

ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE *Diglossa humeralis aterrima*, *Diglossa lafresnayii* y
Diglossa sittoides EN ECOSISTEMAS ALTOANDINOS

LIZETH CAROLINA ROSERO ZAMBRANO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2007

ESTUDIO CITOGENÉTICO DE *Diglossa humeralis aterrima*, *Diglossa lafresnayii* y
Diglossa sittoides EN ECOSISTEMAS ALTOANDINOS

LIZETH CAROLINA ROSERO ZAMBRANO

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo con énfasis en Ecología

Directora
M.Sc. MARTA LUCIA BUENO

Director
M.Sc. JHON JAIRO CALDERÓN

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2007

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas de su autor.

Artículo 1º del acuerdo No. 32 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

Director

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2007

DEDICATORIA

A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

A mis padres, que se merecen más que el título que obtengo, fueron participes activos en mi formación y en mis valores, los amo a ustedes y a mis hermanitos. Siempre serán la bendición de mi vida.

A mi esposo, por su apoyo, cariño, respeto y colaboración durante todo este proceso... Por ser, por estar, por existir.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Genética. Grupo de Cariología. Universidad Nacional de Colombia por el inmenso apoyo técnico y científico.

Al Laboratorio de citogenética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional de Colombia. Por el entrenamiento en la preparación de reactivos y manejo de protocolos.

A la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Nariño, por el préstamo de laboratorios de Medicina para el desarrollo de mi trabajo.

A la Asociación GAICA, por el apoyo logístico y las discusiones tan enriquecedoras en torno a las aves.

A Lucila Riáscos por su constante colaboración.

Un agradecimiento especial a Jhon Jairo Calderón, por enseñarme el mundo de las aves, por que con sus consejos apoyo y estímulo ha orientado mi camino como profesional, por sus enseñanzas, por dirigirme de la mejor manera en cada momento, por su constante ayuda por la confianza que siempre ha tenido en mi, y sobretodo por su amistad.

A Martha Bueno quien con su vasta experiencia y conocimiento en el área de citogenética me preparo desde el comienzo y estuvo conmigo a pesar de la distancia con sus invaluable enseñanzas, por su paciencia, apoyo y confianza en mi como persona y en mi trabajo gracias por no perder la fe y guiar los destinos de mi trabajo por su colaboración y amistad.

Agradezco a mis Padres por su esfuerzo, su comprensión, su apoyo incondicional en todo momento por brindarme su amor y enseñarme que hay caminos difíciles de recorrer pero no imposibles.

A mi hermano por interesarse y compartir un poquito de mi mundo en la Biología, por su compañía y su cariño, a mi hermanita por ser la alegría de mi vida.

A mi familia de la que me siento muy orgullosa y a la que considero el gran valor de mi vida quienes han sido mi constante respaldo.

A mi esposo por todo el amor y la comprensión que me ha brindado, por ser mi fuerza y el impulso para seguir siempre adelante. Por ser el cómplice en mis decisiones y mi apoyo en este largo camino.

A mis amigas Leidy, Paty, Yina, Silvana, Mónica, y Natalia quiero agradecerles su tiempo sus palabras y su apoyo.

A las profesoras Luz Estela y Jaqueline por la orientación y sugerencias tan acertadas para la culminación de este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	20
1. OBJETIVOS	23
1.1 OBJETIVO GENERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
2. MARCO REFERENCIAL	24
2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS	24
2.2 LOS CROMOSOMAS SEXUALES DE LAS AVES	26
2.3 AVES DEL GÉNERO <i>Diglossa</i>	27
2.3.1 <i>Diglossa humeralis</i> : diglosa negra.	28
2.3.1.1 <i>Diglossa humeralis aterrima</i> : carbonero.	28
2.3.2 <i>Diglossa lafresnayii</i> : diglosa lustrosa.	29
2.3.3 <i>Diglossa sittoides</i> : diglosa canela.	30
2.4 CITOGENÉTICA	31
2.4.1 Nomenclatura de componentes cromosómicos.	33
2.4.2 Clasificación cromosómica.	34
2.4.3 Bando cromosómico.	35
2.4.4 Cromosomas, cariotipo y taxonomía.	36
2.5 CITOGENÉTICA EN AVES	37
2.5.1 Características del genoma de aves.	38
2.5.1.1 Consideraciones sobre el cariotipo del orden Passeriformes.	39

2.6 EVOLUCIÓN	40
2.6.1 Esquema evolutivo de los cromosomas sexuales de las aves.	41
2.7 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS CARIOLÓGICO	42
2.7.1 Técnicas de cultivos celulares.	42
2.7.2 Técnicas de cultivos celulares en aves.	44
3. METODOLOGÍA	46
3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ÁREA DE ESTUDIO	46
3.1.1 Santuario de Flora y Fauna Galeras.	46
3.1.2 Laguna de La Cocha.	46
3.1.3 Alto de Daza.	47
3.1.4 Jardines Universidad de Nariño.	47
3.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA	48
3.2.1 Obtención de los ejemplares.	48
3.3 FASE DE CAMPO	50
3.3.1 Animales experimentales.	50
3.3.2 Determinación del sexo morfológico.	51
3.4 FASE DE LABORATORIO	53
3.4.1 Valoración de las técnicas.	53
3.5 ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE LA ESPECIE	53
3.5.1 Determinación del número cromosómico.	53
3.5.2 Determinación del sexo cromosómico.	53
3.6 BIOMETRÍA CROMOSÓMICA	54
3.6.1 Idiogramas.	55

4. RESULTADOS	56
4.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA	56
4.1.1 Tiempo de acción de colchicina.	58
4.1.2 Pruebas en tiempo de hipotónica KCL (0.075M).	59
4.1.3 Fijación.	60
4.1.4 Cultivo corto de médula ósea.	61
4.2 CARACTERIZACIÓN CITOGÉNÉTICA	66
4.2.1 Valoración de las técnicas.	67
4.3 ANALISIS CITOGÉNÉTICO DE LA ESPECIE	68
4.4 BIOMETRÍA CROMOSÓMICA	72
5. DISCUSIÓN	78
6. CONCLUSIONES	83
7. RECOMENDACIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXOS	92

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. <i>D. humeralis aterrima</i> .	29
Figura 2. Mapa de distribución de <i>D. humeralis</i> .	29
Figura 3. <i>D. lafresnayii</i> .	30
Figura 4. Mapa de distribución de <i>D. lafresnayii</i> .	30
Figura 5. <i>D. sittoides</i> . a) Macho de <i>D. sittoides</i> ; b) hembra de <i>D. sittoides</i> .	30
Figura 6. Mapa de distribución de <i>D. sittoides</i> .	31
Figura 7. Posición centromérica.	35
Figura 8. Esquema de la evolución, propuesta de cromosomas sexuales en las aves.	42
Figura 9. Puntos de muestreo en las áreas de estudio.	48
Figura 10. Disección del cuerpo del ave para la observación de gónadas.	52
Figura 11. Células observadas en las láminas teñidas con tinción convencional Giemsa: a) Estimuladas; b) no estimuladas.	56
Figura 12. Metafases observadas de acuerdo al grado de condensación y dispersión: a) Condensadas. b) óptimas. c) menos condensadas.	59
Figura 13. Obtención de metafases a partir de Médula ósea: a) Inyección de colchicina (intramuscular); b) tratamiento con fermento (intraperitoneal); c) extracción de huesos; d) colecta de células.	63
Figura 14. Cultivo corto de médula: a) Siembra de la muestra; b) cosecha; c) tinción.	64
Figura 15. Cariotipo de una hembra de <i>D. humeralis aterrima</i> con tinción convencional Giemsa.	70
Figura 16. Cariotipo preliminar de un macho de <i>D. humeralis aterrima</i> con tinción Giemsa.	70
Figura 17. Cariotipo preliminar de un macho de <i>D. lafresnayii</i> con tinción convencional Giemsa.	71
Figura 18. Cariotipo de una hembra de <i>D. sittoides</i> con tinción convencional Giemsa.	71
Figura 19. Idiogramas de los Macrochromosomas de las especies analizadas: a) <i>D. humeralis aterrima</i> ; b) <i>D. lafresnayii</i> ; c) <i>D. sittoides</i>	76

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clasificación cromosómica.	34
Tabla 2. Variables evaluadas.	50
Tabla 3. Procedencia de animales experimentales.	51
Tabla 4. Protocolos empleados para los ejemplares.	57
Tabla 5. Pruebas en tiempo de acción de colchicina.	58
Tabla 6. Pruebas en tiempo de hipotónica KCl (0.075 M).	60
Tabla 7. Condiciones para cultivo corto de médula ósea.	61
Tabla 8. Identificación de sexo morfológico en las especies de <i>Diglossa</i> analizadas.	65
Tabla 9. Identificación de sexo cromosómico en las especies de <i>Diglossa</i> analizadas.	66
Tabla 10. Valoración de técnicas empleadas.	67
Tabla 11. Índice mitótico para los ejemplares estudiados.	68
Tabla 12. Número de cromosomas observados en las metafases.	68
Tabla 13. Resultados de estadística descriptiva para Relación de Brazos (R.B).	72
Tabla 14. Resultados de estadística descriptiva para Índice Centromérico (I.C).	73
Tabla 15. Resultados de estadística descriptiva para Longitud Relativa (L.R).	73
Tabla 16. Clasificación de Macrocromosomas de <i>D. humeralis aterrima</i> , <i>D. lafresnayii</i> y <i>D. sittoides</i> por Índice centromérico y Relación de brazos.	75

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Protocolo para limpieza de láminas.	92
Anexo B. Protocolos base reportados.	93
Anexo C. Réplica para la evaluación de variables en los protocolos empleados.	96
Anexo D. Protocolos con modificaciones - Médula directa	98
Anexo E. Médula directa - Tratamiento con Fermento.	99
Anexo F. Cultivo corto de médula con inyección de colchicina y fitohemaglutinina <i>in vitro</i> .	100
Anexo G. Cultivo corto de médula con inyección de fitohemaglutinina <i>in vivo</i> .	101
Anexo H. Resultados prueba de Shapiro Will	101
Anexo I. Valores de Biometría Cromosómica en <i>D. humeralis aterrima</i> .	103
Anexo J. Valores de Biometría Cromosómica en <i>D. lafresnayii</i> .	104
Anexo K. Valores de Biometría Cromosómica en <i>D. sittoides</i> .	106

RESUMEN

En el presente trabajo son descritos por primera vez el número cromosómico y la morfología básica del cariotipo de *D. humeralis aterrima*, *D. lafresnayii* y *D. sittoides* pertenecientes al género *Diglossa* familia Thraupidae. Las preparaciones para la obtención de los cariotipos fueron realizadas a partir de técnicas directas y cultivos cortos de médula ósea con colchicina *in vivo* e *in vitro*, empleando modificaciones de las técnicas convencionales ya reportadas. El tiempo óptimo de cultivo fué de 24 horas, en medio Iscove's enriquecido con 20% de Suero Fetal Bovino (SFB) empleando como mitógeno fitohemaglutinina – P (PHA - P) al 0.07% *in vivo* e *in vitro*, el tiempo con colchicina fué de 50 minutos y el tratamiento de solución hipotónica de 50 minutos, se realizó tratamiento de prefijación con carnoy 3:1. Y se reporta un nuevo protocolo que puede emplearse en citogenética de aves de pequeño porte (Cultivo corto de médula con inyección de fitohemaglutinina (PHA) *in vivo*).

Se estudiaron citogenéticamente tres machos de *D. humeralis aterrima* y dos hembras, un macho de *D. lafresnayii* y cuatro hembras de *D. sittoides*. Se encontró que *D. humeralis aterrima* presenta $2n = 56-82$ cromosomas, con ocho pares de macrocromosomas y 20 a 33 pares de microcromosomas. El cromosoma Z es submetacéntrico y el cromosoma W es metacéntrico los cuales corresponden en tamaño al par uno y quinto par del complemento autosómico. Dentro de los macrocromosomas los pares uno a cuatro son submetacéntricos y del cinco al siete son acrocéntricos. *D. lafresnayii* presenta $2n = 66-82$ cromosomas, con ocho pares de macrocromosomas y 25 a 32 pares de microcromosomas. El cromosoma Z es metacéntrico y en tamaño equivale al par uno, no se observó el cromosoma W en esta especie que pudiera ser analizado. Dentro de los macrocromosomas, los pares uno a cuatro son submetacéntricos y del cinco al par siete acrocéntricos al igual que en *D. humeralis aterrima*. En *D. sittoides* el complemento $2n = 54-60$ cromosomas, con ocho pares de macrocromosomas y 19 a 22 pares de microcromosomas. El cromosoma Z es submetacéntrico y el cromosoma W acrocéntrico los cuales corresponden en tamaño al par tres y cinco del complemento autosómico. Dentro de los macrocromosomas, el par uno es metacéntrico y del dos al siete comparten una morfología idéntica con las otras dos especies de *Diglossa*. En todos los casos la identificación del sexo morfológico correspondió al sexo cromosómico, determinado en los cariotipos. Sin embargo para una mejor interpretación de posibles mecanismos de evolución cariotípica en este género se sugiere estudiar un mayor número de individuos y especies.

ABSTRACT

In this work are described for first time the chromosomic number and Basic morphology of the cariotype of *Diglossa humeralis aterrima*, *D. lafresnayii* y *D. sittoides* wich belongs to the *Diglossa* genere, thraupidae family. The preparations to obtain chariotypes were made starting from direct techniques and short cultures of bone marrow, with colchicyne “*in vivo*” and “*in vitro*” using modifications on the convencional techniques alredy reported. The optimal time for cultivation was 24 hours in a rich Iscove’s enviroment with 20% of fetal bovine serum (SFB) using as a mithogenus fitohemaglutine-P (PHA-P) at 0.07% “*in vivo*” and “*in vitro*”. The time with colchicyne was of 50 minutes and the treatment of hypotonic solution of 50 minutes. A prefixation treatment was made with carnoy 3:1 and it reports a new protocol wich is can used on small port birds citogenetics (short culture of marrow with fitohemaglutine injection (PHA) *in vivo*).

Three males of *D. humeralis aterrima* and two females, a male of *D. lafresnayii* and four females of *D. sittoides* were cytogenetically studied. It founds that *D. humeralis aterrima* present $2n = 56-82$ chromosomes with eight pairs of macrochromosomes and 20 to 33 pairs of microchromosomes. The Z chromosome is submetacentric and the W chromosome is metacentric wich one belongs in size to the pair one and fifth pair of the autosomic complement. Inside the macrochromosomes the pairs one to four are submetacentric and from five to seven are acrocentric. *D. lafresnayii* presents $2n = 66-82$ chromosomes with eight pairs of macrochromosomes and 25 to 32 pairs of microchromosomes. The Z chromosome is metacentric and is equal in size to the pair one. It can’t observe the W chromosome on this specie wich can be analized. Inside the macrochromosome the pairs one to four are submetacentric and from the fifth to the seventh pair achrocentric like in *D. humeralis aterrima*. In *Diglossa sittoides* the complement $2n = 54-60$ chromosomes with eight pairs of macrochromosomes and 19 to 22 pairs of microchromosomes. The Z chromosome is submetacentric and the W achrocentric wich ones belongs in size to the pairs three to five of the autosomic complement. Inside the macrochromosome the pair one is metacentric and from two to seven share an identic morphology with the two other *Diglossa* species. In all the case morphologic genre identification belongs to the chromosomic genre determinated on the charotypes. However for a better interpretation of the possible mechanisms for the chariotypic evolution on this genre it suggest to study a longest number of species and individuals.

GLOSARIO

AUTOSOMAS: cualquier cromosoma que no sea sexual.

BANDEO CROMOSÓMICO: tratamiento y tinción de los cromosomas que permiten obtener una secuencia característica de bandas e interbandas transversales sobre los cromosomas.

CARIOTIPO: dotación cromosómica completa de un individuo o una especie que puede observarse durante la mitosis. También se refiere a la presentación gráfica de los cromosomas, ordenados en pares de homólogos y que se puede describir conforme a una nomenclatura convencional.

CITOGENÉTICA: ciencia producto de la combinación de la citología y la genética, que estudia la morfología y comportamiento de los cromosomas vistos durante la división celular mediante el microscopio óptico.

CROMOSOMA: son estructuras complejas localizadas en el núcleo de las células, compuestos por ADN, histonas y otras proteínas, ARN y polisacáridos.

EUCROMATINA: cromatina genéticamente activa, desenrollada en interfase y que se tiñe mas intensamente durante la mitosis en la cual adquiere un estado condensado en forma de hélice.

HETEROCROMATINA: cromatina transcripcionalmente inactiva que muestra alta condensación durante la interfase y se replica al final de la fase S del ciclo celular (heterocromatina constitutiva). La heterocromatina facultativa está constituída por eucromatina que adquiere las características de la heterocromatina en determinados estadíos del desarrollo.

IDIOGRAMA: es un mapa cromosómico diagramático.

MACROCROMOSOMAS: pares cromosómicos relativamente grandes.

MICROCROMOSOMAS: pares cromosómicos pequeños.

INTRODUCCIÓN

Nariño representa aproximadamente el 10% de la avifauna presente en Colombia, considerado como un departamento que alberga en su territorio una megadiversidad biológica, por su variedad climática, sus diferentes zonas de vida, pisos térmicos y gradientes altitudinales entre otros. Esta diversidad considerable de avifauna se incluye dentro de criterios ornitológicos cuantitativos basados en el conocimiento más exacto y actualizado de la distribución de las especies, tamaños y tendencias de las poblaciones¹, los cuales se agrupan bajo cuatro categorías principales: sitios que regularmente mantienen especies amenazadas, sitios que mantienen regularmente especies endémicas o con áreas de distribución restringida, sitios que regularmente mantienen grupos de especies confinadas en gran parte a un bioma o una comunidad biótica única y amenazada, y sitios donde las aves forman grandes grupos o congregaciones (bien sea en su época reproductiva, durante el invierno norteño o durante la migración)². El conocimiento de estos criterios nos involucra en la tarea de incrementar esfuerzos en la conservación de la diversidad a todo nivel: genético, de especies, de poblaciones, de ecosistemas y de paisajes³.

Para que se puedan diseñar políticas claras en conservación es primordial esclarecer la taxonomía y las relaciones entre los diferentes grupos animales⁴; por lo cual es necesario recolectar información de utilidad en diferentes campos como sistemática evolutiva, morfología, fisiología, historia natural, genética y biología molecular de las especies entre otras⁵, con el fin de obtener un mejor conocimiento de la avifauna y de los factores que ponen en riesgo su integridad⁶.

Teniendo en cuenta lo anterior, BirdLife International, creó el programa de Áreas de Importancia para la Conservación de las Aves (AICAS), uno de los proyectos claves enmarcados dentro de la Estrategia Nacional para la Conservación de las

¹ BirdLife Internacional y Conservation International. 2005. Áreas Importantes para la Conservación de las Aves en los Andes Tropicales: Sitios prioritarios para la Conservación de la Biodiversidad. Quito. Ecuador: BirdLife Internacional (Serie de conservación de BirdLife No 14). 769 p.

² Preguntas comunes sobre las Áreas Importantes para la Conservación de las Aves AICAS de Colombia. [en línea]. [citado en 3 de Abril de 2007]. Disponible en Internet: <<http://www.humboldt.org.co/conservacion/aicas/faqs.html>>.

³ BirdLife Internacional y Conservation International, Op. cit., p.769.

⁴ LÓPEZ C, E.J. & PÉREZ, S.G. 1999. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. Bol. SEA. 26: p. 46. Madrid España: Universidad de Alcalá. Departamento de Biología Animal. [en línea]. [citado en 19 de Febrero de 2007]. Disponible en Internet: <http://www.mackenzie.com.br/universidade/exactas/docentes/paginas/leda/material/textcito/evolucrm_doc>.

⁵ SIMONS, J.E & MUÑOZ SABA, J. 2005. Cuidado, Manejo y conservación de las Colecciones Biológicas. Conservación Internacional. Instituto de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Serie Manuales de campo. Bogotá. 288 p.

⁶ FRANCO, A.M., MUNERA, C. & BRAVO, G. 2005. Libro AICAS. Áreas Importantes para la Conservación de las Aves en Colombia. En BirdLife Internacional, Op. cit., p.17.

Aves. Para Nariño se han declarado seis AICAS dentro de las cuales se encuentran: Reserva Natural el Pangan, Reserva Natural Río Ñambí, Lago Cumbal, Reserva Natural La Planada, Santuario de Flora y Fauna Galeras (SFFG) y Laguna de La Cocha⁷. La significancia global, continental o nacional de las AICAS dependerá de los criterios bajo los que califiquen.

En los ecosistemas altoandinos de Nariño uno de los géneros mas representativos es el género *Diglossa*; a este género pertenecen las especies *D. lafresnayii* y *D. humeralis aterrima* las cuales están incluidas en las aves que presentan criterios ornitológicos cuantitativos, estas dos especies se ubican en la categoría A3 que corresponde al conjunto de especies restringidas a un bioma. Este criterio se aplica a grupos de especies que habitan mayoritaria o completamente dentro de un bioma en particular y son por lo tanto, de importancia mundial ayudando específicamente a identificar AICAS en regiones con hábitats relativamente intactos y homogéneos^{8,9}.

Sumado a esto, estudios en los mecanismos de especiación de las aves que viven en los habitats abiertos de los altos andes de Suramérica han demostrado que el género *Diglossa* es un modelo interesante para los evolucionistas por que presenta una amplia gama de fenómenos detectados en la especiación, estos estudios han revelado que *Diglossa* se encuentra en un estado de cambio evolutivo dinámico y que sigue habiendo mucho trabajo por hacer antes de comprender completamente los mecanismos de este cambio; esto se vé reflejado en que el género no se ha ubicado con total certeza dentro una familia. *Diglossa* está en una fase de evolución activa y su radiación adaptativa aún no ha terminado¹⁰ por esta razón en el presente estudio se pretende proporcionar una nueva Fuente de información que pueda contribuir en la determinación de jerarquías sistemáticas y procesos evolutivos además de dar inicio a la caracterización cromosómica de aves altoandinas en Nariño.

A pesar de la enorme diversidad y del inminente peligro de muchas especies aviares en Suramérica, muy poco se conoce genéticamente de las mismas; los estudios en cromosomas de aves son muy escasos y aunque el orden Passeriformes al cual pertenecen las diglosas posee el mayor número de especies cariotipadas, no existe ningún reporte cariológico para las especies del género *Diglossa*. Es por eso que se plantea la necesidad de desarrollar técnicas que puedan ser utilizadas en estudios genéticos y poblacionales en diversas especies

⁷ BirdLife Internacional, Op. cit., p.17.

⁸ PARKER, T.A., STOTZ, D.F. & FITZPATRICK, J.W. 1996. Ecological and distributional databases for Neotropical birds. Chicago: Chicago University Press.

⁹ STOTZ, D.F., FITZPATRICK, J.W., Parker, T.A. & MOSKOVITS, D.K. 1996. Neotropical birds: ecology and conservation: Chicago: Chicago University Press.

¹⁰ VUILLEUMIER, F. 1969. Systematic and evolution in *Diglossa* (Aves Coerebidae). American Museum. Novitates No 2381: p. 1.

de aves¹¹; utilizando la citología, una de las herramientas que nos brinda información con fines clasificativos, que en términos citotaxonómicos trabaja con base en datos citogenéticos considerando número de cromosomas, morfología, patrón de bandas, cantidad de ADN, número y posición de Regiones Organizadoras de Nucleolo (NOR), ADN satélites, etc. logrando plantear hipótesis en la diferenciación de especies a escala cromosómica¹².

Los análisis citogenéticos, han contribuido en el establecimiento de relaciones taxonómicas y evolutivas entre varios grupos, ayudan a entender el papel de los reareglos cromosómicos en la especiación y contribuyen a la diferenciación de cromosomas sexuales posibilitando la identificación del sexo¹³.

El análisis comparativo de datos citogenéticos de tres especies de *Diglossa* que se presenta en este estudio ha permitido distinguir características derivadas, es decir exclusivas de cada especie y características básicas que son comunes a todas o a la mayoría de ellas; se identificó el sexo en especies que no presentan dimorfismo sexual fenotípico aparente, como es el caso de *D. lafresnayii* y *D. humeralis aterrima*, gracias al heteromorfismo existente entre los cromosomas sexuales. Como resultado de la investigación se obtuvo los cariotipos básicos de tres especies del género *Diglossa*, que de acuerdo con López & Pérez¹⁴, “proporcionan una Fuente nueva de caracteres e información para diferenciar o reafirmar aspectos de clasificación, y contribuir al conocimiento de la variación de los cromosomas y su papel en la taxonomía de estas especies; así como un acercamiento a los cambios que han tenido lugar a lo largo de la evolución”

¹¹ DE LUCCA, E.J., & ROCHA, G.T. 1992. Citogenética de aves, Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, ser. Zool. 8 (1). p. 34.

¹² LÓPEZ & PÉREZ, Op. cit., p.45.

¹³ DE LUCCA & ROCHA, Op. cit., p.40.

¹⁴ LÓPEZ & PÉREZ, Op. cit., p. 48.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los cariotipos de *Diglossa humeralis aterrima*, *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa sittoides* con la técnica directa de médula ósea.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica directa de médula ósea con colchicina *in vivo* e *in vitro* para la obtención de cromosomas de especímenes del género *Diglossa*.
2. Determinar el cariotipo preliminar correspondiente a cada una de las especies analizadas, estableciendo el número y morfología cromosómica elaborando los idiogramas correspondientes para cada una de las variantes.
3. Correlacionar el sexo morfológico determinado por disección con los resultados citogenéticos.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los primeros datos acerca del complemento cromosómico de las aves se remontan al año 1902, cuando Guyer analizó la espermatogénesis en *Columba livia* y *Streptopelia risoria*. Desde entonces hasta 1950, se publicaron cerca de 55 trabajos los cuales describían el cariotipo de 107 especies diferentes. En la década del 50 la citogenética de los vertebrados registró un notable avance con la llegada de métodos de cultivo de tejidos, combinados con pretratamiento con colchicina y solución hipotónica antes de la fijación con carnoy, pero lamentablemente este perfeccionamiento de técnicas citogenéticas no provocó de inmediato un gran efecto en los estudios cromosómicos en aves debido en gran medida a la presencia de un elevado número de cromosomas pequeños, denominados microcromosomas, que dificultan el análisis y la determinación del número diploide, por la variación observada en el número de microcromosomas¹⁵.

Matthey^{16,17} en sus revisiones sobre estudios cromosómicos en aves, considera imposible la determinación exacta del número diploide, en vista de la gran frecuencia de cromosomas con dimensiones por debajo de 1 μ m. Estos factores, sumados a los inconvenientes que se plantean para la obtención y manejo del material de estudio, han determinado que actualmente poco menos del 8 % de las aproximadamente 9020 especies de aves conocidas, hayan sido objeto de estudios citogenéticos¹⁸.

Los microcromosomas fueron motivo de mucha controversia, pues algunos autores no los consideraron como verdaderos cromosomas; según Newcomer¹⁹ en virtud de su origen aparente, estructura, comportamiento y función, no satisface la definición admitida para un cromosoma. Sin embargo en el presente no hay duda que los microcromosomas presentan una función normal, poseen regiones de eurocromatina y heterocromatina, Regiones Organizadoras de Nucleolos y hasta algunos genes ya fueron mapeados en tales cromosomas²⁰.

¹⁵ BELTERMAN, R.H.R. & DE BOER, L.E. 1984. A Karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology. En: Genética. 65: p.39.

¹⁶ MATTHEY, R. 1949. Les chromosomes des vertebres. Lausanne, F. Rouge. p.356. Citado por: DE LUCCA & ROCHA, Op. cit., p. 38.

¹⁷ MATTHEY, R. 1951. The chromosomes of the vertebrates. Adv. Genet. 4: 159-180. Citado por Ibid. p.38.

¹⁸ DE LUCCA & ROCHA, Op. cit., p. 34.

¹⁹ NEWCOMER, E.H. & BEND, J.W. 1954. Spermatogenesis in the domestic fowl. En: J. Heredity 45:787 - 799.

²⁰ NEWCOMER, E.H. & BEND, J.W. 1954. Spermatogenesis in the domestic fowl. En: J. Heredity 45:787 - 799.

Así como hubo mucha controversia con respecto a la naturaleza y función de los microcromosomas, también se cuestionó cuál sería el mecanismo cromosómico de determinación del sexo en aves ya que con la existencia de técnicas deficientes en la obtención de buenas preparaciones cromosómicas, muchos autores llegaron a la conclusión que los gametos femeninos eran de tipo ZO ya que no se podía identificar el cromosoma W. La ocurrencia del cromosoma sexual W en las hembras fué verificada por Schimid en 1962, utilizando la incorporación de timidina tritiada en cultivo de tejidos de *Gallus domesticus*, demostró que aparte del cromosoma sexual Z había un cromosoma único identificado como W²¹. La mayoría de las especies de vertebrados, más no en todas, machos representan el sexo heterogamético ya que poseen dos cromosomas sexuales diferentes en tamaño y morfología denominados XY y la hembra representa el sexo homogamético teniendo dos cromosomas de tipo X. En aves y reptiles, la determinación cromosómica del sexo es al contrario ya que los machos son homogaméticos, pues presentan dos cromosomas sexuales homólogos del mismo tamaño y morfología; mientras que las hembras son heterogaméticas, siendo las convenciones que se utilizan ZZ y ZW respectivamente²².

En la gran mayoría de las especies de aves analizadas hasta el momento, el cromosoma Z corresponde al cuarto o quinto par en tamaño, sin embargo en algunas especies del orden Falconiformes, Strigiformes, Passeriformes, familia Alaudidae y orden Gruiformes, familia Cariamidae, el Z es el equivalente al par uno. En general el cromosoma W no presenta un mayor tamaño que el cromosoma Z y corresponde al octavo, noveno o décimo par²³.

El cromosoma sexual Z presenta una morfología variable entre las especies que va de metacéntrico a telocéntrico; pero la no presentación de variación significativa de tamaño indica que durante la diversificación de las diferentes especies de aves ocurrieron inversiones pericéntricas en este cromosoma que alteraron su morfología. El cromosoma W presenta variaciones tanto en tamaño como en morfología, lo cual es un indicio de la ocurrencia de mayores modificaciones en la evolución cariotípica de las aves, que en el cromosoma Z²⁴.

Recientes hallazgos sobre los cromosomas que contienen la información genética que determina el sexo de las aves muestran una notable conexión con las concepciones actuales sobre la evolución de las aves. Los hallazgos proporcionan también una explicación de cómo los cromosomas sexuales de las aves modernas adquirieron sus características distintivas²⁵.

²¹ SCHIMID, W. 1962. DNA replication patterns of the heterochromosomes in *Gallus domesticus*. En: Cytogenetics. 1: 344-352. Citado por: DE LUCCA & ROCHA, Op. cit., p.40.

²² BELTERMAN & DE BOER, Op. cit., p.43.

²³ DE LUCCA & ROCHA., Op. cit., p.41.

²⁴ Ibid. p.48.

²⁵ PIGOZZI M.I & SOLARI A.J. 2000. Los cromosomas sexuales y la evolución de las aves. En: Ciencia Hoy Vol. 10 N° 56. [en línea]. [citado en 15 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy56/cromosomas.htm>>.

En las primeras especies de aves que se utilizaron para examinar el cromosoma W se encontró que este se teñía casi completamente con gran intensidad (característica que se designa con el término "heterocromático"). Tan así fué que la técnica denominada de "bandas C", que se introdujo para teñir regiones condensadas e inactivas de los cromosomas, demostró ser la más útil para identificar el cromosoma W de las aves comunes, por cuanto estos se teñían más que las otras estructuras. Inicialmente se pensó que estas características, que habían sido observadas en el W de la gallina, la codorniz, el pato hembra y en varios pájaros, eran propias de todas las aves, y que siempre el cromosoma W era pequeño, mayormente formado por cromatina inactiva y que portaría solo unos pocos genes relacionados con el sexo. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que este no era el caso. El cromosoma W presentaba variaciones significativas entre las aves comunes (las Neognatas), y notables diferencias en las Ratites (ñandúes, avestruces y otras aves corredoras) y en las Tinamiformes (martinetas). Estas diferencias permitían separar nítidamente a estas aves primitivas de sus congéneres más recientes²⁶.

Concretamente, en las Ratites el cromosoma W era bastante mayor y muy poco "heterocromático", pareciéndose pronunciadamente al cromosoma Z; y en las Tinamiformes el cromosoma W tenía una estructura intermedia entre el de las Ratites y el de las aves recientes (Neognatas)²⁷.

2.2 LOS CROMOSOMAS SEXUALES DE AVES

Los avances más importantes se hicieron a partir de los estudios mediante la microscopía electrónica de las células germinales (espermatoцитos u ovocitos), porque en ellas los cromosomas desarrollan una serie de procesos: se aparean ("sinapsis cromosómica"), intercambian partes de segmentos ("recombinación meiótica") y finalmente se separan ("disyunción") para formar, luego de la segunda división meiótica, los gametos²⁸.

Este proceso fué explicado por primera vez por el biólogo estadounidense M.J. Moses en 1956 cuando aplicó este procedimiento a los ovocitos de gallina, se pudo identificar a las 38 parejas de cromosomas no relacionados con el sexo (llamados autosomas), incluso a los más pequeños o microcromosomas. Además, se comprobó la existencia de apareamiento parcial entre el cromosoma Z y el W. Algún tiempo después, en el mismo laboratorio se descubrió que no solo en los cromosomas comunes (somáticos) se producían intercambios de segmentos durante la meiosis (recombinación meiótica) sino que también un pequeño, pero constante, segmento terminal del cromosoma se intercambiaba entre el W y el Z

²⁶ Ibid.

²⁷ Ibid.

²⁸ Ibid.

en los ovocitos de la gallina²⁹. Esto demostró por primera vez que había una zona compartida de cromatina en los cromosomas sexuales Z y W en un ave (la gallina), en forma muy similar a lo que este mismo laboratorio había demostrado en los mamíferos, cuando años antes había comprobado la existencia de un intercambio entre los cromosomas X y Y. La zona intercambiada fué bautizada por el biólogo inglés Paul Burgoyne en 1982 con el nombre de "región pseudoautosómica". Por lo dicho, en la gallina hay también una pequeña zona "pseudoautosómica" en los cromosomas Z y W, que asegura una separación normal de ambos cromosomas sexuales durante la meiosis³⁰.

Durante los últimos años de la década del 80 y primeros del 90 se fué ampliando el número de especies de aves comunes (Neognatas) cuyos cromosomas sexuales Z y W mostraban un comportamiento muy similar al descrito en la gallina, excepto por algunas peculiaridades propias de cada especie³¹.

2.3 AVES DEL GÉNERO *Diglossa*

El género *Diglossa* era anteriormente considerado como miembro de una familia separada, "*Coerebidae*". Otros autores lo consideraron un miembro de la familia *Parulidae* o *Emberizidae*, debido a su relación íntima con el género *Acanthidops*, y tradicionalmente se situó en la familia *Emberizidae*³². *Diglossa* se ubico en la familia *Thraupidae* por Storer³³, y esto se ha seguido en la mayoría de las clasificaciones subsecuentes. Los datos genéticos confirman que debe ser incluido en las Tangaras, y que forma un grupo con *Acanthidops* y *Catamenia*, tradicionalmente ubicados en la familia *Emberizidae*³⁴.

Las aves del género *Diglossa* donde se incluyen especies usualmente simpátricas propias de montañas, con afinidades poco claras han sido consideradas como *Genera Incertae Sedis* de la familia *Emberizidae*, subfamilia *Thraupinae* según la lista de chequeo de aves del mundo³⁵. Son aves de 11 – 15 centímetros de longitud, con un pico delgado, ligeramente curvo hacia arriba (recurvado) y con el ápice ganchudo. Cada una de las especies se destaca por una forma algo más

²⁹ Ibid.

³⁰ Ibid.

³¹ Ibid.

³² REMSEN, J.V., CADENA, C.D., JARAMILLO, A., NORES, M., PACHECO, J.F., ROBBINS, M.B., SCHULENBERG, T.S. STILES, F.G. STOTZ, D.F. & ZIMMER, K.J. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. [en línea]. [citado en 3 de Abril de 2007]. Disponible en Internet: <<http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>>.

³³ STORER, R. W. 1970. Subfamily Thraupinae. In "Check-list of birds of the World. (Paynter R. A., Jr., ed.). Museum of Comparative Zoology, Cambridge, Massachusetts. Vol. 13". p. 246-408.

³⁴ REMSEN, J.V., CADENA, C.D., JARAMILLO, A., NORES, M., PACHECO, J.F., ROBBINS, M.B., SCHULENBERG, T.S. STILES, F.G. STOTZ, D.F. & ZIMMER, K.J. Op. Cit.

³⁵ HILTY, S. & BROWN, W. 1986. Guía de las aves de Colombia. Princeton, United States of America: Princeton University Press. p. 748.

determinativa en su aspecto morfológico: dimensiones del pico, coloración de las plumas, dimorfismo sexual, comportamiento, canto, etc. La gran mayoría habita en zonas montañosas, a más de 1400 msnm. Se distribuyen a lo largo y ancho de las cordilleras y sierras (aunque cada una de ellas presenta una distribución específica en los Andes). En las Américas se distribuye desde Costa Rica por el norte y hasta Bolivia por el sur^{36,37}.

“El género *Diglossa* en las comunidades aviarias de páramos del Suroccidente Colombiano según Calderón³⁸ se cataloga como dominante, representado especialmente por *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis aterrima* alcanzando un 42.12% y un 12% respectivamente del total de la comunidad. A medida que la altura aumenta, la dominancia relativa de *D. humeralis aterrima* es reemplazada por *Diglossa lafresnayii*”.

De acuerdo con Hilty & Brown³⁹, las especies que se trabajaron en este estudio se describen de la siguiente manera en Colombia:

2.3.1 *Diglossa humeralis*: diglosa negra. Tiene un tamaño de 14.5 cm, pico recurvado y muy ganchudo, existen tres subespecies: *aterrima*, que es enteramente negro opaco o plenamente negro lustroso adelante ver Figura 1; *nocticolor*, negra con rabadilla gris oscuro; *humeralis*, negro opaco con rabadilla gris oscura y pequeño parche gris azul en el hombro, algunos ejemplares raramente presentan abdomen castaño, el inmaduro es café grisáceo con estriado parduzco encima y debajo como algunas hembras de *aterrima*. Los plumajes y muda requieren estudio detallado.

Se distribuye entre los 2200 – 3400 msnm. Desde la Sierra Nevada de Santa Marta y Serranía de Perijá (*nocticolor*); Cordillera Oriental desde Norte de Santander hasta latitud de Bogotá (*humeralis*); Cordillera Central en Caldas y Tolima, Nariño y extremo Sur de la Cordillera Occidental desde Cauca (área de Munchique) sur excepto Valle del Patía (*aterrima*) como se muestra en la Figura 2.

2.3.1.1 *Diglossa humeralis aterrima*: carbonero. De acuerdo a Calderón⁴⁰ se diferencia de *D. humeralis humeralis* por la ausencia de la mancha azul en la parte del hombro, es frecuente en zonas de bosque en regeneración acompañando a grupos mixtos. La hembra construye los nidos y el macho participa en la

³⁶ HILTY & BROWN, Op. cit., p. 748.

³⁷ FJELDSA, J. & KRABBE, N. 1990. Birds of the high andes. Svendborg, Denmark: zoological Museum, University of Copenhagen and Apollo Books. p.601-605.

³⁸ CALDERON, 1998. Ecología de Comunidades Aviarias en Páramos del Suroccidente Colombiano. Santiago de Cali, Tesis de Maestría (Msc. Ciencias Biológicas). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. p.68.

³⁹ HILTY & BROWN, Op. cit., p. 750

⁴⁰ CALDERON, J.J. 2002. Aves de la Laguna de La Cocha. Serie “Un Canto a la Vida”. Primera Edición. San Juan de Pasto. Colombia. Asociación para el Desarrollo Campesino – ADC. p.144.

alimentación de las crías. En el área de estudio, páramos altos como el Volcán Galeras presentan densidades altas en algunas zonas.

Figura 1. *D. humeralis aterrima*



Figura 2. Mapa de distribución de *D. humeralis*



Fuente. Hilty & Brown, 1986⁴¹.

2.3.2 *Diglossa lafresnayii*: diglosa lustrosa. Tiene un tamaño de 5 cm. Pico recurvado y muy ganchudo. Su cuerpo es negro lustroso con hombros gris azulado y ojos oscuros. Figura 3. Se encuentra usualmente a más de 2700 msnm pero con mayor frecuencia por encima de los 3200 m⁴². En Colombia se encuentra en la Cordillera Oriental desde el Sur hasta latitud de Bogotá, Cordillera Central en el Sur Este de Antioquia, Caldas y Tolima (área del Nevado del Ruiz) y en montañas de Nariño⁴³. Figura 4.

⁴¹ HILTY & BROWN, Op. cit., p. 75.

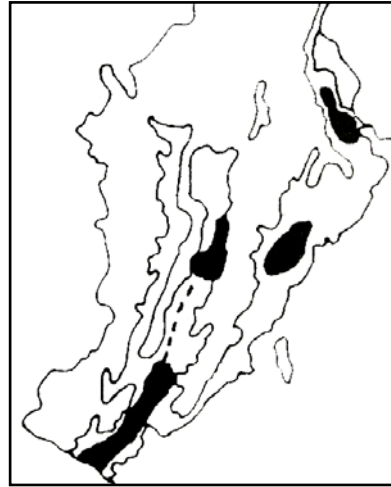
⁴² Ibid. p.144.

⁴³ HILTY & BROWN, Op. cit., p. 750

Figura 3. *D. lafresnayii*



Figura 4. Mapa de distribución *D. lafresnayii*



Fuente. Hilty & Brown, 1986⁴⁴.

2.3.3 *Diglossa sittoides*: diglosa canela. Su tamaño es de 13 cm, pico recurvado y con gancho prominente, dimorfismo sexual: macho: dorso gris azuloso uniforme, frente y lados de la cabeza negruzcos, partes inferiores canela pálido. Figura 5.a). Hembra: dorso oliva parduzco y vientre pálido sucio, difusamente estriada de negruzco en el pecho. Figura 5.b). Se distribuye principalmente 1700-2800 m (raramente a 600 msnm) en Sierra Nevada de Santa Marta; 1500-3400m (usualmente menos de 2400 msnm) en los Andes⁴⁵. Figura 6.

Figura 5. *D. sittoides*. a) Macho de *D. sittoides*. b) Hembra de *D. sittoides*.

a)



b)



Fuente: Jhon Jairo Calderón

⁴⁴ Ibid. p.75.

⁴⁵ Ibid., p. 751.

Figura 6. Mapa de distribución de *D. sittoides*



Fuente. Hilty & Brown, 1986⁴⁶.

En los ecosistemas altoandinos del municipio de Pasto se encuentran registradas seis especies pertenecientes al género *Diglossa*: *D. humeralis*, *D. lafresnayii*, *D. sittoides*, *D. caerulescens*, *D. cyanea* y *D. albilatera*.

En el presente estudio de los datos morfoecológicos de las aves capturadas, se logró establecer un modelo diferencial cuantitativo tomando el parámetro morfométrico de identificación de cada especie. Además de observaciones de explotación de recurso de las diferentes especies, se observó los tipos de forrajeo de acuerdo con la especie explotadora como la explotada. Las preferencias de tipo de recurso y forma de explotación de las aves del género *Diglossa* se inclinaron por especies vegetales pertenecientes al género *Fuchsia*, *Abutilón*, *Brachyotum* y ocasionalmente para *Passiflora*. Como parámetro de identificación entre las especies *D. albilatera* y *D. caerulecens*, encontramos la comisura y el culmen expuesto, los cuales presentaron diferencia significativa entre las especies analizadas. Mientras que para las especies de *D. lafresnayii* y *D. albilatera* el parámetro de identificación morfométrico es la longitud de la mandíbula inferior y para *D. humeralis* y *D. caerulecens* es la comisura del pico.

2.4 CITOGENÉTICA

La citogenética puede definirse como una ciencia producto de la combinación de la citología y la genética, que estudia la morfología y comportamiento de los cromosomas vistos durante la división celular mediante el microscopio óptico^{47,48}.

⁴⁶ Ibid. p.75.

⁴⁷ ELDRIDGE, F.E. 2000. Cytogenetics of Livestock. Avi Publishing Company, 1985. Citado por: JIMENEZ, L.M. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción. Universidad

Su objetivo fundamental es el estudio de las bases citológicas que nos permitan dar una explicación al comportamiento hereditario de los cromosomas, además de analizar como la estructura y comportamiento de los cromosomas garantizan la conservación de la información genética, su transmisión y liberación ordenada para controlar el desarrollo del organismo. Así mismo se estudian las variaciones que afectan a los cromosomas, sus consecuencias genéticas y sus implicaciones evolutivas. Para el análisis citogenético se hace necesario conocer la estructura de los cromosomas, ya que a partir de esta se pueden establecer los patrones normales y anormales de los cariotipos^{49,50}.

Según Stanfield,⁵¹ en las células somáticas de las especies animales, se encuentra un juego de cromosomas heredado del progenitor materno y un juego comparable de cromosomas (cromosomas homólogos) del progenitor paterno. Todas las células somáticas poseen un número de cromosomas dual llamado número diploide, que se simboliza como $2n$ las células sexuales contienen la mitad del número de juegos cromosómicos encontrado en las células somáticas y son conocidas como células haploides, y se simbolizan con la letra n .

Los cromosomas son estructuras complejas localizadas en el núcleo de las células, compuestos por ADN, histonas y otras proteínas, ARN y polisacáridos. El ADN dentro del cromosoma se encuentra empaquetado, proveyendo al cromosoma de una estructura cuaternaria. Esta estructura cromosómica consta de un brazo corto (p) y otro largo (q), los cuales están separados por una constricción primaria o centrómero, el cuál está asociado con heterocromatina. El centrómero juega un papel importante en el comportamiento cromosómico ya que permite la unión del cromosoma al huso mitótico y la correcta segregación de lo mismos durante la división celular^{52,53}.

Los cromosomas se componen de dos tipos de ADN, la eurocromatina y la heterocromatina. Usualmente se asume que la eurocromatina es genéticamente activa y menos empaquetada en interfase que la heterocromatina, esta última se caracteriza por presentar secuencias altamente repetitivas, un máximo grado de empaquetamiento en interfase, por ser transcripcionalmente inactiva se replica tardíamente en la fase S del ciclo celular y se condensa poco en metafase. Las diferencias en el grado de empaquetamiento, la composición de bases nitrogenadas y la etapa en la cuál se replica cada tipo de ADN, han sido la base

Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas. p.13.

⁴⁸ McFEELY, R.A. 1990. Domestic Animal Cytogenetics. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. 34: p.132.

⁴⁹ STANFIELD, W.D. 1992. Genética. Tercera Edición. Mcgraw – Hill. Citado por JIMENEZ, Op. cit., p.126.

⁵⁰ ROONEY & CZEPULKOWSKI, 1987. Human Cytogenetics. A practical approach. IRL. Press. Oxfords. England. Citado por JIMENEZ, Op. cit., p.27.

⁵¹ STANFIELD, Op. cit., p.26.

⁵² Ibid. p.26.

⁵³ ROONEY & CZEPULKOWSKI, Op. cit., p. 27.

para el desarrollo de las técnicas de bandeamiento, que permiten reconocer diferentes zonas dentro de cada cromosoma e identificar pares homólogos con exactitud⁵⁴.

2.4.1 Nomenclatura de componentes cromosómicos. Cromátida: durante la fase S del ciclo celular las dos cadenas se separan, para servir de plantilla a una nueva cadena complementaria de ADN, apareciendo dos pares de filamentos cada uno de ellos imagen complementaria del otro. Cada par de filamentos se asocian formando una cromátida. Esto es lo que se conoce como la replicación semiconservativa del ADN. En la metafase cada cromosoma está formado por dos cromátidas, cada una de las cuales contiene una sola molécula de ADN⁵⁵.

Centrómero: las cromátidas están unidas entre sí a nivel de la constricción primaria conocida como centrómero y se separan al comienzo de la anafase cuando las cromátidas hermanas emigran a polos opuestos. También se podría definir como el sitio por medio del cual se unen las cromátidas al huso mitótico (cinetocoro) y cuya posición determina la clasificación de cada cromosoma^{56,57,58}.

Brazos cromosómicos: el centrómero separa los cromosomas transversalmente en dos segmentos denominado brazo corto simbolizado por “p” y el brazo largo simbolizado por “q”⁵⁹.

Telómeros: todos los cromosomas poseen dos telómeros, que son la zona final de los cromosomas y de vital importancia para mantener la integridad de los mismos; Permiten una asociación transitoria de los cromosomas por los extremos. En los telómeros se encuentran los extremos de una larga molécula de ADN que contiene cada cromátida⁶⁰.

Organizadores Nucleolares: son ciertas constricciones secundarias en las que se encuentran los genes que codifican a los ARN ribosomales e inducen a la formación de nucleolos⁶¹. Los NOR, pueden estar ubicados en uno o varios de los autosomas según la especie⁶².

⁵⁴ MACGREGOR, H.C. 1993. An Introduction to Animal Cytogenetics. First Edition. London. U.K: Published by Chapman and Hall. Capitulo 1, 5 y 6. Citado por: MAHECHA, V.S. 1998. Caracterización citogenética de *Rhinoclemmys diademata* (Mertens, 1954) (Testudinata: Emydidae). Santafé de Bogotá, D.C. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. p.22.

⁵⁵ Ibid. p.27.

⁵⁶ DE ROBERTIS, E.D. & DE ROBERTIS, E.M. 1981. Biología Celular y Molecular. Décima Edición. Editorial “El Ateneo”. S.A. 560 p.

⁵⁷ ROONEY & CZEPULKOWSKI, Op. cit., p. 28.

⁵⁸ LEWIN, B. Genes VI. 1997. Internacional Student Edition. Oxford University Press. Citado por: JIMENEZ, Op. cit., p.27.

⁵⁹ ROONEY & CZEPULKOWSKI, Op. cit., p. 28.

⁶⁰ Ibid. p. 28.

⁶¹ THERMAN, E. & MILLARD, S. 1993. Human Chromosomes, Structure, Behavior, and Effects. Third Edition. Springer – Verlag. 312 p.

⁶² ROONEY & CZEPULKOWSKI, Op. cit., p. 28.

2.4.2 Clasificación cromosómica. En función de la relación de los brazos p y q los cromosomas son clasificados en tres tipos:

- a. Telocéntrico: cuando el centrómero se halla en uno de los extremos.
- b. Acrocéntrico, subtlocéntrico o submetacéntrico: cuando el centrómero está considerablemente más próximo a un extremo que al otro, originando brazos de diferente longitud.
- c. Metacéntrico: si el centrómero está aproximadamente en el medio, observándose los brazos p y q casi iguales⁶³. Figura 7.

Algunos cromosomas metafásicos muestran muy pocas diferencias morfológicas en las preparaciones con tinción convencional giemsa, siendo el tamaño, la posición del centrómero (constricción primaria), y ocasionalmente la constricciones secundarias, los únicos criterios empleados para reconocerlos⁶⁴.

Para determinar la morfología de cada cromosoma se puede calcular la longitud total, la longitud de brazos y la proporción entre brazos, se calculan índices centroméricos (I.C) y relación de brazos (R.B) Una vez medidos los cromosomas se ordenan basándose en los índices propuestos por Levan, *et al.*⁶⁵ como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación cromosómica









Posición Centromérica	Relación de Brazos	Índice Centromérico	Clasificación
Medio Estricto (M)	1	50	Metacéntrico
Región Mediana (m)	1 – 1.7	37.5 – 50	Metacéntrico
Región Submedia (sm)	1.7 – 3	25 – 37.5	Submetacéntrico
Región Subterminal (st)	3 – 7	12.5 – 25	Subtelocéntrico
Región Terminal (t)	> 7	< 12.5	Acrocéntrico
Terminal Estricto (T)	∞	0	Telocéntrico

⁶³ KLUG, W.S. & CUMMINCS, M.R. 1999. Essentials of Genetic. Prentice Hall. New Jersey. p.87.

⁶⁴ ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. 1974. Stainig constitutive heterochromatin and giemsa crossbands of mammalian chromosomes. En human chromosome methodology. Academic press. New York. Citado por JIMENEZ, Op. cit., p.32.

⁶⁵ LEVAN, A., FREGA, K. & SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. En: Hereditas. 52: p.217.

Figura 7. Posición centromérica.

Posición	Tipo	Forma en Metafase	Forma en Anafase
Central	Metacéntrico		
Entre el centro y el extremo	Submetacéntrico		
Próxima al extremo	Acrocéntrico		
En el extremo	Telocéntrico		

Fuente. Klug & Cummins, 1999⁶⁶.

2.4.3 Bando cromosómico. La verdadera identificación de los pares cromosómicos solo fué posible con el desarrollo de las técnicas de tinción diferencial, que originaron los patrones únicos de bandas sobre los cromosomas homólogos, lo cuál permitió no solo el reconocimiento individual de los cromosomas, sino también la caracterización de partes específicas en él⁶⁷. En la actualidad se conocen gran variedad de tinciones diferenciales para los cromosomas sin embargo las que se usan en estudios citogenéticos de rutina son:

Bandas G: con coloración Giemsa pueden aparecer espontáneamente en algunas metafases sin tratamiento previo y se obtienen mediante tratamientos para acentuar estas diferencias dentro de los cromosomas uno de los mas empleados es el uso de proteasas como Tripsina y tinción con Giemsa. Los patrones G corresponden a las bandas obtenidas con la tinción con Quinacrina, que colorea regiones cromosómicas ricas en A -T. Este tipo de bandas es ideal para identificar pares cromosómicos⁶⁸.

Bandas C: denominadas así por referirse a las bandas centroméricas. Esta técnica tiñe la heterocromatina de los cromosomas y no la eucromatina, que en algunas especies puede ocupar posiciones no convencionales, constituyéndose así en un marcador citológico importante. El bando C tiene aplicación para investigar

⁶⁶ KLUG, W.S. & CUMMINCS, Op. cit., p.87.

⁶⁷ McFEELY, Op. cit., p.40.

⁶⁸ VERMA, R.S., & BABU, A. 1989. Human Chromosomes Manual of basic Techniques. Pergamon. Citado por JIMENEZ, Op. cit., p. 35.

rearrreglos cromosómicos cercanos al centrómero y en investigación de polimorfismos⁶⁹.

Bandas R: el principio básico de las bandas R (reversas) es el tratamiento de las láminas a altas temperaturas en varios buffers seguido por tinciones con naranja de acridina (RFA) aprovechando el tiempo de las bandas reversas se puede obtener patrones R mediante la incorporación de Bromodeoxiuridina en pulso tardío y coloración con Hoechst. En los cromosomas humanos estas bandas producen un patrón reverso de las Bandas Q y G que corresponden a regiones ricas en G-C, transcripcionalmente activas, eucromáticas, de replicación temprana por lo que cualquier tipo de alteración en ellas puede ser detectado⁷⁰.

Bandas NOR: son denominadas Regiones Organizadoras del Nucleolo, conformadas por múltiples copias de secuencias de ADN ribosomal, que forman y mantienen el nucleolo en el núcleo interfásico. Pueden ser diferenciadas mediante tinciones de los cromosomas metafásicos utilizando tinción con plata (Bandas Ag-NOR). En el bandeado NOR, solamente se evidencian las Regiones Organizadoras del Nucleolo, activas en la interfase inmediatamente anterior, que presentan abundantes copias de ARN ribosomal asociado con proteínas NOR - específicas que son el blanco para la tinción con plata. La identificación del número de NOR presentes y su localización dentro de los cromosomas constituye un buen marcador para la diferenciación de las especies⁷¹.

2.4.4 Cromosomas, cariotipo y taxonomía. El cariotipo representa los cromosomas, recortados de una metafase y colocados en un orden sistemático de acuerdo con su tamaño y forma. Se pueden hacer cariotipos de cualquier especie animal o vegetal; cada especie tiene su propio cariotipo particular caracterizando a cada especie por el número y morfología de sus cromosomas⁷². La morfología de los cromosomas varía en la medida que las especies poseen una mayor afinidad evolutiva entre sí. El cariotipo es una herramienta muy útil, que brinda al citogenetista una perspectiva mas detallada de cada cromosoma, y por lo tanto permite detectar cambios estructurales, con las técnicas de coloración diferencial, que revelan cambios al nivel de la estructura cromosómica por los reordenamientos que se producen en las distintas alteraciones tales como: fusiones y fisiones céntricas, translocaciones recíprocas y en tandem; inversiones peri y paracéntricas, deleciones, duplicaciones, constricciones secundarias, gaps, fracturas cromosómicas, etc⁷³.

⁶⁹ ROONEY & CZEPULKOWSKI Op. cit., citado por JIMENEZ, Op. cit., p.36.

⁷⁰ VERMA & BABU, Op. cit., p.38.

⁷¹ Ibid. p.39.

⁷² MACGREGOR, Op. cit., p.39.

⁷³ HOLMQUIST, G. & DANCIS, H.A. 1981. General model of karyotype evolution. En: Genetica. Vol. 52/53. p.151.

Las especies pueden ser separadas basándose en diferencias entre sus cariotipos, estableciendo relaciones entre ellas mediante la comparación de elementos comunes (homologías entre cromosomas) que evidencian un ancestro común compartido. Diferencias más pequeñas, polimorfismos, rearrreglos interespecíficos pueden originarse por rearrreglos cromosómicos en parte de un cromosoma, que deben ser detectados con coloraciones diferenciales y nos dará información acerca de un parentesco más estrecho entre las especies⁷⁴. Se ha visto que los rearrreglos cromosómicos han cumplido un papel fundamental en la generación de especies nuevas y por lo tanto en la evolución. Estos cambios han generado un sin número de diferentes cariotipos en organismos de la misma especie, aislando poblaciones reproductivamente. En algunos casos estos cambios en los cromosomas no son viables, en otros hay una selección a favor generando nuevas especies.

Varios estudios citogenéticos de especies similares, aisladas espacialmente, han demostrado la presencia de variaciones en la forma y número cromosómico (polimorfismo cromosómico), evidenciando la presencia de procesos evolutivos con rearrreglos cromosómicos que pueden sin duda llevar a diferenciación de especies⁷⁵.

2.5 CITOGÉNÉTICA EN AVES

Según Rocha & De Lucca⁷⁶, mediante los análisis citogenéticos en las diversas especies de aves es posible contribuir con:

- a. El establecimiento de las relaciones taxonómicas y evolutivas entre los diferentes grupos de aves.
- b. El entendimiento del papel de los rearrreglos cromosómicos en la especiación.
- c. Demostración de las relaciones existentes entre las alteraciones cromosómicas y las alteraciones fenotípicas (patrones de coloración y alteraciones de comportamiento).

Y de una forma más aplicada:

- a. Identificación y caracterización de especies consideradas críticas como herramienta en situaciones donde hay dudas acerca de la inclusión de especie en determinado taxón.

⁷⁴ JOSHUA, S. 1994. Los Cromosomas Resuelven el Rompecabezas de la Taxonomía de los Loros. Director, Avian Research Associates Lts, U.K. p. 75.

⁷⁵ HOLMQUIST & DANCIS, Op. cit., p.160.

⁷⁶ ROCHA, G.T. & DE LUCCA, E.J. 1989. Sexagem de Aves. UNESP. Instituto de Biociencias, Departamento de Genética. p.46.

b. Posibilitar la identificación del sexo en especies que no presentan dimorfismo sexual fenotípico aparente, gracias al heteromorfismo existente entre los cromosomas sexuales de las aves.

2.5.1 Características del genoma de aves. La especie más conocida genéticamente es *Gallus domesticus* (gallina) y debido a la falta de estudios en las especies de avifauna, se admite que la información citogenética sobre esta especie es similar a la de otras aves cuyas características de células y cromosomas son representativas de la clase aves en general. En *Gallus domesticus* el número de cromosomas es $2n = 78$, los cromosomas sexuales son de tipo ZZ, en los machos y ZW en las hembras, se distribuyen en cinco pares de cromosomas de porte medio y los 29 pares restantes en microcromosomas.

Analizando datos de literatura en algunos trabajos de citogenética de aves Sasaki, *et al.*⁷⁷ presenta el siguiente resumen:

1. El número diploide ($2n$) de cromosomas varía de 50 (Falconidae) a más de 100 (Rallidae y Ramphastidae) con un número modal de 80.
2. Con excepción de la familia Accipitridae (Falconiformes) la mayoría de las especies estudiadas presentan algunos pares de macro y gran número de microcromosomas.
3. La determinación cromosómica del sexo es de tipo ZZ-ZW. Siendo la hembra heterogamética quien desarrolla las diferencias morfológicas entre los cromosomas Z y W en la subclase Ratitae aparentemente en estado más primitivo los cuales son indistinguibles morfológicamente.
4. En general el cromosoma Z es de porte medio situándose entre el cuarto y sexto par, en cuanto a W es menor y tiñe totalmente con banda C positiva (el cromosoma Z en algunas especies, puede presentarse en tamaño equivalente al primer par de autosomas y W puede ser de igual tamaño a Z⁷⁸).
5. Análisis comparativos de morfología y patrones de bandas revelan que en algunas taxas, la variabilidad cromosómica es grande. Por ejemplo, el orden Falconiformes presenta grupos altamente heterogéneos como los halcones presentando $2n = 50-52$ cromosomas y los cárcaras $2n = 84 - 88$ (Familia Falconidae), en cuanto a la familia Cathartidae presenta un cariotipo típico, con $2n = 80$ ⁷⁹. El águila pescadora (*Pandion haliaetus*) familia Pandionidae según

⁷⁷ SASAKI, et al. 1984. citado por DE LUCCA, E.J. 1978. Determinação cromossômica do sexo nas aves. Ciência e cultura. 30 (7): p.792.

⁷⁸ DE LUCCA, E.J. 1978. Determinação cromossômica do sexo nas aves. Ciência e cultura. 30 (7): p.792.

⁷⁹ Ibid. p.794.

Ryttman *et al.*⁸⁰, con $2n = 74$ cromosomas, no presenta microcromosomas típicos sino grandes macrocromosomas.

2.5.1.1 Consideraciones sobre el cariotipo del orden Passeriformes. Según Sick,⁸¹ cerca de 5.100 de 9.021 especies de aves existentes en el mundo son representantes del orden Passeriformes, constituyendo así el orden más numeroso dentro de la clase.

Dentro de las aves analizadas citogenéticamente hasta el momento, el orden Passeriformes es quien presenta el mayor número de especies cariotipadas, la familia Emberizidae es la que presenta mayor número de géneros y especies cariotípicamente investigados. Algunos aspectos del cariotipo de estas especies merecen consideraciones:

a. Las especies analizadas en su gran mayoría guardan entre sí una semejanza cariotípica bastante grande, tanto en número ($2n = \pm 80$) como en morfología de cromosomas (predominancia de cromosomas subtelo-céntricos y telocéntricos)⁸².

b. En *Furnarius rufus* y *Pitangus sulphuratus* se observa la presencia de un par de cromosomas de tamaño medio, portadores de constricciones secundarias, que caracterizan satélites bastante evidentes; tales constricciones son portadoras de Regiones Organizadoras de Nucleolo por lo menos en *Pitangus sulphuratus*⁸³.

c. Existe gran diferencia en número de cromosomas entre las especies hasta ahora analizadas de la familia Tyrannidae. Para tener una idea, *Xolmis cinerea* presenta 80 cromosomas, *Pitangus sulphuratus* presenta 68 y *Knipolegus cyanirostris* tiene 78 cromosomas.

d. La familia Mimidae, especies como *Mimus saturninus* pueden presentar macro y microcromosomas envueltos con un organizador de nucleolo.

e. Innumerables especies Brasileñas y no Brasileñas de familias Emberizidae y Estrididae presentan polimorfismo cromosómico debido a inversiones pericéntricas. Dentro de estas especies se destacan *Zonotrichia capensis*, *Chloris chloris*, *Junco hyemalis*, *J. oreganus*, *J. aikene*, *J. kaniceps*, *J. phaenotus*, *Cardinales cardinales*, *Lonchura striata*, *L. malabarica*, y *Oriolus xanthornus* (familia Oriolidae).

⁸⁰ RYTTMAN, et al. 1987. citado por Ibid. p.793.

⁸¹ SICK, 1985 citado por DE LUCCA & ROCHA. Op. cit., p.58.

⁸² DE LUCCA & ROCHA. Op. cit., p.58-59.

⁸³ ROCHA, G. T. & DE LUCCA, E.J. 1988. Nucleolar organizer regions in somatic chromosomes of some species of birds. *Caryologia*, 41(3-4): p.300.

Este orden esta en gran evolución y por esta razón se observa la ocurrencia de polimorfismos cromosómicos en gran número de especies. Las familias Emberizidae y Fringillidae, donde los polimorfismos cromosómicos son frecuentes se ha verificado discordancia entre los autores en cuanto a la clasificación de especies de esta familia, aunque favorecen la hipótesis de que están en la escala de la evolución⁸⁴.

2.6 EVOLUCIÓN

El proceso evolutivo hace relación a un cambio gradual de una especie dentro de una población a lo largo del tiempo, mediado entre otros factores por la selección natural. Esta teoría afirma que se produce una gran cantidad de variación genética en cada generación; sin embargo, sólo algunos de los descendientes son capaces de sobrevivir, y sólo algunos de los sobrevivientes logran reproducirse y dejar nuevamente descendientes (aquellos que se encuentren “mejor adaptados” al ambiente). Puesto que los cambios para ser significativos y efectivos se dan en las especies (unidad de evolución) formadas por un gran número de individuos genéticamente diferentes (unidad de variación), la evolución es considerada como un proceso gradual y continuo de tal modo que las poblaciones (especies) se van transformando genéticamente^{85,86}.

Los cambios fenotípicos son los eventos básicos que proporcionan el material para el proceso evolutivo, ya que pueden producir nuevos fenotipos que mediante interacciones con los factores ambientales, y a través de varias generaciones pueden originar nuevas especies. Los cambios en el genoma pueden ser cambios génicos o cambios cromosómicos (que también pueden implicar cambios génicos). La citogenética evolutiva estudia las formas cromosómicas de las especies actuales y mediante la comparación de sus cariotipos, hace inferencias sobre los cambios cromosómicos (reorganizaciones) que se han podido producir a lo largo del proceso evolutivo de los diferentes grupos taxonómicos⁸⁷. La estrategia utilizada para poder establecer las homologías entre los cromosomas de diferentes especies, determinar las reorganizaciones cromosómicas evolutivas que explicarían dichas homologías es la caracterización citogenética de las especies⁸⁸.

⁸⁴ DE LUCCA & ROCHA. Op. cit., p.59.

⁸⁵ DOBZHANSKY, TH., AYALA, F.J., STEBBINGS, G.L. & VALENTINE, J.W. 1993. Evolución, Ediciones Omega, Barcelona. "EVOLUTION," The History Channel website. [en línea]. [citado en 26 de Febrero de 2007]. Disponible en Internet: <<http://www.history.com/encyclopedia.do?articleId=208880>>.

⁸⁶ MAYR, E. 1992. Darwin y el Darwinismo: una larga controversia. Ed. Crítica. Barcelona. España. 209 p.

⁸⁷ GARCIA HARO, F. 2001. Evolución Cromosómica en Simiiformes. Homologías, Reorganizaciones y Heterocromatina. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. p.3.

⁸⁸ RUIZ-HERRERA MORENO, A. 2003. Implicaciones de los Lugares Frágiles y las Secuencias Teloméricas Intersticiales en la Evolución Cromosómica de los Primates. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. p.1.

Ruiz - Herrera⁸⁹ afirma que las aplicaciones de las técnicas moleculares al campo de la citogenética comparativa han incrementado sorprendentemente la utilidad de los datos cromosómicos en los estudios evolutivos ya que las homologías pueden establecerse a nivel de secuencia de ADN, haciendo posible visualizar la localización nuclear y cromosómica de secuencias específicas de ADN con ello se han ampliado los estudios a lo que se denomina actualmente genómica comparada.

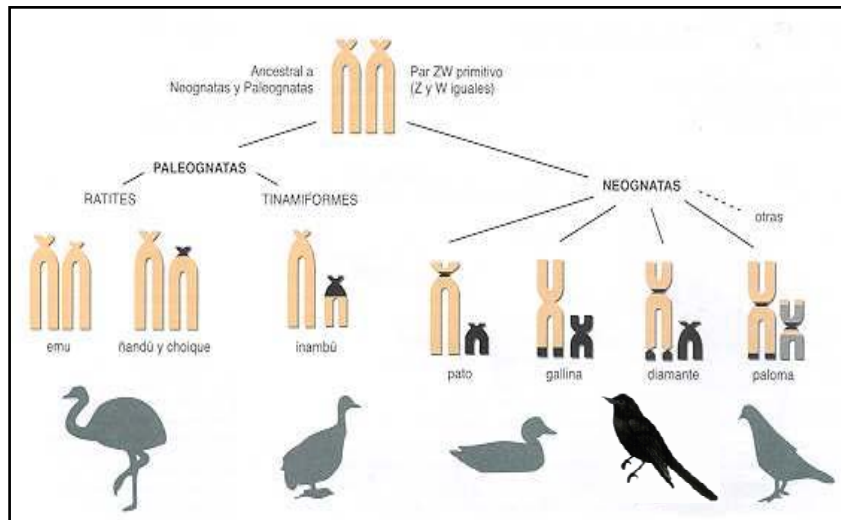
2.6.1 Esquema evolutivo de los cromosomas sexuales de las aves. Pigozzi & Solari⁹⁰, afirman que inicialmente y en un grupo ya extinguido, los cromosomas Z y W eran morfológicamente idénticos, y recombinaban en casi toda su longitud, de manera similar a lo que se observa en las Ratites actuales. En el transcurso de la evolución, con la consecuente diversificación de las aves, la zona sin recombinación sobre el cromosoma W se hizo más grande, porque habrían aparecido nuevos genes relacionados con la determinación sexual, que deben permanecer obligatoriamente sobre el cromosoma W (evitando el intercambio de estos segmentos con el Z durante la meiosis). A medida que la zona que no recombina en el cromosoma W se vuelve mayor, disminuye la región que intercambia efectivamente segmentos con el Z.

Finalmente, en las aves consideradas más "modernas" el cromosoma W tiene solo un pequeño segmento que recombina con el Z, algunos genes relacionados con la diferenciación sexual femenina y el resto del cromosoma está casi totalmente ocupado por ADN pobre en genes, que se manifiesta como "heterocromatina". En la mayoría de las especies Neognatas el cromosoma W es más pequeño, por la pérdida de regiones homólogas al Z y la pérdida ocasional y aleatoria de heterocromatina, ya que dicha pérdida no implica daño para el individuo porque se trata de material genético deteriorado e inerte ver Figura 8.

⁸⁹ Ibid.p.4.

⁹⁰ PIGOZZI M.I & SOLARI A.J. 2000. Los cromosomas sexuales y la evolución de las aves. En: Ciencia Hoy Vol. 10 N° 56. [en línea]. [citado en 15 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy56/cromosomas.htm>>.

Figura 8. Esquema de la evolución propuesta de cromosomas sexuales en las aves.



Fuente. Pigozzi & Solari⁹¹.

2.7 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS CARIOLÓGICO

El objetivo final del análisis cariológico es el establecer un conjunto de relaciones dentro de un grupo taxonómico determinado e identificar similitudes y diferencias; es por ello que se desarrollan una serie de metodologías para la obtención de cromosomas y técnicas de bandeamiento, que brindan una mayor exactitud en los análisis cariológicos, permitiendo identificar en detalle cada uno de los cromosomas, para así establecer la variabilidad genética entre poblaciones, especies y géneros⁹².

2.7.1 Técnicas de cultivos celulares. Según Ford⁹³, las preparaciones cromosómicas para su posterior análisis citogenético se obtienen únicamente de células en división en metafase o cercanas a ella. Sin embargo en la mayoría de organismos vivos en condiciones normales, las células no se dividen espontáneamente por lo que se debe recurrir a ciertos agentes capaces de inducir la división de las células que se encuentran en interfase.

⁹¹ Ibid.

⁹² THORGAARD, G.H & DISNEY, J.E. 1990. Chromosome preparation and analysis in: Methods for fish biology. Editado por: Carls, B., Schretk; and Moyle, P.B. Published by American Fisheries for Society. p. 171-190.

⁹³ FORD, C.E. 1973. Human chromosomes. The Origin and transmission of chromosomal abnormalities. Chapter 8: 152 - 173. Academic Press. London and New York.

El mismo autor clasifica las células que se pueden utilizar para el estudio de cromosomas en las siguientes categorías:

- a. Células en división de médula ósea. En el embrión estas células pueden encontrarse en otros sitios tales como el hígado y el bazo. En estas células no es necesario inducir la mitosis.
- b. Linfocitos de sangre periférica, que debe inducirse a división en medio de cultivo.
- c. Células de tejido conectivo no especializado que se obtienen de una gran variedad de tejidos y están divididas en dos categorías: los fibroblastos que son los más comúnmente estudiados y las células ameboides errantes.
- d. Células en división del epitelio, como la capa basal de la epidermis, que en los humanos pueden obtenerse de la raíz del cabello. En mamíferos también se utiliza la córnea y células en división del epitelio intestinal.
- e. Células en división de la gónada. En los testículos se encuentran tanto células en división mitótica como meiótica, aunque la morfología de los cromosomas es un poco diferente a la de los cromosomas de células somáticas. En el ovario las células se encuentran disponibles únicamente en el embrión, con excepción de las células meióticas, que experimentalmente pueden obtenerse del ovario de adultas⁹⁴.

Rose (1986)⁹⁵ afirma que la mayoría de estudios para análisis de cromosomas se han llevado a cabo sobre linfocitos en división, gracias a un descubrimiento que permitió observar que los linfocitos de sangre periférica podían ser inducidos a división por acción de la Fitoheماغlutinina (PHA), sustancia que fué usada inicialmente para separar los leucocitos de los eritrocitos, debido a su capacidad para aglutinarlos. Coincidentalmente se observó que dicha sustancia actuaba como un potente mitógeno. El primer reporte sobre inducción mitogénica para producción de linfocitos en respuesta a la PHA, data de 1960.

Aparte de la PHA existen otras lecitinas como la concanavalina A y la favina, las cuales actúan sobre receptores específicos (mucopolisacáridos) de los linfocitos T, obligándolos a dividirse. La síntesis óptima de ADN en respuesta a los mitógenos se detecta usualmente a los dos o cuatro días, mientras que para detectar la respuesta a los antígenos y a las mezclas alogénicas leucositarias son necesarios cinco a siete días. El mismo autor comprobó que en condiciones subóptimas tales como bajo número de células o bajas concentraciones de mitógeno, la respuesta

⁹⁴ Ibid. p.153.

⁹⁵ ROSE, R.N. 1986. Manual of clinical laboratory immunology. Tercera edición. Washintong: American Society for Microbiology. p.34.

máxima se presenta cuatro días después de la estimulación, lo que sugiere una relación directa entre el número de células estimuladas y la tasa de síntesis de ADN. Respuestas deficientes también se observan cuando se utilizan tiempos de incubación incorrectos o concentraciones inadecuadas de mitógeno⁹⁶.

2.7.2 Técnicas de cultivos celulares en aves. Gianoni & Ferrari⁹⁷ reportan los siguientes métodos para la obtención de células metafásicas en aves:

A. Cultivo de linfocitos de sangre periférica: de acuerdo con los resultados reportados por Dinkel & Fechheimer⁹⁸. Existen varios procedimientos para cultivar linfocitos, las diferencias radican principalmente en la preparación del medio de cultivo, pero todos incluyen los siguientes pasos: colecta de sangre por punción con el uso de heparina o Liquemine®, separación de linfocitos que puede ser mecánica o química usando Histopaque®, tiempo de incubación, tratamiento con colchicina e hipotónización y finalmente la fijación con carnoy 3:1 y 1:1.

Los medios de cultivo más empleados son el TC 199, el Ham F10 y F12, el RPMI 1640 y el Iscove's, éste último el de mejores resultados en las investigaciones efectuadas. En cuanto al suero, los autores aseguran que al emplear Suero Fetal Bovino o de aves los resultados han sido similares. Los mitógenos más usados son la fitolaca, la concanavalina A, la fitohemaglutinina y algunos lipopolisacáridos⁹⁹.

B. Cultivo de bulbo de plumas *in vitro*: la ventaja de este método se basa en el hecho de que el animal ni se pinza ni se sacrifica, lo que ha permitido estudiar varias especies de aves raras o de zoológico. Generalmente se usan las plumas de las alas por ser las de mayor actividad de proliferación celular. Con el cultivo de este tejido se busca obtener fibroblastos de tal manera que resulten células mitóticas en profase tardía o al inicio de la metafase.

C. Cultivo del bulbo de plumas *in vivo*: para este fin se inyecta al animal, vía peritoneal o endovenosa una dosis de colchicina que varía entre 0.04-0.06 ml/30 g de peso vivo y se continúa el proceso como el cultivo *in vitro*¹⁰⁰.

D. Cultivo de médula ósea: Miller & Fechheimer¹⁰¹, indican que en este método se utilizan células de las áreas hematopoyéticas de los huesos largos.

⁹⁶ Ibid. p.35.

⁹⁷ GIANONNI, M. & FERRARI, L. 1986. Citogenética aplicada a las aves: Técnicas e manual técnico. Universidad estadual Paulista. Javo-ticabal. p.7.

⁹⁸ DINKEL & FECHHEIMER, citado por Ibid. p.7.

⁹⁹ GIANONNI & FERRARI, Op. cit., p.35.

¹⁰⁰ Ibid. p.35.

¹⁰¹ MILLER & FECHHIMER, 1971. citado por Ibid. p.39.

La técnica directa es un proceso rápido y directo eliminando los largos periodos de incubación del cultivo de linfocitos, no requiere de equipos costosos empleados en otras técnicas, los equipos utilizados son fácilmente adaptados a condiciones de trabajo de campo. Sus principales desventajas son:

1. Exige en gran mayoría de veces el sacrificio del animal. (aunque en muchos mamíferos y aves de gran tamaño es posible obtener células de médula ósea por punción).
2. La actividad mitótica de médula ósea es muy variable especialmente en aves adultas, razón por la cual muchas veces es posible no encontrar divisiones celulares ocurriendo en determinado momento. Este aspecto reviste gran importancia en virtud del sacrificio del animal puesto que no permite repetición de pruebas.
3. Según Shoffner¹⁰², las preparaciones obtenidas por esta técnica no producen resultados, con replicación o formación de patrones de bandas, tan buenas como las formadas por otras técnicas debido a la baja calidad de los cromosomas.

Según Gianonni & Ferrari¹⁰³, la médula ósea de las aves también se puede cultivar *in vitro* durante 4 horas a 41°C incluso a nivel de campo es posible coleccionar médula en tubos con medio de cultivo, incubar a temperatura corporal durante 6 horas para luego en el laboratorio realizar la hipotonización, fijación, coloración y preparación de las láminas.

E. Cultivo de células embrionarias: esta técnica desarrollada por Zinder¹⁰⁴, con leves variaciones es ampliamente usada en la mayoría de trabajos de citogenética aviar. A través de esta técnica es posible estudiar rearrreglos cromosómicos que no podrían ser evidenciados en fases posteriores del desarrollo embrionario, ya que la mayor tasa de mortalidad de embriones de pollo y otras aves, ocurre entre las 24 y 72 horas de la incubación de los huevos.

¹⁰² SHOFFNER, R.N. "Curso de Citogenética de Aves". Jaboticabal, UNESP. 21 a 26 de Janeiro de 1985. Citado por GIANONNI & FERRARI, Op. cit., p.43.

¹⁰³ GIANONNI, M. & FERRARI, 1986.Op., cit. p.44.

¹⁰⁴ ZINDER, 1975 citado por POLLOCH, B.J. & FECHHEIMER, N.S. 1981. Variable C banding patterns and a proposed C band Karyotype in *Gallus domesticus*. En: Genetics. 54: 273-279.

3. METODOLOGÍA

3.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ÁREA DE ESTUDIO

3.1.1. Santuario de Flora y Fauna Galeras. Figura 9. Hace parte del ramal centro oriental de la Cordillera de los Andes, en el Nudo de los Pastos, en el extremo sur-occidental de Colombia. Lo conforman las partes altas de los municipios de Pasto, Tangua, Yacuanquer, Consacá, Sandoná y La Florida, en el Departamento de Nariño.

Su distribución altitudinal se encuentra entre los 1950 msnm y los 4276 msnm (medidos en la cima del Volcán Galeras). Sus coordenadas geográficas son: 01° 12' Latitud Norte y 77° 23' Longitud Oeste. Las temperaturas medias anuales en el área oscilan entre 3° y 13°C, las más bajas corresponden a los meses de Julio y Agosto. La precipitación anual promedio en el área está entre los 790 y los 2.000 mm. La dispersión estacional de la precipitación juega un papel muy importante en la exuberancia o escasez de la vegetación, según sean los cambios de humedad. La humedad relativa promedio en el área es de 67%. La evaporación llega a variar incluso más que la temperatura y depende de la radiación solar, la cual es mucho más intensa en los páramos¹⁰⁵. La vegetación corresponde al bosque Andino nublado, comunidades de páramo y subpáramo, Ranunculáceas, bromelias, orquídeas, líquenes y musgos epífitos¹⁰⁶.

3.1.2. Laguna de La Cocha. Figura 9. El lago más importante ambiental y estratégicamente de los Andes colombianos, se ubica en la vertiente oriental del nudo de los Pastos, en el Departamento de Nariño (Colombia). Está comprendido entre 1° 01' y 1° 14' de latitud norte y 77° 05' y 77° 12' de longitud oeste. La región hace parte de la gran cuenca del Amazonas y tiene una extensión de 225.000 Ha., de las cuales 133.600 (59%) corresponden al Departamento de Nariño. La cuenca alta con 42.03 Ha. cubre el 18.68% del total de la cuenca del río Guamués o Laguna de La Cocha¹⁰⁷.

La Cocha se clasifica como una zona de alta biodiversidad avifaunística y por lo tanto prioritaria para su conservación. Esta alta biodiversidad esta relacionada con factores como su ubicación biogeográfica dentro de la zona amazónica andina, la presencia de diferentes ecosistemas como humedales, páramos y bosque de

¹⁰⁵ Ministerio Del Medio Ambiente, Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales. Pasto. Plan de Manejo (Versión preliminar no concertada) Santuario de Flora y Fauna Galeras, Regional Surandina. 1998.

¹⁰⁶ INDERENA. 1989. propuesta general para la elaboración de los términos de referencia de los Planes de Guía de Manejo. Planes de manejo, y Planes y Manuales Operativos del Sistema de Parques Nacionales Naturales de Colombia. Bogotá, Colombia: División de Parques Nacionales, INDERENA.

¹⁰⁷ CALDERON, J.J. 2002. Aves de la Laguna de La Cocha. Serie "Un Canto a la Vida". Primera Edición. San Juan de Pasto. Colombia. Asociación para el Desarrollo Campesino – ADC. p.24.

niebla; las diferencias en el estado de conservación de los bosques, en los cuales se encuentran: potreros, zonas en regeneración bosques en estado secundario y en estado maduro; la presencia de microhábitats y la alta diversidad florística de la zona. Los páramos azonales contribuyen a enriquecer la avifauna altoandina, llegando a observarse en los páramos de La Cocha casi el 50% de las aves de alta montaña colombiana¹⁰⁸.

3.1.3. Alto de Daza. Figura 9. Corregimiento Morasurco, posee un área de 5.822,8 Ha; limita al Norte con los municipios de Chachagüí y Buesaco, al Sur con el área urbana del Municipio de Pasto, al Oriente con el corregimiento de Buesaquillo, al Occidente con los corregimientos de Genoy y Mapachico. Posee nueve veredas, Daza es una de ellas y corresponde a una serie de zonas de páramo aislado que hacen parte de los cerros denominados El Fraile, Zapayurco, San Miguel, hacia el Nororiente del municipio de Pasto, con un área aproximada de 237,8 Has. de páramo, representando el 0,2% del área del municipio, siendo el más reducido e intervenido de los páramos del municipio.

Daza se encuentra a 3 km del Municipio de Pasto a los 1° 16' 27" Altitud Norte y 77° 15' 38" Longitud Oeste. Tiene un paisaje montañoso correspondiente a la vertiente Andina se localiza como una franja que bordea la vertiente entre los 2800 y 3500 msnm, esta unidad de paisaje ocupa el 11.4% del área del municipio. Presenta climas medios, fríos, el relieve se caracteriza por ser fuertemente inclinado con elevaciones mayores del 50%, la cobertura que hace parte de esta unidad se conforma principalmente de bosque secundario, rastrojos y pasto; el uso es de vocación protectora dado que esta unidad hace parte de las cuencas de los ríos Pasto y Bobo, fuentes de suministro de agua para más del 90% de la población del municipio¹⁰⁹.

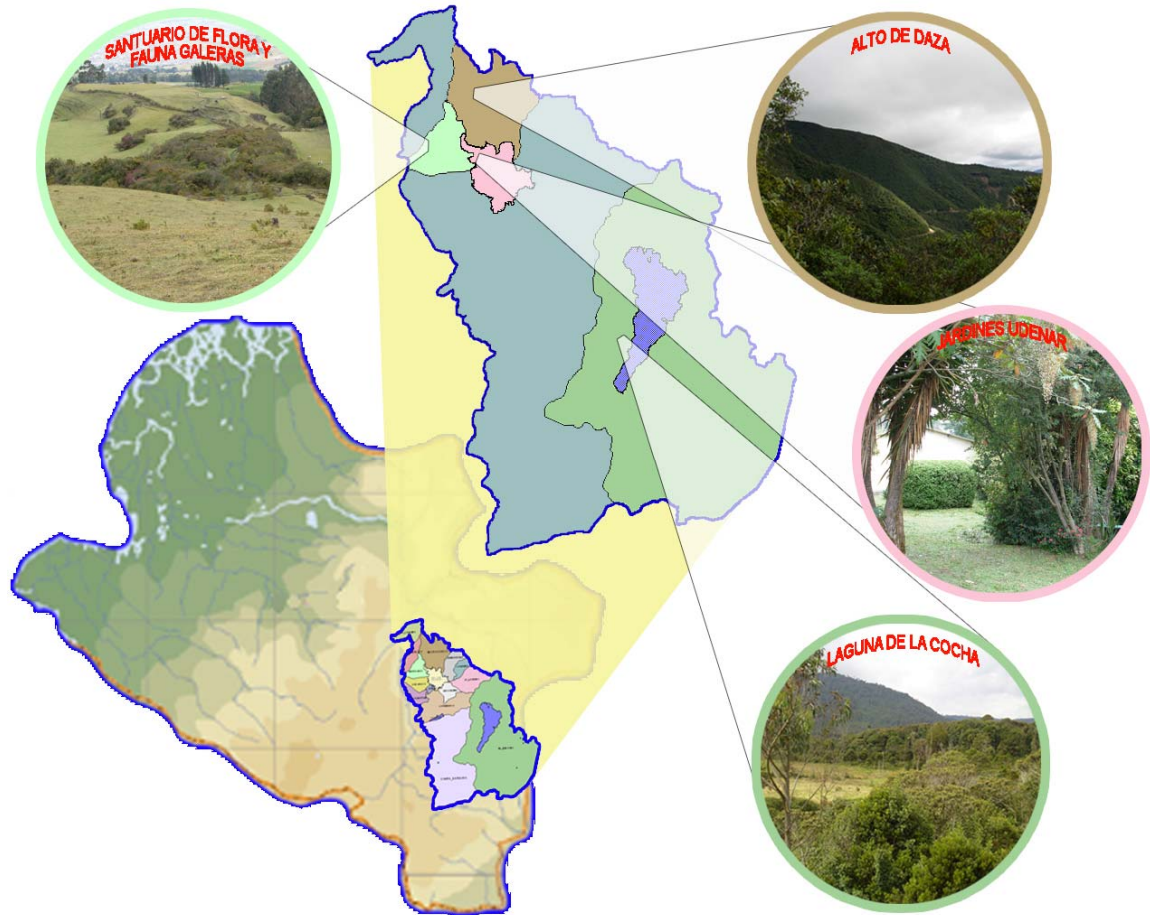
3.1.4 Jardines Universidad de Nariño. Figura 9. Se encuentran en un área verde, son de tipo ornamental en medio de edificaciones, las plantas que aquí se encuentran están sembradas en pasto quicuyo. Dentro de la flora de carácter introducido se encuentra *Begonia*, *Tradescantia*, *Fuchsia*, *Alstroemeriaceae*, *Pelargonium* y *Geranium*, las cuales poseen flores muy llamativas que atraen a las aves. Generalmente son hierbas que llegan de 1.50 a 1.80 metros de altura. Dentro de la vegetación arborea encontramos: Eucalipto de olor, Cipres, araucarias y Clusias*.

¹⁰⁸ Ibid. p.24.

¹⁰⁹ Agenda Ambiental del Municipio de Pasto – Dirección de Desarrollo Territorial. SIGAM. Julio 2004.

* ENTREVISTA con Marta Sofia Gonzales, Docente Departamento de Biología. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, 5 de Febrero de 2007

Figura 9. Puntos de muestreo en las áreas de estudio.



Fuente. Modificado de Agenda Ambiental del Municipio de Pasto¹¹⁰.

3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA

3.2.1 Obtención de los ejemplares. Para la fase de estandarización se utilizaron ejemplares capturados en las proximidades del laboratorio (Jardines de Biología Universidad Nacional de Colombia) para optimizar los resultados de los protocolos, se utilizaron tres ejemplares de *Gallus domésticus* (pollo) y otros ejemplares como *Pirocephalus rubinus* (atrapamoscas pechirojo), *Geothlypis aequinoctialis* (reinita enmascarada), *Contopus virens* (atrapamoscas oriental), por tener peso y talla similar a *Diglossa* y finalmente se aplicó a ocho ejemplares de *Diglossa* para la estandarización de las técnicas. Las muestras obtenidas de los individuos fueron procesadas en el Laboratorio de Citogenética de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Se adecuaron las técnicas mediante un

¹¹⁰ Agenda Ambiental del Municipio de Pasto. Op. cit.

ensayo hasta obtener las condiciones adecuadas repetibles que fueron confirmadas con el procesamiento de las muestras siguientes, la confiabilidad la proporcionó los resultados de las muestras sucesivas con la obtención de metafases óptimas para ser analizadas.

Para la estandarización se emplearon fundamentalmente dos técnicas frecuentemente referenciadas para cariotipos de aves (cultivo de linfocitos y médula, según Gianonni & Ferrari¹¹¹,) como estas técnicas no son adecuadas para todas las especies fué necesario ajustarlas al material que se trabajo.

Se empleó la metodología descrita por Gianonni & Ferrari¹¹², con las modificaciones propuestas por Lee & Elder¹¹³. También se ensayó otra técnica propuesta para la obtención de cromosomas a partir de médula como la colchicina *in vitro* que se empleó cuando los ejemplares no sobrevivieron a la captura en campo y un protocolo buscando mejorar los índices mitóticos en médula con cultivos de corto tiempo y estimulación con PHA como los propuestos para médulas humanas por Verma & Babu¹¹⁴, en aves Waldrigues¹¹⁵, y Shoffner¹¹⁶, la aplicación de estos protocolos implicó que los ejemplares llegaran vivos al laboratorio. Se ensayó una técnica para cultivo *in vivo* que había sido trabajada para reptiles Gutierrez & Bolaños¹¹⁷ inyectando PHA 24 horas antes del sacrificio. Anexo B. Se empleó un protocolo sencillo para la limpieza de las láminas utilizadas ver Anexo A.

Una vez se establecieron las variables a evaluar como: presencia de células estimuladas y no estimuladas, grado de condensación de los cromosomas en las metafases y las variables registradas en la Tabla 2 de los protocolos, se inició con los ejemplares de prueba realizando las respectivas modificaciones y posteriormente se aplicaron los protocolos a los ejemplares de estudio. Las muestras obtenidas de los individuos fueron procesadas en los Laboratorios de Medicina de la Universidad de Nariño.

¹¹¹ GIANONNI & FERRARI, Op. cit., p. 8, 48.

¹¹² Ibid. p.43.

¹¹³ LEE, M.R. & ELDER, F.F. 1986. Yea stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetic. Cell. En: Genet.* 26: p.38.

¹¹⁴ VERMA & BABU, Op. cit., Citado por JIMENEZ, op. cit., p. 32.

¹¹⁵ WALDRIGUES, A. 1971. Estudo cromossômico de alguns Cuculiformes americanas. Tese de doutoramento. Facultad de Medicina de Ribeirão preto, USP. 1980.

¹¹⁶ SHOFFNER, R.N. "Curso de Citogenética de Aves". Jaboticabal, UNESP. 21 a 26 de Janeiro de 1985. Citado por: GIANONNI & FERRARI, Op. Cit., p.121.

¹¹⁷ GUTIERREZ, J.M., TAYLOR, R.T & BOLAÑOS, R. 1979. Cariotipo de 10 especies de serpientes costarricenses de la familia Viperidae. *En: Rev. Biol. Trop. Costa Rica* 27, 309-319.

Tabla 2. Variables evaluadas.

VARIABLES		PARÁMETROS DE EVALUACIÓN
Tiempo de acción de colchicina	60,30,50,45 min	Índice mitótico Morfología de las metafases
Concentración de colchicina	0.05% , 0.016	
Tiempo de hipotónica KCl (0.075M).	30,60,46,47,45,50	Grado de Separación de los cromosomas
Fijación	3:1	Morfología de las metafases
CULTIVO CORTO DE MÉDULA ÓSEA.		
Medio de cultivo	RPMI 1640, Iscove's	Viabilidad Índice mitótico
Tiempo de Incubación	4,24 min	Estimulación celular Índice mitótico Morfología de las metafases
Suero fetal bovino	20%	Crecimiento celular
Fitohemaglutinina (PHA)	0.07%	Estimulación celular

Cada variable se evaluó de manera independiente y a medida que se obtenían resultados se modificaban las condiciones iniciales y se proseguía a evaluar una nueva variable.

3.3. FASE DE CAMPO

3.3.1. Animales experimentales. Se realizaron 12 salidas de campo con tres días de trabajo; utilizando 100 metros de redes de niebla para la captura de las aves, se tomó en cuenta los rangos altitudinales comprendidos entre 2800 y 3600 msnm y el hábitat que frecuentaban las aves del género *Diglossa*. El lugar de procedencia de las especies capturadas fueron: Santuario de Flora y Fauna Galeras, Laguna de La Cocha, Alto de Daza y Jardines de la Universidad de Nariño, como se describe a continuación en la Tabla 3:

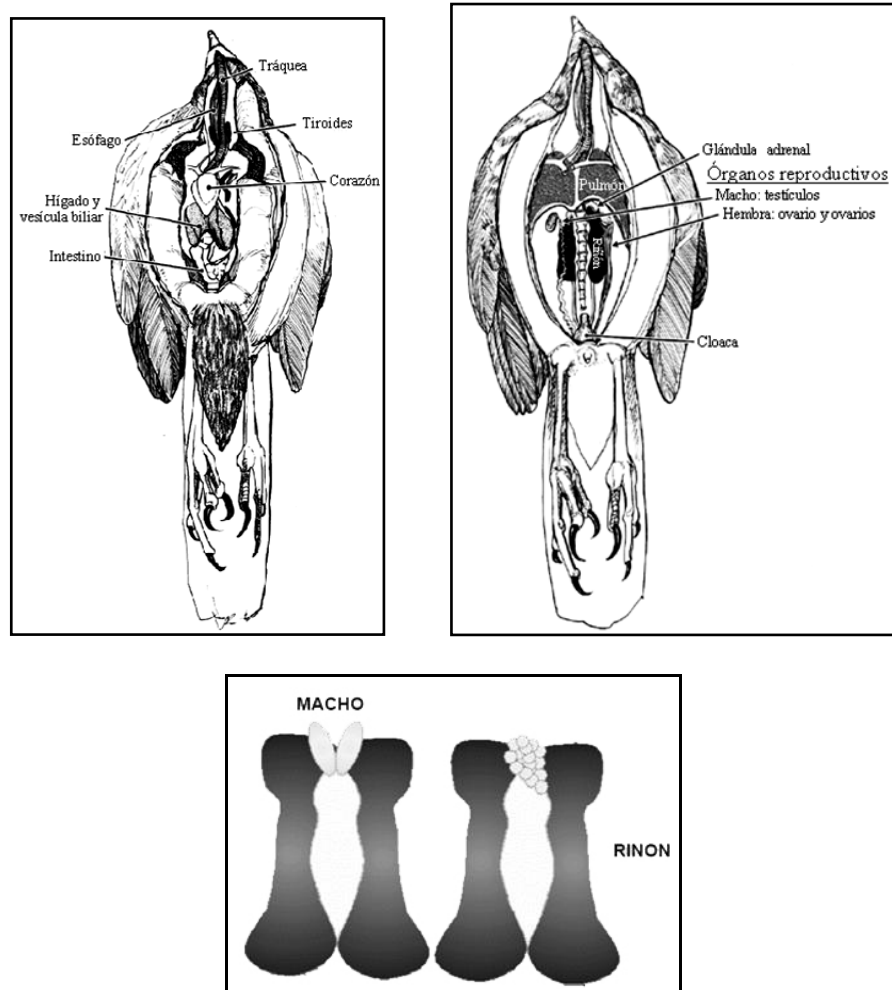
Tabla 3. Procedencia de animales experimentales

PROCEDENCIA	ESPECIE	Nº ANIMALES
Santuario de Flora y Fauna Galeras	<i>D. humeralis aterrima</i>	5
Laguna de La Cocha	<i>D. humeralis aterrima</i>	3
	<i>D. lafresnayii</i>	1
Alto de Daza	<i>D. humeralis aterrima</i>	3
	<i>D. lafresnayii</i>	1
Jardines Universidad de Nariño	<i>D. sittoides</i>	5
Total de capturas		18

3.3.2. Determinación de sexo morfológico. Para determinar el sexo de los individuos que no presentan dimorfismo sexual (*D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii*) se realizó disección del cuerpo del ave por el lado izquierdo cortando por la parte media de las costillas hasta el cinturón pectoral. Se despejaron hacia un lado los órganos digestivos quedando expuestos en el lado dorsal las gónadas como se muestra en la figura 10. En casi todas las aves, solamente el ovario izquierdo se desarrolla en las hembras y el testis izquierdo es el más grande en los machos por esto se entra desde el lado izquierdo. Al ave macho se midió (en mm) el largo y ancho del testis más grande; y en la hembra se midió el largo del ovario y el diámetro del folículo más grande. Al no encontrar o distinguir bien las gónadas (frecuentemente en aves muy jóvenes) se registró como sexo morfológico indeterminado mediante disección¹¹⁸. Los individuos de *D. sittoides* presentan dimorfismo sexual aparente y correspondían a la hembra de la especie.

¹¹⁸ STILES, F.G. 2003. Especímenes Ornitológicos y la Preparación de una piel de Estudio. Unidad de Ornitología. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Guía de Clase.

Figura 10. Disección del cuerpo del ave para la observación de gónadas.



Fuente. Saving Wildlife¹¹⁹

Los ejemplares capturados que murieron en campo y los ejemplares analizados citogenéticamente, fueron incluidos en el Museo colección ornitología PSO – 041 de la Universidad de Nariño, al igual que los tejidos extraídos durante la disección como: estómagos que se preservaron en formol al 10% para posteriores análisis de contenido estomacal y hábitos alimenticios de la especie. Adicionalmente se coleccionó pequeñas biopsias de hígado y corazón en etanol al 96% para estudios posteriores de genética molecular. Todos los ejemplares llevan sus respectivas notas de campo y datos morfoecológicos con el mismo número de colección.

¹¹⁹MUNSON, L. 1999. Procedimientos de necropsia para animales silvestres. [en línea]. [citado en 1 de Mayo de 2007]. Disponible en Internet: <http://www.wsc.org/sw-high_tech_tools/wildlifehealthscience/fvp/168570/guidelinesandpapers/Necropsymanualspanish>.

3.4. FASE DE LABORATORIO

3.4.1. Valoración de las técnicas. Como parámetro de análisis cuantitativo se tomo el grado de dispersión y contracción de los cromosomas obtenidos en cada uno de los tratamientos. Cada una de las metafases observadas en los barridos se observaron en 100X y se clasificaron de acuerdo con su apariencia en tres categorías:

Condensadas: metafases con cromosomas muy condensados, puntuales y un nivel de dispersión bajo que no permitieron el análisis citogenético indicando problemas en tiempo y/o concentración de colchicina y en hipotónica.

Optimas: metafases con un buen grado de dispersión y condensación de los cromosomas en donde se diferenció la morfología de los macrocromosomas. indicando que la técnica empleada fué la adecuada para el estudio citogenético.

Menos condensadas: metafases en forma intermedia de las anteriormente descritas. Los porcentajes se calcularon asignando el 100% al número total de metafases observadas durante los barridos.

De cada protocolo se obtuvo tres láminas coloreadas con Giemsa, de las cuales dos fueron analizadas para seleccionar la técnica más adecuada empleada en los ejemplares capturados, y en cada una de ellas se contabilizaron las células observando en 10X cinco líneas verticales que sumaban 166 campos aproximadamente. Se efectuó un conteo diferencial del número total de células estimuladas y en metafase para estimar los índices mitóticos para cada uno de los tratamientos, seleccionando el protocolo con el índice mitótico más alto.

3.5. ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE LA ESPECIE

3.5.1 Determinación del número cromosómico. De los mejores cultivos se seleccionó 28 metafases de buena calidad en las cuales se determinó el número cromosómico (macro y microcromosomas) y el número fundamental (NF) que se obtuvo realizando un conteo del número de brazos en total del conjunto cromosómico en los macrocromosomas y microcromosomas (considerándolos como acrocéntricos). Cada metafase se digitalizó en coloración Giemsa con la utilización de un microscopio Leitz® conectado por una interfase al hardware, para la elaboración de los cariotipos se empleó como software el programa Lucia Karyotyping®.

3.5.2 Determinación del sexo cromosómico. Se tuvo en cuenta lo reportado por De Lucca & Rocha¹²⁰ en el orden Passeriformes donde se reconoce que el

¹²⁰ DE LUCCA & ROCHA. Op. cit., p.59.

cromosoma Z es equivalente al par uno y el cromosoma W generalmente se encuentra entre el par cinco y diez.

3.6. BIOMETRÍA CROMOSÓMICA

Los cromosomas ordenados dentro del cariotipo fueron medidos por medio del programa Lucia Measurement®, calculando longitud total, longitud de brazos y la proporción entre brazos de cada par cromosómico. Estas mediciones se realizaron desde el extremo de la cromátide más larga hasta la mitad del centrómero para el brazo largo y el corto de cada cromosoma, de la suma de las medidas de los dos brazos se obtuvo la longitud total del cromosoma, utilizando los datos de todas las metafases evaluadas se calculó los índices centroméricos (I.C), relación de brazos (R.B), longitud relativa de los autosomas (L.R) y la longitud de Z y W, de acuerdo con las siguientes fórmulas:

Índice centromérico:

$$I.C = \frac{p}{p+q} \times 100$$

Relación de Brazos:

$$R.B = \frac{q}{p}$$

Longitud Relativa:

$$L.R = \frac{\text{Longitud total del cromosoma}}{\sum \text{Longitud de los cromosomas del conjunto haploide}} \times 100$$

Donde p corresponde al brazo corto y q al brazo largo del cromosoma. Una vez obtenidos estos datos se clasificaron los cromosomas utilizando la tabla de Levan *et al*¹²¹.

Para el análisis de los datos de biometría cromosómica I.C, R.B y L.R fué calculado el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variabilidad (CV) de cada cromosoma.

Se aplicó una prueba de Shapiro Will (Anexo H) para ver si los datos se ajustaban a una distribución normal y posteriormente se evaluó mediante pruebas de

¹²¹ LEVAN, *et al.* Op. cit., p. 210.

ANOVA de una sola vía con un alfa de 0.05 si existen diferencias significativas para I.C, R.B y L.R entre las tres especies de *Diglossa*, los datos fueron analizados en el programa Past 1.3.

3.6.1 Idiogramas. De acuerdo con las mediciones relativas de los cromosomas, estos fueron representados gráficamente mediante los idiogramas con el programa Photoshop C.S[®]. Para este propósito se consideró el centrómero como punto 0, alineando los cromosomas por este punto, con los brazos cortos (p) encima de la línea y los largos (q) por debajo.

4. RESULTADOS

4.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Dado que el tamaño de los ejemplares propuestos para este estudio es muy pequeño hubo limitaciones en cuanto al volúmen disponible de sangre para los cultivos de linfocitos y estos no proporcionaron resultados positivos. Adicionalmente la sobrevivencia en el transporte de estos ejemplares hasta el laboratorio fué baja por esta razón los métodos empleados en el presente estudio son las técnicas directas a partir de médula ósea con algunas modificaciones adaptadas al material en estudio que se discuten a continuación.

Las técnicas estandarizadas en *D. sittoides* fueron aplicadas a los demás ejemplares de estudio *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii*, obteniendo resultados positivos, lo cual nos indica que las técnicas empleadas pueden ser aplicadas a cualquier especie del género *Diglossa*.

Los tratamientos realizados por cada variable evaluada tuvieron una réplica (ver Anexo C) antes de comenzar con los protocolos iniciales de los ejemplares de prueba (*D. sittoides*) y mediante la observación de las láminas obtenidas se valoró la eficacia del protocolo aplicado, determinando la presencia de células estimuladas y no estimuladas ver Figura 11, las metafases y el grado de condensación de los cromosomas como se muestra en la Figura 12 y en Tabla 4.

Figura 11. Células observadas en las láminas teñidas con tinción convencional giemsa: a) Estimuladas; b) no estimuladas

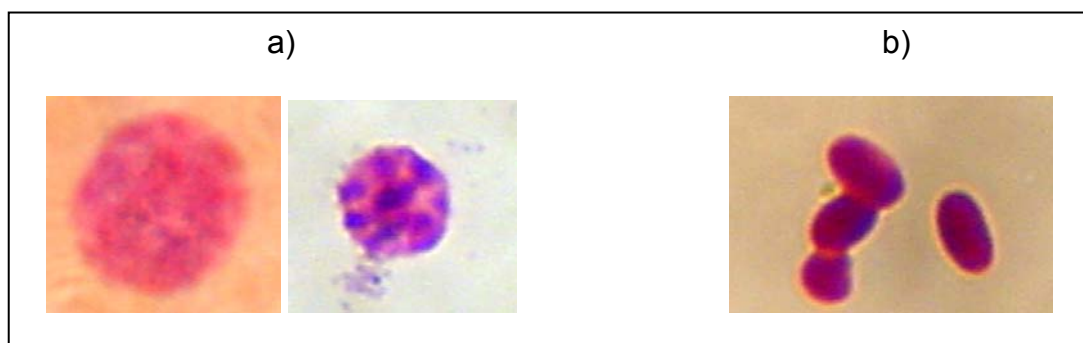


Tabla 4. Protocolos empleados para los ejemplares

Prueba	Ejemplar	Protocolo Aplicado	Resultados
1	<i>D. sittoides</i>	Médula directa	Se encontró un 80 % de células estimuladas y 20 % de metafases con cromosomas muy condensados
2	<i>D. sittoides</i>	Médula directa con fermento	Se encontró un 60 % de células estimuladas y 40 % de metafases con cromosomas muy condensados
3	<i>D. sittoides</i>	Cultivo corto de Médula ósea sin PHA y sin SFB	Se encontró un 70 % de células muertas y residuos, el 30 % restante correspondió a células viables pero no se encontró ninguna metafase. Hecho que puede atribuirse en parte a la deficiencia de PHA y SFB del cultivo.
4	<i>D. sittoides</i>	Médula directa	Se encontró el 100 % de células muertas.
5	<i>D. sittoides</i>	Médula directa	Se encontró el 40 % de células muertas y 60 % de células viables en las cuales no hubo estimulación ni presencia de metafases.
6	<i>D. sittoides</i>	Médula directa	Se encontró un 70 % de células estimuladas, y 30 % de metafases las cuales presentaron una baja dispersión y una condensación media.
7	<i>D. sittoides</i>	Cultivo corto de Médula ósea con inyección <i>in vivo</i> de PHA	Se observó un 30 % de células estimuladas pero no se encontró metafases, no se determino el tiempo después de la muerte del ejemplar por esto los resultados del protocolo no están sujetos a discusión.
8	<i>D. sittoides</i>	Cultivo corto de Médula ósea con PHA <i>in vitro</i>	Se encontró un 70 % de células estimuladas y 30% de metafases la cuales presentaron diferencias en cuanto a dispersión.

De acuerdo a la Tabla 4 los resultados obtenidos sugirieron modificaciones a los protocolos iniciales tomados de Gianonni & Ferrari¹²², Lee & Elder¹²³, Shoffner¹²⁴ y Gutierrez, *et al*¹²⁵. A medida que se trabajó con los ejemplares de estandarización se realizó las siguientes modificaciones:

¹²² GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.40.

¹²³ LEE & ELDER, Op. cit., p.48.

¹²⁴ SHOFFNER, Op.cit., Citado por: GIANONNI & FERRARI, Op. Cit., p.121.

¹²⁵ GUTIERREZ, TAYLOR, & BOLAÑOS, Op. cit., p.310.

4.1.1 Tiempo de acción de colchicina. Siguiendo el protocolo original de Gianonni & Ferrari¹²⁶, la concentración de colchicina empleada fué de 0.05% inyectado de acuerdo al peso del ave. Para cultivo corto se empleó una concentración al 0.016% usada por Vargas¹²⁷. El tiempo de acción de la colchicina recomendado por Gianonni & Ferrari¹²⁸, es de una hora, pero de acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 4 se observaron cromosomas muy condensados, por lo que en el presente estudio se probaron diferentes tiempos de colchicina encontrando los siguientes resultados como se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5. Pruebas en tiempo de acción de colchicina

Prueba	Tiempo de acción de colchicina	Resultados
1	1 hora	12 metafases/ lámina
2	1 hora	20 metafases/ lámina
3	30 minutos	No se encontró metafases
4	30 minutos	No se encontró metafases
5	1 hora	No se encontró metafases
6	30 minutos	17 metafases/ lámina
7	50 minutos	40 metafases/ lámina
8	45 minutos	26 metafases/ lámina

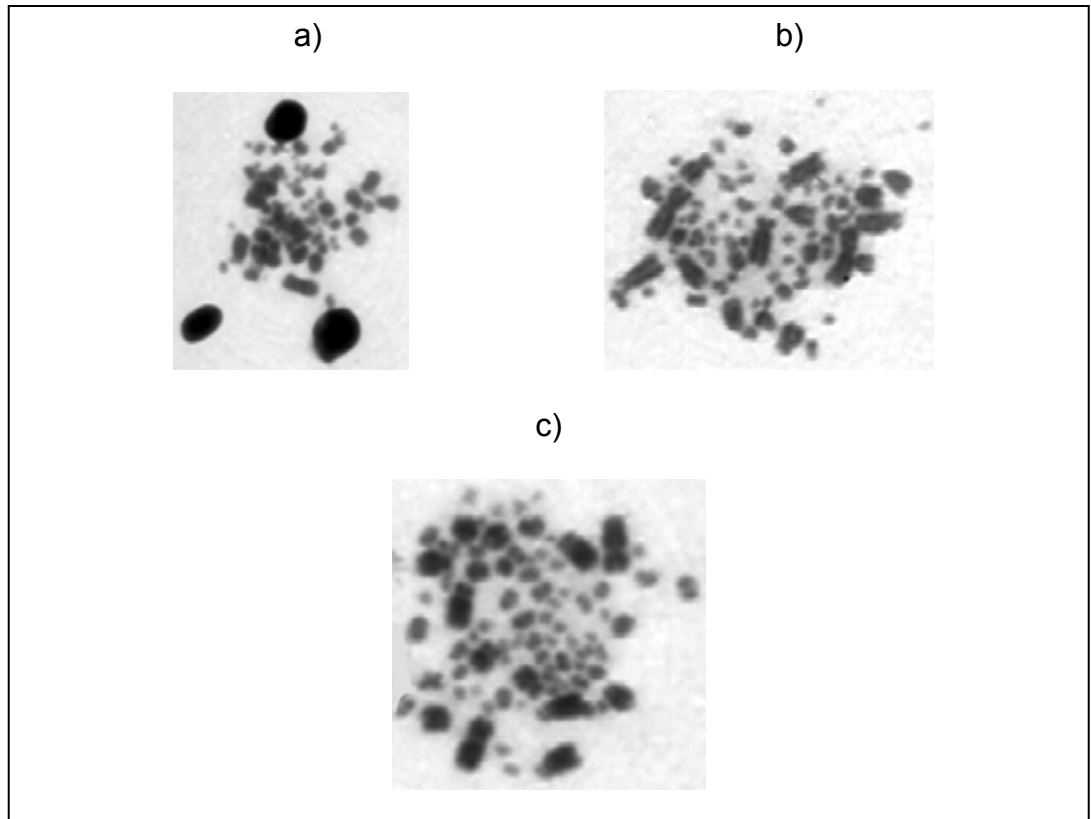
El tiempo de colchicina que mejor se ajustó fué de 50 minutos con un buen número de metafases observadas y un grado de condensación y dispersión satisfactorio. Figura 12.

¹²⁶ GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.40.

¹²⁷ VARGAS, M. S. 2000. Evaluación de Técnicas para Obtención de Cromosomas en Aves de la Familia Psittacidae. Santafé de Bogotá, D.C. Trabajo de grado (Zootecnista) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. P.39.

¹²⁸ GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.41.

Figura 12. Metafases observadas de acuerdo al grado de condensación y dispersión: a) Condensadas; b) óptimas; c) menos condensadas.



4.1.2 Pruebas en tiempo de hipotónica KCl (0.075M). El tiempo de hipotónica recomendado por Gianonni & Ferrari¹²⁹ es de 30 minutos, sin embargo de acuerdo a la Tabla 6 se observó baja dispersión y cromosomas sobrepuestos en la mayoría de las metafases por lo cual fué necesario ajustar este tiempo. La temperatura más frecuente utilizada en los protocolos de aves es de 37°C¹³⁰, sin embargo Gianonni & Ferrari¹³¹ recomienda que se utilice a 40°C - 41°C.

Según Silva, et al¹³². La precisión en la preparación y el tiempo de tratamiento hipotónico son fundamentales para la obtención de metafases óptimas abiertas fáciles de contar y con un bajo número de cromosomas sobrepuestos. Errores en estos pasos, ocasionan rupturas celulares si la concentración de sales es extremadamente baja o el tiempo de tratamiento prolongado, o metafases completamente cerradas si la concentración de sales es cercana a la isotonía. Para lograr una mejor dispersión de los cromosomas es muy importante la ruptura

¹²⁹ GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.42.

¹³⁰ DE BOER 1976, citado por Gianonni & Ferrari Op. cit., p.43.

¹³¹ GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.43.

¹³² SILVA, E., CRANE, C., BERMUDEZ, A.J., BUENO, M.L., PEDRAZA, X., & GIRALDO, A. 1989. Citogenética Humana. Manual de Procedimientos. Instituto Nacional de Salud. Colombia. 36 p.

de la membrana por acción mecánica la cual se realiza en el momento de goteo de la lámina a una distancia de dos a tres metros de altura, ya que las células de la médula ósea son difíciles de romper.

Tabla 6. Pruebas en tiempo de hipotónica KCl (0.075M)

Prueba	Tiempo exposición hipotónica	Resultados
1	30 minutos a 37°	Baja dispersión, cromosomas sobrepuestos
2	60 minutos a 40°	Baja dispersión, cromosomas sobrepuestos
3	46 minutos a 37°	Baja dispersión, cromosomas sobrepuestos
4	47 minutos a 37°	Baja dispersión, cromosomas sobrepuestos
5	45 minutos a 37°	Baja dispersión, cromosomas sobrepuestos
6	50 minutos a 40°	metafases con buena dispersión
7	60 minutos a 40°	Baja dispersión, cromosomas sobrepuestos
8	45 minutos a 40°	Baja dispersión, algunas metafases con pérdida de cromosomas.

Se obtuvo resultados favorables con un tiempo de hipotónica de 50 minutos a 40°C. Adicionalmente el proceso requiere de una correcta resuspensión del botón celular para obtener una mejor calidad en las preparaciones.

4.1.3 Fijación. Silva *et al.*¹³³, recomienda que los reactivos empleados deben ser químicamente puros y conservados en frascos bien tapados para evitar la hidratación, alcoholes hidratados no realizan una adecuada fijación y de esta depende que exista un buen esparcimiento y secado en el momento del extendido. La mezcla alcohol ácido es inestable y por esto se recomienda usar siempre fijador fresco y frío. Si no se efectúa una rápida y ágil suspensión en la fijación se forman grumos difíciles de disolver y producen extendidos sucios y con bajo índice mitótico. Se observan metafases muy cerradas, con restos citoplasmáticos y cromosomas poco definidos o peludos.

Después de aplicar el tratamiento de fijación descrito por Gianonni & Ferrari¹³⁴, se observó la persistencia de residuos citoplasmáticos, por lo cual se realizó una única prueba implementando una prefijación al terminar el tratamiento con hipotónica en *D. sittoides* que arrojó resultados satisfactorios por lo que fue aplicada para los siguientes ejemplares y se describe a continuación:

¹³³ Ibid. p.36.

¹³⁴ GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.40.

Una vez se completó el tiempo de hipotónica antes de centrifugar, se adicionó 1 ml de carnoy fresco y frío, se invirtió el tubo tres veces y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante.

Se adicionó 1, 3 y 6 ml de carnoy y se dejó en nevera en tiempos de 2, 5 y 30 minutos respectivamente.

Se resuspendió, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos se descartó el sobrenadante.

Se adicionó 4 ml de carnoy y se dejó en nevera 20 minutos, se resuspendió, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante.

Se adicionó 4 ml de carnoy y se dejó en nevera 10 minutos, se resuspendió, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante para proceder con el goteo de las láminas.

4.1.4 Cultivo corto de médula ósea. De acuerdo con los resultados observados en la Tabla 7 fué verificada la importancia de la combinación de variables en la respuesta que las células presentan en el cultivo. Se observó que variables como: PHA-P, Suero Fetal Bovino (SFB) y el tiempo de incubación de cultivo fueron parámetros clave en la obtención de mejores resultados.

Tabla 7. Condiciones para cultivo corto de Médula ósea

Prueba	Medio de cultivo	Mitógeno y concentración PHA - P	Tiempo de PHA	SFB	T° incubación	Tiempo	Resultados
3	RPMI 1640	X	X	X	37°	4 horas	No hubo crecimiento celular
7	Iscove's 3 ml	inyección in vivo de PHA 0.01 ml al 0.07%	24 horas	X	40°	24 horas	Celularidad baja
8	Iscove's 3 ml	con PHA in Vitro 70 µml al 0.07%	24 horas	1 ml	40°	24 horas	Celularidad media

a. Medio de Cultivo

De acuerdo con Maureer¹³⁵, el medio RPMI 1640 es rico en nucleosidos y vitaminas, elementos necesarios dentro del proceso de división, esto influye en el aumento del índice mitótico, no obstante una gran cantidad de estos elementos se encuentran en bajas cantidades y no alcanzan a suplir las necesidades de crecimiento y división lo cual se refleja en la ausencia de viabilidad celular. Por

¹³⁵ MAUREER, H. R. 1986. Towards Chemically – defined, Serum-free Media for Mammalian Cell Culture. In: Animal Cell Culture, a practical approach. Edited by Freshney R.I I.R.L. press Limited. Oxford. England. p. 18.

esta razón se tomo lo recomendado por Gianonni & Ferrari¹³⁶, empleando el medio de cultivo Iscove's, ya que es el medio que ha proporcionado los mejores resultados en la mayoría de aves estudiadas. Se trabajó en condiciones estériles siguiendo el protocolo de Shoffner¹³⁷, con modificaciones en cuanto a la cantidad de medio, puesto que se recomiendan de 7 a 10 ml y en este estudio se usó 3 ml debido a que la cantidad de muestra de médula fué baja en comparación de la médula extraída en aves de mayor porte. El tiempo que mejor se ajusto al cultivo fué de 24 horas a una temperatura de 40°C.

b. Suero fetal bovino (SFB)

En el protocolo de Shoffner¹³⁸, no sugiere el uso de SFB, al realizar los ensayos de cultivo se observó que no hubo crecimiento celular por esta razón empleamos un suplemento con 20% de SFB como lo propone Waldrigues¹³⁹, en donde se incrementa el aporte de factores de crecimiento, lo que permite que las células en cultivo entren en la fase de síntesis del ciclo celular, lo cual se refleja en el aumento de células viables y estimuladas en las preparaciones, sugiriendo la utilización del SFB para los siguientes cultivos.

c. Fitohemaglutinina (PHA)

Para mejorar los índices mitóticos en la médula se uso 70 µml de PHA – P, para el cultivo *in vitro*. Una modificación para el cultivo *in vivo* de Gutierrez, *et al*¹⁴⁰, es el uso de la fitohemaglutinina comercial en lugar de la cruda, la cantidad de fitohemaglutinina se uso como la recomienda Gutierrez, *et al*¹⁴¹, en una inyección 0.1ml por cada 34 gramos de peso corporal durante 24 horas.

La técnica de cultivo *in vivo* que Gutierrez, *et al*¹⁴², emplea para reptiles y algunas aves con muy buenos resultados la realiza en sangre y además de inyectar PHA emplea colchicina utilizando el cuerpo del ejemplar como medio de cultivo e incubación. Durante el desarrollo del estudio se estableció que el protocolo de Gutiérrez, *et al*¹⁴³, no tiene óptimos resultados en aves de pequeño porte, ya que no se puede obtener volúmenes de sangre considerables con los que se pueda trabajar. Por esta razón se realizaron modificaciones importantes a dicho protocolo; las modificaciones mas relevantes consistieron en que se inyectó PHA – P (comercial y no cruda) *in vivo*, se trabajó con cultivo corto de médula ósea y se uso colchicina *in vitro* como se describe en el Anexo G.

¹³⁶ GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.40.

¹³⁷ SHOFFNER, Op.cit., Citado por: GIANONNI & FERRARI, Op. Cit., p.121.

¹³⁸ SHOFFNER, Op.cit., Citado por: GIANONNI & FERRARI, Op. Cit., p.121.

¹³⁹ WALDRIGUES, A. 1971. Estudo cromossômico de alguns Cuculiformes americanas. Tese de doutoramento. Facultad de Medicina de Ribeirão preto, USP. 1980.

¹⁴⁰ GUTIERREZ, TAYLOR, & BOLAÑOS, Op. cit., p.310.

¹⁴¹ Ibid. p.310.

¹⁴² Ibid. p.310.

¹⁴³ Ibid. p.310.

Las modificaciones que se hicieron en este estudio al protocolo base, son reportadas como un nuevo protocolo que puede emplearse en citogenética de aves de pequeño porte, ver Anexo G. Sin embargo aunque la Fitohemaglutinina P (PHA - P) es el mitógeno mas empleado, no todas las especies responden adecuadamente a su estímulo, adicionalmente la concentración óptima debe ser establecida para cada caso.

Finalmente durante la estandarización de las técnicas se determinó que los protocolos que mejor se ajustan para el estudio cromosómico en *Diglossa* es la obtención de metafases a partir de: Médula directa (Anexo D), Médula directa – Tratamiento con fermento (Anexo E), Cultivo corto de médula con inyección de colchicina y PHA *in vitro* (Anexo F) y Cultivo corto de médula con inyección de PHA *in vivo* (Anexo G). En las Figuras 13 y 14 se muestra la aplicación de las técnicas a los ejemplares de estudio.

Figura 13. Obtención de metafases a partir de médula ósea. a) Inyección de colchicina (intramuscular); b) Tratamiento con fermento (intraperitoneal); c) extracción de huesos; d) colecta de células.

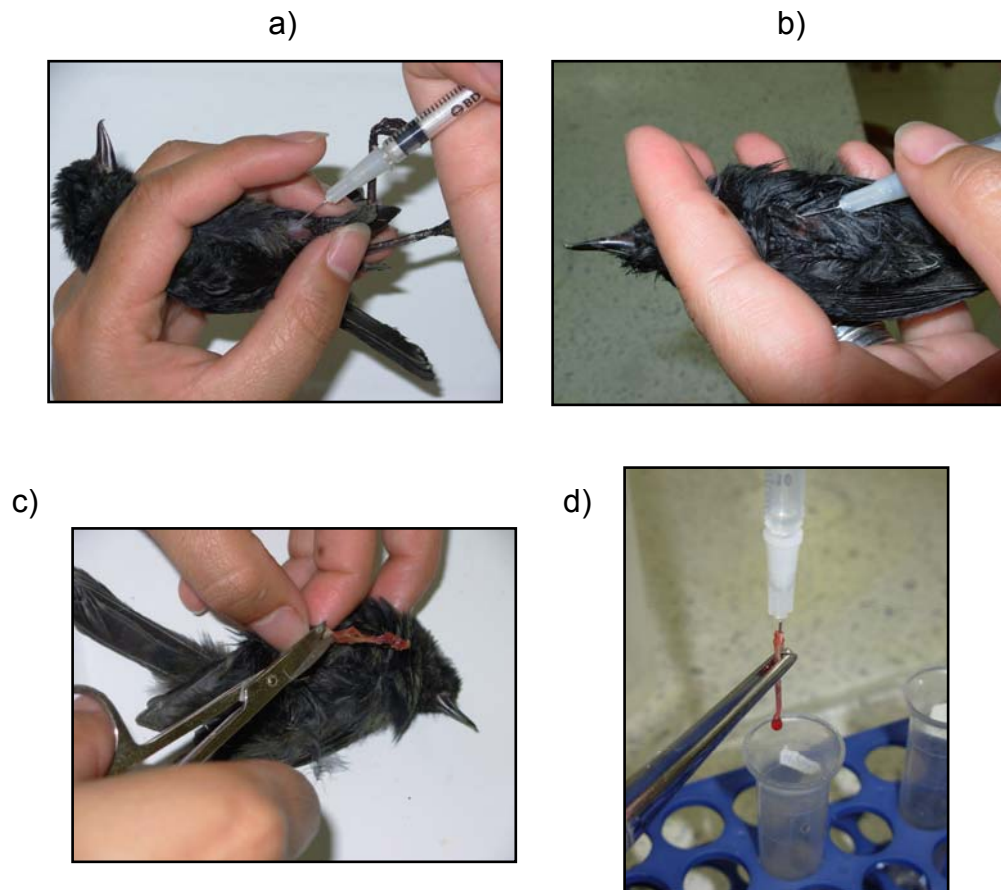
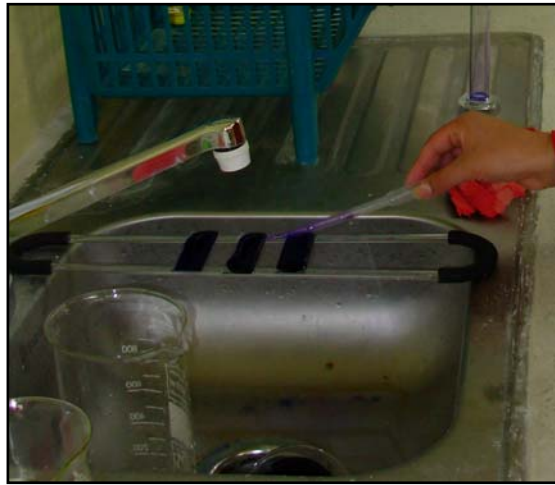


Figura 14. Cultivo corto de médula. a) Siembra de la muestra; b) cosecha; c) tinción.



c)



Mientras se realizó el proceso de extracción de médula en cada individuo analizado se continuó con la disección del ejemplar con el fin de determinar el sexo. Teniendo en cuenta que las especies *D. humeralis* y *D. lafresnayii* no presentan dimorfismo sexual, a diferencia de *D. sittoides* que de acuerdo al patrón del plumaje de los individuos analizados correspondió a la hembra de la especie. Se observó la presencia de gónadas en cada individuo, como se muestra en la Tabla 8 a excepción de dos individuos de *D. humeralis aterrima* donde no se observó la presencia de gónadas que permitieran la identificación del sexo morfológico.











Tabla 8. Identificación de sexo morfológico en las especies de *Diglossa* analizadas.

Especie	Gónada encontrada	Sexo	Medición de Testis y Ovario
<i>D.humeralis aterrima</i>	Testis	M	L=1,74 A=1,58 mm
<i>D.humeralis aterrima</i>	Testis	M	L=1.5 A=1.1 mm
<i>D.humeralis aterrima</i>	No se observó	I	Juvenil
<i>D.humeralis aterrima</i>	No se observó	I	Juvenil
<i>D.humeralis aterrima</i>	Ovarios	H	L=6,47 D=1,27 mm
<i>D.lafresnayii</i>	Testis	M	L=1,34 A=1,71 mm
<i>D. sittoides</i>	Ovarios	H	L= 5,21 A=1,12 mm
<i>D. sittoides</i>	Ovarios	H	L= 6,2 A= 1,31 mm
<i>D. sittoides</i>	Ovarios	H	L= 5,62 A=1,48 mm
<i>D. sittoides</i>	Ovarios	H	L= 6,14 A= 1,25 mm

La identificación cromosómica del sexo se realizó al organizar los cariotipos. Esta identificación pudo ser comparada con los resultados obtenidos en la identificación

del sexo morfológico de las especies analizadas, encontrando que el sexo cromosómico corresponde exactamente al sexo morfológico identificado. Cabe resaltar que los cromosomas sexuales observados en los cariotipos de los individuos de *D. humeralis aterrima* donde no fué posible la identificación del sexo morfológico proporcionaron este dato el cual correspondió a un macho y una hembra de la especie claramente diferenciado en el cariotipo. Tabla 9.

Tabla 9. Identificación de sexo cromosómico en las especies de *Diglossa* analizadas.

Especie	Sexo cromosómico
<i>D. humeralis aterrima</i>	
<i>D. humeralis aterrima</i>	
<i>D. humeralis aterrima</i>	
<i>D. humeralis aterrima</i>	
<i>D. humeralis aterrima</i>	
<i>D. lafresnayii</i>	
<i>D. sittoides</i>	
<i>D. sittoides</i>	
<i>D. sittoides</i>	
<i>D. sittoides</i>	

4.2 CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA

Se caracterizaron citogenéticamente tres machos de *D. humeralis aterrima* y dos hembras, un macho de *D. lafresnayii* y cuatro hembras de *D. sittoides*. En las Tablas 10 y 11 se presenta un resumen de la técnica empleada para cada uno de los ejemplares estudiados citogenéticamente.

4.2.1 Valoración de las técnicas. De acuerdo al grado de dispersión y contracción de los cromosomas observados en las metafases el mayor porcentaje en metafases optimas se presentó en *D. humeralis aterrima* (individuo 5) con un 48.27% empleando el cultivo corto de médula utilizando inyección de PHA – P *in vitro*, seguida de *D. lafresnayii* con un 38.11% con la técnica directa de médula ósea y *D. humeralis aterrima* (individuo 2) con un 35% utilizando la técnica de médula directa – tratamiento con fermento como se muestra en la Tabla 10:

Tabla 10. Valoración de técnicas empleadas

Especie	Individuo No	Técnica	Grado de contracción y dispersión		
			Condensadas	Optimas	Menos Condensadas
<i>D. humeralis aterrima</i> ♂	1	Técnica directa de médula Ósea	*	*	*
<i>D. humeralis aterrima</i> ♀	2	Tratamiento con fermento	34 %	35 %	31 %
<i>D. humeralis aterrima</i> ♂	3	Técnica directa de médula Ósea	*	*	*
<i>D. humeralis aterrima</i> ♂	4	Cultivo corto de Médula utilizando inyección de PHA - P <i>in vivo</i>	60 %	8.69 %	30.43%
<i>D. humeralis aterrima</i> ♀	5	Cultivo corto de Médula utilizando inyección de PHA - P <i>in vitro</i>	24.13 %	48.27%	27.58 %
<i>D. lafresnayii</i> ♂	1	Técnica directa de médula Ósea	27.22 %	38.11 %	34.75 %
<i>D. sittoides</i> ♀	1	Técnica directa de médula Ósea	32 %	28 %	70 %
<i>D. sittoides</i> ♀	2	Técnica directa de médula Ósea	56%	10 %	34%
<i>D. sittoides</i> ♀	3	Cultivo corto de Médula utilizando inyección de PHA - P <i>in vivo</i>	*	*	*
<i>D. sittoides</i> ♀	4	Cultivo corto de Médula utilizando inyección de PHA - P <i>in vitro</i>	31 %	24 %	45 %

* La técnica no justifica aplicar análisis cuantitativo

De acuerdo a los protocolos establecidos para *Diglossa* en la fase de estandarización, se obtuvo los índices mitóticos para las especies analizadas como se muestra en la Tabla 10, en donde *D. humeralis aterrima* (individuo 2) presenta un índice de 1.54 con la técnica de médula directa – tratamiento con fermento, seguida de *D. lafresnayii* con un índice de 0.62 con la técnica directa de médula ósea y *D. humeralis aterrima* (individuo 4) con un índice de 0.45 empleando el cultivo corto de médula utilizando inyección de PHA – P *in vivo*. Cabe resaltar que aunque los índices no fueron muy altos permitieron el análisis cariológico.

Tabla 11. Índice mitótico para los ejemplares estudiados

Procedencia	Especie	Individuo No	Tecnica	Metafasas observadas	Indice Mitotico
Santuario de Flora y Fauna Galeras	<i>D. humeralis aterrima</i> ♂	1	Técnica directa de médula Ósea	12	*
	<i>D. humeralis aterrima</i> ♀	2	Tratamiento con fermento	41	1.54
Alto de Daza	<i>D. humeralis aterrima</i> ♂	3	Técnica directa de médula Ósea	1	*
Laguna de La Cocha	<i>D. humeralis aterrima</i> ♂	4	Cultivo corto de Médula utilizando inyección de PHA - P "in vivo"	23	0.45
	<i>D. humeralis aterrima</i> ♀	5	Cultivo corto de Médula utilizando inyección de PHA - P "in vivo"	29	0.17
Laguna de La Cocha	<i>D. lafresnayii</i> ♂	1	Técnica directa de médula Ósea	202	0.62
Jardines Universidad de Nariño	<i>D. sittoides</i> ♀	1	Técnica directa de médula Ósea	40	0.30
	<i>D. sittoides</i> ♀	2	Técnica directa de médula Ósea	18	0.15
	<i>D. sittoides</i> ♀	3	Cultivo corto de Médula utilizando inyección de PHA - P "in vivo"	1	*
	<i>D. sittoides</i> ♀	4	Cultivo corto de Médula utilizando inyección de PHA - P "in vivo"	7	0.05

* La técnica no justifica aplicar análisis cuantitativo

4.3 ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE LA ESPECIE

Para la determinación del número cromosómico fueron digitalizadas y analizadas en el microscopio un total de 28 metafases: nueve metafases en *D. humeralis aterrima*, 12 en *D. lafresnayii* y siete metafases en *D. sittoides*. Realizando un conteo de macro y microcromosomas como se muestra en la Tabla 12 encontrando los siguientes resultados:

Tabla 12. Número de cromosomas observados en las metafases.

Especie	Número de Metafasas	Numero de Macrocromosomas	Número de Microcromosomas
<i>D. humeralis aterrima</i>	1	8	22
	2	8	22
	3	8	27
	4	8	33
	5	8	26
	6	8	20
	7	8	29
	8	8	23
	9	8	29

Especie	Número de Metafases	Numero de Macrocromosomas	Número de Microcromosomas
<i>D.lafresnayii</i>	1	8	33
	2	8	33
	3	8	28
	4	8	26
	5	8	25
	6	8	34
	7	8	34
	8	8	34
	9	8	25
	10	8	33
	11	8	33
	12	8	32
<i>D. sittoides</i>	1	8	19
	2	8	19
	3	8	19
	4	8	18
	5	8	21
	6	8	22
	7	8	21

El número de macrocromosomas fué constante en las metafases observadas de las tres especies, mientras que en el número de microcromosomas presentó una variación que puede estar asociada con genes específicos relacionados con variables ambientales. Por esta razón se presentan rangos entre el menor y el mayor número de microcromosomas encontrado en los cariogramas observados. Los pares cromosómicos fueron ordenados de acuerdo a su tamaño como lo recomienda Gianonni & Ferrari¹⁴⁴.

El complemento cromosómico de *D. humeralis aterrima* corresponde a $2n = 56 - 82$ con un número fundamental de $NF = 66 - 92$ donde se observa ocho pares de macrocromosomas incluyendo el par sexual. El número de microcromosomas corresponde a un rango de 20 a 33 pares y los cromosomas Z (Submetacéntrico) y W (metacéntrico) que en tamaño corresponden al primer y quinto par. Figura 15 y 16.

¹⁴⁴ GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.51.

Figura 15. Cariotipo de una hembra de *D. humeralis aterrima* con tinción convencional Giemsa.

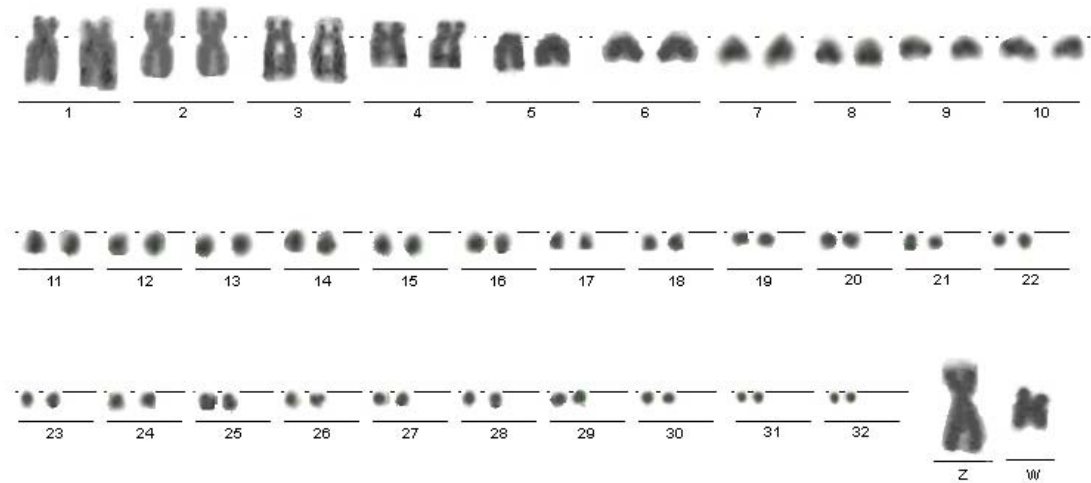
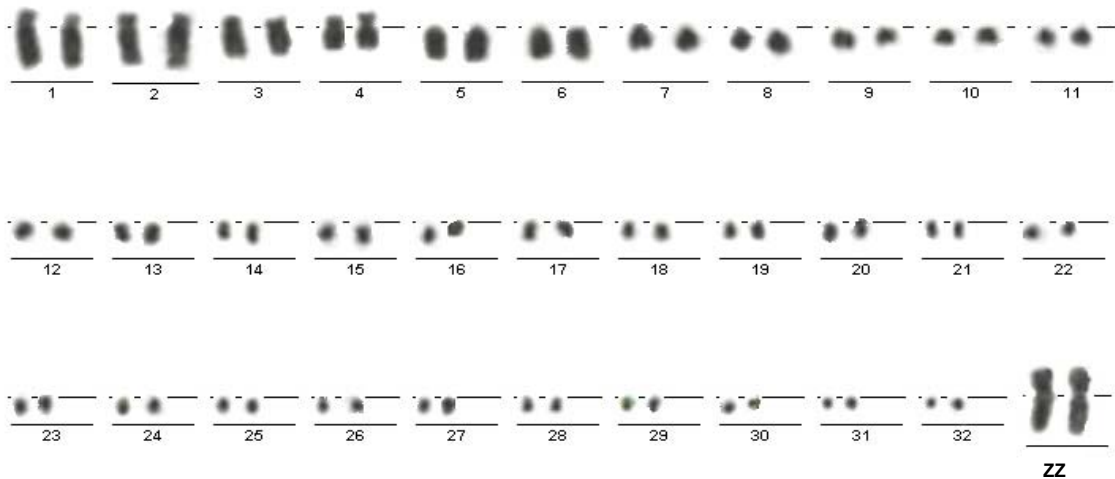
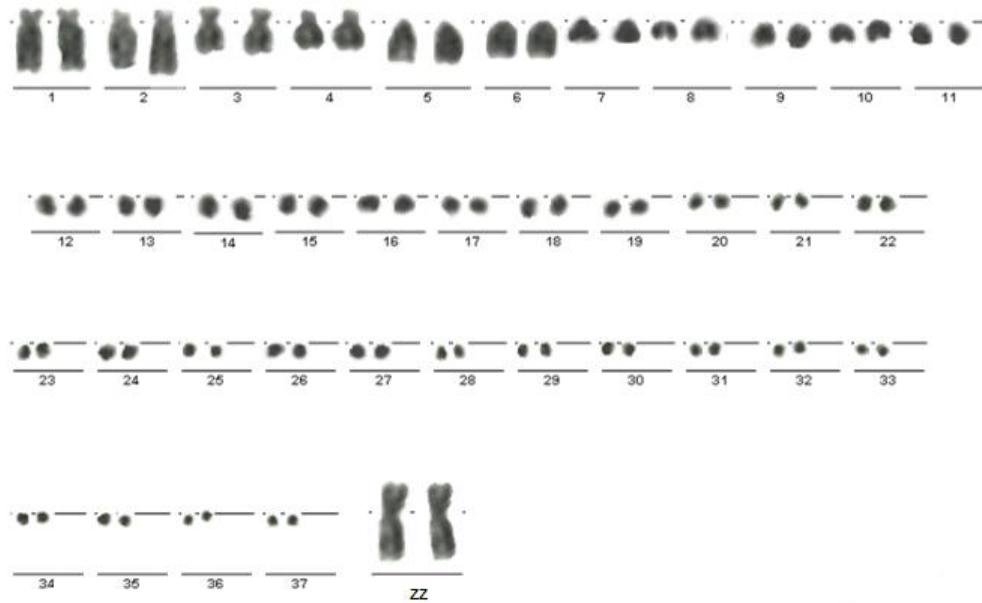


Figura 16. Cariotipo de un macho de *D. humeralis aterrima* con tinción convencional Giemsa.



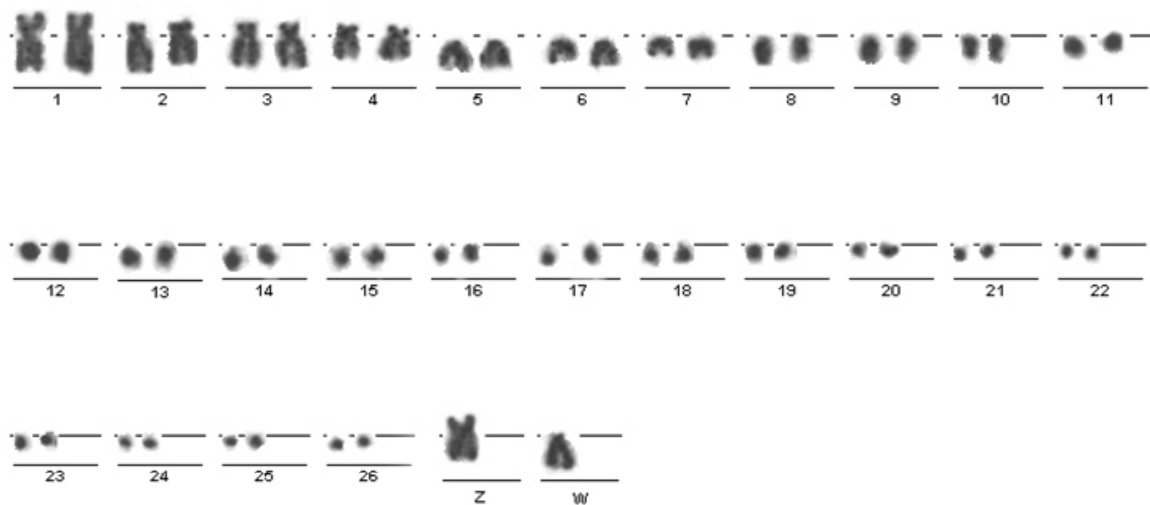
Para *D. lafresnayii* el número diploide es de $2n = 66 - 82$ con un número fundamental de $NF = 76 - 92$ donde se observa ocho pares de macrocromosomas incluyendo el par sexual. El número de microcromosomas corresponde a un rango de 25 a 32 pares y el cromosoma Z (metacentrico), que en tamaño corresponden al primer par. No fueron obtenidas metafases de hembra en donde pudiera ser analizado el cromosoma W para esta especie. Figura 17.

Figura 17. Cariotipo preliminar de un macho de *D. lafresnayii* con tinción convencional Giemsa.



En *D. sittoides* el complemento corresponde a $2n = 54 - 60$ con un número fundamental de $NF = 63 - 69$ donde se observa ocho pares de macrocromosomas incluyendo el par sexual. El número de microcromosomas corresponde a un rango de 19 a 22 pares y los cromosomas Z (Submetacéntrico) y W (Acrocéntrico) que en tamaño corresponden al tercer y quinto par. Figura 18.

Figura 18. Cariotipo de una hembra de *D. sittoides* con tinción convencional Giemsa.



Los microcromosomas se consideraron como acrocéntricos para las tres especies. La longitud relativa para los microcromosomas presentes de acuerdo al tamaño en *D. humeralis aterrima* corresponde a un rango de 16.02 a 7.24 teniendo en cuenta los primeros y últimos pares de microcromosomas, en *D. lafresnayii* la longitud relativa de microcromosomas se encuentra en un rango de 13.66 a 6.35 y en *D. sittoides* se encuentra en un rango de 16.73 a 7.94. Esto indica que el tamaño de microcromosomas es muy similar en las tres especies y que las diferencias en cuanto a morfología y biometría cromosómica se presenta en los primeros pares de macrocromosomas los cuales se observan en la Figura 15 a 18 los demás pares de microcromosomas se presentan de forma puntual.

4.4 BIOMETRÍA CROMOSÓMICA

Se tomaron las mejores metafases de cada especie: nueve de *D. humeralis aterrima*, ocho de *D. lafresnayii* y seis de *D. sittoides*, para realizar las mediciones de biometría cromosómica (R.B, I.C y L.R) ver Anexo I, J, K, para cada medición se aplicó la respectiva estadística descriptiva. Los resultados se presentan en las Tablas 13 a 15:

Tabla 13. Resultados de estadística descriptiva para Relación de brazos (R.B)

Especie	<i>D. humeralis aterrima</i>			<i>D. lafresnayii</i>			<i>D. sittoides</i>		
Cromosoma	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV
1	2,66	0,73	27,61	2,71	0,62	23,03	1,7	0,19	11,31
2	2,77	0,75	27,09	3,12	0,95	30,65	2,78	0,82	29,63
3	2,53	0,52	20,75	2,38	0,65	27,34	2,37	0,56	23,69
4	2,1	0,44	21,07	1,8	0,51	28,34	2,11	0,42	19,99
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	1,77	0,45	25,44	1,55	0,13	8,76	2,15	0,44	20,45
W	1,41	0,26	18,77	*	*	*	**	**	**

* No fueron obtenidas metafases de hembra que pudieran ser medidas en esta especie.

** No existe valor para el cromosoma W ya que es acrocéntrico.

Tabla 14. Resultados de estadística descriptiva para Índice Centromérico (I.C)

Especie	<i>D. humeralis aterrima</i>			<i>D. lafresnayii</i>			<i>D. sittoides</i>		
	Cromosoma	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S
1	29	5,45	18,79	27,68	4,55	16,45	37,3	2,58	6,92
2	27,75	5,95	21,46	25,81	7,02	27,19	27,76	5,43	19,56
3	29,08	4,4	15,13	30,5	5,12	16,78	30,43	4,14	13,61
4	33,18	4,46	13,45	36,85	6,31	17,12	32,88	4,55	13,84
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	36,99	5,53	14,96	39,34	2,18	5,55	32,19	4,31	13,39
W	41,64	4,58	11	*	*	*	0	0	0

* No fueron obtenidas metafases de hembra que pudieran ser medidas en esta especie.

Tabla 15. Resultados de estadística descriptiva para Longitud Relativa (L.R)

Especie	<i>D. humeralis aterrima</i>			<i>D. lafresnayii</i>			<i>D. sittoides</i>		
	Cromosoma	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S
1	7,45	1,67	22,5	6,52	1,17	17,94	8,13	1,99	24,58
2	6,69	1,37	20,51	6,37	1,14	18	7,08	1,64	23,23
3	5,38	0,92	17,2	4,96	0,77	15,65	5,44	1,06	19,52
4	4,75	1,02	21,53	4,33	0,7	16,33	4,28	0,83	19,44
5	4,48	1,01	22,6	4,24	0,48	11,37	3,53	0,46	13,15
6	3,59	0,85	23,91	3,46	0,52	15,29	3,01	0,45	15,15
7	3,04	0,52	17,31	2,76	0,49	17,95	3,03	0,48	15,83
Z	15,39	5,39	35,04	13,75	3,08	22,41	13,69	4,09	29,86
W	7,89	0,16	2,11	*	*	*	7,37	4,48	60,83

* No fueron obtenidas metafases de hembra que pudieran ser medidas en esta especie.

Los resultados de estadística descriptiva observados en las Tablas 13 a 15 muestran la variación que presentaron los cromosomas en las metafases analizadas de cada especie, encontrando que el cromosoma uno de *D. sittoides* con respecto al cromosoma uno de las otras dos especies presenta una variación relativamente baja con un CV= 6.92 para I.C y un CV =11.31 para R.B y la variación mas significativa se presenta en el cromosoma W respecto a la longitud relativa con CV = 60.83 si se compara con el cromosoma W de *D. humeralis aterrima* que presenta un CV = 2.11.

D. lafresnayii presenta variación relativamente baja en el cromosoma Z mostrando un CV = 5.55 para I.C y un CV = 8.76 para R.B y un CV = 22.41 para L.R con respecto al cromosoma Z de *D. humeralis aterrima* y *D. sittoides*.

Lo anterior podría deberse a que los cromosomas pueden variar su longitud relativa ya que los brazos de un mismo cromosoma se condensan a diferentes velocidades, haciendo que varíen los I.C y R.B de este a lo largo de la división celular.

Aplicando las pruebas de ANOVA de una sola vía se encontró una diferencia significativa para el I.C del cromosoma uno en *D. sittoides* que corresponde al valor promedio más alto ($\bar{X} = 37.3$) y coincide con la diferencia en la morfología que presenta este cromosoma que es metacéntrico y en *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii* es submetacéntrico. *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii* no presentan diferencias significativas en cuanto al I.C (ANOVA de una sola vía GI = 22, P = 0.001954).

Otra diferencia significativa para el I.C se presenta en el cromosoma Z de *D. lafresnayii*, con el valor promedio más alto ($\bar{X} = 39.34$) y que morfológicamente es metacéntrico a diferencia de *D. humeralis aterrima* y *D. sittoides* que son cromosomas submetacéntricos. *D. humeralis aterrima* y *D. sittoides* no presentaron diferencias significativas (ANOVA de una sola vía GI = 22, P = 0.00199).

Con respecto a la Relación de Brazos (R.B) se encontró diferencia significativa en el cromosoma uno en *D. sittoides* con un valor promedio de $\bar{X} = 1.7$ mientras que en *D. humeralis aterrima* es de $\bar{X} = 2.66$ y de *D. lafresnayii* $\bar{X} = 2.71$, morfológicamente se observa que el cromosoma uno de *D. sittoides* en longitud es menor que el que presentan *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii* según lo observado en los idiogramas (ANOVA de una sola vía GI = 22, P = 0.0094).

Otra diferencia significativa para la R.B se presenta en el cromosoma Z de *D. sittoides* con un valor promedio de $\bar{X} = 2.15$ siendo este mayor que en *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii*, que no presentan diferencias significativas (ANOVA de una sola vía GI = 22, P = 0.0228). Para longitudes relativas no se encontró diferencias significativas en ninguno de los cromosomas de las tres especies.

De acuerdo con los valores promedio I.C y R.B encontrados, los macrocromosomas de cada especie fueron clasificados teniendo en cuenta el sistema de nomenclatura cromosómica propuesto por Levan *et al*¹⁴⁵. Tabla 16.

¹⁴⁵ LEVAN, et al. Op. cit., p. 210.

Tabla 16. Clasificación de macrocromosomas de *D. humeralis aterrima*, *D. lafresnayii* y *D. sittoides* por Índice Centromérico y Relación de Brazos.

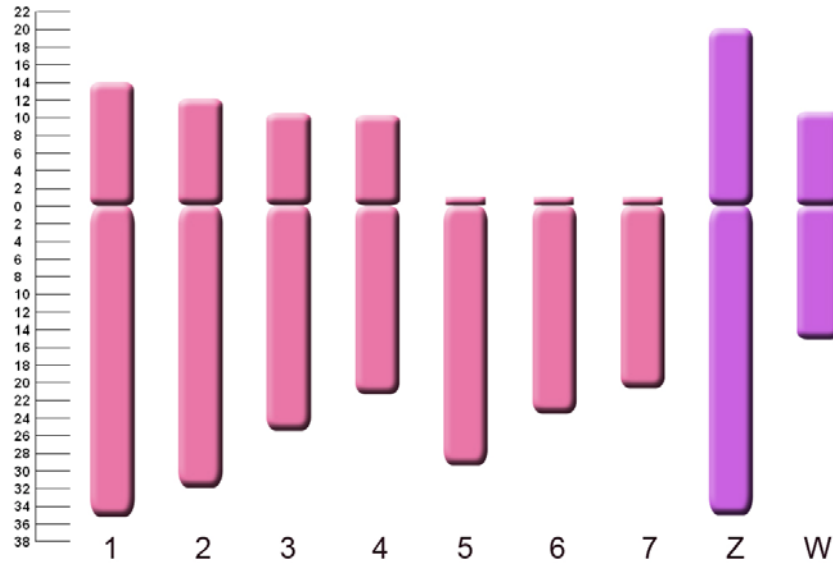
Cromosoma	Especie		
	<i>D. humeralis aterrima</i>	<i>D. lafresnayii</i>	<i>D. sittoides</i>
1	Submetacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico
2	Submetacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
3	Submetacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
4	Submetacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
5	Acrocéntrico	Acrocéntrico	Acrocéntrico
6	Acrocéntrico	Acrocéntrico	Acrocéntrico
7	Acrocéntrico	Acrocéntrico	Acrocéntrico
Z	Submetacéntrico	Metacéntrico	Submetacéntrico
W	Metacéntrico	No determinado	Acrocéntrico

Según los resultados obtenidos de la clasificación de macrocromosomas; es posible observar que el arreglo cromosómico para las especies *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii* es idéntico, sin embargo los cromosomas sexuales no coinciden en *D. humeralis aterrima*, el cromosoma Z es Submetacéntrico mientras que en *D. lafresnayii* es Metacéntrico. El cromosoma W de *D. humeralis aterrima* es metacéntrico, para la segunda especie no pudo ser determinado, ya que entre los ejemplares no hubo ninguna hembra que pudiera ser analizada.

Para la especie *D. sittoides* aunque el arreglo es muy parecido a las otras dos especies, presenta diferencias con respecto al cromosoma uno que es metacéntrico y no submetacéntrico como en el caso de *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii*. La diferencia mas marcada se encuentra en el cromosoma W que difiere en tamaño y morfología si se compara con *D. humeralis aterrima*, siendo este acrocéntrico, el cromosoma Z es submetacéntrico similitud que comparte con *D. humeralis aterrima*, aunque la diferencia en tamaño sea marcada. Esto puede ser observado mas claramente en la Figura 19, en donde se describen los idiogramas para cada especie de acuerdo a los resultados obtenidos de longitud relativa.

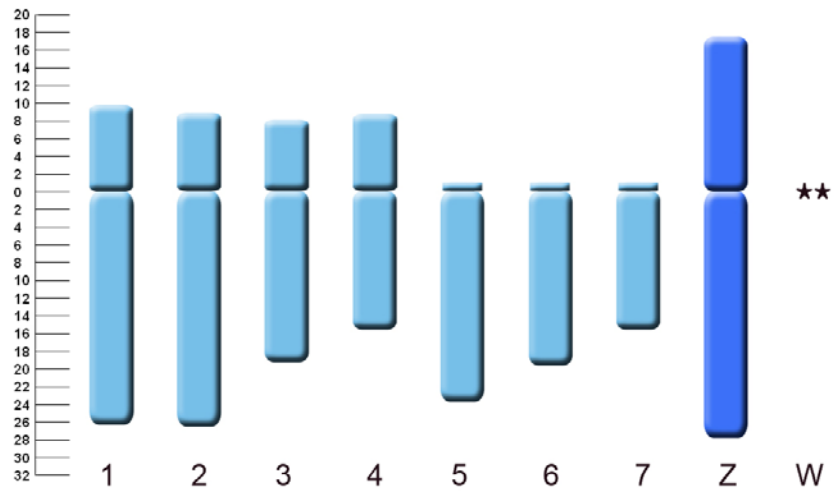
Figura 19. Idiogramas de los macrocromosomas de las especies analizadas: a) *D. humeralis aterrima*; b) *D. lafresnayii*; c) *D. sittoides*

a)

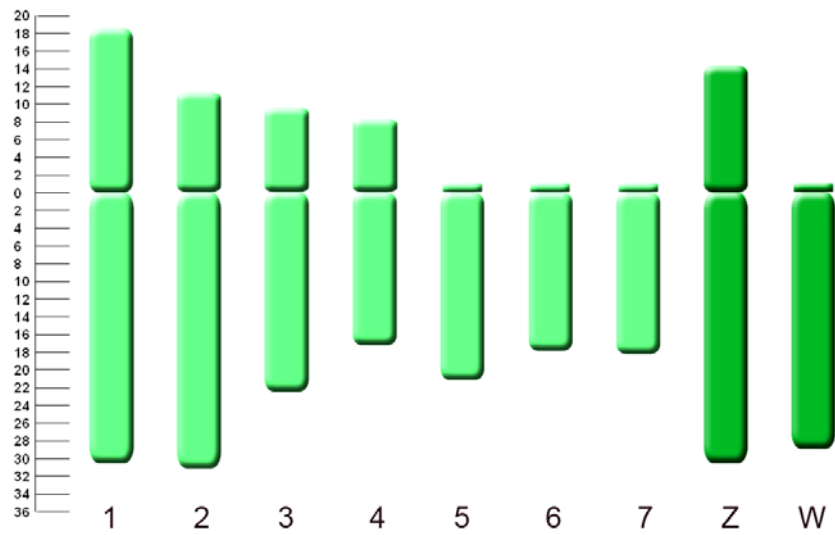


Las mediciones de biometría cromosómica con respecto al I.C, R.B y L.R establecen diferencias en los macrocromosomas de las especies analizadas al comparar la relación de brazos se observa que los idiogramas tienen una forma determinada que se asemeja a una escalera que decrece en tamaño y disminuye drásticamente del cuarto al séptimo par presentandose cromosomas acrococéntricos. Esta morfología en cuanto a la posición del centrómero es diferente en las tres especies, lo que permite diferenciarlas por su cariotipo.

b)



c)



5. DISCUSIÓN

Las técnicas citogenéticas empleadas en animales silvestres como las que se describen en este trabajo implican, que cada réplica realizada se maneje con un nuevo individuo donde intervienen una serie de variables a evaluar en cada prueba realizada. Es posible verificar, que las técnicas directas a partir de médula ósea a pesar de ser procesos rápidos y directos tienen desventajas tal como lo reporta Giannoni & Ferrari¹⁴⁶, una de estas desventajas verificadas en este estudio es la variabilidad de la actividad mitótica en médula de aves adultas, que fué evidenciada por la ausencia de división celular en determinado momento con la aplicación de los protocolos.

Las modificaciones sugeridas en los protocolos iniciales propuestos por Gianonni & Ferrari¹⁴⁷, Lee & Elder¹⁴⁸, Shoffner¹⁴⁹ y Gutierrez, *et al*¹⁵⁰ se hicieron con el propósito de obtener una mayor cantidad de células metafásicas que no se obtuvieron en las pruebas iniciales; para lograr este objetivo se empleó el inhibidor mitótico más utilizado que es la colchicina, para la cual se estableció el tiempo de acción hasta que se observaron células con un grado óptimo de condensación dentro de cada metafase. Thorgaard & Disney¹⁵¹ afirman que la solución hipotónica tiene una baja presión osmótica que provoca el hinchamiento de las células, este estado se mantiene en las fases de fijación y lavado hasta el momento del extendido, donde por acción mecánica se produce el rompimiento de la membrana celular permitiendo que los cromosomas queden totalmente separados; teniendo en cuenta esta consideración se ajustó el tiempo hasta observar una dispersión adecuada de los cromosomas que fué a los 50 minutos.

Con respecto al fijador empleado Clark & Wall¹⁵² explican que el metanol actúa desnaturizando y precipitando las proteínas por deshidratación bajo condiciones ácidas y por otra parte el ácido acético coagula las nucleoproteínas ocasionando el desenrollamiento de las células observándose cromosomas más distendidos, libres de residuos y grasa en suspensión; por lo cual se realizó un procedimiento de prefijación.

Uno de los protocolos empleados siguiendo a Lee & Elder¹⁵³, en el cual la división de médula ósea es estimulada por fermento activo ha producido resultados

¹⁴⁶ GIANONNI & FERRARI, Op. cit. p.40.

¹⁴⁷ Ibid. p.40.

¹⁴⁸ LEE & ELDER, Op. cit., p.48.

¹⁴⁹ SHOFFNER, Op.cit., Citado por: GIANONNI & FERRARI, Op. Cit., p.121.

¹⁵⁰ GUTIERREZ, TAYLOR, & BOLAÑOS, Op. cit., p.310.

¹⁵¹ THORGAARD & DISNEY, Op. cit.,p.180.

¹⁵² CLARK, M.S. & WALL, W.J. 1996. Chromosomes: The Complex Code. First Edition. London. U.K.: Published by Chapman and Hall. p. 27-93.

¹⁵³ LEE & ELDER, Op. cit., p.48.

variables en las diferentes especies de aves evaluadas. El mismo autor reporta que en *Porzana albicollis* el material obtenido fué de buena calidad y lo contrario ocurre en especies del género *Turdus* donde se observan resultados inconstantes alterando el estado metabólico del animal. En *D. humeralis aterrima* se observó ambas condiciones por un lado una mayor cantidad de células en división en las preparaciones y por otra parte mientras el ave era expuesta a la acción del fermento, presentaron inestabilidad en sus condiciones fisiológicas evidenciadas en el decaimiento del animal y ocasionalmente la muerte si sobrepasaba el tiempo a la exposición del fermento de 24 horas.

En los cultivos realizados se tuvo en cuenta las condiciones y requerimientos para el crecimiento celular como nutrición, que fué proporcionada por el medio de cultivo¹⁵⁴; para este caso fué el medio Iscove's, que de acuerdo con Vargas¹⁵⁵ al parecer suple en mayor cantidad algunos elementos nutritivos para que un mayor porcentaje de células entren en la etapa de división; probablemente los aportes nutricionales no son suficientes, razón por la cual se presenta la diferencia entre células estimuladas y células en división resultando una celularidad media en el cultivo. El SFB es un factor de crecimiento que contribuye a estimular la multiplicación celular¹⁵⁶, por esta razón fué utilizado en un 20%, valor que pudo incrementar el aporte de estos factores permitiendo que las células en cultivo entren en la fase de síntesis del ciclo celular lo cual se reflejó en la presencia de una celularidad media si se compara con el cultivo realizado sin SFB donde no hubo crecimiento celular.

Shoffner¹⁵⁷, afirma que las preparaciones obtenidas por esta técnica no producen resultados con relación a la formación de patrones de bandas que implica que los cromosomas sean largos y con cromátides bien separadas.

En las especies como lo afirma Clark & Wall¹⁵⁸, se analiza el número cromosómico el cual es una propiedad fundamental de cada organismo, donde cada unidad cromosómica representa un bloque de genes. También se trabaja con el número fundamental que se refiere al número de brazos en total del conjunto cromosómico y que tiene un valor evolutivo ya que a mayor número de brazos habrá una mayor simetría de los cariotipos representando una mayor especialización; teniendo en cuenta estos criterios, se obtuvo que las especies analizadas exhiben una morfología cariotípica homogénea común a muchos otros ordenes aviares como los encontrados por Sasaki, *et al.*¹⁵⁹ quien resume algunas características del genoma de aves Passeriformes y que coinciden con las encontradas en *Diglossa*,

¹⁵⁴ HAM, R.G. & MCKEEHAN, W.L. 1980. Media and Growth Requirements. En: Cell Culture. Editado por: Jakoby W.B. and Pastand I.H. Academic Press Inc. San Diego, California. U.S.A.

¹⁵⁵ VARGAS, Op. cit. p.42.

¹⁵⁶ MAUREER, Op. cit., p.24.

¹⁵⁷ SHOFFNER, Op.cit., Citado por: GIANONNI & FERRARI, Op. Cit., p.121.

¹⁵⁸ Ibid. p.42.

¹⁵⁹ SASAKI, et al. 1984. citado por DE LUCCA, Op. cit., Determinação cromossômica do sexo nas aves. p.792.

como la presencia de algunos pares de macrocromosomas y gran número de microcromosomas que de acuerdo a Shields¹⁶⁰ son difíciles de contar exactamente; por lo tanto es difícil determinar si las diferencias en el número total de microcromosomas expresado por cada autor son verdaderas o corresponden a efectos de preparación y análisis; el mismo autor afirma que este problema puede ser resuelto solamente cuando una gran cantidad de cariotipos han sido analizados de forma individual. Tales estudios son poco frecuentes y los estudios comparativos enfatizan la variación en los macrocromosomas anotando los cambios de número diploide, número fundamental y posición del centrómero como se realizó en este estudio.

Se observa una variabilidad cromosómica intraespecífica en cuanto a número diploide que varía de $2n = 56-82$ con un $NF = 66-92$ en *D. humeralis aterrima*, en *D. lafresnayii* $2n = 66-82$ un $NF = 76-92$ y para *D. sittoides* $2n = 54-60$ con un $NF = 63-69$.

Se podría afirmar que el cariotipo básico en cuanto a morfología cromosómica entre las especies analizadas del género *Diglossa* que va de cromosomas metacéntricos a acrocéntricos es claramente diferenciado en las tres especies no solo en los macrocromosomas sino en la morfología de los cromosomas sexuales que de acuerdo a López y Pérez¹⁶¹, puede demostrar que el cambio evolutivo dinámico en estas especies es constante y puede seguirse dando fenómenos de especiación como respuesta a la adaptación.

La incidencia de la evolución cromosómica favorece la formación de pocos cromosomas largos, los grupos evolutivamente más primitivos presentan cariotipos con tendencias a aumentar el número de macrocromosomas en la medida que el número de microcromosomas disminuye. Por el contrario los grupos que presentan la radiación adaptativa más importante es decir las Passeriformes son los que presentan un mayor número de microcromosomas¹⁶².

Se consideró la variabilidad cromosómica intraespecífica pero no se observó cromosomas homólogos de un individuo que se diferenciaron de una manera obvia del mismo par de cromosomas en otros individuos de la misma especie, como es el caso de algunas Passeriformes.

El número de macrocromosomas encontrado para las tres especies es de 16 incluyendo los cromosomas sexuales. *D. sittoides* tiene un arreglo muy parecido a *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii*, a excepción del cromosoma uno que es metacéntrico y no submetacéntrico como en *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii*.

¹⁶⁰ SHIELDS, G.F. Comparative avian Cytogenetics: A Review. 1982. Condor 84:45-58.

¹⁶¹ López & Pérez, Op. cit., p.49.

¹⁶² GOLDSCHMIDT, B., NOGUEIRA, D.M., ARAÚJO, K., S. & MORENO DE SOUZA, L. 2000. Study of the karyotype of *Oryzoborus maximiliani* (Passeriformes - Aves) using young feather pulp cultures. Genetics and Molecular Biology, 23, 2, 371-373.

Los cromosomas sexuales corresponden a la descripción de De Lucca¹⁶³. El cromosoma Z se presenta en tamaño equivalente al primer par de autosomas para las tres especies; Pigozzi y Solari¹⁶⁴ argumentan que la ausencia de variación significativa de tamaño en el cromosoma Z indica que durante la diversificación de las especies de aves ocurrieron inversiones pericéntricas en este cromosoma que alteraron su morfología.

En cuanto a W que es menor en tamaño corresponde al quinto par en las especies *D. humeralis aterrima* y *D. sittoides*. Según Pigozzi y Solari¹⁶⁵, el tamaño pequeño del cromosoma W se debe a la pérdida ocasional de heterocromatina, presentando variaciones tanto en tamaño como en morfología, lo cual es un indicio de la ocurrencia de mayores modificaciones de la evolución cariotípica de la aves que en el cromosoma Z¹⁶⁶.

Conforme a lo anterior se observa el cromosoma W de *D. sittoides* difiere en tamaño y morfología si se compara con la especie *D. humeralis aterrima*, ya que este es acrocéntrico, el cromosoma Z es submetacéntrico similitud que comparte con *D. humeralis aterrima* aunque la diferencia en tamaño sea marcada.

Pigozzi y Solari¹⁶⁷ consideran que en la evolución de los cromosomas sexuales de las aves, las inversiones pericentroméricas se observan por las deleciones grandes en los cromosomas W, como en el caso de *D. sittoides*. Los taxa más primitivos no tienen diferenciación sexual, la variación cromosómica de W en *D. sittoides* puede estar relacionada con la diferencia marcada en su fenotipo o dimorfismo sexual, con respecto a *D. humeralis aterrima* y *D. lafresnayii* las cuales no presentan dimorfismo sexual. Según los resultados obtenidos el género *Diglossa* podría servir como un modelo para explicar los cambios sucedidos en los cromosomas de aves neognatas, sobretodo en Z y W muy diferenciados en la mayoría de especies de aves incluyendo las *Diglossa* (Figura 8).

De las tres especies de *Diglossa*, *D. lafresnayii* y *D. humeralis aterrima* no presentan dimorfismo sexual fenotípico aparente por lo que el sexo tuvo que ser determinado en el momento de la disección observando la presencia de gónadas (ovarios o testis), y aun así dos de los ejemplares de *D. humeralis aterrima* no pudieron ser sexados mediante este método. Por su parte *D. sittoides* quien presenta un patrón de plumaje claramente definido para macho y hembra permitió confirmar con los datos citogenéticos que los ejemplares analizados correspondieron a la hembra de la especie. Demostrando que el heteromorfismo

¹⁶³ DE LUCCA, Op. cit., Determinação cromossômica do sexo nas aves. p.793.

¹⁶⁴ PIGOZZI & SOLARI, Op. Cit.

¹⁶⁵ Ibid.

¹⁶⁶ DE LUCCA & ROCHA, Citogenética de aves. Op. cit., p. 42.

¹⁶⁷ PIGOZZI & SOLARI, Op. Cit.

existente en los cromosomas sexuales es una herramienta muy útil para la identificación del sexo en aves, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en todos los casos la identificación del sexo morfológico correspondió al sexo cromosómico, determinado en los cariotipos incluyendo el sexo de los ejemplares de *D. humeralis aterrima* donde no fué posible la determinación del sexo morfológico.

6. CONCLUSIONES

Los protocolos reportados de acuerdo a las modificaciones del material de estudio que se presentan en este trabajo se constituyen en una alternativa para la obtención de cariotipos en aves del género *Diglossa*.

La técnica reportada por Gutiérrez *et al.* presenta modificaciones absolutas al inyectar PHA *in vivo* con la posterior utilización de colchicina *in vitro*; este nuevo protocolo que se reporta es una técnica fácil y directa que puede aplicarse en otros animales.

Los datos morfológicos obtenidos por las mediciones relativas indican diferencias en morfología cromosómica en cuanto a posición centromérica, la longitud relativa determina la relación en tamaño que se observa en forma de escalera con un cambio drástico de los cromosomas submetacéntricos a acrocéntricos, estas diferencias morfológicas indican que los microcromosomas pudieron fusionarse para formar los macrocromosomas.

El cariotipo en las tres especies de *Diglossa* muestra un patrón cariológico que permite diferenciar especies a escala cromosómica no solo en la morfología que presentan los macrocromosomas sino también en la variabilidad cromosómica intraespecífica en cuanto a número diploide que va de $2n = 56-82$ con un NF = 66-92 en *D. humeralis aterrima*, en *D. lafresnayii* $2n = 66-82$ un NF = 76-92 y para *D. sittoides* $2n = 54-60$ con un NF = 63-69.

Los cromosomas sexuales de las especies de *Diglossa* juegan un papel fundamental en la evolución de este género que indudablemente puede llevar a procesos de especiación.

Dentro del análisis citogenético de las tres especies de *Diglossa* fue verificada la importancia de estos estudios para la determinación del sexo en aves, ya que el sexo cromosómico indudablemente corresponde al sexo morfológico. Además los resultados citogenéticos permitieron determinar el sexo en especies donde no fue posible observar gónadas.

La información de tendencia que aporta el análisis estadístico comparada con la obtenida mediante la biometría cromosómica, demuestra que el mejor reflejo de los cambios que pueden estar sucediendo en las especies estudiadas se puede entender de mejor manera con las mediciones relativas de cada par cromosómico expresadas en los idiogramas. Debido a la condensación que presentan los cromosomas en las diferentes fases del ciclo celular.

7. RECOMENDACIONES

Realizar estudios citogenéticos en otras especies del Género *Diglossa*, con un mayor número de individuos para establecer las relaciones filogenéticas e interpretar los posibles mecanismos de evolución en este género.

Utilizar la técnica directa de médula ósea en aves que no proporcionen la cantidad de muestra adecuada para trabajar con cultivos que no requieran el sacrificio del ejemplar. De lo contrario si la captura en campo sugiere el sacrificio del animal, aprovechar al máximo las muestras del ejemplar con este tipo de procedimientos.

Realizar técnicas de bandeo cromosómico en las especies analizadas para establecer posibles mecanismos de rearrreglos cromosómicos desarrollando la técnica de cultivo de fibroblastos y verificar inversiones pericentroméricas en el cromosoma W de *D. sittoides*.

Para confirmar que la diferencia en tamaño de los cromosomas sexuales puedan deberse a acumulaciones de heterocromatina, se recomienda realizar bandas C, dado que la heterocromatina tiene la capacidad de adicionarse o perderse fácilmente dentro del genoma. Adicionalmente el bandeo C también se utiliza para investigar la evolución de los cromosomas sexuales.

Determinar el cariotipo de más ejemplares de *D. lafresnayii* donde se obtengan metafases de hembra, ya que el único individuo capturado permitió elaborar un cariotipo preliminar para esta especie.

Se observó variación en el número de microcromosomas presentes en las metafases analizadas de las tres especies al parecer existe una posible relación entre la altitud y el número de microcromosomas, es necesario realizar un estudio citogenético con un mayor número de individuos para cada especie capturados a diferentes alturas.

BIBLIOGRAFIA

Agenda Ambiental del Municipio de Pasto – Dirección de Desarrollo Territorial. SIGAM. Julio 2004.

ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. 1974. Staining constitutive heterochromatin and giemsa crossbands of mammalian chromosomes. En human chromosome methodology. Academic press. New York. Citado por: JIMENEZ, L.M. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas.

BELTERMAN, R.H.R. & DE BOER, L.E. 1984. A Karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology. En: Genética. 65: 39-82.

BirdLife Internacional y Conservation International. 2005. Áreas Importantes para la Conservación de las Aves en los Andes Tropicales: Sitios prioritarios para la Conservación de la Biodiversidad. Quito. Ecuador: BirdLife Internacional (Serie de conservación de BirdLife No 14). 769 p.

BROW, M.L & HUNT, R.C. 1984. Lectins. International Review of Cytology 75: 277 – 347.

BUENO, M.L. 2003. Técnicas Citogenéticas. Santa Fé de Bogotá. Trabajo de Promoción. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología.

CALDERON, J.J. 2002. Aves de la Laguna de La Cocha. Serie “Un Canto a la Vida”. Primera Edición. San Juan de Pasto. Colombia. Asociación para el Desarrollo Campesino – ADC. 172 p.

_____. 1998. Ecología de Comunidades Aviarias en Páramos del Suroccidente Colombiano. Santiago de Cali, Tesis de Maestría (Msc. Ciencias Biológicas). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. p. 126.

CLARK, M.S. & WALL, W.J. 1996. Chromosomes: The Complex Code. First Edition. London. U.K.: Published by Chapman and Hall. p. 27-93.

DARNELL, J., LODISH, H., BALTIMORE, D. 1988. Biología Celular y Molecular: División Celular y Replicación del DNA. Editorial Labor S.A. Imprenta Juvenil. 1175 p.

DARWIN, C. 1984. El origen de las especies por medio de la selección natural. Barcelona: Ediciones Piados Iberica, S.A.

DE LUCCA, E.J. 1978. Determinação cromossômica do sexo nas aves. *Ciência e cultura*. 30 (7): 791-798.

DE LUCCA, E.J., & ROCHA, G.T. 1992. Citogenética de aves, *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, ser. Zool.* 8 (1). p. 33 – 67.

DE ROBERTIS, E.D. & DE ROBERTIS, E.M. 1981. *Biología Celular y Molecular*. Décima Edición. Editorial "El Ateneo". S.A. 560 p.

DOBZHANSKY, TH., AYALA, F.J., STEBBINGS, G.L. & VALENTINE, J.W. 1993. *Evolución*, Ediciones Omega, Barcelona. "EVOLUTION," The History Channel website. [en línea]. [citado en 26 de Febrero de 2007]. Disponible en Internet: <<http://www.history.com/encyclopedia.do?articleId=208880>>.

ELDRIDGE, F.E. 2000. *Cytogenetics of Livestock*. Avi Publishing Company, 1985. Citado por: JIMENEZ, L.M. 2000. *La Citogenética en Medicina Veterinaria*. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas. p.13.

FJELDSA, J. & KRABBE, N. 1990. *Birds of the high andes*. Svendbord, Denmark: zoological Museum, University of Copenhagen and Apollo Books. p. 601-605.

FORD, C.E. 1973. *Human chromosomes. The Origin and transmission of chromosomal abnormalities*. Chapter 8: 152 - 173. Academic Press. London and New York.

FRANCO, A.M., MUNERA, C. & BRAVO, G. 2005. Libro AICAS. Áreas Importantes para la Conservación de las Aves en Colombia. p 17 – 281 en BirdLife Internacional y Conservation International. 2005. Áreas Importantes para la Conservación de las Aves en los Andes Tropicales: Sitios prioritarios para la Conservación de la Biodiversidad. Quito. Ecuador: BirdLife Internacional (Serie de conservación de BirdLife No 14). 769 p.

GALLEGO PUERTAS, M.S. 1999. *Genética: Fundamentos y Perspectivas*. Segunda Edición. Mc Graw Hill. Interamericana.

GARCIA HARO, F. 2001. *Evolución Cromosómica en Simiiformes. Homologías, Reorganizaciones y Heterocromatina*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 255 p.

GIANONNI, M. & FERRARI, L. 1986. *Citogenética aplicada as aves: Técnicas e manual técnico*. Universidad estadual Paulista. Javo-ticabal. 121 p.

GOLDSCHMIDT, B., NOGUEIRA, D.M., ARAÚJO, K., S. & MORENO DE SOUZA. L. 2000. Study of the karyotype of *Oryzoborus maximiliani* (Passeriformes - Aves) using young feather pulp cultures. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 2, 371-373.

GUTIERREZ, J.M., TAYLOR, R.T & BOLAÑOS, R. 1979. Cariotipo de 10 especies de serpientes costarricenses de la familia Viperidae. En: *Rev. Biol. Trop. Costa Rica* 27, 309-319.

HAM, R.G. & MCKEEHAN, W.L. 1980. Media and Growth Requirements. En: *Cell Culture*. Editado por: Jakoby W.B. and Pastand I.H. Academic Press Inc. San Diego, California. U.S.A.

HILTY, S. & BROWN, W. 1986. Guía de las aves de Colombia. Princeton, United States of America: Princeton University Press. 1030 p.

HOLMQUIST, G. & DANCIS, H.A. 1981. General model of karyotype evolution. En: *Genetica*. Vol. 52/53. 151-163.

INDERENA. 1989. propuesta general para la elaboración de los términos de referencia de los Planes de Guía de Manejo. Planes de manejo, y Planes y Manuales Operativos del Sistema de Parques Nacionales Naturales de Colombia. Bogotá, Colombia: División de Parques Nacionales, INDERENA.

JIMENEZ, L.M. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas. 169 p.

JOSHUA, S. 1994. Los Cromosomas Resuelven el Rompecabezas de la Taxonomía de los Loros. Director, Avian Research Associates Lts, U.K. p. 72 – 81.

KLUG, W.S. & CUMMINCS, M.R. 1999. *Essentials of Genetic*. Prentice Hall. New Jersey. 87 p.

LEE, M.R. & ELDER, F.F. 1986. Yea stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetic. Cell*. En: *Genet*. 26: 36-40.

LEVAN, A., FREGA, K. & SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. En: *Hereditas*. 52: 201-220.

LEWIN, B. *Genes VI*. 1997. Internacional Student Edition. Oxford University Press. Citado por: JIMENEZ, L.M. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas. p.27.

LÓPEZ C, E.J. & PÉREZ, S.G. 1999. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. Bol. SEA. 26: 45-56. Madrid España: Universidad de Alcalá. Departamento de Biología Animal. [en línea]. [citado en 19 de Febrero de 2007]. Disponible en Internet: <http://www.mackenzie.com.br/universidade/exactas/docentes/paginas/leda/material/texcito/evolucrm_doc>.

MACGREGOR, H.C. 1993. An Introduction to Animal Cytogenetics. First Edition. London. U.K: Published by Chapman and Hall. Capítulo 1, 5 y 6. Citado por: MAHECHA, V.S. 1998. Caracterización citogenética de *Rhinoclemmys diademata* (Mertens, 1954) (Testudinata: Emydidae). Santafé de Bogotá, D.C. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

MAHECHA, V.S. 1998. Caracterización citogenética de *Rhinoclemmys diademata* (Mertens, 1954) (Testudinata: Emydidae). Santafé de Bogotá, D.C. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 116 p.

MATTHEY, R. 1949. Les chromosomes des vertebres. Lausanne, F. Rouge. p.356. Citado por: DE LUCCA, E.J., & ROCHA, G.T. 1992. Citogenética de aves, Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, ser. Zool. 8 (1). p. 33 – 67.

_____. 1951. The chromosomes of the vertebrates. Adv. Genet. 4: 159-180. Citado por: DE LUCCA, E.J., & ROCHA, G.T. 1992. Citogenética de aves, Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, ser. Zool. 8 (1). p. 33 – 67.

MAUREER, H. R. 1986. Towards Chemically – defined, Serum-free Media for Mammalian Cell Culture. In: Animal Cell Culture, a practical approach. Edited by Freshney R.I I.R.L. press Limited. Oxford. England. p. 13-30.

MAYR, E. 1992. Darwin y el Darwinismo: una larga controversia. Ed. Crítica. Barcelona. España. 209 p.

McFEELY, R.A. 1990. Domestic Animal Cytogenetics. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. 34:131 - 167.

Ministerio Del Medio Ambiente, Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales. Pasto. Plan de Manejo (Versión preliminar no concertada) Santuario de Flora y Fauna Galeras, Regional Surandina. 1998.

MUNSON, L. 1999. Procedimientos de necropsia para animales silvestres. [en línea]. [citado en 1 de Mayo de 2007]. Disponible en Internet: <http://www.wsc.org/sw-high_tech_tools/wildlifehealthscience/fvp/168570/guidelinesandpapers/Necropsymannualspanish>.

NEWCOMER, E.H. 1957. The mitotic chromosomes of the domestic fowl. En: J. Hereditas 48: 227 - 234.

NEWCOMER, E.H. & BEND, J.W. 1954. Spermatogenesis in the domestic fowl. En: J. Heredity 45:787 - 799.

PARKER, T.A., STOTZ, D.F. & FITZPATRICK, J.W. 1996. Ecological and distributional databases for Neotropical birds. Chicago: Chicago University Press.

PIGOZZI M.I & SOLARI A.J. 2000. Los cromosomas sexuales y la evolución de las aves. En: Ciencia Hoy Vol. 10 N° 56. [en línea]. [citado en 15 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy56/cromosomas.htm>>.

POLLOCH, B.J. & FECHHEIMER, N.S. 1981. Variable C banding patterns and a proposed C band Karyotype in *Gallus domesticus*. En: Genetics. 54: 273-279.

Preguntas comunes sobre las Áreas Importantes para la Conservación de las Aves AICAs de Colombia. [en línea]. [citado en 3 de Abril de 2007]. Disponible en Internet: < <http://www.humboldt.org.co/conservacion/aicas/faqs.html> >.

REMSEN, J.V., CADENA, C.D., JARAMILLO, A., NORES, M., PACHECO, J.F., ROBBINS, M.B., SCHULENBERG, T.S. STILES, F.G. STOTZ, D.F. & ZIMMER, K.J. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. [en línea]. [citado en 3 de Abril de 2007]. Disponible en Internet: <<http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>>.

ROCHA, G. T. & DE LUCCA, E.J. 1988. Nucleolar organizer regions in somatic chromosomes of some species of birds. Caryologia, 41(3-4): 299-308.

ROCHA, G.T. & DE LUCCA, E.J. 1989. Sexagem de Aves. UNESP. Instituto de Biociencias, Departamento de Genética. 60 p.

ROCHA, G.T. 1992. Citogenética de aves, Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, ser. Zool. 8 (1). p. 33 – 67.

ROJAS, S.V. 2005. Ecología de la Comunidad de Pinchaflores Aves (*Diglossa* y *Diglossopsis*) en un Bosque Altoandino. Santa Fé de Bogotá, Tesis de Postgrado para optar el título de Magíster en Biología. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

ROONEY, D.E & CZEPULKOWSKI, B.H. 1987. Human Cytogenetics. A practical approach. IRL. Press. Oxford. England. Citado por: JIMENEZ, L.M. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción.

Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas. 169 p.

_____. 1992. Human cytogenetics. Volume I. Constitutional analysis. A practical Approach. IRL. Press. Oxford University press. England. Citado por: JIMENEZ, L.M. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas. 169 p.

ROSE, R.N. 1986. Manual of clinical laboratory immunology. Tercera edicion. Washintong: American Society for Microbiology. 150 p.

RUIZ-HERRERA MORENO, A. 2003. Implicaciones de los Lugares Frágiles y las Secuencias Teloméricas Intersticiales en la Evolución Cromosómica de los Primates. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 197 p.

SCHIMID, W. 1962. DNA replication patterns of the heterochromosomes in *Gallus domesticus*. En: Cytogenetics. 1: 344-352. Citado por: DE LUCCA, E.J., &

SHIELDS, G.F. Comparative avian Cytogenetics: A Review. 1982. Condor 84:45-58.

SHOFFNER, R.N. "Curso de Citogenética de Aves". Jaboticabal, UNESP. 21 a 26 de Janeiro de 1985. Citado por: GIANONNI, M. & FERRARI, L. 1986. Citogenética aplicada as aves: Técnicas e manual técnico. Universidad estadual Paulista. Javo-ticabal. 121 p.

SILVA, E., CRANE, C., BERMUDEZ, A.J., BUENO, M.L., PEDRAZA, X., & GIRALDO, A. 1989. Citogenética Humana. Manual de Procedimientos. Instituto Nacional de Salud. Colombia. 36 p.

SIMONS, J.E & MUÑOZ SABA, J. 2005. Cuidado, Manejo y conservación de las Colecciones Biológicas. Conservación Internacional. Instituto de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Serie Manuales de campo. Bogotá. 288 p.

STANFIELD, W.D. 1992. Genética. Tercera Edición. Mcgraw – Hill. Citado por: JIMENEZ, L.M. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas. p.26.

STILES, F.G. 2003. Especímenes Ornitológicos y la Preparación de una piel de Estudio. Unidad de Ornitología. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Guia de Clase.

STORER, R. W. 1970. Subfamily Thraupinae. In "Check-list of birds of the World. (Paynter R. A., Jr., ed.). Museum of Comparative Zoology, Cambridge, Massachusetts. Vol. 13". p. 246-408

STOTZ, D.F., FITZPATRICK, J.W., Parker, T.A. & MOSKOVITS, D.K. 1996. Neotropical birds: ecology and conservation: Chicago: Chicago University Press.

THERMAN, E. & MILLARD, S. 1993. Human Chromosomes, Structure, Behavior, and Effects. Third Edition. Springer – Verlag. 312 p.

THORGAARD, G.H & DISNEY, J.E. 1990. Chromosome preparation and analysis in: Methods for fish biology. Editado por: Carls, B., Schretk; and Moyle, P.B. Published by American Fisheries for Society. p. 171-190.

VARGAS, M. S. 2000. Evaluación de Técnicas para Obtención de Cromosomas en Aves de la Familia Psittacidae. Santafé de Bogotá, D.C. Trabajo de grado (Zootecnista) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 81 p.

VERMA, R.S., & BABU, A. 1989. Human Chromosomes Manual of basic Techniques. Pergamon. Citado por: JIMENEZ, L.M. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Santa Fé de Bogotá, Trabajo de Promoción. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Ciencias Fisiológicas. p. 35.

VUILLEUMIER, F. 1969. Systematic and evolution in *Diglossa* (Aves Coerebidae). American Museum. Novitates No 2381: 1 – 44.

WALDRIGUES, A. 1971. Estudo cromossômico de alguns Cuculiformes americanas. Tese de doutoramento. Facultad de Medicina de Ribeirão preto, USP. 1980.

YUNIS, J.J. & YASMINEH. W. 1971. Heterochromatin, Satellite DNA, and Cell Function. En: Science. 174: 1200-1209.

ANEXOS

Anexo A. Protocolo para limpieza de láminas¹⁶⁸

1. Dejar las láminas en jarras copping durante 5 días.
2. Limpiar las láminas con gasa.
3. Limpiarlas con una solución alcohol-acetona 1:1.
4. Colocarlas en jarras opling con Ácido Clorhídrico 1% durante 24 horas.
5. Descartar el ácido.
6. Lavarlas con agua durante 1 hora.
7. Dejar en jarras copping con Solución sulfocrómica durante 24 horas.
8. Lavarla con agua durante 1 hora.
9. Pasarlas por agua destilada 3 o 4 veces.
10. Dejarlas en fijador metanol: ácido acético 3:1, hasta usarlas, cuidando que el nivel del fijador se mantenga constante.
11. Después de limpias deben guardarse en cajas para evitar el polvo y el engrase

¹⁶⁸ BUENO, M.L. 2003. Técnicas Citogenéticas. Santa Fé de Bogotá. Trabajo de Promoción. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología.

Anexo B. Protocolos Base Reportados

Obtención de metafases a partir de médula ósea¹⁶⁹

Tratamiento con colchicina

Se inyecta el ejemplar con una solución del 0.05% de colchicina en una dosis correspondiente a 0.04ml por 30g de peso. Esta aplicación puede efectuarse intramuscular o intraperitoneal. La dosis, el tiempo y lugar de administración tendrán que ser ajustadas de acuerdo con los resultados obtenidos para cada especie. De Lucca & Rocha¹⁷⁰ inyectan solución de colchicina 0.05% en el muslo del ave, en dosis de 0.02ml/g de peso del animal. Después de 1 hora se sacrifica el animal.

Colecta de células

1. Después de 30 – 40 minutos de la inyección de colchicina se sacrifica el ave, seleccionando una pierna a la altura de la articulación coxo – femoral, removiendo los músculos, exponiendo el fémur y la tibia.
2. Se cortará las epífisis para extraer la médula con ayuda de una jeringa de 5 – 10ml y se inyecta medio de cultivo tibio a 37°C, en el foramen del hueso recogiendo la médula en tubo de centrifuga de 15 ml.
3. Se homogeniza el tejido con la jeringa o pipeta pasteur, hasta obtener una suspensión celular.
4. Se deja sedimentar por 5 minutos para que los residuos se depositen en el fondo de la grasa de la superficie.
5. Posteriormente se transfiere a otro tubo procurando dejar la grasa y los residuos en el primer tubo, centrifugar por 5 minutos a 800 – 1000 rpm y se desprecia el sobrenadante. Este procedimiento se puede repetir 2 o 3 veces para limpiar mejor las células.
6. Al botón celular, se adiciona KCL 0.075M mantenida a 37 – 41°C, se resuspende con pipeta pasteur varias veces y se incuba por 20 minutos a 37° – 41°C.
7. Se centrifuga, se desprecia el sobrenadante y se agrega 1 ó 2ml de fijador fresco (carnoy 3 partes de metanol y 1 parte de ácido acético) dependiendo del

¹⁶⁹ GIANONNI & FERRARI, Op.cit., p.8,48.

¹⁷⁰ DE LUCCA & ROCHA. Citogenética de aves. Op. cit., p. 38.

volumen del material antes de extender se recomienda repetir este procedimiento 2 o 3 veces para obtener células mas limpias y con menos citoplasma.

8. Una ves se tenga un botón celular limpio se gotean la células en láminas limpias y secas.

9. Se utiliza la tinción convencional Giemsa y se examina al microscopio de acuerdo a la calidad y concentración de células.

10. Se prepararán cerca de 2-3 láminas que estén secas en estufa a 37°C. el material restante se colocara en pequeños frascos de vidrio con el número del ave y datos. Se adicionará más fijador (± 2 ml) y se almacenará a -20°C para posterior utilización.

Colchicina *in vitro*: de células de médula ósea¹⁷¹

En caso de que los animales mueran en campo, Gianonni & Ferrari, 1986, proponen una técnica que tendrá que ser experimentada en la cuál se colecta la médula ósea en campo, en medio de cultivo con la colchicina, que son transportados en contacto con el cuerpo para mantener la temperatura. De esta forma pueden ser transportados cerca de 6 horas hasta el laboratorio. Cuando se llega al laboratorio se terminará la técnica iniciando con la hipotonización, la fijación y preparación de las láminas.

El cultivo de médula ósea en condiciones de campo es empleado cuando no se tienen los medios de hacer una inmediata incubación de material.

Médula directa - Tratamiento con fermento¹⁷²

1. Se preparará una suspensión de fermento disolviendo 1g de fermento Fleischman en 2.5g de dextrosa en 10ml de agua destilada a 40°C.

2. Se incubará a 40°C por 20 – 40 minutos hasta iniciar burbujeo indicando la activación del fermento.

3. Se inyectará el ave por vía subcutánea en la región dorsal ó peritoneal 0.5ml de suspensión de fermento para cada 25 – 30 g del peso del animal (en aves jóvenes ó recién capturadas se expondrá a 24 horas la solución de fermento).

¹⁷¹ Ibid. p.41.

¹⁷² LEE & ELDER, Op. cit., p. 38.

Cultivo corto de médula¹⁷³

Extraer médula con medio y antibiótico en condiciones estériles cultivar por 2-4 horas con PHA, colchicina y cosecha.

Los procedimientos son esencialmente iguales a los descritos en la técnica anterior con excepción a dos pasos:

1. La colchicina no es inyectada en el animal permitiendo la utilización de médula ósea de aves recién sacrificadas.

2. La médula ósea es colectada como se describió anteriormente y es colocada en frascos de cultivo con 7 a 10 ml de medio completo (sin antibióticos) adicionándose una gota de colchicina 0.05% ó de Velban 0.25% e incubarse por 2-4 horas a 37.5°C. las etapas siguientes son iguales a las presentadas en la última técnica descrita.

Waldrigues (1980) utilizó medio RPMI1640 suplemento con 20% de Suero Bovino, 2% de fitohemaglutinina, penicilina 1 µl/ml y estreptomycin 1 mg/l. Las suspensión de células en medio de cultivo e incubado por 4 horas a 41°C, después adicionar 2 gotas de colchicina (solución stock B 0.0016%) homogenizar e incubar por más de 2 horas y continuar con la fase de hipotonización y fijación de manera usual.

Cultivo *in vivo* con inyección de fitohemaglutinina y colchicina del ejemplar¹⁷⁴

Descrito por Taylor y Bolaños (1975), basado en la inoculación *in vivo* de fitohemaglutinina (PHA) cruda, obtenida de semillas de *Phaseolus lunatus*, y la posterior detención de la mitosis *in vitro* con colchicina, efectuando luego el choque hipotónico con citrato de sodio al 1%, fijación con metanol: ácido acético (3:1) y coloración con Giemsa.

La inoculación *in vivo* tanto de PHA cruda como de colchicina en las siguientes proporciones: PHA: 0.1ml por cada 34 gramos de peso corporal y colchicina, 1ml de una solución al 5% por cada 100 gramos de peso del ejemplar. Para la serpientes que se emplean en este protocolo se sangran a las 48 horas, desarrollándose el resto del procedimiento de manera análoga al método anteriormente descrito.

¹⁷³ SHOFFNER, Op. Cit., Citado por: GIANONNI & FERRARI, Op. Cit., p.121.

¹⁷⁴ GUTIERREZ & BOLAÑOS, Op. Cit., p.309-319.

Anexo C. Replica para la evaluación de variables en los protocolos empleados.

TÉCNICA EMPLEADA	ESPECIE	Volumen de fermento inyectado	Tiempo de exposición fermento	Concentración de colchicina	Volumen de Colchicina inyectada	Tiempo de exposición a colchicina	Hipotónica	Tiempo y T° de exposición hipotónica
Técnica Directa de Médula Osea Sin fermento	<i>Gallus domesticus</i>	X	x	0,05%	1.4ml	60 minutos	KCl 0.075 M	30 minutos a 37°
Técnica Directa de Médula Osea con fermento	<i>Gallus domesticus</i>	1.6 ml	24 horas	0,05%	1.4 ml	60 minutos	KCl 0.05 M	60 minutos a 40°
Técnica Directa de Médula Osea Sin fermento	<i>Pirocephalus rubinus</i> ♀	X	x	0,05%	0,22 ml	30 minutos	KCl 0.075 M	46 minutos a 37°
Técnica Directa de Médula Osea Sin fermento	<i>Geothlypis aequinoctialis</i> ♀	X	x	0,05%	0,2 ml	30 minutos	KCl 0.075 M	47 minutos a 37°

TÉCNICA EMPLEADA	ESPECIE	Concentración de colchicina	Volumen de Colchicina	Tiempo de exposición a colchicina	Hipotónica	Tiempo y T° de exposición hipotónica	SFB	Medio de cultivo	PHA-P	T°	Tiempo de Incubación
Cultivo de Linfocitos Punción Cardiaca	<i>Gallus domesticus</i>	0,02%	20µl	40 minutos	KCl 0.05 M	45 minutos a 40°	1 ml	TC199 4ml	0,4ml	37°	72 horas
Cultivo de Linfocitos Punción Cardiaca	<i>Gallus domesticus</i>	0,02%	0,15 ml	15 minutos	KCl 0.075 M	30 minutos a 39°	1 ml	Iscove's	0,5 ml	37°	88 horas

TÉCNICA EMPLEADA	ESPECIE	Concentración de colchicina	Volumen de Colchicina	Tiempo de exposición a colchicina	Hipotónica	Tiempo y T° de exposición hipotónica	SFB	Medio de cultivo	PHA-P	T°	Tiempo de Incubación
Cultivo Corto de Médula Ósea in vitro	<i>Gallus domesticus</i>	0,016%	0,1 ml	4 horas	KCl 0.075 M	45 minutos a 37°	x	RMPI1640	x	37°	4 horas

TÉCNICA EMPLEADA	ESPECIE	PESO	Volumen de Colchicina inyectada	Concentración de colchicina	Tiempo de exposición a colchicina	PHA concentración n 0.07%	Hipotónica	Tiempo y T° de exposición hipotónica	Tiempo de cultivo
Protocolo "in vivo" utilizando inyección de Fitoheماغlutinina -P y Colchicina	<i>Diglossa sittoides</i> ♀	10g	0,1 ml	0.05%	4 1/2 horas	0.1ml	KCl 0.075 M	20 minutos a 40°	26 horas
Muestra de Médula Ósea (Técnica Directa)	<i>Diglossa sittoides</i> ♀	10g	0,1 ml	0.05%	4 1/2 horas	0.1ml	KCl 0.075 M	45 minutos a 40°	27 horas

TÉCNICA EMPLEADA	ESPECIE	PESO	Concentración de colchicina	Volumen de Colchicina	Hipotónica	Tiempo y T° de exposición hipotónica	SFB	Medio de cultivo	PHA-P	Tiempo de Incubación
Muestra de sangre por punción cardiaca	<i>Diglossa sittoides</i> ♂	10g	0,016%	0,05 ml	0,075 M	30 minutos a 40°	0,5 ml	Iscove's	0,1 ml	24 horas
Muestra de sangre por punción cardiaca	<i>Diglossa sittoides</i> ♂	10g	0,016%	0,2ml	0,075 M	31 minutos a 40°	1 ml	Iscove's	0,1 ml	73 horas

TÉCNICA EMPLEADA	ESPECIE	PESO	Concentración de colchicina	Volumen de Colchicina	Tiempo de exposición a colchicina	Hipotónica	Tiempo y T° de exposición hipotónica
Técnica directa de médula Ósea	<i>Diglossa sittoides</i> ♀	10g	0,05%	0,2ml	60 minutos	0,075 M	45 min a 40°
Técnica directa de médula Ósea	<i>Contopus virens</i>	10g	0,05%	0,2ml	30 minutos	0,075 M	50 min a 40°

TÉCNICA EMPLEADA	ESPECIE	PESO	Concentración de colchicina	Volumen de Colchicina	Tiempo de exposición a colchicina	Hipotónica	Tiempo y T° de exposición hipotónica	Medio de cultivo	Tiempo de Incubación	T°
Cultivo Corto de Médula Ósea	<i>Diglossa sittoides</i> ♀	10g	0,016	0,2ml	60 minutos	0,075 M	60 min a 40°	Iscove's	24 horas	40°
Cultivo Corto de Médula Ósea	<i>Diglossa sittoides</i> ♀	10g	0,016	0,2ml	50 minutos	0,075 M	45 min a 40°	Iscove's	24 horas	40°

Anexo D. Protocolos con modificaciones - Médula directa

Tratamiento con colchicina

Inyectar el ejemplar con una solución del 0.05% de colchicina en una dosis correspondiente a 0.04ml por 30g de peso. Esta aplicación puede efectuarse intramuscular o intraperitoneal. Teniendo en cuenta que el tiempo de acción de la colchicina terminará en un tiempo de 50 minutos.

Colecta de células

1. Después de 30 – 40 minutos de la inyección de colchicina se sacrifica el ave, seleccionando una pierna a la altura de la articulación coxo – femoral, removiendo los músculos, exponiendo los fémures y húmeros del ave.
2. Se corta las epífisis para extraer la médula con ayuda de una jeringa de insulina y se inyecta solución hipotónica tibia a 37°C, en el foramen del hueso recogiendo la médula en tubo de centrifuga de 15 m.
3. Se homogeniza el tejido con pipeta pasteur de vidrio, hasta obtener una suspensión celular, evitando el burbujeo.
4. Centrifugar por 5 minutos a 800 – 1000 rpm y se desprecia el sobrenadante. Este procedimiento se repite 2 o 3 veces para limpiar mejor las células.
5. Al botón celular, se adiciona KCL 0.075M mantenida a 40°C, se resuspende con pipeta pasteur varias veces y se incuba por 20 minutos a 40°C. el tratamiento hipotónico debe durar 50 minutos en total.
6. Fijación: una ves completado el tiempo de hipotónica antes de centrifugar, se adiciona 1 ml de carnoy fresco y frió, se invierte el tubo 3 veces y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante.

Adicionar 1, 3 y 6 ml de carnoy y se dejó en nevera en tiempos de 2, 5 y 30 minutos.

Resuspender, centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante.

Adicionar 4 ml de carnoy y dejar en nevera 20 minutos, resuspender, centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante.

Adicionar 4 ml de carnoy y dejar en nevera 10 minutos, resuspender, centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante.

7. Una vez se tenga un botón celular limpio se gotean la células en láminas limpias y secas a una distancia de dos a tres metros de altura.

8. Se utiliza tinción convencional Giemsa, una vez las láminas estén secas emplear 4.6 ml de agua destilada, 0.2 ml de buffer giemsa y 0.2 ml de colorante recién filtrado (colorante para una lámina) se colorean por 10 minutos, se lavan con agua destilada y se dejan secar al aire. Se examina al microscopio de acuerdo a la calidad y concentración de células.

9. Se prepararán cerca de 2-3 láminas

Colchicina in vitro: de células de médula ósea¹⁷⁵

Cuando los animales mueren en campo, coleccionar la médula ósea inmediatamente, en 3 ml de medio de cultivo con 0.02 ml de colchicina al 0.016%, transportarlos en contacto con el cuerpo para mantener la temperatura. De esta forma pueden ser transportados cerca de 6 horas hasta el laboratorio. Al llegar al laboratorio se termina la técnica como se describe en el Anexo D iniciando con la hipotonización, la fijación y preparación de las láminas.

Anexo E. Médula directa - Tratamiento con fermento¹⁷⁶

1. Se prepara una suspensión de fermento disolviendo 1g de fermento Fleischman en 2.5g de dextrosa en 10ml de agua destilada a 40°C.

2. Se incuba a 40°C por 20 – 40 minutos hasta iniciar burbujeo indicando la activación del fermento.

3. Se inyecta el ave por vía subcutánea en la región dorsal ó peritoneal 0.5 ml de suspensión de fermento para cada 25 – 30 g del peso del animal (en aves jóvenes ó recién capturadas se expondrá a 24 horas la solución de fermento).

4. Después de las 24 horas del tratamiento se inicia con la inyección de colchicina del ejemplar como se describe en el Anexo D.

¹⁷⁵ GIANONNI & FERRARI, Op.cit., p.121.

¹⁷⁶ LEE & ELDER, Op. cit., p. 38.

Anexo F. Cultivo corto de médula con inyección de colchicina y fitohemaglutinina *in vitro*

Siembra

Se sacrifica el ave, realizando disección en condiciones estériles seleccionando los fémures y húmeros del ave.

Se corta las epífisis para extraer la médula con ayuda de una jeringa de insulina y se inyecta medio de cultivo, en el foramen del hueso recogiendo la médula en frascos de vidrio que contengan 3 ml de medio de cultivo Iscove's, con 70 μ ml de PHA al 0.07% y 1 ml de SFB.

Llevar a incubadora a 40°C por 24 horas.

Cosecha

1. A las 23:10 horas agregar 0.02 ml de colchicina 0.016%, llevar a incubadora a 40°C durante 50 minutos.
2. Transferir a tubo de centrifuga, centrifugar a 800 – 1000 rpm desprejar el sobrenadante.
3. Al botón celular, se adiciona KCL 0.075M mantenida a 40°C, homogenizar el botón celular con pipeta pasteur y llevar a incubadora o baño maría a 40°C durante 50 minutos.
4. Una vez completado el tiempo de hipotónica iniciar con la fijación como se describe en el anexo 1
5. Una ves se tenga un botón celular limpio se gotean la células en láminas limpias y secas a una distancia de dos a tres metros de altura.
6. Se utiliza la tinción convencional Giemsa y se examina al microscopio de acuerdo a la calidad y concentración de células.

Anexo G. Cultivo corto de médula con inyección de fitohemaglutinina *in vivo*

Inyectar el ejemplar *in vivo* inmediatamente después de la captura con 0.1ml de fitohemaglutinina PHA – P comercial, por cada 34 gramos de peso corporal, vía intraperitoneal, empleando una concentración de 0.07%, durante 24 horas.

Siembra

Se sacrifica el ave, realizando disección en condiciones estériles seleccionando los fémures y húmeros del ave como se describe en el Anexo F.

Cosecha

Posteriormente se sigue con la detención de la mitosis *in vitro* con colchicina, efectuando luego el choque hipotónico con KCl al 0.075, fijación con carnoy (metanol: ácido acético (3:1)) y coloración con Giemsa, como se describe en el Anexo F.

Anexo H. Resultados prueba de Shapiro Hill

Cromosoma	I.C	Gl	P	Conclusión
1	<i>D. sittoides</i>	22	0,0019	diferencia significativa
2		22	0,777	No existe diferencia significativa
3		22	0,781	No existe diferencia significativa
4		22	0,271	No existe diferencia significativa
5	0			No existe diferencia significativa
6	0			No existe diferencia significativa
7	0			No existe diferencia significativa
Z	<i>D.lafresnayii</i>	22	0,0199	Diferencia significativa
W				No existe diferencia significativa
Cromosoma	R.B	Gl	P	Conclusión
1	<i>D. sittoides</i>	22	0,0094	Diferencia significativa
2		22	0,653	No existe diferencia significativa
3		22	0,826	No existe diferencia significativa
4			0,351	No existe diferencia significativa
5	0			
6	0			
7	0			
Z			0,0228	Diferencia significativa
W				No existe diferencia significativa

Cromosoma	L.R	GI	P	Conclusión
1				No existe diferencia significativa
2		22	0,636	No existe diferencia significativa
3		22	0,552	No existe diferencia significativa
4		22	0,504	No existe diferencia significativa
5			0,071	No existe diferencia significativa
6			0,297	No existe diferencia significativa
7			0,453	No existe diferencia significativa
Z			0,677	No existe diferencia significativa
W				No existe diferencia significativa

Anexo I. Valores de biometría cromosómica en *Diglossa humeralis aterrima*

Valores de Índice centromérico									
Cromosoma	mdf02l1m1	mdf02ml1m1	mdf02ml1m2	mdf02ml1m3	mdf02ml1m6	mdf02ml1m7	mdf02ml1m8	md01hl2m1	cm05hl1m4
1	31,14587	29,03319	26,91871	21,47956	36,84648	35,27302	21,0450	27,77251	31,56813
2	23,12484	25,46611	24,5218	21,72803	34,77783	21,78395	29,06676	38,44443	30,84664
3	24,490717	32,23717	23,81196	28,35454	37,14446	29,83532	27,18093	32,98473	25,71413
4	37,91931	31,79186	29,35284	36,49006	30,22837	34,27457	24,94186	35,22855	38,42110
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	40,8151	32,52107	37,79175	47,17877	27,8722	35,91017	40,37196	33,7604	36,72332
W	*	*	*	*	*	*	*	44,88188	38,40275
Valores de Relación de Brazos									
Cromosoma	mdf02l1m1	mdf02ml1m1	mdf02ml1m2	mdf02ml1m3	mdf02ml1m6	mdf02ml1m7	mdf02ml1m8	md01hl2m1f3	cm05hl1m4
1	2,303227	2,923239	2,815254	3,694772	1,783364	1,844640	3,828617	2,611312	2,172009
2	3,343657	2,947982	3,078169	3,724846	1,903112	3,609552	2,486369	1,606762	2,260152
3	3,183185	2,10727	3,199814	2,556954	1,692472	2,364979	2,793282	2,044575	2,888915
4	1,784622	2,147878	2,534428	1,745049	2,323251	1,91957	3,011887	1,849264	1,665645
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	1,453995	2,082916	1,647819	1,124604	2,710474	1,817955	1,482080	1,962045	1,723064
W	*	*	*	*	*	*	*	1,228070	1,6039

Valores de Longitud Relativa									
Cromosoma	mdf02l1m1	mdf02ml1m1	mdf02ml1m2	mdf02ml1m3	mdf02ml1m6	mdf02ml1m7	mdf02ml1m8	md01hl2m1	cm05hl1m4
1	10,36864	9,186712	7,554026	7,070467	7,619103	5,528751	5,508485	5,885306	8,411520
2	8,782057	8,820745	6,995521	6,131394	7,183211	5,276533	5,41537	5,412956	6,194199
3	6,722710	5,646945	5,476721	4,151333	5,894268	4,118087	4,766624	5,183588	6,47198
4	6,794619	5,415479	4,319742	3,476268	5,714147	4,02170	4,408529	4,458730	4,19877
5	5,76494	5,447800	4,554293	3,109860	5,661552	4,102440	3,486532	3,420787	4,788854
6	3,924386	4,80553	4,032600	2,645904	4,419440	3,402115	2,525375	2,522371	4,081251
7	3,313926	3,213420	3,265838	2,824983	4,111794	2,379478	2,396582	2,872889	3,049022
Z	11,19635	9,80916	8,9182	20,15589	22,59467	16,6461	21,56958	17,19386	10,44055
W	*	*	*	*	*	*	*	7,772273	8,007889

Anexo J. Valores de biometría cromosómica en *Diglossa lafresnayii*

Valores de Índice centromerico								
Cromosoma	md01l1m10	md01l1m13	md01l1m15	md01l1m16	md01l1m17	md01l1m19	md01l1m21	md01l1m24
1	29,74152	31,22893	26,78683	23,45783	34,83747	20,82413	29,65884	24,91103
2	29,88026	40,50093	23,7273	24,12276	20,62548	17,90378	27,53726	22,19344
3	28,34243	37,06328	29,47308	21,00295	31,61518	27,72035	35,99754	32,81518
4	41,32434	45,05299	35,19846	27,67461	42,84717	31,78695	39,92415	31,05001
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	38,42245	39,47678	43,94108	37,46024	37,12026	38,08094	40,31976	39,97715
W	*	*	*	*	*	*	*	*

Valores de Relación de Brazos								
Cromosoma	md011m10	md011m13	md011m15	md011m16	md011m17	md011m19	md011m21	md011m24
1	2,4017	2,2055	2,736972	3,28	1,875833	3,804166	2,423165	3,014285
2	2,438176	1,469833	3,215714	3,18699	3,88321	4,612380	2,642023	3,544013
3	2,559632	1,726319	2,39625	3,783727	2,164529	2,615555	1,791499	2,057861
4	1,431916	1,219611	1,847241	2,614245	1,333887	2,154415	1,528970	2,333529
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	1,605486	1,533135	1,276024	1,670026	1,697833	1,6365	1,481481	1,501428
W	*	*	*	*	*	*	*	*
Valores de Longitud Relativa								
Cromosoma	md011m10	md011m13	md011m15	md011m16	md011m17	md011m19	md011m21	md011m24
1	6,626696	6,268755	6,508033	8,708387	4,347791	6,598244	6,521256	6,629036
2	6,375328	5,304632	6,376230	8,452023	4,923178	6,441935	5,673011	7,452357
3	4,930912	4,504781	5,515191	5,972656	3,589411	4,70951	4,727309	5,793919
4	4,037075	4,123435	4,328965	5,789920	3,534073	4,566957	3,644443	4,620273
5	4,102385	4,020764	4,980417	4,805269	3,464272	4,417161	4,016227	4,131941
6	2,916171	3,523058	3,568398	3,641431	2,521643	3,98658	3,402603	4,135480
7	2,449888	2,270480	3,029303	2,764116	2,200935	2,566064	3,137903	3,664842
Z	16,41051	11,63852	12,20920	18,60296	13,66879	16,51302	10,2569	10,71594
W	*	*	*	*	*	*	*	*

Anexo K. Valores de biometría cromosómica en *Diglossa sittoides*

Valores de Índice centromerico						
Cromosoma	md01hl3m2	md03hl1	cm05hl1m2	cm05hl1m3	cm05hl1m4	cm05hl1m5
1	40,023730	37,15751377	35,59620825	40,90854587	34,78157565	35,38164906
2	31,912766	31,01146389	27,428024	22,89977606	19,83157054	33,51608546
3	33,78710	30,51750381	22,34350517	33,07354212	31,13276692	31,74881221
4	32,671679	35,76835902	32,54901495	28,83632375	27,51882661	39,95344305
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
Z	33,333333	33,29171868	38,42563123	25,83979328	29,01802839	33,27796235
W	0	0	0	0	0	0
Valores de Relación de Brazos						
Cromosoma	md01hl3m2	md03hl1	cm05hl1m2	cm05hl1m3	cm05hl1m4	cm05hl1m5
1	1,4999343	1,691248	1,8732958	1,4451224	1,8805742	1,8353574
2	2,134318182	2,229660	2,8941955	3,3671546	4,0924169	1,999390
3	1,9605049	2,3049450	3,5037527	2,1325909	2,2121890	2,1502380
4	2,0730383	1,7970577	2,081875	2,4835	2,684159	1,5434932
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
Z	2	2,00375	1,6024295	2,87	2,446133	2,0049916
W	*	*	*	*	*	*

Valores de Longitud Relativa						
Cromosoma	md01hl3m2	md03hl1	cm05hl1m2	cm05hl1m3	cm05hl1m4	cm05hl1m5
1	7,3709100	6,4775447	8,8994600	11,573198	8,38972102	6,086953
2	6,23313014	5,368376	8,1961716	9,8677233	6,6231964	6,2474391
3	5,9103986	4,9247087	7,3865722	5,0544077	4,4413607	4,9604789
4	3,9913144	3,8876360	5,6355069	4,8970389	4,0020893	3,3087776
5	3,8087505	3,148190	3,7965304	2,7907772	3,9962807	3,6888763
6	3,0386942	2,8810655	3,8087971	2,4930943	2,7017007	3,1728636
7	3,7395319	2,4068959	3,3119975	2,6473623	3,2034140	2,9279111
Z	10,097835	7,3530604	14,421545	17,763011	15,95458	16,57881
W	9,7979606	5,2110952	6,2422984	0	11,949105	11,052540