

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

**Cromosomas politénicos de *Drosophila yangana* (grupo *repleta*, subgrupo *inca*,  
Díptera, Drosophilidae)**

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

KARINA A. BETANCOURT VELASCO

Quito, 2010

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

Yo, Ana Beatriz Mafla Mantilla, directora de la disertación, CERTIFICO que la Srta. Karina Alexandra Betancourt Velasco ha realizado la investigación sobre el tema: “Cromosomas politénicos de *Drosophila yangana* (grupo *repleta*, subgrupo *inca*, Díptera, Drosophilidae)” de acuerdo a las normas y técnicas establecidas. Una vez concluido y revisado el trabajo, conforme con las disposiciones reglamentarias, autorizo la presentación del informe respectivo

Ms. Ana Beatriz Mafla Mantilla

Directora de la disertación

Quito, 19 de noviembre del 2010

**A todas aquellas mujeres quienes  
en el transcurso de este largo caminar  
han empapado mi espíritu con su gran fortaleza,  
especialmente a mi madre**

## AGRADECIMIENTOS

Mis más profundos y sinceros agradecimientos para todas aquellas personas que de una u otra forma han compartido junto a mí instantes, horas, días, semanas, meses, años, siglos y/o milenios la alegría de estar vivos; para todos aquellos que han brindado un pedacito de su luz a mi ser y para aquellos que han caminado a mi lado en esta incansable lucha por conseguir mis sueños, pero sobretodo un inmenso agradecimiento desde el fondo de mi corazón a mis padres y a mi hermano por estar siempre.

A mi madre, le agradezco el incondicional e infinito amor que nos brinda día a día y ser la artífice de la culminación de mi carrera, sin su apoyo físico, económico, espiritual y mental no hubiese sido posible este sueño.

A mi hermano, gracias por el simple hecho de existir, por escucharme, por consolarme, por enseñarme y por estar ahí.

A mi padre, por quedarse, cuando los demás se han ido, apoyando todos mis sueños por más locos o ridículos que parezcan.

A mi Papá Enrique, por hacer de mí la persona que soy hoy, por su paciencia, por su sabiduría, por la felicidad, por dar rienda suelta a mi imaginación, por el inmenso amor con el que me crió y sobre todo por enseñarme a soñar, a creer y a abrir mis alas y volar.

A mis amigas Paty y Fura por ser el complemento perfecto en mi vida, creer conmigo que los sueños son posibles, por cumplirlos junto a mí, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por darme felicidad, por ayudarme a ser mejor persona, porque a pesar de todo aún siguen a mi lado, por todos los momentos que hemos vivido juntas y por todos los que nos quedan por vivir.

A mis primas, Gaby y Mabe por ser mis amigas y hermanas de vida por todos los días compartidos en la niñez, en la adolescencia y en la juventud, por las peleas y

reconciliaciones, por ser los momentos más lindos de mi niñez y porque lo siguen siendo en el presente.

A Paulita, mi gata, por ser la compañera más fiel en esas interminables noches de trabajos, informes y estudio.

A mis compañeros y amigos de carrera y de sueños, Kary, Verito, Mery, Gaby, Fer, Santa, Caro, Diego, Jean Piere, Michael y Natalia por hacer que esos largos días y noches de estudios fueran más fáciles y llevaderos cuando se compartía con buenos amigos y camaradería, en medio de risas y bohemia, por ser los instantes más divertidos de las agotadoras salidas de campo y por ser las mejores anécdotas y recuerdos de la universidad.

A la Mgr. Ana Beatriz Mafla, mi directora de tesis, por haber compartido conmigo sus conocimientos y apoyarme cada instante para culminar con éxito este proyecto y sobre todo por ser más que mi maestra mi amiga.

A la Doctora Violeta Rafael por compartir su valioso conocimiento de estas mosquitas conmigo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Luna, Diego y Stephy por todo el apoyo brindado para la finalización de mi trabajo.

A mis profesores y maestros de carrera quienes me enseñaron el sacrificado trabajo de un biólogo pero aún más por inculcarme este gran amor que hoy siento por la biología.

Y finalmente, a todas aquellas personas que he conocido en el transcurso de mi vida, a los que están, a los que no están, a los de siempre, a los de ahora, a todos.....

¡MUCHAS GRACIAS!

**TABLA DE CONTENIDOS**

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>V</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	<b>VII</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>X</b>
<b>TABLAS</b>	<b>XII</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>XIII</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>4.1. ÁREA DE ESTUDIO</b>	<b>14</b>
<b>4.2. MUESTREOS</b>	<b>15</b>
<b>4.3. IDENTIFICACIÓN</b>	<b>16</b>
<b>4.4. MANTENIMIENTO DE <i>Drosophila yangana</i>         EN EL LABORATORIO</b>	<b>17</b>
<b>4.5. PREPARACIONES CROMOSÓMICAS</b>	<b>18</b>
<b>4.5.1. LAVADO DE LARVAS</b>	<b>18</b>
<b>4.5.2. DISECCIÓN</b>	<b>19</b>
<b>4.5.3. TINCIÓN</b>	<b>19</b>
<b>4.5.4. APLASTADO SQUASH</b>	<b>20</b>
<b>4.6. FOTOGRAFÍA</b>	<b>20</b>
<b>4.7. MAPA CITOLÓGICO</b>	<b>21</b>
<b>4.7.1. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA CITOLÓGICO</b>	<b>22</b>
<b>4.7.1.1. EDICIÓN FOTOGRÁFICA</b>	<b>22</b>
<b>4.7.1.2. COMPARACIÓN</b>	<b>22</b>

4.7.2. NOMINACIÓN DE LA SECUENCIA CROMOSÓMICA	22
4.7.3. IDENTIFICACIÓN Y NOMINACIÓN DE LOS REARREGLOS CROMOSÓMICOS	23
4.7.4. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS	24
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
5.1. COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE	26
5.2. ESTADO ACTUAL DE LA ESPECIE	27
5.3. MANTENIMIENTO DE LA ESPECIE EN EL LABORATORIO	29
5.4. MUESTRA POBLACIONAL DE <i>Drosophila yangana</i>	31
5.5. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CROMOSOMAS POLITÉNICOS	35
5.6. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS	36
5.6.1. CROMOSOMA X	37
5.6.2. CROMOSOMA 2	42
5.6.3. CROMOSOMA 3	47
5.6.4. CROMOSOMA 4	51
5.6.5. CROMOSOMA 5	53
5.6.6. CROMOSOMA 6	56
5.7. COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE <i>Drosophila yangana</i> CON LA SECUENCIA DE <i>Drosophila huancavilcae</i>	56
5.8. SIGNIFICADO EVOLUTIVO	58
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>7. LITERATURA CITADA</b>	<b>63</b>
<b>8. FIGURAS</b>	<b>70</b>

**9. TABLAS****83****10. ANEXOS****89**

## 8. FIGURAS

1. Mapa de los sitios de colecta. **A.** Mapa del Ecuador. **B.** Ubicación de la localidad de Yangana (4° 21' 46" S, 79° 10' 32" O), **C.** Ubicación de la localidad de Suro (4° 20' 24" S, 79° 11' 30" O), **D.** Ubicación de la localidad de Quinara (4° 18' 56" S, 79° 13' 54" O), **E.** Ubicación de la localidad de Mandango (4° 16' 9" S, 79° 14' 32" O) en la provincia de Loja. 71
  
2. *Drosophila yangana*: **A.** Vista dorsal. **B.** Acercamiento del tórax donde se pueden observar los lunares que caracterizan al grupo *repleta*. **C.** Vista lateral. 72
  
3. Cromosomas con inversiones en estado heterocigoto: **A.** Dos cromosomas de un mismo individuo con 3 inversiones en el cromosoma X. **A1.** Cromosoma X con tres inversiones consecutivas que abarcan las regiones distal y parte de la central. **A2.** Probable cromosoma X con tres inversiones consecutivas que abarcan las regiones: distal, central y parte de la proximal (las torsiones del cromosoma impiden observar las tres inversiones de forma clara). **B.** Cromosoma 3 de un individuo con una inversión en la región proximal. **C.** Cromosoma 4 de un individuo con una inversión en la región proximal. **D.** Cromosoma 5 de un individuo con dos inversiones consecutivas en la región distal. 73
  
4. Dos aspectos del cromocentro "difuso" de *Drosophila yangana*. **A.** Se observan los seis brazos cromosómicos, el Cromocentro (**Cr.**) y el Nucleolo (**Nu.**). **B.** Se observan cinco de los seis brazos cromosómicos, el cromosoma X presenta tres inversiones en estado heterocigoto. 74
  
5. Cromosoma X: (D. h.) *Drosophila huancavilcae* (referente subgrupo *inca*), (D. y.) *Drosophila yangana*, (C) Cromocentro. 75
  
6. Inversión XI en el cromosoma X de *Drosophila yangana*. (D. y.), (P.I.) Sección C de la secuencia hipotética Primitiva I que corresponde a la secuencia original sin inversión. 76
  
7. Cromosoma 2: (D. h.) *Drosophila huancavilcae* (referente subgrupo *inca*), (D. y.) *Drosophila yangana*, (C) Cromocentro. 77
  
8. Cromosoma 3: (D. h.) *Drosophila huancavilcae* (referente subgrupo *inca*), (D. y.) *Drosophila yangana*, (C) Cromocentro. 78
  
9. Inversión 3l en el cromosoma 3 de *Drosophila yangana*. (D. y.), (P.I.) Parte de las secciones C y B de la secuencia hipotética Primitiva I que corresponde a la secuencia original sin inversión. 79
  
10. Cromosoma 4: (D. h.) *Drosophila huancavilcae* (referente subgrupo *inca*), (D. y.) *Drosophila yangana*, (C) Cromocentro 80
  
11. Cromosoma 5: (D. h.) *Drosophila huancavilcae* (referente subgrupo *inca*), (D. y.) *Drosophila yangana*, (C) Cromocentro. 81

12. Cromosoma 6: (D. h.) *Drosophila huancavilcae* (referente subgrupo *inca*), (D. y.) *Drosophila yangana*, (C) Cromocentro.

## 9. TABLAS

1. Registro de isolíneas fundadas de las diferentes localidades de la provincia de Loja en agosto del 2008. **84**
2. Número de isolíneas que presentaron huevos de 4 filamentos y números de individuos pertenecientes a las especies del sungrupo *inca* encontradas en las diferentes localidades de la provincia de Loja en agosto del 2008. **85**
3. Comparación de número de individuos de *Drosophila yangana* vs. Número de individuos de especies del grupo *repleta* en colectas realizadas en diferentes años en la provincia de Loja. **86**
4. Comparación de número de individuos de diferentes especies del grupo *repleta* vs. Número de individuos de otras especies en colectas realizadas en diferentes años en la provincia de Loja. **87**
5. Número de tubos de *Drosophila yangana* multiplicados y generaciones que sobrevivieron (colecta noviembre del 2008). **88**

## 10. ANEXOS

1. Comparación de algunos caracteres taxonómicos entre *Drosophila inca*, *Drosophila huancavilcae* y *Drosophila yangana* sp. Nov. (Rafael y Vela, 2003). **90**
2. Comparación morfológica de los falos, en vista frontal y lateral respectivamente, de las especies del subgrupo *inca*: **a y b)** *D. inca*, **c y d)** *D. huancavilcae*, **e y f)** *D. yangana* (Rafael y Vela, 2003). **91**
3. Secuencia estándar del grupo *repleta* (Wharton, 1942). **92**
4. Secuencia hipotética Primitiva I para el grupo *repleta* (Wasserman, 1960). **93**
5. Relaciones filogenéticas entre los linajes de especies del grupo *repleta*. **94**
6. Comparación de componentes de la aptitud entre *Drosophila huancavilcae*, *Drosophila yangana* y *Drosophila inca* (Mafla 2005a, 2008). **95**
7. Anatomía interna de una larva de *Drosophila* en su tercer estadio de Desarrollo. **96**
8. Parte de la lista de inversiones vacantes, del cromosoma X y cromosoma 3, disponible en Wasserman, 1992. **97**

## 1. RESUMEN

El presente trabajo es un reporte de lo hallado en el análisis de los cromosomas politénicos de *Drosophila yangana*. Se realizaron placas citológicas de las glándulas salivales de 40 larvas de tercer estadio. En esta muestra, cuatro individuos presentaron inversiones en estado heterocigoto: el primero mostró tres inversiones consecutivas en el cromosoma X, dos localizadas en la región distal, una de 10 bandas y otra de 16 bandas, la tercera de 13 bandas se encuentra en la región central; el segundo presentó una inversión de 22 bandas en la región proximal del cromosoma 3, el tercero exhibió una inversión de 28 bandas en la región proximal del cromosoma 4 y en el cuarto se encontró dos inversiones consecutivas en la región distal del cromosoma 5, de 10 y 6 bandas respectivamente.

Además se encontraron dos inversiones homocigotas: una localizada en la región central del cromosoma X de un individuo, nombrada como **XI**, de 11 bandas; inversión que se encuentra en la misma región de una de las tres inversiones en estado heterocigoto del individuo descrito anteriormente. La otra inversión fue hallada en la región central del cromosoma 3 de un individuo, nombrada como **3I**, de 15 bandas; inversión distinta a la del individuo con inversión en estado heterocigoto en el cromosoma 3 descrito anteriormente.

El cromosoma 2 de *D. yangana* no presentó la inversión  $2y^5$  que caracteriza a *Drosophila huancavilcae*, cuyo mapa citológico es el referente para el subgrupo *inca*; sin embargo, se encontró un segmento extra de 12 bandas en la sección E, subsección E1, que probablemente corresponda a una duplicación cromosómica y se encuentra ubicado en un punto considerado como caliente.

El alto número de individuos, seis en cuarenta (15%), portadores de ocho inversiones nos hace pensar que *D. yangana* presenta un alto grado de polimorfismo.

**Palabras claves:** Cromosomas politénicos, *Drosophila yangana*, inversiones en estado heterocigótico, inversiones XI y 3I, subgrupo *inca*.

## 2. ABSTRACT

The present study is a report of the analysis of polytene chromosomes of *Drosophila yangana*. Cytological plates were performed of salivary glands of 40 larvae in the third stage. In this sample, four individuals presented inversions in heterozygous state. The first individual showed three consecutive inversions in the X chromosome: two located in the distal region (one of 10 bands and other with 16 bands), and the third of 13 bands which is in the central region. The second individual presented an inversion of 22 bands in the proximal region in the chromosome 3. The third individual showed an inversion of 28 bands in the proximal region in the chromosome 4. The fourth individual presented two consecutive inversions in the distal region in the chromosome 5: 10 and 6 bands respectively. Additionally, two homozygous inversions were found: the first named as **XI**, was located in the central region of the X chromosome of an individual, and it was made of 11 bands. This inversion was located in the same region of one of the three heterozygous state inversions in the individual described above. The second inversion named as **3I** was found in the central region of the chromosome 3 of an individual. This inversion was of 15 bands, and it is different than the inversion in the individual with the heterozygous state on the chromosome 3 previously described. Chromosome 2 of *D. yangana* did not present the inversion  $2y^5$  which characterizes *Drosophila huancavilcae*. Whose cytology map is the reference for the *inca* subgroup. However, an extra segment of 12 bands was found in subsection E1 inside section E, this extra segment probably corresponds to a chromosomal duplication, and it is located at a point considered as hot.

The high number of individuals (six in forty) carriers of eight inversions, we think indicates that *D. yangana* has a high degree of polymorphism.

**Keywords:** *Drosophila yangana*, *inca* subgroup, inversions in the heterozygous state, inversions XI and 3I, polytene chromosomes.

### 3. INTRODUCCIÓN

El grupo *repleta* perteneciente al género *Drosophila* es uno de los grupos de especies más grande (Ranz *et al.*, 1997), pues reúne a casi 100 especies las cuales se encuentran distribuidas en seis subgrupos: *mulleri*, *hydei*, *mercatorum*, *repleta*, *fasciola* e *inca* (Morán y Fontdevila, 2005). Pertenece al subgénero *Drosophila* y comparte características comunes con otros 21 grupos de especies ubicadas en el mismo subgénero (huevos con 3 o 4 filamentos, receptáculos ventrales espirales, testículos espirales, y bandas abdominales dorsales discontinuas) (Wasserman, 1982a). Sin embargo, el grupo *repleta* presenta una característica particular que las diferencia notablemente del resto de especies que se encuentran en dicho subgénero, ya que cada cerda o pelo del tórax se origina de un punto negro como peca (Wasserman, 1992), dichas manchas presentes en el tórax de las especies miembros del grupo *repleta* pueden fusionarse formando bandas en algunas especies, a esto se le conoce como patrón de coloración del tórax (Wasserman, 1982a).

El grupo *repleta* es endémico de América (Diniz y Sene, 2004) su evolución explosiva ha ocurrido mediante la colonización de zonas áridas y semiáridas del Nuevo Mundo y la utilización de nuevos hábitats como las cactáceas, en donde se alimentan y reproducen. (Wasserman, 1982a, 1992; Morán y Fontdevila, 2005).

El grupo *repleta*, pertenece a una de las radiaciones más grandes ocurridas en el Nuevo Mundo (Tatarenkov, 2001): la radiación *virilis-repleta*. El linaje ancestral de la radiación *virilis-repleta* arribó al Nuevo Mundo hace 30 millones de años, proveniente de los bosques tropicales de Asia, las evidencias indican que lo más probable es que este ancestro llegó por primera vez a algún lugar de Norteamérica y posteriormente se expandió a Sudamérica ocurriendo una evolución independiente en los dos grupos (Norteamérica y Sudamérica) (Throckmorton, 1982). Sin embargo se desconoce si el ancestro del grupo se

diversificó en los bosques, y posteriormente se trasladó a hábitats áridos, o por el contrario se trasladó primero a los desiertos y fue aquí donde llegó a ser “*repleta*” (Throckmorton, 1982). Los grupos *aureata*, *cannalinea*, *castanea* y *dreyfusi* se encuentran dentro de la sección *repleta*, y son los parientes más cercanos al grupo *repleta*, son especies de bosque y al parecer miembros primitivos del grupo, estos junto con las especies pertenecientes a los grupos *melanica*, *peruviana*, *virilis*, *robusta* y *mesophragmatica* forman la rama de la radiación *virilis-repleta* (Wasserman, 1982a; Throckmorton, 1982).

En el Ecuador los estudios de diversidad del género *Drosophila* que se realizan desde 1988 son importantes, pues muestran que el grupo *repleta* posee un gran número de especies (Rafael y Arcos, 1989; Rafael y Vela, 2003).

Los muestreos realizados en la costa ecuatoriana permitieron descubrir una nueva especie para la ciencia, a la cual se la nombró *Drosophila huancavilcae* (Rafael y Arcos, 1989); la especie fue colectada en la localidad de Progreso, Provincia del Guayas en el año 1989. Los estudios taxonómicos basados en caracteres morfológicos diagnósticos como: edeago, el gonopodio, el índice del edeago, el número de vueltas de los testículos, el número de vueltas del receptáculo ventral, el índice de la espermateca, la longitud del cuerpo y de las pupas, así como el número de cromosomas,  $2n = 12$ , mostraron semejanzas con *Drosophila inca*, especie que hasta entonces estaba fuera de uno de los cinco grupos existentes para el grupo *repleta*; por ello en el año de 1989 se reunió a estas dos especies en el nuevo subgrupo *inca* (Rafael y Arcos, 1989).

La continuidad de los estudios de diversidad, permitió encontrar, en el año 2001, en la Provincia de Loja una nueva especie (Rafael y Vela, 2003); los análisis de morfología externa (Anexo 1) e interna (Anexo 2) permitieron ubicar a dicha especie dentro del grupo *repleta* pero más interesante resultó su semejanza con *D. inca* y *D. huancavilcae* por lo cual se la ubicó en el subgrupo *inca*. La nueva especie fue encontrada en la localidad de

Yangana, de ahí su nombre: *Drosophila yangana* (Rafael y Vela, 2003), de modo que el subgrupo *inca* quedó conformado por tres especies: *Drosophila inca*, *Drosophila huancavilcae* y *Drosophila yangana*.

El primer reporte de *Drosophila inca* en el país fue en Guayllabamba, esta especie es similar a la del Perú, sin embargo, presenta 2 diferencias marcadas, una a nivel de su morfología externa y otra en sus cromosomas mitóticos: 1) *D. inca* del Perú presenta cerdas escutelares anteriores paralelas o ligeramente convergentes, mientras que en la mayoría de individuos de *D. inca* de Guayllabamba se ha observado cerdas escutelares paralelas pero también hay individuos con cerdas escutelares ligeramente divergentes. 2) Las dos poblaciones tienen 6 pares de cromosomas pero la de Ecuador (Guayllabamba) presenta cromosomas puntiformes que no están presentes en la población del Perú (Rafael y Arcos, 1989)

Es importante destacar también que se realizaron análisis citológicos de dos poblaciones de *D. inca* del Ecuador (Guayllabamba y Loja) las cuales mostraron diferencias en el par cromosómico seis, tal es así que: en la población de Guayllabamba el cromosoma seis es puntiforme mientras que en la población de Loja, si bien es cierto que el cromosoma seis presenta un tamaño menor al resto de autosomas, este es submetacéntrico y por lo tanto más grande que los cromosomas puntiformes de *D. huancavilcae* y *D. yangana* que son telocéntricos, y tienen la mitad del tamaño del cromosoma seis de *D. inca*, que no aparece como puntiforme en el caso de la población de Loja (Mafla, 2005b, 2008).

En cuanto a la distribución geográfica de las especies del subgrupo *inca* podemos decir que *D. inca* y *D. huancavilcae* no han sido encontradas juntas, la primera especie ha sido colectada en las provincias de Imbabura, Pichincha, Chimborazo, El Oro y Loja mientras que la segunda ha sido encontrada en las provincias de Guayas y Manabí (Rafael

y Vela, 2003; Rafael y Arcos, 1989), a pesar de estas diferencias, las dos especies comparten semejanzas en el hábitat en el que se desenvuelven, el cual está estrechamente relacionado con especies cactófilas como: *Opuntia soederstromiana*, *O. ficus-indica*, *O. dilleni* y el género *Armatocereus* (Rafael y Arcos, 1989).

Por el contrario *D. yangana* y *D. inca* han sido encontradas en la misma localidad, Yangana, es decir conviven en simpatría (Rafael y Vela, 2003). *Drosophila yangana* ha sido colectada únicamente en una plantación de *Opuntia soederstromiana* que fue sembrada para la explotación de *Cochinilla* spp (Rafael y Vela, 2003), lo que hace presumir que la población presente en dicha plantación es marginal y además endémica de Yangana. Sin embargo, cabe aclarar que las localidades que se encuentran hacia el sur de Yangana no han sido muestreadas hasta la actualidad y por lo tanto la población central, de existir, no ha sido localizada aún.

Las especies cactófilas del grupo *repleta* han sido ampliamente estudiadas se cuenta con una gran información tanto a nivel morfológico, ecológico, geográfico y genético, que ha permitido establecer las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *repleta* así como entre estas y otros miembros del género *Drosophila* (Wasserman, 1982b). Sin embargo, las investigaciones citogenéticas basadas en cromosomas politénicos han sido más importantes para determinar las relaciones filogenéticas dentro de las especies del grupo *repleta* (Wasserman, 1982b).

Los cromosomas politénicos presentan ciertas características que les hacen muy útiles para estudios de evolución: 1) El tamaño de los cromosomas politénicos es mucho mayor que el de los cromosomas corrientes, ya que debido al proceso de endoreduplicación, que ocurre en las glándulas salivales, se originan filamentos gigantes 100 veces más largos y 10 veces más anchos que los cromosomas mitóticos de otros tejidos (Lacadena, 1996). 2) La constancia del patrón de bandas e interbandas es una de las

particularidades más importante de los cromosomas politénicos, ya que estas son únicas de cada cromosoma y pueden ser mapeadas con facilidad (Koltzoff, 1934; Berkaloff *et al.*, 1984), además permiten detectar inversiones, ya sea por un cambio en el patrón de bandas o por la aparición de bucles en los heterocigotos (Cáceres, 2000). 3) Así mismo, la presencia de desenrollamientos de cromatina, llamados puffs, sirven como marcadores cromosómicos y ayudan a la identificación de los cromosomas politénicos (Lacadena, 1996). 4) La heterogeneidad de tinción del cromosoma de *Drosophila*, que permite distinguir la eucromatina de la heterocromatina. La eucromatina está localizada en las bandas (Zhang y Spradling, 1994) y está formada por el 80% de ADN de secuencia única y el 20% de secuencia moderadamente repetitiva especialmente por elementos transponibles (González, 2002). La heterocromatina puede ser de dos tipos: a) La  $\alpha$ -heterocromatina, que tiene pocos genes y está constituida por ADN satelital (secuencias cortas altamente repetitivas) que nunca se transcribe; esta heterocromatina no politeniza en el proceso de endoreduplicación, está presente en la región proximal al centrómero del cromosoma X y en la totalidad del cromosoma Y, en las regiones pericentroméricas de los autosomas, en los telómeros y en el cromocentro (Zhang y Spradling, 1994; Berghella y Dimitri 1996; González, 2002) y b) La  $\beta$ -heterocromatina que se condensa únicamente en ciertos tipos celulares o en momentos especiales del desarrollo, es decir es reversible. Forma parte de la región próxima al cromocentro, con las técnicas de bandeo se tiñe débilmente; es difusa y politeniza durante la endoduplicación. (Zhang y Spradling, 1994; Berghella y Dimitri 1996) y 5) Los telómeros de los cromosomas politénicos presentan configuraciones particulares que permiten la identificación de cada elemento cromosómico, además son complejos funcionales especializados que protegen a las terminaciones cromosómicas de fusiones con otros cromosomas (capping) (Blackburn, 2001) e impiden la pérdida de material genético (Biermann, 2009).

En cuanto a los cromosomas politénicos del grupo *repleta*, se puede observar que el cromosoma 2 es el más grande y variable, ya que 211 de las 299 inversiones paracéntricas registradas en el grupo, están presentes en dicho cromosoma (Romero, 2008), este presenta el 23% de la eucromatina y el 70% de las inversiones (Wasserman, 1982b), por lo tanto es el cromosoma filogenéticamente más informativo (Ruiz *et al.*, 1997), en contraste los cromosomas X, 3, 4 y 5 juntos tienen el 77% de eucromatina y alrededor del 30% de las inversiones (Wasserman, 1982b).

Los autosomas de las especies del grupo *repleta* tienen una longitud aproximadamente igual, pero el cromosoma 4 tiene un tamaño menor comparado con el resto de los cromosomas, además este cromosoma y el cinco tienen secuencias conservadas en todas las especies del grupo (Zorus, 1982).

Así mismo, los estudios de comparación interespecífica de cariotipos metafásicos y el avance de los estudios genéticos también han aportado nuevos conocimientos del género *Drosophila*, mostrando que la integridad de los brazos de los cromosomas es altamente preservada en este género (Ranz *et al.*, 1997a), y el grupo *repleta* no es la excepción.

Casi todas las especies miembros del grupo *repleta* presentan un cariotipo similar al ancestral del género, el cual consiste de cinco cromosomas telocéntricos y un par puntiforme (Ranz *et al.*, 1997b). Además, en el grupo, no se ha observado rearrreglos cromosómicos a nivel de eucromatina (deleciones o duplicaciones) y los cromosomas heteromórficos también han permanecido constantes ya que los rearrreglos en los mismos son muy raros (Wasserman, 1982b). Las translocaciones son escasas en el género *Drosophila*, se han contabilizado 3 a nivel de género (González, 2002), y en el grupo *repleta* no han sido reportadas (Wasserman, 1982b). Las fusiones céntricas también se han presentado en un número bajo en el género *Drosophila*, aunque son un poco más comunes que los rearrreglos antes mencionados no alcanzan un alto porcentaje, se han reportado 58

(González, 2002) y en el grupo *repleta* únicamente 4 fusiones céntricas han sobrevivido (la fusión 2-3F en la población ancestral del subgrupo *mercatorum*, la fusión 3-4F en el complejo *meridiana* del subgrupo *mulleri* y las fusiones 2-4F y 3-5F en el ancestro de *D. fascioloides* del subgrupo *fasciola*) (Wasserman, 1982b). Las inversiones cromosómicas de tipo pericéntricas tampoco han sido registradas en un alto número en el género, únicamente 32 inversiones han sido encontradas, y en el grupo *repleta* ninguna (González, 2002); los únicos rearrreglos cromosómicos importantes en el género *Drosophila* y en el grupo *repleta* son las inversiones paracéntricas que han sido registradas en alto número, 299 en el grupo *repleta* (Romero, 2008) de las 22 000 a 50 000 presentes en el género *Drosophila* (González, 2002).

La gran cantidad de inversiones paracéntricas y fusiones céntricas presentes en el género *Drosophila* es una muestra de que el contenido de los diferentes elementos cromosómicos está conservado (González, 2002). Las inversiones presentes en el género *Drosophila* podrían estar expuestas a una gran presión selectiva, por lo que la selección natural explicaría la presencia de las mismas en el género, ya que este factor puede operar bajo un gran período de tiempo (Wasserman, 1992).

Por su parte las especies del grupo *repleta* constituyen un grupo muy prometedor para el estudio de los mecanismos de especiación debido a que estas especies presentan diversos grados de aislamiento reproductivo (Ranz *et al.*, 1997a; Tatarenkov, 2000). Además, el estudio de las inversiones paracéntricas ha permitido conocer su historia y filogenia (Wasserman, 1982b, 1992). Dichas inversiones tienen un origen único (todas las copias de una determinada reordenación cromosómica, provienen de un único evento de inversión, González, 2002), por ello para determinar las relaciones filogenéticas entre las especies se usa el criterio de “Asunción Básica” el cual dice que si dos poblaciones o especies tienen la misma inversión, están más cercanamente emparentadas entre sí, que con

otras poblaciones o especies que no posean dicha inversión, se entiende que la aparición de una inversión en la naturaleza es un evento raro y la probabilidad de que dos eventos raros impliquen el mismo fragmento, con los mismos puntos de rotura y se fijen en dos poblaciones o especies distintas es muy bajo, por esto las inversiones paracéntricas son consideradas determinantes fiables en la determinación de parentesco (Wasserman, 1982b, 1992; González, 2002). Pero, a pesar de que los cromosomas politénicos presenten un completo registro de mutaciones exitosas mantenidas durante el proceso de divergencia de las especies (Requema *et al.*, 1987; Ruiz *et al.*, 1997), las inversiones paracéntricas sólo nos permiten deducir las relaciones entre especies, sin precisar la dirección de la evolución, es decir no podemos saber con certeza qué secuencia es primitiva y cual derivada (Durando, 2000; Wasserman, 1982b).

La filogenia de las especies del grupo *repleta* se ha construido en base a la comparación de todo orden de bandas encontrado en cada especie del grupo con una secuencia considerada como estándar (Anexo 3), construida por Wharton en 1942. Esta secuencia génica pertenece a una especie cosmopolita que no varía citológicamente, *Drosophila repleta* (Wasserman, 1982b). Las nuevas inversiones paracéntricas que se encontraron fueron nombradas especificando, por un lado, el brazo del cromosoma en el cual se encuentran (X, 2, 3, 4 ó 5) y por otro, una letra para nominar a cada inversión (a, b, c, etc.), esta nomenclatura indica el orden en el que fueron encontradas las mutaciones. Debido al alto número de inversiones encontradas que superan de largo la cantidad de letras en el alfabeto (excluyendo las letras ch, ñ, ll) se hizo indispensable el uso de superíndices para nombrar a las nuevas inversiones (2a, 2a<sup>2</sup>, 2a<sup>3</sup>, etc.). De esta manera cada especie recibió una fórmula citológica que indica los cambios que se han dado y han permanecido a lo largo de la historia de cada una de las especies (Wasserman 1982b).

En 1960, Wasserman, basándose en investigaciones citológicas, propuso una secuencia hipotética que difiere de la secuencia estándar de *D. repleta* por seis inversiones: tres en el cromosoma X: (Xa, Xb, Xc); dos en el cromosoma 2: (2a y 2b) y una en el cromosoma 3: (3b); esta sería la secuencia ancestral para el grupo *repleta* a la que se le llamó Primitiva I (Anexo 4), lo más importante es que esta secuencia ancestral vincula al grupo *repleta* con los miembros de los grupos *castanea*, *cannalina*, *dreyfusi* y *aureata* formando la unidad filogenética conocida como sección *repleta* (Wasserman, 1960) (Anexo 5).

En cuanto a las relaciones de parentesco entre los miembros del subgrupo *inca* algunos estudios se han realizado. Mafla (2005, 2008) comparó algunos parámetros de aptitud darwiniana (fertilidad, velocidad de desarrollo, viabilidad y madurez de los adultos) y ciclos de vida o velocidad de desarrollo entre las tres especies del subgrupo *inca* mostrando la poca diferencia que existe entre las especies, como se evidencia en su ciclo de vida: *D. huancavilcae*: 23,4 días, *D. inca*: 22,3 días y *D. yangana*: 21,6 días (Anexo 6).

Los estudios citológicos realizados en cromosomas mitóticos han evidenciado la presencia de 12 cromosomas en estas tres especies, cinco pares de cromosomas en forma de barra y un par puntiforme, que corresponde al cariotipo ancestral (Mafla, 2005b). *D. inca*, *D. huancavilcae* y *D. yangana* comparten ciertas características particulares en los cromosomas mitóticos: 1) Las tres especies presentan heteropicnósis en el autosoma 6, pero este cromosoma en *D. yangana* tiene la mitad del tamaño del cromosoma 6 de *D.inca*. El cromosoma 6 de *D.inca* es submetacéntrico, mientras que el de *D. yangana* y *D. huancavilcae* es telocéntrico, esta característica morfológica ha hecho que se considere a *D.huancavilcae* como una forma primitiva del género 2) El cromosoma Y es heteropicnótico en las tres especies, en *D. inca* y *D. yangana* es submetacéntrico mientras que en *D. huancavilcae* es subteloecéntrico, por otro lado en *D. yangana* y *D. huancavilcae*

se ha encontrado una constricción secundaria en el brazo largo del cromosoma Y. 3) En *D. yangana* y en *D. inca* se han encontrado cromosomas supernumerarios que son considerados raros en el género *Drosophila* (Mafla, 2005b, Mafla, 2008).

Pero así mismo existen algunas diferencias en los miembros del subgrupo *inca*, una de las más relevantes es la concentración de heterocromatina en los brazos cortos de los cromosomas (Mafla, 2005b, Mafla, 2008), dichos rearrreglos de heterocromatina son fáciles de detectar en los cariotipos metafásicos de las especies (Yoon y Richardson, 2006). La heterocromatina no solamente causa cambios a nivel estructural de los cromosomas sino también en la regulación génica, es por esto que la heterocromatina tiene especial interés en evolución (Yoon y Richardson, 2006).

La proporción de heterocromatina presente en las especies del subgrupo *inca* en orden ascendente va desde *D. huancavilcae*, luego *D. yangana* y finalmente *D. inca*. Se ha observado que la concentración de heterocromatina está relacionada con la aptitud biológica de las especies (Mafla, 2005b) y además dicha acumulación ocurre únicamente en especies filogenéticamente derivadas (Yoon y Richardson, 2006), por lo que se podría sospechar que *D. huancavilcae* es la forma más primitiva y estaría más emparentada con *D. yangana*, mientras que *D. inca* sería una especie derivada (Mafla, 2008).

Así mismo el estudio realizado por Romero (2008) que se enfocó en los cromosomas politénicos de *D. huancavilcae* arrojó interesantes resultados; por un lado se encontró una nueva inversión, a la cual se la nombró  $2y^5$ , y se ubica en la región central del cromosoma 2. Dicha inversión caracteriza a la especie y sirve como referente para el subgrupo *inca* (Romero, 2008) y por otro lado este estudio dio una pista de la posible posición filética del subgrupo *inca*, el cual formaría una cuarta línea filética dentro del grupo *repleta*, es decir tendría una conexión directa con la Primitiva I (Anexo, 5) (Romero, 2008).

Para probar esta hipótesis, es de gran interés analizar los cromosomas politénicos de los otros dos miembros del subgrupo *inca* (*D. inca* y *D. yangana*). Es por esto que la presente investigación tiene como objetivo construir el mapa citológico de los cromosomas politénicos de *Drosophila yangana*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. ÁREA DE ESTUDIO

Yangana es una parroquia rural del cantón Loja ubicada al sureste de la provincia del mismo nombre (Figura 1) , se encuentra ubicada en el límite occidental del Parque Nacional Podocarpus (Rafael y Vela, 2003) a una latitud de: 4° 21' 46" S y longitud de: 79° 10' 32" W; presenta una orografía con un relieve irregular, el principal accidente orográfico está representado por las cordilleras Oriental de los Andes, de Paredones y de Sabanilla (Aguirre, 2003). Tiene una temperatura promedio anual de 19°C, con una mínima de 17.2°C y una máxima de 20.9°C (INAMHI, desde el año 2000 al 2009). La humedad relativa promedio es de 89.60% (INAMHI, desde el año 2000 al 2009). Los meses con mayor humedad atmosférica van de diciembre a mayo, siendo los meses de enero, febrero, y marzo los que registran las cifras más altas (91.80%) mientras que de junio a noviembre son meses de menor humedad relativa (88.60%) siendo junio el mes con cifras más bajas (87.20%). Las precipitaciones anuales promedio se registran en 974.45 mm. (INAMHI, desde el año 2000 al 2009). Los meses de diciembre a mayo registran las precipitaciones más altas (1412.87 mm), y los meses de junio a noviembre las más bajas (536.03 mm). Estos factores climáticos han permitido el desarrollo de una gran diversidad biológica, y así mismo brindan condiciones propicias para el desarrollo de la vida humana, lo cual ha conducido a cambiar la mayor parte de la vegetación original por cultivos de maíz, trigo, cebada, fréjol, papas, yuca, banano, café, cítricos y hortalizas; además gran extensión de suelo ha sido usada para pastizales y cultivos forestales, especialmente: eucalipto, pino y ciprés (Cañadas, 1983; Sierra, 1999); pero todavía se puede encontrar remanentes de vegetación natural arbustivo seco, típica de la zona de vida de Matorral Seco Montano de la región interandina (Sierra, 1999, Cañadas, 1983). En la zona destacan: cholán *Tecoma stans*, *Eugenia* sp, faique *Acacia macrantha*, algarrobo *Prosopis juliflora*, porotón

*Erythrina edulis*, higuerilla *Ricinus comunis*, chinchin *Cassia tormentosa*, espino de chivo *Barnadesia arborea*, tuna *Opuntia ficus-indica*, sigse *Cortaderia nitida*, carrizo *Arundo donax*, zuro *Chusquea scandens*, retama olorosa *Spartium junceum*, arabisco *Jacaranda angustifolia*, molle *Schinus molle*, sauce llorón *Salix humboldtiana*, mataperro *Solanum marginatum*, cashco *Weinmania crenata* y cabuyo negro *Agave americana* (Sierra, 1999, Jorgense, 1999).

No obstante es importante aclarar que el único lugar donde fue encontrada y colectada *D. yangana* corresponde a una huerta familiar ubicada en la localidad de Yangana, donde predominan cultivos de hortalizas y cítricos en medio de los cuales permanecen como remanentes algunos cactus del género *Opuntia*.

#### 4.2. MUESTREOS

Para esta investigación se utilizó la especie *D. yangana* (Figura 2). Para la obtención de dicha especie se realizaron dos salidas de campo a la Provincia de Loja: La primera en el mes de agosto del año 2008 y la segunda en noviembre del mismo año.

En la primera colecta (agosto 2008) se escogieron 4 localidades: 1) Yangana, 2) El Suro, 3) Quinara y 4) Mandango (Figura 1)

Se prepararon 100 trampas con medio de banano y levadura y se distribuyeron en las 4 localidades: 50 trampas se colocaron en la localidad de Yangana y las 50 trampas restantes se distribuyeron entre las localidades de El Suro, Quinara y Mandango.

Las trampas permanecieron en los sitios de colecta toda la semana y se realizaron colectas dos veces al día, a las 6 am y a las 4 ó 5 pm apenas el sol empezaba a ocultarse. Para evitar la desecación del banano colocado en las trampas se llevaba un balde con preparado de banano-levadura para sustituir a aquellos que ya no se encontraban frescos. El último día de colecta se retiraron todas las trampas de las cuatro localidades.

La segunda colecta que fue realizada en el mes de noviembre del 2008, fue dirigida solo a la localidad de Yangana, esto debido a antecedentes que indicaron que en este sitio se había encontrado la especie de nuestro interés, *D. yangana* (Rafael, 2003). Se colocaron 100 trampas de banano-levadura en la localidad de Yangana. Se realizaron las colectas durante tres días. El primer día se colocaron las trampas en la localidad de Yangana. El segundo día se colectó el material biológico a las 6 am y a las 6 pm y el tercer día después de colectar el material en la mañana (6am), se retiraron las trampas del sitio de colecta.

El material colectado en las dos salidas de campo fue identificado, clasificado y analizado en el laboratorio de Genética de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

#### 4.3. IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de los individuos que se colectaron en la primera salida (agosto, 2008) se agrupó a los individuos según su morfología externa, observando sus semejanzas superficiales como color del cuerpo, manchas en el tórax, tamaño, etc. Una vez establecidos los grupos se diferenció entre machos y hembras, a su vez las hembras se clasificaron en: grávidas y no grávidas y cada hembra grávida se colocó en un tubo de ensayo para la fundación de isolíneas, las hembras no grávidas se colocaron en diferentes tubos junto a dos o tres machos para multiplicar las cepas.

Una vez establecidas las isolíneas se procedió de la siguiente manera: se utilizó el criterio de número de filamentos en los huevos para discernir entre especies del grupo *repleta* (4 filamentos en los huevos) y especies de otros grupos como *melanogaster* (dos filamentos en los huevos), esta observación se realizó en la primera oviposición de las hembras que fundaron las isolíneas colocando directamente el tubo de ensayo en un estereomicroscopio NIKON.

Las isolíneas en las cuales se encontraron huevos con 4 filamentos se conservaron y se realizaron análisis morfológicos del aparato genital interno de los machos F1, de estas isolíneas, para comprobar o descartar la presencia de *Drosophila yangana* o *Drosophila inca*.

Para la identificación de los individuos que se colectaron en la salida de noviembre del 2008 se establecieron nuevos parámetros para clasificar el material. Se usó la presencia de manchas a manera de lunares en el tórax como criterio para reconocer a las especies miembros del grupo *repleta*.

Los individuos que calzaban dentro de esta categoría se agruparon según sus semejanzas morfológicas externas; dentro de cada grupo se clasificaron en machos y hembras los cuales se colocaron por separado en tubos con medio de gelatina-tuna, de tal manera que se tenía tubos de machos separados según su morfología externa y tubos de hembras separadas de la misma manera. Se usaron a los machos para realizar un análisis del aparato genital interno e identificarlos.

Con los individuos que se identificaron como *D. yangana* se fundaron isolíneas con hembras grávidas y aquellas hembras no grávidas fueron reunidas con machos para que se crucen y no perder el poco material biológico (99 individuos) con que se contaba.

#### **4.4. MANTENIMIENTO DE *Drosophila yangana* EN EL LABORATORIO**

*Drosophila yangana* es una especie muy sensible y requiere de muchos cuidados, se la mantiene en el laboratorio en tubos de ensayo con medio de cultivo gelatina-tuna y adicionalmente cada dos días se colocaba pedazos de tuna fresca para tener mayor éxito (Rafael y Vela, 2003). El cambio de papel y tuna se lo realizaba al menos dos veces por semana para evitar la contaminación por hongos.

Todos los materiales (pinzas, agujas de disección, tunas) que se utilizaron para el mantenimiento de la cepa se desinfectaron con alcohol y/o sablón.

#### **4.5. PREPARACIONES CROMOSÓMICAS**

Para las preparaciones cromosómicas se utilizaron glándulas salivales de larvas de tercer estadio, (Anexo 7), se las diferencia de las de otros estadios larvales porque empiezan a migrar a superficies relativamente más secas, dejan de alimentarse y la cutícula se hace menos transparente impidiendo diferenciar los órganos larvales, su aparato bucal presenta de 9 a 12 ganchos o placas quitinosas (Shorrock, 1972a).

Se siguió la metodología recomendada en el trabajo de Morán (2001) para la preparación de los cromosomas politénicos por aplastado o “SQUASH”, la cual se describe a continuación:

##### **4.5.1. LAVADO DE LARVAS**

Para la extracción de las larvas del tubo con medio de cultivo se utiliza una espátula o una aguja de disección, se transfiere a las larvas a un porta objetos excavado que contenga agua destilada, una vez que se encuentran en el porta objetos se sujeta a la larva con una pinza y con movimientos suaves se agita a la larva hasta retirar todo el material adherido, este procedimiento se puede repetir tres o cuatro veces cambiando cada vez el agua destilada del portaobjetos

Las larvas también pueden ser transferidas de un porta objetos excavado, con agua destilada, a otro; se debe realizar movimientos suaves en cada transferencia y sujetar las larvas cuidadosamente con una pinza.

#### 4.5.2. DISECCIÓN

Se coloca a la larva en un portaobjetos excavado con una gota de ácido acético al 50% o Ringer. Con una pinza entomológica N°5 se sostiene a la larva por la mitad del cuerpo y con una aguja de disección se pincha en el medio de las mandíbulas, luego se tira firmemente el cuerpo de la larva con la pinza entomológica hasta que los órganos de la cabeza se liberen.

Al identificar las glándulas salivales se procede a limpiarlas, para esto se utiliza dos agujas de disección y se retira los cuerpos grasos que cubren a las glándulas. Posteriormente se coloca una gota de HCl 1 N para fijar los tejidos.

#### 4.5.3. TINCIÓN

Las glándulas salivales son transferidas a un nuevo porta objetos plano con tres gotas de orceína acética al 3% (orceína BDH 3% diluida en ácido acético al 70%), durante un mínimo de 30 minutos.

Cuando la orceína ha saturado la capacidad de absorción de los cromosomas, se coloca una gota de aceto carmín al 2% y se deja actuar al colorante durante 10 minutos. El aceto carmín lava el exceso de orceína, tiñe bandas más finas y da mayor definición a las interbandas.

Debido a que las glándulas salivales de *D. yangana* son muy frágiles, el lavado de los tintes se realizó únicamente colocando una gota de ácido acético al 50%, en la misma placa donde fueron teñidas las glándulas, e inmediatamente se procedió a realizar el aplastado de las mismas.

#### **4.5.4. APLASTADO/ SQUASH**

Una vez que se añadido el ácido acético, se deja caer el cubre objetos sobre la placa donde se encuentran las glándulas salivales, evitando la formación de burbujas.

Se coloca la placa en medio de papel absorbente y se la cubre hasta la mitad de la misma, para lograr una mejor extensión de los cromosomas politénicos se realizan tres pasos esenciales: 1) Con la punta de una pinza de relojero se presiona el sitio donde se encuentran las glándulas salivales, este primer paso ayuda a romper los núcleos permitiendo la salida de los cromosomas politénicos 2) Con la yema del pulgar se presiona firmemente el cubreobjetos teniendo la precaución de sostener la placa para evitar su deslizamiento y 3) Utilizando la base de un esferográfico se realiza movimientos oscilatorios sobre la placa para lograr una extensión exitosa de los brazos cromosómicos.

Es conveniente realizar varios ensayos del procedimiento de aplastado para obtener placas con cromosomas bien extendidos y evitar que estos se rompan. Si es necesario, para evitar la evaporación del fluido debajo del cubre objetos, se coloca unas gotas de ácido acético al 50% alrededor de la placa (Shorrock, 1972b).

Una vez que se han obtenido placas con una buena muestra de cromosomas, se las sella con esmalte transparente de uñas. Estas placas se refrigeran a una temperatura de 4°C por un máximo de 5 días.

#### **4.6. FOTOGRAFÍA**

Para las fotografías de los cromosomas politénicos se utilizó una cámara fotográfica digital marca CANON Power Shot A640 y un fotomicroscopio de contraste de fases marca CARL ZEISS (modelo 62724).

Para tener una perspectiva amplia de la disposición de los brazos cromosómicos en el núcleo se tomaron fotografías en dos aumentos: 10x y 40x en el objetivo y 10x en el ocular para ambos casos, estas fotografías sirven como guía para la identificación y

secuenciación de bandas. Para obtener segmentos cromosómicos bien definidos se tomaron fotografías con aumento de 100x en el objetivo y 10x en el ocular, con estas fotos se construyó el mapa cromosómico de *Drosophila yangana*.

Todas las fotografías tomadas son digitales y se archivan en la computadora mediante el programa ZOOM BROWSER (V. 5.7). Este programa permite la utilización de filtros digitales que ayudan a dar más contraste a las bandas e interbandas de los cromosomas politénicos. Posteriormente las fotografías se editaron y analizaron en el programa Adobe Photo Shop.

La selección de los segmentos cromosómicos para el ensamblaje del mapa cromosómico se hizo de la siguiente manera: 1) Es importante encontrar segmentos cromosómicos grandes y bien estirados (sin torsiones), es por esto que se observa detenidamente cada cromosoma y cada núcleo fotografiado hasta encontrar el segmento adecuado. 2) Cuando se encuentra segmentos en los cuales se visualiza una torsión o el segmento cromosómico no está muy definido ni claro se busca el mismo segmento en otro cromosoma para reemplazar el segmento distorsionado.

Es decir que el mapa cromosómico de *D. yangana* no proviene de un solo individuo sino que constituye la reunión de varios segmentos de diferentes núcleos de diferentes individuos, escogidos para lograr la mejor representación cromosómica de la especie.

#### **4.7. MAPA CITOLÓGICO**

El análisis cromosómico de *Drosophila yangana* fue realizado en cuatro fases:

1) Construcción del mapa citológico 2) Nominación de la secuencia cromosómica de *Drosophila yangana* 3) Identificación y nominación de los rearrreglos cromosómicos y 4) Descripción de los segmentos cromosómicos.

#### 4.7.1. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA CITOLÓGICO

La construcción del mapa citológico se llevó a cabo en dos fases: 1) Edición fotográfica y 2) Comparación.

##### 4.7.1.1. EDICIÓN FOTOGRÁFICA

Para editar las fotografías de los cromosomas se utilizó el programa de computación Adobe Photo Shop (V. 8.0), el cual permite ajustar el tamaño, forma, fondo y dar contraste/brillo a cada imagen. Además el programa permite seleccionar, cortar y pegar segmentos cromosómicos para ensamblar un cromosoma completo. Los segmentos cromosómicos se eligieron de una serie de fotografías y aquellos que presentaban mayor contraste de bandas y nitidez pasaron a formar parte del cromosoma en construcción.

##### 4.7.1.2. COMPARACIÓN

La secuencia de *Drosophila huancavilcae* se utilizó como modelo para la construcción del mapa cromosómico de *Drosophila yangana* por ser el primer mapa del subgrupo *inca* que se construyó y por lo tanto un referente para las especies miembros del subgrupo (Romero, 2008). Debido a que algunos segmentos cromosómicos en el mapa de *Drosophila huancavilcae* no se encontraban muy claros se revisó también las secuencias: Primitiva I, *D. guayllabambae* y *D. novemmaristata* (Morán, 2001) para evitar confusiones y dudas con respecto al aspecto de bandas, interbandas y puffs de *Drosophila yangana*.

#### 4.7.2. NOMINACIÓN DE LA SECUENCIA CROMOSÓMICA

Para nominar la secuencia cromosómica de *D. yangana* se utilizó la nomenclatura empleada por Wharton (1942) en la secuencia estándar de *D. repleta*.

Los cromosomas se dividieron en tres **regiones**: 1) Región Distal: que es la parte más alejada del cromocentro 2) Región Central: que es la parte intermedia entre la región distal y proximal, y 3) Región Proximal: que es la parte más cercana al cromocentro; dentro de cada región se encuentran **secciones** nominadas con letras mayúsculas que van de la A a la H, cada sección contiene **subsecciones** que son numeradas del 1 al 7 (dependiendo del tamaño de la subsección), y las **bandas** de cada subsección son denominadas con letras minúsculas en orden sucesivo (a, b, c, d, etc.) según el número de bandas (Morán, 2001; Romero, 2008).

La nomenclatura que se utilizó para nominar al cromosoma 6 es diferente del resto de cromosomas debido a su reducido tamaño; las secciones del cromosoma 6 no siguen la secuencia ascendente de letras empleada en los otros cromosomas (A, B, C...H). El cromosoma 6 tiene únicamente dos secciones nominadas como A que es la más distal al cromocentro y H que es la más proximal al cromocentro (Romero, 2008).

#### 4.7.3. IDENTIFICACIÓN Y NOMINACIÓN DE LOS REARREGLOS CROMOSÓMICOS

Debido al alto número de inversiones paracéntricas encontradas en las especies del grupo *repleta* Wasserman en 1963 recomendó una nomenclatura para poder identificar a cada inversión, la cual ha sido empleada para nombrar a las nuevas inversiones encontradas en la secuencia de *D. yangana*.

Consiste de un nombre binario en el que por un lado se indica el cromosoma en el cual se encuentra la inversión (X, 2, 3, 4, 5) y por el otro se especifica la inversión nombrándola con letras minúsculas del alfabeto (a, b, c, d, etc), por ejemplo: **Xa**, es una inversión de la secuencia Primitiva I, que se encuentra en el cromosoma **X** y su nombre específico, para diferenciarla de otras inversiones, es **a**. Debido a que el número de

inversiones sobrepasa las letras del alfabeto se utiliza superíndices ( $2y, 2y^2 \dots 2y^5$ ) para individualizarlas y evitar confusiones (Wasserman, 1992).

Para especificar la posición de las inversiones en los cromosomas se toma en cuenta los puntos de quiebre del segmento invertido, de esta manera a los dos lados del segmento invertido se escribe una letra mayúscula que indica la sección en donde se presentó la inversión, seguido de un número que indica las subsecciones en donde inicia y termina el segmento invertido y finalmente se hace referencia a la banda donde se corta la inversión en ambos extremos, nombrándola con letras minúsculas (Morán, 2001), por ejemplo: la inversión 2a de la secuencia Primitiva I tiene como puntos de corte a B4e y A3a, esto indica que la zona invertida se encuentra entre las secciones A y B, abarca todas las subsecciones comprendidas entre la subsección 3 en la sección A y la subsección 4 en B y se corta en la banda a de la subsección A3 por un lado, y por el otro se corta en la banda e de la subsección B4.

#### 4.7.4. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS

Para la descripción de los cromosomas politénicos se toma en cuenta las características más sobresalientes de cada segmento como telómeros, puffs, bandas y constricciones.

Los telómeros son de gran ayuda en la descripción cromosómica porque presentan particularidades morfológicas distintivas que sirven como marcadores en la identificación de cada cromosoma. El telómero del cromosoma cinco por ejemplo, presenta una forma muy particular de “copa” que facilita su reconocimiento en las preparaciones cromosómicas.

Los puffs sirven como marcadores importantes en la identificación y descripción de los cromosomas ya que se los observa como abultamientos de diferentes tamaños distribuidos a lo largo del cromosoma.

El patrón de bandeo también tiene una gran importancia pues la configuración de una banda depende de cuán concentrado se encuentre el ADN en esta y del estado en el que se encuentren los cromómeros, de esta forma se pueden observar bandas más teñidas y de mayor grosor que otras (mayor concentración de ADN) así como también bandas en forma de cadena o punteadas (cromómeros menos compactados) (Bedoya, 1980).

La descripción de las bandas en los cromosomas politénicos de *Drosophila yungana* sigue el mismo criterio de clasificación utilizado por Romero, 2008: según su grosor se clasifican en: gruesas o delgadas, según la tinción en: muy teñidas (heteropicnóticas o coloreadas), medianamente teñidas o poco teñidas (tenues o pálidas) y según su forma en: continuas o discontinuas (apariencia de eslabones de una cadena, punteadas, entrecortadas)

Es importante decir que la tipificación de las bandas depende del estado fisiológico de la célula, el grado de politenización y el grado de estiramiento de los cromosomas (Ananina, 2002) por esta razón las descripciones de los cromosomas en cada especie será distinta.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE

Los resultados obtenidos en la primera salida a la localidad de Yangana en agosto del 2008 fueron los siguientes: se recolectaron 2 584 individuos con los cuales se fundaron 460 aislíneas de las cuales, después de observar el número de filamentos en los huevos, se descartaron 427 aislíneas pues presentaban huevos con dos filamentos indicativo de que estas especies no pertenecían al grupo *repleta*, las 33 aislíneas restantes presentaron huevos con 4 filamentos y fueron conservadas (Tabla 1). Sin embargo solamente una aislínea de las 33 fue identificada como *Drosophila inca*, de la cual se obtuvo una descendencia escasa, únicamente se consiguieron 5 adultos (3 machos y 2 hembras) (Tabla 2) que no prosperaron a pesar de los cuidados que se les dio. *Drosophila yangana* no fue encontrada.

En la segunda salida de noviembre del 2008 se colectaron 4 406 individuos de los cuales 208 pertenecían al grupo *repleta* y de estos 99 se identificaron como *D. yangana*, no se encontró *D. inca*.

Con los 99 individuos de *D. yangana* obtenidos en la colecta se fundaron 39 aislíneas, de las cuales 15 correspondían a tubos que contenían una hembra grávida, y 24 a tubos en los que se colocó una hembra (no grávida) con un macho y en algunos casos una hembra (no grávida) con dos y hasta tres machos para aprovechar el poco material disponible.

De los 39 tubos solamente 2 fueron exitosos y eclosionaron larvas que llegaron al estado adulto (F1). La generación F1 que provino de estos tubos fue separada en cuatro tubos numerados del 1 al 4 y a partir de los cuales se multiplicó la especie.

La poca descendencia que se logró obtener a partir de estos cuatro tubos no permitió establecer una población significativa de *D. yangana*.

El poco éxito obtenido en la primera salida de campo del mes de agosto del 2008 probablemente se deba a que los cactus de la huerta donde se reportó haber encontrado a *D. yangana* lucían muy poco saludables y no habían florecido ni fructificado, mientras que en el mes de noviembre los cactus se encontraban en su período de floración y fructificación y lucían verdes.

Probablemente el enfocar la colecta únicamente en la localidad de Yangana también haya favorecido coleccionar un alto número de individuos (99) de la especie *D. yangana* identificados en el mes de noviembre, pues en el mes de agosto se hizo un muestreo de reconocimiento de los lugares probables donde pudiese estar presente *D. yangana* dividiendo el esfuerzo de muestreo en 4 localidades (Yangana, El Suro, Quinara y Mandango) de las cuales en ninguna se identificó a *D. yangana*.

## 5.2. ESTADO ACTUAL DE LA ESPECIE

*Drosophila yangana* es una especie poco representativa en las colectas, así lo demuestran los datos de los muestreos realizados en la provincia de Loja en los años 2000, 2001, 2002, (Rafael y Vela, 2003) y 2008 (agosto y noviembre) (Tabla 3).

El número de individuos de esta especie no sobrepasa de cinco, en el año 2001, mientras que en los años 2000 y 2008 (agosto) el número es nulo. Los registros más altos de la especie se dan en los años 2002 y 2008 (noviembre) esto probablemente se deba a dos fenómenos naturales importantes: 1) El fenómeno de El Niño que se suscitó en el país en el año 2002, y 2) El estado saludable que presentaban los cactus en el mes de noviembre como se mencionó anteriormente, el cual pudo haber estado influenciado por los niveles de precipitación que se registraron en la estación de Yangana del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) en este mes, 74.4 mm, comparados con los niveles bajos registrados en el mes de agosto (37 mm) del mismo año; la mayor cantidad de lluvia

registrada en noviembre puede haber influenciado en una mayor fructificación y floración de los cactus y por lo tanto en una mejor colecta.

Aunque los datos del bajo número de individuos de *D. yangana* que se colectaron en los diferentes años no son un indicativo suficiente como para categorizar a esta especie dentro de la lista roja de los insectos, son importantes para conocer el estado actual de la especie.

Según Ezcurra (1990) y Benayas (2009) cuatro factores determinan la rareza de una especie: 1) la extensión geográfica que ocupa (Rareza biogeográfica), 2) su especificidad de hábitat o amplitud ecológica (Rareza de hábitat), 3) la abundancia que alcanza en una determinada localidad (Rareza demográfica) y 4) la ocupación de hábitat.

*Drosophila yangana* reúne estas cuatro condiciones, es una especie endémica de la localidad de Yangana y ha sido encontrada únicamente en una plantación de *Opuntia soederstromiana* (Rafael y Vela, 2003), por lo que se podría decir que tiene una extensión geográfica muy limitada, tiene preferencias alimenticias específicas (cactáceas como las del género *Opuntia*) y la población de *D. yangana* que se ha encontrado en Yangana es marginal, es decir que los recursos y condiciones ambientales que favorecen a esta especie, son escasos en este sitio, estrechando su especificidad de hábitat y disminuyendo su abundancia local, pues es en el centro de distribución de las especies donde existe mayor combinación de recursos y de hábitats que se puedan explotar y donde habrá mayor abundancia local (Benayas, 2009).

Por lo tanto podríamos decir que el estado actual de *D. yangana* es incierto, y si la plantación de *Opuntia soederstromiana*, único sitio de colecta de esta especie, es reemplazado con otros cultivos de importancia económica (papas, fréjol, etc.) la especie muy probablemente no logrará sobrevivir.

Así mismo es importante conocer que las especies del grupo *repleta*, en general, no son una muestra representativa en las colectas, realizadas en la provincia de Loja, y se las registra en números bajos en comparación con las especies de otros grupos como el grupo *melanogaster*, que están presentes en un número mayor y son especies cosmopolitas y antropogénicas.

En los años 2002 y 2008 (noviembre) se registra el número más alto de individuos del grupo *repleta* colectados debido probablemente a los acontecimientos antes mencionados (fenómeno de El Niño y estado saludable de los cactus). En los otros años el número de individuos del grupo que se colectaron no sobrepasan los 30, siendo el año 2001 el que registra el menor número de individuos colectados con solo 3 individuos, todos de la especie *D. yangana* (Tabla 4).

### **5.3. MANTENIMIENTO DE LA ESPECIE EN EL LABORATORIO**

En cuanto al mantenimiento de la especie en el laboratorio se pudo observar que el crecimiento de *D. yangana* es precario. Las cepas de esta especie presentan una mortalidad considerable, especialmente en los períodos larvario y de pupación, lo que puede atribuirse a que el medio de cultivo no presenta todos los componentes necesarios para un crecimiento y desarrollo exitoso (Mafla, 2005a).

Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre las especies de drosófilas cactófilas y los cactus de diversas especies. Los cactus proveen los nutrientes requeridos por las especies que en ellos habitan. Las bacterias y levaduras que se encuentran en los tejidos descompuestos de los cactus exudan un jugo que provee alimento para los adultos, mientras las larvas se alimentan de la pulpa pútrida de las cactáceas. Además el tejido vivo del cactus suministra nutrientes adicionales a las larvas, como esteroides y monosacáridos. (Ruiz, 1988). De modo que el medio de cultivo utilizado para la crianza de drosófilas en el

laboratorio tendría deficiencias nutricionales que podrían afectar el desarrollo normal y exitoso de la especie.

El tipo de tunas que se utilizaron tanto en la preparación del medio de cultivo como en el suministro de fruta fresca en los tubos también podría estar relacionado con el crecimiento y mortalidad de las larvas. Se observó que al usar tunas silvestres la cepa de *Drosophila yangana* estaba más saludable y la mortalidad de los individuos disminuía. Estas tunas se colectaron en el bosque seco de la provincia de Imbabura, específicamente en la localidad de Ambuquí, en donde se encuentran una gran cantidad de cactus silvestres con tunas de la variedad conocida como morada. Sin embargo, una vez que se agotó el stock de estas frutas silvestres se realizó un cambio y se empezaron a utilizar tunas cultivadas (de la variedad conocida como blanca) este cambio provocó que las larvas de la especie no prosperen adecuadamente y la mortalidad aumente.

Las diferentes variedades de tuna (blanca, amarilla, morada o roja) que existen en el país no solamente se diferencian por el color de su pulpa sino también por sus características químicas, por ejemplo: análisis de la composición química entre la tuna de la variedad blanca y la variedad amarilla, indicaron que la tuna blanca presenta 1.5% más carbohidratos, 0.12% más pectina y 0.142 mg/g menos vitamina C que la tuna amarilla (Aguirre *et al.*, 2008), estas diferencias, en cuanto a concentración de determinados compuestos que se pueden dar en cualquiera de las variedades de tunas existentes, podrían estar relacionadas con el tipo de levaduras que se generen en las frutas y por ende con el éxito o fracaso de la oviposición, así como con el crecimiento y desarrollo larval.

Estudios realizados por Barker (1984, 1992) indicaron la importancia de la diversidad de especies de levaduras y su abundancia en los tejidos de los cactus, ya que estas podrían ser la base para la selección de hábitats por las drosófilas cactófilas. Las levaduras tienden a ser especialistas para un hábitat particular (tunas de las diferentes

variedades), esta especificidad está determinada por la disponibilidad de nutrientes, compuestos inhibitorios y factores medioambientales como concentración de oxígeno y temperatura.

Así mismo las sustancias volátiles producidas por los microorganismos que se encuentran en los tejidos putrefactos de los cactus, probablemente sean señales químicas para las hembras en la búsqueda de los sitios de alimentación y oviposición, tal es el caso de *Drosophila pachea*, especie restringida a un tipo de cactus conocido como senita o cacto viejito (*Cephalocereus senilis*), por que este cactus contiene un único esterol necesario para el desarrollo y fertilidad de esta mosca (Barker, 1992), indicando que las drosófilas cactófilas son muy específicas y susceptibles a la presencia de ciertos compuestos en los cactus donde se reproducen y alimentan.

#### **5.4. MUESTRA POBLACIONAL DE *Drosophila yangana***

El bajo número de individuos que se colectaron y la alta mortalidad de las larvas en las condiciones de crianza en el laboratorio no permitieron obtener una muestra representativa de la población de *Drosophila yangana*. De las 39 isolíneas sembradas solamente 2 fueron exitosas; de ellas eclosionaron larvas que llegaron al estado adulto (F1). La generación F1 que provino de estos tubos fue separada en cuatro tubos numerados del 1 al 4 (Tabla 5).

A partir de estos cuatro tubos se multiplicó la cepa de *D. yangana*, obteniéndose un total de 73 tubos. Sin embargo, no todos los tubos tuvieron el éxito esperado, únicamente tres tubos llegaron a la generación F4 y solamente cinco a la generación F6 (Tabla 5). Una vez que las cepas alcanzaron la generación F6, los huevos dejados en los tubos por esta generación no eclosionaron ocasionando que la muestra desaparezca (Tabla 5).

Según estos datos se podría decir que, en condiciones de laboratorio, el genotipo que se encontraba en el tubo 2 resultó ser más exitoso, pues estos tubos llegaron a la

generación F6 con un alto número de individuos, mientras que los genotipos de los tubos 3 y 4 podrían ser considerados muy poco exitosos pues únicamente los tubos que fueron multiplicados a partir del tubo número 3 llegaron a la generación F4, los otros, del tubo número 4 sucumbieron en la generación F2 (Tabla 5). Es importante notar que los tubos que alcanzaron generaciones mayores, como F5 y F6, pertenecen mayoritariamente y en números altos al tubo N°2, mientras los tubos provenientes de los tubos N°1 y N°3 no sobrepasan de uno en la generación F4 (Tabla 5). Además el número de huevos que ovipositaron las hembras era bajo, en consecuencia el número de larvas que eclosionaron también, ello condujo a la desaparición de la especie en el laboratorio.

Se fotografiaron un total de 616 núcleos de 40 individuos: 10 individuos del tubo N°1 (150 núcleos), 21 individuos del tubo N°2 (281 núcleos) y 9 individuos del tubo N° 3 (185 núcleos), con estas fotografías se construyó el mapa cromosómico de *Drosophila yangana*; para la construcción del mapa se escogió los segmentos que presentaban mayor nitidez y contraste de bandas, es decir que este mapa no proviene de un solo individuo sino que es la mejor representación que se logró conseguir de la micromuestra de la especie.

De los 40 individuos fotografiados, cuatro presentaron inversiones en estado heterocigoto. Un individuo, proveniente del tubo 3, presentó tres inversiones consecutivas en el cromosoma X (Figura 3A1). Una pequeña de aproximadamente 10 bandas se ubica cerca al telómero en la región distal; seguida por otra inversión localizada en la sección B de la región distal con aproximadamente 16 bandas y la tercera se encuentra en la región central probablemente en la sección C, tiene aproximadamente 13 bandas.

En otro cromosoma del mismo individuo se encontró tres inversiones consecutivas, las dos primeras inversiones presentan varias torsiones resultando difícil seguir su secuencia con seguridad, pero podemos decir que la primera inversión se ubica cerca del telómero en la región distal al igual que la segunda inversión la cual puede abarcar

inclusive el inicio de la región central, la tercera inversión, que es la más visible, se encuentra en la región central y puede abarcar el inicio de la región proximal, es una inversión considerablemente grande de aproximadamente 32 bandas (Figura 3A2). El telómero de este cromosoma no es visible por lo que su identificación resultó un tanto difícil, pero probablemente corresponda al cromosoma X ya que el otro cromosoma (descrito anteriormente) encontrado en el mismo individuo que presentó este tipo de inversiones correspondía al cromosoma X.

Un individuo, que provino del tubo 2, presentó una inversión en la región proximal del cromosoma 3 de aproximadamente 22 bandas (Figura 3B). Un individuo, del mismo tubo número 2, presentó una inversión en la región proximal del cromosoma 4 de aproximadamente 28 bandas (Figura 3C). Y finalmente un individuo, descendiente del tubo 1, presentó dos inversiones consecutivas en la región distal del cromosoma 5, la primera aproximadamente de 10 bandas y la segunda de aproximadamente 6 bandas (Figura 3D).

Las inversiones en estado heterocigoto encontradas en este estudio corresponden a cuatro individuos distintos que provienen de dos isolíneas de los tubos 1, 2 y 3, de la micromuestra de *D. yangana*. El hallazgo de estos individuos, con inversiones en estado heterocigoto, podría indicar la presencia de al menos dos genotipos distintos, hecho que resulta muy interesante.

En cuanto a las inversiones en estado heterocigoto encontradas en el cromosoma X se puede notar que la inversión XI, nueva inversión encontrada en el cromosoma X de *D. yangana* y que será descrita más adelante, está localizada en la región central del cromosoma X, es decir que está incluida en la inversión en estado heterocigoto que abarca la región central y proximal del cromosoma (Figura 3A1 y 3A2).

Cabe recalcar que se encontraron tres inversiones consecutivas en estado heterocigoto en dos cromosomas X del mismo individuo como se observan en las figuras 3A1 y 3A2, pero es muy difícil decir con certeza que estas inversiones sean las mismas para los dos cromosomas pues en el caso del cromosoma de la figura 3A2 las torsiones que forman estas inversiones hace difícil comparar los segmentos, pero la tercera inversión, más extendida, que se encuentra en el cromosoma de la figura 3A2 aparentemente parece abarcar más segmentos cromosómicos que la inversión del cromosoma de la figura 3A1.

Estas observaciones nos hacen presumir que la sección C del cromosoma X de *D. yangana* contiene puntos calientes.

En el cromosoma 3 se encontraron dos inversiones: la primera corresponde a la inversión 3I, nueva inversión reportada para *D. yangana* y que será descrita más adelante, que se ubica en la región central del cromosoma; y la segunda corresponde a una inversión en estado heterocigoto que se encuentra en la región proximal del cromosoma (Figura 3B).

Por último resulta peculiar el hallazgo de tres inversiones en estado heterocigoto en dos cromosomas considerados conservados en el grupo *repleta*, el cromosoma 4 (una inversión en la región proximal) y el cromosoma 5 (dos inversiones consecutivas en la región distal).

La presencia de estas inversiones en estado heterocigoto más las inversiones XI y 3I en los cromosomas politénicos de *D. yangana* hacen pensar que el genoma de esta especie presenta un alto grado de polimorfismo. Estos hallazgos en una muestra poblacional tan reducida hacen aún más atractivo e importante la continuación de los estudios con esta rara pero muy interesante especie.

## 5.5. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CROMOSOMAS POLITÉNICOS

En cuanto a las características citológicas de *D. yangana* podemos decir lo siguiente:

Los cromosomas politénicos de *D. yangana* presentan seis brazos cromosómicos (X, 2, 3, 4, 5 y 6) que se unen en el cromocentro (Figura 4), este cuerpo irregular se forma por la fusión de las regiones heterocromáticas centroméricas de los autosomas, del cromosoma X y de la totalidad del cromosoma Y (Gardner, 1971). En esta especie el cromocentro se presenta como una masa difusa no bien definida, al igual que en *D. huancavilcae* (Romero, 2008).

Además en las preparaciones cromosómicas se puede observar unas masas globulosas que se tiñen de un color rosado opaco, los nucléolos (Figura 4), los cuales están formados por ribonucleoproteínas y se encuentran unidos estrechamente al cromocentro debido a que las regiones organizadoras nucleolares se encuentran por lo general dentro de la heterocromatina sexual (Wolfgang *et al.*, 1982).

En los núcleos politénicos de *Drosophila yangana* el cromosoma X es uno de los más distintivos debido a su telómero muy particular en forma de “clavel”. Sin embargo, en las preparaciones cromosómicas aparece poco nítido y no se tiñe con intensidad dificultando su ensamblaje en las fotografías porque aparece opaco y con baja resolución.

El cromosoma 2 de *Drosophila yangana* se lo observó casi completamente estirado al contrario del cromosoma 2 de *Drosophila huancavilcae*, que se lo encuentra replegado sobre el cromocentro (Romero, 2008),

El cromosoma 3, aunque tiende a replegarse, se lo observó en casi todos los núcleos politénicos fotografiados al igual que el cromosoma 5 que es fácilmente reconocible por su telómero en forma de “copa alargada”. El cromosoma 4 por lo general se lo encuentra

replegado sobre sí mismo dificultando su reconocimiento especialmente porque no se puede observar con claridad su telómero, y finalmente el cromosoma 6 se encontró en una sola placa, lo más frecuente es que se encuentre inmerso en el cromocentro.

En cuanto a estas seis inversiones en estado heterocigótico, encontradas en cuatro de los 40 individuos analizados, los cuales provienen de dos isolíneas sobrevivientes de la especie *D. yangana*, probablemente podrían ser mutaciones accidentales, pues no fueron observadas más de una vez o máximo dos en un individuo, llevándonos a pensar que posiblemente estos rearrreglos no se han fijado en *D. yangana*.

Por ello la descripción de los cromosomas politénicos de *D. yangana* se basó en los núcleos de los 36 individuos restantes, donde las inversiones XI y 3I se encuentran en estado homocigoto.

## **5.6. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS**

Para la descripción de los cromosomas se siguió la nomenclatura utilizada en Morán, 2001 que fue descrita en la página 22. Se dividió a cada cromosoma en tres regiones y así se facilitó su descripción: 1) Región Distal, 2) Región Central y 3) Región Proximal. Cada región a su vez se dividió en secciones, nominadas con letras mayúsculas, cada sección contiene subsecciones, numeradas del 1 al 7, el tamaño de las subsecciones es variable y las bandas de cada subsección son denominadas con letras minúsculas en orden sucesivo (a, b, c, d, etc.).

La posición de las inversiones paracéntricas se especifica según los puntos de rotura que indicarán: a) la sección en donde ocurrió el rearrreglo, definida con letras mayúsculas, b) las subsecciones donde inicia y termina el segmento invertido, mostrado con números y c) las bandas, en ambos extremos, donde se corta la inversión, nombrándolas con letras minúsculas (Morán, 2001).

### 5.6.1. CROMOSOMA X

El cromosoma X (Figura 5) de *Drosophila yangana* comprende 8 secciones y 30 subsecciones. Este cromosoma presenta las tres inversiones correspondientes a la Primitiva I: **Xa** con puntos de quiebre en: D4a- C4g, **Xb**: F2k a F1a y **Xc**: G2a-F3a las cuales han sido descritas en Morán (2001) y Romero (2008).

En el cromosoma X de *Drosophila yangana* se ha encontrado una nueva inversión, nominada como **XI**, que comprende aproximadamente la mitad de la sección C, subsecciones C1 y C2 de la región central, y parte de la sección B (B4) de la región distal. Esta inversión no ha sido reportada en *Drosophila huancavilcae* y será detallada más adelante.

**Región Distal:** presenta dos secciones y 7 subsecciones, la subsección B4 ha sido excluida de esta región porque forma parte de la inversión XI y será descrita como parte de esta nueva inversión en la región central, sección C.

**Sección A (A1- A4):** Lo más destacable en este segmento es la presencia de un telómero en forma de clavel o roseta, correspondiente a la subsección A1, esta estructura es un marcador que permite identificar al cromosoma X, le sigue un grupo de bandas fuertemente teñidas, que forman una constricción, dichas bandas parecerían estar muy pegadas una a la otra visualizándose como una sola banda a manera de un “cuello”.

En la subsección A2 se encuentra un puff con 4 bandas centrales muy poco teñidas y dos bandas muy oscuras que se encuentran al inicio y al final del puff (una en cada extremo). La subsección A3 inicia con un segmento que abarca aproximadamente 3 bandas discontinuas le sigue el inicio de un puff que se continua hasta la subsección A4. Este puff presenta, en la parte central una interbanda muy gruesa, y en su extremo izquierdo, localizado en la subsección A3, se puede visualizar una banda punteada, continua y

heteropicnótica, y en el extremo derecho, localizado en la subsección A4 dos bandas continuas muy oscuras.

**Sección B (B1- B3):** La subsección B1 corresponde a un segmento muy corto en el que en su inicio no se distinguen claramente las bandas pero se puede observar dos bandas muy difusas, al final de esta subsección se puede ver una banda delgada heteropicnótica que forma una ligera constricción.

La subsección B2 inicia con una serie de bandas pálidas y delgadas, casi al final de este fragmento se observa una banda oscura, delgada de apariencia punteada. La subsección B3 es un pequeño puff que inicia con tres bandas heteropicnóticas delgadas, dispuestas en forma discontinua seguidas por una interbanda muy amplia a continuación de la cual se encuentra una banda continua y heteropicnótica claramente diferenciable.

**Región Central:** constituida por tres secciones y 15 subsecciones.

**Sección C (C1- C4):** La nueva inversión registrada en el cromosoma X de *Drosophila yungana* se encuentra en esta sección. La inversión comprende parte de la sección B, específicamente la subsección B4, y la sección C (C1 y C2). Esta inversión presenta alrededor de 12 bandas y 11 interbandas cuyos puntos de corte son: C2e- B4a (Figura 6). Las bandas, en los segmentos invertidos, se nombraron de izquierda a derecha debido al giro que ocurre al momento de la inversión.

La subsección C2 se encuentra colindando con la subsección B3, debido al giro de 180° del segmento, es una porción considerablemente grande con 5 bandas, la primera banda (e), de izquierda a derecha, es una banda heteropicnótica gruesa, después encontramos una banda (d) heteropicnótica gruesa que forma una constricción fácilmente observable, la banda (c) que le sigue tiene una apariencia continua y densamente teñida, este segmento termina con dos bandas (b y a) heteropicnóticas de apariencia punteada que

se encuentra limitando con la primera banda de la subsección C1, separadas por una interbanda muy delgada dando la apariencia de estar unidas.

En la subsección C1 se observan dos bandas (b y a) gruesas, heteropícnóticas y continuas. La subsección B4 forma un puff de apariencia romboidal y una textura granulosa, en el centro del cual se pueden visualizar 4 bandas discontinuas y heteropícnóticas (e, d, c y b) después de las cuales se encuentra una interbanda mediana seguida por una banda continua (a) fuertemente tinturada donde termina la subsección.

Al comparar las subsecciones C1 y C2 del cromosoma X de *D. yangana* con la secuencia hipotética Primitiva I (Figura 6) se observa una peculiaridad, pues estas subsecciones (C1 y C2) constituyen un segmento de grosor homogéneo, en la Primitiva I, y en *D. yangana* forman un puff con una constricción pronunciada en la banda **d**, que podría ser una particularidad de la especie.

Dos puntos importantes que permiten el fácil reconocimiento de esta inversión son: a) el puff descrito anteriormente, debido a su forma y textura particular, fácilmente reconocible y, b) la constricción que se forma en la subsección C2. A esta nueva inversión se la ha nominado XI y no ha sido encontrada en *Drosophila huancavilcae*.

Las subsecciones C3 y C4 no forman parte de la nueva inversión. La subsección C3 forma un puff muy grande con alrededor de 6 bandas oscuras, discontinuas de aspecto granuloso. La subsección C4 inicia con un segmento muy difuso en el que se encuentra una banda punteada igualmente difusa seguida por dos bandas heteropícnóticas discontinuas de aspecto punteado después de la cual se encuentra una banda extremadamente difusa y muy delgada donde termina esta subsección.

**Sección D (D1- D4):** En esta subsección se encuentra la inversión Xa de la Primitiva I, sus puntos de corte son: D4b- C4g (Morán, 2001).

Las subsecciones D4b, D3, D2 y D1 forman parte de la inversión Xa. La subsección D4b está formada por 3 bandas discontinuas no muy tinturadas. La subsección D3 presenta 3 bandas la primera es delgada y densamente teñida, la segunda es difusa y continua y la tercera es heteropicnótica continua. Lo más destacable de la subsección D2 es la presencia de una constricción pronunciada, localizada en la parte central de la subsección, este segmento presenta 4 bandas difusas discontinuas. La subsección D1 es un segmento muy corto conformado por tres bandas, la primera y la tercera son bandas heteropicnóticas continuas, mientras que la segunda, localizada en el medio, presenta un aspecto difuso y discontinuo.

La subsección D4c corresponde a un segmento muy pequeño con 2 bandas punteadas muy poco visibles, esta subsección no forma parte de la inversión.

**Sección E (E1- E4):** La sección E1 forma un segmento homogéneo que inicia con una banda heteropicnótica continua, seguida de siete bandas difusas y discontinuas. La subsección E2 corresponde a un puff que inicia con una banda heteropicnótica seguido de una interbanda gruesa después de la cual encontramos tres bandas continuas medianamente teñidas. La subsección E3 inicia con una banda delgada, continua y oscura seguida de dos bandas difusas poco discernibles después de las cuales se encuentran dos bandas continuas y heteropicnóticas. La subsección E4 está conformada por 6 bandas gruesas, continuas y densamente teñidas.

**Región proximal:** Está formada por tres secciones y nueve subsecciones. En esta región se encuentran dos de las tres inversiones de la Primitiva I: Xb y Xc. Es importante tener en cuenta que al encontrarse estas dos inversiones las secciones y subsecciones no siguen un orden ascendente (F1, F2, F3, etc.), por lo que las subsecciones serán descritas en el orden en el que aparecen en las inversiones, de izquierda a derecha; para evitar confusiones se reunió a las secciones F y G en una sola nombrándola como sección F2-G2,

los números indican en qué subsección empieza y en cuál termina la inversión. La sección H conserva la nomenclatura original.

**Sección F-G (F2-G2):** La inversión Xb presenta sus puntos de corte en F2k-F1a. La subsección F2k es un puff que presenta 5 bandas discontinuas y difusas. La subsección F1a corresponde a la continuación del puff que se inició en F2k, en esta subsección se distinguen dos bandas muy oscuras que se encuentran en el inicio de la subsección después de las cuales se encuentran tres bandas muy poco teñidas y difusas.

La inversión Xc presenta sus puntos de corte en G2a y F3a. La subsección G2a inicia en una banda gruesa, continua y heteropícnótica enseguida de la cual se encuentra un segmento de alrededor de 3 bandas difusas muy poco teñidas, esta sección termina en una banda gruesa, continua y oscura. La subsección G1 inicia con tres bandas heteropícnóticas discontinuas después de las cuales se encuentran una serie de bandas muy juntas una de la otra dando la apariencia de formar una sola banda. La subsección F5 corresponde a un pequeño puff con 4 bandas continuas, gruesas y densamente teñidas. La subsección F4 presenta 5 bandas difusas y opacas, seguidas de tres bandas muy juntas dando la apariencia de una gran banda gruesa y muy oscura, después se puede observar una banda continua muy difusa casi imperceptible y al final de esta subsección se observa una banda heteropícnótica. El segmento F3a inicia con una banda muy gruesa y oscura, después de la cual se encuentran dos bandas delgadas muy teñidas que forman una constricción conspicua, luego se observa 6 bandas discontinuas heteropícnóticas, la subsección finaliza con una banda muy gruesa y oscura que probablemente corresponda a la unión de 2 ó 3 bandas.

La subsección G2b se encuentra fuera de la zona de inversión, este segmento presenta 11 bandas discontinuas y heteropícnóticas que dan un aspecto granuloso al segmento.

**Sección H (H):** Lo más destacable en esta subsección es la presencia de un gran puff con bandas heteropicnóticas de aspecto punteado. Esta porción del cromosoma forma parte del cromocentro.

### 5.6.2. CROMOSOMA 2

El cromosoma 2 (Figura 7) de *D. yangana* comprende 8 secciones y 38 subsecciones. Presenta las dos inversiones correspondientes a la Primitiva I: 2a y 2b. En la Región Central, de este cromosoma específicamente en la sección E, subsección E1, se encontró un segmento extra, de 12 bandas, entre E1 y E2 por lo que se procedió a alargar la subsección E1 incluyendo a este pedazo, de esta manera no se alteró la nomenclatura utilizada en la secuencia de *D. huancavilcae* y las siguientes subsecciones fueron nombradas en orden ascendente (E2, E3, etc.) Este segmento no se reportó en *D. huancavilcae* y será descrito más adelante. En la secuencia de *D. yangana* no se encontró la inversión  $2y^5$  que caracteriza a *D. huancavilcae*

**Región Distal:** Presenta 2 secciones y 8 subsecciones. En esta región se encuentra la inversión 2a correspondiente a la Primitiva I. Es importante tener en cuenta que la inversión 2a abarca parte de la sección A y la sección B, en consecuencia las subsecciones no siguen un orden ascendente (A1, A2, ..., B1, B2... etc.) ya que están invertidas, por lo que serán descritas en el orden en el que aparecen en la inversión, de izquierda a derecha del cromosoma.

**Sección A (A1- A3):** Las subsecciones A1 y A2 no se encuentran dentro del segmento invertido. En la subsección A1 encontramos un telómero en forma de balón con apariencia globular y bandas punteadas al inicio, seguido de una banda gruesa muy oscura que forma una constricción muy característica de este cromosoma. La subsección A2

corresponde a un puff con tres bandas gruesas, continuas y muy teñidas claramente visibles.

La inversión 2a, comprende a las secciones B y parte de la A, sus puntos de quiebre son: B4e-A3a. La subsección B4e inicia con una banda gruesa muy oscura seguida de dos bandas delgadas y poco teñidas, las tres bandas son claramente visibles. La subsección B3 inicia en una banda heteropicnótica delgada seguida por una banda más gruesa densamente teñida. La subsección B2 es un puff que inicia con una banda gruesa heteropicnótica seguida de una interbanda de tamaño considerable seguida y tres bandas continuas, irregulares y muy teñidas, después se observa una banda continua, gruesa y heteropicnótica donde termina la subsección. En la subsección B1 se pueden observar dos bandas gruesas muy teñidas, a diferencia de *D. huancavilcae* que presenta bandas delgadas en este segmento. La subsección A4 inicia en una banda gruesa heteropicnótica seguida de dos bandas continuas densamente teñidas después de las cuales se encuentra una interbanda muy gruesa seguida por dos bandas delgadas y discontinuas que se encuentran muy juntas una de la otra, luego se observa una banda muy delgada y difusa, seguida por una banda delgada, continua, heteropicnótica donde termina la subsección. La subsección A3 forma un segmento de un grosor homogéneo en el que se puede observar 2 bandas muy delgadas discontinuas y muy teñidas.

**Región Central:** Presenta 4 secciones y 24 subsecciones. En esta región se encuentra la inversión 2b correspondiente a la Primitiva I. Es importante tener en cuenta que en la inversión 2b se incluye parte de las secciones C y D, en consecuencia las subsecciones no siguen un orden ascendente (C1, C2,...D1, D2... etc.), por lo que serán descritas, en la sección D, en el orden en el que aparecen en la inversión, de izquierda a derecha.

**Sección C (C1- C5):** Las subsecciones C1, C2, C3, C4 y C5 no están incluidas dentro del segmento invertido. C1, C2 y C3 corresponden a segmentos muy cortos con una o dos bandas delgadas y continuas en cada subsección. Las subsecciones C4 y C5 corresponden a un puff romboidal. En la subsección C4 se pueden observar dos bandas (de izquierda a derecha), una gruesa heteropícnótica y otra delgada y difusa. En la subsección C5 se distinguen claramente 5 bandas densamente teñidas, la primera banda, al inicio de la subsección, es discontinua, las otras cuatro son continuas.

**Sección D (D1- D5):** En esta subsección se encuentra la inversión 2b cuyos puntos de corte son: D1g- C6a. Esta inversión comprende parte de las secciones D y C. El segmento D1 forma un puff irregular que inicia con una banda gruesa heteropícnótica seguida de una serie de bandas muy difusas casi imperceptibles. La subsección C7 inicia con tres bandas discontinuas, seguidas de dos bandas muy juntas que se observan como una sola banda heteropícnótica. La subsección C6a presenta 12 bandas fuertemente teñidas y de distintos grosores, la primera banda de la subsección es gruesa y heteropícnótica y se observa muy pegada a la última banda de la subsección C7, le sigue una banda gruesa muy teñida después de la cual se observa 10 bandas delgadas heteropícnóticas. D2 forma un puff que presenta 6 bandas muy gruesas heteropícnóticas. Lo más destacable de la subsección D3 es una constricción que se encuentra en el inicio del segmento seguida por una banda delgada medianamente teñida y continua, después se observa un corto segmento con cuatro bandas continuas heteropícnóticas. La subsección D4 inicia con cuatro bandas heteropícnóticas, seguidas de una interbanda gruesa después de la cual se encuentran dos bandas muy gruesas y densamente teñidas que se encuentran muy juntas una a la otra. La subsección D5 corresponde al inicio de un puff en forma romboidal, en el centro del cual se puede distinguir una banda muy gruesa, oscura y continua, que divide al puff en dos

subsecciones: D5 y E1 respectivamente, esta última subsección será descrita a continuación.

**Sección E (E1- E6):** En esta sección se encontró un segmento extra entre E1 y E2 por lo que se procedió a alargar la subsección E1 incluyendo a este pedazo, de esta manera no se alteró la nomenclatura y las siguientes subsecciones fueron nombradas en orden ascendente (E2, E3, etc.). La subsección E1 es un segmento grande que se inicia en la mitad proximal del puff que se observó en D5, está formado por alrededor de 5 bandas, la primera es difusa y discontinua, la segunda es una banda gruesa, continua y heteropicnótica, quizá la más sobresaliente de este segmento, a continuación se observan 3 bandas delgadas y muy poco teñidas que forman una constricción, después de la cual encontramos un gran segmento que se observa a manera de dos puffs muy juntos, en el primero se distinguen 4 bandas muy delgadas heteropicnóticas seguidas de un segmento mediano en el que no se puede distinguir claramente el número de bandas, probablemente haya 3 bandas en este segmento, el segundo puff corresponde a un segmento con bandas muy difusas, donde la banda más sobresaliente se encuentra al final del puff, es una banda densamente teñida y continua, claramente visible. Este segmento no ha sido reportado en *D. huancavilcae*. Se considera la posibilidad de que este gran segmento podría corresponder a una duplicación cromosómica; del segmento comprendido entre F1 hasta F4 por la similaridad de bandas, con el segmento adicional (E1), pero en direcciones opuestas. La sección E (E1- E6) fue reportada por Morán (2001) como altamente inestable, las inversiones  $2b^{10}$  y  $2c^{10}$ , de *D. guayllabambae* y *D. novemariata* se encuentran en esta sección, así como también la inversión  $2y^5$  de *D. huancavilcae*.

Las subsecciones que van desde E2 hasta E6 en *D. yangana* tienen la misma secuencia que en la Primitiva I, es decir que no se encontró la inversión  $2y^5$  reportada en *D. huancavilcae* que abarca todas estas subsecciones (E2- E6). La subsección E2 corresponde

a un segmento delgado, que forma una constricción, en la cual se puede distinguir dos bandas muy teñidas y continuas, seguidas de una interbanda de tamaño mediano. En la subsección E3 se observa dos bandas muy pegadas, son bandas continuas heteropícnóticas. En E4 se nota claramente dos bandas heteropícnóticas y continuas. En E5 se observa tres bandas discontinuas, densamente teñidas. La subsección E6 inicia con dos bandas discontinuas muy difusas, casi imperceptibles, seguidas de una banda densamente teñida donde termina la subsección E6.

**Sección F (F1- F6):** La subsección F1 es un pequeño puff donde se encuentran tres bandas heteropícnóticas, delgadas. La subsección F2 inicia con tres bandas oscuras y continuas después de las cuales se observa dos bandas más delgadas que las tres primeras, continuas y heteropícnóticas. Las subsecciones F3 y F4 forman un puff con bandas difusas, de las cuales se destacan tres bandas continuas y densamente teñidas que se encuentran: la primera al inicio de la subsección F3, la segunda localizada en el límite entre F3 y F4, la tercera se encuentra casi enseguida de la segunda antes de finalizar la subsección F4; en el límite entre la subsección F4 y F5 se encuentra una constricción pronunciada que no se observa en la secuencia de *D. huancavilcae*. En la subsección F5 se puede observar cuatro bandas muy difusas, casi imperceptibles. La subsección F6 presenta un patrón de bandeo claro en donde se distinguen siete bandas heteropícnóticas continuas.

**Región proximal:** En esta subsección encontramos dos secciones y 6 subsecciones.

**Sección G (G1- G5):** La subsección G1 inicia con tres bandas densamente teñidas, seguidas de una banda medianamente teñida, delgada después de la cual se observa una interbanda muy clara; enseguida se observan tres bandas medianamente teñidas y delgadas, esta subsección termina en una banda delgada heteropícnótica. La subsección G2 inicia con tres bandas delgadas heteropícnóticas y continuas, después de las cuales se observa un segmento muy difuso donde las bandas son casi imperceptibles. Las subsecciones G3, G4

y G5, presentan bandas muy difusas de aspecto discontinuo, aproximadamente se encuentran 15 bandas en estas tres subsecciones, de las cuales se destaca una banda de grosor medio, heteropicnótica y continua localizada al final de la subsección G5.

**Sección H:** Esta sección presenta una forma muy particular, parecida a una “antorcha” con cuatro bandas muy oscuras y continuas después de las cuales se observa un segmento con bandas difusas, discontinuas y de aspecto granuloso.

### 5.6.3. CROMOSOMA 3

El cromosoma 3 (Figura 8) de *Drosophila yangana* está dividido en ocho secciones y 36 subsecciones. Este cromosoma presenta la inversión 3b correspondiente a la Primitiva I con puntos de quiebre en: E1a- D3a.

En el cromosoma 3 de *Drosophila yangana* se ha encontrado una nueva inversión, nominada como **3I**, que se encuentra en la Región Central del cromosoma y comprende la sección C, subsecciones C1, C2 y C3. Esta inversión será descrita más adelante.

**Región Distal:** Esta formada por dos secciones y 10 subsecciones.

**Sección A (A1- A5):** La subsección A1 de *D. yangana* es claramente diferenciable, debido a la forma peculiar del telómero que tiene la apariencia de una copa ensanchada, esta conformación particular del telómero se observa en la secuencia Primitiva I, así como también en *D. guayllabambae* y *D. novemaristata*, pero en el cromosoma de *D. huancavilcae* este segmento no es tan conspicuo y no presenta dicha estructura. Al inicio de esta porción se puede observar dos bandas heteropicnóticas y continuas, enseguida de estas hay una interbanda de un grosor considerable, después de la cual se encuentra una banda gruesa densamente teñida, este segmento finaliza con una banda delgada muy oscura que forma una constricción muy importante para el reconocimiento del cromosoma.

La subsección A2 corresponde a un ensanchamiento que presenta siete bandas continuas heteropicnóticas. En A3 se observa un puff ovalado que se extiende hasta la subsección A4 el cual inicia con dos bandas heteropicnóticas, en A3, y finaliza con dos bandas gruesas continuas y muy teñidas en, A4, en la parte central presenta tres bandas muy opacas casi imperceptibles, este puff es pronunciado en *D. yangana* y la Primitiva I y menor en *D. huancavilcae*, además en la subsección A4 se destaca la presencia de una constricción conspicua semejante a la observada en la Primitiva I (Anexo 4) pero que no se observa en la secuencia de *Drosophila huancavilcae*, después de la cual se encuentra una banda continua, gruesa y heteropicnótica donde finaliza la subsección A4. La subsección A5 forma un puff con cinco bandas gruesas, muy regulares, continuas y heteropicnóticas.

**Sección B (B1- B5):** La subsección B1 empieza con cinco bandas de diferente grosor y tinción. La subsección B2 corresponde a un puff con cinco bandas delgadas heteropicnóticas, la segunda banda, localizada en el centro del puff, se observa entrecortada. La subsección B3 inicia con una interbanda gruesa después de la cual se encuentran cuatro bandas delgadas, discontinuas y heteropicnóticas. La subsección B4 presenta cuatro bandas, la primera banda es continua, con mayor tinción en sus extremos, su parte media es poco teñida, la segunda banda es discontinua y se observa como tres puntos muy poco teñidos, la tercera y cuarta bandas se encuentran muy juntas y se observan como una sola heteropicnótica al final de esta subsección. Al inicio de la subsección B5 se puede observar una constricción muy leve que no se observa en la secuencia de *D. huancavilcae*, pero ha sido reportada en la secuencia de *D. novemaristata* esta subsección inicia con una banda continua heteropicnótica, seguida de un segmento con bandas muy difusas después del cual se observan seis bandas delgadas medianamente teñidas, casi al final de la subsección se observa un adelgazamiento del segmento que forma una constricción.

**Región Central:** Incluye tres secciones y 16 subsecciones. En esta región se encuentra la inversión 3I aquí reportada, ausente en la secuencia de *Drosophila huancavilcae*, la descripción de la inversión se la hará en el orden en el que aparece en el cromosoma, leyendo de izquierda a derecha.

**Sección C (C1- C5):** En esta sección se encuentra la nueva inversión 3I encontrada en este cromosoma, abarca más de la mitad de la sección C comprende alrededor de 15 bandas y 14 interbandas de las subsecciones C3, C2 y C1, sus puntos de corte son C3g-C1a (Figura 9). Esta inversión no ha sido encontrada ni en la secuencia Primitiva I ni en *D. huancavilcae*. La subsección C3 presenta una forma muy peculiar a manera de barril en donde se pueden observar claramente 7 bandas heteropicnóticas (g, f, e, d, c, b y a). La subsección C2 constituye un segmento a manera de cuello en donde se pueden distinguir 3 bandas delgadas y tenues (d, c, y b), seguido por un puff de forma ovalada, cuya primera parte se encuentra en la sección C2, en donde se puede visualizar una banda (a) discontinua y heteropicnótica al inicio del puff, el puff continúa hasta la subsección C1d en donde se encuentran cuatro bandas muy poco visibles (d, c, b y a). Las bandas, en los segmentos invertidos, se nombraron de izquierda a derecha debido al giro que ocurre al momento de la inversión. Las tres subsecciones de la inversión 3I son muy semejantes a los de la Primitiva I (Figura 9).

La subsección C4 es un segmento homogéneo en grosor que inicia con una banda muy gruesa heteropicnótica. La subsección C5 corresponde a un pequeño puff con cuatro bandas discontinuas y ligeramente teñidas.

**Sección D (D1- D5):** En la subsección D1 se puede observar una constricción conspicua en donde se encuentra una banda continua heteropicnótica, después de la cual se encuentra una banda discontinua oscura, luego se observa una interbanda amplia seguida por una banda muy oscura y continua, luego se observa una interbanda ancha después de la

cual encontramos una banda discontinua, donde finaliza esta subsección. La subsección D2 tiene tres bandas densamente teñidas.

Las subsecciones E1, D5, D4 y D3a forman parte de la inversión 3b con puntos de corte en: E1a- D3a, las subsecciones de esta inversión serán descritas en el orden en el que aparecen en el cromosoma. En la subsección E1 se puede visualizar a la banda **a** en forma de cadena heteropicnótica, la subsección D5 presenta dos bandas discontinuas densamente teñidas. Las subsecciones D4 y D3, forman un puff con seis bandas punteadas, se destaca una banda densamente teñida y continua, localizada al final de la subsección D3.

**Sección E (E1- E5):** La subsección E1 es un segmento un poco abultado con cuatro bandas heteropicnóticas continuas. La subsección E2 es un segmento de grosor homogéneo con bandas muy tenues. Las subsecciones E3 y E4 corresponden a un puff, donde se distinguen 5 bandas continuas heteropicnóticas claramente visibles, localizadas en E3, mientras en E4 las bandas son muy poco teñidas y difusas. En el límite entre E4 y E5 se observa una constricción conspicua que no se observa en la secuencia de *D. huancavilcae* ni en la Primitiva I. La subsección E5 corresponde a un puff con seis bandas difusas muy poco visibles.

**Región Proximal:** incluye tres secciones y nueve subsecciones.

**Sección F (F1- F4):** La subsección F1 es un gran puff que inicia con una banda continua pero muy poco teñida, seguido de un segmento de tamaño considerable donde no se pueden distinguir claramente las bandas, después se encuentran cuatro bandas continuas, heteropicnóticas. La subsección F2 es un segmento pequeño que presenta en su inicio una banda heteropicnótica después de la cual se observa una amplia interbanda y al final se encuentran dos bandas gruesas y oscuras, Entre F1 y F2 se puede observar una constricción leve que no ha sido observada en *D. huancavilcae*. La subsección F3 es un puff que se extiende hasta la subsección F4, este puff inicia con dos bandas heteropicnóticas continuas,

en F3, seguidas por cuatro bandas punteadas y difusas, después de las cuales se observa una banda densamente teñida, ubicada en F4, donde termina el puff, la subsección F4 continua con un segmento homogéneo donde se distinguen siete bandas delgadas y muy poco teñidas.

**Secciones G (G1- G5) y H:** La subsección G1 es un puff con ochos bandas medianamente teñidas y discontinuas. Las subsecciones G2, G3 y G4 corresponden a puffs que no han sido observados en la secuencia de *D. huancavilcae*, pero si se los reporta en *D. guayllabambae* y *D. novemaristata*; además en los límites de cada uno de estos puffs se pueden observar constricciones muy conspicuas. El puff de la subsección G2 presenta cinco bandas delgadas y discontinuas. En la subsección G3 se pueden distinguir cinco bandas medianamente teñidas, intercaladas con interbandas de un grosor considerable. En el puff de la subsección G4 se observan 5 bandas discontinuas levemente teñidas, luego de las cuales se encuentra una banda muy gruesa y densamente teñida donde finaliza esta subsección. La subsección G5 y la sección H corresponden a segmentos muy difusos con bandas muy tenues, estas secciones formarían parte del cromocentro.

#### 5.6.4. CROMOSOMA 4

El cromosoma 4 (Figura 10) de *Drosophila yangana* no presenta rearrreglos cromosómicos, es decir que su secuencia se encuentra altamente conservada y es similar a la secuencias de *D. huancavilcae* y Primitiva I. Este cromosoma ha sido dividido en ocho secciones y 31 subsecciones, cuyas características se destacan a continuación:

**Región Distal:** incluye dos secciones y nueve subsecciones.

**Sección A (A1- A5):** En la subsección A1 se puede observar el telómero con una forma muy peculiar, se podría describir a manera de un jarrón, con 9 bandas heteropicnóticas, cuyo extremo distal se encuentra ensanchado y en su extremo proximal,

justo en el límite con A2, se observa un ensanchamiento en donde se encuentra una banda heteropicnótica más larga que las anteriores la cual le da esta forma característica y fácilmente reconocible. Las subsecciones A2 y A3 son segmentos homogéneos en grosor, en A2 se observan cinco bandas difusas, discontinuas, mientras en A3 se observan cuatro bandas delgadas heteropicnóticas. En A4 se observa un puff con cuatro bandas oscuras y delgadas. La subsección A5 también corresponde a un puff que inicia con cuatro bandas delgadas medianamente teñidas, después de las cuales se encuentra una banda muy gruesa y densamente teñida, marcando el centro del puff, después observamos una banda discontinua levemente teñida seguida por dos bandas heteropicnóticas.

**Sección B (B1- B4):** Las subsecciones B1 y B2 forman un puff. En B1 se pueden observar cuatro bandas, la primera muy gruesa y densamente teñida, las otras tres delgadas y muy poco teñidas. En la subsección B2 se observan seis bandas, las tres primeras levemente teñidas y las tres que le siguen heteropicnóticas. La subsección B3 inicia con dos bandas heteropicnóticas después de las cuales se observa tres bandas delgadas muy poco teñidas. En la subsección B4 se observan dos bandas, la primera delgada y muy poco teñida y la segunda muy gruesa y heteropicnótica

**Región Central:** incluye 4 secciones y 17 subsecciones

**Sección C (C1- C3):** La subsección C1 forma un puff con tres bandas heteropicnóticas claramente visibles. Lo más destacable de C2 es la presencia de una gran constricción, así como también el inicio de un puff que se extiende hasta C3, el cual termina con una banda delgada y densamente teñida que forma una constricción, que es igual de pronunciada que en *D. huancavilcae*.

**Sección D (D1- D5):** La subsección D1 de *D. yangana* corresponde a un segmento de grosor homogéneo donde se observan cuatro bandas gruesas heteropicnóticas, en *D. huancavilcae* este segmento corresponde a un puff. Las subsecciones D2 y D3 forman un

puff en forma de balón en donde se puede observar seis bandas gruesas heteropicnóticas. Las subsecciones D4 y D5 constituyen segmentos homogéneos con bandas difusas.

**Sección E (E1- E5):** La subsección E1 es un segmento uniforme que presenta bandas muy difusas casi imperceptibles. En las subsecciones E2 y en E3 encontramos dos puffs con bandas muy difusas, en el límite entre E2 y E3 se encuentra una constricción pronunciada que no ha sido observada en *D. huancavilcae*, ni en la Primitiva I. Las subsecciones E4 y E5 son segmentos uniformes en grosor con bandas tenues muy difusas.

**Sección F (F1- F4):** La subsección F1 forma un puff con bandas muy poco visibles. En la subsección F2 se observan ocho bandas delgadas heteropicnóticas. En la subsección F3 se observan cuatro bandas, las dos del centro muy oscuras, las dos de los extremos levemente teñidas. La subsección F4 corresponde a un puff grande con 12 bandas delgadas, heteropicnóticas.

**Región Proximal:** incluye dos secciones y seis subsecciones.

**Secciones G (G1- G5) y H:** En la subsección G1 se puede observar tres bandas heteropicnóticas al inicio del segmento, en la parte proximal de este por el contrario las bandas se encuentran difusas pero se pueden divisar dos bandas oscuras al final de esta subsección. En G2, G3 y G4 se puede observar 14 bandas muy teñidas de forma punteada, las cuales varían en su espesor. En la subsección G5 y sección H se pueden observar cinco bandas muy difusas, estas porciones formarían parte del cromocentro.

### 5.6.5. CROMOSOMA 5

El cromosoma 5 (Figura 11) de *D. yangana* presenta una secuencia muy similar a la de *D. huancavilcae* y a la Primitiva I, es decir que este cromosoma no presenta ningún rearrreglo cromosómico. Este cromosoma está dividido en ocho secciones y 32 subsecciones, las cuales serán detalladas a continuación:

**Región Distal:** incluye dos secciones y 10 subsecciones.

**Sección A (A1- A5):** En este cromosoma el telómero es un aspecto muy importante para su reconocimiento debido a su forma muy peculiar y fácilmente reconocible. En los segmentos A1, A2 y A3 se puede apreciar la forma de copa alargada que presenta este cromosoma, en estas tres subsecciones se puede observar 10 bandas heteropicnóticas, discontinuas. En A3 se observa una constricción muy pronunciada formando una especie de cuello en el cual se distinguen tres bandas delgadas y oscuras. En la subsección A4 se observa un ensanchamiento, que corresponde a un puff, en el cual se encuentran cuatro bandas claramente diferenciables, después de esto, se observa un segmento homogéneo con cuatro bandas, la última de las cuales es una banda gruesa y muy oscura. La subsección A5 inicia con una banda muy gruesa y heteropicnótica después de la cual se encuentra un puff que se extiende hasta B1, este puff presenta una banda discontinua en el centro que divide al puff en las dos subsecciones, A5 y B1.

**Sección B (B1- B5):** La subsección B1 corresponde a la segunda mitad del puff que se inicia en A5, en esta subsección se pueden encontrar cinco bandas heteropicnóticas, esta subsección finaliza en una constricción que es mucho más pronunciada que en *D. huancavilcae*. La subsección B2 inicia con dos bandas continuas heteropicnóticas después de las cuales se encuentran cinco bandas difusas. La subsección B3 es un segmento de grosor homogéneo con cuatro bandas de aspecto difuso y entrecortadas. La subsección B4 forma un puff con cuatro bandas heteropicnóticas de diferentes espesores. La subsección B5 corresponde a un segmento corto con alrededor de cinco bandas muy poco teñidas.

**Región Central:** incluye cuatro secciones y 18 subsecciones.

**Sección C (C1- C5):** Las subsecciones C1, C2, C3 y C4 constituyen un segmento homogéneo en grosor en el cual se pueden notar 13 bandas delgadas levemente teñidas. En la subsección C5 se encuentra el inicio de un gran puff romboidal el cual se extiende hasta

D1, en la subsección C5 se pueden observar cuatro bandas delgadas medianamente teñidas. En la secuencia de *D. huancavilcae* este puff no ha sido reportado.

**Sección D (D1- D5):** La subsección D1 constituye la segunda parte del puff que inicia en C5, se pueden observar tres bandas medianamente teñidas. En la subsección D2 se observan seis bandas de distintos grosores heteropicnóticas. La subsección D3 presenta siete bandas, las tres primeras están muy juntas una de otra visualizándose como una sola banda muy gruesa y heteropicnótica, seguida por dos bandas oscuras y continuas después de las cuales se encuentran dos bandas más que se ven como una sola banda porque están muy pegadas entre sí. Las subsecciones D4 y D5 forman parte de un puff, en el que se distingue cuatro bandas densamente teñidas.

**Sección E (E1- E5):** En la subsección E1 se observan cinco bandas heteropicnóticas, muy juntas una de otra. La subsección E2 presenta bandas difusas y difíciles de observar. Las subsecciones E3 y E4 corresponden a un puff. En el inicio de E3 se observa una banda gruesa y muy teñida, después de la cual se observa un segmento con bandas muy difusas y poco distinguibles. En la subsección E4 se observan dos bandas heteropicnóticas. La subsección E5 corresponde a un segmento con bandas delgadas y difusas.

**Sección F (F1- F3):** Las subsecciones F1 y F2 forman un gran puff en cuya parte inicial se observan bandas muy difusas, seguidas de una banda delgada y muy poco teñida, localizada en la parte central, donde termina F1, en la otra mitad del puff localizada en F2 se observa una banda gruesa heteropicnótica. La subsección F3 presenta bandas muy difusas y casi imperceptibles.

**Región Proximal:** incluye dos secciones y cinco subsecciones.

**Secciones G (G1- G4) y H:** En el inicio de la subsección G1, se puede observar una banda gruesa muy poco teñida, seguida de dos bandas heteropicnóticas discontinuas.

Las subsecciones G2, G3 y G4 son segmentos homogéneos con alrededor de siete bandas heteropcnóticas distribuidas en los tres segmentos. La sección H constituye un segmento muy corto en el que se pueden observar bandas de aspecto punteado y difuso.

#### 5.6.6. CROMOSOMA 6

El cromosoma 6 (Figura 12) de *D. yangana*, es el más pequeño de los cromosomas en comparación al resto de cromosomas politénicos de la especie, está constituido en su mayoría por heterocromatina de características similares a las del cromocentro, es decir que no politeniza, además presenta una tasa muy baja de recombinación, por lo tanto una carencia de variación genética (Riddle, 2006). Tiene una secuencia cromosómica similar a la de *D. huancavilcae*, incluye una región, dos secciones y tres subsecciones que serán descritas a continuación:

**Región Proximal:** con dos secciones y tres subsecciones.

**Sección A (A1- A2):** En la subsección A1 se pueden identificar cuatro bandas continuas muy oscuras, claramente diferenciables, mientras en A2 se observan cuatro bandas continuas, la primera y la tercera heteropcnóticas, y la segunda y la cuarta medianamente teñidas.

**Sección H:** Esta sección forma parte del cromocentro.

#### 5.7. COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE *Drosophila yangana* CON LA SECUENCIA DE *Drosophila huancavilcae*

Al realizar la comparación de la secuencia de *D. yangana* con la secuencia de *D. huancavilcae* usada como modelo se notaron varias semejanzas y diferencias que se detallan a continuación:

1) En *D. yangana* se encontraron las seis inversiones correspondientes a la secuencia Primitiva I, estas son: Xa, Xb, Xc, 2a, 2b y 3b, secuencia que es compartida con *D. huancavilcae*.

2) Los telómeros, que ayudan al reconocimiento y diferenciación de cada uno de los cromosomas, son muy similares en las dos especies, a excepción del cromosoma 3 el cual en *D. yangana* presenta una forma de copa ensanchada claramente diferenciable y muy semejante al telómero de la secuencia Primitiva I, mientras en *D. huancavilcae* esta forma peculiar no es notoria.

3) Una diferencia muy clara en *D. yangana*, es la ausencia de la inversión  $2y^5$  que caracteriza a *D. huancavilcae*.

4) En la secuencia de *D. yangana* se encontraron dos nuevas inversiones, la primera localizada en la Región Distal del cromosoma X nominada **XI** y otra encontrada en la Región Central del cromosoma 3: nominada **3I**. Para evitar el incremento de superíndices se utilizaron los literales disponibles en la lista de inversiones de Wasserman, 1992 (Anexo 8) para la nominación de estas nuevas inversiones.

5) En el cromosoma 2 de *D. yangana* se encontró un segmento extra, de 12 bandas que probablemente corresponda a una duplicación, que se encuentra en la región central del cromosoma, en la subsección E1. Este segmento cromosómico está localizado en una zona reportada por Morán, 2001 como punto caliente. Las inversiones que caracterizan a *D. novemariata* y *D. guayllabambae* ( $2b^{10}$  y  $2c^{10}$ ) y la inversión  $2y^5$  de *D. huancavilcae* se encuentran en esta zona. Además en la sección E de *D. yangana* se observan constricciones pronunciadas indicando la fragilidad de ciertos puntos de la sección y su gran exposición a quiebres o roturas.

El establecimiento de “puntos calientes” en ciertas zonas de los cromosomas politénicos indica que la distribución de los mismos dentro de los cromosomas no es al azar pues se han observado inversiones que comparten puntos de rotura o inversiones solapantes, es decir que las inversiones se dan preferentemente en puntos donde los

cromosomas se encuentran más frágiles (González, 2002), tales son los casos de las inversiones  $2b^{10}$  y  $2c^{10}$  de *D. novemariata* y *D. guayllabambae* que son solapantes y las inversiones  $3c$  y  $3u$  reportadas para los subgrupos *fasciola* y *mulleri* respectivamente, las cuales comparten el punto de quiebre G1c (Diniz y Sene, 2004).

También se ha notado que las inversiones en los cromosomas de las especies del grupo *repleta* presentan una distribución no uniforme ya que estas pueden estar dispersas en todos los cromosomas o acumuladas en uno o dos cromosomas en las diferentes especies (González *et al.*, 2007). De esta manera el cromosoma 2 se ha caracterizado primero por ser el cromosoma de mayor tamaño y además por poseer el mayor número de inversiones paracéntricas (211) del grupo *repleta*, con 70.2% del total de inversiones. (Wasserman, 1992). Las inversiones de *D. novemariata*, *D. guayllabambae*, *D. huancavilcae* y el segmento extra de *D. yangana* se acumulan en dicho cromosoma.

La muestra tan reducida que se obtuvo de la población de *D. yangana* para esta investigación no permite asegurar con certeza que el ordenamiento génico: Xabcl, 2ab, 3bl, 4, 5 reportado en este estudio se cumpla para toda la población, sin embargo, es un avance importante y brinda un aporte al conocimiento de esta especie.

## 5.8. SIGNIFICADO EVOLUTIVO

Para entender el significado evolutivo de las inversiones encontradas en la especie *D. yangana* es necesario complementar los datos citológicos obtenidos en esta investigación con los pocos datos previos que se conocen de cromosomas mitóticos, bloques heterocromáticos y distribución geográfica de las especies del subgrupo *inca*.

Uno de los primeros pasos de diferenciación genética en los insectos es la acumulación de bloques heterocromáticos, debido a esto los cambios heterocromáticos

tienen gran interés en evolución, ya que pueden ser usados para determinar el cambio evolutivo de un taxón (Sukowati, 1996; Baimai, 1998; Yoon y Richardson, 2006).

Los bloques heterocromáticos se concentran en especies filogenéticamente derivadas permitiendo sugerir la probable secuencia genética que se encuentra más cercana al ancestro y las diferencias en las tasas de evolución entre las especies (Yoon y Richardson, 2006).

Es así que, estudios realizados por Mafla (2005, 2008) en cromosomas mitóticos de las tres especies del subgrupo *inca* muestran que *Drosophila huancavilcae* presenta la menor acumulación de heterocromatina en los brazos cortos de los cromosomas, seguida por *Drosophila yangana* y finalmente *Drosophila inca* que presenta una concentración mayor. Estos datos nos permitirían considerar la idea de que *Drosophila yangana* y *Drosophila inca* son especies derivadas mientras que *Drosophila huancavilcae* sería una especie ancestral.

Por otro lado en los cariotipos metafásicos de *D. huancavilcae* se ha observado la presencia de un cromosoma 6 telocéntrico, característica morfológica que hace considerarse a esta especie como una forma primitiva del género *Drosophila* (Mafla, 2005) agregando bases para este supuesto.

Además los datos citológicos de cromosomas politénicos de *D. huancavilcae* indican que esta especie presenta en su secuencia cromosómica una sola inversión ( $2y^5$ ) distinta a las seis inversiones de la Primitiva I (Xabc, 2ab, 3b, 4, 5) este hecho llevó a considerar a la especie *D. huancavilcae* como una especie primitiva e inclusive podría ser la hipotética Primitiva I (Romero, 2008), estos hallazgos complementarían la información aportada por la concentración de heterocromatina encontrada en los cromosomas mitóticos de las especies del subgrupo *inca*.

En *D. yangana* por el contrario se han encontrado dos inversiones distintas a las de la Primitiva I, localizadas en los cromosomas X (XI) y 3 (3I) además de una posible duplicación localizada en el cromosoma 2, en la región central, subsección E1, indicando que esta especie conformaría un linaje más moderno.

En suma los datos expuestos previamente nos llevan a pensar que las especies del subgrupo *inca* probablemente atravesaron un proceso alopátrico de especiación a través de aislamiento geográfico, esto pudo haber llevado a un proceso de diversificación que produjo diferenciación citológica originando dos linajes, el más antiguo sería el de *D. huancavilcae* que se encontraría en la costa y el linaje más moderno representado por *D. yangana* estaría en la sierra.

## 6. RECOMENDACIONES

Es primordial que para continuar con los estudios citogenéticos de las especies del subgrupo *inca*, se encuentre un medio de cultivo óptimo que permita la supervivencia de las especies en el laboratorio por varias generaciones y de esta manera obtener una población estable con la cual trabajar.

La realización de muestreos en la Provincia de Loja especialmente hacia el sur de Yangana, sitios que no han sido monitoreados hasta el momento y donde se encuentran remanentes de cactus, son importantes pues es urgente encontrar otros puntos en donde se localice *D. yangana* ya que la única población de esta especie encontrada hasta el momento se limita a un remanente muy pequeño de cactus en peligro de desaparecer y con esta la especie *D. yangana*.

También es importante recolectar y mantener en el laboratorio a *D. inca* y construir el mapa citológico de los cromosomas politénicos de esta especie. La comparación de los mapas citológicos de las tres especies del subgrupo *inca* permitirán entender y establecer de una forma más precisa las relaciones filogenéticas entre estas especies, la posible ruta de evolución del subgrupo y además ayudará a precisar la posición filética del subgrupo *inca* dentro del grupo *repleta*.

Si se logra encontrar un medio de cultivo adecuado para el mantenimiento de las especies en el laboratorio, se podría realizar estudios complementarios como:

- 1) los de selección de hábitat con las especies *D. yangana* y *D. inca* que por ser especies simpátricas son los mejores candidatos para estudios de este tipo puesto que se considera la idea de que la competencia es más intensa entre especies cercanamente relacionadas. La diferenciación de comportamiento llevaría al establecimiento de nichos diferenciados para reducir o eliminar la competencia interespecífica (Fogleman, 1981).

2) la realización de cruzamientos interespecíficos entre las tres especies del subgrupo *inca*, ya que la primera evidencia de aislamiento geográfico es el aislamiento sexual incompleto entre dos poblaciones (Mayr 1963; Kaneshiro, 1980) debido a que el escaso o nulo flujo genético entre especies simpátricas constituye una prueba de un aislamiento reproductor eficaz (Dobzhansky *et al.*, 1980).

Finalmente quiero indicar que debido al rápido crecimiento de la población humana en la zona de Yangana paralela a la destrucción de bosques originarios para ser reemplazados con tierras de cultivo y pastoreo, la única población que se ha encontrado de *D. yangana* hasta el momento es considerada marginal y enfrenta condiciones ecológicas desfavorables provocando una densidad poblacional baja y una alta tasa local de extinción (Prakash, 1973) condiciones óptimas para una posible desaparición de esta especie; por lo cual este y todos los estudios futuros que se realicen en la especie *Drosophila yangana* son urgentes y de gran importancia pues permitirán aportar al conocimiento de esta especie y del subgrupo *inca*.

## 7. LITERATURA CITADA

- Aguirre, Y. 2003. Estado actual de conservación y perspectivas de conservación del romerillo en el sur oriente del Ecuador. Ediciones UNL. Imprenta UTPL. Loja, Ecuador.
- Aguirre, A., Godoy, M. E., Torres, M. P. y Reyes, J. 2006. Caracterización físico-química del fruto de la tuna pp 1-3. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.
- Ananina, G., Peixoto, A. A., Souza, W.N. y Klaczko, L.B. 2002. Polytene Chromosome Map and Inversion Polymorphism in *Drosophila mediopunctata*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil 97 (5): 691-694.
- Baimai, V.1998. Heterochromatin Accumulation and Karyotypic Evolution in Some Dipteran Insects. Zoological Studies 37, 2: 75-88.
- Barker, J. S. F., East, P.D., Phaff, H. J. and Miranda, M. 1984. The Ecology of the Yeast Flora in necrotic *Opuntia* Cacti and of Associated *Drosophila* in Australia. Microbial Ecology 10:379-399
- Barker, J. S. F. 1992. Genetic Variation in Cactophilic *Drosophila* for Oviposition on Natural Yeast Substrates. Society for the Study of Evolution 46 (4): 1 070-1 083.
- Bedoya, G., Barrera, L. 1980. Estudio de algunos Aspectos Morfológicos en Cromosomas Politenicos. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. En: Actualidades Biológicas 9 (31): 16-24.
- Benayas, J. M. 2009. La rareza de las especies. Revista de Investigación y Ciencia 392: 62-69.

- Berghella, L. y Dimitri, P. 1996. The Heterochromatin *rolled* Gene of *Drosophila melanogaster* Is Extensively Polytenized and Transcriptionally Active in the Salivary Gland Chromocenter. *Genetics* 144: 117-125.
- Berkaloff, A., Bourguet, J., Favara, P. y Lacroix, J. C. 1984. *Biología y Fisiología celular IV. Cromosomas, Nucleolos, Envoltura Celular*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.
- Biermann, C. 2009. Ticking Telomeres/Telltale Telomerase. *National Association of biology Teachers (NABT)* 59 (1): 16-20.
- Blackburn, E. H. 2001. Switching and Signaling Review at the Telomere. *Cell*, 106: 661-673.
- Cáceres, M. 2000. *Inversiones Cromosómicas en Drosophila: Origen Molecular y Significado Evolutivo de su Tamaño*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Cañadas, L. 1983. *EL Mapa Bioclimático y Ecológico del Ecuador*. Quito, Ecuador. MAG-PRONAREG. 210 p.
- Diniz, N. M. y Sene, F. M. 2004. Chromosomal phylogeny of *Drosophila fasciola* species subgroup revisited (Diptera, Drosophilidae). *Genetics and Molecular Biology* 27 (4): 561-566.
- Dobzhansky, T., Ayala, F., Stebbins, G. y Valentine, J. 1980. *Evolución*. Ediciones Omega. Imprenta Juvenil S. A. Barcelona, España.
- Durando, C. M., Baker, R. H., Etges, W. J., Heed, W., Wasserman, M. y DeSalle, R. 2000. Phylogenetic Analysis of the *replete* Species group of the Genus *Drosophila* Using

Multiple Sources of Characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16 (2): 296-307.

Ezcurra, E. 1990. ¿Por qué hay tantas especies raras? La riqueza y rareza biológica en las comunidades naturales. *Centro de Ecología UNAM* 4: 82-88.

Fogleman, J. C., Hackbarth, K. y Heed, W. 1981. Behavioral Differentiation Between two species of Cactophilic *Drosophila* III. Oviposition Site Preference. *The American Naturalist* 118 (4): 541-548.

Gardner, E. J. 1971. *Principios de Genética*. Editorial Limusa-Wiley, S.A. México, México.

González, P. J. 2002. *Evolución Comparada de los Elementos Cromosómicos en el género Drosophila*. Título de Doctora en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

González, P. J., Casals, F. y Ruiz, A. 2007. Testing Chromosomal Phylogenies and Inversion Breakpoint Reuse in *Drosophila*. *Genetics* 175: 167-177.

Kaneshiro, K. 1980. Sexual Isolation, speciation and the Direction of Evolution. *Evolution* 34(3): 437-444.

Koltzoff, N. 1934. The structure of the chromosomes in the salivary glands of *Drosophila*. *Science*: 312-313.

Lacadena, J. M. 1996. *Citogenética*. Editorial Complutense S.A. 1ª Edición. Madrid, España.

Mafla, A. B. 2005a. Ciclos de vida y componentes de la aptitud de *Drosophila inca* y *Drosophila yangana* (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia, Sér. Zool.* 95(1):89-91.

- Mafla, A. B. 2005b. Cariotipos Metafásicos de *Drosophila inca* y *Drosophila yangana*, subgrupo *inca*, grupo *repleta*. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas XXVII (1 y 2): 21-25.
- Mafla, A. B. 2008. *Drosophila huancavilcae*: Ciclo biológico y cariotipo Metafásico. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas XIX (1 y 2) 35-39.
- Mayr, R. 1963. Especies Animales y Evolución. Ediciones Ariel. Santiago de Chile, Chile.
- Morán, T. 2001. Cariología Z y Significado Evolutivo del Fenómeno de Asinápsis Somática en *Drosophila novemmaristata* y *Drosophila guayllabambae* (Grupo *repleta*, Subgrupo *hydei*, Díptera Drosophilidae). Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito- Ecuador.
- Morán, T. y Fontdevila, A. 2005. Phylogeny and molecular evolution of the *Drosophila hydei* subgroup (*Drosophila replete* group) inferred from *Xanthine dehydrogenase* gene. Molecular Phylogenetics and Evolution 36 (3): 695-705.
- Pakrash. S. 1973. Patterns of Gene variation in Central and Marginal Populations of *Drosophila robusta*. Genetics 75: 347-369.
- Rafael, V. y Arcos, G. 1989. Subgrupo *inca*, un nuevo subgrupo del grupo *repleta*, con Descripción de *Drosophila huancavilcae*, n.sp. /Díptera, Drosophilidae). Evolución Biológica 3: 233-243.
- Rafael, V. y Vela, D. 2003. *Drosophila yangana* sp. Un nuevo miembro del grupo *repleta*, subgrupo *inca* (Diptera: Drosophilidae). Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador 71: 129-139.

- Ranz, J. M., Maurin, D., Chan, Y., Grotthuss, M., Hillier, L., Roote, J., Ashburner, M. y Bergman, C. 1997a. Principles of Genome Evolution in the *Drosophila melanogaster* species group. Plos Biology 5 (6): 1 366-1 381.
- Ranz, J. M., Segarra, C. y Ruiz, A. 1997b. Chromosomal homology and molecular Organization of Muller's elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. Genetics 145: 281-295.
- Requema, J. M., Arias, P., Lancillotti, F., López, M. C. y Alonso, C. 1987. Organización estructural y de la transcripción en cromosomas politénicos de *Drosophila hydei*. Evolución Biológica. 1: 129-160.
- Riddle, N. C. y Elgin, S. C. R. 2006. The dot chromosome of *Drosophila*: Insights into chromatin states and their change over evolutionary time. Chromosome Research 14: 405-416.
- Romero, G. 2008. Mapa Citológico de los Cromosomas Politénicos de *Drosophila huancavilcae* (grupo *Repleta*, subgrupo *Inca*, Díptera, Drosophilidae. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad católica Del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Ruiz, A. y Heed, W. 1988. Host-Plant Specificity in the Cactophilic *Drosophila mulleri* species complex. Journal of Heredity 81:30-42.
- Ruiz, A., Ranz, J., Cáceres, M., Segarra, C., Navarro, A. y Barbadilla, A. 1997. Chromosomal Evolution and Comparative gene mapping in the *Drosophila repleta* species group. Brazilian Journal of Genetics 20 (4): 553-565.
- Sierra, R. 1999. Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRD y EcoCiencia. Quito, Ecuador. 194 p.

- Shorrock, B. 1972a. Chapter 2: Laboratory Ecology. Life-cycle of *Drosophila melanogaster*. En: *Drosophila* (Hilary Burn, ed.) pp. 31-40. Ginn & Company Limited. London, U. K.
- Shorrock, B. 1972b. Chapter 5: Chromosomes. En: *Drosophila* (Hilary Burn, ed.) pp. 65-70. Ginn & Company Limited. London, U. K.
- Sukowati, S. y Baimai, V. 1996. A standard cytogenetic map for *Anopheles sundaicus* (Diptera: Culicidae) and evidence for chromosomal differentiation in populations from Thailand and Indonesia. *Genome* 39: 165-173.
- Tatarenkov, A. y Ayala, F. J. 2001. Phylogenetic Relationships among Species Groups of the *virilis-repleta* Radiation of *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21 (2): 327-331.
- Throckmorton, L. H. 1982. Pathways of Evolution in the Genus *Drosophila* and the Pounding of the *Repleta* group. *Ecological genetics and Evolution* 33-37.
- Wasserman, M. 1960. Cytological and Phylogenetic relationships in the *repleta* group of the genus *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 56 (6): 842-859.
- Wasserman, M. 1963. Cytology and Phylogeny of *Drosophila*. *The American Naturalist* XCVII (869): 333-352.
- Wasserman, M. 1982a. Evolution of the *repleta* group. En: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol 3b. (M. Ashburner, H. L. Carson y J. N. Thompson, JR. eds.) pp. 61-139.
- Wasserman, M. 1982b. Cytological evolution in the *Drosophila repleta* species group. *Ecological Genetics and Evolution* 49-64.

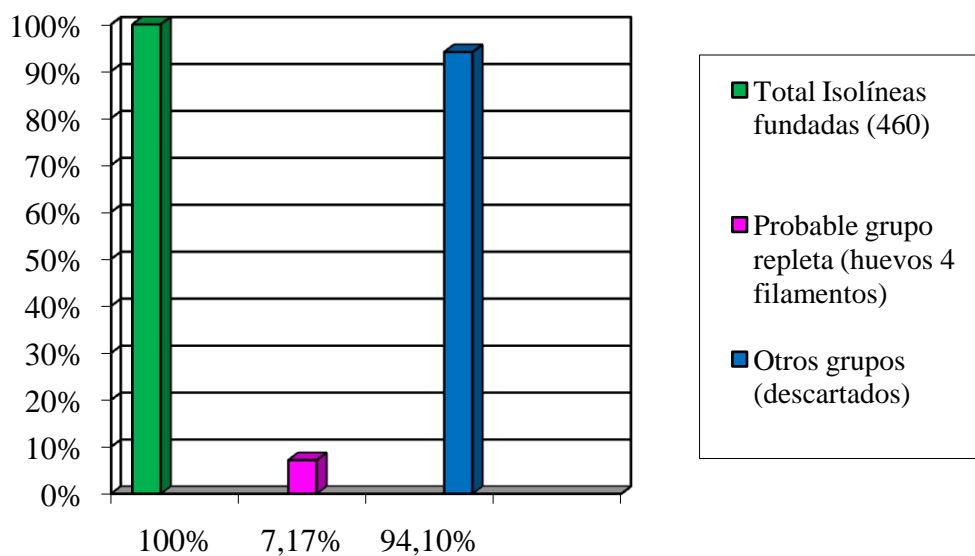
- Wasserman, M. 1992. Cytological Evolution of the *Drosophila repleta* species group. En: *Drosophila* inversion polymorphism. (C.B. Krimbas y J.R. Powell eds) pp. 455-552. CR. C Press, Boca Ratón, Florida, U.S.A.
- Wolfgang, H., Vogt, P., Jacob, G. y Siegmung, I. 1982. Nucleolus Organizer Regions in *Drosophila* Species of the *repleta* group. *Chromosoma* 87: 279-292.
- Yoon, J., Richardson, R. y Wheeler, M. 1973. A Technique for Improving Salivary Chromosome Preparations. *Experientia* 29: 639-641.
- Zhang, P. y Spradling. A. C. 1994. The *Drosophila* Salivary Gland Contains Highly Polytenized Subdomains of Mitotic Heterochromatin. *Genetics* 139: 659-670.
- Zorus, E. 1982. On the Role of Chromosomal Inversion in Speciation. *Evolution* 36(2): 414-416.

## **8. FIGURAS**

## 9. TABLAS

**Tabla 1. Registro de isolíneas fundadas de las diferentes localidades de la provincia de Loja en agosto del 2008.**

<b>Puntos de colecta</b>	<b>N° Isolíneas Fundadas (grupo <i>repleta</i> y otros grupos)</b>	<b>N° Isolíneas Descartadas (otros grupos)</b>
Yangana	192	184
Zuro	143	130
Quinara (antes del puente)	105	95
Quinara (después del puente)	13	13
Mandango	7	5
<b>Total Isolíneas</b>	<b>460</b>	<b>427</b>
<b>Total tubos Descartados</b>	<b>427</b>	<b>Tubos de otros grupos (huevos 2 filamentos)</b>
<b>Total tubos Conservados</b>	<b>33</b>	<b>Tubos con probables especies del grupo <i>repleta</i> (huevos 4 filamentos)</b>



**Tabla 2. Número de isolíneas con la categoría: huevos de 4 filamentos y número de individuos pertenecientes a las especies del subgrupo *inca* encontradas en las diferentes localidades de la provincia de Loja en Agosto del 2008.**

<b>Localidad</b>	<b>N° Isolíneas conservadas probable grupo <i>repleta</i> (huevos 4 filamentos)</b>	<b>N° de individuos pertenecientes a las especies del subgrupo <i>inca</i></b>	<b>Especie</b>
Yangana	5	1	<i>Drosophila inca</i>
Suro	12	0	
Quinara	12	0	
Mandango	4	0	
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>1</b>	

**Tabla 3. Comparación de número de individuos de *Drosophila yangana* vs. Número de individuos de especies del grupo *repleta* en colectas realizadas en diferentes años en la provincia de Loja.**

Años de colecta	Nº de individuos de especies grupo <i>repleta</i>	Nº individuos de <i>D. yangana</i>	Porcentaje de indiv. <i>D. yangana</i> (%)
2000*	13	0	0
2001*	3	3	100
2002*	63	16	25.4
2008\Agos.	27	0	0
2008\Nov.	208	99	47.6

\*(Tomado de Rafael y Vela, 2003)

**Tabla 4. Comparación de número de individuos de diferentes especies del grupo *repleta* vs. Número de individuos de otras especies en colectas realizadas en diferentes años en la provincia de Loja.**

<b>Años de colecta</b>	<b>N° individuos de otras especies</b>	<b>N° indiv. de especies grupo <i>repleta</i></b>	<b>Porcentaje de indiv. de especies grupo <i>repleta</i> (%)</b>
2000*	2356	13	0.55
2001*	19	3	15.79
2002*	93	63	67.74
2008\Agos.	2584	27	1.04
2008\Nov.	4406	208	4.72

\*(Tomado de Rafael y Vela, 2003)

**Tabla 5. Número de tubos de *Drosophila yangana* multiplicados y generaciones que sobrevivieron (colecta noviembre del 2008)**

Tubos originales	Tubos fundados a partir originales	Nº tubos (F2)	Nº tubos (F3)	Nº tubos (F4)	Nº tubos (F5)	Nº tubos (F6)
33	Tubo 1 (F1) Tubo 1a (F1)	1a.1 1a1.1 1a.1.2 1a.1.4	1a.2 1a.3 1a.4 1a.5 1a.6 1a.1.3 1a.5.1 1a.5.2	..... ..... ..... 1a.5.3 ..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	Tubo 2 (F1)	2a 2b 2c	2a.1 2a.2 2a.2.1 2b.1 2a1.1 2b.2 2b.2.1 2b.2.2	2a.1.2 2a.1.3 2a.1.4 2a.1.3.1	2a.1.3.1 2a.1.3.2 2a.1.4.1 2a.1.4.2 2a.1.3.1.1 2a.1.3.2.1 2a.1.3.2.2 2a.1.4.1.1 2a.1.4.1.2 2a.1.4.2.1	2a.1.3.1.2 2a.1.4.2.2 2a.1.3.2.3 2a.1.3.1.3 2a1.4.2.5
34	Tubo 3 (F1) Tubo 3a (F1) Tubo 3b (F1)	3a.1 3a.1.1 5 6 7 8 9 10 11 5.1 6.1 8.1 9.1	3a.1.1 ..... 5.2 5.3 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	..... ..... 5.2.1 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	Tubo 4 (F1) Tubo 4a (F1)	4a.1	4a.1	.....	.....	.....

## **10. ANEXOS**

**Anexo 1. Comparación de algunos caracteres taxonómicos entre *D. inca*, *D. huancavilcae* y *D. yangana* sp. Nov. (Tomado de Rafael y Vela, 2003).**

<b>Caracteres taxonómicos</b>	<b><i>D. inca</i></b>	<b><i>D. huancavilcae</i></b>	<b><i>D. yangana</i> sp.nov.</b>
Edeago	<i>La parte ventral posterior inferior en punta, margen ventral aserrado</i>	La parte ventral postero inferior en punta, el margen central aserrado, presenta esclerotizaciones	Parte superior de forma semitriangular, con microproyecciones en la parte lateral del edeago
Gonopodio	Redondeado, un poco ovalado y desnudo	Alargado y desnudo	Semiovalado y desnudo
Índice del edeago	1	1	1.5
Índice de espermateca	1.57	1.2	1.4
Número de vueltas de los testículos	4 externas 2 internas	4- 5.5 externas 2-3 internas	3.4-4 externas 3-2.5 internas
Número de vueltas del receptáculo ventral	23	17-16	10
Longitud del cuerpo	2.4-2.8	2.5-2.9	2.8
Pupa: digitaciones	10	5-6	11-13

**Anexo 6. Comparación de componentes de la aptitud entre *Drosophila huancavilcae*, *Drosophila yangana* y *Drosophila inca* (Tomado de Mafla 2005a, 2008).**

<b>Especies/ Componentes de la aptitud</b>	<b><i>Drosophila huancavilcae</i></b>	<b><i>Drosophila yangana</i></b>	<b><i>Drosophila inca</i></b>
<b>Fertilidad</b>	67.97%	88.7%	92.7%
<b>Viabilidad</b>	64.4%	81.2%	86.6%
<b>Velocidad de Desarrollo</b>	23.4733+/-2.6601	21.6+/- 4.1	22.3+/- 4.7
<b>Maduración</b>	5.077+/- 1.6831	5.8+/- 2.1	5.7+/-2.3