



CITOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA TAXONÓMICA EN PECES CYTOGENETICS AS A TAXONOMIC TOOL IN FISH

MAURO NIRCHIO^{1,2}, CLAUDIO OLIVEIRA³

¹Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Isla de Margarita, Venezuela, ²Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Ecuador, ³Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, Botucatu, São Paulo, Brasil.
E-mail: mauro.nirchio@gmail.com

RESUMEN

Se presenta una descripción general de las técnicas básicas y moleculares más comúnmente empleadas para el estudio de los cromosomas en los peces, con ejemplos que demuestran la utilidad de la citogenética para resolver problemas de tipo taxonómico, particularmente cuando las características merísticas o morfométricas no permiten una clara diferenciación entre especies.

PALABRAS CLAVE: Cromosomas, cariotipo, morfometría.

ABSTRACT

This document presents a general overview on the basic and molecular techniques more commonly employed for the study of chromosomes in fishes, with examples that demonstrate the usefulness of cytogenetics to resolve taxonomic problems, particularly when meristic or morphometric characteristic do not result in a clear differentiation between species.

KEY WORDS: Chromosomes, karyotype, morphometry.

INTRODUCCIÓN

Los peces constituyen un grupo parafilético que representa más de la mitad de las 55.000 especies de vertebrados vivientes (Helfman *et al.* 2009). Mientras la descripción de nuevas especies pertenecientes al grupo de los anfibios, reptiles, aves y mamíferos no es muy frecuente, hasta ahora han sido reconocidas 33.065 especies de peces (Eschmeyer y Fong 2014) y el registro anual indica que existe una tendencia a que los descubrimientos de

nuevas especies se incrementen (Fig. 1), lo cual refleja la importancia esencial de distinguir unidades taxonómicas para el entendimiento fundamental de la biodiversidad de los peces y su conservación mediante la delimitación, descripción y asignación de nombres a las especies con base en normas establecidas (Taxonomía) y la evaluación de las relaciones de parentesco entre ellas o entre taxones superiores como Familias y Órdenes (Sistemática) mediante el estudio de caracteres específicos (variaciones de estructuras homólogas).

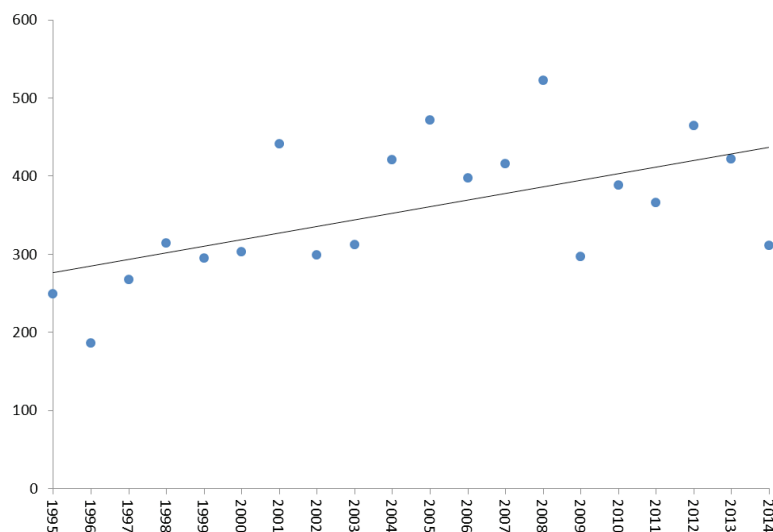


Figura 1. Número de nuevas especies de peces descritas en el mundo por año (datos tomados de Eschmeyer y Fong 2014).

Los caracteres tradicionalmente empleados en taxonomía pueden incluir cualquier diferencia describable como el color, la presencia de rayas, manchas, número y posición de fotóforos, estructuras sexualmente dimórficas que pueden tener valor funcional, incluyendo órganos usados por los machos para inseminar a las hembras como el gonopodio de los guppy o los pterigopodios de los condriktios. También pueden corresponder a estructuras que pueden ser contadas como el número de escamas, arcos branquiales, poros cefálicos, espinas y radios de las aletas, entre otros (merísticos); o aquellas variables continuas que pueden ser medidas (morfométricas) como la longitud estándar, longitud de las aletas, diámetro de los ojos, altura del cuerpo, ancho de la cabeza o proporciones entre ellas aunque son más difíciles de definir con exactitud y, al estar sujetas a ser medidas con diferentes grados de precisión, son menos fácilmente repetibles, además de estar expuestas al problema de la alometría, es decir, que la longitud de diferentes partes del cuerpo pueden cambiar con el desarrollo del individuo (Helfman *et al.* 2009).

Una herramienta que ha demostrado ser de gran utilidad para generar información importante para la distinción de especies en los peces es la Citogenética. En sus principios, los estudios citogenéticos en peces resultaron tediosos y poco informativos debido a la obtención de metafases de poca calidad para el análisis a causa del pequeño tamaño y mayor número de sus cromosomas en comparación con los de los mamíferos. Sin embargo, a partir de la publicación de McPhail y Jones (1966), con una metodología para la obtención de preparaciones cromosómicas mediante el uso de células en suspensión, se logró un gran avance. A partir de ahí, la incorporación de modificaciones como el tratamiento con colchicina y optimización en el tiempo de tratamiento hipotónico de las células y con la aplicación de procedimientos para la estimulación de la mitosis, resultó

en la obtención de un mayor número de células mitóticas disponibles para la preparación de los cromosomas metafásicos de buena calidad en especies marinas y de agua dulce, allanando el camino para la consolidación del protocolo que se emplea actualmente con gran éxito en la mayoría de los laboratorios (Foresti 2008).

Hasta el año 2011, habían sido obtenidos datos sobre el número de cromosomas y fórmula cariotípica para 3.425 especies y subespecies vivientes de agnatos, peces cartilagosos, actinopterigios y sarcopterigios (Arai 2011). No obstante, esa información apenas representa una pequeña fracción de todas las especies reconocidas de peces existentes (aproximadamente el 10,36%). Aun así, el empleo de técnicas como el bandeado C para estudiar la distribución de heterocromatina constitutiva, localización de regiones organizadoras del nucléolo por impregnación con nitrato de plata (Ag-RONs), el uso de fluorocromos base-específicos y la identificación de secuencias de ADN en los cromosomas mediante Hibridación *in situ* fluorescente, han contribuido de manera importante al estudio de las relaciones y la clasificación de la ictiofauna, permitiendo resolver problemas difíciles de esclarecer mediante la taxonomía clásica. Veamos a grandes rasgos las principales características citogenéticas y las técnicas que son empleadas más frecuentemente para el estudio de los cromosomas de los peces.

Cariotipo, Número Diploide (2n) y Número Fundamental (FN)

El cariotipo es el patrón cromosómico de una especie expresado a través de la descripción del número, tamaño y forma de cada tipo de cromosoma del set completo de cromosomas agrupados en pares homólogos y ordenados según su tamaño y forma, desde el más grande al más pequeño (Fig. 2).

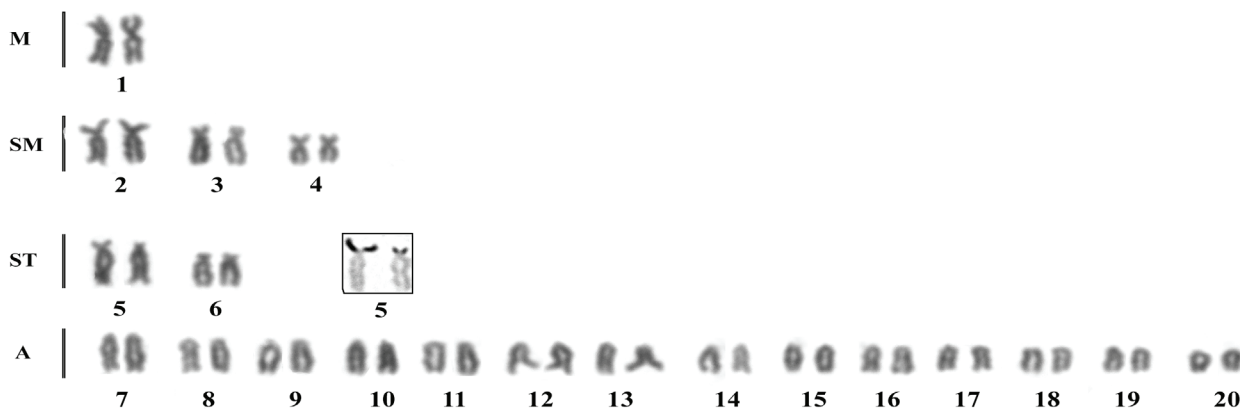


Figura 2. Cromosomas de *Opistognathus macrognathus* ordenados según tipo y tamaño (tomado de Nirchio *et al.* 2012).

El número de cromosomas generalmente se determina en la mitosis y es denominado número diploide ($2n$), excepto en organismos poliploides en cuyo caso es citado el número base o número de cromosomas del genoma de la serie original haploide. El número de cromosomas es generalmente constante en una especie, así como también la forma, tamaño, posición del centrómero, número y localización de genes ribosomales (NORs, 18S rDNA, 5S rDNA) y cantidad y distribución de la heterocromatina constitutiva, permitiendo que estas características puedan ser empleadas como una poderosa herramienta para diferenciar especies cuando los cromosomas son lo suficientemente grandes para su observación microscópica.

Un descriptor citogenético común es el número total de brazos o número fundamental (NF), el cual es definido como la cantidad de brazos cortos y largos presentes en un cariotipo (Matthey 1945, 1965) y es un indicador de la proporción de cromosomas acrocéntricos frente a la cantidad de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos presentes en un cariotipo. El NF puede variar dependiendo del criterio adoptado para su determinación. Algunos autores cuentan todos los brazos visibles de los cromosomas mientras que otros no consideran los brazos diminutos de cromosomas acrocéntricos pequeños o cromosomas subtelocéntricos. Las diferencias en el NF dentro de una misma especie o entre individuos de localidades geográficas diferentes, cuando el número diploide es constante, indican la ocurrencia de cambios estructurales en el complemento cromosómico como consecuencia de modificaciones en su morfología sin variación en el número de cromosomas y permiten establecer hipótesis sobre la dinámica evolutiva del cariotipo.

Por ejemplo, si en dos especies relacionadas y con el mismo número cromosómico se encuentra una disminución del NF en un cariotipo en comparación con el otro, es posible suponer que a partir del cariotipo original pudieron ocurrir inversiones pericentroméricas de un cromosoma meta o submetacéntrico dando origen a un cromosoma acrocéntrico y, por lo tanto, la visualización del brazo corto visible de ese cromosoma original deja de contabilizarse, en tanto que las fusiones céntricas no tienen efecto en los números fundamentales, pero sí en la reducción de los números cromosómicos entre las especies comparadas.

Regiones organizadoras de nucléolos (RONs) y DNA ribosomal

El nucléolo corresponde a una región específica dentro del núcleo interfásico de la célula eucariótica, y

puede ser observado con el microscopio de luz como una o más estructuras esféricas de tamaño variable, pero en general grande, en aquellas células con alta tasa de síntesis proteínica. A medida que transcurre la división celular, disminuye la tasa metabólica celular y el nucléolo va desapareciendo, reapareciendo en el núcleo telofásico. El nucléolo está constituido por DNA ribosomal (rDNA), RNA ribosómico (rRNA) y proteínas y es responsable de la formación de los ribosomas que son las estructuras ligadas a la síntesis proteínica en el citoplasma celular. En realidad, el nucléolo corresponde a las regiones donde se localizan las secuencias de rDNA responsables de la transcripción que, aun estando localizadas en cromosomas distintos, se asocian íntimamente y se denominan Regiones Organizadoras del Nucléolo (NORs). En los peces, las NORs generalmente están ubicadas en constricciones secundarias de los cromosomas, pueden observarse en un solo par cromosómico (Nirchio *et al.* 2001, 2003a,b, Alves *et al.* 2012), o distribuidas en varios cromosomas del complemento (Nirchio *et al.* 2007a, 2008, Monteiro *et al.* 2008, Alves *et al.* 2012) y su número, posición y localización cromosómica es especie-específica para varios grupos de peces (Kavalco *et al.* 2005, Nirchio *et al.* 2005, Diniz *et al.* 2009).

Los genes ribosomales se encuentran organizados como secuencias repetitivas en tándem separadas unas de otras por segmentos espaciadores (Fig. 3). Cada una de estas secuencias es responsable de la síntesis de una molécula precursora de rRNA de tamaño 40S o 45S a la que se asocian proteínas no-histónicas formando un complejo de ribonucleoproteína. En detalle, cada unidad de transcripción tiene la misma organización, siendo reconocidos en dirección $5' \rightarrow 3'$ un segmento externo (ETS), una secuencia de rRNA 18S, un segmento intercalar 1 (ITS1), una secuencia de rRNA 5,8S, un segmento intercalar 2 (ITS2) seguido de una secuencia de rRNA 28S. Al contrario del espaciador, también conocido como IGS, que no transcribe, los segmentos ETS, ITS1, ITS2 son transcritos, están presentes en el transcripto primario o rRNA pre-ribosómico pero no hacen parte de la molécula de rRNA y efectivamente harán parte de los ribosomas, siendo eliminados durante el metabolismo post-transcripcional en un proceso también conocido como modificaciones postranscripcionales o maduración del RNA (Sumner 2003, Úbeda-Manzanaro *et al.* 2010). El rRNA 18S y las proteínas forman la subunidad menor de los ribosomas mientras que los rRNA 28S, 5,8S y 5S más las proteínas forman parte de la subunidad mayor. La molécula 5S también es transcrita por genes repetitivos pero localizados fuera de las NORs y con frecuencia en cromosomas distintos (Griffiths *et al.* 2012).

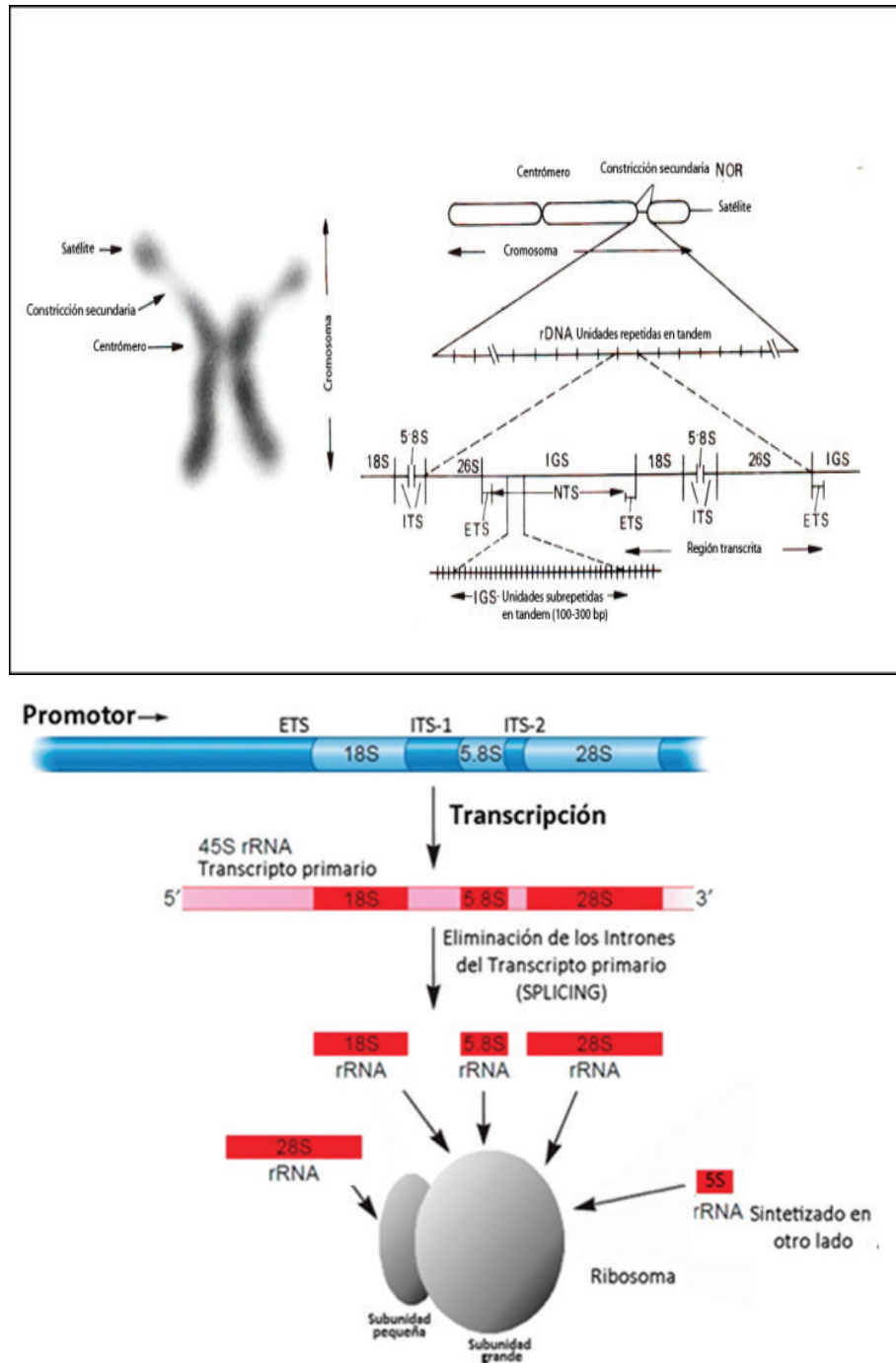


Figura 3. Organización del cistron y transcripto primario que codifica los genes ribosomales con la localización de los distintos tipos de rRNA en el ribosoma eucariótico.

Las NORs pueden ser visualizadas de forma indirecta, por el método de paso único de Howell y Black (1980), técnica que se basa en la afinidad que presenta el nitrato de plata por las proteínas ácidas como la nucleolina asociada a la estructura fibrilar del nucléolo y el pre-ARN naciente. Estas proteínas

persisten en la región de la constricción secundaria durante todo el ciclo celular, permitiendo colorear los nucléolos en interfase y dichas regiones en cromosomas metafásicos (Fig. 4). Sin embargo, debe tenerse precaución al interpretar los resultados obtenidos mediante la técnica de impregnación con nitrato de plata debido a

que otras estructuras, además de las NORs, pueden ser coloreadas con las sales de plata, tales como algunas heterocromatinas, histonas, núcleos cromosómicos,

complejos sinaptonémicos y principalmente cinetocoros (Sumner 1990, Dobigny *et al.* 2002).

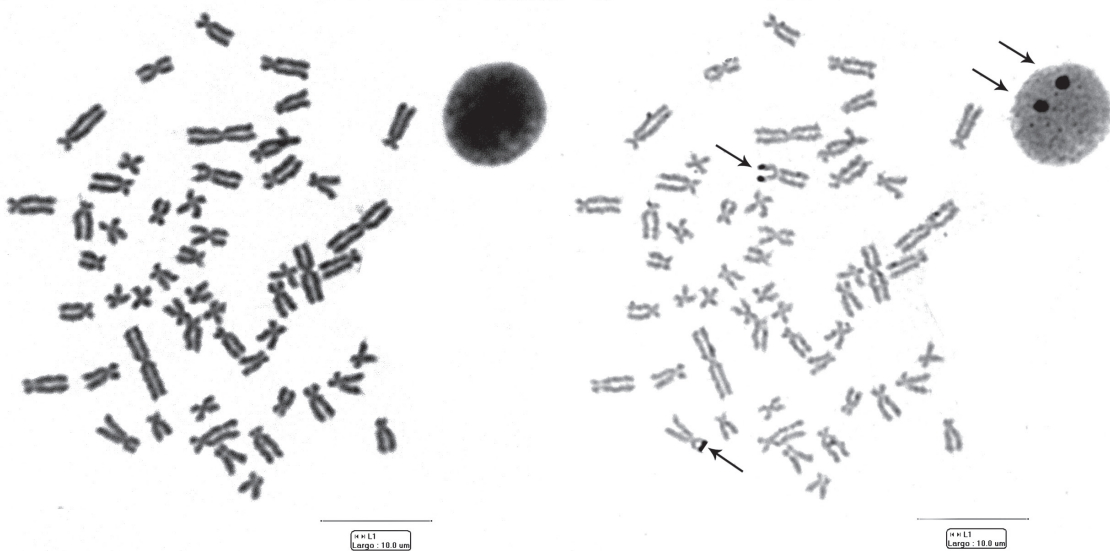


Figura 4. Metafase de *Catorops spixii* primero teñida con colorante de Giemsa (izquierda) y luego mediante impregnación argéntica (derecha). Las flechas indican las NORs marcadas en los cromosomas y en el núcleo interfásico.

Heterocromatina Constitutiva

El término bandas-C se emplea para designar las regiones de heterocromatina constitutiva que predominantemente contienen secuencias de DNA altamente repetidas e inactivas durante la transcripción. La técnica de bandeado-C más comúnmente utilizada (Sumner 1972) involucra la depurinización de la cromatina con tratamiento ácido (HCl), desnaturalización del DNA con tratamiento alcalino (BaOH), quiebre de las cadenas de DNA en los sitios depurinizados y remoción de las cadenas de DNA desnaturalizado en solución salina caliente (2xSSC) (Comings 1978) lo que permite, luego de la tinción con colorante de Giemsa, revelar bloques más intensamente coloreados que el material cromosómico restante, el cual presenta una coloración más pálida. Estas marcaciones o bandas C ocurren frecuentemente en la región de los centrómeros o próximas a ellos (de allí la designación con la letra C) (Fig. 5), aunque puede estar presente en los telómeros y regiones intersticiales. En peces, el análisis comparativo de la distribución de la heterocromatina constitutiva a lo largo de los cromosomas ha sido utilizado para la identificación de polimorfismos cromosómicos (Molina 1995) para la identificación de cromosomas sexuales (Galetti y Foresti 1986, Andreatta *et al.* 1992) y para caracterizar las especies o grupos de especies (Caputo *et al.* 1996, Ferreira *et al.* 2005, Ruber *et al.* 2011, Valente *et al.* 2012), contribuyendo a una mayor comprensión de las relaciones genéticas y evolutivas

dentro de y entre los diferentes grupos.

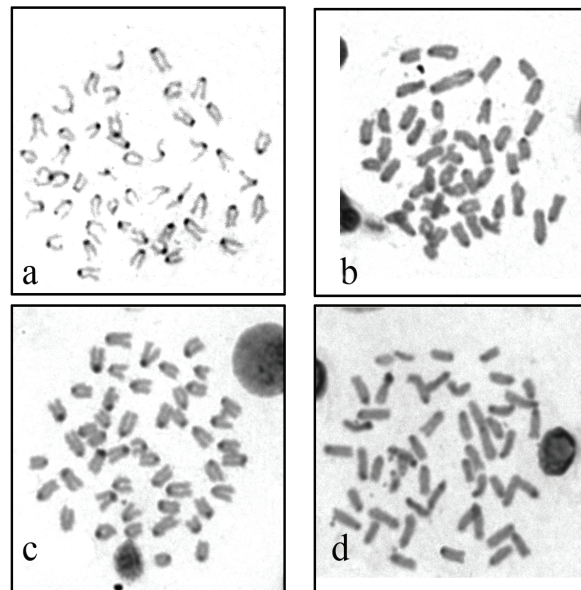


Figura 5. Bandas-C restringidas a los centrómeros de todos los cromosomas de tres especies de Lutjanidae. *Lutjanus analis* (a), *L. griseus* (b), *L. synagris* citotipo I (c) y *L. synagris* citotipo II (d) (tomado de Nirchio *et al.* 2008).

Hibridación *in situ* fluorescente

Es una técnica más específica (FISH, en inglés, *fluorescent in situ hybridization*) que permite, con sondas específicas de ADN, la detección de un gen o grupo de

genes o aun de secuencias particulares, en diferentes estados de la cromatina en el núcleo interfásicos, en cromosomas mitóticos y/o meióticos. Primero, la muestra de ADN (cromosomas metafásicos o núcleos en interfase) debe ser desnaturizada mediante altas temperaturas para separar las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del ADN y añadir entonces la sonda de interés (también desnaturizada), que ha sido marcada con fluorescencia, que se hibridará al ADN de la muestra en el sitio en el

que se encuentra los genes que se desean localizar en el cromosoma, en un proceso denominado templado, en el que se vuelve a formar la doble hélice (Nirchio y Oliveira 2006). Las sondas son fragmentos de DNA de aproximadamente 100-500 pb, lo que permite su penetración hasta los sitios en los que se encuentran los genes en los cromosomas. Estas sondas poseen algún nucleótido modificado acoplado a una molécula marcadora que permitirá su localización mediante un microscopio de fluorescencia (Fig. 6).

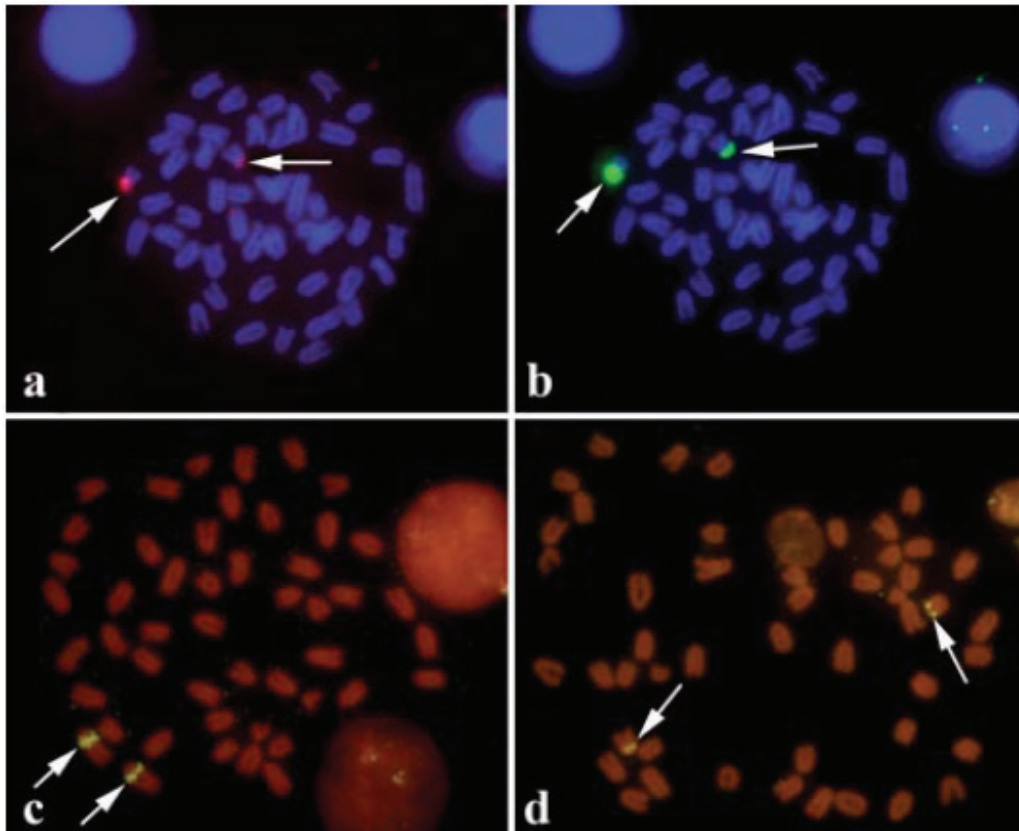


Figura 6. Metafasas de of *Rhomboplites aurorubens* (a-b) y *Ocyurus chrysurus* (c-d) después de haber sido sometidas a FISH con 18S rDNA (izquierda) y con 5S rDNA (derecha). Las flechas indican los cromosomas portadores de los genes ribosomales mayores (18S rDNA). Las puntas de flechas indican los cromosomas portadores de los genes ribosomales menores (5S rDNA).

Ejemplos de la aplicación la citogenética en problemas taxonómicos en peces

La literatura sobre la aplicación de los datos citogenéticos en los estudios de la biología comparativa de los peces es muy amplia, con un gran número de ejemplos que muestran su grado de eficiencia. A continuación se refieren algunos a fin de ilustrar la eficacia de las técnicas citogenéticas para la identificación de especies.

Mugilidae

Debido a que los caracteres morfológicos externos

son muy conservativos entre las especies de este grupo, la familia ha sido objeto de numerosas revisiones sistemáticas tanto a nivel de género como de especie y, en algunos casos, las sutiles diferencias interespecíficas de los caracteres merísticos y morfométricos han contribuido con el aumento de numerosos problemas taxonómicos y de nomenclatura en el grupo. Por ejemplo, *Mugil curema* y *M. gaimardianus*, habían sido consideradas como dos especies diferentes estrechamente emparentadas, diferenciables solo por el color del iris del ojo en especímenes vivos, la longitud de la aleta pectoral y el número de series oblicuas de escamas a lo largo de la línea lateral. Sin embargo, el color del iris se pierde en especímenes preservados y las aletas

muchas veces se deterioran durante la captura por lo que se recurre principalmente al número de series oblicuas de escamas como criterio para diferenciar especies. No obstante, la amplitud del intervalo del número de escamas característico para estas dos "especies", lo convierte en una variable de poca fortaleza como único carácter diagnóstico, debido a que los valores se solapan en ambas entidades taxonómicas, de tal manera que Menezes (1983) indica que *M. curema* posee de 36 a 40 series laterales de escamas y *M. gaimardianus* de 35 a 38, mientras que Cervigón (1993) señala entre 37 y 40 para *M. curema* y entre 35 y 39 para *M. gaimardianus*. Por otro lado, la descripción original de *M. gaimardianus* creó diversos problemas taxonómicos en el pasado debido a la descripción ambigua de la especie y la aparente pérdida del espécimen tipo. Por esa razón, el *International Committee on Zoological Nomenclature* invalidó el nombre *Mugil gaimardianus* (ICZN 1994) y procedió a declararlo *nomina dubia* y

consecuentemente como una sinonimia de *M. curema*. Sin embargo, el estudio citogenético demostró que existían notables diferencias en el número y tipo de cromosomas entre ejemplares que concordaban con la descripción de *M. curema* y aquellos que podrían clasificarse como *M. gaimardianus*, sobre la base del color rojo del iris del ojo. De hecho, *M. curema* posee un cariotipo $2n = 24$ compuesto por 22 cromosomas metacéntricos y 2 submetacéntricos mientras las supuestas *M. gaimardianus* poseen un cariotipo $2n = 48$ constituido por cromosomas enteramente acrocéntricos (Nirchio *et al.* 2003b, 2007b) (Fig. 7). Esta evidencia necesariamente condujo a revisar la situación sistemática de estas dos entidades taxonómicas, revelando que en realidad se trataba de dos especies diferentes, *M. curema* y *M. rubrioculus* (antes denominada *gaimardianus*) (Harrison *et al.* 2007) demostrándose el poder de la citogenética como herramienta para distinguir entre especies de Mugilidae.

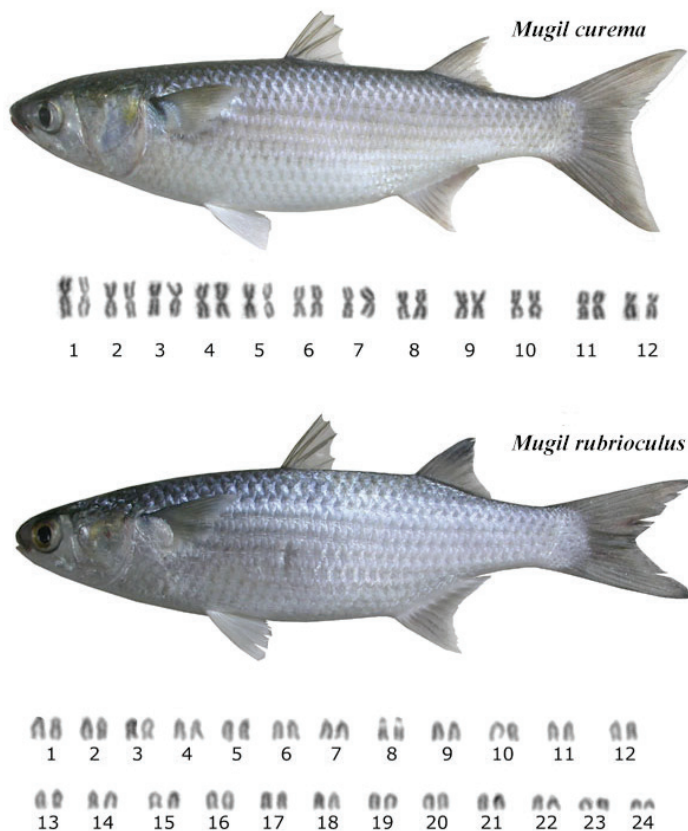


Figura 7. Fotografías de *Mugil curema* y *Mugil rubrioculus* con sus respectivos cariotipos.

Gymnotidae

En un estudio en el que fueron examinados los cariotipos de cinco poblaciones morfológicamente indistinguibles del pez cuchillo eléctrico de la Amazonia oriental de Brasil, identificados inequívocamente como

Gymnotus carapo sensu stricto sobre la base de la pigmentación, caracteres merísticos y morfología externa, se encontró que los especímenes de una de las cinco localidades exhibieron un cariotipo $2n = 40$ (34M/SM + 6ST/A) no documentado previamente para especies del género *Gymnotus* en la cuenca del Amazonas, mientras

que especímenes procedentes de otras cuatro localidades exhibieron un cariotipo $2n = 42$ (30M/SM + 12ST/A), que ya había sido descrito (Milhomem *et al.* 2008). La diferencia entre los dos cariotipos en el número diploide y morfología de los cromosomas fue explicada como consecuencia de eventos de fusión-fisión y también por inversiones pericéntricas. La presencia de secuencias teloméricas intersticiales detectadas mediante el ensayo FISH en un par de cromosomas metacéntricos en la población con cariotipo $2n = 40$ sugirió que esa población se ha diferenciado como una especie diferente respecto a las que poseen cariotipo $2n = 42$.

Haemulidae

El género *Haemulon* perteneciente a los Haemulinae se encuentra representado en Venezuela por 14 especies reconocidas (Cervigón 1993), de las cuales, hasta ahora

han sido cariotipadas solo siete, encontrándose, en todos los casos, un complemento $2n = 48A$, muy difícil de diferenciar entre especies cuando solo se considera el cariotipo convencional teñido con Giemsa (Fig 8).

Un análisis más detallado empleando las técnicas de impregnación con nitrato de plata, bandeado-C y mapeo de los genes ribosomales 18S-rDNA y 5S-DNA en *Haemulon aurolineatum*, *H. bonariensis* y *H. plumierii* (Nirchio *et al.* 2007c) mostró que, si bien esas tres especies presentan características citogenéticas conservadas (número diploide, presencia y ubicación de constricciones secundarias en el cromosoma 24, ubicación de los clúster 18S rDNA), la distribución de bandas C, y la localización de los cluster 5S-rDNA permitió la clara diferenciación de *H. aurolineatum* de las otras dos especies (Fig. 9).

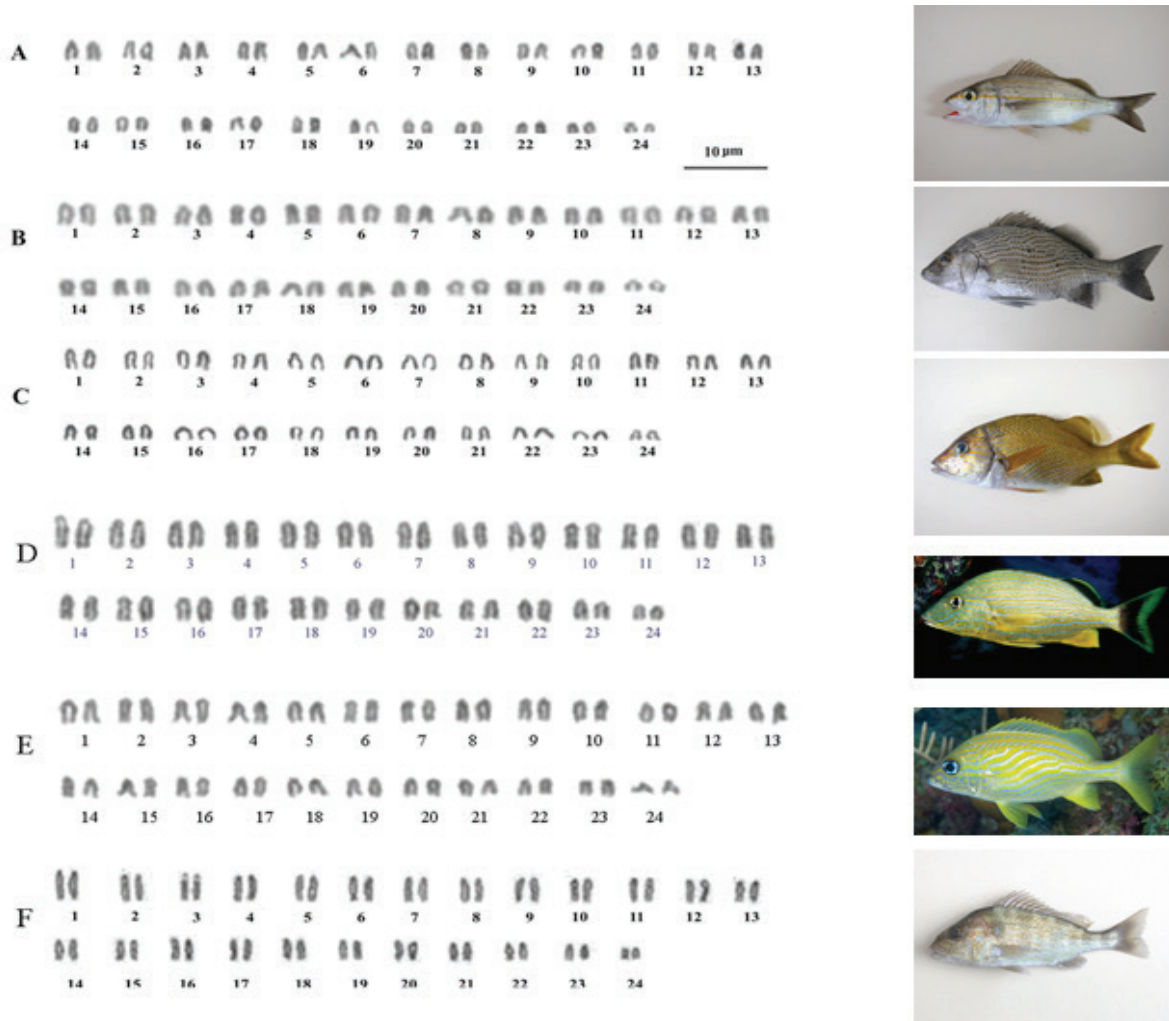


Figura 8. Cariotipos de *Haemulon aurolineatum* (A), *H. bonariense* (B), *H. plumierii* (C), *H. sciurus* (D), *H. flavolineatum* (E) y *Orthopristis ruber* (F). A la derecha del cariotipo se muestra una fotografía de la especie.

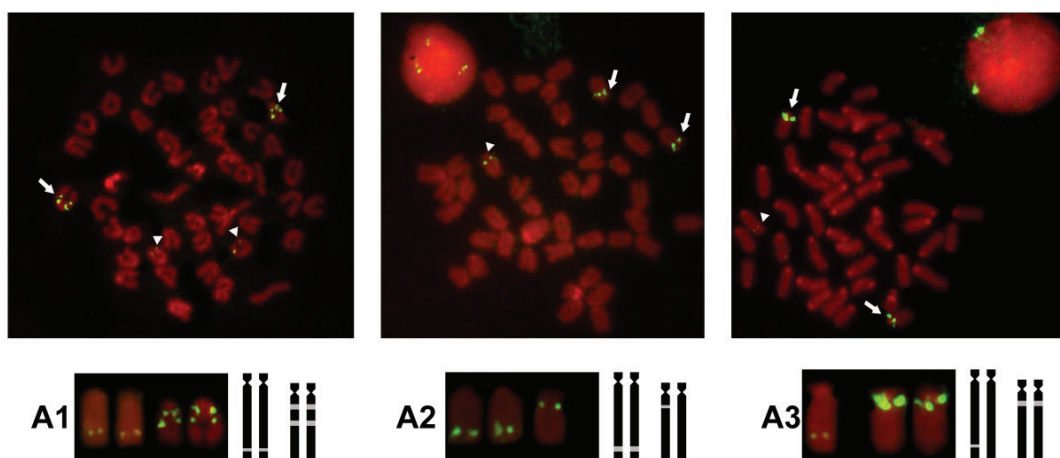


Figura 9. Metafase que muestran la posición de los cluster 5S rDNA de *Haemulon aurolineatum* (izquierda), *H. bonariensis* (centro), y *H. plumieri* (derecha). Las flechas y puntas de flecha indican la ubicación de señales positivas fuertes y débiles, respectivamente. Detalles de los cromosomas portadores de los genes 5S rDNA se muestran en los cariotipos parciales y en los ideogramas bajo cada una de las metafases.

Characidae

La caracterización citogenética de seis especies de *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. argyrimarginatus*, *A. elachylepis*, *A. xavante*, y dos especies provisionalmente llamadas *Astyanax* sp. y *A. aff. bimaculatus*, mediante tinción convencional con Giemsa, AgNORs, bandeó-C, fluorocromo base-específicos, y mapeo de los genes ribosomales 18S y 5S mostró un número diploide $2n = 50$ para cinco especies y $2n = 52$ en *Astyanax* sp., identificando pequeñas variaciones macroestructurales (Tenório *et al.* 2013) en los cariotipos que fueron atribuidas principalmente a cambios en la cantidad y distribución de heterocromatina constitutiva entre las especies de *Astyanax* con $2n = 50$. Asimismo, en *Astyanax* sp. con $2n = 52$, además de la variación en la distribución de la heterocromatina constitutiva, parece haberse producido un evento de fisión céntrica en un par cromosómico seguido de reorganizaciones posteriores menores, con lo que se evidencia la notable diversidad cariotípica que caracteriza a este grupo e indica, según Tenório *et al.* (2013) la necesidad de una revisión taxonómica para incluir *A. aff. bimaculatus* y *Astyanax* sp. como nuevas especies con la posible inclusión de *Astyanax* sp. en otro género.

Parodontidae

Así como en los casos anteriores las características cromosómicas permitieron establecer claramente diferencias a nivel específico, estudios citogenéticos en *Parodon nasus* y *P. tortuosus* (Parodontidae: Characiformes) mostraron que el número diploide observado en ambas especies fue $2n = 54$ (48M/SM

y 6ST) sin diferencias entre los sexos y que, a pesar de ligeras diferencias en el patrón de distribución de la heterocromatina, la ubicación de las regiones organizadoras nucleolares (NORs) y de los genes rRNA 5S fueron similares (Bellafronte *et al.* 2005), apoyando la opinión que sostiene que *P. tortuosus* es una sinonimia de *P. nasus*.

Ariidae

La taxonomía de este grupo es incierta, con varios casos de identificación errónea. En un estudio citogenético realizado por Sczepanski *et al.* (2010) para caracterizar dos poblaciones de *Genidens genidens* y dos poblaciones de *Aspistor luniscutis* de la costa sur de Brasil, utilizando técnicas convencionales y sondas de hibridación *in situ* fluorescente con 18S rDNA se encontró que las dos especies tenían el mismo número diploide ($2n = 56$), números fundamentales altos y patrones de bandas similares, corroborando así la homogeneidad cariotípica propuesta para el grupo. Sin embargo, NORs únicas fueron encontradas en el género *Genidens* y múltiples en *Aspistor*, lo que es considerado como un marcador citotaxonomico importante para este género.

Pimelodidae

En el caso de las especies del género *Pseudoplatystoma* (Pimelodidae), distribuido en las principales cuencas fluviales de América del sur, la taxonomía tradicional había reconocido solo tres especies pero análisis morfológicos elevaron su número a ocho, incluyendo dos nuevas especies (Buitrago-Suárez y Burr 2007), *P.*

orinocoense y *P. metaense*, distribuidas exclusivamente en la cuenca del Orinoco. Estas especies presentan cariotipos muy conservados ($2n = 56$) y similares características citogenéticas en términos de distribución de heterocromatina constitutiva y número y localización de genes ribosomales mayores y menores. Sin embargo, el análisis de secuencias de los genes mitocondriales Citocromo b (1110 bp) y un fragmento del gen COI (432 bp) confirmaron la asignación de *P. metaense* y *P. orinocoense* a dos clados moleculares distintos de *Pseudoplatystoma* identificados en la cuenca del Orinoco. Las genealogías obtenidas con estos dos marcadores mitocondriales confirman que los clados moleculares identificados proporcionan apoyo para el reconocimiento de solo algunos de las ocho morfoespecies descritas para el género *Pseudoplatystoma* poniendo sobre el tapete la necesidad de re-evaluar mediante análisis morfológicos y moleculares la monofilia de algunos linajes (Nirchio *et al.* 2013).

CONCLUSIÓN

Los datos disponibles hasta la fecha indican que características cromosómicas como posición del centrómero, número, tipo y posición de Regiones Organizadoras del Nucléolo, tamaño absoluto y relativo de los cromosomas, cantidad y distribución de heterocromatina pueden ser investigadas en los peces con técnicas relativamente sencillas y al alcance de muchos laboratorios. Estas técnicas, aplicadas cada vez a un mayor número de grupos, brindan valiosos aportes para la resolución de problemas taxonómicos, evolutivos y aplicados, permitiendo generar importante información para establecer la distinción entre especies, especies crípticas y razas cromosómicas, contribuyendo al desarrollo de la citotaxonomía en los peces y acrecentando así el conocimiento de su biodiversidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Venezuela y al Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República de Ecuador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES AL, DE BORBA RS, OLIVEIRA C, NIRCHIO M, GRANADO A, FORESTI F. 2012. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comp. Cytogen.* 6(4):443-452.
- ANDREATTA AA, ALMEIDA-TOLEDO LF, OLIVEIRA C, TOLEDO-FILHO SA. 1992. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietenses*. *Cytologia* 57(3):369-372
- ARAI R. 2011. *Fish Karyotypes: A Check List*. Springer, Japan, pp. 348.
- BELLAFRONTE E, MARGARIDO VP, MOREIRA-FILHO O. 2005. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genet. Mol. Biol.* 28(4):710-716.
- BUITRAGO-SUÁREZ UA, BURR BM. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatysoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa* 1512:1-38.
- CAPUTO V, MARCHEGFTANI F, OLMO E. 1996. Karyotype differentiation between two species of carangid fishes, genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae). *Mar. Biol.* 127(2):193-199.
- CERVIGÓN F. 1993. *Los peces marinos de Venezuela*. 2ª ed. Fundación Científica Los Roques, Caracas, Venezuela, pp. 499.
- COMINGS DE. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structures. *Ann. Rev. Genet.* 12:25-46.
- DINIZ D, LAUDICINA A, BERTOLLO LAC. 2009. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triporthus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 32(1):37-41.
- DOBIGNY G, OZOUF-COSTAZ C, BONILLO C, VOLOBOUV V. 2002. "Ag-NORs" are not always true NORs: New evidence in mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 98(1):75-77 doi: 10.1159/000068541.
- ESCHMEYER WN, FONG JD. 2014. Species by Family/Subfamily. Online Version: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp> (Updated 18.Nov.2014).
- FERREIRA DC, CHIACHIO MC, TAKAKO AK, ANDREATTA

- AA., FORESTI F, OLIVEIRA C. 2005. Comparative cytogenetics of nine species of Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): the importance of structural rearrangements in chromosome evolution. *Caryologia*. 58(4):387-395.
- FORESTI F. 2008. A brief history of fish genetics in Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 31(1)(suppl):385-388.
- GALETTI PM. 1998. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. *Ital. J. Zool.* 65:53-56. doi: 10.1080/11250009809386795.
- GALETTI PM, FORESTI F. 1986. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* 43:43-46.
- GRIFFITHS AJF, WESSLER S R, CARROLL S B, DOEBLEY J. 2012. *Introduction to Genetic Analysis*. Tenth edition. H. W. Freeman and Company, New York, pp. 832.
- HARRISON IJ, NIRCHIO M, OLIVEIRA C, RON E, GAVIRIA J. 2007. A new species of mullet (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. *J. Fish Biol.* 71(a):76-97.
- HELFMAN GS, COLLETTE BB, FACEY DE, BOWEN BW. 2009. *The diversity of fishes*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, pp. 720.
- HOWELL WM, BLACK DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 36(8):1014-1015.
- ICZN (INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE). 1994. Opinion 1787. *Mugil curema* and *M. liza* Valenciennes in Cuvier. Valenciennes, 1836 (Osteichthyes, Perciformes): specific names conserved. *Bull. Zool. Nom.* 51(3):286-287.
- KAVALCO KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94(2):180-186.
- MATTHEY R. 1945. L'évolution de la formule chromosomiale chez les vertébrés. *Experientia*. 1(3):50-56.
- MATTHEY R. 1965. Cytogenetic Mechanisms and Speciations of Mammals. *In: The Chromosome: Structural and Functional Aspects [Annual Symposium, 1965], In Vitro*, Vol. 1, pp. 1-11.
- MCPHAIL JD, JONES RL. 1966. A Simple Technique for obtaining chromosomes from Teleost Fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 23(5):767-768.
- MENEZES NA. 1983. Guia pratico para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral Brasileiro. *Rev. Bras. Zool.* 2(1):1-12.
- MILHOMEM SSR, PIECZARKA JC, CRAMPTON WGR, SILVA DS, DE SOUZA ACP, CARVALHO JR JR, NAGAMACHI CY. 2008. Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics*. 9:75. doi:10.1186/1471-2156-9-75.
- MOLINA WF. 1995. Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). São Carlos, SP, Brasil: Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução [Dissertação de Mestrado], pp. 177.
- MONTEIRO MER, NIRCHIO M, GRANADO A, FORESTI F, OLIVEIRA C. 2008. Cytogenetic analysis of three sea catfish species (Teleostei, Siluriformes, Ariidae) with the first report of Ag-NOR in this fish family. *Genet. Mol. Biol.* 33(2):262-265.
- NIRCHIO M, OLIVEIRA C. 2006. *Citogenética de Peces*. Editado por Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, pp. 216.
- NIRCHIO M, GONZÁLEZ D, PÉREZ JE. 2001. Estudio citogenético de *Mugil curema* y *M. Liza* (Pisces: Mugilidae): Regiones organizadoras del nucleolo. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*. 40(1-2):3-7.
- NIRCHIO M, CEQUEA H, TURNER BJ. 2003a. Karyotypic characterization and nucleolus organizer regions in *Cyprinodon dearborni* (Meek, 1909) (Pisces: Cyprinodontidae) from Venezuela. *Interciencia*. 28(6):1-4.
- NIRCHIO M, CERVIGÓN F, REVELO PORTO JI, PEREZ J E, GÓMEZ JA, VILLALAZ J. 2003b. Karyotype

- supporting *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil "gaimardianus"* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as two valid nominal species. *Sci. Mar.* 67(1):113-115.
- NIRCHIO M, CIPRIANO RR, CESTARI MM, FENOCCHIO AS. 2005. Cytogenetical and morphological features reveal significant differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema*. *Neotrop. Ichthyol.* 3(1):99-102.
- NIRCHIO M, OLIVEIRA C, FERREIRA IA, GRANADO A, RON E. 2007a. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 30(1):25-30.
- NIRCHIO M, OLIVEIRA C, FERREIRA IA, PEREZ JE, GAVIRIA JI, HARRISON IJ, ROSSI AR, SOLA L. 2007b. Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubrioculus* and *M. curema* (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela. *Interciencia.* 32(11):757-762.
- NIRCHIO M, GAVIRIA JI, OLIVEIRA C, FERREIRA IA, MARTINS C. 2007c. Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita Island, Venezuela. *Genetica.* 131(2):135-140. doi 10.1007/s10709-006-9123-4.
- NIRCHIO M, RONDON R, PÉREZ JE, OLIVEIRA C, FERREIRA IA, MARTINS C, ROSSI AR, SOLA L. 2008. Cytogenetic studies in three species of Lutjaninae (Teleostei) from Margarita Island, Venezuela. *Neotrop. Ichthyol.* 6(1):101-108.
- NIRCHIO M, GAVIRIA JI, OLIVEIRA C. 2012. Classical cytogenetic characterization of *Opistognathus macrognathus* (Perciformes: Opistognathidae). *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela.* 51(2):123-127.
- NIRCHIO M, MUJICA A, OLIVEIRA C, GRANADO A, MORA J, HETT AEK, ROSSI AR, MILANA V, SOLA L. 2013. *Pseudoplatystoma metaense* and *P. orinocoense* (Siluriformes: Pimelodidae) from the Orinoco basin, Venezuela: cytogenetic and molecular analyses. *Ital. J. Zool.* 84(4):526-535
- RUBER M, DA ROSA R, JEREP FC, BERTOLLO LAC, GIULIANO-CAETANO L. 2011. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comp. Cytogen.* 5(5):397-410.
- SCZEPANSKI TS, NOLETO RB, CESTARI MM, ARTONI RF. 2010. A comparative study of two marine catfish (Siluriformes, Ariidae): Cytogenetic tools for determining cytotaxonomy and karyotype evolution. *Micron.* 41(3):193-197.
- SUMNER AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75(1): 304-306.
- SUMNER AT. 1990. Chromosome Banding. Unwin Hyman Ltd., London, United Kingdom, pp. 434.
- SUMNER AT. 2003. Chromosomes Organization and Function. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, United Kingdom, pp. 287.
- TENÓRIO RCCO, VITORINO CA, SOUZA IL, OLIVEIRA C, VENERE P C. 2013. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotrop. Ichthyol.* 11(3):553-564.
- ÚBEDA-MANZANARO M, MERLO M A, PALAZÓN J L, SARASQUETE C, REBORDINOS L. 2010. Sequence characterization and phylogenetic analysis of the 5S ribosomal DNA in species of the family Batrachoididae. *Genome.* 53:723-730. doi:10.1139/G10-048.
- VALENTE GT, DE ANDRADE VITORINO C, CABRAL DE MELLO DC, OLIVEIRA C, LIMA SOUZA I, MARTINS C, VENERE PC 2012. Comparative cytogenetics of ten species of cichlid fishes (Teleostei, Cichlidae) from the Araguaia Riversystem, Brazil, by conventional cytogenetic methods. *Comp. Cytogen.* 6(2):163-181.