

ESTUDIO DE ALGUNOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS EN CROMOSOMAS POLITÉNICOS

Por: Gabriel Bedoya *
Luis F. Barrera.

INTRODUCCION

Los cromosomas son estructuras localizadas dentro del núcleo en los organismos eucarióticos. Ellos contienen la información necesaria para el funcionamiento celular, así como de la morfogénesis y la reproducción de los organismos. Los cambios del material genético contenido en ellos son la causa de la variación, selección y mutación.

Los cromosomas están constituidos por DNA (ácido desoxirribonucleico), molécula que guarda la información genética y por proteínas básicas llamadas histonas, sustancias ambas, permanentes. Los cromosomas también poseen cantidades menores de RNA (ácido ribonucleico) y proteínas de carácter ácido, pero a diferencia del DNA y las histonas, se localizan en lugares específicos y comparativamente, por cortos períodos de tiempo.

La morfología de los cromosomas puede variar, en general, con los diferentes tipos de organismos, con diferentes tipos de células (ej. politénicos en glándula salival, plumosos en ovocitos), en células de un mismo organismo (metacéntricos, acrocéntricos, etc.) y con el estado fisiológico de la célula (cromosomas interfásicos y metafásicos).

El tipo específico a considerar en este laboratorio serán los cromosomas politénicos.

En solamente pocos casos es posible ver y estudiar los cromosomas en el núcleo en interfase, período en el cual se realizan la gran mayoría de las funciones cromosómicas.

Para este objetivo se utilizan los cromosomas gigantes encontrados principalmente en larvas de dípteros y en oocitos de algunos vertebrados del género *Triturus* (salamandras).

Los cromosomas politénicos se encuentran en varios tipos de organismos tales como dípteros del género *Chironomus* (Beermann, 1952; Grossbach, 1977), *Rhynchosclara* (Pavan y Breuer, 1952; Ramirez, 1979), *Simulium* (Rothfels y Freeman, 1977), *Drosophila* (Becker, 1959; Ashburner, 1978), *Telmatoscopus* (Amabis y Simoes, 1972; Palau, 1980; Barrera, 1981), entre otros; en protozoarios ciliados (Ammerman, 1970), colémbolos (Cassagnau, 1968), y plantas (Nagl, 1969 a), en diferentes tejidos.

Los cromosomas politénicos con que trataremos aquí se encuentran en glándula salival. La función de las células de la glándula salival es sintetizar proteínas estructurales específicas las cuales son transportadas a través de la membrana celular y almacenadas en el lumen de la glándula (Grossbach, 1977). Además, los órganos en los cuales se encuentran estos cromosomas crecen no por aumento en el número de células, sino por el aumento en el tamaño de éstas; es decir, las células que contienen los cromosomas politénicos no se dividen, sucediéndose ciclos S-G¹, manteniendo por tanto, un permanente estado interfásico (1).

Las células somáticas de un organismo poseen un número 2n de cromosomas, es decir, un juego par de cromosomas homólogos, a excepción de las células sexuales, el espermatozoide y el óvulo, las cuales tienen la mitad del número de cromosomas (n). Las células que contienen los cromosomas

* Profesores, Depto. de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(1) Un ciclo celular consta de los siguientes períodos: G₁-S - G₂-M.

G₁: Período en el cual la célula tiene actividad metabólica normal y su cantidad de material genético aún no se ha duplicado.

S: Período en el cual la célula duplica su material genético, preparándose de esta forma para la división.

G₂: Período de preparación para entrar en la mitosis. Durante este lapso comienza la compactación de la cromatina.

M: División celular con las etapas conocidas de profase, metase, anafase y telofase.

politénicos se observan con un número haploide (n) de cromosomas. Esto se debe a que los cromosomas homólogos se aparean (apareamiento somático), y empiezan a producir copias de sí mismos (replicación), siendo el número final de copias producidas una característica definida de la especie.

El hecho de replicarse en gran número de veces sin separación de los cromosomas homólogos, permite el aumento tanto en diámetro como en longitud, alcanzando tamaños no encontrados por ningún otro tipo de cromosomas (a excepción de los cromosomas plumosos), y denominándose por esto cromosomas gigantes (Figura 1).

La característica más distintiva de los cromosomas politénicos es su patrón de bandas. Este patrón puede ser descrito citológicamente como una secuencia repetitiva y aperiódica de bandas de alta intensidad de coloración y concentración de masa (bandas o cromómeros) conectadas por secciones con muy poca concentración de masa y coloración (interbandas o intercromómeros) (Figura 2). Las bandas pueden variar en grosor y forma (lineadas, punteadas, de forma regular) (Fig.2), lo cual puede ser un reflejo de la cantidad de DNA y de la estructura cromosómica.

A veces una banda se puede observar como gruesa y redondeada, correspondiendo generalmente al centrómero; sin embargo, ésta sólo puede ser verificado por técnicas especiales de tinción, principalmente bandas C, es decir, centroméricas (Fig.3). Hay que resaltar que el patrón de bandas es otra característica definida de la especie, siendo muy semejante en los tejidos celulares que presentan cromosomas politénicos dentro de un mismo organismo.

Desde el punto de vista funcional, los cromosomas politénicos constituyen uno de los sistemas más importantes para el estudio de la expresión de los genes y de la diferenciación celular. Esto se debe a cambios reversibles en la estructura cromosómica en forma de ensanchamientos, específicamente localizados en el cromosoma y presentes en un estadio característico del desarrollo larval, a los cuales se les ha llamado "puff". Así, cada cromosoma, y por extensión cada genoma, poseen un conjunto específico de "puffs" durante un momento definido de la vida larval al cual se le ha denominado Patrón de "Puff".

Los "puff" son los lugares del cromosoma donde se sintetiza el RNA, el cual será posteriormente transformado en proteínas, por medio del proceso de translación. Esta actividad del "puff" fue demostrada por Pelling (1964) por medio de la técnica de autorradiografía, tanto con TH^3 (timidina tritiada) como con UH^3 (uridina tritiada).

El ensanchamiento notado citológicamente es producido por el desempaquetamiento (desespiralización) del DNA contenido en una banda (Fig.4), haciendo a éste accesible a las moléculas constructoras del RNA (RNA polimerasa). Una vez concluido el proceso de transcripción, el DNA se empaqueta de nuevo, pudiendo volver a desespiralizarse en otro momento del desarrollo, ya sea por las actividades metabólicas normales de la célula, o, por cambios experimentalmente inducidos (con la hormona ecdysona, choques de calor y otros).

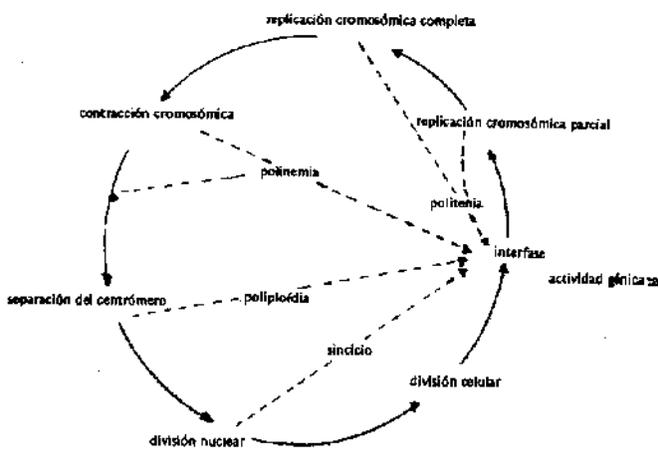


Figura 1. Esquema del proceso que puede seguir una célula, ya sea para dar cromosomas *politénicos*, u otros procesos por medio de los cuales se aumenta la cantidad de material cromosómico dentro de la membrana celular.



Figura 2. Parte del cromosoma IV de *Telmatoscopus* sp. mostrando varias bandas notorias (No.1, color oscuro), e interbandas (No.2, color claro), así como también otros tipos de bandas señalados por las flechas.

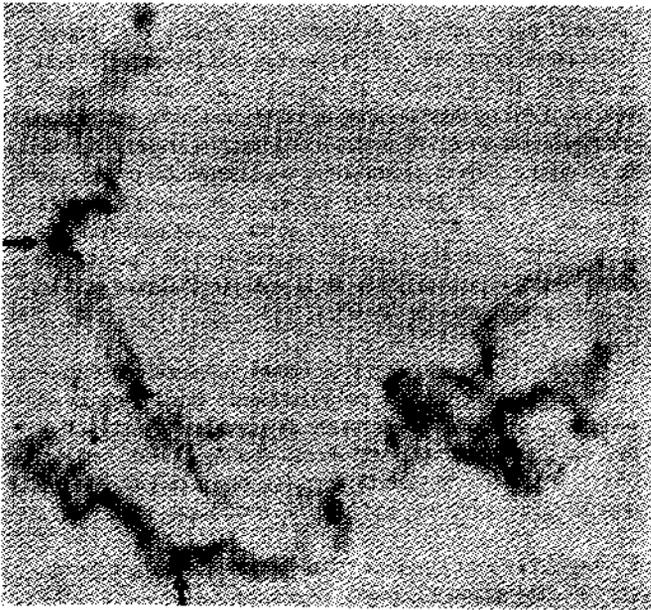


Figura 3. Cromosomas politénicos teñidos con la técnica de tinción para bandas c., en los cuales los puntos más oscuros (flechas) corresponden a la región centromérica.

Muchos investigadores desde 1952 (Beer mann, 1952; Breuer y Pavan, 1952; Becker, 1959; Ashburner, 1967) han demostrado que el patrón de "puff" varía tanto en una misma célula, de un estadio larval a otro, como en células diferentes (Guevara, 1971). Esta base ha servido para la demostración de que las células que tengan diferentes actividades tienen diferentes patrones de "puff", y que por lo tanto, la acción diferencial de los genes en el tiempo y el espacio (ubicación de la célula en el organismo), conduce a la célula a la diferenciación celular.

El estudio sobre los cromosomas politénicos, ha demostrado, igualmente, ciertas relaciones evolutivas. Así, el tamaño del cromosoma como reflejo de la cantidad de DNA ha sido explicado como un mecanismo desarrollado por la selección natural para obtener durante un período determinado de tiempo grandes cantidades de un producto celular específico (Pavan y Da Cunha, 1969). El tiempo de actividad del cromosoma politénico es una función importante puesto que generalmente este tipo de cromosomas sólo existen durante cierto período de tiempo en la vida del individuo. Por ejemplo, durante la vida larval y parte del período pupal pero no en el estado adulto (en glándula salival). También el patrón de bandas ha servido para estudiar las relaciones evolutivas entre organismos relacionados filogenéticamente, lográndose construir, por comparación, árboles filogenéticos:

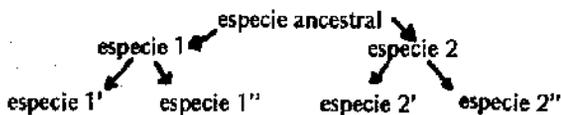


Figura 4. Parte de un cromosoma politénico de *Telmatoscopus* sp., en el cual se muestran 2 puffs vecinos (flechas).

Otros fenómenos que pueden presentar tal tipo de cromosomas son:

- 1) **Bandas heterocigóticas:** en sitios correspondientes del cromosoma una banda es más gruesa que otra. Esto parece deberse a duplicaciones del material genético en un homólogo pero no en el otro (Keyl, 1964) (Fig.5).
- 2) **Dispariamientos o asinapsis:** el cromosoma se abre permitiendo notar ambos homólogos. Este fenómeno puede ser producido por duplicaciones de bandas y/o inversiones (en un homólogo la secuencia sería ABCD, mientras en el otro sería DCBA, para un segmento dado del cromosoma) (Fig.6).
- 3) **Puffs heterocigóticos:** Se detectan porque un puff homólogo aparece más grande que el otro puff. Se cree que la causa se debería a una mutación genética por medio de la cual solo un alelo es funcional (Fig. 7).
- 4) **Ligaciones:** no aparecen en todos los géneros siendo muy frecuentes en *Telmatoscopus* y *Rhynchosciara*. Se ven como hilos que unen 2 regiones de un mismo cromosoma (ligaciones intracromosómicas) o, de dos cromosomas (ligaciones intercromosómicas). Algunos investigadores postulan que en los lugares ligados se encuentra material genético afín (Fig.8).
- 5) **Cromocentro:** en algunos géneros como *Drosophila* después de las preparaciones se observa que los cromosomas se unen por los centrómeros, y a esta estructura se le da el nombre de cromocentro (Fig.9).



Figura 5.
La fotografía muestra el complemento politénico de glándula salival de *Telmatoscopus* sp. La flecha muestra el cromosoma IV con una banda heterocigótica.



Figura 6.
Las flechas señalan 2 disparamientos (asínapsis) muy notables en un cromosoma politénico.

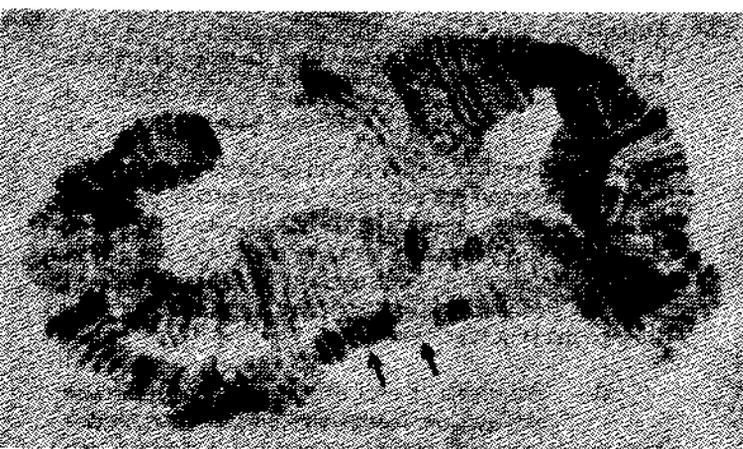


Figura 7.
Las flechas señalan 2 "puffs" heterocigóticos. Note que el cromosoma homólogo muestra ensanchamientos (puffs) mucho mayores.

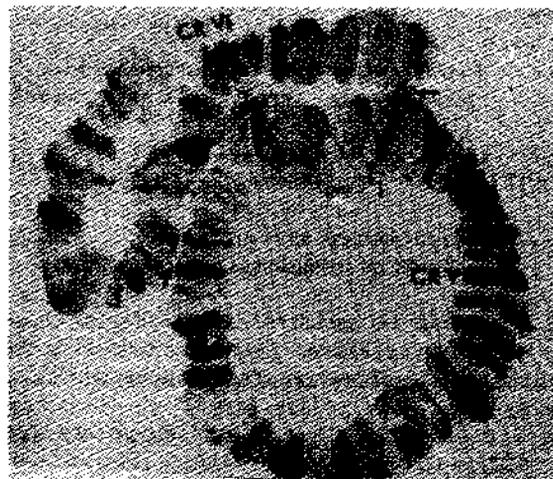


Figura 8.
Los lugares señalados por las flechas muestran ligaciones intracromosómicas (i) e intercromosómicas entre los cromosomas (cr) V y VI de *Telmatoscopus* sp.

6) **Nucléolo:** se observan sólo en ciertos estadios larvales, sobre uno o varios cromosomas, como estructuras globosas. Los nucléolos están formados por ribonucleoproteínas (proteínas asociadas al RNA) y, formadoras de los ribosomas. La parte del cromosoma a partir del cual se origina el nucléolo toma en nombre de región organizadora del nucléolo (RON) (Fig. 10).

MATERIALES

- Material vivo:** Larvas de dípteros tales como *Rhynchosciara*, *Telmatoscopus*, *Simulium*, *Chironomus*, *Drosophila*, *Musca*, *Anastrepha*.
- Equipo de disección:**
Pinzas de relojero alfileres entomológicos.

- Materiales de Laboratorio:**
Cubre objetos
porta-objetos
Pipetas Pasteur
Fracos pequeños
Acido acético
Acido Láctico
Agua destilada
Cloruro de sodio (NaCl)
Orceína
Estereo-microscopio o lupas
Microscopio compuesto
Siliclad (Adams)
Gelatina (Merck)
Sulfato de aluminio y potasio
Toallas de papel
Esmalte de uñas transparente.

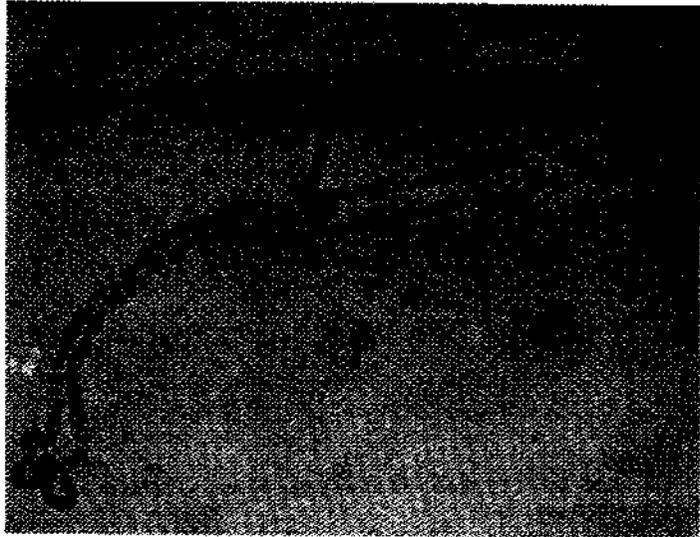


Figura 9.
La región indicada por la flecha muestra el cromocentro.



Figura 10.
En la foto se señala el nucléolo (zona clara). La región del cromosoma que lo origina es la región organizadora del nucléolo (RON).

OBJETIVOS

1. Adquirir destreza en el procedimiento para hacer preparaciones de cromosomas politénicos.
2. Observar las características morfológicas de un cromosoma politénico (bandas, interbandas, "puffs", cromocentro, ligaciones, nucléolo, dispariamientos).
3. Relacionar las estructuras morfológicas con su función.
4. Comparar la morfología de cromosomas politénicos en diferentes dípteros.
5. Buscar las aplicaciones que tiene el estudio de cromosomas politénicos en cuanto a estructura, función cromosómica y diferenciación celular.
6. Utilizar un sistema para el estudio cromosómico que no exige equipos sofisticados, material de fácil adquisición y poco costo.

METODOS

1. Consecución del Material Vivo.

A. *Telmatoxenus*: Los adultos se consiguen en los baños, adheridos a sus paredes. Son moscas de color oscuro, pequeñas y triangulares, poco voladoras. Generalmente la hembra más grande que el macho. Una vez colectados, se depositan en cajas plásticas provistas de un medio alimenticio.

El medio alimenticio consta de tres partes de hojas de batata dulce (*Ipomoea*) por una parte de concentrado para aves, un litro de agua y un poco de tierra. Las hojas de batata se ponen a secar, y una vez secas se procede a elaborar el alimento. Se espera aproximadamente 20 días y se escogen larvas con las siguientes características: color amarillo, grandes y gordas (Fig.11).

B. *Drosophila* (mosca del vinagre): Los adultos se consiguen en lugares donde haya frutas en descomposición. Son de tamaño pequeño. Las hembras son más grandes que los machos. Los adultos recogidos se colocan en un medio que puede ser macerado de banano, dentro de un frasco cubierto con un tapón de gasa. Se espera aproximadamente 15 días y se escogen las larvas más gordas, generalmente de color blanquecino (Fig.12).

C. *Rhynchosciara* (gusanos de invierno): Generalmente se encuentran las larvas entre 1700-2000 m de altura, en lugares húmedos cerca a plataneras y/o matas de chilco dulce. Se busca bajo material vegetal en descomposición. Siempre se encuentran en colonias de más de 60 larvas, grandes y de color marrón. Se colocan en una caja plástica agregando parte del material donde se encontraron. Duran varios días en el laboratorio, tiempo en el que se realizan las disecciones. (Fig.13).

D. *Simulium* (jején). Las hembras pican al hombre y al ganado. Son muy comunes en los ríos, quebradas y arroyuelos. Las larvas se pueden localizar adheridas a piedras y material vegetal en sitios donde la corriente es fuerte, ej., pequeñas cascadas. Su color es oscuro y le dan a las piedras un aspecto "lamoso". Estas larvas se colocan en



Figura 11.
Esquema de la larva del género *Telmatoscopus*.

un recipiente con agua al cual se le suministra oxígeno con un pequeño compresor de aire (como el de las peceras). De esta manera duran de 2-4 días (Fig.14).

E. *Chironomus*: Las larvas se localizan en el fondo a orillas de lagunas, estanques y ríos, sobre todo cuando el fondo es arenoso, adheridas a piedras o material vegetal en descomposición. Presentan un color rojo, por lo cual se confunden con *Tubifex* (anélido). Sin embargo, las larvas de *Chironomus* son más móviles y se desplazan en forma pulsante (Fig. 15).

F. *Anastrepha* (gusano de las frutas): Para obtener las larvas basta con partir una fruta bien madura, comúnmente de guayaba, mango, zapote, aguacate, etc.. Son larvas grandes y blancas. Se mantienen en el laboratorio con el macerado de esas frutas. (Fig.16).



Figura 13.
Esquema de la larva del género *Rhynchasciara*.



Figura 14.
Esquema de la larva del género *Simulium*.

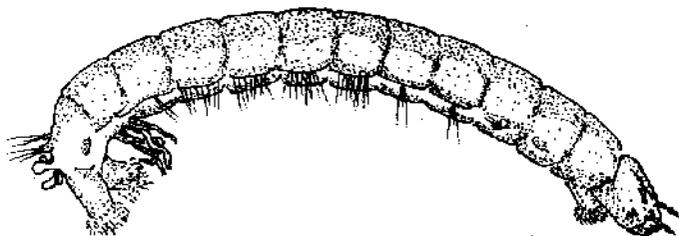


Figura 15.
Esquema de la larva del género *Chironomus*.



Figura 12.
Esquema de la larva del género *Drasophila*.



Figura 16.
Esquema de la larva del género *Anastrepha*.

II. Preparación de Porta-Objetos y Cubre-Objetos.

A. Porta Objetos: Se gelatinizan. La gelatina se elabora de la siguiente manera:

gelatina (Merck)	5 gr.
sulfato de potasio y aluminio $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0,5 gr.
H_2O destilada	1 litro

Se vierte el agua y se le agrega la gelatina. Cuando esté hirviendo se le agrega el sulfato. El recipiente se retira del calor, con toallas de papel se retira toda la espuma de la superficie del líquido. Los porta-objetos se introducen uno a uno con una pinza y se dejan sumergidos aproximadamente 5 seg. Se dejan secar al aire, protegidos del polvo. La gelatina debe de estar siempre caliente y las láminas limpias. El objetivo de la gelatinización es lograr una mayor adhesión del material biológico por medio del aumento de la tensión superficial. Para verificar una buena gelatinización, se escoge un porta-objetos seco, se agrega una gota de agua y se inclina. La gota no resbala.

B. Siliconización: Se realiza con Siliclad (Adams).

Este proceso se utiliza con los cubre-objetos. Se prepara al 50/o en volumen. Las laminillas se sumergen por 10 minutos en la solución, se retiran y se secan al aire. Para comprobar la siliconización se procede como en el caso anterior.

Su objetivo es lograr que las gotas agregadas a la laminilla (fijador, targa, colorante) no se esparzan por la laminilla.

Nota: En caso de que no se disponga de la Gelatina y el Siliclad se puede trabajar sin estos tratamientos, pero los preparados deben observarse más rápidamente, ya que no duran lo mismo que con el pretratamiento.

III. Preparación de Reactivos:

A. Solución Salina:

1. 0,80/o de NaCl en agua destilada, o
2. 2,20/o de citrato de sodio en agua destilada.

B. Fijador.

1. Carnoy: etanol-ácido acético 3:1, o
2. Acido acético al 450/o en agua destilada.

C. Solución Targa: Solución de ácido acético, ácido láctico y agua destilada en proporción 9:5:6 respectivamente. El ácido láctico debe ser preparado con anterioridad al 850/o en agua destilada.

D. Colorante: Aceto-orcefna.

Orcefna	0,5 gr.
ac. acético	45 ml.
H ₂ O destilada	55 ml.

Agregue 0,5 gr. de orcefna a los 45 ml. de ácido acético, revuelva por 30 min., añada los 55 ml. de agua destilada y caliente por media hora mientras revuelve; deja reposar 24 horas, filtre (con papel filtro), y filtre de nuevo antes de usar.

IV. Disección y Extracción de Glándulas Salivales.

A. Se coloca la larva en una gota grande de solución salina sobre un porta-objetos gelatinizado. Utilizando el estereomicroscopio (lupa) se localiza la cabeza (generalmente de color marrón o negra y quitinizada).

B. Se sujeta la larva en la mitad de su longitud con las pinzas de relojero y con el alfiler entomológico situado en la región dorsal y posterior de la cabeza, se procede a separarla del cuerpo (Fig.17).

C. Las glándulas salivales aparecen adheridas a la cabeza por un ducto largo. Son de forma alargada y transparente, un par. Son muy grandes en *Simulium* y *Rhynchosclara* y pequeñas en *Chironomus* y *Telmatoctopus*. Las glándulas se cortan con el alfiler por el ducto, cerca a la inserción de éste con los ganglios cerebrales (Fig.18).

V. Preparación de Láminas.

A. Las glándulas extraídas se pasan a un cubre-objetos siliconizado, al cual anteriormente se le ha agregado una gota del fijador escogido, por medio de una pipeta Pasteur. Se deja reposar por 1-5 minutos.

B. Con otra pipeta Pasteur se agrega una gota de solución Targa y se espera de 1-10 minutos.

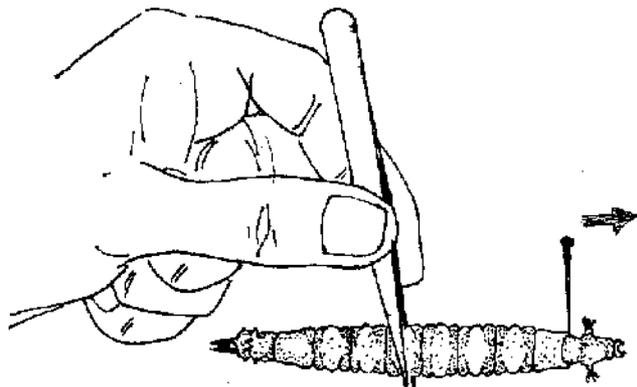


Figura 17.

Se muestra la forma como debe tomarse la larva con la pinza y la flecha indica la dirección en que debe moverse el alfiler para extraer la cabeza.

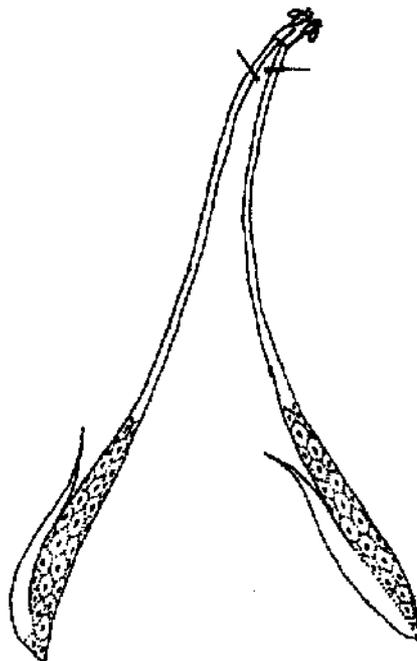


Figura 18.

Dibujo de las glándulas salivales de díptero después de la extracción. Las barras (arriba) indican el lugar de corte.

C. Acto seguido se deposita una gota del colorante (con otra pipeta Pasteur) y se deja por espacio de 5 minutos.

D. Se coloca el porta objeto sobre el cubre-objeto. Se gira de tal manera que quede el cubre sobre el porta-objeto (Figs. 19 y 20).

E. Squash: Se dobla una toalla de papel por su centro, se introduce la lámina dentro de ella hasta el doblez y se procede a masajearla de un lado a otro con la uña del pulgar, suavemente, por 30-60 segundos (Fig.21).

F. Se mira al microscopio. Si la preparación está lo suficientemente buena, agregue una capa de esmalte transparente alrededor de la laminilla (Fig.22).

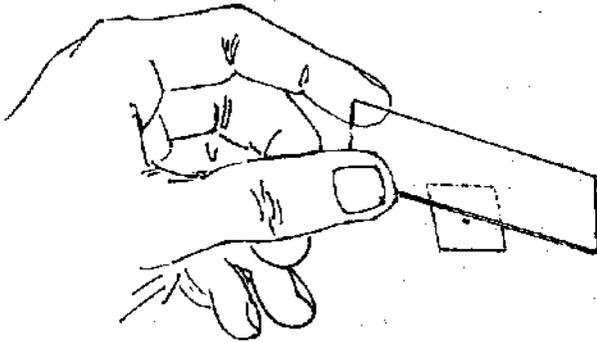


Figura 19.
Se indica la forma de colocar el porta-objetos sobre el cubre-objetos.

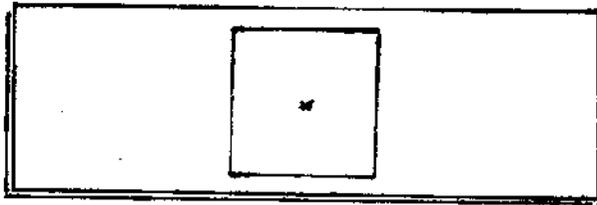


Figura 20.
Muestra al cubre-objetos sobre el porta-objetos después de haber sido girado.

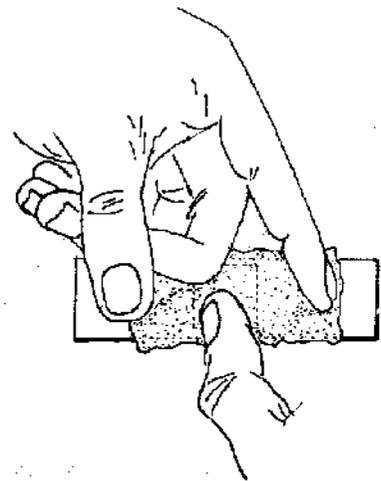


Figura 21.
Se indica la forma en que se debe realizar el "squash".

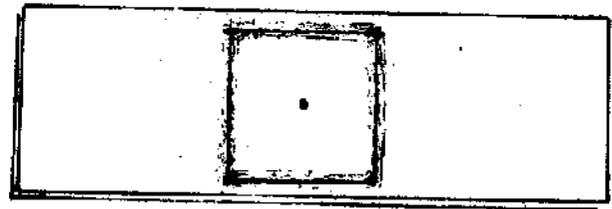


Figura 22.
La capa de esmalte transparente (en negro) debe colocarse alrededor de la laminilla.

CONCLUSIONES

El profesor organizará con los estudiantes grupos de discusión acerca de los siguientes aspectos:

- 1) De acuerdo a los resultados, qué pasos son críticos en la metodología?
- 2) De qué manera se puede emplear los cromosomas politénicos en la citotaxonomía y en la evolución?
- 3) Qué aplicaciones prácticas en cuanto al control de ciertos dípteros perjudiciales para el hombre en la economía o en la salud (el Profesor suministrará ejemplos), tendrá el estudio de los cromosomas politénicos?
- 4) Cómo podría enfocarse un pequeño trabajo de investigación en cuanto a la estructura y función de los cromosomas politénicos?

BIBLIOGRAFIA

- Amabis, J. M. and L. C. G. Simoes: Chromosome studies in a specie of *Telmatoscopus* sp. *Caryologia*, vol. 25, no.2: 199-210. (1972).
- Ammerman, D. Cytologische und genetische Untersuchungen andem Ciliaten *Stylonchia mytilus* Ehrenberg. *Arch. Protistenk.* 108, 109-152, (1964).
- Ashburner, M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* (Berl.) 22, 398-428. (1967).
- Ashburner, M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. VIII. A revision of the puffing patterns of the proximal region of chromosoma arm 2L of *D. melanogaster*. *Chromosoma* (Berl.) 68,195-203. (1978).
- Barrera, Luis F. Patrón de puff en cromosomas politénicos de glándula salival de *Telmatoscopus* sp. durante 3 estadios larvales. Tesis para obtener el título de Biólogo. Dpto. de Biología. Universidad de Antioquia, 72 pp. 1981.
- Becker, H. J. The puffs of the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. I. Observations on the behavior of the standard puffs of a normal stock, and of two mutants, Giant and Lethal-Giant. *Chromosoma* 5: 139-198. (1952).
- Beermann, W. Chromomeronkonstanz in spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* 5:139-198. (1952).
- Breuer, M. E., and C. Pavan. Gens na Diferenciação, *Cienc. e Cult.* 3(4):115, (1952).
- Cassagnau, P. Sur la structure des chromosomes salivaires de *Bllobella masoudi* (Collembola: Neanuridae). *Chromosoma*, 24: 42-58, 1969 a.
- Guevara, M. Estudio citológico da fisiología e diferenciação cromossomica durante e desenvolvimiento larval de *Rhynchosciara angeiae*. Tese de Doutorado. Dpto. de Biologia. Instituto de Biociencias de Universidad de Sao Paulo, 127 pp. 1971.
- Grossbach, U. The salivary gland of *Chironomus* (Diptera): A model system for the study of cell differentiation. *Results and Problems in Cell Differentiation*, Vol. 8, 1977.
- Keyl, H. G. Verdopplung des DNS-Gehalts Kleiner Chromosomenabschnitte als Faktor der Evolution. *Naturwissenschaften* 51, 46-47 (1964).
- Nagl, W. Banded polytene chromosomes in the legume *Phaseolus vulgaris*. *Nature*, 221:70-71, 1969a.
- Palau, M. Estudio de las características de los cromosomas politénicos en glándulas salivales de *Telmatoscopus* sp. Tesis para obtener el Grado en Biología. Depto. de Biología, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad de Antioquia, 40 pp. 1980.
- Pavan, C., and A. B. Da Cunha. Chromosomal activities in *Rhynchosciara* and other Sclariidae. *Ann. Rev. Genet.* 3: 425-450, 1969b.
- Pelling, C. Ribonukleinsäure-Synthese der Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an *Chironomus tentans*. *Chromosoma*, 15: 71-122, 1964.
- Ramirez, J. Estudio de los cromosomas politénicos en glándula salival (S1) de *Rhynchosciara* sp. del Departamento de Antioquia. Tesis para obtener el Grado de Biología. Depto. de Biología, Universidad de Antioquia, 1979.
- Rothfels, K. H., and D. M. Freeman. The salivary gland chromosomes of seven species of *Prosimullum* (Diptera: Simuliidae) in the mixtum (III L-1) group. *Canadian Jour. of Zool.* Vol. 55(3): 482-507. 1977.