

Cariología *beta* de tres especies pertenecientes al grupo de especies *Drosophila mesophragmatica*

Ana Beatriz Mafla M.

Laboratorio de Genética Evolutiva, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
Apartado 17-01-2184. Quito-Ecuador. amafla@puce.edu.ec

Recibido: 04, 04, 2012; aceptado: 01, 10, 2012

RESUMEN. - Se presentan los cariotipos metafásicos de tres especies pertenecientes al grupo de especies *Drosophila mesophragmatica*, dos especies ecuatorianas nuevas para la ciencia: *Drosophila chorlavi* Céspedes & Rafael, 2012; *Drosophila rucux* Céspedes & Rafael, 2012 y la tercera *D. mesophragmatica* Duda, 1927 que corresponde a una población de los Andes Ecuatorianos. El número $2n = 10$ es compartido por las tres especies; en los cariotipos son claramente identificables los autosomas 4 y 5 así como el cromosoma sexual Y; en tanto que los autosomas 2 y 3 al igual que el cromosoma sexual X son prácticamente indistinguibles entre ellos. Las tres especies difieren ligeramente en el contenido de heterocromatina y marcadamente en la morfología del autosoma 5.

PALABRAS CLAVE: Cromosomas mitóticos, dípteros andinos, heterocromatina, nuevas especies.

ABSTRACT. - We present the metaphase karyotypes of three species belonging to the species group *Drosophila mesophragmatica*, two Ecuadorian species new to science: *Drosophila chorlavi* Céspedes & Rafael, 2012, *Drosophila rucux* Rafael & Céspedes, 2012 and the third *D. mesophragmatica* Duda, 1927 corresponds to a population of the Ecuadorian Andes. The number $2n = 10$ is shared by the three species; in the karyotypes are clearly identifiable autosomes 4 and 5 and the Y sex chromosome, while the autosomes 2 and 3 as well as the sex chromosome X are virtually indistinguishable from them. The three species differ slightly in heterochromatin content and markedly in autosomal morphology 5.

KEYWORDS: Andean Diptera, heterochromatin, mitotic chromosomes, new species.

INTRODUCCIÓN

La cariología *beta* según White, 1978, corresponde a un segundo nivel de análisis cromosómico por el cual se consigue determinar no solo el número de cromosomas de una especie sino definir su tamaño, la posición de los centrómeros e identificar a los cromosomas sexuales; en tanto que la cariología *zeta* corresponde a una descripción más detallada de las bandas y otras marcas en los cromosomas politénicos (puffs, ectopic pairing, weak

spots). Estos dos niveles de análisis citológico proporcionan datos complementarios para dilucidar el grado de parentesco entre dos o más especies relacionadas; más aún, en los casos en que los cromosomas politénicos resultan homosecuenciales en dos especies, la simple comparación de los bloques heterocromáticos en los cromosomas mitóticos, permite asumir qué especie es derivada de cuál otra, considerando que la tendencia a ganar material es el carácter apomórfico (Ward y Heed, 1970).

El grupo de especies de *D. mesophragmatica* fue establecido por Brncic & Koref-Santibañez, 1957 para reunir a las especies andinas: *D. mesophragmatica* Duda, 1927; *D. gaucha* Jaeger y Salzano, 1953; *D. pavani* Brncic, 1957; *D. altiplanica* Brncic & Koref-Santibañez, 1957; *D. orkui* Brncic & Koref-Santibañez, 1957 y *D. viracochi* Brncic & Koref-Santibañez, 1957.

Posteriormente, Brncic *et al.*, 1971, proponen las relaciones citotaxonómicas entre seis especies del grupo *D. mesophragmatica*, y establecen tres unidades filéticas al interior del grupo; en su trabajo consideran de importancia dos tipos de cambios cromosómicos: las alteraciones en la cantidad de heterocromatina observada en las placas metafásicas y las inversiones paracéntricas detectadas en los cromosomas politénicos. Los autores asumen que ambos tipos de cambio ocurren al azar y se constituyen como eventos únicos en la historia evolutiva de los diferentes grupos dentro del género *Drosophila*, por lo que las especies que compartan estructuras cromosómicas únicas pueden ser agrupadas en unidades filéticas discretas; consecuentemente proponen que dentro del grupo *mesophragmatica* hay tres de estas unidades: una conformada por *D. mesophragmatica*, *D. brncici* Hunter & Hunter, 1964 y *D. gasici* Brncic, 1957; otra por *D. pavani* y *D. gaucha* y una tercera sólo con *D. viracochi*. Plantean que la filogenia cromosómica propuesta requiere partir desde una secuencia de bandas en los cromosomas politénicos semejante a la de *D. mesophragmatica* y portadora del cromosoma puntiforme en el cariotipo metafásico, tal estado sería el de una Hipotética primitiva para el grupo; sugieren que esta condición “*podría encontrarse en alguna población local o especie aún no descubierta...en alguna región del sistema montañoso de los Andes, propensa a mantener poblaciones aisladas y/o endémicas*”.

Vela y Rafael, 2004, describen tres nuevas especies del grupo *D. mesophragmatica*, recolectadas en el Bosque Protector del Pa-

sochoa: *D. ruminahui* Vela & Rafael, 2004; *D. amaguana* Vela & Rafael, 2004; *D. shyri* Vela & Rafael, 2004; en su trabajo, las autoras argumentan que la dirección de las cerdas escutelares basales es un carácter taxonómico importante, por lo cual reconocen los dos subgrupos ya propuestos por Nacur, 1958 y proponen renombrarlos como subgrupo *D. viracochi* a las especies con cerdas escutelares anteriores convergentes y subgrupo *D. mesophragmatica* a las especies con cerdas escutelares anteriores divergentes.

Mota *et al.*, 2008, presentan una filogenia molecular del grupo *D. mesophragmatica* como un ejemplo de evolución andina; dan la referencia de que otros autores ya han hecho inferencias de las relaciones dentro del grupo, basados en análisis morfológicos, citológicos, y de isoenzimas, que a nivel molecular se ha confirmado la monofilia del grupo pero que las relaciones internas no son claras, por ello argumentan que el uso de marcadores nucleares y mitocondriales podría arrojar datos esclarecedores; comparan seis de las trece especies del grupo *mesophragmatica*; y reportan sus resultados apoyando la subagrupación hecha por Brncic *et al.*, 1971; reconocen tres subgrupos y entonces proponen renombrarlos como subgrupos *D. mesophragmatica*, *D. gaucha* y *D. viracochi*; aclaran que tal subagrupación no está en discordancia con la de Vela y Rafael, 2004, pero que prefieren la de tres subgrupos pues esa topología refleja mejor sus resultados de ramificación.

Recientemente, el grupo de especies *D. mesophragmatica* se ha ampliado a 17 miembros con el descubrimiento de otras especies ecuatorianas: *D. cashapamba* Céspedes & Rafael, 2012; *D. chorlavi* Céspedes & Rafael, 2012; *D. rucux* Céspedes & Rafael, 2012; y *D. yanayuyu* Céspedes & Rafael, 2012. En esta publicación se posiciona a *D. chorlavi* como un miembro del grupo *mesophragmatica* mientras que a *D. rucux* se la categoriza como un “miembro aberrante” del grupo *mesophragmatica*. De forma que, las especies

nuevas de este grupo de moscas andinas se constituyen en un objeto interesante para analizarlas citológicamente y complementar las propuestas mencionadas anteriormente respecto a las relaciones entre especies y entre subgrupos.

En este trabajo se reporta los resultados del análisis de los cromosomas metafásicos de *Drosophila chorlavi* Céspedes & Rafael, 2012; *D. rucux* Céspedes & Rafael, 2012, especies nuevas descubiertas en el Ecuador y que han sido propuestas como miembros del grupo *mesophragmatica* por Céspedes y Rafael, 2012; y se las compara con los cromosomas metafásicos de *D. mesophragmatica* Duda, 1927, especie de amplia distribución, desde el sur de Perú y Bolivia hasta Colombia (Koref-Santibañez, 1963).

Considerando que la comparación de bloques heterocromáticos en cromosomas mitóticos es un carácter del endofenotipo con valor citotaxonomico, creemos que la información que proporcione la cariólogía

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras examinadas corresponden a 55 larvas de *Drosophila mesophragmatica*, 47 de *D. rucux* y 31 de *D. chorlavi*, provenientes de las colecciones que se muestran en la tabla 1.

Para obtener cromosomas bien extendidos y diferenciados en porciones eucromáticas y heterocromáticas se utilizó la técnica de suspensión celular y la tinción con Giemsa descrita en Mafla, 2008.

Se disectaron larvas de tercer estadio para extraer los ganglios cerebrales; se colectaron de 10 a 18 ganglios cerebrales en un portaobjeto excavado con solución de Ringer-*Drosophila*; se transfirieron a otro portaobjeto excavado conteniendo una solución de Ringer: colchicina 0,01M en proporción 2:1 por 30 minutos; se retiró esta solución y se reemplazó por KCl 0.075M durante 20 minutos. Después del tratamiento hipotónico se fijó el tejido en metanol: ácido acético (3:1) durante un mínimo de 30 minutos, después de lo cual se retiró el fijador y se dispersó el tejido en ácido

Tabla 1. Datos de colección de las especies analizadas

Especie	Colector	Localidad	Determinado por	Código del holotipo
<i>D. mesophragmatica</i>	R. León	Chimborazo: Riobamba, 01°41'00"S, 78°38'00"W, 2 754m	V. Rafael	
<i>D. chorlavi</i>	M. L. Figuero	Ibarra: Chorlavi, 0°21'30"S, 78°10'42"W, 2 200 m	V. Rafael	QCAZI 2316
<i>D. rucux</i>	D. Céspedes	Quito: Cruz Loma, 0°1'19"S, 78°31'25.1"W, 3 325 m	D. Céspedes	QCAZI 2305

beta de las tres especies ecuatorianas mencionadas, aportarían pistas para esclarecer las relaciones tanto entre especies como entre subgrupos.

acético 60 %, se añadió dos gotas de fijador y la suspensión se goteó en portaobjetos que se conservados en etanol y en refrigeración; las placas con la suspensión se dejaron secar en una plancheta a 65° C (el shock térmico

permite una mejor dispersión de los cromosomas). Luego fueron teñidas con Giemsa diluido en agua desionizada en proporción 1:20 durante 30 minutos.

Para el registro fotográfico de las placas se usó un microscopio Zeiss con cámara digital Olympus DP72; se seleccionaron los mejores núcleos para fotografiarlos con el objetivo de inmersión APO 40X y el factor 2 del Optovar obteniéndose una amplificación total de 80X. La medición de los cromosomas se hizo con el Software DP2BSW sobre las imágenes capturadas y archivadas.

En lugar de realizar cariotipos convencionales se optó por medir los cromosomas y los datos se organizaron en orden descendente. Para la identificación de la forma cromosómica se sigue las recomendaciones de Levan *et al.*, 1964; nominando a los cromosomas m, sm, st o T de acuerdo a la posición del centrómero en la región medial, submedial, subterminal o en el punto terminal, respectivamente. Esta nomenclatura tiene la siguiente equivalencia con la nomenclatura clásica de cromosomas de *Drosophila*: la forma metacéntrica equivale a "V"; los submetacéntricos y subtelocéntricos a "J o barras" y los telocéntricos a "puntiformes".

Los idiogramas se construyeron normalizando los valores de 20 cariotipos (14 ♂♂, 6 ♀♀) de *D. chorlavi*; 20 (12 ♂♂, 8 ♀♀) de *D. rucux* y 20 (15 ♂♂, 5 ♀♀) de *D. mesophragmatica*. En la descripción se utiliza la Longitud Relativa (LR) definida como el valor porcentual que cada cromosoma tiene en la dotación haploide; por tanto corresponde a la relación entre la longitud de cada cromosoma frente a la suma de longitudes del complemento total.

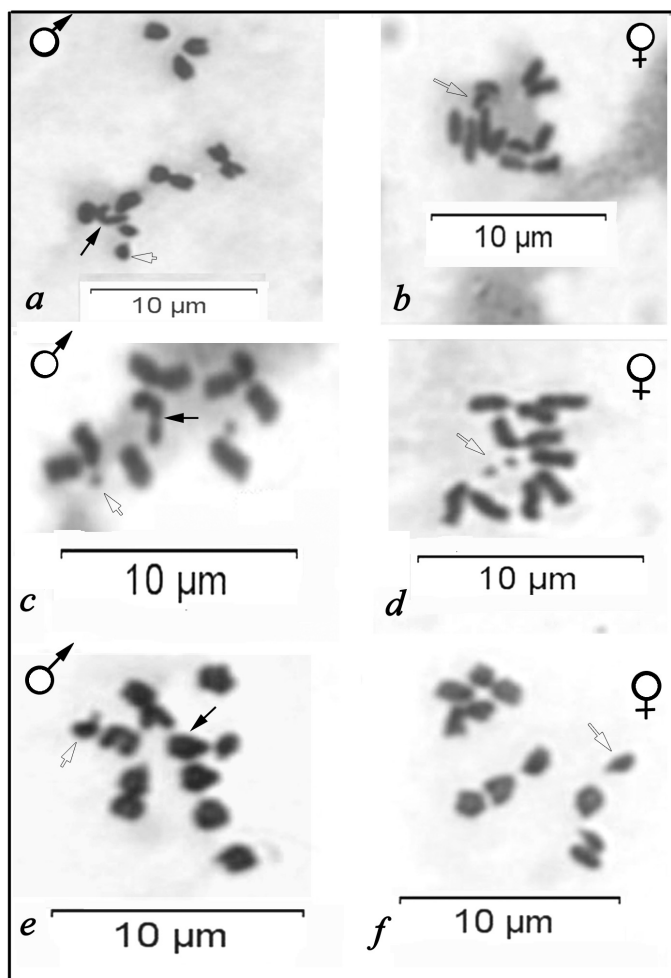
Figura 1. Placas metafásicas de neuroblastos de *Drosophila mesophragmatica* a-b; *D. chorlavi* c-d; *D. rucux* e-f. La flecha sólida indica el cromosoma Y, la flecha clara al microcromosoma.

RESULTADOS

D. mesophragmatica tiene cinco pares cromosómicos: $2n = 10$ (Figura 1a, b); las especies nuevas: *D. chorlavi* y *D. rucux*, coinciden con el cariotipo básico del grupo *D. mesophragmatica* ya que en los conteos cromosómicos de las placas mitóticas se obtuvo un número modal de 10, (87/93 en *D. chorlavi*, 40/49 en *D. rucux*) por lo tanto se establece que estas dos especies ecuatorianas tienen $2n = 10$ (Figura. 1. c, d, e, f).

El tamaño de los cromosomas en *D. mesophragmatica* fluctúa entre 3.92 y 0.65 μm ; en *D. chorlavi* entre 4.74 y 0.50 μm y en *D. rucux* entre 3.43 y 0.81 μm .

En este complemento de cinco pares se identifican claramente los autosomas 4, 5 y el cromosoma sexual Y. El autosoma 4 es el par más grande, de longitud relativa (LR) 15.60 en *D. mesophragmatica*, 16.98 en *D. chorlavi*



y 15.81 en *D. rucux*; tiene el centrómero en la región medial por lo que se le puede identificar como metacéntrico en las tres especies. El más pequeño del complemento es el autosoma 5, claramente heterocromático; en *D. chorlavi* es puntiforme o telocéntrico de LR 2.85; en tanto que en *D. mesophragmatica* y *D. rucux* es submetacéntrico de LR 6.36 y 6.66, respectivamente. El cromosoma Y también se distingue con claridad por su magnitud y heteropicnosis, en orden descendente ocupa el segundo lugar en longitud; en *D. chorlavi* es subteloacéntrico y con un satélite conspicuo en el brazo largo, LR 13.15; al contrario que el de *D. rucux*, cuyo aspecto es semejante al de *D. mesophragmatica*, submetacéntrico y sin satélite visible, LR

11.16 en la primera especie y 12.21 en la segunda especie Figura 2 d.

El cromosoma X así como los pares autosómicos 2 y 3 son indistinguibles entre ellos, tanto en tamaño como en morfología; los tres aparecen como submetacéntricos, los brazos cortos son totalmente heterocromáticos y de LR: 10.31, 8.96, 8.06 en *D. mesophragmatica*; 11.07, 9.77, 8.84 en *D. chorlavi* y 10.12, 9.09, 8.24 en *D. rucux*. En placas excepcionales se pudo reconocer el par heteromórfico, y definir que el cromosoma X ocupa el tercer lugar en orden descendente de longitud (Figura 2 a, b, c, d). Por lo tanto el par XY es heteromórfico: sm-st el Y de mayor longitud.

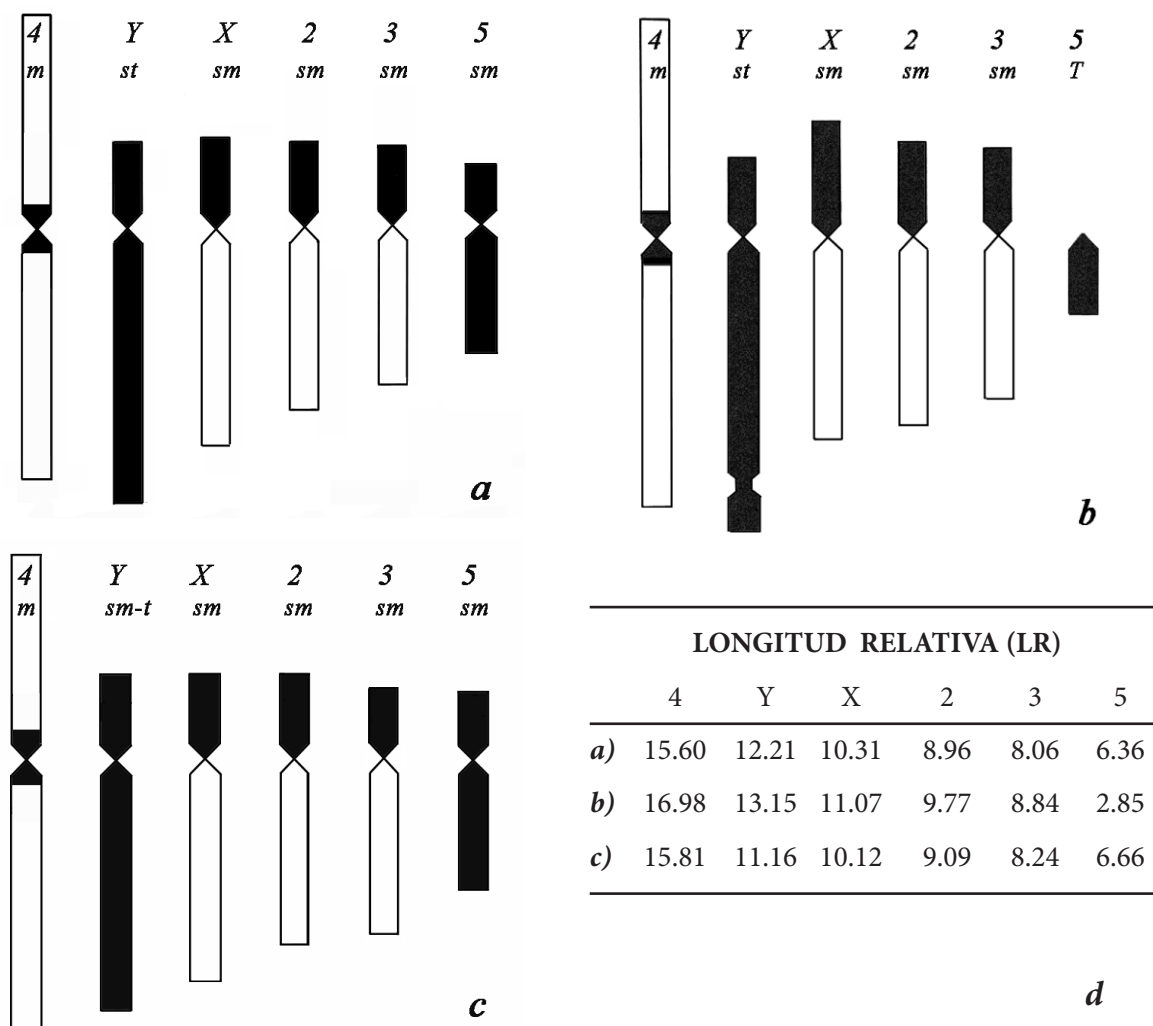


Figura 2. Idiogramas de las tres especies: a) *Drosophila mesophragmatica*; b) *D. chorlavi*; c) *d. rucux* y d) Valores de Longitud Relativa (LR) usados en los idiogramas.

La distribución de heterocromatina es semejante en las tres especies: el autosoma 4 más grande tiene un contenido de 2 % de heterocromatina en la región pericentromérica, los brazos cortos del cromosoma sexual X, así como los de los autosomas 2 y 3, fluctúan entre 2.41 y 3.96 %, en tanto que la totalidad del cromosoma sexual Y así como del pequeño autosoma 5 son completamente heterocromáticos. En los idiogramas de las tres especies (Figura 2) se aprecia claramente las porciones eucromáticas y heterocromáticas; en total, cada una de las tres especies tienen alrededor de un tercio del genoma haploide estructurado en heterocromatina (Tabla 2, Figura 2).

En suma, los cariotipos mitóticos de *D. rucux* y *D. mesophragmatica* son muy parecidos entre sí y diferentes al de *D. chorlavi* (Figura 2 a, b, c).

DISCUSIÓN

La apariencia de las placas metafásicas en las tres especies es semejante a lo reportado por Brncic y Koref-Santibañez, 1957 como característico del grupo *D. mesophragmatica*, es decir comprende 1 par en V, 3 pares de barras y 1 par puntiforme. La forma de pequeña barra del par 5, igualmente ha sido reportada en algunos miembros del grupo como *D. mesophragmatica*, *D. altioplánica* y *D. orkui* por

Tabla 2. Distribución de la heterocromatina en valores porcentuales

Cromosoma	Heterocromatina	<i>Drosophila mesophragmatica</i>	<i>chorlavi</i>	<i>rucux</i>
4	pericentromérica	2.00	2.00	2.00
X	brazo corto	2.98	3.96	2.78
2	brazo corto	2.79	3.31	2.83
3	brazo corto	2.62	3.09	2.41
5	todo	6.36	2.83	6.66
Y	todo	12.21	13.15	11.16
	Total:	28.96	28.24	27.84

Las diferencias más notables entre las nuevas especies ecuatorianas: *D. chorlavi* y *D. rucux* son dos: 1) el tamaño y morfología del autosoma 5, en la primera es telocéntrico y pequeño de LR 2.85 % mientras que en la segunda es submetacéntrico y más grande de LR 6.66 %. 2) La morfología del cromosoma Y, en la primera es submetacéntrico y con una constricción secundaria bien definida en el brazo largo; en tanto que en *D. rucux* es submetacéntrico (el índice centromérico de 25.5 corresponde a la cifra límite usada para definir la morfología como submetacéntrico o subtelocéntrico) y no se visualiza ninguna constricción secundaria.

Brncic *et al.*, 1971, de modo que al compartir el carácter $2n = 10$ las especies ecuatorianas *D. chorlavi* y *D. rucux* están relacionadas con los otros miembros del grupo, por lo tanto acertadamente incluidas en el grupo *D. mesophragmatica* (Céspedes y Rafael, 2012).

Respecto a la morfología y tamaño del cromosoma 5 diferente en *D. chorlavi* y *D. rucux*, se ve la misma relación registrada por Brncic *et al.*, 1971 entre las especies del subgrupo *D. mesophragmatica* y las del subgrupo *D. pavani*; diferencia que les llevó a proponer la reunión de las especies que tienen el cromosoma 5 “alargado” y que son: *D. mesophragmatica*, *D. gasici*, *D. brncici* en una unidad filética; separadas de otra unidad portadora del 5 puntiforme

y que corresponde a las especies: *D. gaucha*, *D. pavani* y *D. viracochi*. En esta línea deductiva: *D. chorlavi* podría ubicarse como un miembro más tanto del subgrupo *gaucha* como del subgrupo *viracochi* (según Mota, 2008) y *D. rucux* dentro del subgrupo *mesophragmatica*.

Como se ha señalado antes, la cariología *beta* ha de ser complementada con la cariología *zeta* para obtener evidencias que establezcan los nexos de parentesco, en el caso de las nuevas especies falta este complemento aun cuando se cuenta con datos preliminares: el cariotipo de *D. chorlavi* fue reportado (Romero, 2010) como estructuralmente similar a los de las especies del grupo *D. mesophragmatica*, es decir que posee 5 filamentos largos: X, II, III, IV-R, IV-L, con telómeros bien definidos y extremos basales que coalescen en un cromocentro heteroplicnótico que incluye al pequeño V; así mismo registró lazos de inversión en los cromosomas X, II, IV-R, IV-L, y además un segmento duplicado, que comprende las secciones 60 a la 75 del cromosoma IV R; sin embargo tales reestructuras cromosómicas no se han observado en las preparaciones de Salas, 2011 quien construyó el mapa de los cromosomas politénicos de *D. chorlavi* en la que se muestra una secuencia de bandas similar a la de *D. pavani*; con lo dicho, se podría asumir que esta especie puede ser ubicada en el subgrupo *D. gaucha*. No obstante a Céspedes y Rafael, 2012 les llama la atención el aspecto “atigrado” de *D. chorlavi* “que la acerca a las especies del grupo *repleta*”, así como la convergencia de las cerdas escutelares, carácter considerado plesiomórfico; en consecuencia parecería apropiada la integración que Céspedes y Rafael hacen de *D. chorlavi* dentro del subgrupo *viracochi*. Es claro que la subagrupación ha de continuar siendo preliminar hasta contar con la información que proporcionen los estudios comparativos de cromosomas politénicos de *D. viracochi* y de *D. shyri*.

Con respecto a la posición de *D. rucux*, con el sustento de que la convergencia citológica es extremadamente improbable en dos

linajes, parece apropiado considerarla en el subgrupo *mesophragmatica*, junto a las especies que poseen el cromosoma 5 alargado.

La subagrupación realizada por Brncic *et al.*, 1971 así como la de Mota *et al.*, 2008 coinciden y refuerzan la idea de usar la comparación de cantidad de heterocromatina en la distinción de linajes. La importancia de la cantidad de heterocromatina parece ser su relación con el ADN satélite, así como con los elementos transponibles y el papel que juega en la especiación; así lo establece la hipótesis de Korochkiri, 1983 quien supone que las diferencias en DNA satélite dependen de la afinidad del genoma con los “genes saltarines” y que estos genes pueden determinar la redistribución de heterocromatina provocando cambios en los procesos moleculares y morfogénicos durante el desarrollo, por lo tanto: la afinidad del genoma por genes saltarines específicos puede cambiar por una simple mutación la cual correspondería a una “gran mutación”, que podría determinar el origen de una nueva especie por un salto y no por la acumulación de pequeños cambios, como lo propuso Goldschmidt (citado por Gould, 1980). Esta hipótesis se complementa con el trabajo de Pimpinelli *et al.*, 1993 y muchos otros en la misma línea, que muestran a los elementos transponibles como componentes estructurales de la heterocromatina.

CONCLUSIONES

- Las especies ecuatorianas *D. chorlavi* y *D. rucux* comparten el número cromosómico $2n = 10$ con las especies que conforman el grupo de especies *D. mesophragmatica*.
- *D. chorlavi* y *D. rucux* difieren entre ellas en el tamaño y morfología del cromosoma 5; esta característica se considera como indicio para posicionar a *D. chorlavi* en uno de los subgrupos que tienen el autosoma 5 puntiforme (*D. gaucha* o *D. viracochi*) y a *D. rucux* en el subgrupo *D. mesophragmatica*.

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por financiar los proyectos: “Cariología Z de nuevas especies del subgrupo *inca*” E 29179 y “Cariología Z de nuevas especies de *Drosophila*” G19115. A la Dra. Violeta Rafael por la provisión de las muestras de estas especies así como por sus entusiastas comentarios y por fomentar la interdisciplinariedad. Al Dr. Clifford Keil por sus valiosas acotaciones al manuscrito. A la Dra. Laura Arcos ex Decana de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por su permanente apoyo a la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brcic D y Koref-Santibañez S. 1957. The *Mesophragmatica* Group of Species of *Drosophila*. *Evolution*, **11**:300–310.
- Brcic D, Nair PS y Wheeler MR. 1971. Cytotaxonomic Relationships Within the *mesophragmatica* Species Group of *Drosophila*. STUDIES IN GENETICS VI. University of Texas Publications, 7103.
- Céspedes D y Rafael V. 2012. Cuatro especies nuevas del grupo de especies *Drosophila mesophragmatica* (Diptera, Drosophilidae) en los Andes ecuatorianos. *Iheringia, Série. Zoologia*, **102**(1).
- Gould SJ. 1983. El regreso del monstruo esperanzado. En GOULD, S. J. El Pulgar del Panda: 197–205. Hermann Blume Ediciones. Primera edición española Fuenlabrada, Madrid.
- Koref-Santibañez S. 1963. Courtship and Sexual Isolation in Five Species of the *Mesophragmatica* Group of the Genus *Drosophila*. *Evolution*, **17**(1): 99–106.
- Korochkiri LI. 1983. Institute of Developmental Biology, Moscow, USSR. The hypothesis about the role of heterochromatin in the evolution of *Drosophila* of the *virilis* group. *DIS*, **59**:70.
- Levan A, Fredga K y Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, **52**(2).
- Mafla AB. 2008. Cariotipos metafásicos de *Drosophila inca* y *D. yangana*, subgrupo *inca*, grupo *repleta*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, **XIX**(1 y 2).
- Mota NR, Robe LJ, Vera LS, Budnik VM y Loreto E. 2008. Phylogeny of the *Drosophila mesophragmatica* group (Diptera, Drosophilidae): An Example of Andean Evolution. *Zoological Science*, **25**: 526–532.
- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, Marchetti E, Caizzi R, Caggese C y Gatti M. 1993. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**:3804–3808.
- Romero G. 2010. Informe de avance del Proyecto “Cariología Z de nuevas especies del subgrupo *inca*” E 29179.
- Salas ISA. 2011. Caracterización de los cromosomas politénicos de una nueva especie de *Drosophila* perteneciente al grupo *mesophragmatica*. *Tesis de Licenciatura*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Vela D y Rafael V. 2004. Three new Andean species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) of the *mesophragmatica* group. *Iheringia Série Zoologia*, **94**(3):295–299.
- White MJD. 1978. Modes of Speciation. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Ward BL y Heed WB. 1970. Chromosome Phylogeny of *Drosophila packea* and Related Species. *Journal of Heredity*, **61**(6): 248–258.