Influence of Environmental and Spatial Data Quality. *Oecologia* 155: 593 – 604.
- Kaiser, H., Steinlein, C., Feichtinger, W. y Schmid, M. 2003. Chromosome Banding of Six Dendrobatid Frogs (*Colostethus*, *Mannophryne*). *Herpetologica* 59:203 – 218.
- Kasahara, S. 2009. Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética. Editora SBG. Primeira Edição. São Paulo, Brasil. pp 160.

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.233 – 258. Academia Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, California, USA.

Kuramoto, M. 1990. A List of Chromosome Numbers of Anuran Amphibians. Bull Fukuoka University. Ed. 39:83 – 127.

Lacadena, J. 1996. Citogenética. Primera Edición. Editorial Complutense. Madrid - España. 937 pp.

Lande, R. 1979. Effective Deme Sizes During Long-Term Evolution Estimated From Rates of Chromosomal Rearrangement. Evolution 33: 234 – 251.

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.

Liehr, T. y Pallestor, F. 2009. Molecular Cytogenetics: The Standard FISH and PRINS Procedure. En: Springer Protocols. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). Application Guide. Part 1 (Liehr, T. ed) pp. 23 – 34. Institut für Humangenetik und Anthropologie. Alemania.

- Martirosyan, A. y Stepanyan, I. 2009. Features of the karyotypes of *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 and *Rana macrocnemis* Boulenger, 1985 (Amphibia: Ranidae) from Armenia. *Comparative Cytogenetics* 3: 11 – 24.
- 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). *Genetica* 138: 1127 – 1132.
- Nei, M. y Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc. New York, USA. Pp. 239.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F. y de Miguel, M. 1999. *Biología Celular*. Capítulo 3: Estructura y Expresión Génica. McGraw-Hill Interamericana. Primera Edición. Madrid - España. pp 361.
- Rasotto, M., Cardellini, P. y Sala, M. 1987. Karyotypes of five Dendrobatidae (Anura, Amphibia). *Herpetology* 43: 177 – 182.

- Read, M. 2000. Frogs of the Ecuadorian Amazon, a Guide to their Calls. Morley Read Productions. CD. <<http://www.morley-read.com/frogcd.html>> [Consulta: Enero del 2012]
- Reinoso, M. 2008. Análisis de los Cromosomas Mitóticos de Cuatro Especies de Ranas del Género *Hyloxalus* (Anura: Dendrobatidae). Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Rivera, M. 2006. La Citogenética: Un Aporte más al Conocimiento de los Anfibios Ecuatorianos. *Nuestra Ciencia* 8: 27 – 30.
- Rodrigues, P., Aguiar, O., Serpieri, F., Lima, A., Uetanearo, M. y Recco-Pimentel, S. 2011. Chromosome Analysis of Five Brazilian Species of Poison Frogs (Anura: Dendrobatidae). *Journal of Genetics* 90 (1): 31 – 37.
- Rodrigues, D., Strussmann, C. y Lourenço, L. 2012. Cytogenetics of *Ameerega braccata* (Anura, Dendrobatidae) from Serra São Vicente, Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. Resumos do 58° Congresso Brasileiro de Genética. 11 a 14 de Setembro de 2012. Rafain Palace Hotel e Convention Center. Foz do Iguaçu. PR. Brasil.
- Ron, S. 2001-2011. Anfibios de Parque Nacional Yasuní, Amazonía ecuatoriana. [en línea]. Ver. 1.7 (2011). Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. <<http://tropicalfrogs.net/yasuni/>> [Consulta: Noviembre del 2012].

Ron, S. R., Guayasamín, J. M. y Yanez-Muñoz, M. H. 2013. AmphibiaWebEcuador. Version 2013.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador>>. [Consulta: Abril del 2013].

Save America's Forest. 2005. Yasuní Rainforest Campaign: The Most Biodiversity Forest in the World. Yasuní-Amphibian Diversity Map and Information. <<http://saveamericasforests.org/Yasuni/Maps/Amphibian.html>> [Consulta: Enero del 2012]

Schmid, M. 1978. Chromosome Banding in Amphibia. II. Constitutive Heterochromatin and Nucleolus Organizer Regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma* 68: 131 – 148.

Schmid, M. 1982. Chromosome Banding in Amphibia. VIII. Analysis of the Structure and Variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327 – 344.

Schmid, M., Nanda, I., Steinlein, C., Kausch, K. y Haaf, T. 1991. Sex - Determining Mechanisms and Sex Chromosomes in Amphibia. En: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Chapter 16. (Green, M. and Sessions, K. eds) pp.233 – 258. Academia Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, California, USA.

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.

Schweizer, D., Ambros, P. y Andrie, M. 1978. Modification of DAPI Banding on Human Chromosomes by Prestaining with a DNA-Binding Oligopeptide Antibiotic, Distamycin A. *Experimental Cell Research* 111: 327 – 332.

Silva, A. y Guerra, M. 2010. The Meaning of DAPI Bands Observed After C-Banding and FISH Procedures. *Biotechnic & Histochemistry* 85: 115 – 125.

Silva, A., Haddad, C. y Kasahara., S. 2000. Chromosomal Studies on Five Species of the Genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) Using Differential Staining. *Cytobios* 103: 25 – 38.

Siqueira-Jr, S., Ananias, F. y Recco-Pimentel, S. 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: 363 – 372.

Sousa, S., Siva, P., Torres, G. y Lyderson, F. 2009. Chromosome Banding and Essential Oils Composition of Brazilian Accessions of *Lippia alba* (Verbenaceae). *Biologia* 64: 711 – 715.

Sumner, A. 1972. A Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304 – 306.

Sumner, A. 2003. *Chromosomes Organization and Function*. Chapter 16: Chromosomes, the Karyotype and Evolution. Blackwell Publishing. First Edition. United Kindom. pp 287.

Targueta, C., Rivera, M., Souza, M., Recco-Pimentel, S. y Lourenço, L. 2010. Cytogenetic Contributions for the Study of the Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae) Accessed in the Light of Phylogenetics Relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 709 – 725.

Targueta, C., Rivera, M., Lourenço, L. 2012. Karyotypic Differentiation Via 2n Reduction and a Finding of a Case of Triploidy in Anurans of the Genus *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). *Genetica* 139: 1339 – 1347.

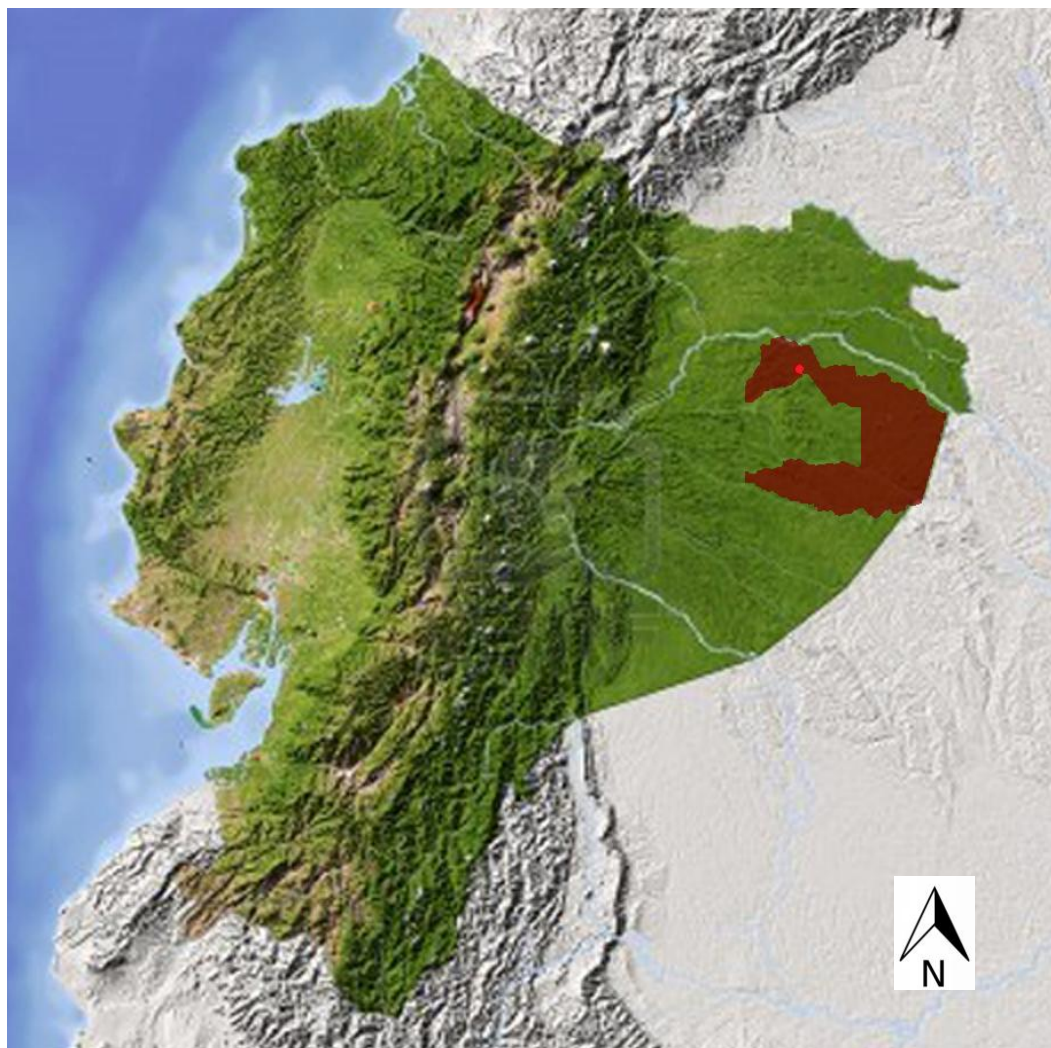
Twomey, E. y Brown, J. 2009. *Ameerega*. <<http://www.dendrobates.org/ameerega.html>>. [Consulta: Noviembre del 2012].

Veiga-Menoncello, A., Lima, A. y Recco-Pimentel, S. 2003a. Cytogenetics of Two Central Amazonian Species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with Nidicolous Tadpoles. *Caryologia* 56: 253 – 260.

- Veiga-Menoncello, A., Lima, A., y Recco-Pimentel, S. 2003b Cytogenetic Analysis of Four Central Amazonian Species of *Colostethus* (Anura, Dendrobatidae) with a Diploid Complement of 22 Chromosomes. *Hereditas* 139: 189–198.
- Veiga-Menoncello, A., Strüssmann, C., Lima, A., y Recco-Pimentel, S. 2006. Chromosomal study of *Colostethus brunneus* from the Type Locality and Two Related Species (Anura, Dendrobatidae). *Genetica* 126: 179 – 187.
- Velázquez, C. 2012. Análisis Cariotípico de Cuatro Poblaciones de *Oophaga sylvatica* (Anura: Dendrobatidae). Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Vistorin G., Gamperl R. y Rosenkranz W. 1976. Analysis of mitotic and meiotic chromosomes of the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Säugetierkunde* 41: 342 – 348.
- Weygoldt, P. 1987. Evolution of Parental Care in Dart Poison Frogs (Amphibia: Anura: Dendrobatidae). Sonderdruck aus *Z. f. zool. Systematik u. Evolutionsforschung* 25: 51 – 67.
- White, M. 1978. Modes of Speciation. W. H. Freeman and Company. San Francisco - California.
- Zarco, C. 1986. A New Method for Estimating Karyotype Asymmetry. *Taxon* 35: 526 – 530.
- Zeizz, C. 2005. Axio Vision 4.4 Software. Göttingen - Alemania.

Zimmermann, E. 1990. Behavioral Signals and Reproduction Models in the Neotropical Frog Family Dendrobatidae. *Fortschritte der Zoologie* 38: 61 – 73.

## **8. FIGURAS**



**Figura 1.** Mapa del Ecuador. Localidad de colecta de los especímenes de *Ameerega hahneli* y *Ameerega bilinguis*. El área marrón representa al Parque Nacional Yasuní (PNY) - Orellana, Ecuador y el punto rojo representa a la Estación Científica Yasuní (ECY).

a)

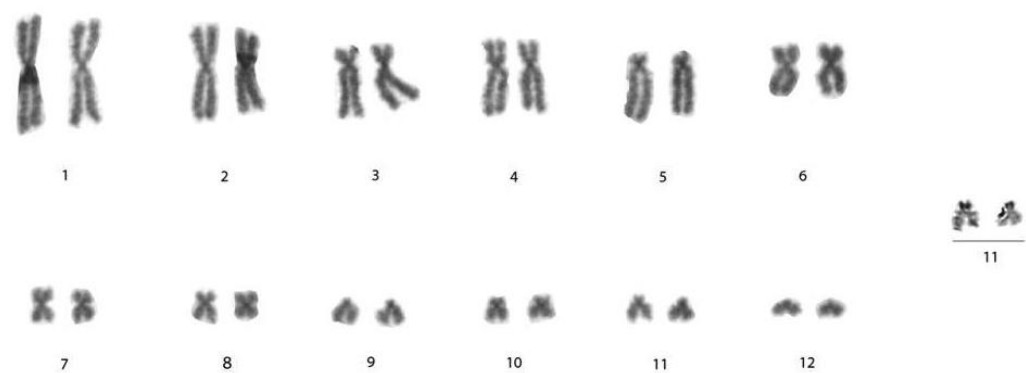


b)

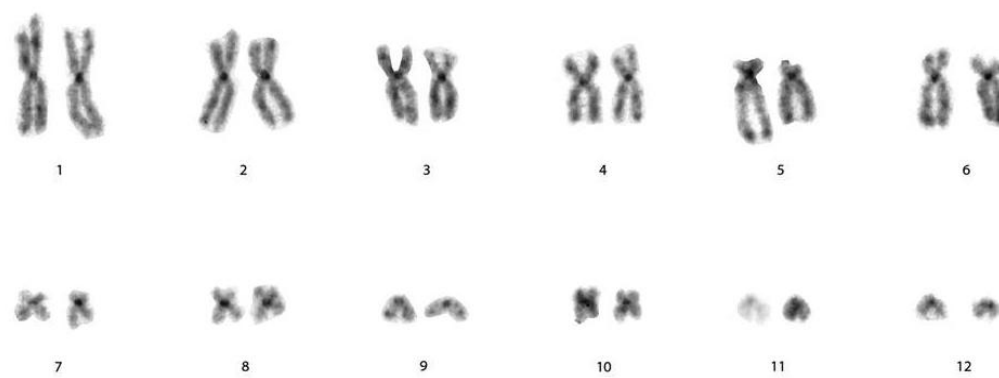


**Figura 2.** Especímenes de (a) *Ameerega bilineata* y (b) *Ameerega hahneli*.

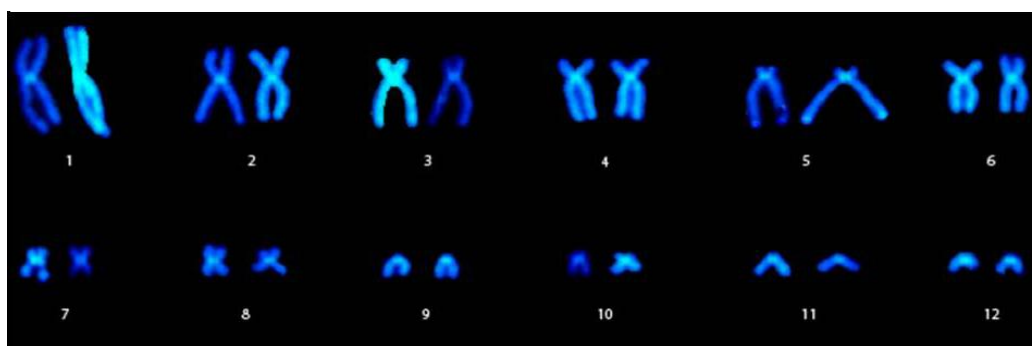
a)



b)

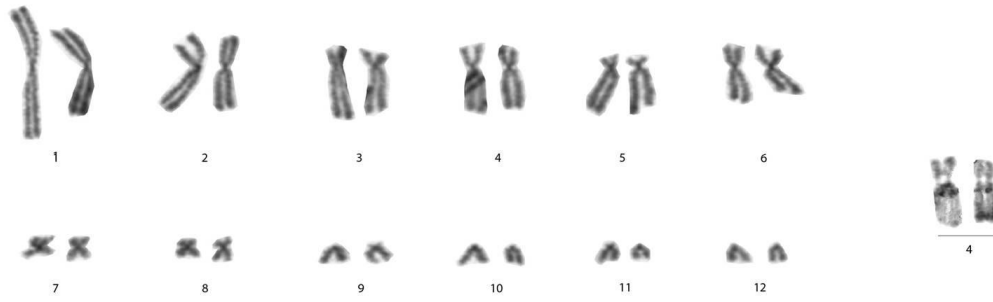


c)

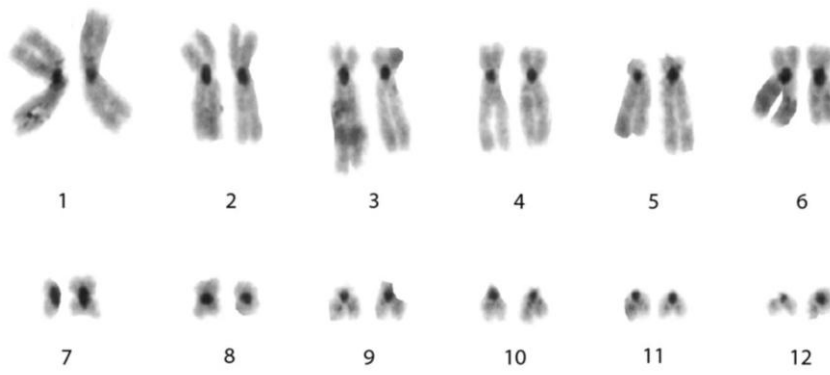


**Figura 3:** Cariotipos de *Ameerega bilinguis*. Tinción convencional, bandas C, NOR y DAPI. a) Tinción con Giemsa, el par aislado a la derecha revela el cromosoma que contiene el NOR; b) bandeo-C, las áreas más oscuras representan a la heterocromatina tinturada; c) Técnica de bandeo-DAPI, las áreas con un color azul claro más fluorescente representa regiones heterocromáticas ricas en A-T.

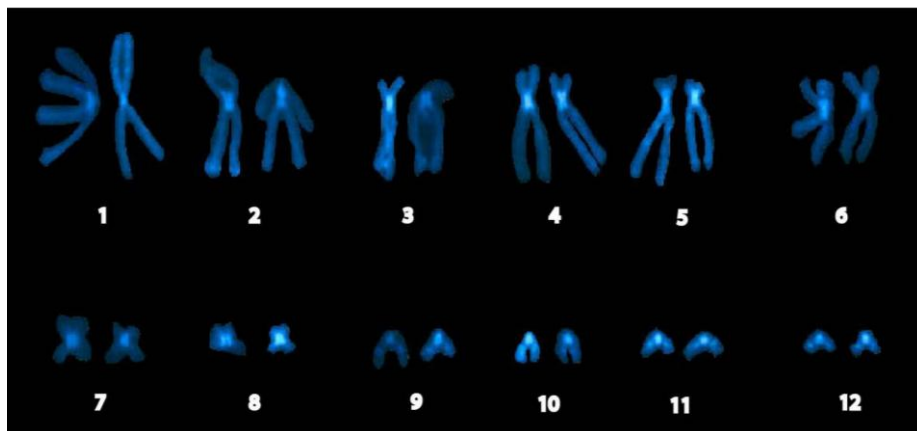
a)



b)

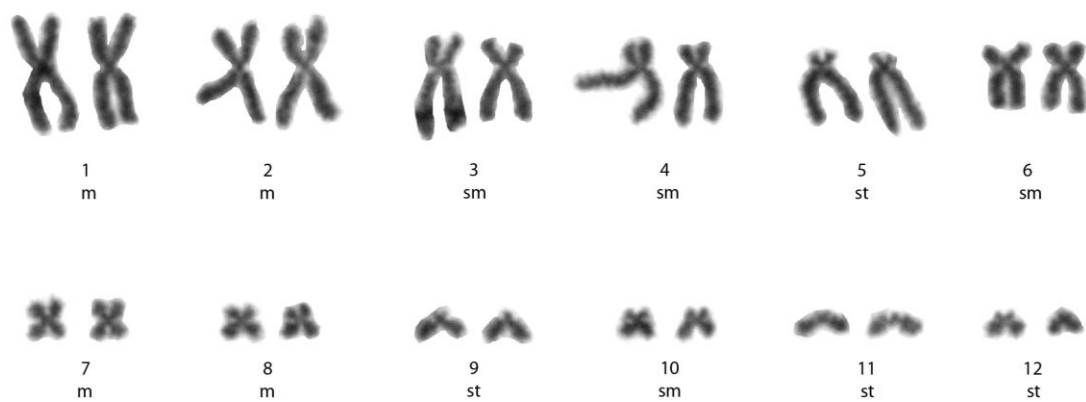


c)

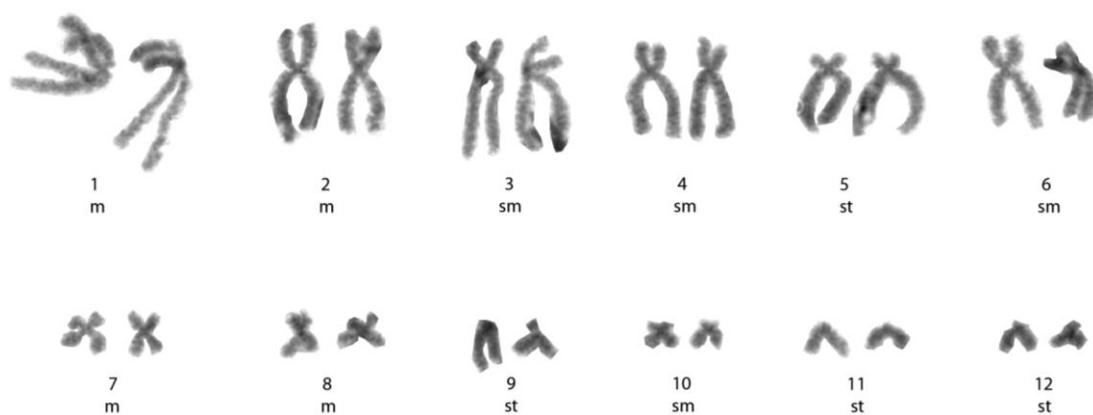


**Figura 4:** Cariotipos de *Ameerega hahneli*. Tinción convencional, bandas C, NOR y DAPI. a) Tinción con Giemsa, el par aislado a la derecha revela el cromosoma que contiene el NOR; b) bandeo-C, las áreas más oscuras representan a la heterocromatina tinturada; c) técnica de bandeo-DAPI, las áreas con un color azul claro más fluorescente representa regiones heterocromáticas ricas en A-T.

a)



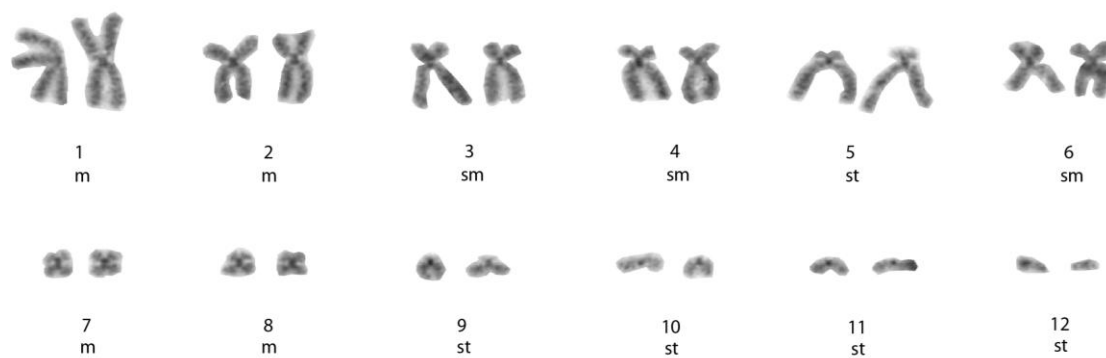
b)



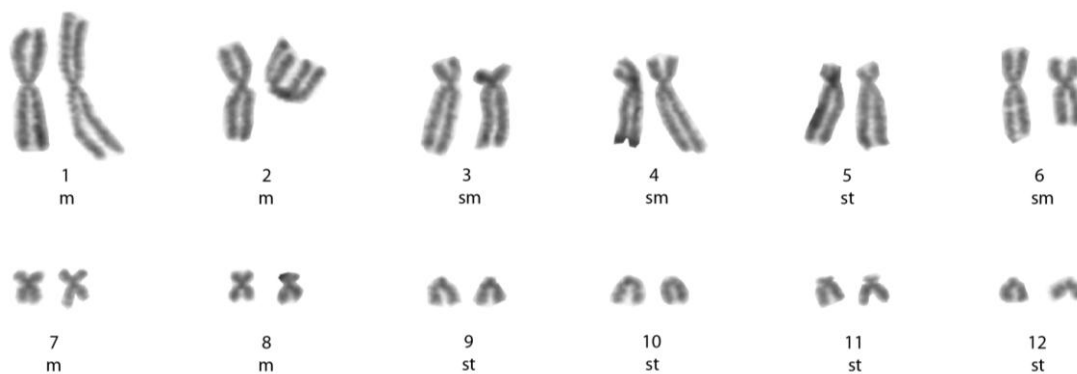
**Figura 5:** Cariotipos comparativos de individuos (a) hembra y (b) macho de *Ameerega bilineata*.

m = metacéntrico, sm = submetacéntrico y st = subtelocéntrico.

a)



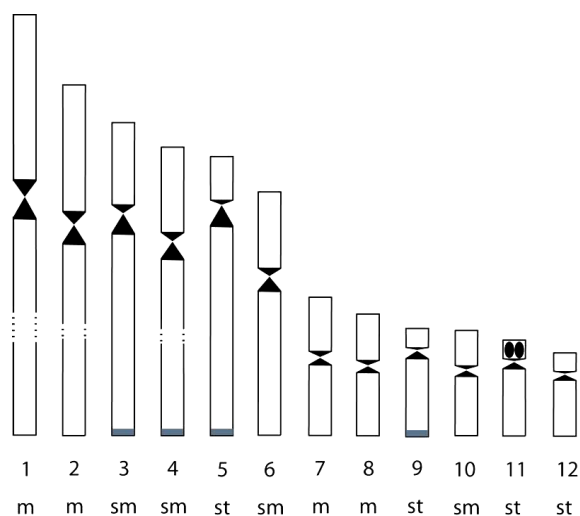
b)



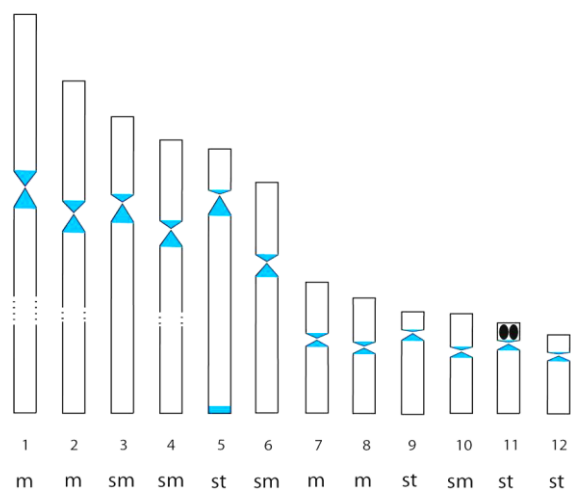
**Figura 6:** Cariotipos comparativos de individuos (a) hembra y (b) macho de *Ameerega hahneli*..

m = metacéntrico, sm = submetacéntrico y st = subtelocéntrico.

a)

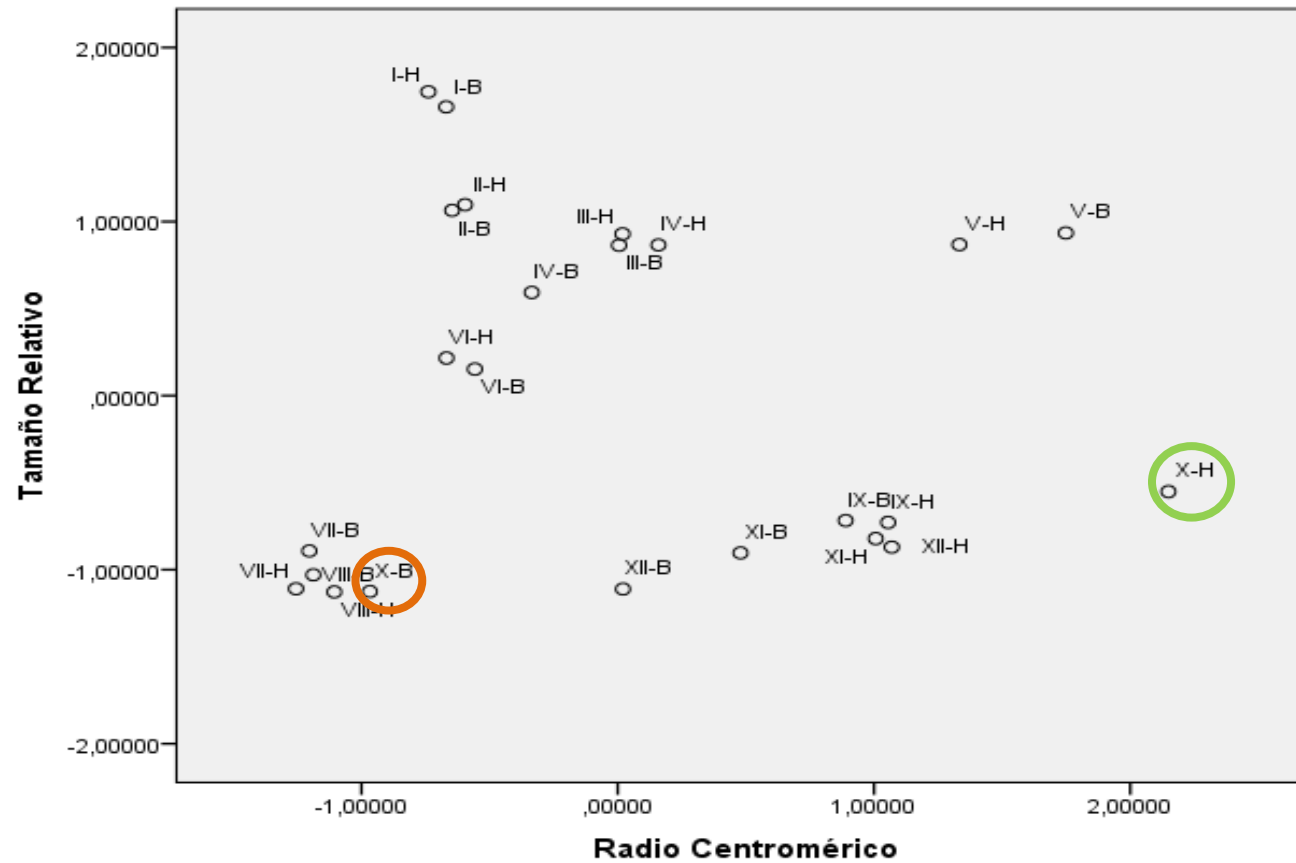


b)

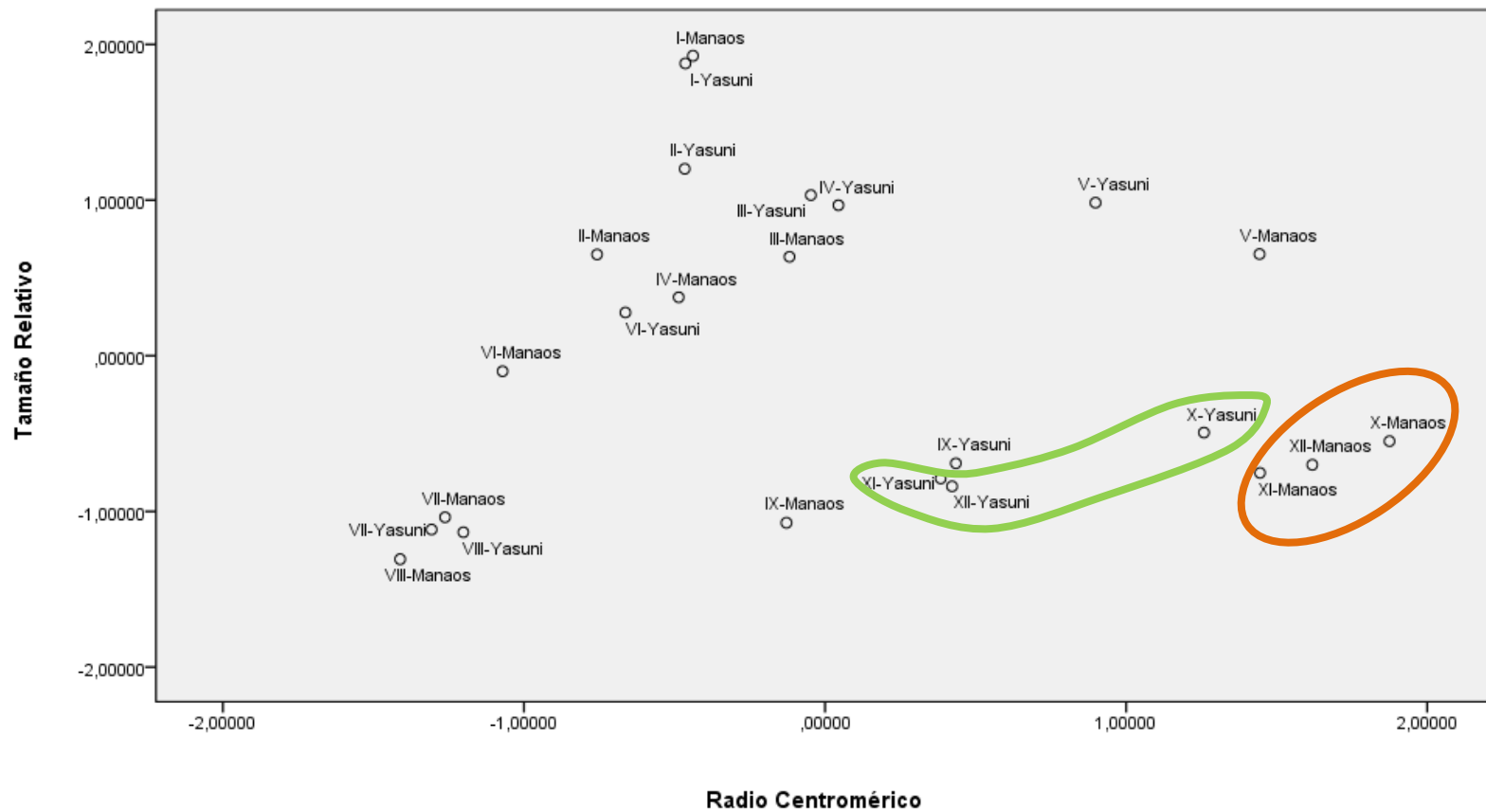


**Figura 7.** Ideograma representativo de los cromosomas mitóticos de *Ameerega bilineata*. Se detalla el número de cromosomas, constricciones secundarias, localización del NOR y el patrón de (a) bandas-C y (b) bandas-DAPI. Las áreas negras indican la heterocromatina fuertemente marcada para bandeado C, mientras que los sectores grises muestran regiones débilmente teñidas. Las áreas azul clara señalan heterocromatina fuertemente marcada en el bandeado DAPI. Los óvalos oscuros muestran la localización del NOR. Las líneas entrecortadas indican sitios de constricciones secundarias. m = metacéntrico, sm = submetacéntrico, st = subtelocéntrico.





**Figura 9:** Análisis de componentes principales (PCA) de la morfología cromosómica de *Ameerega bilineata* y *Ameerega hahneli*. El círculo anaranjado contiene la distribución del cromosoma 10 de *A. bilineata* que tiene una morfología submentacéntrica y el verde agrupa los cromosomas 10 de *A. hahneli* que son de forma subteloacéntrica. B = *Ameerega bilineata*, H = *Ameerega hahneli*. Cada par cromosómico está representado por su número romano respectivo.



**Figura 10:** Análisis de componentes principales (PCA) de la morfología cromosómica de *Ameerega hahneli* de las poblaciones de Manaos y Yasuní. La elipse anaranjada contiene a los cromosomas de *A. hahneli* – Manaos y tienen morfología telocéntrica y la figura verde agrupa los cromosomas *A. hahneli* – Yasuní que son de forma subtelocéntrica. Cada par cromosómico está representado por su número romano respectivo.

## **9. TABLAS**

**Tabla 1.** Datos de colección de los individuos analizados de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli*.

<b>Especie</b>	<b>Serie de Campo</b>	<b>QCAZ</b>	<b>Sexo</b>	<b>Mes /Año de Colección</b>
<i>Ameerega bilinguis</i>		45499	M	2009
	26535	55086	F	Agosto del 2011
	26536	55087	F	Agosto del 2011
	26537	55088	F	Agosto del 2011
	26538	55089	F	Agosto del 2011
	33896	55090	F	Julio del 2011
	33902	55091	F	Julio del 2011
	33903	55092	F	Julio del 2011
<i>Ameerega hahneli</i>	26545	55093	F	Agosto del 2011
	26549	55094	F	Agosto del 2011
	26550	55095	F	Agosto del 2011
	26552	55096	M	Agosto del 2011
	26554	55097	F	Agosto del 2011
	26867	55098	M	Agosto del 2011
	33912	55099	M	Julio del 2011

F= femenino  
M= masculino

**Tabla 2.** Datos morfométricos de los cromosomas de *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli* (clasificación centromérica de acuerdo a Green y Sessions, 1991).

Cromosomas												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Ameerega bilinguis</i> n= 8												
LR	19,24 $\sigma=0,12$	16,05 $\sigma=0,09$	14,27 $\sigma=0,09$	13,20 $\sigma=0,07$	12,73 $\sigma=0,08$	11,10 $\sigma=0,06$	6,25 $\sigma=0,04$	5,50 $\sigma=0,03$	4,88 $\sigma=0,03$	4,75 $\sigma=0,02$	4,34 $\sigma=0,02$	3,74 $\sigma=0,02$
RC	1,31 $\sigma=0,06$	1,51 $\sigma=0,15$	2,46 $\sigma=0,30$	2,07 $\sigma=0,17$	4,83 $\sigma=0,44$	1,89 $\sigma=0,17$	1,30 $\sigma=0,11$	1,36 $\sigma=0,09$	4,12 $\sigma=0,45$	1,69 $\sigma=0,07$	3,61 $\sigma=0,18$	3,04 $\sigma=0,34$
IC	0,43 $\sigma=0,01$	0,40 $\sigma=0,02$	0,29 $\sigma=0,03$	0,33 $\sigma=0,08$	0,17 $\sigma=0,07$	0,35 $\sigma=0,02$	0,43 $\sigma=0,02$	0,42 $\sigma=0,02$	0,20 $\sigma=0,09$	0,37 $\sigma=0,09$	0,22 $\sigma=0,01$	0,25 $\sigma=0,02$
MC	m	m	sm	sm	st	sm	m	m	st	sm	st	st
<i>Ameerega hahneli</i> n= 7												
LR	19,78 $\sigma=0,12$	16,17 $\sigma=0,17$	14,60 $\sigma=0,11$	14,11 $\sigma=0,11$	12,83 $\sigma=0,10$	11,56 $\sigma=0,09$	5,15 $\sigma=0,02$	4,89 $\sigma=0,02$	4,64 $\sigma=0,03$	4,38 $\sigma=0,04$	4,20 $\sigma=0,02$	3,87 $\sigma=0,02$
RC	1,19 $\sigma=0,04$	1,57 $\sigma=0,13$	2,46 $\sigma=0,45$	2,67 $\sigma=0,17$	4,28 $\sigma=0,30$	1,72 $\sigma=0,11$	1,29 $\sigma=0,04$	1,50 $\sigma=0,06$	4,35 $\sigma=0,57$	5,80 $\sigma=0,67$	4,31 $\sigma=0,69$	4,41 $\sigma=0,75$
IC	0,46 $\sigma=0,01$	0,39 $\sigma=0,02$	0,29 $\sigma=0,03$	0,27 $\sigma=0,02$	0,19 $\sigma=0,01$	0,37 $\sigma=0,01$	0,44 $\sigma=0,08$	0,40 $\sigma=0,11$	0,19 $\sigma=0,12$	0,15 $\sigma=0,02$	0,19 $\sigma=0,03$	0,18 $\sigma=0,02$
MC	m	m	sm	sm	st	sm	m	m	st	st	st	st

LR= longitud relativa  
 RC= radio centromérico  
 IC= índice centromérico  
 MC= morfología cromosómica

m= metacéntrico  
 sm= submetacéntrico  
 st= subtelocéntrico

n= número de individuos analizados  
 $\sigma$ = desviación estándar

**Tabla 3.** Valores obtenidos del Análisis de Variancia en Una-Vía realizado entre los cromosomas 10 de las especies *Ameerega bilinguis* y *Ameerega hahneli*.

	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>DF</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F</b>	<b>Significación</b>
<b>Entre Grupos</b>	31,914	1	31,914	21,977	0,001
<b>Dentro de los Grupos</b>	17,426	12	1,452		
<b>Total</b>	49,340	13			

**Tabla 4.** Valores obtenidos del Análisis de Variancia en Una-Vía realizado entre los cromosomas 10, 11 y 12 de *Ameerega hahneli* de las poblaciones de Yasuní y Manaos.

	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>DF</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F</b>	<b>Significación</b>
<b>Entre Grupos</b>	4,824	1	4,824	11,809	0,026
<b>Dentro de los Grupos</b>	1,634	4	0,409		
<b>Total</b>	6,458	5			

## **10.ANEXOS**

**Anexo 1.** Datos morfométricos de los cromosomas de *Ameerega hahneli* – Manaus, obtenidos de la publicación de Aguiar *et al.* (2002).

Cromosomas												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<i>Ameerega hahneli</i> – Manaus											
LR	20,0	13,7	12,6	11,8	10,2	10,2	5,5	4,3	3,5	3,1	2,7	2,7
RC	1,21	1,33	2,55	2,0	5,55	1,16	1,33	1,20	3,5	7,0	6,3	6,6
MC	M	m	sm	sm	st	m	m	m	st	t	t	t

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

LR= longitud relativa

RC= radio centromérico

IC= índice centromérico

MC= morfología cromosómica

m= metacéntrico

sm= submetacéntrico

st= subtelocéntrico

t= telocéntrico

**Anexo 2.** Protocolos para preparar las diferentes soluciones utilizadas para este estudio.

**1.1.** Ringer de Anfibios (Humason, Animal Tissue Techniques).

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

\* Diluido en un litro de agua destilada.

**1.2.** Solución Giemsa.

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

\* Proporción 1:20

**1.3.** Solución Salina Altamente Concentrada (2xSSC)

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

\* Disolver en 200ml de Agua destilada

**Anexo 3.** Fórmulas para determinación del índice centromérico (IC) y radio centromérico (RC).

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

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

Siendo,

IC= índice centromérico

RC= radio centromérico

p= longitud de brazo pequeño

q= longitud de brazo largo

**Anexo 4.** 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).

