

**ANÁLISIS CARIOLÓGICO DE LA ESPECIE *Brycon meeki* (Piscis, Characidae), EN LA QUEBRADA LAS TALLAS, AFLUENTE DEL RIO PATÍA, MUNICIPIO DEL PATÍA (CAUCA)**

**DIANA SAAVEDRA TRUJILLO**

**LEONARDO DAVID PINZÓN**

**Trabajo de grado  
Para optar al título de Biólogos**

**Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL  
Director**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2008**

# ANÁLISIS CARIOLÓGICO DE LA ESPECIE *Brycon meeki* (Piscis, Characidae), EN LA QUEBRADA LAS TALLAS, AFLUENTE DEL RIO PATÍA, MUNICIPIO DEL PATÍA (CAUCA)

## RESUMEN

Los estudios citogenéticos permiten identificar las constantes cariológicas de la especie como base para determinar los posibles cambios cromosómicos producidos mediante procesos de especiación, así como permitir técnicas de mejoramiento genético tales como la hibridación y la inducción de poliploides; así mismo, permite investigar la evolución cariotípica de especies relacionadas, permitiendo hipotetizar los posibles rearrreglos cromosómicos implicados en tal proceso. De esta manera, la presente investigación se lleva a cabo teniendo en cuenta la importancia que los estudios citogenéticos de peces alcanzan en el momento actual y del aporte que éstos le puedan dar a la piscicultura, tanto en el campo científico como socioeconómico, sabiendo que en el Sábalo (*Brycon meeki*) encontramos un sistema biológico de gran importancia económica y que corresponde al grupo de especies endémicas de Colombia. Además fue la principal fuente de alimento en la región del Patía, y fue la principal especie en la pesquería artesanal y deportiva; lamentablemente está cerca de hallarse en vía de extinción, ubicándose dentro de la categoría de casi amenazado (NT).

El objetivo de ésta investigación fue realizar la caracterización cromosómica de esta especie, la cual sirve como instrumento para la identificación de semejanzas y diferencias intersexo. La especie se capturó con métodos convencionales de pesca, en la quebrada Las Tallas (Río Patía), municipio del Patía, Departamento del Cauca. La metodología aplicada en esta investigación esta basada en la obtención de extendidos mitóticos a partir de tejido de riñón, de 6 ejemplares (3 machos y 3 hembras) de la especie *Brycon meeki*. En la etapa de estandarización de la técnica se utilizaron 14 ejemplares.

Los resultados permitieron concluir un número diploide de  $2n=50$  cromosomas para ambos sexos, con una fórmula cromosómica de  $24m + 26sm/st$  y que morfológicamente no se detectan heterocromosomas. Comparando con otros miembros o especies del género, se ha encontrado una estabilidad en el cariotipo, caracterizado por el mismo número cromosómico y una gran igualdad en la estructura de los cromosomas; tal es el caso de la especie *Brycon siebenthalae*, con la cual se ha encontrado la mayor similitud entre todas la especies estudiadas de este género. Así mismo, en general se observa una estabilidad en la macroestructura del cariotipo para los miembros de la familia Characidae, encontrando grandes semejanzas entre el género *Bycon* y *Salminus*, lo cual permite constatar que esta familia constituye grupos cariológicamente homogéneos.

**Palabras Claves:** *Brycon meeki*, Sábalo, número diploide, Fórmula cromosómica, Patía.

## INTRODUCCIÓN

Colombia posee una ictiofauna dulceacuícola muy diversa, en la cual, muchas de sus especies tienen importancia económica. Las 22.000 especies de peces existentes representan cerca del 60% entre todos los vertebrados (Nirchio, M *et al.* 2005). Es importante destacar que, mientras la descripción de nuevas especies pertenecientes al grupo de los anfibios, reptiles, aves y mamíferos no es muy frecuente, muchas nuevas especies de peces son descritas continuamente, lo cual puede elevar su número total a aproximadamente 28.500 (Nirchio, M *et al.* 2005). Paradójicamente, es un grupo de vertebrados muy descuidado en términos de investigación y, por tanto, de los menos conocidos del país (Mojica, J. I *et al.* 2002).

*Brycon meeki*, perteneciente a la familia Characidae, es una de las especies representativas de las aguas continentales colombianas por ser un pez de gran importancia económica y de consumo; además, por ser un pez ornamental, es uno de los más importantes en la región de Patía (Cauca). En términos de investigación genética, los peces son un grupo pobremente estudiado. A escala mundial, se conocen varios estudios citogenéticos; sin embargo, este tipo de estudio no ha sido reportado sobre la especie *Brycon meeki*, por lo cual esta especie es un excelente blanco de investigación.

Los peces poseen un alto grado de diversificación y un origen ancestral evolutivo, haciéndolos ideales para el estudio de la evolución de los cromosomas (Koheler, M.R *et al.* 1997). Por ello, los análisis citogenéticos, y en especial la caracterización del cariotipo, son un soporte fundamental para los estudios de la taxonomía clásica.

El objetivo central de esta investigación fue caracterizar cromosómicamente a la especie *Brycon meeki*, ya que no se conocen reportes bibliográficos al respecto. Este estudio es un aporte a la documentación citogenética general de los Characidae. Además, esta investigación permitió revisar bibliografía sobre la especie, para conocer aspectos relacionados con su ecología, morfología y explotación comercial. La descripción del cariotipo de *Brycon meeki*, es un estudio preliminar útil en investigaciones citogenéticas posteriores; además, este análisis citogenético sirve de base para estudios taxonómicos y para planear investigaciones relacionadas con mejoramiento (manipulación cromosómica) y evaluación de posibles agentes genotóxicos (lixiviados) que caigan en las corrientes de agua, mediante la identificación de daños cromosómicos, los cuales, son predictivos de potenciales problemas de salud, asociados con la exposición a factores ambientales.

## 1. PROBLEMÁTICA

Se ha determinado el cariotipo para unas 2.800, de las aproximadamente 22.000 especies de peces vivientes conocidas (Nirchio, M *et al.* 2001), lo que representa alrededor del 10%; en cuanto a datos citogenéticos de peces neotropicales dulceacuícolas, hasta el 2005, se describe a 47 familias, 278 géneros y 1.047 especies (Nircho, M. *et al.* 2005), lo cual pone en evidencia que la citogenética de peces es un campo que requiere de mayor exploración.

En Sur América existen aproximadamente 3000spp de peces, de los cuales se estima que en Colombia existan unas 2000sp (Ortega, A. 2004). A pesar de la relativamente alta diversidad que se presenta en peces, en particular los de agua dulce, son muy pobres e imperfectamente conocidos en cuanto a su genética, taxonomía y distribución. En Colombia son pocos los estudios cariológicos que se han realizado en peces; algunos de ellos son: *Prochilodus reticulatus* (Bocachico), *Pseudopimelodus bufonius* (Bagre sapo), *Pimelodus clarias* (Nicuro), *Pimelodius Grosskopffi* (Capaz), *Piractus mesopotamicus* (Cachama negra), *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* (Tilapia negra), entre otros (Bolaños, L. *et al* 1994).

El género *Brycon*, es particularmente diverso en Colombia, donde se reportan 14 especies: *B. amazonicus*, *B. falcatus*, *B. fowleri*, *B. henni*, *B. labiatus*, *B. medemi*, *B. meeki*, *B. moorei*, *B. oligolepis*, *B. posadae*, *B. rubricauda*, *B. sinuensis* y *B. whitei*, de las cuales ocho son endémicas (Montoya, A *et al* 2006); sin embargo, para estudios cariológicos de este género, solo se conoce el realizado por Parada, S. *et al* (2003), en la especie *Brycon siebenthalae*.

El Grupo de Investigación de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, ha realizado dos estudios citogenéticos en peces de agua dulce; el primero realizado por Bolaños *et al* (1994), reporta el cariotipo para las especies *Piractus brachypomun*, *Prochilodus reticulatus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* y *Oreochromis roja*; el segundo realizado por Alzate *et al* (1991), de las especies *Pimelodus grosskopffi* y *Pimelodus clarias*, de la parte alta del río Cauca; cabe anotar que en las bases de datos consultadas no se registran otros estudios de este tipo en el Departamento del Cauca.

La familia Characidae es el grupo más complejo y grande entre el orden Characiformes, comprendiendo cerca de 30 subfamilias (Dos Santos y Morelli 2006), 170 géneros y 1.400 especies (Rubert y Margarido 2007). El género *Brycon* comprende aproximadamente 40 especies de peces (Margarido y Galetti 1999). Sin embargo, hasta la fecha, la información

disponible sobre el cariotipo de los peces de la familia Characidae, es prácticamente desconocida y se limita solamente a estudios realizados para los géneros *Astyanax*, *Bryconamericus*, *Oligosarcus*, *Triportheus* y *Salminus*; del género *Brycon* se conoce de las especies *Brycon lundii*, *Brycon microlepis*, *B. brevicauda*, *B. orbignyanus*, *B. cephalus* (Margarido, V *et al* 1999), *B. insignis*, *B. cf renhardti* (De Almeida-Toledo *et al* 1996) y *Brycon siebenthelae* (Parada, S. *et al* 2003), no obstante, de la especie *Brycon meeki* específicamente, no hay reportes cariológicos, razón de más que deja al descubierto la necesidad de realizarlo.

En ésta investigación se responderán básicamente los siguientes interrogantes:

¿Cuál es el número y tipo de cromosomas característicos de la especie *Brycon meeki*?

¿Existen diferencias cromosómicas entre los dos sexos de la especie *Brycon meeki*; es decir, poseen heterocromosomas?

Ambas preguntas implican realizar una investigación descriptiva de tipo observacional. Para la primera pregunta, los resultados serán analizados mediante estadística descriptiva. Para la segunda pregunta, se someterá a prueba la siguiente hipótesis:

Si los cromosomas de machos y hembras de *Brycon meeki*, son semejantes, no se detectarán diferencias numéricas, ni de forma, ni de tamaño; de lo contrario, de alguna de las variables antes anotadas, se detectará diferencia significativa estadística.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La determinación del cariotipo, en las diferentes especies, es importante desde el punto de vista de la citotaxonomía, puesto que ésta permite la diferenciación genética más allá de la diferenciación morfológica dada por la taxonomía, permitiendo de ésta manera ubicarlas específicamente dentro de las diferentes familias y géneros, e, incluso, corroborar ubicaciones taxonómicas ya establecidas, o por el contrario, cambiarlas o reubicarlas.

En relación con la diversidad biológica, los peces forman un grupo aparte de los demás grupos de vertebrados; con una amplia diversidad y relativamente escasos estudios realizados hasta el momento, el conocimiento que se tiene de la ictiofauna aún es muy reducido. Este problema se ha agravado en los últimos tiempos por el hecho de que el ser humano está dañando de forma irreparable el ambiente en muchas áreas, conduciendo a la extinción de muchas especies que aún no son conocidas. Por estas razones, se torna cada vez más importante y urgente la necesidad de estudiar las especies presentes en los ecosistemas. En este punto es necesario señalar que los estudios requeridos no se circunscriben a la simple identificación de especies, sino que deben abarcar todas las áreas y aspectos posibles, de manera que las futuras generaciones dispongan de información que les permita aprovechar ese conocimiento al máximo.

Algunos peces se han reportado como importantes bioindicadores de los sistemas acuáticos, pues permiten predecir los impactos ambientales producidos por fenómenos de distinto origen, mediante estudios prospectivos. *Brycon meeki* es una especie muy exigente en cuanto a la calidad del agua y debe ser estudiada integralmente para preservarla mejor y contribuir a futuras investigaciones que se planteen a partir del conocimiento de sus cromosomas, como los estudios taxonómicos, de mejoramiento genético y de evaluación genotóxica.

Dentro de la gama de soluciones propuestas al problema de la obtención de recursos alimentarios, se ha situado la producción de líneas de peces de alto rendimiento, a partir de progenitores que muestren características deseables, tales como rápido crecimiento, eficientes tasas de conversión de alimento, resistencia a enfermedades, alto índice de viabilidad de embriones, etc. En este contexto es conveniente explorar las posibilidades que ofrezcan los híbridos de especies que tengan características deseables. El territorio Colombiano cuenta con una superficie continental de 1.141.748 km<sup>2</sup> y una superficie marina de 930.000 km<sup>2</sup> (Mojica, J. I *et al.* 2002), que significan un enorme potencial de recursos acuáticos, tales como la pesquería y la acuicultura. Este potencial, de gran magnitud, puede incrementarse si se logran establecer líneas ícticas de rendimiento incrementado o portadoras del vigor híbrido (Uribe, M *et al.* 1988); es por esto, que la

especie *Brycon meeki* es de gran utilidad puesto que es uno de los peces de mayor importancia económica para el país, en especial para la región del Patía. Colombia es un país productor de excelente carne blanca en todas sus aguas marinas y continentales, por lo tanto, se hace necesario el mejoramiento paulatino en pro de la actividad íctica; es decir, desarrollar metodologías que contribuyan al mejoramiento de las especies para obtener una mayor productividad en beneficio de la comunidad.

*Brycon meeki* pertenece a la familia Characidae, la más numerosa entre los Characiformes que incluye cerca del 55% de los peces de agua dulce pertenecientes a este orden (Margarido, Vladimir.1999). Es una de las especies ícticas de importancia en la pesquería de grandes ríos como el Patía y otros del Anden Pacifico Colombiano; pero ha mostrado rendimientos muy bajos y cada vez disminuye su producción (Caicedo, J. 2004), razón por la cual ha sido objeto de estudio en diferentes campos, más específicamente desde el punto de vista de la acuicultura; sin embargo, no ha sido abordado a partir de la citogenética; solo existen estudios citogenéticos sobre los géneros *Triportheus* (Artoni, R. et al 2002), *Astyanax* (Dos Santos A. et al 2006), *Bryconamericus* (Marques, T. et al 2003; De Brito et al 2007), *Oligosarcus* (Rubert, M. et al 2007), *Salminus* (Margarido, V et al 1999) y sobre las especies *Brycon lundii*, *Brycon microlepis*, *B. brevicauda*, *B. orbignyianus*, *B. cephalus* (Margarido, V et al 1999), *B. insignis*, *B. cf renhardti* (De Almeida-Toledo et al 1996) *Brycon siebenthelae* (Parada, S. et al 2003), lo cual es un número muy reducido si se considera que el género *Brycon* comprende alrededor de 40 especies (Margarido, V et al.1999), por lo tanto, se hace urgente realizar estudios de este tipo a los diferentes géneros de esta familia, para incrementar el conocimiento de los mismos.

Por ello, como contribución a la documentación citogenética de los Characidae y como parte de un estudio preliminar, en éste trabajo se presenta la primera descripción del cariotipo de *Brycon meeki*, con el fin de conocer la organización cromosómica de ésta especie y como punto de partida para investigaciones posteriores que incluyan técnicas de bandedo (bandas G, C, R, Q, NORs, entre otras), además, para que pueda ser utilizado en estudios de citotaxonomía, en proyectos de acuicultura y como un sistema biológico para la evaluación de agentes genotóxicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Realizar el análisis cariológico (número y tipo de cromosomas) de la especie íctica nativa de importancia económica, *Brycon meeki*, para su caracterización genética y como instrumento para la identificación de semejanzas y diferencias intersexo.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estandarizar la técnica de extracción de cromosomas, mediante el cultivo del tejido de riñón y tinción con giemsa, de la especie íctica *Brycon meeki*.
2. Identificar el número y tipo de cromosomas característicos de la especie *Brycon meeki*, con el fin de montar el cariograma respectivo.
3. Identificar diferencias cromosómicas intersexo, con el fin de comprobar posibles mecanismos cromosómicos de herencia del sexo (Presencia de heterocromosomas).

#### 4. ANTECEDENTES

La década del 60 marcó un importante hito en la historia de la Citogenética. En este tiempo se empezaron a realizar trabajos observando cromosomas mediante el empleo de cortes histológicos seriados, de baja resolución, que causaba muchos errores de interpretación. Hacia el final del siglo antepasado (1890), una investigación realizada por Retzius permitió sugerir la presencia de 50 cromosomas en la especie *Myxine glutinosa* (Anguila babosa) y el trabajo de Kastschenko que insinuó la presencia de 30 a 50 cromosomas en el pez *Pristiurus melanostomus*; sin embargo, la caracterización cromosómica en los peces se hizo efectiva desde 1960, gracias al desarrollo de técnicas refinadas de cultivos de células y tejidos en mamíferos (Nirchio, M *et al.* 2005).

Los primeros estudios cariológicos registrados en peces neotropicales datan de 1975 en dos especies de *Astyanax* por Jim y Toledo; un año después, Toledo y Ferrari (1976) estudiaron al género *Pimelodidae*, Michele *et al* (1977a, 1977b) realizaron estudios en las familias *Chilidae* y *Loricariidae*.

A partir de 1982, se determinó que la tecnología genética de los peces se podía clasificar en los siguientes tópicos: selección, identificación y remoción de genes recesivos letales de la población de peces, intercruces de líneas, ingeniería cromosomal (manipulación cromosómica), criopreservación de gametos y embriones e hibridación (Carvajal, S. 2000).

De los diferentes estudios genéticos realizados se han identificado ciertos principios básicos:

- La mayoría de peces poseen solo cromosomas autosómicos (citado por: Carvajal, S. 2000).
- Unas pocas especies de peces presentan cromosomas sexuales (citado por: Carvajal, S. 2000).
- En peces, se encuentran números cromosómicos entre  $2n=12$  a  $2n=446$ ; y el tamaño cromosómico entre 1 a  $30\ \mu\text{m}$  (Nirchio, M *et al* 2005).
- La mitosis y la meiosis de los peces, son similares a la de los demás vertebrados (citado por: Carvajal, S. 2000).
- Debido a cambios cariológicos, la especiación de los peces se ha hecho en largos períodos de tiempo (Chen 1971).
- Mediante la determinación del número de cromosomas y la medición y clasificación de éstos, se ha hecho el estudio de especies relacionadas (*Fundulus*) logrando una visión del desarrollo y parentesco evolutivo (Chen 1971).

- Según Ohno *et al* (1976), “mientras menor sea el número  $2n$  que incluya al mayor número de metacéntricos, la especie íctica será mas evolucionada que otra que posea un  $2n$  mayor y que incluya mas acrocéntricos”.

En los últimos años el estudio citogenético de peces neotropicales ha presentado una considerable expansión. La primera revisión sobre datos citogenéticos de peces neotropicales dulceacuícolas, realizada por Almeida-Toledo (1978), incluye los números haploides y/o diploides de 252 especies de agua dulce de América del Sur y Central. Diez años después (Oliveira *et al.*, 1988), indica los números haploides y/o diploides de 421 especies, distribuidas en 141 géneros y 32 familias. Para el año 2000 los datos disponibles para peces de agua dulce (Oliveira *et al.*, 2000), recopilan los números diploides y/o haploides de 921 especies (113% más que en 1988), 252 géneros (74% más que en 1988) y 44 familias (33% más que en 1988). El último dato registrado para el 2005 describe 47 familias, 278 géneros y 1.047 especies dulceacuícolas y 39 familias, 73 géneros y 109 especies marinas (Nircho, M. *et al.* 2005).

En Sur América existen aproximadamente 3000spp de peces, de los cuales se estima que en Colombia existan unas 2000spp (Ortega, A. 2004). A pesar de la relativamente alta diversidad que se presenta en peces, en particular los de agua dulce, son muy pobres e imperfectamente conocidos en cuanto a su genética, taxonomía y distribución. En Colombia son pocos los estudios cariológicos que se han realizado en peces; algunos de ellos son: *Prochilodus reticulatus* (Bocachico), *Pseudopimelodus bufonius* (Bagre sapo), *Pimelodus clarias* (Nicuro), *Pimelodius Grosskopffi* (Capaz), *Piractus mesopotamicus* (Cachama negra), *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* (Tilapia negra), etc. Así mismo, este género es particularmente diverso en Colombia, donde se reportan 13 especies: *B. amazonicus*, *B. falcatius*, *B. fowleri*, *B. henni*, *B. labiatus*, *B. medemi*, *B. meeki*, *B. moorei*, *B. oligolepis*, *B. posadae*, *B. rubricauda*, *B. sinuensis* y *B. whitei*, de las cuales ocho son endémicas (Montoya, A *et al* 2006); estudios cariológicos de este género, se conoce para este país, el de *Brycon siebenthalae* (Parada, S. *et al* 2003).

Los estudios citogenéticos de peces Neotropicales, han revelado una amplia diversidad cariológica. Dentro de este orden se han identificado dos corrientes: la primera, son grupos cariológicamente homogéneos y la otra son grupos con una alta variabilidad citogenética (Bertollo, M *et al.* 1986)(citado por: Brassesco, M *et al* 2004). La familia Characidae se encuentra ubicada dentro de la primera corriente, puesto que este grupo de peces presentan un cariotipo poco variable.

El orden Characiformes ha sido muy estudiado dentro del campo de la citogenética. Cesar Martins en 1998, estudió los peces neotropicales de agua dulce de la familia Anostomidae, más específicamente las especies *Schizodon borelli* y *Schizodon isognathum* y concluyó que las especies del género *Schizodon* muestran un alto grado de similaridad morfológica y ecológica comparado con otros Anostómidos; además, muestran una baja variabilidad en el

cariotipo. Esta información podría relacionarse con los rasgos poblacionales o, alternativamente, podría indicar que el mantenimiento de un cariotipo simétrico y conservado representa una organización genómica óptima entre estos peces.

Brassesco, M.S *et al* en el 2004, estudiaron peces de la familia Curimatidae, en la cual la macroestructura del cariotipo al parecer es conservada, los procesos de especiación dentro de la familia se han acompañado por rearrreglos microestructurales, como fue evidenciado por los patrones de diversidad en las regiones heterocromáticas y organizadores nucleolares.

Según Harvey, S.C en el 2002, peces del género *Oreochromis*, presentan un cariotipo altamente conservado con un complemento diploide de  $2n = 44$ . Sin embargo, sus estudios con las especies *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis karongae*, muestra algo de variabilidad con  $n = 44$  y  $n = 38$  respectivamente. No obstante, ésta diferencia en el número cromosómico no evita que se dé la producción de híbridos entre ellos.

Oliveira *et al* (1996), referencia los números diploides de 706 especies, variando de  $2n=20$  para *Pterolebias longipinnis* a  $2n=134$  para *Corydoras aeneus*, además de cromosomas sexuales verificados para 40 especies de peces. En el orden Characiformes se exhibe una amplia variación en el número diploide; así, se observan casos como en *Hemigrammus* con  $2n=28$  hasta  $2n=102$  en *Potamorhina altamazonica* (Artoni, R.F. *et al* 2000).

A nivel global, se han reportado pocos estudios citogenéticos sobre la familia Characidae como también específicamente de la especie *Brycon meeki*. Los únicos trabajos citogenéticos sobre la familia Characidae son los realizados por Margarido P. Vladimir (1999), De Brito, P *et al* (2000), RF Artoni y LAC Bertollo (2002), Marques (2003), Parada, S *et al* (2003) y más recientemente, Dos Santos, A y Morelli S (2006) y Rubert M. y Margarido, V. (2007). El trabajo realizado por Margarido P. Vladimir se basó en el análisis del cariotipo de los géneros *Brycon* y *Salminus*, identificando relaciones entre y dentro de ellos. La macroestructura del cariotipo observado en *Brycon* es realmente similar al complemento cromosómico de *S. hilarii* y otras especies de *Salminus* (*S. maxillosus* y *S. brasiliensis*), estudiadas a través de tinción con Giemsa y Plata. Sugiriendo de esta manera que este cariotipo puede ser ancestral para algunos Characidae. Sin embargo, el bandeo C muestra diferencias significativas dentro y entre el género *Brycon* y *Salminus*. Por otro lado, RF Artoni y LAC Bertollo (2002), estudiaron peces del género *Triporthus*, demostrando que es un género de peces que muestra un número diploide constante ( $2n=52$ ) y una macroestructura cariotípica relativamente conservada, así como también, un sistema cromosómico sexual ZZ/ZW diferenciado. Estos antecedentes evidencian que en el orden characiformes, existen cariotipos muy estables y conservados. En el 2003, Marques Tania, realizó la caracterización citogenética de una población de *Bryconamericus* aff. *iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae), encontrando diferencias entre las poblaciones de este género; aunque el número diploide de 52 cromosomas es característico de *Bryconamericus*, el cariotipo para las diferentes especies, en este género, varía, sugiriendo que los rearrreglos cromosómicos pueden estar involucrados en la evolución del cariotipo de éste grupo de

peces. La especie *Brycon siebenthalae* estudiada por Parada, S. *et al* (2003), muestra un número cromosómico de  $2n=50$  (24 m, 26sm/st), el cual es similar al de otros Bryconidos de la cuenca amazónica. Así mismo, se observa un par cromosómico de gran tamaño, distintivamente grande con respecto a los demás del complemento, haciendo pensar que ésta es una característica de marca de género. Dos Santos, A y Morelli S (2006), realizaron análisis citogenéticos de dos poblaciones de *Astyanax scabripinnis*. Ambas poblaciones presentaron un número diploide  $2n=50$  cromosomas. En este caso se realizaron tinciones con nitrato de plata (NORs) evidenciando un sistema de múltiples NORs, además se identificaron bloques de heterocromatina constitutiva en la región telomérica de algunos cromosomas subtelocéntricos y acrocéntricos. Por último, Rubert M. y Margarido, V. (2007), identificaron un número cromosómico de  $2n=50$  para el género *Oligosarcus* con fórmula cromosómica  $4m + 10sm + 16st + 2a$ . La tinción con plata reveló en algunas especies NORs sencillos y en otras NORs múltiples, además la heterocromatina juega un papel importante en la diversificación cromosómica de especie de este género.

La aplicación de los conocimientos citogenéticos en proyectos de piscicultura que hace algunos años atrás constituía una posibilidad promisoriosa, hoy puede ser considerada como una realidad; las técnicas de manipulación cromosómica pueden ser aplicadas fácilmente en peces, ya que estos organismos presentan generalmente fecundación externa. La aplicación más directa del conocimiento citogenético en piscicultura es la identificación de híbridos. Así, por ejemplo, los estudios de Almeida, L.F *et al.* (1987, 1988) mostraron que era posible distinguir los cariotipos del pacu (*Piaractus mesopotamicus*) y del tambaqui (*Colossoma macropomum*), de forma que los híbridos entre esas especies podían ser fácilmente caracterizados, pues presentaban cromosomas de las dos especies parentales. Recientemente, Nirchio *et al.* (2003) también demostraron que las especies parentales *C. macropomum* y *P. brachypomus* pueden ser perfectamente identificables y distinguidas del híbrido *C. macropomum* x *P. brachypomus* mediante la tinción convencional con Giemsa, la impregnación con Nitrato de plata y la Hibridación Fluorescente *in situ*.

Otra línea de trabajo bastante interesante se relaciona con la producción de linajes poliploides. En este caso, Carvalho, E. D (1992) ha obtenido triploides de dos especies de peces de interés comercial, *Colossoma macropomum* y *Piaractus mesopotamicus*; sometiendo los óvulos recién fertilizados a tratamientos físicos (choques de temperatura y de presión) o químicos (tratamiento con drogas como colchicina). Estos tratamientos inhiben la liberación del segundo corpúsculo polar, haciendo que en los embriones se produzca la presencia de tres conjuntos cromosómicos.

La manipulación cromosómica también puede emplearse para crear individuos cuyos genomas completos provienen de la madre (ginogénesis) o del padre (androgénesis). Con relación al primero de los casos, se debe señalar que la ginogénesis es la forma natural de reproducción de unas pocas especies, tales como *Poecilia formosa* y *Carassius auratus gibelius*. La ginogénesis y la androgénesis, pueden ser empleadas para obtener cepas monosexuales. La ginogénesis permite crear las llamadas superhembras (WW) en especies que tienen el sistema de determinación sexual ZZ-WZ. Al igual que la ginogénesis, la

androgénesis puede emplearse para examinar los efectos de alelos recesivos y producir organismos altamente consanguíneos. En términos generales, la producción de ginogénéticos o androgenéticos permite la obtención de linajes con reducida variabilidad genética que puede ser utilizada en diversos experimentos de mejoramiento genético (Nirchio, *et al* 2005). Por lo expuesto, es indudable que la manipulación cromosómica surge como un área de investigación aplicada de gran importancia en los cultivos de peces.

**Tabla 1. Resumen de Antecedentes**

<b>AUTOR/AÑO</b>	<b>FAMILIA</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>TECNICA</b>	<b>RESULTADOS</b>
Martins, Cesar 1998	Anostomidae	<i>Schizodon borelli</i> <i>Schizodon isognathum</i>	Cultivo riñón, FISH.	2n=27, Sin Heterocromosomas
Venere, C. <i>et al</i> 2004	Anostomidae	<i>Leporinus</i> <i>Trifasciatus</i>	Cultivo riñón NORs Bandeo C	2n=54, Sistema cromosómico sexual ZZ/ZW
Bellafronte, E. <i>et al</i> 2005	Parodontidae	<i>Parodon nasus</i> y <i>Parodon tortuosus</i>	Cultivo riñón, NORs. FISH. Bandeo C	2n = 54 Sin Heterocromosomas
Brassesco, M.S <i>et al</i> 2004	Curimatidae	<i>Steindachnerina</i> <i>conspersa</i> <i>Potamorhina</i> <i>squamoralevis</i>	Cultivo riñón, NORs. Bandeo C	2n = 54, Sin Heterocromosomas
De Rosa, L <i>et al</i> 2007	Curimatidae	<i>S. insculpta</i> <i>Cyphocharax</i> <i>modesta</i>	Cultivo riñón, NORs. FISH. Bandeo C	2n = 54, sin diferenciación sexual
Margarido, P y Galetti, P. 1999	Characidae	<i>Brycon lundii</i> , <i>Brycon microlepis</i> <i>Salminus hilarii</i>	Cultivo riñón Bandeo C NORs, DAPI	2n=50, sin diferenciación sexual
Artoni, R.F <i>et al</i> 2002	Characidae	<i>Triportheus</i>	Cultivo riñón, Cultivo <i>inVitro</i> , NORs Bandeo C	2n=52 y sistema cromosómico sexual ZZ/ZW diferenciado
Marques, Tania 2003	Characidae	<i>Bryconamericus</i> aff. <i>iheringii</i>	Cultivo riñón, NORs, Bandeo C	2n=52, sin Heterocromosomas
Parada, S <i>et al</i> 2003	Characidae	<i>Brycon siebenthalae</i>	Cultivo <i>in</i> <i>Vitro</i> linfocitos	2n=50 24m + 26 sm/st
Dos Santos, A <i>et al</i> 2006	Characidae	<i>Astyanax scabripinnis</i>	Cultivo riñón NORs, Bandeo C	2n=50
Rubert, M. <i>et al</i> 2007	Characidae	<i>O. paranensis</i> <i>O.</i> <i>pintoi</i> <i>O. longirostris</i>	NORs y Bandeo C	2n=50,

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PECES

Los peces constituyen el grupo más numeroso del fílum de los vertebrados, representando alrededor de la mitad de las especies. Se los encuentra en agua dulce y salada, tanto en los abismos oceánicos como en los lagos de alta montaña, desde las regiones polares a los oasis de los desiertos. Bajo el nombre de *peces* se engloban dos grupos diferentes, tanto desde el punto de vista evolutivo como del morfológico y anatómico: peces **cartilagosos** y peces **óseos**. Otros dos grupos, relacionados con los peces de manera puramente formal, debido a su morfología y su modo de vida, son las **lampreas** y los **mixinos** que son formas particularmente arcaicas, aunque algunos autores los consideran como otro grupo de peces (sin mandíbula) (Lima, F.C.T *et al.* 2003).

Existen aproximadamente unas 22.000 especies de peces, de las cuales, un 40% vive en agua dulce y un 60% en los mares. Sólo unas pocas especies pueden pasar de uno de estos medios al otro (salmónidos, acipenséridos, anguilas). Entre las especies marinas, más de tres cuartas partes viven en la zona litoral hasta una profundidad de 200 m, una décima parte son *pelágicas* y una vigésima parte vive en las grandes profundidades (Lima, F.C.T *et al.* 2003).

### 5.2 ICTIOFAUNA NEOTROPICAL

La ictiofauna Neotropical (Fig. 1) de peces dulceacuícolas es bastante rica, incluye alrededor de 71 familias y 4.475 especies conocidas (Reis *et al.* 2003). El más reciente inventario realizado por Reis *et al* sugiere la existencia de 6.000 especies en los ríos y lagos de la región Neotropical, mientras que la estimación disponible sobre la cantidad de peces de agua dulce para todo el planeta se encuentra en el orden de 13.000 especies (Nirchio *et al.*, 2005).

La región Neotropical corresponde aproximadamente a lo que conocemos como "Latinoamérica"; abarca el sur de México, las Antillas, Centroamérica y toda Sudamérica (Nirchio, M *et al.* 2005).

En un estudio de tendencias históricas de descripción de especies de Characidae y Loricariidae, realizada por Schaefer (1998), se estimó que podían existir aproximadamente 8.000 especies de peces neotropicales de agua continental, lo que correspondería al 25% de todas las especies de peces dulceacuícolas del mundo. Este número fue discutido y

aceptado por Vari y Malabarba (1998) quienes sostienen que toda esta diversidad de peces neotropicales de agua dulce ocurre en menos del 0,003% del agua continental del planeta.

**Figura 1. Región Neotropical**



Fuente: Manual de Citogenética de Peces (Nirchio *et al.*, 2005)

### **5.3 FAMILIA CHARACIDAE**

La familia Characidae es el grupo más grande de peces de agua dulce en Sur América, conteniendo cerca de 170 géneros y 885 especies (Marques, T.R *et al.* 2003). También son muy frecuentes en México, Centroamérica y África; son exclusivos de agua dulce y habitan arroyos, ríos y lagos. Se conocen más de 1.400 especies en total. Es posible reconocerlas por la presencia de una aleta corta y adiposa (grasa) situada entre la cola y la aleta dorsal. El carácido de mayor tamaño es el pez tigre africano, que alcanza una longitud de 1,3 m, mientras el más pequeño es el carácido azul pigmeo boliviano, que mide 15 milímetros. Aunque los carácidos tienden a ser pequeños, con el cuerpo en forma de cigarro o aplastado lateralmente, muchas especies han evolucionado de manera divergente en lo que se refiere a la forma del cuerpo y la boca, como adaptación a la captura de gran variedad de presas y alimentos. Algunas especies son herbívoras estrictas, mientras que otras se alimentan sólo de otros peces. Varían desde especies omnívoras lentas, corpulentas, que se mueven en bancos, hasta especies depredadoras solitarias de movimientos rápidos, con forma de torpedo. Muchas especies exhiben un colorido brillante, como los “tetras neón”, muy populares entre los aficionados a los acuarios. La mayoría de los carácidos dispersan sus huevos entre las plantas acuáticas, en donde las crías se protegen de los depredadores. Ciertas especies emigran a hábitats con vegetación acuática densa, durante la estación de reproducción. Entre las especies de mayor tamaño son muy conocidas las pirañas y los pacúes (Lima, F.C.T *et al.* 2003).

## 5.4 ESPECIE *Brycon meeki*

Figura 2. *Brycon meeki*



### 5.4.1 Taxonomía

- Reino:** Animal
- Phylum:** Chordata
- Grupo:** Craniana (Vertebrata)
- Subphylum:** Gnathostomata
- Superclase:** Piscis
- Clase:** Osteichthyes
- Subclase:** Actinopterygii
- Grupo:** Teleostei
- Superorden:** Teleosteica
- Orden:** Heterognati
- Suborden:** Characinae
- Familia:** Characidae (o Characinidae)
- Subfamilia:** Bryconinae
- Genero:** *Brycon*

**Especie:** *Brycon meeki*

**Nombres Comunes:** Sábalo (sur de Colombia y Ecuador), Salmones (Uruguay y Argentina)

**5.4.2 Descripción.** *Brycon meeki* es una especie que corresponde al grupo de peces neotropicales de mayor popularidad y accesibilidad para los pescadores deportivos que habitan el Centro y Sur de América. Especie de gran tamaño que puede alcanzar tallas hasta de 32cm o más, está cubierta de escamas cicloideas, sus aletas están desprovistas de espinas punzantes y poseen dientes multicúspides resistentes (Caicedo, J. 2004). Se caracterizan principalmente por poseer una aleta adiposa y unas escamas bien desarrolladas. La mandíbula superior sobresale notoriamente sobre la inferior; radios de la aleta anal entre 33-35; base de la aleta anal mayor que la longitud de la cabeza, escamas pequeñas, coloración del cuerpo plateada sin mancha humeral ni peduncular; dorso de la cabeza amarillento, aletas amarillentas en la base de los radios y hialinas en los extremos (Ortega, A 2004).

**5.4.3 Ecología.** El sábalo es una especie que se localiza principalmente en sistemas lóticos con buena condición físico-química, temperatura entre 19°C y 25°C, exigente porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (mayor de 80%), y pH entre 6 y 7.5, es reofílica. Su hábito alimenticio es omnívoro con tendencia carnívora, preferiblemente peces pequeños y macroinvertebrados (Caicedo, J. 2004). En estado adulto, ésta especie se encuentra asociada preferiblemente al canal central de los ríos en los sitios con turbulencia; en ocasiones se los encuentra en remansos en donde el aporte del material alóctono es abundante; los juveniles con frecuencia penetran ríos y quebradas de bajo caudal; se alimentan principalmente de semillas, frutos y otros materiales vegetales, aunque también consume peces pequeños (Ortega, A 2004).

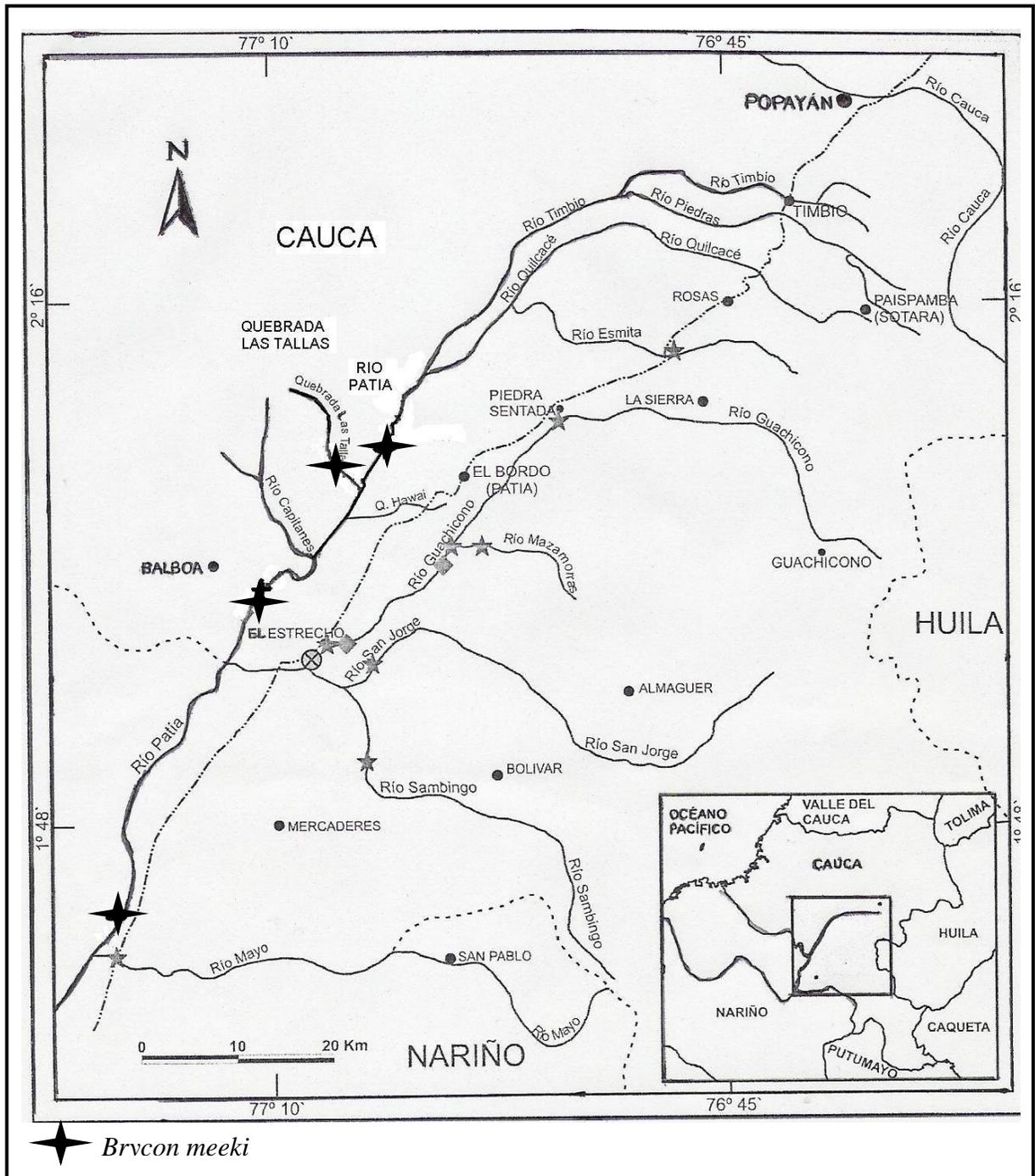
**5.4.4 Distribución Geográfica.** El sábalo es una especie endémica de Colombia, de amplia distribución en la vertiente del Pacífico, es un pez exclusivo de agua dulce, vive en los arroyos, ríos y lagos (Caicedo, J. 2004). Presente en las cuencas de los ríos San Juan, Dagua y Patía al oeste de Colombia y el Andén Pacífico Caucaño (Figura. 3) (Ortega, A 2004).

**5.4.5 Estado de Conservación.** Con base en la información de los habitantes de la región, las poblaciones de esta especie han disminuido dramáticamente, y considerando que es la principal especie dentro de las pesquerías tanto artesanales como deportivas en la región, se debe considerar dentro de la categoría de casi amenazado (NT) (Ortega, A 2004).

**5.4.6 Importancia Económica.** Debido a que actualmente esta especie se considera casi amenazada, su importancia económica ha disminuido considerablemente. Años atrás fue la especie por excelencia en la región, de gran importancia económica y de una atracción turística de primer orden. En la época de verano se realizaban torneos de pesca deportiva en

donde se evaluaba la talla máxima, peso máximo y número de ejemplares capturados en un tiempo determinado (Ortega, A 2004).

**Figura 3. Distribución Geográfica de la especie *Brycon meeki* en la región del Cauca, Río Patía.**



Fuente: Peces del Río Patía (Ortega 2004).

## 5.5 VERTIENTE DEL PACÍFICO

A la vertiente del pacífico pertenecen más de 200 ríos, entre los principales se encuentran el río Patía, Baudó, San Juan y Mira. Sus ríos suelen ser muy caudalosos y cortos.<sup>1</sup> El territorio que conforma el Litoral Pacífico equivale al 6.2% de la superficie del país. Posee 1.400 Km. de longitud, 49.663 Km<sup>2</sup> de área que generan 16.700 Km<sup>2</sup> de plataforma comprendida entre la frontera con Panamá y la desembocadura del río Mataje en la frontera con el Ecuador, constituyendo una unidad ecológica, geográfica, económica, racial y sociocultural claramente diferenciable del resto del país (Escobar, J. 2002).

**5.5.1 Río Patía.** El Patía es el río más extenso de la vertiente Pacífica de Colombia y de Suramérica, con sus 400 km de curso, de los cuales sólo son navegables 90 debido a que es un río de montaña y llanura. Su recorrido lo realiza en dirección sur, entre las cordilleras Central y Occidental, para entrar luego en la llanura del Pacífico donde recibe su principal afluente, el Telembí<sup>2</sup> (Figura 3).

## 5.6 LA CITOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES

La citogenética se basa en el hecho de que el material hereditario se encuentra organizado en unidades de información denominadas “cromosomas”. La ocurrencia universal de cromosomas como unidades de la herencia, sugiere que éstos hayan aparecido muy temprano en la Historia de la vida. Históricamente la citogenética es una ciencia híbrida, originalmente constituida por la citología y la genética. La citología tuvo su inicio con la invención del microscopio en el siglo XVII. Los estudios iniciales indicaron la existencia de unidades elementales en los seres vivos, lo que culminó con el desarrollo de la teoría celular en 1850, según la cual los seres vivos están formados por células y productos celulares. Durante el período comprendido entre 1850 y 1900, hubo un gran avance en la identificación de los constituyentes celulares y de sus procesos biológicos llegando al descubrimiento de los procesos de mitosis y meiosis. En 1888 Waldeyer creó el término “cromosoma” para identificar las pequeñas unidades estructurales que se formaban en el núcleo en un determinado período del ciclo celular (Nirchio, M *et al.* 2005).

El conocimiento sobre la diversidad biológica es el punto de partida para todos los estudios básicos o aplicados relacionados con las ciencias de la vida y la identificación de las especies, así como también la habilidad de identificarlas y/o nombrarlas es fundamental para estudios de ecología, comportamiento, evolución y todas las otras disciplinas relacionadas con los organismos. Hoy en día la citogenética se ha convertido en una importante herramienta para la identificación de especies debido a la posibilidad de

---

<sup>1 y 2</sup> [Colombialink.com/index\\_geografia\\_hidrografia.html](http://Colombialink.com/index_geografia_hidrografia.html)

organizar los cromosomas mediante técnicas de cultivos celulares y procesos de tinción. Con éstas técnicas se pretende identificar células en metafase de donde se puedan tomar los cromosomas y organizarlos según su tamaño y posición del centrómero. Este proceso es el punto de partida para la caracterización cromosómica de las especies y su posterior análisis mediante técnicas más específicas.

## 5.7 CROMOSOMAS

La citogenética es el estudio de los cromosomas y las enfermedades relacionadas, causadas por un número y/o estructura anormales de los cromosomas. Los cromosomas son estructuras complejas localizadas en el núcleo de las células, compuestos por ADN, histonas y otras proteínas, ARN y polisacáridos. Son básicamente los "paquetes" que contienen el ADN. Normalmente, los cromosomas no se pueden ver con un microscopio óptico, pero durante la división celular se condensan lo suficiente como para poder ser fácilmente analizados a 1.000 aumentos. Para obtener células con sus cromosomas en estado condensado se las expone a un inhibidor de la mitosis, que bloquea la formación del huso mitótico y detiene la división celular en la etapa de metafase (Donald, Mc. 2002). Se pueden usar distintos tejidos para obtener preparaciones de cromosomas; por ejemplo, sangre periférica, medula ósea, fluido amniótico y productos de la concepción. Aunque las técnicas específicas difieren según el tejido usado, el método básico para obtener preparaciones de cromosomas es así (Donald, Mc. 2002):

- Recolección de la muestra y preparación inicial.
- Cultivo celular.
- Adición de un inhibidor de la mitosis para detener las células en metafase.
- Recogida de las células. Este paso es muy importante para obtener preparaciones de alta calidad. Implica exponer las células a una disolución hipotónica, seguida de una serie de disoluciones fijadoras. Esto hace que las células se expandan, de modo que los cromosomas se extiendan y puedan examinarse individualmente.
- Tinción de las preparaciones cromosómicas para detectar los posibles cambios numéricos y estructurales.

**5.7.1 Morfología del Cromosoma.** Los cromosomas poseen un brazo corto y otro largo separados por un estrechamiento o constricción primaria, llamada *centrómero*. El brazo corto se designa como *p* y el largo como *q*. El centrómero es el punto de unión del huso mitótico y es parte integral del cromosoma; es esencial para la segregación del cromosoma durante la división celular (Donald, Mc. 2002).

De esta manera, la morfología del cromosoma se encuentra determinada por la localización del centrómero (Tabla 2), el cual puede estar ubicado en cualquier parte a lo largo del cromosoma. Dependiendo de su posición, el cromosoma se clasifica en una de cuatro clases principales: un cromosoma **metacéntrico (M)** presenta el centrómero aproximadamente en el centro del cromosoma, de tal manera que lo divide en dos brazos de longitud similar. En

un cromosoma **submetacéntrico (SM)**, el centrómero se encuentra desplazado hacia un extremo de tal forma que presenta brazos de distinta longitud. Los cromosomas con brazos muy cortos se denominan **subtelocéntricos (ST)** y aquellos en los que es visible solo un brazo con el centrómero en el extremo terminal se denominan **telocéntricos (T)** (Nirchio, M *et al.* 2005).

**Tabla 2. Clasificación de los cromosomas según el valor r y I.C**

POSICIÓN CENTROMÉRICA	r (q/p)	I.C	DESIGNACIÓN	FORMA
Media <i>sensu stricto</i>	1 – <1.7	0.5 - >0.37	Metacéntrico (M)	
Región Media				
Submedia	1.7 - <3.0	0.37- >0.25	Submetacéntrico (SM)	
Subterminal	3.0 – <7.0	0.25 - >0.125	Subtelocéntrico (ST)	
Región Terminal	≥ 7.01	≤ 0.125	Telocéntrico (T)	
Terminal <i>sensu stricto</i>				

Fuente: Nomenclature for centromeric position on chromosomes (Levan *et al.*, 1964).

A fin de reducir la subjetividad a la hora de clasificar los cromosomas, se ha extendido el uso de la nomenclatura propuesta por Levan *et al.* (1964), que consiste en calcular el índice interbraquial (r), que se obtiene dividiendo el tamaño del brazo largo entre el tamaño del brazo corto ( $r = q/p$ ), además del índice centromérico ( $I.C = p/p+q$ ). Dependiendo del valor del índice centromérico se clasifican según se indica en la Tabla 2, en metacéntrico (I.C: 0.5 - >0.37), submetacéntrico (I.C: 0.37 - >0.25), subtelocéntrico (I.C: 0.25 - >0.125), y telocéntrico (I.C: ≤ 0.125).

**5.7.2 Cromosomas Sexuales o Heterocromosomas.** En muchos organismos, un par de cromosomas homólogos es distinto al resto, y esta involucrado en la determinación sexual de los individuos. A estos cromosomas se les llama cromosomas sexuales o heterocromosomas ya que determinan el sexo. Existen tres tipos básicos de determinación del sexo (Donald, Mc. 2002):

- Sistema de determinación XX/XY: En los mamíferos las hembras son homogaméticas, es decir, tienen cromosomas sexuales idénticos (XX) produciendo

gametos de un solo tipo; por el contrario, los machos son heterogaméticos debido a que sus cromosomas son diferentes (XY) en tamaño, morfología y contenido genético.

- Sistema de determinación ZZ/ZW: Esta dado en diferentes animales como mariposas y aves. En este sistema ocurre lo contrario, el sexo masculino es homogamético (ZZ) y el femenino heterogamético (ZW).
- Sistema de determinación XX/XO: Lo presentan especies de insectos, anfibios, entre otros. Se caracteriza por no presentar el cromosoma Y, determinándose el sexo por el número de cromosomas X, de esta manera el macho es XO y la hembra XX. También existe su contraparte: ZZ/ZO

Los cromosomas sexuales se han identificado en aproximadamente 50 especies y/o poblaciones locales de peces de la región Neotropical, incluyendo 36 informes de heterogamia femenina y 20 informes de heterogamia masculina. En algunas especies se ha identificado más de un tipo de mecanismo cromosómico de determinación sexual (Nirchio, M *et al.* 2005).

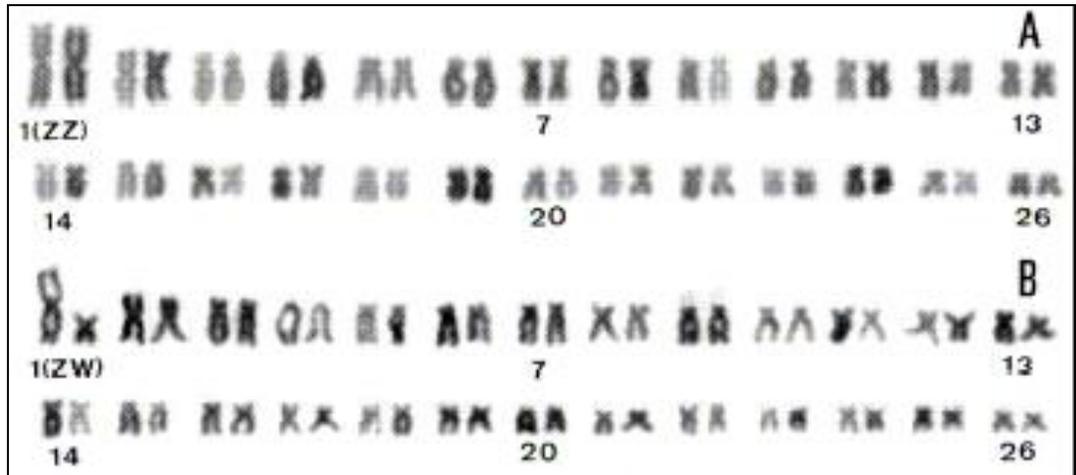
Cinco diferentes sistemas de determinación sexual han sido detectados en peces Neotropicales, cada uno caracterizándose por determinadas líneas generales de eventos evolutivos; de acuerdo a esto, la diferenciación del sistema ZZ/ZW está frecuentemente correlacionada con mecanismos de heterocromatinización, mientras que la evolución de sistemas múltiples (X1X1X2X2/X1X2Y, XX/XY1Y2 y ZZ/ZW1W2) resulta de reordenaciones estructurales de cromosomas, principalmente del tipo translocación. En los casos donde hay cromosomas XY, el cromosoma Y exhibe, en general, un tamaño menor que el X en la mayoría de los casos estudiados, y no se evidencia una aparente heterocromatinización del Y (Bertollo *et al.*, 1990). Las principales formas de determinación sexual encontradas en peces son:

a) El mecanismo ZZ/ZW (Figura. 4) es similar al presentado por las aves. Las hembras son heterogaméticas ZW y los machos homogaméticos ZZ. Lo presentan algunas especies de tilapias: *O. hornorum*, *O. aureus*, *O. macrochir*, *O. varibilis* (Nirchio, M *et al.* 2005).

b) El mecanismo de determinación sexual XX – XY (Figura. 5), es similar al de los mamíferos, en éste las hembras homogaméticas (XX) producen un solo tipo de gametos. Los machos (XY) son heterogaméticos, producen dos tipos de espermios, unos portadores del X y otros del Y. La mezcla al azar de los gametos origina hembras y machos en proporción de 1:1. Se presenta en truchas, salmones, algunas especies de tilapia, tales como: *O. mossambicus* y *O. niloticus* y en los bagres de canal, entre otros (Nirchio, M *et al.* 2005).

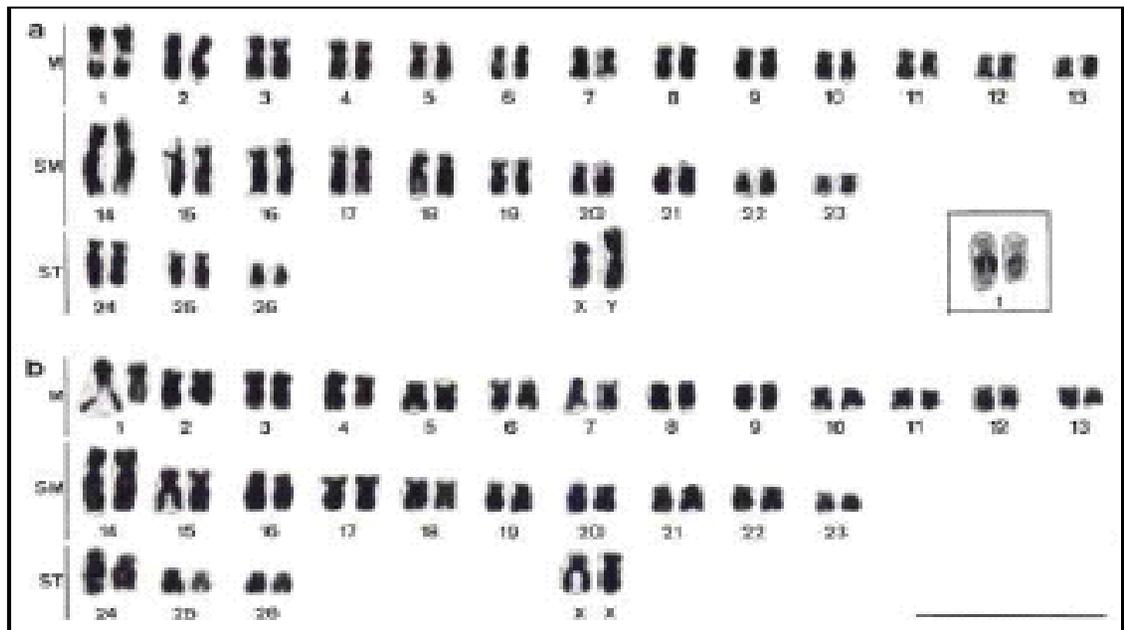
Es importante señalar que se conocen muy pocas especies de peces con cromosomas sexuales diferenciados (heterocromosomas) (Nirchio, M *et al.* 2005).

**Figura 4. Cariotipo del género *Triportheus* (Characiformes, Triporthinae) mostrando la presencia de un sistema cromosómico de determinación del sexo del tipo ZZ/ZW. Macho (A), Hembra (B)**



Fuente: Manual de Citogenética de Peces. (Nirchio, M *et al.* 2005).

**Figura 5. Cariotipo de *Pseudotocinclus tietensis* (Siluriformes, Loricariidae) mostrando la presencia de un sistema cromosómico de determinación sexual de tipo XX/XY. Macho (a) Hembra (b)**



Fuente: Manual de Citogenética de Peces. (Nirchio, M *et al.* 2005).

## 5.8 ANÁLISIS CROMOSÓMICO

Prácticamente todos los análisis citogenéticos de rutina se realizan sobre preparaciones cromosómicas que se han tratado y teñido para producir un patrón de bandas específico de cada cromosoma. Esto permite la detección de cambios sutiles en la estructura de los cromosomas. El tratamiento de tinción más común se llama bandeado G. Se dispone de otras técnicas de tinción que ayudan a identificar anomalías específicas. Una vez que se han obtenido las preparaciones de cromosomas metafásicos teñidos, pueden examinarse al microscopio. Durante un análisis completo, cada cromosoma se compara críticamente banda por banda con su homólogo. Es necesario examinar tantas células para poder detectar un mosaicismo, con significado clínico (Donald, Mc. 2002).

Tras el análisis al microscopio, se toman imágenes de las células en metafase que tengan mejor calidad, ya sea mediante fotografía o por digitalización de imagen computarizada. Cada cromosoma puede entonces disponerse en pares de acuerdo con su tamaño y patrón de bandas, formando un cariotipo. El cariotipo permite al citogenetista examinar aún más en detalle cada cromosoma en busca de cambios estructurales. Se hace entonces una descripción por escrito del cariotipo, definiendo el análisis cromosómico (Donald, Mc. 2002).

**5.8.1 Cariotipo.** Es el ordenamiento y descripción de los cromosomas de una célula metafásica de acuerdo a su número, tamaño y forma de cada tipo de cromosoma del juego completo de cromosomas de un organismo (Donald, Mc. 2002). En los organismos superiores, los cromosomas de cada célula somática ocurren en pares que confieren una constitución diploide a cada especie y que se indica con el número  $2n$ . Las células sexuales (gametos), contienen un solo miembro del par y por lo tanto el número haploide de cromosomas se indica como  $n$  (Nirchio, M *et al.* 2005).

El cariotipo es característico de cada especie; el humano tiene 46 cromosomas o 23 pares de cromosomas, organizados en 22 pares autosómicos y un par sexual. Los peces presentan una alta variabilidad cariotípica, su número diploide varía entre  $2n=12$  en *Gonostoma bathyphylum* y  $2n=446$  en *Diptychus dipogon*; por otro lado en los peces neotropicales los números diploides varían entre  $2n=20$  para *Pterolebias longipinnis* a  $2n=134$  para *Corydoras aeneus* (Nirchio, M *et al.* 2005).

Los cromosomas, en un cariotipo, pueden diferir entre sí con respecto al número, tamaño, morfología y patrón de bandas. (Nirchio, M *et al.* 2005). Los cromosomas se agrupan en pares de homólogos y se clasifican de acuerdo al Índice Centromérico y Tamaño Relativo, en metacéntricos, submetacéntricos, subtlocéntricos, telocéntricos o acrocéntricos. También se tiene en cuenta dos clases de cromosomas, los de tamaño “Fundamental” (Clase F) ó “Largos” (Clase L) dependiendo de su longitud relativa. La clase F incluye cromosomas m, sm y st de longitud decreciente; los de clase L, se caracterizan por tener una longitud doble respecto a los cromosomas F (Carvajal, S. 2000). Este tipo es poco frecuente y posiblemente se originan mediante la fusión céntrica de dos cromosomas F (Chen 1971).

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 AREA DE COLECTA Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La especie estudiada se colectó en la quebrada Las Tallas (Figura 6), en el municipio de Patía (El Bordo), departamento del Cauca, al oeste de la cabecera municipal; ésta quebrada confluye, en la margen derecha del río Patía

Los muestreos se realizaron en distintos puntos del paso de la quebrada, por la Estación Piscícola Las Tallas. El agua permanentemente se encuentra translúcida en la época de verano, haciendo más fácil la pesca de esta especie; sin embargo, se presentan dificultades en la captura cuando llega la época de lluvias, pues el nivel agua aumenta.

Como metodología de muestreo y con el fin de sondear todos los ambientes posibles dentro de las variantes de fisonomía de los causes, tales como corrientes, fondos, orillas, y empalizadas, se utilizaron varios métodos de captura. Uno de ellos fue la pesca eléctrica, el cual es un equipo portátil que se basa en la aplicación de una corriente eléctrica que fluctúa entre 250 y 600 voltios; también se intentó con atarraya y galandra; sin embargo, con estos métodos, no se obtuvieron los mejores resultados. De esta manera se utilizó el método de arrastre, ya que con este se obtuvo una mayor cantidad de ejemplares. El método consistió en armar un trinche (Figura 7a) en un extremo del cause y en el sentido de la corriente realizar arrastres (Figura 7b) con chinchorro cada media hora, en horas de la noche y la madrugada. Los ejemplares se transportaron hacia la estación piscícola Las Tallas (CRC), en tarros de plástico, con agua de su hábitat natural y aireación manual, para luego ser colocados en piletas. Los ejemplares fueron transportados vivos pero sedados, hasta las instalaciones del Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, en bolsas plásticas con agua y oxígeno.

Para llevar a cabo los estudios cariológicos se colectaron 20 ejemplares vivos de la especie *Brycon meeki*; 14 de ellos se utilizaron para la estandarización de la técnica y los restantes para la determinación genética de la especie.

**Figura 6. Quebrada Las Tallas**



**Figura 7. Método de Captura.**

**a. Trinche**



## b. Arrastre



## 6.2 OBTENCIÓN DE EXTENDIDOS MITÓTICOS

Se realiza mediante la técnica de cultivo de riñón (Figura. 8), según lo propuesto por Bertollo *et al* (1978) y Fenocchio *et al* (1991), con ciertas modificaciones.

- Sacrificio y disección del pez.
- Extracción del riñón.
- Maceración del riñón en 4ml de solución de tripsina (0.0125%) en caja de petri por 2 minutos. Adicionar 3ml de medio simple, suplementado con suero fetal bovino (10%) en una caja de petri e introducir el macerado de riñón, con el fin de parar la acción de la tripsina.
- Centrifugar por 10 minutos a 1200 rpm y retirar sobrenadante.
- Adicionar 5ml de medio completo RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino al 10% e incubar a temperatura ambiente, durante dos horas.
- Agregar 0.1ml de Colcemid al 0.1% e incubar durante hora y media.
- Centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm y retirar sobrenadante.
- Agregar 6ml de solución hipotónica de KCL al 0.45% durante 40 minutos, a temperatura ambiente. Agregar 1ml de solución fijadora Carnoy (metanol - ácido acético: 3:1) para prefijar, dejar reposar y centrifugar 10 minutos a 1200 rpm y retirar sobrenadante.
- Agregar 4ml de solución fijadora Carnoy durante 20 minutos, refrigerar, centrifugar y retirar sobrenadante. Agregar 4ml de solución fijadora Carnoy y refrigerar durante 24 horas.
- Se realizan dos fijaciones más sin reposo entre ellas.
- Gotear la suspensión celular sobre una portaobjetos limpio.

- Colorear con Giemsa al 10%, durante 5 minutos.
- Las placas se montan en forma permanente con entellan y cubreobjetos.
- Se analizan las placas al microscopio para contar número cromosómico e identificar las mejores metafases.

**Figura 8. Método Obtención de Extendidos Mitóticos.**



### **6.3 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO CROMOSÓMICO**

Para establecer el número cromosómico de la especie, se analizaron 30 metafases bien conformadas de cada animal, y se identificó el número modal. Éste se toma como el número cromosómico de la especie.

### **6.4 REGISTRO Y PROCESAMIENTO DE DATOS**

El registro de datos se realizó mediante la toma de fotografías de las metafases. Se registraron aquellas metafases de morfología aceptable, es decir, con una buena definición de cada uno de los cromosomas, de forma que el centrómero se pueda ubicar fácilmente; para esto es importante seleccionar metafases con *background* mínimo. Para la toma de las fotografías se utilizó un sistema de adquisición y procesamiento de imágenes que tiene como base el software Leica Qwin, que funciona bajo el ambiente del sistema operativo Microsoft® Windows, con cámaras CCD y TV, conectadas a un computador en el cual se encuentra el software (Figura. 9); este programa fue empleado para la visualización, adquisición y almacenamiento de las imágenes. Una vez almacenadas las fotografías, estas

se analizaron, mediante un sistema de visión computacional, llamado Sistema Asistido para la Elaboración de Cariotipos (López y Pinto, 2007). Este programa se basa en el análisis de imágenes y permite seleccionar automáticamente características de las metafases por el color o el contraste, identificando cada uno de los cromosomas como un color específico y diferenciándolo de cualquier otro objeto presente. En primera instancia el programa realiza un pre-procesamiento para mejorar el contraste de la imagen, la analiza para identificar todos los cromosomas, posteriormente permite separar o unir cromosomas, también eliminar background presente en la metafase. Una vez determinados exactamente los cromosomas, calcula áreas y elimina objetos que por su tamaño no son reconocidos como cromosomas y rota automáticamente los cromosomas para encontrar el centrómero. Finalmente la organización del cariotipo es realizada manualmente, basándose en la toma de medidas de los cromosomas y en su morfología, para determinar el valor de índice centromérico y poder comparar con los rangos de clasificación (Tabla. 2) establecidos teóricamente para cada tipo de cromosoma; finalmente se obtienen parejas asociadas por su similitud en tamaño e índice centromérico.

**Figura 9. Estación de Tratamiento de Imágenes Leica.**



## **6.5 DIAGRAMACIÓN DEL IDEOGRAMA**

Para realizar el ideograma se mide la longitud total de cada cromátida de tres cariotipos y se promedian para obtener la longitud total del cromosoma. De esta manera, las mediciones obtenidas se transforman en medidas relativas (%), tomando como patrón el par cromosómico más grande, al cual se le asigna el valor del 100 %. Se promedian las longitudes totales relativas (%) de cada una de las parejas de cromosomas. Finalmente se realiza una representación gráfica de cada par cromosómico teniendo en cuenta el tamaño promedio relativo (%), la forma (posición del centrómero) y número correspondiente a cada pareja, según posición en el orden decreciente de tamaño.

## 6.6 DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental de esta investigación se basó en un experimento de tipo observacional, y consistió en la recolección de 3 machos y 3 hembras de la especie *Brycon meeki*, para un total de 6 individuos. De cada pez se realiza un cultivo de riñón y se analizan 30 metafases. El análisis estadístico se realizó mediante estadística descriptiva y comparativa mediante prueba no Paramétrica (Z; Wilcoxon), para determinar si existen diferencias cariológicas intersexo, comparando estadísticamente el tamaño relativo y la posición del centrómero (Índice centromérico) de las parejas homólogas de ambos sexos.

Después de estandarizada la técnica de obtención de cromosomas, para la identificación del cariotipo (número, tipo y tamaño de cromosomas), se colectan un mínimo de tres ejemplares por sexo (6 ejemplares/especie), en los cuales se cuentan los cromosomas en al menos 30 metafases por pez; para un total de 90 metafases por género. Como no se observaron variaciones entre los tres ejemplares del mismo sexo, entonces, el número de peces no se incrementó (6 ejemplares por sexo). Una vez determinado el número cromosómico, se identificaron tres metafases bien conformadas por cada pez, para realizar las mediciones (longitud total y de cada brazo cromosómico), establecer el tamaño relativo y tipo de cromosomas, a través del sistema asistido de visión computacional para la elaboración de cariotipos.

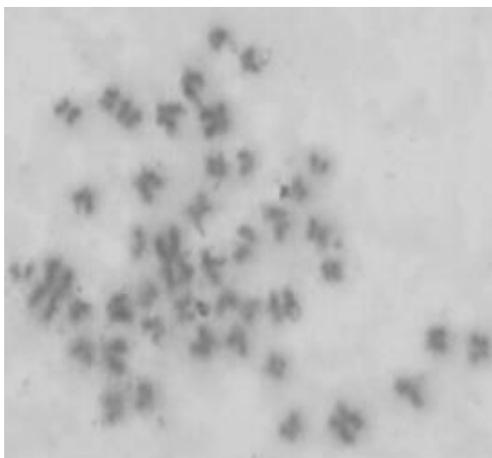
## 7. RESULTADOS

### 7.1 ESTANDARIZACIÓN MÉTODO DE CULTIVO DE RIÑÓN

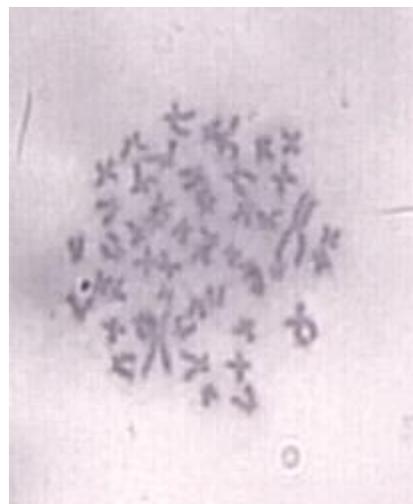
Para la estandarización de la técnica se tuvieron en cuenta tiempos y concentraciones (Anexo A) de algunos de los reactivos que son determinantes en la obtención de metafases. El factor más determinante en la buena obtención de metafases, es el tiempo de acción en la solución hipotónica. Se realizaron cinco tiempos de acción, comenzando en 30 minutos, con espacios de tiempo de 5 minutos, hasta un máximo de 50 minutos. Los cultivos tratados con KCl 0.45% en un tiempo menor a 40 minutos presentaron metafases con mucho citoplasma y con cromosomas muy pequeños y juntos, en algunos casos indistinguibles (Figura. 10a,b). Por otro lado, aquellos tratados por más de 40 minutos, presentaron metafases con cromosomas casi degradados o con separación de las cromátidas hermanas (Figura. 10c,d). Caso contrario ocurrió con un tiempo de tratamiento de 40 minutos, en donde la acción de la solución hipotónica produjo un efecto preciso en la buena visualización de las metafases, con cromosomas distinguibles y de un tamaño aceptable. Sumado a esto, para obtener una buena expansión de la metafase, en algunos casos se utilizó fijador en proporción de 4:1, observándose una mejora en comparación con las demás metafases (Figura. 11).

**Figura 10. Fotografías de Metafases en proceso de estandarización.**

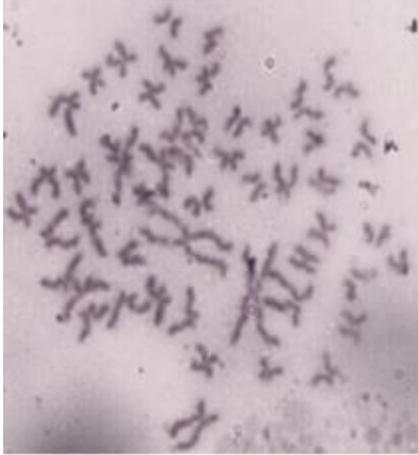
a. Metafase tratada durante  
30 min/KCl 0.45%



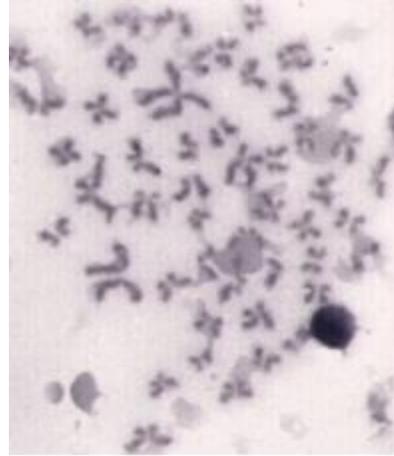
b. Metafase tratada durante  
35 min/KCl 0.45%



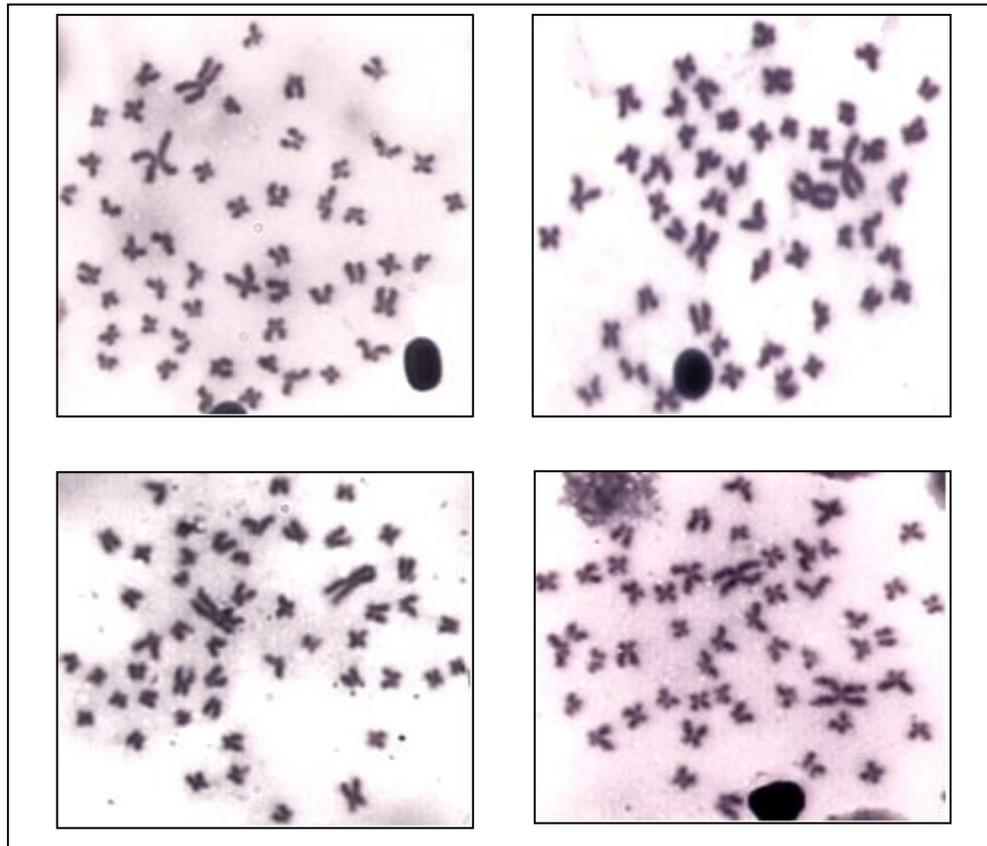
c. Metafase tratada durante  
45 min/KCl 0.45%



d. Metafase tratada durante  
50 min/KCl 0.45%



**Figura 11. Fotografías de Metafases con metodología estandarizada (KCL 0.45% / 40minutos, Colcemid 0.1%)**



## 7.2 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO CROMOSÓMICO

Los datos obtenidos para la determinación del número cromosómico de la especie *Brycon meeki* (Sábalo), están resumidos en la tabla 3. Estos resultados se obtuvieron a partir del análisis de 90 metafases para macho y 90 metafases para hembra (Anexo B). El número modal encontrado corresponde a metafases con 50 cromosomas (25 pares cromosómicos). Se observaron metafases con menos cromosomas, pero con frecuencias muy bajas que no ameritan ser tenidas en cuenta (Figura. 12).

En la tabla 4, se presenta la clasificación cromosómica de la especie, encontrándose el mismo número y clase de cromosomas en ambos sexos. De los 50 cromosomas de esta especie, 24 son metacéntricos (M), 22 submetacéntricos (SM) y 4 subtelocéntricos (ST); no se encontraron cromosomas telocéntricos (T).

**Tabla 3. Número cromosómico encontrado en la especie *Brycon meeki*.**

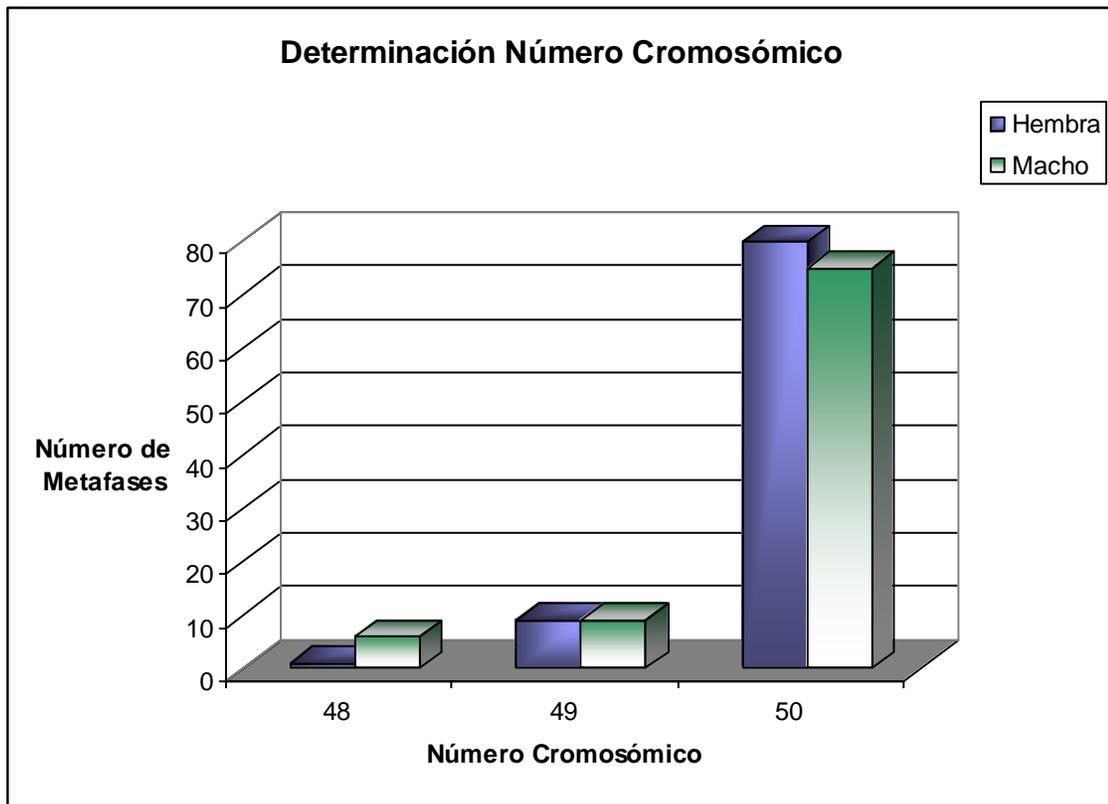
	Numero Cromosómico	Número de Metafases
<b>HEMBRA</b>	48	1
	49	3
	50	86
	<b>Total</b>	90
<b>MACHO</b>	48	0
	49	2
	50	88
	<b>Total</b>	90

**Tabla 4. Clasificación Cromosómica de la especie *Brycon meeki*.**

Tipo Cromosómico	Número de Cromosomas	
	Macho	Hembra
Metacéntrico (M)	24	24
Submetacéntrico (SM)	22	22
Subtelocéntrico (ST)	4	4
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

Los números cromosómicos por debajo del número modal son poco frecuentes y suelen originarse durante el proceso de goteo; en el que por hipotonización, las células experimentan turgencia y se revientan fácilmente cuando caen sobre la placa, de forma que uno o varios cromosomas, pueden perderse, originando metafases con un número cromosómico menor.

**Figura 12. Determinación del Número Cromosómico**



### **7.3 DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO**

El número cromosómico diploide observado en los ejemplares de ambos sexos de esta especie fue igual a 50, con una fórmula cariotípica compuesta casi en totalidad por cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, se identificaron 24M + 26SM/ST (Figura 13). En el cariotipo se observa un par de cromosomas metacéntricos (Par I) particularmente grandes con respecto a los demás del complemento.

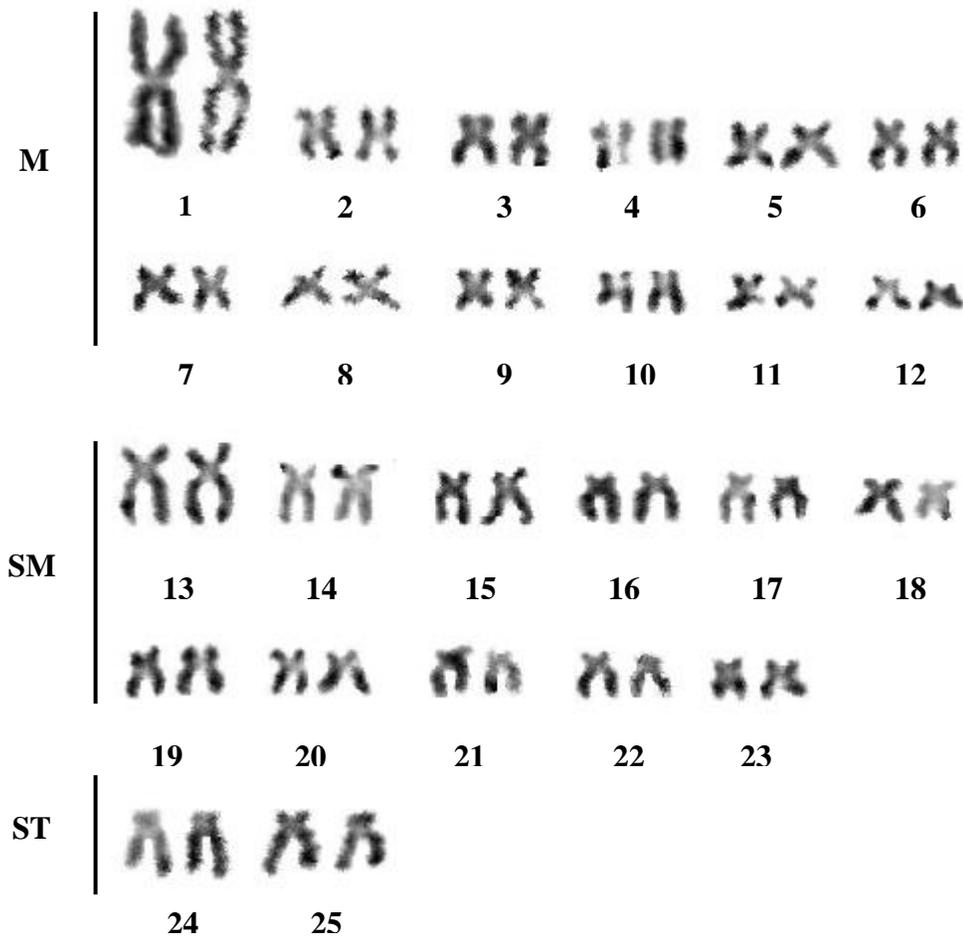
En la clasificación de los cromosomas se puede tener en cuenta el tamaño "fundamental" (F) ó "largos" (L), el cual depende de su longitud relativa. Los de clase F incluye cromosomas de longitud decreciente, este tipo es el más frecuente. Los de clase L doblan el tamaño del resto de cromosomas (clase F). De esta manera, se observa que los cromosomas del cariotipo presenta una longitud decreciente, pero dentro de cada clasificación (M-SM-ST) (Figura 13), se podría decir que son de tamaño fundamental. Sin embargo, observando el cariotipo en general, el par uno presenta una longitud doble respecto de los demás, sugiriendo que sea de clase L ("largos"); según Chen (1971), estos se originan mediante la

fusión céntrica<sup>3</sup> de dos cromosomas de clase F (tamaño fundamental). En este caso, todos los cromosomas no son de tamaño fundamental.

En el ideograma (Figura. 14) de la especie *Brycon meeki*, se observa la representación gráfica del cariotipo, en donde se demuestra la ubicación del centrómero (I.C) en relación con el tamaño relativo (%) de cada par cromosómico; la similitud existente entre los cromosomas denota en general un tamaño decreciente dentro de cada tipo cromosómico. De igual forma, se observa como el tamaño relativo de los cromosomas es menor respecto del par uno, el cual es el de mayor tamaño.

En la figura 15 se muestran los cariotipos realizados para cada uno de los sexos de la especie *Brycon meeki*, demostrando una similitud en su morfología.

**Figura 13. Cariotipo de la especie *Brycon meeki*.**



<sup>3</sup> Ocurre cuando dos cromosomas de un solo brazo (telocéntrico) se fusionan (unen) para formar un cromosoma de dos brazos (metacéntrico o submetacéntrico).

Figura 14. Ideograma del complemento cromosómico de la especie *Brycon meeki*

M = Metacéntrico  
SM = Submetacéntrico  
ST = Subtelocéntrico

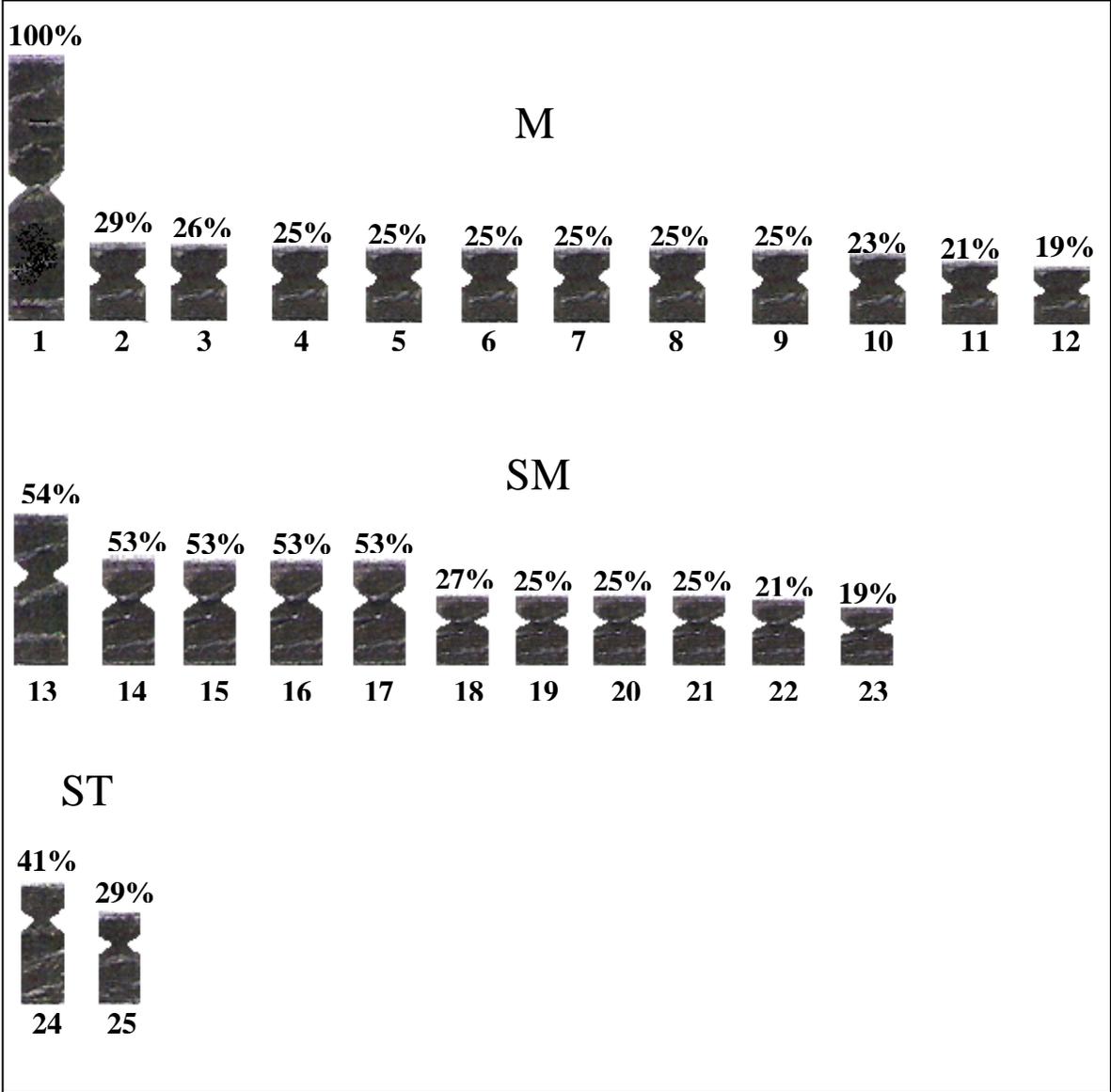
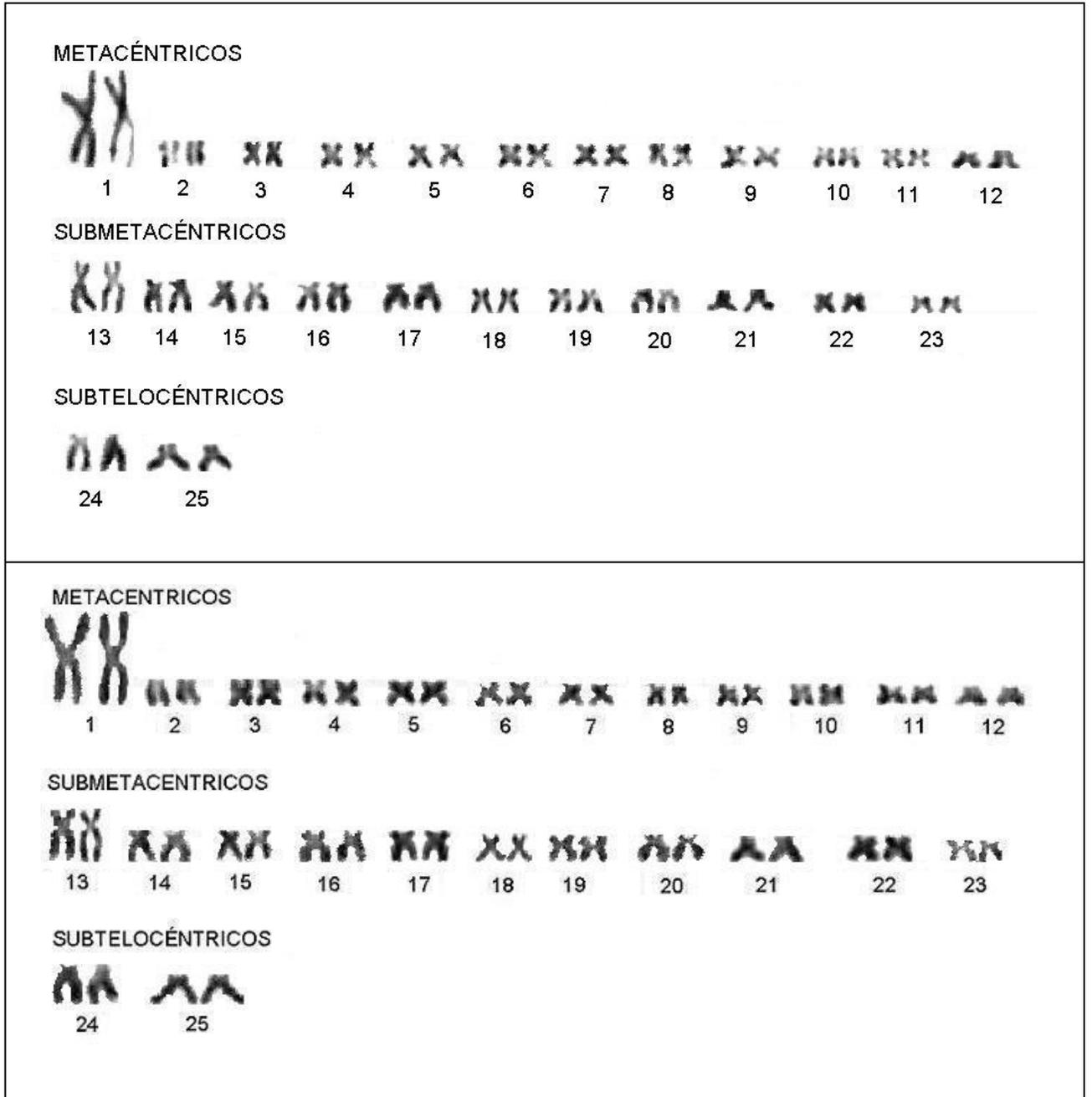
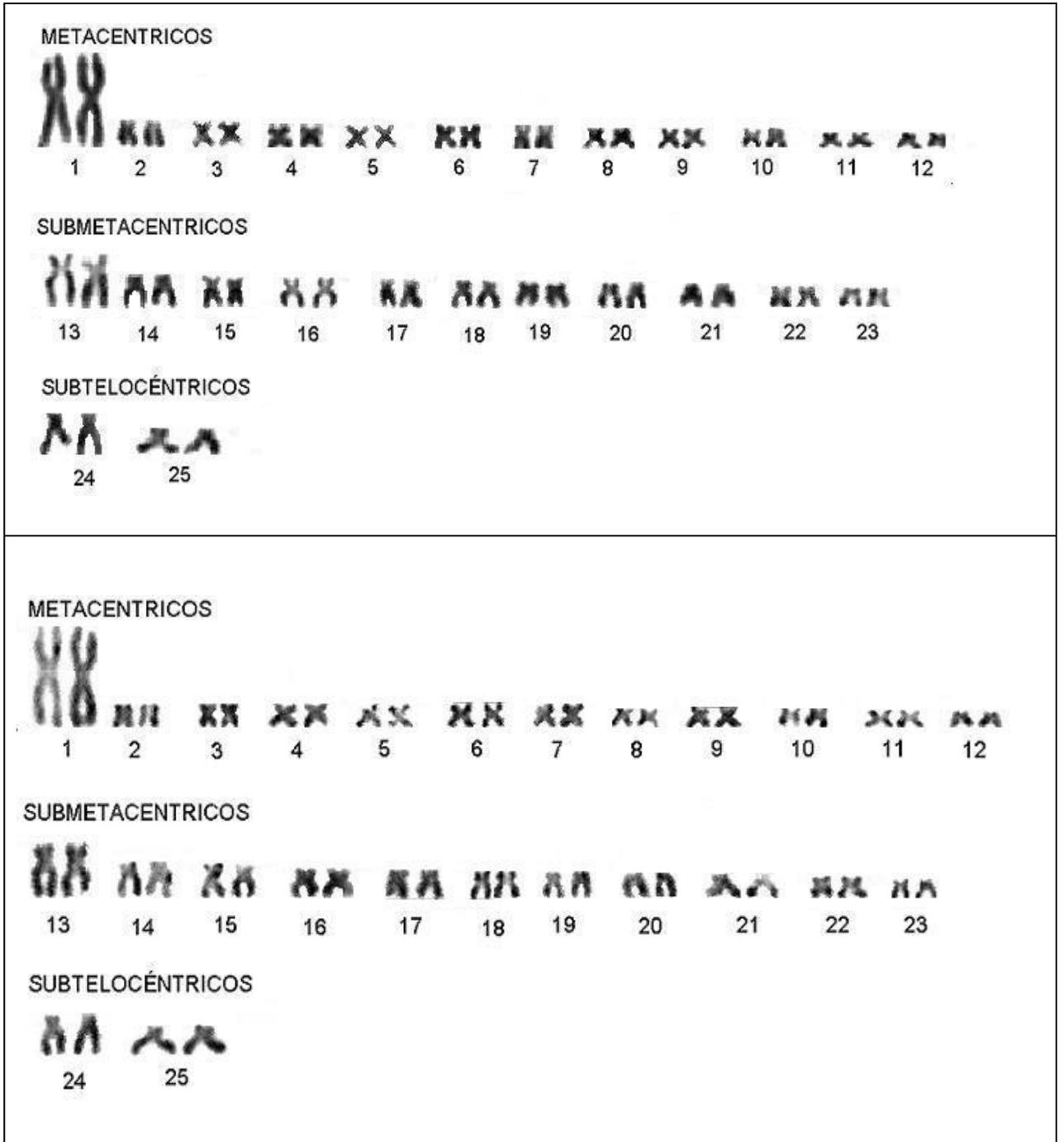


Figura 15. Cariotipos de macho y hembra realizados para la especie *Brycon meeki*.

A. Macho



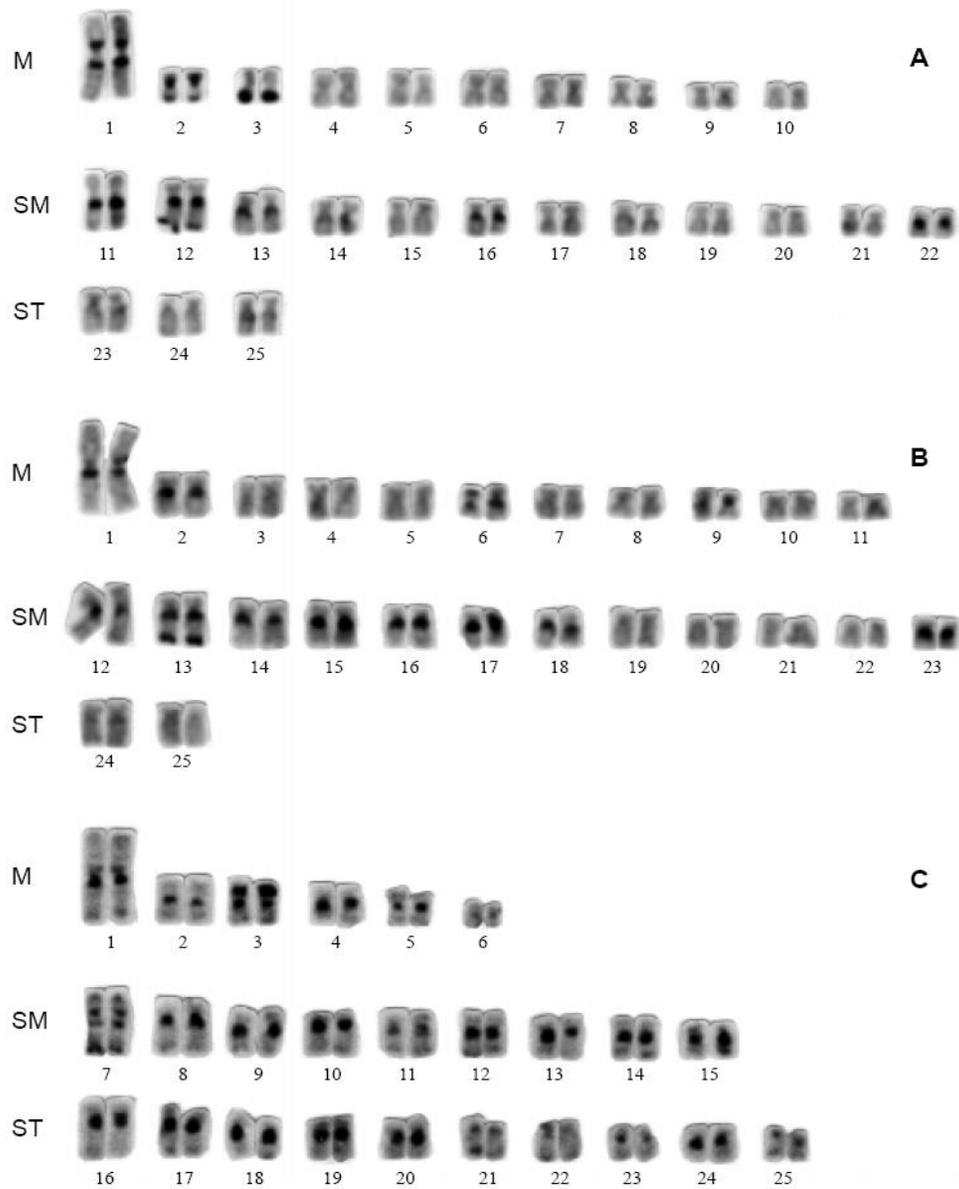
## B. Hembra



Comparando la estructura cariotípica (morfología de los cromosomas) y número cromosómico de la especie *Brycon meeki*, con otros miembros de la familia y del mismo

género se encuentran grandes similitudes. En la Figura 16 se muestran los cariotipos para dos especies del género *Brycon* y una para el género *Salminus*.

**Figura 16. Cariotipo con bandeo C de *Brycon microlepis* (A), *Brycon lundii* (B) y *Salminus hilarii* (C)**



Fuente: Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). (Margarido, V *et al* 1999).

### 7.3.1 COMPARACIÓN CARIOLÓGICA INTERSEXO

En la Tabla. 5 se muestran los datos de Índice centromérico y Tamaño relativo para cada uno de los pares cromosómicos de ambos sexos. Los datos son obtenidos a partir de las medidas tomadas de tres cariotipos de cada sexo, obteniendo un dato estándar tanto para el índice centromérico como para tamaño relativo. Se observa que la variabilidad (desviación estándar) entre los datos de índice centromérico no es significativa; es decir, que cada par cromosómico de los tres cariotipos del mismo género no presenta diferencias significativas.

**Tabla 5. Datos de índice centromérico y tamaño relativo de cada par cromosómico para ambos sexos de la especie *Brycon meeki*.**

Par Cromosómico	INDICE CENTROMERICO (I.C)				TAMAÑO RELATIVO (%)	
	Macho		Hembra		Macho	Hembra
	$\bar{\chi}$	$\sigma$	$\bar{\chi}$	$\sigma$		
1	0,47	±0,0115	0,46	±0,0173	100	100
2	0,45	±0,0089	0,45	±0,0206	29,16	26,1
3	0,38	±0,0167	0,36	±0,0414	27,08	26,1
4	0,38	±0,0119	0,37	±0,028	25,41	26,1
5	0,42	±0,01	0,41	±0,0349	25,41	26,1
6	0,38	±0,027	0,39	±0,0195	25	26,1
7	0,41	±0,0046	0,40	±0,01	25	26,1
8	0,44	±0,0075	0,44	±0,0324	25	22
9	0,43	±0,0095	0,42	±0,0215	25	22
10	0,42	±0,0216	0,42	±0,0198	23,3	22
11	0,43	±0,0243	0,43	±0,0265	21	22
12	0,41	±0,017	0,41	±0,0205	19	21,3
13	0,34	±0,0308	0,32	±0,0078	54,2	56,5
14	0,35	±0,0115	0,36	±0,0223	33,3	39,1
15	0,29	±0,0026	0,28	±0,004	33,3	39,1
16	0,27	±0,006	0,26	±0,02	33,3	34,8
17	0,31	±0,0231	0,29	±0,0075	33	34,8
18	0,31	±0,0141	0,30	±0,008	27,1	30,4
19	0,35	±0,0166	0,36	±0,0065	25	30,4
20	0,33	±0,015	0,32	±0,0043	25	28,3
21	0,33	±0,0186	0,33	±0,006	25	27
22	0,31	±0,0096	0,31	±0,0028	21,2	26
23	0,34	±0,0181	0,34	±0,0092	19	24
24	0,25	±0,0255	0,25	±0,0185	41,7	43,5
25	0,24	±0,005	0,24	±0,0236	29,2	32,6

$\sigma$  = Desviación Estándar

En la Tabla 6 se observan las medias promedio obtenidas para índice centromérico y tamaño relativo; en donde el I.C para machos y hembras es de 0.36. En cuanto al tamaño relativo se observa que tanto para machos como para hembras el tamaño promedio de la mayoría de los cromosomas es de aproximadamente un 30%, en relación al 100% (Par I).

**Tabla. 6 Media estándar para índice centromérico y tamaño relativo de cada género.**

	<b>Género</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Error típico de la media</b>
<b>Índice Centromérico</b>	Machos	<b>0,3616</b>	0,06440	0,01288
	Hembras	<b>0,3568</b>	0,06530	0,01306
<b>Tamaño Relativo</b>	Machos	<b>30,8264</b>	16,23766	3,24753
	Hembras	<b>32,4960</b>	16,24599	3,24920

Al comparar estadísticamente el tamaño relativo y la posición del centrómero (índice centromérico), de las parejas homólogas de ambos sexos, no se encontró diferencia significativa ( $p = 0,293$  y  $p = 0.793$  respectivamente) (Tabla 7). Permitiendo concluir que tanto la hembra como el macho de la especie *Brycon meeki*, muestran uniformidad en el número, tamaño relativo y tipo de cromosomas (Figura. 17)

**Tabla 7. Comparación estadística del índice centromérico y tamaño relativo con respecto al género.**

**Estadísticos de contraste (a)**

<b>Estadísticos</b>	<b>Índice Centromérico</b>	<b>Tamaño Relativo</b>
U de Mann-Whitney	299,000	258,500
W de Wilcoxon	624,000	583,500
Z	-0,262	-1,051
<b>Sig. asintót. (bilateral)</b>	<b>0,793</b>	<b>0,293</b>

a Variable de agrupación: Genero

Figura 17. Comparación de cada par cromosómico del cariotipo de macho y hembra.



## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo pretende ser la primera aproximación cariotípica para la especie de *Brycon meeki*, con el objeto de ampliar los conocimientos en el marco de los aspectos citogenéticos. Teniendo en cuenta que se está describiendo morfológicamente el cariotipo para esta especie y no se ha abordado técnicas más refinadas de tinción, como los bandeos.

En varias investigaciones se han reportado la obtención de cariotipos de peces a partir del cultivo de diversos tejidos frescos, como Denton (1969), Kligerman y Bloom (1977) los cuales estandarizaron técnicas citogenéticas a partir de epitelio de agallas, obteniendo buenos resultados. Por otro lado, el cultivo *in vitro* de linfocitos, ha demostrado ser un método que constituye una alternativa más eficiente para la obtención de cariotipos en peces. Sin embargo, en los últimos años se ha ido perfeccionando estos métodos, obteniéndose mejores resultados, a partir del cultivo de células de riñón; el cual es utilizado en este estudio. Algunos autores (Alzate *et al* 1991; Bolaños *et al* 1994; Feldberg, E *et al* 1999) inyectan *in vivo* levadura y colchicina, con el fin de aumentar el índice de células mitóticas; sin embargo en este estudio se demostró que no es necesaria la adición de levadura, puesto que sin ella también se obtiene un gran número de metafases por individuo. A pesar de que no existe una metodología estandarizada para todas las especies ícticas, puesto que ésta resulta en la publicación de un gran número de variantes de la técnica debido a la especie en particular, los resultados obtenidos para cualquiera de ellas es efectivo y similar. Por lo anterior, es primordial destacar que la metodología aplicada en este estudio, la cual es similar a la realizada por Alzate *et al* (1991) y Bolaños *et al* (1994); es válida y reproducible en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, de tal forma que siga contribuyendo a la ampliación del conocimiento científico en el área de la citogenética de peces.

Durante las últimas tres décadas, estudios citogenéticos en peces Neotropicales han contribuido a su taxonomía. Esto es un punto a favor de los análisis cariotípicos, puesto que proporcionan información que permite estudiar especies de identificación taxonómica controversial. Así mismo, muchos autores reconocen la importancia de conocer el número cromosómico de una especie, ya que permite establecer la individualidad específica, y permite tanto relacionarlas, como diferenciarlas en un grupo taxonómico. Por otra parte, el número de cromosomas dentro de un grupo de especies cercanas, tiene un gran significado evolutivo, ya que la mayoría de especies emparentadas, principalmente en la jerarquía de género, son en muchos casos, producto de rearrreglos cromosómicos estructurales como deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones; que modifican la estructura y/o la cantidad de material genético (Parada, S *et al.* 2003). De esta manera, estudios citogenéticos de especies del género *Brycon*, están de acuerdo con su clasificación taxonómica (Margarido y Galetti, 1996) ya que presentan semejanzas entre sus cariotipos,

permitiendo ubicarlas dentro del mismo género; caso contrario ha ocurrido con especies como *Astyanax scabripinnis*, *Hoplias malabaricus*, *Eigenmannia virescens*, y *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Bellafronte, E et al 2005) las cuales difieren de las clasificaciones taxonómicas, sugiriendo que estos grupos deberían ser revisados nuevamente.

Estudios cromosómicos en varias especies del género *Brycon* de diferentes regiones hidrográficas, han revelado una estabilidad en el cariotipo, comparable con *Brycon meeki*, caracterizado por el mismo número diploide ( $2n=50$ ) y una gran similitud en la estructura de los cromosomas, tal es el caso de las especies: *Brycon siebenthalae* (Parada, S. et al 2003), *B. microlepis*, *B. lundii*, *B. cf. reinhardti*, *B. brevicauda*, *B. insignis*, *B. orbignyanus* y *B. cephalus* (Margarido, V et al 1999) (Figura. 16). Por otra parte, a pesar de la similitud en el número cromosómico  $2n=50$  encontrado en este estudio y hallado por De Almeida-Toledo et al. (1996) para *Brycon cf. reinhardti* y *B. insignis*, la fórmula ( $24m, 26sm/st$ ) de *B. meeki* es diferente de *B. cf. reinhardti* ( $22m, 28sm/st$ ) y *B. insignis* ( $26m, 24sm/st$ ), pero similar a la de *B. siebenthalae* ( $24m+26sm/st$ ). Las comparaciones permiten observar que las diferencias en los cariotipos están dadas por la posición del centrómero y consecuentemente en la morfología de los cromosomas comprometidos. Estas diferencias suelen ser atribuidas a cambios causados por rearrreglos o condensación diferencial de los brazos. Además, la presencia de un par cromosómico metacéntrico (Par I) de gran tamaño, particularmente grande con relación a los demás del complemento, hace pensar que ésta es una característica de marca del género (Parada, S et al. 2003), tomando en cuenta que todos los estudios cariológicos realizados a los representantes del género *Brycon* revelan ésta característica.

Es muy probable que la especie *Brycon meeki* presente un  $2n=50$  para diferentes poblaciones, puesto que según Oliveira et al (1988), las variaciones en la macroestructura del cariotipo entre diferentes poblaciones, puede ser debida a su desplazamiento y tamaño de población, mientras que grupos de peces que tiene poblaciones grandes tienden a conservar la macroestructura de su cariotipo, tal es el caso de las subfamilias Bryconinae, Salmininae, entre otras; además, este grupo de peces son migratorios, de forma que permite que las poblaciones evolucionen conjuntamente, caso contrario ocurre con peces no migratorios como *Hoplia*, *Astyanax scabripinnis* y *Corydoras*, los cuales por ser aislados, induce a que cada población evolucione independientemente, proporcionando distintos cariotipos (Rubert, M et al 2007).

La información acerca del análisis cariotípico en la familia Characidae es escasa. Así, de las aproximadamente 1.400 spp en total que componen la familia, solo se han reportado estudios cromosómicos en una decena de ellas. Los géneros mayormente estudiados son *Salminus*, *Astyanax*, *Triporthesus*, *Bryconamericus*, *Oligosarcus* y *Brycon*, de los cuales se conocen número y fórmula cromosómica, patrones de bandas C y NORs, encontrándose una similitud en la macroestructura del cariotipo entre y dentro de los géneros; en donde la especie *Brycon meeki*, demuestra ésta similitud.

Los géneros de esta familia presentan una distribución estable en el cariotipo, caracterizado por un complemento cromosómico muy semejante que varía entre  $2n=50$  y  $2n=54$ , además comparten similitud en la morfología de los cromosomas: metacéntricos, submetacéntricos, subtlocéntricos y en algunos casos telocéntricos o acrocéntricos. De esta manera, la macroestructura cariotípica (número y clasificación cromosómica) de *Brycon meeki* ( $24+26sm/st$ ) y en general de otras especies del género, es muy similar al complemento cromosómico de especies del género *Salminus* como por ejemplo con la especie *Salminus hilarii* ( $12m+38sm/st$ ) (Figura 16) (Margarido, V *et al* 1999), presentando un número diploide  $2n=50$  y misma clasificación cromosómica (M-SM-ST), pero con algunas diferencias en la fórmula cromosómica. Algunos géneros presentan un  $2n=50$ , pero muestran pares cromosómicos acrocéntricos (a) a diferencia del género *Brycon*. Así, por ejemplo, especies del género *Oligosarcus* (Rubert y Margarido. 2007) constan de un cariotipo dado por  $2n=50$ , pero con una fórmula cromosómica de  $4m + 10sm + 16st + 20a$ ; ó especies como *Astyanax scabripinnis* (Dos Santos y Morelli 2006) que presentan  $2n=50$  con una fórmula cromosómica  $8m + 22sm + 12st + 8a$ . El género *Bryconamericus* presenta diferencias tanto en número ( $2n=52$ ) como en tipo cromosómico (M-SM-ST-A) (Marques, T 2003; De Brito, A. *et al* 2007). Todas estas comparaciones podrían sugerir que éstos (*Salminus*, *Astyanax*, *Oligosarcus*, *Bryconamericus*) cariotipos son ancestrales para el género *Bycon*, si se tiene en cuenta que los cariotipos pueden sufrir transformaciones estructurales (evolución cromosómica), las cuales podrían causar la transformación de un cromosoma resultando en cambios en su longitud, o incluso en un aumento o disminución del número cromosómico.

Puesto que el complemento cromosómico de la especie *Brycon meeki* esta dado por un  $2n=50$ , esta especie sería considerada como más evolucionada en relación con otros characidos; ya que no posee cromosomas telocéntricos y presenta un mayor número de cromosomas metacéntricos (24m) en relación con los demás, sugiriendo casi un 50% de cromosomas metacéntricos sobre el total de cromosomas. Esto, según lo dicho por Ohno en 1976, el cual asegura que: “mientras menor sea el número  $2n$  que incluya al mayor número de metacéntricos, la especie íctica será más evolucionada que otra que posea un  $2n$  mayor y que incluya más acrocéntricos”. De esta manera se podría decir que la especie *Brycon meeki* presenta un cariotipo evolucionado en relación a la especie *Potamorhina squamotalevis* (familia Curimatidae) por presentar un  $2n=102$  (Brassesco, M.S. *et al* 2004), de los cuales 44 pares cromosómicos son acrocéntricos y solo 7 son metacéntricos; por otro lado, miembros del género *Leporinus* pertenecientes a la familia Anostomidae tiene un  $2n=54$  (Venere, P *et al* 2004) y a pesar de poseer un número cromosómico mas grande que *Brycon*, solo presentan cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, dándoles un estado evolutivo mayor. Partiendo de la hipótesis de Ohno (1976), *Brycon meeki* sería mas evolucionado cromosómicamente que *Potamorhina squamotalevis* por tener un número cromosómico menor que incluye un mayor número de cromosomas metacéntricos. Pero con *Leporinus*, aunque se asemejan en el número cromosómico, sus tipos de cromosomas difieren, teniendo *Leporinus* solo cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, y *Brycon meeki* cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y subtlocéntricos; es decir, *Leporinus* tiene un cariotipo mas simétrico con respecto al de *Brycon meeki*; por lo tanto *Brycon*

*meeki* sería menos evolucionado cromosómicamente que *Leporinus* desde el punto de vista del tipo de cromosomas. La diferencia antes anotada, en el proceso de evolución cromosómica se logra mediante cambios como fusiones céntricas entre cromosomas no homólogos acrocéntricos o telocéntricos, que reducen el número cromosómico. También se pueden deber a translocaciones pericéntricas que producen cromosomas de mayor simetría (metacéntricos, submetacéntricos) a partir de cromosomas menos simétricos como los telocéntricos y acrocéntricos. Comparando con especies de la familia Characidae propiamente, se encuentra que *Oligosarcus paranensis*, *O. pinto* y *O. longistrostris* exhiben un  $2n=50$  (Rubert, M *et al* 2007); sin embargo, tienen solo 2 pares cromosómicos metacéntricos y 10 pares acrocéntricos. Otras especies de la familia Characidae que también exhiben diferencias en la macroestructura del cariotipo son *Serrapinnus notomelas* y *Serrapinnus* sp, con  $2n=52$  y en su mayoría cromosomas acrocéntricos (Santi-Rampazzo A.P. *et al* 2007), otro género que identifica cromosomas acrocéntricos es *Bryconamericus aff. iheringii* con un  $2n=52$  (De Brito, A. *et al* 2007). De esta manera es posible concluir que el género *Brycon* muestra un cariotipo evolucionado en contraste con algunas especies de otras familias; y en relación con su propia familia (Characidae), pues aunque exhiben un número cromosómico muy similar, presentan algunas diferencias en la clasificación cromosómica.

Bertollo *et al* (1986) identifica dos corrientes para peces neotropicales: la primera, son grupos cariológicamente homogéneos (números cromosómicos similares) y la segunda, son grupos con una alta variabilidad citogenética (números cromosómicos muy distantes) (citado por: Brassesco, M *et al* 2004); en el orden Characiformes estas dos tendencias de evolución cromosómica han sido encontradas, aunque se demuestra la tendencia a una estabilidad cariotípica en la familia Characidae. De esta manera la familia Characidae se ubicaría dentro de la primera corriente, es decir, un grupo cariológicamente homogéneo; tomando en cuenta los estudios cariológicos reportados hasta el momento.

La falta de diferenciación morfológica entre los cromosomas de los dos sexos de la especie *Brycon meeki*, es típico de peces de agua dulce; prueba de ello es que solo han sido descritas unas 50 especies que presentan cromosomas sexuales morfológicamente diferenciados, esto representa tan solo el 4% de todos los peces analizados cariotípicamente (Nircho, M *et al* 2005). Sin embargo, este porcentaje constituye una subestimación, ya que recientemente se ha demostrado que especies con cromosomas sexuales indistinguibles morfológicamente, presentan bloques de heterocromatina constitutiva limitada a un solo sexo cuando se analizan por la técnica de bandeo C. Así, en la familia Characidae, se ha identificado el sistema de determinación sexual ZZ/ZW principalmente en especies del género *Triporthus*, además de las especies *Cheirodon notomelas*, *Cheirodon* sp y *Odontostilbe cf. Microcephala* (Nircho, M *et al* 2005). Los patrones de heterocromatina son una importante fuente para determinar tanto, la diferenciación sexual, como la diversificación dentro y entre grupos de peces. Ésta ha sido descrita principalmente en las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas (Margarido y Galetti, 2000). Algunas especies como *Brycon microlepis* y *Brycon lundii* que han sido estudiadas mediante

bandeo C, no han evidenciado la presencia de cromosomas sexuales; en este caso, la determinación sexual puede estar determinada por cromosomas autosómicos; es decir, el sexo es controlado según Tave, D (1989), por uno o más genes presentes en los cromosomas autosómicos. De esta manera, existe un sistema cromosómico de determinación sexual, que no involucra cromosomas sexuales.

De 44 especies de anastómidos estudiadas, solo 7 tienen en su cariotipo los cromosomas sexuales diferenciados (Molina, W *et al* 1998), lo que demuestra en cierta forma que la diferenciación morfológica de los cromosomas sexuales es poco común entre los peces dulceacuícolas neotropicales, sin olvidar que la genética de peces es un campo aún muy poco estudiado teniendo en cuenta la amplia distribución de especies en los diferentes sistemas hídricos del mundo.

Finalmente, la diversidad de mecanismos que aparecen en los peces, incluso dentro de algunas especies, así como también la ausencia de estos; todo esto según Venere, C (2004), puede indicar que esta clase de animales mantienen una fuente rica en material de estudio para determinar el origen evolutivo en el proceso de determinación del sexo en los vertebrados.

## 9. CONCLUSIONES

Le técnica de cultivo de riñón, es un método fácil, rápido y eficaz para la obtención de extendidos mitóticos en especies ícticas, sin embargo es importante tener en cuenta que es necesario realizar ciertas modificaciones, que estandaricen las técnica de acuerdo a la especie estudiada en particular. De esta manera, la técnica de cultivo de riñón estandarizada en este estudio, es reproducible en las instalaciones del Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca; así mismo, sirve de guía para otros estudios que incluyan otras especies.

La especie *Brycon meeki* presenta un cariotipo con un número diploide  $2n=50$  cromosomas, el cual esta determinado por una fórmula cromosómica de  $24m + 26sm/st$ .

Para ambos sexos de la especie *Brycon meeki*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a número y clasificación cromosómica; así mismo no se detectó la existencia de heteromorfismos cromosómicos relacionados con el sexo; sin embargo, no es posible descartar la existencia de estos, puesto que posiblemente se presenten diferencias a nivel genético y/o en el contenido de heterocromatina.

Los resultados obtenidos en este estudio para número y tipo de cromosomas de la especie *Brycon meeki*, soporta los realizados por diferentes autores, para especies de éste género como: *Brycon siebenthalae*, *Brycon microlepis*, *Brycon lundii*, *B. brevicauda*, *B. insignis*, *B. orbignyanus* y *B. cephalus*. Encontrándose la mayor similitud en el cariotipo con *Brycon siebenthalae*.

La especie *Brycon meeki*, por tener una reducción en el tamaño del genoma y presentar en su mayoría cromosomas metacéntricos, se puede considerar como una especie evolucionada.

El género *Brycon* muestra un cariotipo evolucionado en contraste con algunas especies de otras familias; y en relación con su propia familia, pues a pesar de exhibir un número cromosómico muy similar, presentan ciertas diferencias a nivel del tipo de cromosomas.

Este tipo de investigación permite encaminar el campo de la piscicultura hacia mejoras en cuanto al manejo adecuado y obtención de especies mejoradas de mayor aceptabilidad, puesto que proporciona mejores conocimientos en el área de la citogenética.

## **10. IMPACTO**

### **10.1 IMPACTO CIENTÍFICO**

En este estudio se ha generado información novedosa, dicho conocimiento tiene impacto no solo a nivel regional, por ser uno de los pocos estudios en su tipo realizado en el Cauca; sino también a nivel nacional, ya que este tipo de estudios no se había realizado en esta especie en particular. En adición, los resultados obtenidos, permiten ampliar aun más la literatura científica que existe acerca de los estudios citogenéticos en peces y sobre todo de la especie *Brycon meeki*. Por otro lado, estimula a personas interesadas en el acampo de la citogenética de peces, y a instituciones relacionadas con el campo de la piscicultura, mediante programas que estén encaminados a la producción y manejo de especies altamente comerciales y de gran valor nutricional, que son difíciles de reproducir en cautiverio.

## 11. RECOMENDACIONES

Para otros estudios sería interesante incluir procedimientos especializados, tales como el Bando Cromosómico, ya sea mediante marcaje del ADN con análogos de bases (Brdu) o mediante el tratamiento de las metafases antes de la tinción con enzimas proteolíticas como la Tripsina (Bandas G) o con Hidroxido de Bario (Bandas C), el cual permitiría determinar los patrones de distribución de las regiones de heterocromatina constitutiva pericentromérica y así poder determinar mas efectivamente la distribución del cariotipo y la presencia de heterocromosomas.

En estudios posteriores sería interesante analizar citogenéticamente a la especie *Brycon meeki* de diferentes regiones hidrogeográficas; así como con otras especies emparentadas, incrementando el número de ejemplares analizados de ambas especies a efectos de realizar un muestreo más representativo de la población.

## BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, L.F *et al* Estudos citogeneticos de hibridos entre femeas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e machos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Bol. Tec. Vol.1 (1988); p. 11-17

\_\_\_\_\_, L.F *et al* Cytogenetics studies of *Colossoma mitrei*, *Colossoma macropomum* and their interspecific hybrid. Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture (1987); p. 27-30.

\_\_\_\_\_, L.F. Contribuição à Citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysi). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. (1978); p.128

ALZATE, C y HURTADO, G. Análisis cariológico de dos especies ícticas que habitan la parte alta del río Cauca: *Pimelodus grosskopffi* y *Pimelodus clarias*. Trabajo de grado (Biólogos). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

ARTONI, F., Roberto and BERTOLLO, L., Antonio. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*: A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. En : Heredity. Vol.89 (2002); p. 15–19.

\_\_\_\_\_, Roberto *et al* Citogenética de peixes neotropicais: Métodos, Resultados e Perspectivas. En: Biological and Health Sciencies. Vol.6, No.1 (2000); p.43-60

BELLAFRONTTE, Elisangela; MARGARIDO, Vladimir y MOREIRA-FILHO, Orlando. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. En: Genetics and Molecular Biology. Vol.28, No. 4 (2005); p. 710-716 .

BERTOLLO, L.A.C., MOREIRA-FILHO, O y GALETI, P.M. Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish En: J. Fish Biol. Vol.28 (1986); p. 153-159

\_\_\_\_\_, L.A.C *et al* Evolucao de cromossomos sexuais em peixes neotropicais de água doce. 36º Congresso Nacional de Genética. p.69

BERTOLLO, T y MOREIRA-FILHO. Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae*. En: Braz. J. Genet. Vol.1 (1978); p. 103-120

BOLAÑOS, L *et al* Estudio citogenético de las especie sicticas *Piractus brachypomun*, *Prochilodus reticulatus*, *Oreocgromis niloticus*, *O. mossambicus* y *O. roja*. 1994. Trabajo

de grado (Biólogos). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

BRASSESCO, M *et al* Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). En : Genet. Mol. Vol.3, No.2 (2004); p. 293-301.

CAICEDO, E., Javier. Aspectos reproductivos del *Brycon meeki*, Keigemann & Hildebrand, 1918 (PISCIS: Characidae) en el río patía, sector comprendido entre el puente de la fonda y puente de la barca, municipio del patía, departamento del Cauca. Departamento de Biología. Universidad del Cauca, 2004.

CARVAJAL, Silvio. Análisis cromosómico de especies ícticas. Cuarto Congreso Colombiano de Genética Internacional. Universidad del Cauca, 2000.

CARVALHO, E. D. Linhagens triplóides de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) e de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818): indução artificial e estudos de sobrevivência e desempenho em condições de tanques de cultivo. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. (1992); p. 211

CHEN, T. Comparative Chromosome Study of Twenty Killifish Species of the Genus *Fundulus* (Teleostei: Cyprinodontidae). En: Chromosoma. Vol.32 (1971); p. 436-453.

\_\_\_\_\_, T. Karyological heterogamety of deep sea fishes. En : Postilla. Vol.130 (1969); p. 1-29.

DE ALMEIDA, L.F *et al* Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. En: Caryologia. Vol.49, No. 1 (1996); p. 35-43.

DE BRITO, P *et al* New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Parana River of Brazil : analysis of the synaptonemal complex. En : Genética. Vol.110, No.3 (2000); p. 277-283

DE ROSA, LVS *et al* Cytogenetic analyses of two Curimatidae species (Pisces; Characiformes) from the Paranapanema and Tietê Rivers. En: Braz. J. Biol. Vol.67, No. 2 (2007); p. 333-338.

DENTON, T.E *et al* Technique for obtaining chromosomes from the scale epithelium of teleost fishes. En: Copeia. Vol 50 (1969); p. 392-393.

DONALD, Mc. Cytogenetics Basic. Seattle, WA, U.S.A., 2002. Available from Internet: [www.uah.es/biomodel/citogene/dynacare/geninfo.htm](http://www.uah.es/biomodel/citogene/dynacare/geninfo.htm)

DOS SANTOS, A y MORELLI, S. Comparacao citogenética de duas populacoes de *Astyanax scabripinis* (Pisces, Characidae) da regio do triangulo mineiro. En: Biosci. J., Uberlândia. Vol.22, No.1 (2006); p. 145-150.

ESCOBAR, José. Síndromes de sostenibilidad ambiental del desarrollo en Colombia. Seminarios y conferencias. 2002 Santiago de Cali

FELDBERG, Eliana et al Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *plagioscion* (perciformes, sciaenidae) from the central amazon. En : Genet. Mol. Biol. Vol.22 No.3 (1999).

FENOCCHIO, A.S. et al. Short term culture from solid tissues of fishes. En: Caryologia.Vol.44 (1991); p.161-166.

HARVEY, S et al Karyotype evolution in Tilapia: mitotic and meiotic chromosome analysis of *Oreochromis karongae* and *O. niloticus* x *O. karongae* hybrids. En : Genetica Vol.115, No.2 (2002); p. 169-177.

JIM, S. M y TOLEDO, V. Citogenética de *Astyanax fasciatus* y *Astyanax bimaculatus* (Characidae, Tetragonopterinae). En: Cien. Cult. Vol.27 (1975); p. 122-124

KLIGERMAN, A.D. and S.E. BLOOM. J. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. En: Fish. Res. Board Can. Vol.34 (1977); p. 266-269

KOEHLER, M et al Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. En: Chromosome Research. Vol.5 (1997); p. 12-22.

LEVAN, A; FREDGA, A and SANDBURG, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. En : Hereditas. Vol.52 (1964); p. 201-220.

LIMA, F.C.T et al Genera Incertae Sedis in Characidae. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America, 2003; p. 106-168.

LÓPEZ, G. y PINTO, J. Sistema asistido de segmentación, clasificación y conteo de cromosomas en metafase para la elaboración de cariotipos basado en visión computacional. 2007. Trabajo de grado (Físicos). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Departamento de física.

MARGARIDO, P., Vladimir y GALETTI, M., Pedro. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). En: Genetics and Molecular Biology. Vol. 23, No. 3 (2000); p. 569-573.

\_\_\_\_\_, P., Vladimir y GALETTI, M., Pedro. Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). En : Cytobios. Vol. 85 (1996); p. 219-228.

\_\_\_\_\_, P., Vladimir y GALETTI, M., Pedro. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). En : Genet. Mol. Biol. Vol.22, No.3. (1999).

MARQUES, P., Tania; CAETANO, G., Lucia and DIAS, Lucia. Cytogenetic characterization of a population of *Bryconamericus aff. iheringii* (Characidae, Tetragonopterinae). En : Genet. Mol. Biol. Vol.26, No.2 (2003); p.145-149.

MARTINS, César y GALETTI, P., Manoel. Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. En : Genet. Mol. Biol. Vol.21, No.3. (1998).

MICHELLE, J. L y TAKAHASHI, C.S. Comparative cytology of *Tilapia rendalii* y *Geophagus brasiliensis* (Cichilidae, Pisces). En : Citología. Vol.42 (1977a); p. 535-537

\_\_\_\_\_, J. L et al Karyotypic studies of some especies de la familia Loricariidae (Pisces). En : Citología. Vol.42 (1977b); p. 539-546

MOJICA, J. I et al Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia y Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia, 2002.

MOLINA, W.F et al Heterochromatin and sex chromosomes in the Neotropical fish genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae). En : Cytobios. Vol.94 (1998); p. 141-149.

MONTOYA, F., Alvaro et al Algunos aspectos biológicos y del manejo en cautiverio de la sabaleta *Brycon henni* Eigenman, 1913 (Pisces: Characidae). En : Rev Col Cienc Pec. Vol.19, No. 2 (2006); p.180-186.

MORELLI, S. et al Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. En: *Caryologia*. Vol.36 (1983); p. 235-244.

NIRCHIO, Mauro et al Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. En : *Caryologia*. Vol.56, No. 4 (2003); p. 405-411.

\_\_\_\_\_, Mauro; GÓMEZ, Juan y VILLALAZ, Janel. Cariotipo del pez sapo batrachoides pacifici (batrachoididae: Teleostei) de la costa del pacífico de panamá. Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar. Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela. Vol.13, No.1 (2001); p. 82-84.

\_\_\_\_\_, Mauro y OLIVEIRA, Claudio. Manual de Citogenética de Peces. Universidad de Oriente. Departamento de Acuicultura. Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar Isla de Margarita, Venezuela, 2005.

OHNO, S., *et al.* Post-zygotic rearrangements in rainbow trout (*Salmo irrideus* Gibbons). En: Cytogenetics. Vol.4 (1976); p. 117-129.

OLIVEIRA, C., *et al.* Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. En: Rev. Brasil. Genet. Vol.11 (1988); p. 577-624.

\_\_\_\_\_, C., *et al.* Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. VIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes (2000); p. 24.

\_\_\_\_\_, C., *et al.* Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. VI Simpósio de Citogenética evolutiva e aplicada de Peixes Neotropicais. São Carlos, São Paulo. (1996); p. 104.

ORTEGA, Armando. Peces de la cuenca del Río Patía. Corporación Regional del Cauca. (2004); p. 20-50

PARADA, Sandra *et al.* Caracterización cariotípica del Yamú, *Brycon siebenthalae*. En: Revista Orinoquia. (2003); p. 42-46

REIS, R. E *et al.* Checklist of the freshwater fishes of South and Central América. Edipucrs. Porto Alegre; p.742. 2003

RUBERT M. y Margarido, V. Cytogenetic Studies in Three Species of the Genus *Oligosarcus*. En : Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol.50, No. 1 (2007); p. 127-135.

SANTI-RAMPAZZO, A.,P *et al.* Cytogenetic analysis and description of the sexual chromosome determination system ZZ/ZW of species of the fish genus *Serrapinnus* (Characidae, Cheirodontinae). En : Genet. Mol. Res. Vol.6, No. 3 (2007); p. 504-509.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). En: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs (1998); p. 375-400.

TAVE, Douglas. Sex determination. En : Aquaculture magazine (1989); p.67-69.

TOLEDO, V y FERRARI, I. Estudo citogenético em três espécies do gênero *Pimelodus* (Pimelodidae, Pisces). En : Científica. Vol.4 (1976); p. 101-106.

URIBE, A., Manuel y RAMIREZ, A. Comparación citogenética entre las especies del género dormitator (pisces: gobiidae). Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, 1988.

VARI, R.P and MALABARBA, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. En : Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil; p.1-11.

VENERE, P., Cesar *et al*. A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). En : Genetica Vol.121 (2004); p.75–80.

[http://Colombialink.com/index\\_geografia\\_hidrografia.html](http://Colombialink.com/index_geografia_hidrografia.html)



**ANEXO B**

**REGISTRO DE NÚMERO CROMOSÓMICO**

**Proyecto:** \_\_\_\_\_

**Fecha Registro:** \_\_\_\_\_

**Registrador:** \_\_\_\_\_

**Código Placa:** \_\_\_\_\_

**Macho:** \_\_\_\_

**Hembra:** \_\_\_\_

<b>Número de Metafasas</b>	<b>Número Cromosómico</b>	<b>Coordenadas</b>
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		

Total		
<b>X</b>		