

INFORME FINAL

Presentado por

Dr. Mauro Nirchio Tursellino

CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA DE PECES DE LA PROVINCIA DEL ORO, ECUADOR

ÁREA DE DESARROLLO:

Ciencias de la vida

Universidad Técnica de Machala

11/08/2014 al 10/12/2014

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	7
JUSTIFICACIÓN.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
RESULTADOS OBTENIDOS	9
CONTRIBUCIÓN AL PLAN DEL BUEN VIVIR.....	14
DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS ALCANZADOS.....	15
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	20
ANEXOS	29
Carta de Aceptación de artículo CITOGÉNÉTICA COMO HERRAMIENTA TAXONÓMICA EN PECES.	30
Constancia de indización de la Revista Saber en SCielo	31
Constancia de indización de la Revista Saber en Latindex.....	32
Manuscrito de artículo <i>Citogenética Como Herramienta Taxonómica En Peces.</i>	33
Constancia de recepción de artículo "Sobre la introducción, manejo y cultivo de Tilapias en la República del Ecuador: un mensaje de alerta" por el editor de la revista Latin American Journal of Aquatic Research.....	53
Constancia de indización de la Revista Latin American Journal of Aquatic Reseach	54
Manuscrito de artículo intitulado "Sobre la introducción, manejo y cultivo de Tilapias en la República del Ecuador: un mensaje de alerta."	55
Manuscrito de artículo intitulado " First description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in Rhoadsia altipinna (Characiformes: Characidae) from Ecuador." (En elaboración)	68
Manuscrito de artículo <i>A putative new Caribbean species of Scorpaena (Actinopterygii: Scorpaeniformes) revealed by cytogenetic and molecular techniques.</i>	83

INFORME FINAL DE ACTIVIDADES

INTRODUCCIÓN

Ecuador abarca a lo largo de su territorio en el Océano Pacífico, fondos arenosos, litorales rocosos, praderas de fanerógamas marinas, arrecifes coralinos, comunidades de fondos blandos, y bosques de manglar y a nivel continental destacan ríos, lagunas, zonas pantanosas, lagos y embalses, todos ecosistemas que poseen gran diversidad ictiológica.

Aun cuando los registros totalizan unas 1.716 especies de las cuales 765 son marinas y 951 de agua dulce (Barriga, 2012) el conocimiento citogenético sobre la ictiofauna local es prácticamente nulo. Por esta razón se torna importante estudiar las especies presentes en los ecosistemas acuáticos ecuatorianos con la meta de aportar una contribución al conocimiento sobre su Biodiversidad e incentivar este tipo de investigación en el país.

Con la finalidad de iniciar los estudios cromosómicos en la República del Ecuador, se propuso realizar la caracterización citogenética de *Scorpaena mystes* y ampliar los estudios a otras especies de peces marinas y dulceacuícolas que pudieran ser colectadas durante el tiempo de vinculación.

Adicionalmente y considerando que los estudios cromosómicos convencionales en la actualidad pueden ser complementados con análisis moleculares, fueron obtenidas muestras de tejidos para iniciar un banco de tejidos a partir de los cuales es posible realizar la amplificación y secuenciación de genes mitocondriales Citocromo Oxidasa I (COI) y rDNA-16S, los cuales son marcadores moleculares empleados para hacer identificaciones moleculares a través del FISH-bol (Fish barcode of life). La gran importancia de los estudios moleculares que utilizan las secuencias de bases del ADN está produciendo cambios en el patrón de formación y alojamiento de colecciones biológicas, las cuales ahora deben incluir este tipo de elementos, a partir de los cuales el ADN puede ser extraído y analizado.

De igual manera y teniendo en cuenta que estas muestras de tejidos deben estar respaldadas por ejemplares voucher, es decir, los especímenes de los que se obtuvieron los datos de referencia y que las publicaciones científicas de calidad exigen la preservación de estos ejemplares y dan indicaciones exactas de cómo encontrarlos para quien quiera revisar las hipótesis de trabajo o resultados publicados, se realizó la identificación y organización de especímenes capturados en diferentes cuerpos de agua dulce y salada con la finalidad de iniciar una colección ictiológica de referencia para la Universidad Técnica de Machala.

Finalmente, y no por ello menos importante, durante el periodo de vinculación fue posible analizar la problemática de la invasión de organismos exóticos en el Ecuador y, aprovechando la experiencia en la materia, se abordó el caso específico del manejo y cultivo de tilapias en el país con la finalidad de ofrecer información que permita a los legisladores y administradores de la biodiversidad ecuatoriana, contar con detalles que deben ser tomados en cuenta a la hora de establecer ordenanzas sobre la materia. Esto se tradujo en una publicación que, aunque no formaba parte del plan de investigación propuesto, representa un aporte de primera línea para las agencias encargadas de supervisar las actividades de tilapicultura en el país.

MARCO TEÓRICO

Desde el punto de vista evolutivo los peces forman un grupo polifilético considerable, con 27.977 especies, que representa más de la mitad del número total de vertebrados conocidos el cual se encuentra en 54.711 especies (Nelson, 2006). 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 32.500 (Nelson, 2006).

Debido a su gran diversidad y a los relativamente escasos estudios realizados hasta el momento, el conocimiento que se tiene de la ictiofauna es aún 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 a muchas especies que todavía no son conocidas. Por estas razones, se torna cada vez más importante y urgente la necesidad de estudiar las especies presentes en nuestros ecosistemas. En este punto es necesario señalar que los estudios requeridos no se circunscriben a la simple identificación de especies que puedan registrarse en un futuro, sino que deben abarcar todos los aspectos posibles, de manera que las futuras generaciones dispongan de información que les permita aprovechar ese recurso al máximo.

Uno de los aspectos que ha llamado la atención de los científicos que se dedican al estudio de los peces es la caracterización citogenética que en los últimos años se ha expandido significativamente, sobre todo a partir de la aplicación de técnicas de bandeo que, entonces usadas de manera rutinaria en investigaciones de citogenética humana y de mamíferos, presentaban dificultades para adaptarlas a los cromosomas de peces. La introducción en el estudio de los cromosomas de los peces de técnicas como el bandeo C, localización de regiones organizadoras del nucleolo por impregnación con Nitrato de plata (Ag-RONs), el uso de fluorocromos base-específicos, la incorporación de análogos de bases del ADN en el ciclo celular y, en

menor escala, los bandeos G y R han suministrado, en conjunto, importantes resultados en la comparación de especies estrechamente emparentadas (Sola *et al.*, 1984; Almeida -Toledo *et al.*, 1988a), en la visualización de estadios iniciales de diferenciación de cromosomas sexuales (Phillips & Ihssen, 1985; Almeida-Toledo *et al.*, 2000), en la identificación de patrones de replicación de los cromosomas (Delany & Bloom, 1984) y, más recientemente, en la identificación de secuencias de ADN en los cromosomas (Martínez *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 2002, 2004).

Hasta el año 2011, habían sido obtenidos datos sobre el número de cromosomas y fórmula cariotípica para 3.425 especies y subespecies vivientes de agnatos, peces cartilaginosos, actinopterigios y sarcopterigios (Arai 2011). No obstante, esa información apenas representa una pequeña fracción de todas las especies reconocidas de peces existentes (aproximadamente el 10,36%).

El número de estudios citogenéticos en peces neotropicales ha presentado un considerable aumento en los últimos años. En la actualidad se registran datos citogenéticos para 47 familias, 278 géneros y 1.047 especies dulceacuícolas y 39 familias, 73 géneros y 109 especies marinas (Estas listas son actualizadas periódicamente y se encuentran disponibles en Internet en los sitios: <http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>, y <http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Marine%20Neotropical%20fishes.pdf>.

Considerando que el inventario de ictiofauna neotropical de agua dulce (Reis *et al.*, 2003), totaliza unas 6025 especies (4475 especies válidas más 1550 especies no descritas) y que en la actualidad existen registros de datos citogenéticos para 47 familias, 278 géneros y 1.047 especies dulceacuícolas del neotrópico el conocimiento citogenético en este grupo apenas cubre el 17,37% de las especies existentes. Esos datos permiten establecer que el número diploide varía entre 2n=20 para *Pterolebias longipinnis* a 2n=134 para *Corydoras aeneus*. Sin embargo, hay una gran discrepancia respecto a la naturaleza de los datos disponibles para cada grupo. Así, por ejemplo, para el género *Hypseobrycon* se conocen los números diploides y/o haploides de 35 especies/subespecies pero apenas seis tienen su cariotipo descrito, mientras que para el género *Leporinus* son conocidos los números haploide y/o diploide de 37 especies de las cuales apenas para tres de ellas no hay datos respecto a su estructura cariotípica. El género más estudiado ha sido *Corydoras* para el cual se conocen los números haploide y/o diploide de 43 especies. Han sido descritos cromosomas sexuales para 51 especies o poblaciones locales (5,75% del total de especies analizadas) que engloban 36 informes de heterogamia femenina (68%) y 17 de heterogamia masculina (32%). Cromosomas supernumerarios han sido encontrados en 41 especies (4,45%) del total de especies analizadas. El contenido de ADN nuclear se encuentra determinado para 174 especies y/o poblaciones y varía entre $1,04 \pm 0,09$ pg/núcleo diploide en *Corydoras cf. simulatus* (2n=62) a 248,0

pg/núcleo diploide en *Lepidosiren paradoxa*. El número y/o la localización de las regiones organizadoras del nucléolo (RONs) han sido descritos para 1.205 especies y/o poblaciones, variando entre 1 y 13 pares de cromosomas portadores de RONs (con una moda de 1 par). Los estudios que involucran la aplicación de técnicas de bandeo cromosómico han sido aplicados a 1.032 especies y/o poblaciones locales, destacándose un creciente aumento de la aplicación de técnicas de hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH).

En cuanto a los peces Neotropicales marinos, las caracterizaciones citogenéticas se iniciaron a principio de la década de los 80, con la descripción de los cariotipos de *Menticirrhus americanus* y *Micropogonias furnieri* (Gomes et al., 1983a, 1983b) y actualmente, el estudio de estos peces se encuentra en franco aumento. El análisis general de los datos para 109 especies marinas (Oliveira, 2006; indica que las familias más extensamente estudiadas son Carangidae y Mugilidae, para las que se conocen los números haploide y/o diploide de 10 y 16 especies respectivamente. Los números diploides varían de 2n=24 para *Mugil curema* a 2n=100/102 para *Prionotus punctatus*. Del total de especies analizadas, 49 (60%) presentan 2n=48 cromosomas y en 28 (35%) de ellas todos los cromosomas son acrocéntricos. Han sido descritos cromosomas sexuales para tres especies (3,7% del total de especies analizadas) y cromosomas supernumerarios para una especie (1,2% del total de especies analizadas). Se conoce el contenido de ADN nuclear para dos especies (2,5% del total de especies analizadas) siendo que el mismo varía de $1,24 \pm 0,01$ pg/núcleo en *Micropogonias furnieri* ($2n=48$) a $1,57 \pm 0,03$ pg/núcleo en *Menticirrhus americanus* ($2n=48$). El número y localización de las regiones organizadoras del nucléolo (RONs) han sido descritos para 79 especies y/o poblaciones, y todas han exhibido RONs simples. Otras técnicas de bandeo cromosómico han sido aplicadas en 56 especies y/o poblaciones. Considerando que la ictiofauna de aguas marinas de la región Neotropical es bastante diversificada, se puede afirmar que el estado actual del conocimiento en esta área es aún muy limitado.

En el caso de Ecuador, no existe ningún reporte publicado de estudios citogenéticos en peces y, por lo tanto, la Citogenética en peces es una disciplina inédita en el país que requiere de urgente atención para la obtención de este tipo de información.

En este orden de ideas, este trabajo tiene la finalidad de iniciar este tipo de estudios en Ecuador e intentar capacitar personal de investigación que se aboque a desarrollar esta disciplina estudiando las especies locales. Por ello se propuso como objetivo principal la caracterización citogenética de *Scorpaena mystes*, perteneciente a la familia Scorpaenidae del Orden Scorpainiformes y que es conocido en Ecuador con los nombres vulgares de "pez diablo y pez roca". El estudio de esta especie en particular, reviste especial importancia por cuanto es posible resolver un problema

taxonómico de larga data que ha surgido entre *Scorpaena mystes* localizada en el Océano Pacífico y *Scorpaena plumieri* localizada en el Caribe y que se explicará en detalle en la siguiente sección de este informe.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Publicaciones que datan de mediados del siglo pasado describen diversos aspectos biológicos de *Scorpaena plumieri*, entre ellos, la etología; la variación morfológica; nuevos reportes de la presencia de *S. plumieri plumieri* y *S. plumieri mystes* en localidades adyacentes a las costas de Texas y de California y hasta emponzoñamiento en personas causadas por este pez. Un elemento en común en estas publicaciones es la íntima relación que presentan *Scorpaena plumieri plumieri* y *Scorpaena plumieri mystes*, consideradas en principio como dos subespecies distintas pero actualmente aceptadas como especies nominales válidas bajo la nomenclatura de *Scorpaena plumieri* y *S. mystes* sólo con base en las diferencias presentadas en cuanto a su distribución en distintas cuencas oceánicas, aunque no existen caracteres diagnósticos que claramente permitan la diferenciación taxonómica entre ellas.

En el caso de *Scorpaena plumieri*, los datos obtenidos para el Caribe y que constituyen el primer reporte de características citogenéticas para la especie indican un complemento diploide $2n=48$ en los que se logró identificar la existencia de dos citotipos: el Citotipo I (CI), constituido por 2 elementos metacéntricos y 46 subtelocéntricos con un NF=96 y el Citotipo II (CII) caracterizado por la presencia de 48 cromosomas subtelocéntricos-acrocéntricos, con NF=48; un sólo par cromosómico portador de Ag-RONs localizadas en posición telomérica de los brazos cortos del par subtelocéntrico número 5, en el CI y, en el par 9 para el CII y cuando se realizaron análisis de Hibridación Fluorescente in situ (FISH) con sondas específicas, la sonda para el gen 18S-rRNA hibridizó en los telómeros de los brazos cortos de un par ST coincidente con el correspondiente al portador de las Ag-RONs para ambos citotipos, mientras que para el gen 5S-rRNA, la FISH reveló las marcas en posición intersticial en los brazos largos de un par subtelocéntrico en ambos casos. El bandeo C, en ambos citotipos, mostró pequeños bloques intersticiales, teloméricos y centroméricos en casi todos los cromosomas; con un bloque grande de aproximadamente 1/3 de la longitud del brazo largo en los telómeros de un par cromosómico metacéntrico en el citotipo CI, mientras que en el citotipo CII este bloque se localizó en posición telomérica en los brazos largos de un par acrocéntrico.

El hallazgo de los dos citotipos con las diferencias indicadas conduce a descartar la posibilidad de un polimorfismo cromosómico intrapoblacional o ligado al sexo, debido a que estas variantes cariotípicas fueron observadas en ejemplares provenientes de

dos localidades de colecta y, en ambos sexos, y las diferencias citogenéticas descritas entre los citotipos CI y CII en *Scorpaena plumieri* así como la comparación de secuencias de DNA mitocondrial de esos citotipos con secuencias externas indican la presencia de especies críticas diferenciables por sus cariotipos de manera tal que los peces poseedores del citotipo CI se corresponderían con *S. plumieri* y los del citotipo CII con *S. mystes*.

DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los primeros intentos para obtener especímenes de *Scorpaena mystes* en la región marino-costera de la provincia del Oro fueron infructuosos debido a que el tipo de sustrato (fangoso-arenoso) de las áreas visitadas no es el hábitat de la especie en cuestión. Luego de varias indagaciones e interrogatorios a pescadores locales se logró obtener información que apuntaba a la presencia de la especie en la Provincia de Santa Elena por lo que se decidió realizar una Visita Científica a Playa Ayangue (Santa Elena) donde fueron obtenidos 4 ejemplares de *Scorpaena mystes* teniendo que contratar los servicios de pescadores locales para la colecta de los peces mediante buceo a profundidades entre 9-12 m y aprovechar la presencia de las instalaciones del CENAIM-ESPOL, para obtener los cromosomas gracias a las facilidades logísticas y equipos que brindó ese centro de investigación.

Dentro del marco de la propuesta general de investigación presentada al SENESCYT, también fueron realizadas salidas de campo a diversos ríos en la Provincia del Oro como el Río Las Lajas, Río dos Bocas, y los canales de riego de las plantaciones de Banano en Santa Inés donde fue posible colectar varios ejemplares de diferentes especies de peces dulceacuícolas entre los cuales, dependiendo del limitado tiempo disponible, algunos fueron objeto de estudios citogenéticos pero a todos les fueron extraídas muestras de tejido para crear un banco de tejido que permita realizar futuros trabajos con el material genético que pueda ser amplificado a partir de esas muestras con el empleo de primers específicos.

En una primera fase se invirtió esfuerzo en la obtención de un laboratorio con facilidades mínimas de equipamiento para poder realizar el trabajo planteado. Aunque se presentó una propuesta para construir un Laboratorio específicamente diseñado para realizar estudios citogenéticos que incluía Planos de Planta (**Anexo**) y solicitudes de Equipos y materiales (**Anexo**), el limitado tiempo de vinculación no permitió que esa propuesta se concretara. Sin embargo, fue posible obtener un espacio se encontraba desde hace más de 7 años clausurado y no operativo, lleno de equipos dados de baja y que se había convertido en un local totalmente no aprovechado. Luego de realizar las labores de limpieza, reparación de algunos equipos, (microscopios, centrífugas, vidriería, algunos reactivos que pudieron ser recuperados) materiales y reactivos, y

obtener en calidad de préstamo algunos equipos indispensables como estufa y microscopio con cámara digital, fue posible disponer de facilidades mínimas que permitieron realizar la investigación.

Como segunda fase se propuso realizar los análisis moleculares (Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) y secuenciación de los genes mitocondriales Citocromo oxidasa I y 16 S rDNA) en el Laboratorio de Genética y Citogenética de Peces del Instituto de Biociencias de la Universidad Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho de Brasil aprovechando la relación de cooperación que mantengo con el Dr. Claudio Oliveira (Director de ese laboratorio) quien puso a disposición el equipo, materiales y reactivos requeridos para esa etapa de la investigación.

JUSTIFICACIÓN

La utilización de características citogenéticas, como el número de cromosomas y fórmula cariotípica, Regiones Organizadoras del Nucleolo (RONs), distribución de heretocromatina constitutiva (bandas C) y de otros marcadores más específicos determinados gracias a la aplicación de técnicas moleculares, han revelado ser de gran importancia en el estudio de los peces permitiendo diagnosticar especies, diferenciar especies crípticas y razas cromosómicas (Nirchio et al., 2003a, 2005), establecer las relaciones existentes entre especies dentro de un género o familia (Nirchio et al., 2001, Oliveira et al., 2003), clarificar el origen de los híbridos naturales y variedades cultivadas (Nirchio et al., 2003b) y proponer teorías sobre la evolución del cariotipo en peces marinos y dulceacuícolas (Nirchio, 2014).

La posibilidad analizar *Scorpaena mystes* en el Pacífico y establecer su identidad, con base en las características de su cariotipo y secuencias de DNA de genes mitocondriales comparando los resultados con los obtenidos para *Scorpaena plumieri* en el Caribe, permitiría confirmar o descartar la presencia de *Scorpaena mystes* en las aguas en las costas de Venezuela conduciendo a proponer la ampliación del rango de distribución de *S. mystes* al océano Atlántico o, si es el caso, definir si uno de los dos citotipos de *Scorpaena plumieri* del Caribe es una nueva especie.

OBJETIVO GENERAL

Ante la falta absoluta de información, comenzar a generar el conocimiento citogenético de los peces de Ecuador determinando el número diploide, cariotipo, número fundamental, y cuando sea posible, el patrón de distribución de Bandas C y el número y distribución de Regiones Organizadoras del Nucléolo (RONs) para peces marinos y

dulceacuícolas de la Provincia del Oro, Ecuador centrando la investigación en *Scorpaena mystes*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el número diploide, cariotipo, número fundamental, patrón de distribución de Bandas C y el número y distribución de Regiones Organizadoras del Nucléolo (RONs) para las especies *Scorpaena mystes*.
- 2) Crear un banco de tejidos para disponer de material genético (DNA) que permita secuenciar marcadores moleculares de utilidad en el estudio de *Scorpaena mystes*. En este objetivo, aprovechando la colecta de otros especímenes pertenecientes a otras especies, obtener material para iniciar un banco de tejidos que permita en futuras investigaciones disponer material genético apto para otros estudios.
- 3) Secuenciar los genes mitocondriales de *Scorpaena mystes* y *Astroblepus sp* en la UNESP, SP, Brasil
- 4) Iniciar una colección ictiológica de los peces del Ecuador a fin de disponer de ejemplares de referencia (vouchers).

RESULTADOS OBTENIDOS

Investigación:

- a) Caracterización citogenética y molecular de *Scorpaena mystes*. (Anexo 1 CD)
- b) Caracterización molecular de *Astroblepus sp*. (Anexo 2 CD)
- c) Fueron incluidos otros aspectos que contribuyeron a la generación de información científica de gran interés para la ciencia y, por supuesto, para el conocimiento de la biodiversidad ecuatoriana y gracias a los cuales fue posible producir tres artículos adicionales al ofrecido en la Matriz de Actividades, a desarrollar en apenas 4 meses de vinculación totalizando cuatro artículos científicos, dos concluidos y y enviados y dos a punto de culminar:
 - i. Un mensaje de alerta sobre la introducción, manejo y cultivo de especies de tilapias (Perciformes: Cichlidae) y sus híbridos en la República de Ecuador (Anexo 3 CD)
 - ii. Citogenética como herramienta taxonómica en peces (Anexo 3 CD)
 - iii. A putative new Caribbean species of *Scorpaena* (Actinopterygii: Scorpaeniformes) revealed by cytogenetic and molecular techniques. (Anexo 3 CD)

- iv. First description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in *Rhoadsia altipinna* (Characiformes: Characidae) from Ecuador (Anexo 3 CD)

Capacitación Científica:

- d) Organización de un Laboratorio de Citogenética de Peces. (Anexo 4 CD)
- e) Capacitación a varias miembros de la institución (Estudiantes, Profesores, Prometeos) de la UTMACH. (Anexo 5 CD)

Docencia:

- f) Curso-Taller "Citogenética de peces" (Anexo 6 CD)
- g) Conferencia, "Riesgos de la introducción de Tilapias en el Ecuador. (Anexo 7 CD)
- h) Asesoría de dos estudiantes del noveno ciclo para presentar Proyecto de trabajos de Titulación (Jonathan Barros, Jaime Rodríguez). (Anexo 8 CD)

Gestión de Recursos Nacionales e Internacionales:

- i) Conferencia sobre Identificación molecular de las especies (Anexo 9 CD)
- j) Curso-Taller sobre Principios de Análisis de Filogenias Moleculares. (Anexo 10 CD)

Relacionamiento Estratégico Interinstitucional a Nivel Nacional a Internacional:

- k) Convenio UTMACH-UNESP que está a la espera de la firma por parte de autoridades Rectorales. (Anexo 11 CD)

Colección Ictiológica peces

- l) Colección ictiológica de los peces del Ecuador (Anexo 12)

PAPERS INDEXADOS O ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS Y/O SOMETIDOS A REVISTAS CIENTÍFICAS

1. Artículo científico intitulado “**CITOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA TAXONÓMICA EN PECES**” que fue consignado para ser publicado en la Revista| **SABER**

CITOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA TAXONÓMICA EN PECES.

Mauro Nirchio¹ y Claudio Oliveira²

¹ Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

² Departamento de Morfología, Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumen:

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

Palabras clave: cromosomas, cariotipo, taxonomía, peces

Área: Ciencias Básicas y Tecnología

El artículo fue aprobado para ser publicado en el Volumen 26(4): octubre-diciembre, 2014. (Anexo 2: carta de aceptación). La revista SABER se encuentra incluida e indexada en el Índice y Biblioteca Electrónica de Revistas Venezolanas de Ciencia y Tecnología (**REVENCYT**), **SciELO** (Scientific Electronic Library Online), Registro de Publicaciones Científicas y Tecnológicas Venezolanas del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (**FONACIT**), en los resúmenes sobre Ciencias Acuáticas y de la Pesca de la FAO (**ASFA**), en el Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (**LATINDEX**) y en Zoological Record (**THOMAS REUTERS**) (Anexos 3 y 4).

2. Artículo científico intitulado "**UN MENSAJE DE ALERTA SOBRE LA INTRODUCCIÓN, MANEJO Y CULTIVO DE ESPECIES DE TILAPIAS (PERCIFORMES: CICHLIDAE) Y SUS HÍBRIDOS EN LA REPÚBLICA DE ECUADOR**". El artículo fue sometido a la Revista *Latin American Journal of Aquatic Research*

**SOBRE LA INTRODUCCIÓN, MANEJO Y CULTIVO DE TILAPIAS EN LA REPÚBLICA DEL
ECUADOR: UN MENSAJE DE ALERTA.**

César Quezada Abad¹, Omar Sánchez Rogerio¹, Julio Eduardo Pérez², Juan I. Gaviria³
& Mauro Nirchio^{1,3}

¹ Universidad Técnica de Machala, Ecuador

² Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Venezuela

³ Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Venezuela.

Resumen:

Se enfatiza el potencial invasivo de las tilapias y algunos aspectos de su biología que deberían ser tomados en cuenta por parte de los legisladores para dictar las normas para el manejo de las tilapias en el Ecuador. Creemos que es importante brindar detalles que permitan a los investigadores, administradores y a quienes corresponda tomar decisiones referentes a la conservación de la diversidad dulceacuícola de la Nación y advertir acerca de la magnitud y alcance de las potenciales consecuencias de las tilapias en cuerpos de agua dulce, salobre o marinos, a fin de facilitar la adopción de medidas para mitigar el impacto del escape y/o liberación sin control de estos peces, establecer planes de erradicación, donde sea posible, y desarrollar la capacidad de respuesta a los efectos negativos de la invasión, contribuyendo así con la preservación de la biodiversidad.

Palabras clave: Tilapia; acuacultura; especies exóticas; invasión; biodiversidad

Área: Biodiversidad, Invasiones biológicas

Actualmente se encuentra en fase de arbitraje como consta en e-mail que acusa recepción del mismo.

La Revista *Latin American Journal of Aquatic Research* se encuentra indizada en: Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts (**ASFA**), Information Service of Oceanic Abstracts (**EBSCO**), Web of Science (Thomson Reuters), Online Computer Library Center (**OCLC**), Regional on-line Information System for Scientific Magazines of Latin America, Caribe, Spain and Portugal (**LATINDEX**), Scientific Electronic Library Online (**SciELO**), Scientific Magazine Network of Latin America and Caribe, Spain and Portugal (**REDALyC**), **SCImago Journal & Country Ranks**, **Scopus**, Zoological Record (**BIOSIS**).

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PREPARADOS PARA SER ENVIADOS A REVISTAS
CIENTÍFICAS INDEXADAS.

3. Artículo científico intitulado: **A putative new Caribbean species of *Scorpaena* (Actinopterygii: Scorpaeniformes) revealed by cytogenetic and molecular techniques.**

A putative new Caribbean species of *Scorpaena* (Actinopterygii: Scorpaeniformes) revealed by cytogenetic and molecular techniques

Mauro Nirchio^{1,2}, Claudio Oliveira³, Zoila Raquel Siccha-Ramirez³, Viviani França de Sene³, Omar Rogerio Sanchez², Valentina Milana⁴, Anna Rita Rossi⁴, Luciana Sola⁴

¹ Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela.

² Universidad Técnica de Machala, Ecuador

³ Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁴ Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “C. Darwin”, Sapienza - Università di Roma, Via Alfonso Borelli 50, 00161 Roma, Italia

Corresponding author: Mauro Nirchio

Key words: mtDNA, Cytochrome b, 16S rDNA, karyotype, cryptic species

Running title: A putative new species of *Scorpaena*

Abstract

Cytogenetic and molecular analyses were performed in presumptive specimens of *Scorpaena plumieri* from Venezuela and in specimens of *S. mystes* from Ecuador. Two cytotypes of *S. plumieri* were identified: cytotype 1, characterized by 2n=48, all subtelo/acrocentric chromosomes, and NF=48; cytotype 2 characterized by 2n=48, 2 metacentric+46 subtelo/acrocentric chromosomes, and NF=50. The two cytotypes also show a different location of the major ribosomal clusters, which are non-syntenic with minor ribosomal clusters, and a different constitutive heterochromatin distribution. *S. mystes* shows a Giemsa karyotype similar to *S. plumieri* cytotype 1, i.e. it is characterized by 2n=48, all subtelo/acrocentric chromosomes. Mitochondrial molecular markers (COI and 16S rRNA gene sequences) disclosed the existence of two distinct lineages, corresponding to the two cytotypes, in *S. plumieri*. *S. mystes* also cluster into a distinct and well supported clade. However, their phylogenetic relationships appear to be unresolved. To summarize, both cytogenetic and molecular data identify two distinct entities within the presumptive *S. plumieri* specimens from Venezuela, possibly disclosing the existence of two cryptic species in the area.

Este artículo, aunque se encuentra prácticamente listo para ser sometido a una revisión para publicarse en alguna Revista de Impacto del Primer Cuartil requiere de disponer algún tiempo adicional para depositar las secuencias genéticas obtenidas en el GENE BANK y poder disponer de un Número de Acceso lo cual es un proceso que se está realizando a través de una colega Italia (Luciana Sola, coautora) en la Universidad de Roma, del grupo de investigación en el que me desempeño a nivel internacional.

CONTRIBUCIÓN AL PLAN DEL BUEN VIVIR

La biodiversidad es la variedad de la vida y es un concepto que incluye varios niveles de organización desde las especies de plantas, animales, hongos y microorganismos que viven en un espacio determinado, a su variabilidad genética incluyendo los procesos ecológicos y evolutivos que se dan a nivel de cromosomas, genes, especies, ecosistemas y paisajes.

La República de Ecuador como signataria del Convenio sobre la Diversidad Biológica (1993) está comprometida con la creación de medidas para la conservación, el aprovechamiento sustentable de la biodiversidad, y el reparto equitativo de los beneficios derivados del uso de sus componentes. El Gobierno ecuatoriano, consciente de que la riqueza de la biodiversidad del país constituye un potencial importante para el desarrollo del conjunto de saberes, conocimientos y aplicaciones, tanto tradicionales como científicas, estableció en el Plan Nacional del Buen Vivir la necesidad de implementar iniciativas para fortalecer la investigación y aplicación del bioconocimiento y, por lo tanto, los resultados obtenidos se encuentran enmarcados dentro de los intereses del Plan Nacional del Buen Vivir.

En este orden de ideas y también dentro del marco del Plan Nacional del Buen Vivir, la posibilidad de hacer un análisis de la situación actual del manejo y cultivo de Tilapias en el Ecuador, considerando el potencial invasivo de esa especie, permitió recopilar información de gran importancia que puede ser usada por la legislación ecuatoriana para administrar las prácticas de piscicultura que se realizan con esa especie invasora a fin de minimizar el impacto negativo de una especie que ha demostrado haber causado pérdidas económicas y dramáticos daños a la biodiversidad de todos los países en la cual ha sido introducida.

DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS ALCANZADOS

- **Investigación:** Aun cuando no fue posible obtener el cariotipo de *Astroblepus* sp debido a la imposibilidad de transportar los peces vivos hasta el laboratorio (0 msnm y temperatura entre 20-29°C) por las condiciones ambientales en su hábitat diametralmente opuestas (2600 msnm y temperaturas entre 3-10 °C), se logró obtener material para iniciar estudios moleculares y preservar ejemplares vouchers para realizar la identificación taxonómica de los mismos.



Figura 1. Arbol filogenético de consenso obtenido para las secuencias del gen mitocondrial 16S de muestras de *Astroblepus* sp.

A partir de esas muestras fueron secuenciados los genes 16S y CO1 que permitieron generar una topología que revela la presencia de tres clados bien soportados por valores de bootstrap superiores al 70% (Figura 1 y 2) y que pone de manifiesto la presencia de al menos tres especies diferentes que requieren descripción (Fig. 3).

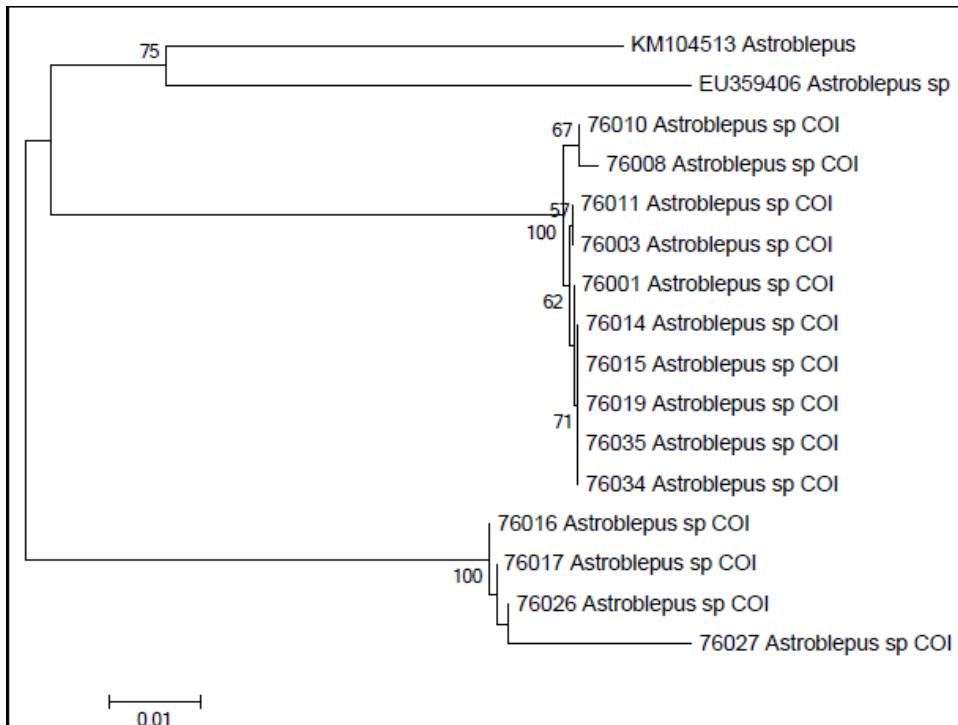


Figura 2. Árbol filogenético de consenso obtenido para las secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa 1 de muestras de *Astroblepus* sp.



Figura 3. Formas melánicas de *Astroblepus* spp.

- En el caso de *Scorpaena mystes* de Ecuador se cumplió a cabalidad con el objetivo de obtener el cariotipo para hacer las comparaciones con ejemplares de *Scorpaena plumieri* del Caribe. Además también fue posible obtener muestras de tejidos para hacer los estudios de DNA y compararlos con muestras del Caribe, logrando establecer diferencias moleculares entre las dos especies del Caribe y la de Ecuador que sustentan la posibilidad cierta de estar en presencia de una nueva especie de *Scorpaena* en el Caribe, diferente a *Scorpaena mystes* del Pacífico (Ecuador) sustentada en datos citogenéticos y moleculares (Ver manuscrito anexo).
- Otro aspecto importante es la preparación de dos artículos científicos ya enviados a las revistas *Saber* y *Latin American Journal of Aquatic Research* de los cuales el de la Revista *saber* se encuentra aprobado y el de la revista *Latin American Journal of Aquatic Research* se encuentran en proceso de evaluación. Adicionalmente se comenzó a preparar un tercer artículo con los datos citogenéticos de *Rhoadsia altipinna* con lo que se alcanzaría la producción total de cuatro productos de investigación tangibles, lo que representa tres artículos más de lo que fue propuesto presentar en la Matriz de Actividades en el lapso de 4 meses de vinculación.
- **Capacitación Científica:** Durante mi estadía brindé capacitación a varias personas de la institución (Estudiantes, Profesores, Prometeos), en el manejo, cuidado y calibración de microscopios ópticos logrando recuperar muchos equipos que se encontraban fuera de uso.

Lo más relevante es que el Ing. Omar Sánchez quien me fue asignado como contraparte técnica, recibió capacitación en las técnicas de análisis de cariotipos de peces y en conjunto con él se ha podido preparar varios manuscritos para publicaciones científicas en revistas indexadas contribuyendo así con su formación profesional y con el incremento de la producción científica de la UTMACH.

- **Organización de Laboratorio de Citogenética de Peces.** Se cumplió con la propuesta de organizar un laboratorio apto para realizar estudios de Citogenética en Peces. Aun cuando se está a la espera de la compra de los equipos, materiales y reactivos, gracias a que fue posible rescatar algunos insumos que habían sido dados de baja y otros fueron obtenidos en calidad de préstamo.
- **Docencia:**

1. Se organizó el curso "Citogenética de peces" que fue propuesto en mi plan de trabajo el cual fue dictado, según lo previsto en la Matriz de actividades durante la última semana del mes de octubre (27 al 31 de octubre). Este curso fue programado para comprender un total de 40 horas de clase teórico-prácticas pero debido al inicio de las actividades académicas en la universidad y con la finalidad de que asistiera el mayor número posible de participantes, fue necesario concentrar la información en 25 horas de clases dictadas desde las 14 horas a 18 horas. Con ese Curso fueron

- capacitados profesores de la UTMach y estudiantes de la Carrera Ingeniería Acuícola.
2. Dicté la Conferencia, "Riesgos de la introducción de Tilapias en el Ecuador" con asistencia de más de 40 participantes.
 3. Ofrecí una Clase Teórico–Práctica de 7 horas de duración sobre preparación de cariotipos en peces a un grupo de estudiantes del segundo ciclo de la carrera Ingeniería Acuícola.
 4. Brindé asesoría de dos estudiantes del noveno ciclo para presentar Proyecto de trabajos de Titulación (Jonathan Barros, Jaime Rodríguez).
- **Gestión de Recursos Nacionales e Internacionales:** Fueron realizadas todas las gestiones para traer como invitado al Dr. Claudio Oliveira desde Brasil para dictar una conferencia sobre Identificación molecular de las especies y un Curso-Taller que intitulamos Principios de Análisis de Filogenias Moleculares. Ante la propuesta presentada al Rector de la Universidad se logró obtener recursos para sufragar los costos del pasaje aéreo del Dr. Oliveira. La estadía del Dr. Oliveira en Ecuador fue cubierta con recursos propios.
 - **Relacionamiento Estratégico Interinstitucional a Nivel Nacional a Internacional:** Fueron realizadas las gestiones para concretar la firma del Convenio UTMACH-UNESP. Se está a la espera de la firma del documento durante el periodo Diciembre-Enero mientras las autoridades rectorales de las respectivas universidades sometan a consideración de sus Consejos Universitarios la propuesta de Convenio de Cooperación.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Fueron realizadas todas las salidas de campo necesarias para colectar peces dulceacuícolas y marinos lográndose obtener un total de 22 taxones pudiendo clasificar la mayoría, aunque algunas requieren identificación a nivel de especie por cuanto sólo fue posible clasificarlas hasta nivel de Género. Esto ha representado un gran volumen de trabajo por las horas invertidas en el campo y en el laboratorio, consulta de literatura especializada, edición de imágenes digitales y organización del material colectado, pero ha podido permitir disponer de una colección incipiente con la meta de, en un futuro, constituirse en material de referencia para alumnos y docentes de la UTMACH y del Ecuador.
- Pudo obtenerse el cariotipo de varias especies dulceacuícolas y marinas y con ello capacitar a la contraparte institucional (Ing. Omar Sanchez) en las técnicas de obtención de cromosomas con lo cual la universidad dispone ahora de un docente – investigador capaz para desarrollar y dirigir este tipo de estudios.

- Además se dictó una conferencia a una nutrida concurrencia para crear conciencia respecto a los riesgos que entrañan la introducción, manejo y cultivo de las Tilapias para la Biodiversidad en el Ecuador.
- Quizás lo más importante es la preparación de tres artículos científicos de los cuales uno ya se encuentra aprobado para ser publicado en la Revista Saber, otro fue sometido a la revista *Latin American Journal of Aquatic Research*, un tercero está listo para ser sometido a Publicación y se está trabajando en un cuarto manuscrito que estimo pueda culminar en aproximadamente dos meses mientras se analizan los datos.
- Una recomendación importante es que el SENESCYT resuelva el problema de permisos de pesca científica y de exportación de peces preservados en alcohol 70% para ser depositados en museos y colecciones certificadas con suficiente antelación, por cuanto la importancia de contar con colecciones de tejidos y ejemplares voucher es de primer orden en trabajos de bioprospección. Mientras no sea posible enviar o transportar tanto los ejemplares voucher así como muestras de sus tejidos fuera del País, resulta difícil concluir aspectos como el de secuenciación de genes lo cual puede entorpecer este tipo de investigaciones. Afortunadamente, en esta ocasión fue posible salvar los inconvenientes.
- Otro aspecto que considero importante destacar es el referente a los cambios, por parte del SENESCYT, de las fechas de entrega de Informe Final de Vinculación. Llama la atención que, habiendo recibido aprobación para desarrollar una matriz de actividades que fue revisada y auditada tanto por la Universidad como por el SENESCYT, alertándome reiteradamente que los plazos para llevar a cabo el Proyecto son inamovibles se me sometiera a una presión a mi juicio excesiva para rendir informes técnicos en lapsos fuera de lo estipulado inicialmente. Aun reconociendo que los cambios realizados en el cronograma obedecen a una intención de solucionar los pagos de los Prometeos, esa situación genera circunstancias de estrés y ansiedad innecesarias y por lo tanto sugeriría, en un futuro, quizás prever la ejecución presupuestaria y los trámites administrativos con suficiente antelación para evitar en lo posible este tipo de cambios en los cronogramas o, cuando los Prometeos culminen sus actividades en diciembre, tratar esos caso como especiales brindando al investigador condiciones que le permitan usar el tiempo con mayor eficiencia en la generación de los productos finales, es decir, los artículos científicos que requieren de tranquilidad para poder hilar ideas y plasmarlas en un manuscrito para su difusión en revistas científicas.

LIMITACIONES

Una limitación importante es la relativa a la obtención de permisos de pesca científica y de exportación de organismos preservados en alcohol 70% para ser depositados en museos y colecciones certificadas por cuanto la importancia de

contar con colecciones de tejidos y ejemplares voucher es de primer orden en este tipo de trabajos. Mientras no sea posible enviar o transportar oportunamente tanto los ejemplares voucher así como muestras de sus tejidos fuera del País, es imposible concluir aspectos importantes como el de secuenciación de genes. Este inconveniente escapa a mi responsabilidad como Prometeo por cuanto en mi propuesta de investigación y en mi Matriz de Actividades especificué claramente que requería llevar las muestras a Brasil y, durante la reunión de inducción en las oficinas del SENESCYT a mi llegada al Ecuador, alerté de esta preocupación y, hasta la fecha próxima al viaje programado a Brasil, no había sido solventado ese aspecto. En este sentido, me vi obligado a invertir mucho tiempo en la redacción de un Proyecto para ser presentado ante el Ministerio del Ambiente del Ecuador para solicitar permisos de investigación y de exportación de material biológico. Esta observación más allá de ser onsiderada como una queja debe ser tomada como una crítica constructiva para mejorar el funcionamiento y operatividad del PROYECTO PROMETEO, que es una iniciativa digna de admiración y que apoyo incondicionalmente, pero que por mantener ese sentimiento de respaldo, considero necesario emitir mi opinión como investigador.

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama D.M. & A.M. Anggawati. 1999. Polyculture of *Penaeus monodon* and red tilapia in intensive pond culture conditions. ASA Technical Bulletin, Vol. AQ47: 1-7.
- Alcantar-Vazquez J.P., R. Moreno-De La Torre, D. Calzada-Ruiz, & C. Antonio-Estrada. 2014. Production of YY-male of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from atypical fish. Lat. Am. J. Aquat. Res. [online], 42(3): 644-648.
- Alday de Graindorge V. & D. Griffith. 2001. Ecuador. In: Thematic review on Management Strategies for Major Diseases in Shrimp Aquaculture. Subasinghe R., R. Arthur, M.J. Phillips & M. Reantaso (eds). Report of the workshop held in Cebu, Philippines from 28-30 November, 1999. A component of the WB/NACA/WWF/FAO Program on Shrimp Farming and the Environment. pp. 17-19.
- Aljanabi S. M. & L. Martínez L.1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acid Res 25: 4692-4693.
- Alves Al, De Borba Rs, Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Foresti F. 2012. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). Comp. Cytogen. 6(4):443–452.
- Andreatta Aa, Almeida-Toledo Lf, Oliveira C, Toledo-Filho Sa. 1992, Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces,Siluriformes, Loricariidae). I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietenses*. Cytologia 57:369-372
- Arai R, Katsuyama I (1973) Notes on the chromosomes of three species of shore-fishes. Bull Natn Sci Mus Tokyo 16: 405–408.
- Arai R. 2011. Fish Karyotypes: A Check List. Springer, 348 pp.
- ASP (Aquasense Panama). 2014. Our Farm - Isla San Jose, Panama. [<http://www.aquasenseusa.com/#our-farm/c1gdh>]. Revisado: 6/10/2014.
- Barel C.D.N., R. Dorit, P.H. Greenwood, G. Fryer, N. Hughes, P.B.N Jackson, H. Kawanabe, R.H. Lowe-McConnell, M. Nagoshi, A.J. Ribbink, E. Trewavas, F. Witte & K. Yamaoka. 1985. Destruction of fisheries in African lakes. Nature, 315: 19–20.
- Baroiller J.F. & B. Jalabert. 1989. Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. Aquatic. Living Resour., 2(2): 105-116.
- Beardmore J., G. Mair & R. Lewis, 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. Aquaculture , 197: 283–301.

- Beardmore J.A., G.C. Mair, R.I. Lewis. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapias: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, 197: 283–301.
- Bellafronte E, Margarido VP, Moreira-Filho O. 2005. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genet. Mol. Biol.* [online] 28(4):710-716.
- Bernardi G, Goswami U (1997) Molecular evidence for cryptic species among the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and *Trematomus hansonii*. *Antarctic Science* 9 (4): 381-385.
- Bessa Junior A.P., C.M. da Silveira Borges Azevedo, F.S. Thé Pontes & G.G. Henry-Silva. 2012. Polyculture of Nile tilapia and shrimp at different stocking densities. *R. Bras. Zootec.*, 41(7): 1561-1569.
- Bocek A. (ed), 1983. Culture of hand-selected male tilapia. Water harvesting and aquaculture for rural development. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Auburn University, Auburn AL, USA, 6 pp.
- Boyd C.E., A.A. McNevin, J. Clay & H.M. Johnson. 2005. Certification Issues for Some Common Aquaculture Species, Reviews in Fisheries Science, 13(4): 231-279, DOI: 10.1080/10641260500326867.
- Breder C (1963) Defensive behavior and venom in *Scorpaena* y *Dactylopterus*. *Copeia* 4: 698-700.
- Briggs M., S. Funge-Smith, R.P. Subasinghe & M. Phillips. 2005. Introducciones y movimiento de dos especies de camarones peneídos en Asia y el Pacífico. FAO Documento Técnico de Pesca No. 476. Roma, FAO;, 86pp.
- BUITRAGO-SUÁREZ UA, BURR BM. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatysoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa* 1512:1–38.
- Burger J., K. Cooper, D.J. Gochfeld, J.E. Saliva, C. Safina, D. Lipsky & M. Gochfeld. 1992. Dominance of *Tilapia mossambica*, an Introduced Fish Species, in Three Puerto Rican Estuaries. *Estuaries*, 15(2): 239-245.
- Cano J, Thode G, Alvarez M (1982) Karyoevolutive considerations in 29 Mediterranean teleost fishes. *Vie Milieu* 32: 21–24.
- Caputo V, Cerioni PN, Caniglia M, Giovannotti M (2003) Chromosomal studies of five tropical Scorpaeniform fishes (Teleostei, Scorpaenidae). *Italian Journal of Zoology* 70: 201-204.
- Caputo V, Marchegiani F, Olmo E. 1996. Karyotype differentiation between two species of carangid fishes, genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae). *Mar. Biol.* 127:193 199.
- Caputo V, Sorice M, Vitturi R, Magistrelli R, Olmo E (1998) Cytogenetic studies in some species of Scorpaeniformes (Teleostei: Percomorpha). *Chromosomal Research* 6: 255-262.
- Caraballo P. 2009. Efecto de tilapia *Oreochromis niloticus* sobre la producción pesquera del embalse El Guájaro Atlántico – Colombia. *Rev.MVZ Córdoba*. 14(3): 1796-1802.
- Cartay R. 1997. Una ojeada al comercio mundial de los alimentos. *Agroalimentaria*, 5: 25-32.
- Cataudella S, Civitelli MV, Capanna E (1973) The chromosomes of some Mediterranean teleosts: Scorpaenidae, Serranidae, Labridae, Blenniidae, Gobiidae (Pisces–Scorpaeniformes, Perciformes). *Boll Zool* 40: 385–389.
- CENAIM (Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas). 2014. Cultivo de Peces Marinos. Proyecto: Caracterización de cultivo de Tilapia en ambiente salino. [<http://www.cenaim.espol.edu.ec/node/95>]. Revisado: 6/10/2014.
- Cervigón F (1991) Los peces marinos de Venezuela. Volumen I. Fundación Científica de Los Roques. Caracas.
- Cervigón F. 1993. Los peces marinos de Venezuela. 2^a ed. Fundación Científica Los Roques. Caracas, Venezuela, 499 pp.
- CNA (Cámara Nacional de Acuacultura – Ecuador). 2014. Exportaciones de Tilapia Ecuatoriana a EEUU - Julio 2014. Categoría: Tilapia. [<http://www.cna-ecuador.com/comercio-exterior/estadisticas/tilapia>] Revisado: 15/8/2014.
- Cnaani A., B.Y. Lee, N. Zilberman, C. Ozouf-Costaz, G. Hulata, M. Ron, A. D'Hont, J.F. Baroiller, H. D'Cotta, D.J. Penman, E. Tomasino, J.P. Coutanceau, E. Pepey, A. Shirak & T.D. Kocher. 2008. Genetics of sex determination in tilapia species. *Sex. Dev.*, 2: 43–54.
- Cnaani A. & B. Levavi-Sivan. 2009. Sexual Development in Fish, Practical Applications for Aquaculture. *Sex. Dev.*, 3:164–175, DOI: 10.1159/000223080.
- Coates DJ, Shaw DD (1984) The chromosomal component of reproductive isolation in the grasshopper *Caledia captiva*. III. Chiasma distribution pattern in a new chromosomal taxon. *Heredity* 53:85-100.

- COMINGS DE. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structures. *Ann. Rev. Genet.* 12:25-46.
- Contreras-Sánchez W.M., M.S. Fitzpatrick & Schreck. 2001. Fate of methyltestosterone in the pond environment: impact of MT-contaminated soil on tilapia sex differentiation. In: Gupta A., K. McElwee, D. Burke, J. Burright, X. Cummings, & H. Egna (Eds), Eighteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, 83-86.
- Corrêa M, Galetti Jr P (1997) Chromosomal diversity in Scorpaenidae (Teleostei, Scorpaeniformes): cytogenetic studies in *Scorpaena brasiliensis* and *Scorpaena isthmensis* from the coast of Rio de Janeiro, Brazil. *Cytologia* 62: 397–404.
- Costa F, Carvalho G (2007) The barcode of life initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Genomics, Society and Policy* 3: 29– 40.
- Cucherousset J. & J.D. Olden. 2011. Ecological impacts of nonnative freshwater fishes. *Fisheries*, 36 (5): 215-230, Doi:10.1080/03632415.2011.574578
- Delarete Drummond C., L.D. Solis Murgas & C. Vicentini. 2009. Crescimento e sobrevivência de tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) submetidas a diferentes temperaturas durante o processo de inversão sexual. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 33(3): 895-902.
- Devlin R.H. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Diniz D, Laudicina A, Bertollo Lac. 2009. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 32(1):37-41.
- Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Bonillo C, Volobouev V. 2002. "Ag-NORs" are not always true NORs: New evidence in mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 98:75-77 doi: 10.1159/000068541.
- El-Sayed A-F.M. 2006. Tilapia Culture. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 277 pp.
- Endo KS, Monteiro MER, Zawadzki CH, De Souza PLR & Ferreira HJ (2012) Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. *Acta Scientiarum. Acta Scientiarum. Biological Sciences* 34 (2): 181-189. Doi: 10.4025/actascibiolsci.v34i2.9318
- EPA. 2014. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/>. Revisado: 06/10/2014.
- Eschmeyer WN, Fong JD. 2014. Species by Family/Subfamily. [<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>]. Online Version, Updated 5 Feb 2014.
- Ezaz M.T., J.M. Myers, S.F. Powell, B.J. McAndrew & D.J. Penman. 2004. Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 232: 205-214.
- FAO 1997. Enfoque precautorio para la pesca de captura y las introducciones de especies. FAO Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable. No 2, 64 pp.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
- Ferreira DC, Chiachio MC, Takako AK, Andreata AA,, Foresti F, Oliveira C. 2005. Comparative cytogenetics of nine species of Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): the importance of structural rearrangements in chromosome evolution. *Caryologia* 58(4):387-395.
- Fitzsimmons K. 2000. Tilapia and penaeid shrimp polycultures. *Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Aquanews*, 15(4): 1-3.
- Foresti F. 2008. A brief history of fish genetics in Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 31(1) (suppl):385-388.
- Froese R, Pauly D (2013) FishBase. World Wide Web electronic publication www.fishbase.org, version (01/2013).
- FWS. 2014. US Fish and Wildlife Service . <http://www.fws.gov/>. Revisado: 06/10/2014.
- Galetti Jr. P M. 1998. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies, *Ital. J. Zool.* 65:53-56, DOI: 10.1080/11250009809386795.
- Galetti PM, Foresti F. 1986. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* 43:43-46.
- Galluzzi G., C. van Duijvendijk, L. Collette, N. Azzu & T. Hodgkin. 2011. Biodiversity for Food and Agriculture - Contributing to food security and sustainability in a changing world. Outcomes of an expert workshop held by FAO and the Platform on Agrobiodiversity Research from 14–16 april 2010 in Rome, Italy. 66 pp.
- Genner M.J., E. Connell, A. Sheehan, A. Smith, J. Swanstrom, S. Mzighani, A. Mwijage, B.P. Ngatunga & G.F. Turner. 2013. Nile tilapia invades the Lake Malawi catchment, *Afr. J. Aquat. Sci.*,38:sup1, 85-90

- Goslan E.R. 2008. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad. *Fish Fish.*, 9:106-115.
- Griffiths AJF, Wessler S R, Carroll S B, Doebley J. 2012. *Introduction to Genetic Analysis*. H. W. Freeman and Company. Tenth edition. 832 pp.
- Gunter G (1941) Notes on variation in *Scorpaena plumieri*. *Copeia* 2: 119-120.
- Gunter G (1942) A new *Scorpaena* from the Texas Coast, with notes on *Scorpaena mystes* Jordan and Starks. *Copeia* 2: 105-111.
- Haddad V, Martins I, Makyama H (2003) Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 y *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the South-western Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon* 42: 79-83.
- Harrison I J, Nirchio M, Oliveira C, Ron E, Gaviria J. 2007. A new species of mullet (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. *J. Fish Biol.* 71(a):76-97.
- Hartley-Alcocer A.G. 2014. Potential Of YY Tilapia Male Technology. *Global Aquaculture Advocate*, March/April 38-40 [http://www.til-aqua.com/images/pdf/Global-aquaculture-advocate-april2014.pdf]. Revisado 2/10/2014.
- Halfman GS, Collette BB, Facey DE, Bowen BW. 2009. *The diversity of fishes*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, UK. 720 pp.
- Hernández-Barraza C., J. Loredo, J. Adame & K.M. Fitzsimmons. 2012. Effect of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the growth performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a sequential polyculture system. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 40(4): 936-942.
- Hinton, S. 1962. Unusual defense movements in *Scorpaena plumieri* mystes. *Copeia* 4: 842.
- Homklín S., T. Wattanadorn, S. Kee-Ong, & T. Limpiyakorn. 2009. Biodegradation of 17 α -methyltestosterone and isolation of MT-degrading bacterium from sediment of Nile tilapia masculinization pond. *Water Sci. Technol.*, 59 (2): 261-265..
- Howell W M, Black DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 3:1014-1015.
- Howell W, Black D (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hubbs C (1945) The Record of a Fish, *Scorpaena mystes*, from California: A Comedy of Errors. *Copeia* 3: 129-133.
- Hyde J, Kimbrell C, Budrick J, Lynn E, Vetter D (2008) Cryptic speciation in the vermillion rockfish (*Sebastodes miniatus*) and the role of bathymetry in the speciation process. *Mol Ecol* 17(4): 1122-36.
- ICES. 2014. International Council for the Exploration of the Seas. http://www.ices.dk/explore-us/what-we-do/Pages/default.aspx. Revisado: 06/10/2014
- Infofish Trade News. 2014; No. 7/2014 [http://www.infofish.org/pdf/ITN/ITN%207-2014.pdf]. Revisado: 10/9/2014.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE (ICZN). 1994. Opinion 1787. *Mugil curema* and *M. liza* Valenciennes in Cuvier . Valenciennes, 1836 (Osteichthyes, Perciformes): specific names conserved. *Bull. Zool. Nom.* 51(3):286-287.
- Jiménez-Uzcátegui G., V. Carrión, J. Zabala, P. Buitrón & B. Milstead. 2007. Status of introduced vertebrates in Galapagos. *Galapagos Report 2006–2007:* 136–141. Charles Darwin Foundation, Puerto Ayora, Ecuador.
- Kavalco, KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94:180–186
- Khan A.M., Z. Ali, S.Y. Shelly, Z. Ahmad, & M.R. Mirza. 2011. Aliens: A catastrophe for native fresh water fish diversity in Pakistan. *J. Anim. Plant Sci.* 21(2 Suppl.): 435-440
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Biol* 16:111-120.
- Kirk R.G. 1972. A review of the recent development in tilapia culture with special reference to fish farming in the heated effluents of power stations. *Aquaculture*, 1: 45-60.
- Klett V. & A. Meyer. 2002. What, if anything, is a tilapia?—Mitochondrial ND2 phylogeny of tilapiines and the evolution of parental care systems in the African cichlid fishes. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 865–883.
- Kon T, Yoshino T, Mukai T, Nishida M (2007) DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: A lesson from gobioid fish Schindleria. *Mol Biol Evol* 44(1): 53-62.
- Kon T, Yoshino T, Nishida M (2011) Cryptic species of the gobioid paedomorphic genus Schindleria from Palau, Western Pacific Ocean. *Ichthyol Res* 58 (1): 62-66.

- Lasso-Alcalá O, Posada J (2010) Presence of the invasive red lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758), on the coast of Venezuela, southeastern Caribbean Sea. *Aquat Invasion* 5: S53-S59.
- Levan A, Fredga K, Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lévéque C., J.-C. Mounolou. 2009. Biodiversity. John Wiley & Sons Ltd, 284 pp.
- Lowe S., M. Browne, S. Boudjelas & M. De Poorter. 2004. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 12pp. First published as special lift-out in Aliens 12, December 2000. (Updated and reprinted version: November 2004).
- Loyo J, Lugo L, Cazorla D, Acosta M (2008) Envenenamiento por pez escorpión (*Scorpaena plumieri*) en una comunidad pesquera y turística de la península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela: aspectos clínicos, epidemiológicos y tratamiento. *Investigaciones Clínicas*. 49 (3): 299-307.
- Lozano R, Rejón C, Rejón M (1988) A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. *Stain tech* 63: 335-338.
- Machado-Allison A, Rodríguez-Acosta A (1997) Animales venenosos y ponzoñosos de Venezuela. 1a Ed. Caracas: Ediciones del CDCH Universidad Central de Venezuela.
- MAGAP-INP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca – Instituto Nacional de Pesca). 2014. Memorando Nro. MAGAP-INP-2014-1867-M. Actualización de lista de especies marinas aptas para la maricultura. [http://www.acuacultura.gob.ec/pdf/listado_especies.pdf] Revisado: 2/10/2014.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* 109: 161–168. doi:10.1023/A:1017546601065
- Marjani M., S. Jamili, P.G. Mostafavi, M. Ramin & A. Mashinchian. 2009. Influence of 17-alpha methyl testosterone on masculinization and growth in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J. Fish. Aquat. Sci.*, 4 (1): 71-74.
- Mateen A. & I. Ahmed. 2007. Effect of androgen on sex reversal and growth of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pak. J. Agri. Sci.*, 44 (2): 272-276.
- Matthey R. 1945. L'évolution de la formule chromosomiale chez les vertébrés. *Experientia*. 1:50-56.
- Matthey R. 1965. Cytogenetic Mechanisms and Speciations of Mammals. In: The Chromosome: Structural and Functional Aspects [Annual Symposium, 1965], In Vitro, Vol. 1pp. 1-11
- McCosker J.E. & R.H. Rosenblatt. 2010. The fishes of the Galapagos Archipelago: An update. *Proc. Calif. Acad. Sci.*, Series 4, Vol 61, Supplement II (11): 167-195
- Mcphail JD, Jones RI. 1966. A Simple Technique for obtaining Chromosomes from Teleost Fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 23(5):767-768.
- Mcveigh S. 2003. Super tilapia now produced in South Africa. *FishFarm.* (USA), 26: 31.
- Menezes N A. 1983. Guia pratico para conhecimento e identificacao das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral Brasileiro. *Rev. Bras. Zool.* 2(1): 1-12.
- Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Silva DS, De Souza ACP, Carvalho JR & Nagamachi CY (2008) Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae) . *BMC Genetics* 9:75. doi:10.1186/1471-2156-9-75
- Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Silva DS, De Souza ACP, Carvalho JR JR, Nagamachi CY. 2008. Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics* 9:75 doi:10.1186/1471-2156-9-75
- Molina WF, Bacurau TOF (2006) Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Perciidae and Gerreidae). *Cytologia*. 71: 237–242. doi:10.1508/cytologia.71.237
- Molina WF. 1995, Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Universidad Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução [Dissertação de mestrado].
- Monteiro MER, Nirchio M, Granado A, Foresti F, Oliveira C. 2008. Cytogenetic analysis of three sea catfish species (Teleostei, Siluriformes, Ariidae) with the first report of Ag-NOR in this fish family. *Genet. and Mol. Biol.* 33(2):262-265.

- Morgan D.L., H.S. Gill, M.G. Maddern & S.J. Beatty. 2004. Distribution and impact of introduced freshwater fishes in Western Australia. N.Z. J. Mar. Freshw. Res., 38: 511–523.
- Murofushi M, Yoda K, Deguchi Y (1987) Karyological study of four species in scorpionfishes. Report of the Mishima Research Institute of Science for Living, Nihon University. 10: 37–42.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, De Souza A CP and Ferguson-Smith MA (2010) Multiple earrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. BMC Genetics 11 (28). doi:10.1186/1471-2156-11-28
- Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Granado A, Ron E. 2007. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). Genet. Mol. Biol. 30(1):25-30.
- Nirchio M, Cequea H, Turner BJ. 2003. Karyotypic characterization and nucleolus organizer regions in *Cyprinodon dearborni* (Meek, 1909) (Pisces: Cyprinodontidae) from Venezuela. Interciencia, 28(6):1-4
- Nirchio M, Cervigón F, Revelo Porto JI, Perez J E, Gómez JA, Villalaz J. 2003. Karyotype supporting *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil "gaimardianus"* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as two valid nominal species. Sci. Mar. 67(1):113-115.
- Nirchio M, Cipriano RR, Cestari MM, Fenocchio AS. 2005. Cytogenetical and morphological features reveal significant differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema*. Neotrop. Ichthyol., 3(1):99-102.
- Nirchio M, Gaviria Ji, Oliveira C. 2012. Classical cytogenetic characterization of *Opistognathus macrognathus* (Perciformes: Opistognathidae). Bo. . Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente, 51(2):123-127.
- NIRCHIO M, GONZÁLEZ D, PÉREZ JE. 2001. Estudio citogenético de *Mugil curema* y *M. liza* (Pisces: Mugilidae): Regiones organizadoras del nucleolo. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente 40(1-2): 3-7.
- Nirchio M, Mujica A, Oliveira C, Granado A, Mora J, Hett A E K, Rossi AR, Milana V, Sola L. 2013. *Pseudoplatystoma metaense* and *P. orinocoense* (Siluriformes: Pimelodidae) from the Orinoco basin, Venezuela: cytogenetic and molecular analyses. Ital. J. Zool. (in press)
- Nirchio M, Oliveira C, Ferreira I.A, Perez JE, Gaviria JI, Harrison IJ, Rossi AR, Sola L. 2007. Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubriculus* and *M. curema* (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela. Interciencia 32(11):757-762.
- Nirchio M, Oliveira C. 2006. Citogenética de Peces. Editado por Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 216 pp.
- Nirchio M, Rondon R, Pérez J E, Oliveira C, Ferreira I A, Martins C, Rossi AR, Sola L. 2008. Cytogenetic studies in three species of *Lutjaninae* (Teleostei) from Margarita Island, Venezuela. Neotrop. Ichthyol. 6(1):101-108.
- Nirchio M., Gaviria JI, Oliveira C, Ferreira I A, Martins C. 2007b. Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita Island, Venezuela. Genetica 131(2):135-140. DOI 10.1007/s10709-006-9123-4
- Nirchio M. & J.E. Pérez. 2002. Riesgos del cultivo de Tilapia en Venezuela. Interciencia, 27(1): 39-44.
- Nishikawa S, Honda M, Wakatsuki A (1977) Comparative studies on the chromosomes in Japanese fishes-II. Chromosomes of eight species in scorpion fishes. J Shimoneseki Univ Fish 25: 187–191.
- Ogutu-Ohwayo R. The decline of the native fishes of Lake Victoria and Kyoga (East Africa) and the impact of introduced species, especially the Nile perch *Lates niloticus* and the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Environmental Biology of Fishes 1990; 27: 81–96.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA (1988) Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. Rev Brasil Genet 11:577-624.
- Oliveira C, Nirchio M, Granado A, Levy S. 2003. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *S. laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela, Neotrop. Ichthyol. 1(1):47-52.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). 1992. Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), 32 pp. [<https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>]. Revisado: 29/8/2014.
- Ovychynnyk M.M. 1971. Unrecorded and new species of fishes from fresh waters of Ecuador. Zool. Anz., 187(1/2): 82-122.

- Pang K.C. 2005/2006. Production of marine tilapia hybrid for culture in a coastal fish farm. Singapore J. Pri . Ind.. 32:93-105.
- Pazian MF, Garcia Pereira LH, Shimabukuru-Dias CK, Oliveira C, Foresti F (2012) Cytogenetic and molecular markers reveal the complexity of the genus Piabina Reinhardt, 1867 (Characiformes: Characidae). *Neotrop Ichthyol* 10(2): 329-340
- PCEIG (Proyecto de Control de Especies Invasoras del Archipiélago de Galápagos). 2011. Resultado 3/Restauración Ecológica de la Laguna de El Junco. El Junco libre de la especie invasora tilapia (Oreochromis niloticus) [http://www.manejoespeciesinvasoras.info/wiki/index.php/Resultado_3/Restauraci%C3%B3n_Ecol%C3%B3gica_de_la_Laguna_de_El_Junco] Revisado: 6/9/2014.
- Penman D.J., B.J. McAndrew. 2000. Genetics for the management and improvement of cultured tilapia. In: Beveridge, M.C.M. & B.J. McAndrew, B.J. (eds) *Tilapias: Biology and Exploitation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 227–266.
- Pérez J.E., C. Alfonsi, M. Nirchio, C. Muñoz & J.A. Gómez. 2003. The Introduction of exotic species in aquaculture: a solution or part of the problem. *Interciencia*, 28: 234-238.
- Pérez J.E., C. Muñoz, L. Huaquin & M. Nirchio. 2004. Riesgos de la introducción de tilapias (Oreochromis sp) (Perciformes: Cichlidae) en ecosistemas acuáticos de Chile, *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 77: 195-199.
- Pérez J.E., M. Nirchio & J.A. Gómez. 2000. Aquaculture: part of the problem, not a solution. *Nature*, 408: 514.
- Pérez JE, Alfonsi C, Salazar S, Nirchio M. Mejoramiento genético en acuicultura. Sistema de Bibliotecas Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela 2012; 220 pp.
- Pimentel D. 2002. Introduction: Non-native species in the world. In: Pimentel D. (ed.), *Biological invasions: Economic and environmental costs of alien plant, animal and microbe Species*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- Pimentel D., L. Lach, R. Zuniga & D. Morrison. 2000. Environmental and economic cost of nonindigenous species in the United States. *BioSciences*; 50: 53–65.
- Pimentel D., R. Zúñiga & D. Morrison. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econ.*, 52: 273-288.
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *PNAS* 83: 2934-2938.
- Poss G (1995) Scorpaenidae. In: Fischer W, Krupp F, Schneider, W, Sommer C, Carpenter K, Niem V (1995) Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen III. Vertebrados-Parte 2. Roma.
- Poss S, Eschmeyer W (2002) Scorpaenidae. In K.E. Carpenter (ed.). *The living marine resources of the Western Central Atlantic*. Vol. 2: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae). FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologist and Herpetologist Special Publication No.5. FAO. Rome.
- Putra N.S.S.U., I. Lapong, Ma. Rimmer, S. Raharjo & N.K. Dhand. 2013. Comparative Performance of Four Strains of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brackish Water Ponds in Indonesia. *J. Appl. Aquacult.*, 25:293–307, DOI: 10.1080/10454438.2013.834282
- Randall J.E. 1987. Introductions of marine fishes to the Hawaiian Islands. *Bull. Mar. Sci.*, 41(2): 490– 502.
- Registro Oficial. 2008. Constitución de la República del Ecuador. Año II, Quito, Lunes 20 de Octubre del 2008 - N° 449, 80 pp
- Richards W, Miller G (2002) Triglidae. In K.E. Carpenter (ed.). *The living marine resources of the Western Central Atlantic*. Vol. 2: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae). FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologist and Herpetologist Special Publication No.5. FAO. Rome.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evolut* 16 (7) :351-358
- Roberts D.E. 1997. Non-indigenous fishes and invertebrates of concern to Florida's Gulf Coast. Paper presented at "Introduction of Nonindigenous Species Workshop" June 11-12, 1997; Gulf of Mexico Program, Metairie, Louisiana, USA.
- Rodríguez J.P. 2014. Inversión pública en el resguardo de la biodiversidad. *Interciencia*, 39(8): 1.
- Rojas A. & S. Wadsworth. 2008. Estudio de la acuicultura en jaulas: América Latina y el Caribe. In: Halwart M., D. Soto & J.R. Arthur (eds). *Acuicultura en jaulas – Estudios regionales y panorama mundial*. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 498. Roma, FAO, pp. 73–104

- Román B (1980) Peces Marinos de Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle.
- Ruber M, Da Rosa R, Jerep FC, Bertollo LAC, Giuliano-Caetano L. 2011. Cytogenetic characterization of four species of the genus Hypostomus Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comp. Cytogen.* 5(5):397–410.
- Rutten M.J.M., H. Komen & H. Bovenhuis. 2005. Longitudinal genetic analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) body weight using a random regression model. *Aquaculture*, 246: 101-113.
- Sauceda R., P. Rendón, E. Figueroa, A. Renón & C. López. 2009. Modelo tecnológico para el cultivo de tilapia (*Oreochromis* sp.) en jaulas. Comité Sistema Producto de Tilapia Mexico, A. C. 133 pp
- Sczepanski TS, Noleto RB, Cestari MM, Artoni RF. 2010. A comparative study of two marine catfish (Siluriformes, Ariidae): Cytogenetic tools for determining cytotaxonomy and karyotype evolution. *Micron* 41: 193–197.
- Smith-Vaniz WF (2002) Dactylopteridae. In K.E. Carpenter (ed.). The living marine resources of the Western Central Atlantic. Vol. 2: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae). FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologist and Herpetologist Special Publication No.5. FAO. Rome.
- Sofradzija A (1984) First data on the chromosomes of the three Adriatic fish species (*Scorpaena porcus*, *S. ustulata* and *Corvina nigra*). *Ichthyologia* 16: 57–61.
- Stickney R.R. 1993. Tilapia. In: Stickney R.R. (ed) Culture of non-salmonid freshwater fishes. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 81-115.
- Suárez S.L.C. & S.R.D. Suárez. 2003. Impacto socioeconómico de la mancha blanca en el sector camaroneiro del ecuador, con análisis en la provincia de Manabí, período 1999-2003. Tesis de Grado. Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí. Manta, Ecuador.
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75:304–306.
- Sumner AT. 1990. Chromosome Banding. Unwin Hyman Ltd., London, UK. 434 pp
- Sumner AT. 2003. Chromosomes Organization and Function. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, United Kingdom, 287 pp.
- Suresh A.V. & C.K. Lin. 1992. Tilapia culture in saline waters: a review. *Aquaculture*, 106(3&4): 201-226.
- Takai A, Ojima Y (1986) Some features on nucleolus organizer regions in fish chromosomes. In: Uyeno, T., Arai, R., Taniuchi, T. and Matsuura, K. eds. Indo-Pacific fish biology. Ichthyol Soc Japan Tokyo.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Tave D. 1995. Production of all male *Tilapia aurea* by sex-reversed broodstock. *Aquacu. Magaz.* (USA), 21: 78-80.
- Tenório RCCO, Vitorino C A, Souza IL, Oliveira C, Venere P C. 2013. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. *Neotrop. Ichthyol.* 11(3):553-564.
- Tessema, M., A. Müller-Belecke & G. Hörstgen-Schwark. 2006. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture*, 258: 270–277.
- Thode G, Alvarez M, García E, Giles V (1985) Variations in C-banding patterns and DNA values in two scorpion-fishes (*Scorpaena porcus* y *S. notata*, Teleostei). *Genetica* 68: 69–74.
- Torres C.G. 2012. Estrategias preventivas a especies invasoras acuáticas en el interior del golfo de Guayaquil en el 2011. Administración Ambiental. Universidad de Guayaquil, 229 pp. [<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/982>]. Revisado: 4/9/2014.
- Tran, L.D., T.V. Dinh, T.P. Ngo & R. Fotedar. 2011. Tilapia. In: Fotedar R.K & B.F. Phillips (eds.). Recent Advances and New Species in Aquaculture. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 318-333.
- Tucker J. & D. Jory. 1991. Marine fish culture in the Caribbean region. *World Aquacult.*, 22 (1): 10-27.
- Úbeda-Manzanaro M, Merlo M A, Palazón J L, Sarasquete C, Rebordinos L. 2010. Sequence characterization and phylogenetic analysis of the 5S ribosomal DNA in species of the family Batrachoididae. *Genome* 53:723–730, doi:10.1139/G10-048.
- Valente G T, De Andrade Vitorino C, Cabral De Mello D C, Oliveira C, Lima Souza I, Martins C, Venere P C 2012. Comparative cytogenetics of ten species of cichlid fishes (Teleostei,

- Cichlidae) from the Araguaia Riversystem, Brazil, by conventional cytogenetic methods. Comp. Cytogen. 6(2):163–181.
- Van der Knaap, M. 2013. May we eat biodiversity? How to solve the impasse of conservation and exploitation of biodiversity and fishery resources. Aquat. Ecosyst. Health., 16(2): 164-171
- Von-Hessberg H., C.M. Grajales-Quintero, A. Restrepo-Murillo & A. Martín. 2012. Monografía de protocolos para obtener poblaciones monosexo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*; TREW. 1983). Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas [online]., 16(1): 156-172.
- Ward R, Zemlak B, Innes P, Last P, Hebert P (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philos Trans R Soc London [Biol] 360: 1847-1857.
- Ward RD (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. Mol Ecol Res 9: 1077-1085.
- Watanabe W.O. 1991. Saltwater culture of tilapia in the Caribbean. World Aquacult., 22(1): 49-55.
- Watanabe W.O., T.M. Losordo, K. Fitzsimmons & F. Hanley. 2002. Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. Rev. Fish. Sci., 10(3&4): 465–498
- Yao K., M. Ouattara & A.F.A. AhoussiA. 2008. Survie du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) en eaux salées durant un transfert direct et progressif. Livest. Res. Rural Dev., 20(72). [<http://www.Irrd.org/Irrd20/5/yao20072.htm>]. Revisado: 30 septiembre 2014.
- Yokoyama , Ebitani N, Kubo T (1992) Karyotypes and banding patterns in eight species of the scorpionfish (Scorpaenidae). Zool Sci 9:1210.
- Zambrano L., E. Martínez-Meyer, M. Menezes & A.T. Peterson. 2006. Invasive potential of common carp (*Cyprinus carpio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American freshwater systems. Can. J. Fish.Aquat. Sci., 63: 1903–1910.

FIRMA DEL INVESTIGADOR/DOCENTE	(rúbrica)
FIRMA CONTRAPARTE INSTTITUCIONAL 1	(rúbrica)
FIRMA CONTRAPARTE INSTITUCIONAL 2	(rúbrica)

ANEXOS

Carta de Aceptación de artículo CITOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA TAXONÓMICA EN PECES.



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
RECTORADO

VICERRECTORADO ACADÉMICO
CONSEJO DE INVESTIGACIÓN
REVISTA MULTIDISCIPLINARIA
SABER

R.S Nº 279

Cumaná, 16 de octubre de 2014

Ciudadano Profesor
Dr. Mauro Nirchio
Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar
Núcleo de Nueva Esparta
Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Técnica de Machala
Machala, Provincia El Oro, Ecuador

Estimado Profesor Nirchio, reciba un cordial saludo.

El Comité Editorial se complace en comunicarle que el trabajo, bajo la modalidad de ARTICULO DE REVISIÓN POR INVITACIÓN, titulado **CITOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA TAXONÓMICA EN PECES** (código OJS/UDO: 1279-4378-1-SM) presentado Mauro Nirchio y Claudio Oliveira, se encuentra planificado para su publicación en SABER, Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, correspondiente al Volumen 26(4); octubre-diciembre, 2014.

La revista SABER se encuentra incluida e indexada en el Índice y Biblioteca Electrónica de Revistas Venezolanas de Ciencia y Tecnología (REVENCYT), Scielo (*Scientific Electronic Library Online, Scielo Citation Index*), Registro de Publicaciones Científicas y Tecnológicas Venezolanas del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), en los Resúmenes sobre Ciencias Acuáticas y de la Pesca de la FAO (ASFA), en el Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (LATINDEX) y en Zoological Record (*Thomson Reuters Web of Science*). Miembro de la Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas (ASEREME) y Miembro de la Asociación Venezolana de Editores de Revistas Científicas (ASOVERCI).

Sin otro particular al que hacer referencia, se suscribe, atentamente

Trátese sólo un asunto en cada Oficio

LDS/lds

José Leonardo De Souza
Editor Jefe

DEL PUEBLO VENIMOS / HACIA EL PUEBLO VAMOS

ÚLTIMA TRANSVERSAL AV. GRAN MARISCAL DIAGONAL AL EDIF. RECTORADO QTA. PÁGINA
CONSEJO DE INVESTIGACIÓN, REVISTA SABER, CUMANÁ, ESTADO SUCRE - VENEZUELA
Apartado Postal (094). TELF (0293) 4008271 – FAX. (58-293) 4008319
E-mail: saber@udo.edu.ve revistasabер@yahoo.es saberciudo@gmail.com
<http://saber.udo.edu.ve/> <http://revistas.ojs.es/index.php/saber>

Constancia de indización de la Revista Saber en SCielo

Saber - Home Page http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_serial&pid=1315-0162...

Scielo

números — búsqueda de artículos —
todos anterior actual próximo autor materia búsqueda alfab

Actualizado en
Julio 14, 2014
portugués
english

SABER
REVISTA MULTIDISCIPLINARIA DEL CONSEJO DE INVESTIGACIÓN

Búsqueda
Introduzca una o más palabras Todos los índices En la Revista Búsqueda

Publicación de
Universidad de Oriente
versión impresa ISSN 1315-0162

Misión
Fomenta, estimula y coordina las actividades de investigación científica, tecnológica y humanística en sus cinco núcleos.

© 2014 Universidad de Oriente
Última Transversal Av. Gran Mariscal diagonal al Edif. Rectorado, Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela.
eMail
cinvesti@udo.edu.ve

Constancia de indización de la Revista Saber en Latindex

Revistas en Latindex <http://www.latindex.unam.mx/buscadorsicRev.html?opcion=1&folio=1096>

Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

latindex¹⁵

¿Qué es Latindex? Organización Socios Editores Biblioteca del editor Documentos Números Noticias

Nombre de la revista Buscar Ayuda Facebook Web Mapa del sitio Contacto

Descripción/Description/Descrição

Revista multidisciplinaria, arbitrada, editada semestralmente por el Consejo de Investigaciones de la Universidad de Oriente (Venezuela) su propósito es publicar trabajos originales en todas las áreas del conocimiento científico (artículos, ensayos, notas, trabajos de investigación) elaborados por el personal docente y de investigación de la Universidad de Oriente y de otras instituciones del país.

En catálogo.

Folio	10963	Características cumplidas/Cumpridas/Standards met: 29
Acopio	Venezuela	Características no cumplidas/Não cumpridas/Standards not met: 4
Fecha de Alta	2001-07-20	
Fecha de Modificación	2008-01-25	
Tipo de Registro	Modificado	
Título	Saber	
País	Venezuela	
Situación	Vigente	
Año Inicio	1987	
Año Terminación	9999	
Frecuencia	Semestral	
Tipo de Publicación	Publicación periódica	
Soporte	Impreso en papel	
Idioma(s)	Español	
	ISSN 1315-0162	
	Biología	
	Matemáticas	
Temas	Oceanografía	
	Clencias Sociales	
	Multidisciplinarias	
Organismo Responsable	Universidad de Oriente, Consejo de Investigación	
Lugar	Cumaná	
Editorial	Universidad de Oriente	
Responsables	Gerónimo Ojeda	
Calle	El Parque, Qta Página	
Sector/Barrio/Colonia	Calígüire Abajo	
Ciudad	Cumaná	
Estado/Provincia/Departamento	Edo. Sucre	
País Editor	Venezuela	
Código Postal	6101	
Email	saber@udo.edu.ve; revistasaber@yahoo.com	

1 de 2 11/09/2014 09:10 p.m.

CITOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA TAXONÓMICA EN PESES.

Mauro Nirchio¹ y Claudio Oliveira²

¹ Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela.
Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

² Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumen:

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

Palabras clave: cromosomas, cariotipo, taxonomía, peces

Área: Ciencias Básicas y Tecnología

Introducción:

Los peces constituyen un grupo parafilético que representa más de la mitad de las 55.000 especies de vertebrados vivientes (Helfman et al. 2009). Mientras la descripción de nuevas especies pertenecientes al grupo de los anfibios, reptiles, aves y mamíferos no es muy frecuente, hasta ahora han sido reconocidas 33.065 especies de peces (Eschmeyer y Fong 2014) y el registro anual indica que existe una tendencia a que los descubrimientos de nuevas especies se incrementen (Fig. 1), lo cual refleja la importancia esencial de distinguir unidades taxonómicas para el entendimiento fundamental de la biodiversidad de los peces y su conservación mediante la delimitación, descripción y asignación de nombres a las especies con base en normas establecidas (Taxonomía) y la evaluación de las relaciones de parentesco entre ellas o entre taxones superiores como Familias y Órdenes (Sistemática) mediante el estudio de caracteres específicos (variaciones de estructuras homólogas).

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

Una herramienta que ha demostrado ser de gran utilidad para generar información importante para la distinción de especies en los peces es la Citogenética. En sus principios, los estudios citogenéticos en peces resultaron tediosos y poco informativos debido a la obtención de metafases de poca calidad para el análisis a causa del pequeño tamaño y mayor número de sus cromosomas en comparación con los de los mamíferos. Sin embargo, a partir de la publicación de McPhail y Jones (1966), con una metodología para la obtención de preparaciones cromosómicas mediante el uso de células en suspensión, se logró un gran avance. A partir de ahí, la incorporación de modificaciones como el tratamiento con colchicina y optimización en el tiempo de tratamiento hipotónico de las células y con la aplicación de procedimientos para la estimulación de la mitosis, resultó en la obtención de un mayor número de células mitóticas disponibles para la preparación de los cromosomas metafásicos de buena calidad en especies marinas y de agua dulce, allanando el camino para la consolidación del protocolo que se emplea actualmente con gran éxito en la mayoría de los laboratorios (Foresti 2008).

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

Cariotipo, Número diploide (2n) y Número Fundamental (FN).

El cariotipo es el patrón cromosómico de una especie expresado a través de la descripción del número, tamaño y forma de cada tipo de cromosoma del set completo de cromosomas agrupados en pares homólogos y ordenados según su tamaño y forma, desde el más grande al más pequeño (Fig. 2). El número de cromosomas generalmente se determina en la mitosis y es denominado número diploide (2n), excepto en organismos poliploides en cuyo caso es citado el número base o número de cromosomas del genoma de la serie original haploide. El número de cromosomas es generalmente constante en una especie, así como también la forma, tamaño, posición del centrómero, número y localización de genes ribosomales (NORs, 18S rDNA, 5S rDNA) y cantidad y distribución de la heterocromatina constitutiva, permitiendo que estas características puedan ser empleadas como una poderosa herramienta para diferenciar especies cuando los cromosomas son lo suficientemente grandes para su observación microscópica.

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

Por ejemplo, si en dos especies relacionadas y con el mismo número cromosómico se encuentra una disminución del NF en un cariotipo en comparación con el otro, es posible

suponer que a partir del cariotipo original pudieron ocurrir inversiones pericentroméricas de un cromosoma meta o submetacéntrico dando origen a un cromosoma acrocéntrico y, por lo tanto, la visualización del brazo corto visible de ese cromosoma original deja de contabilizarse, en tanto que las fusiones céntricas no tienen efecto en los números fundamentales, pero sí en la reducción de los números cromosómicos entre las especies comparadas.

Regiones organizadoras de nucléolos (NORs) y DNA ribosomal:

El nucléolo corresponde a una región específica dentro del núcleo interfásico de la célula eucariótica, y puede ser observado con el microscopio de luz como una o más estructuras esféricas de tamaño variable, pero en general grande, en aquellas células con alta tasa de síntesis proteínica. A medida que transcurre la división celular, disminuye la tasa metabólica celular y el nucléolo va desapareciendo, reapareciendo en el núcleo telofásico. El nucléolo está constituido por DNA ribosomal (rDNA), RNA ribosómico (rRNA) y proteínas y es responsable de la formación de los ribosomas que son las estructuras ligadas a la síntesis proteínica en el citoplasma celular. En realidad, el nucléolo corresponde a las regiones donde se localizan las secuencias de rDNA responsables de la transcripción que, aun estando localizadas en cromosomas distintos, se asocian íntimamente y se denominan Regiones Organizadoras del Nucléolo (NORs). En los peces, las NORs generalmente están ubicadas en constricciones secundarias de los cromosomas, pueden observarse en un solo par cromosómico (Nirchio et al. 2001, Nirchio et al. 2003a, Nirchio et al. 2003b, Alves et al. 2012), o distribuidas en varios cromosomas del complemento (Nirchio et al. 2007, Nirchio et al. 2008, Monteiro et al. 2008, Alves et al. 2012) y su número, posición y localización cromosómica es especie-específica para varios grupos de peces (Galetti et al. 1998, Kavalco et al. 2005, Nirchio et al. 2005, Diniz et al. 2009).

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

Las NORs pueden ser visualizadas de forma indirecta, por el método de paso único de Howell y Black (1980), técnica que se basa en la afinidad que presenta el Nitrato de Plata por las proteínas ácidas como la nucleolina asociada a la estructura fibrilar del nucléolo y el pre-ARN naciente. Estas proteínas persisten en la región de la constricción secundaria durante todo el ciclo celular, permitiendo colorear los nucléolos en interfase y dichas regiones en cromosomas metafásicos (Fig. 4). Sin embargo, debe tenerse precaución al interpretar los resultados obtenidos mediante la técnica de impregnación con Nitrato de Plata debido a que otras estructuras, además de las NORs, pueden ser coloreadas con las sales de plata, tales como algunas heterocromatinas, histonas, núcleos cromosómicos, complejos sinaptonémicos y principalmente cinetocoros (Sumner 1990; Dobigny et al. 2002).

Heterocromatina Constitutiva:

El término bandas-C se emplea para designar las regiones de heterocromatina constitutiva que predominantemente contienen secuencias de DNA altamente repetidas e inactivas durante la

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

Hibridación in situ fluorescente:

Es una técnica más específica (FISH, en inglés, fluorescent in situ hybridization) que permite, con sondas específicas de ADN, la detección de un gen o grupo de genes o aun de secuencias particulares, en diferentes estados de la cromatina en el núcleo interfásicos, en cromosomas mitóticos y/o meióticos. Primero, la muestra de ADN (cromosomas metafásicos o núcleos en interfase) debe ser desnaturizada mediante altas temperaturas para separar las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del ADN y añadir entonces la sonda de interés (también desnaturizada), que ha sido marcada con fluorescencia, que se hibridará al ADN de la muestra en el sitio en el que se encuentran los genes que se desean localizar en el cromosoma, en un proceso denominado templado, en el que se vuelve a formar la doble hélice (Nirchio y Oliveira 2006). Las sondas son fragmentos de DNA de aproximadamente 100-500 pb, lo que permite su penetración hasta los sitios en los que se encuentran los genes en los cromosomas. Estas sondas poseen algún nucleótido modificado acoplado a una molécula marcadora que permitirá su localización mediante un microscopio de fluorescencia (Fig. 6).

Ejemplos de la aplicación la citogenética en problemas taxonómicos en peces:

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

Mugilidae: Debido a que los caracteres morfológicos externos son muy conservativos entre las especies de este grupo, la familia ha sido objeto de numerosas revisiones sistemáticas tanto a nivel de género como de especie y, en algunos casos, las sutiles diferencias interespecíficas de los caracteres merísticos y morfométricos han contribuido con el aumento de numerosos problemas taxonómicos y de nomenclatura en el grupo. Por ejemplo, *Mugil curema* y *M. gaimardianus*, habían sido consideradas como dos especies diferentes estrechamente emparentadas, diferenciables solo por el color del iris del ojo en especímenes vivos, la longitud de la aleta pectoral y el número de series oblicuas de escamas a lo largo de la línea lateral. Sin embargo, el color del iris se pierde en especímenes preservados y las aletas muchas veces se deterioran durante la captura por lo que se recurre principalmente al número de series oblicuas de escamas como criterio para diferenciar especies. No obstante, la amplitud del intervalo del número de escamas característico para estas dos "especies", lo convierte en una variable de poca fortaleza como único carácter diagnóstico, debido a que los valores se solapan en ambas entidades taxonómicas, de tal manera que Menezes (1983) indica que *M. curema* posee de 36 a 40 series laterales de escamas y *M. gaimardianus* de 35 a 38, mientras que Cervigón (1993) señala entre 37 y 40 para *M. curema* y entre 35 y 39 para *M. gaimardianus*. Por otro lado, la descripción original de *Mugil gaimardianus* creó diversos problemas taxonómicos en el pasado debido a la descripción ambigua de la especie y la aparente pérdida del espécimen tipo. Por esa razón, el International Committee on Zoological Nomenclature invalidó el nombre *Mugil gaimardianus* (ICZN, 1994) y procedió a declararlo nomina dubia y consecuentemente como

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

Gymnotidae: En un estudio en el que fueron examinados los cariotipos de 5 poblaciones morfológicamente indistinguibles del pez cuchillo eléctrico de la Amazonia oriental de Brasil, identificados inequívocamente como *Gymnotus carapo* sensu stricto sobre la base de la pigmentación, caracteres merísticos y morfología externa, se encontró que los especímenes de una de las cinco localidades exhibieron un cariotipo $2n = 40$ (34M/SM + 6ST/A) no documentado previamente para especies del género *Gymnotus* en la cuenca del Amazonas, mientras que especímenes procedentes de las otras cuatro localidades exhibieron un cariotipo $2n = 42$ (30M/SM + 12ST/A), que ya había sido descrito (Milhomem et al. 2008). La diferencia entre los dos cariotipos en el número diploide y morfología de los cromosomas fue explicada como consecuencia de eventos de fusión-fisión y también por inversiones pericéntricas. La presencia de secuencias teloméricas intersticiales detectadas mediante el ensayo FISH en un par de cromosomas metacéntricos en la población con cariotipo $2n = 40$ sugirió que esa población se ha diferenciado como una especie diferente respecto a las que poseen cariotipo $2n = 42$.

Haemulidae: El género *Haemulon* perteneciente a los Haemulinae se encuentra representado en Venezuela por 14 especies reconocidas (Cervigón 1993), de las cuales, hasta ahora han sido cariotipadas solo siete, encontrándose, en todos los casos, un complemento $2n=48A$, muy difícil de diferenciar entre especies cuando solo se considera el cariotipo convencional teñido con Giemsa (Fig 8).

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

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

Parodontidae: Así como en los casos anteriores las características cromosómicas permitieron establecer claramente diferencias a nivel específico, estudios citogenéticos en *Parodon nasus* y *P. tortuosus* (Parodontidae: Characiformes) mostraron que el número diploide observado en

ambas especies fue $2n = 54$ (48M/SM y 6ST) sin diferencias entre los sexos y que, a pesar de ligeras diferencias en el patrón de distribución de la heterocromatina, la ubicación de las regiones organizadoras nucleolares (NORs) y de los genes rRNA 5S fueron similares (Bellafronte et al. 2005), apoyando la opinión que sostiene que *P. tortuosus* es una sinonimia de *P. nasus*.

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

Pimelodidae: En el caso de las especies del género *Pseudoplatystoma* (Pimelodidae), distribuido en las principales cuencas fluviales de América del sur, la taxonomía tradicional había reconocido solo tres especies pero análisis morfológicos elevaron su número a ocho, incluyendo dos nuevas especies (Buitrago-Suárez y Burr 2007), *P. orinocoense* y *P. metaense*, distribuidas exclusivamente en la cuenca del Orinoco. Estas especies presentan cariotipos muy conservados ($2n=56$) y similares características citogenéticas en términos de distribución de heterocromatina constitutiva y número y localización de genes ribosomales mayores y menores. Sin embargo, el análisis de secuencias de los genes mitocondriales Citocromo b (1110 bp) y un fragmento del gen COI (432 bp) confirmaron la asignación de *P. metaense* y *P. orinocoense* a dos clados moleculares distintos de *Pseudoplatystoma* identificados en la cuenca del Orinoco. Las genealogías obtenidas con estos dos marcadores mitocondriales confirman que los clados moleculares identificados proporcionan apoyo para el reconocimiento de solo algunos de las ocho morfoespecies descritas para el género *Pseudoplatystoma* poniendo sobre el tapete la necesidad de re-evaluar mediante análisis morfológicos y moleculares la monofilia de algunos linajes (Nirchio et al. 2013).

CONCLUSIÓN:

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

Agradecimientos:

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

REFERENCIAS:

- ALVES AL, DE BORBA RS, OLIVEIRA C, NIRCHIO M, GRANADO A, FORESTI F. 2012. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus Hypostomus Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comp. Cytogen.* 6(4):443–452.
- ANDREATTA AA, ALMEIDA-TOLEDO LF, OLIVEIRA C, TOLEDO-FILHO SA. 1992. Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). I. XX/XY sex chromosome heteromorphism in *Pseudotocinclus tietensis*. *Cytologia* 57:369-372
- ARAI R. 2011. Fish Karyotypes: A Check List. Springer, 348 pp.
- BELLAFRONTE E, MARGARIDO VP, MOREIRA-FILHO O. 2005. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genet. Mol. Biol.* [online] 28(4):710-716.
- BUITRAGO-SUÁREZ UA, BURR BM. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatysoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa* 1512:1–38.
- CAPUTO V, MARCHEGFTANI F, OLMO E. 1996. Karyotype differentiation between two species of carangid fishes, genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae). *Mar. Biol.* 127:193-199.
- CERVIGÓN F. 1993. Los peces marinos de Venezuela. 2^a ed. Fundación Científica Los Roques. Caracas, Venezuela, 499 pp.
- COMINGS DE. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structures. *Ann. Rev. Genet.* 12:25-46.
- DINIZ D, LAUDICINA A, BERTOLLO LAC. 2009. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 32(1):37-41.
- DOBIGNY G, OZOUF-COSTAZ C, BONILLO C, VOLOBOUEV V. 2002. “Ag-NORs” are not always true NORs: New evidence in mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 98:75-77 doi: 10.1159/000068541.
- ESCHMEYER WN, FONG JD. 2014. Species by Family/Subfamily. [(<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>)]. Online Version, Updated 5 Feb 2014.
- FERREIRA DC, CHIACHIO MC, TAKAKO AK, ANDREATTA AA., FORESTI F, OLIVEIRA C. 2005. Comparative cytogenetics of nine species of Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae): the importance of structural rearrangements in chromosome evolution. *Caryologia* 58(4):387-395.
- FORESTI F. 2008. A brief history of fish genetics in Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 31(1) (suppl):385-388.
- GALETTI JR. P M. 1998. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies, Ital. J. Zool. 65:53-56, DOI: 10.1080/11250009809386795.
- GALETTI PM, FORESTI F. 1986. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Role of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* 43:43-46.
- GRIFFITHS AJF, WESSLER S R, CARROLL S B, DOEBLEY J. 2012. Introduction to Genetic Analysis. H. W. Freeman and Company. Tenth edition. 832 pp.

HARRISON IJ, NIRCHIO M, OLIVEIRA C, RON E, GAVIRIA J. 2007. A new species of mullet (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. *J. Fish Biol.* 71(a):76–97.

HELFMAN GS, COLLETTE BB, FACEY DE, BOWEN BW. 2009. The diversity of fishes. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, UK. 720 pp.

HOWELL W M, BLACK DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 3:1014-1015.

INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE (ICZN). 1994. Opinion 1787. *Mugil curema* and *M. liza* Valenciennes in Cuvier . Valenciennes, 1836 (Osteichthyes, Perciformes): specific names conserved. *Bull. Zool. Nom.* 51(3):286-287.

KAVALCO, KF, PAZZA R, BERTOLLO LAC, MOREIRA-FILHO O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94:180–186

MATTHEY R. 1945. L'évolution de la formule chromosomiale chez les vertébrés. *Experientia*. 1:50-56.

MATTHEY R. 1965. Cytogenetic Mechanisms and Speciations of Mammals. In: The Chromosome: Structural and Functional Aspects [Annual Symposium, 1965], In Vitro, Vol. 1pp. 1-11

MCPHAIL JD, JONES RL. 1966. A Simple Technique for obtaining Chromosomes from Teleost Fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 23(5):767-768.

MENEZES NA. 1983. Guia pratico para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral Brasileiro. *Rev. Bras. Zool.* 2(1): 1-12.

MILHOMEM SSR, PIECZARKA JC, CRAMPTON WGR, SILVA DS, DE SOUZA ACP, CARVALHO JR JR, NAGAMACHI CY. 2008. Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics* 9:75 doi:10.1186/1471-2156-9-75

MOLINA WF. 1995, Cromossomos sexuais e polimorfismo cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Universidad Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução [Dissertação de mestrado].

MONTEIRO MER, NIRCHIO M, GRANADO A, FORESTI F, OLIVEIRA C. 2008. Cytogenetic analysis of three sea catfish species (Teleostei, Siluriformes, Ariidae) with the first report of Ag-NOR in this fish family. *Genet. and Mol. Biol.* 33(2):262-265.

NIRCHIO M, RONDON R, PÉREZ J E, OLIVEIRA C, FERREIRA I A, MARTINS C, ROSSI AR, SOLA L. 2008. Cytogenetic studies in three species of *Lutjaninae* (Teleostei) from Margarita Island, Venezuela. *Neotrop. Ichthyol.* 6(1):101-108.

NIRCHIO M, OLIVEIRA C, FERREIRA IA, GRANADO A, RON E. 2007. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triportheus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 30(1):25-30.

NIRCHIO M, OLIVEIRA C. 2006. Citogenética de Peces. Editado por Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 216 pp.

NIRCHIO M, MUJICA A, OLIVEIRA C, GRANADO A, MORA J, HETT A E K, ROSSI AR, MILANA V, SOLA L. 2013. *Pseudoplatystoma metaense* and *P. orinocoense* (Siluriformes:

Pimelodidae) from the Orinoco basin, Venezuela: cytogenetic and molecular analyses. Ital. J. Zool. (in press)

NIRCHIO M, CEQUEA H, TURNER BJ. 2003. Karyotypic characterization and nucleolus organizer regions in *Cyprinodon dearborni* (Meek, 1909) (Pisces: Cyprinodontidae) from Venezuela. Interciencia, 28(6):1-4

NIRCHIO M, CIPRIANO RR, CESTARI MM, FENOCCHIO AS. 2005. Cytogenetical and morphological features reveal significant differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema*. Neotrop. Ichthyol., 3(1):99-102.

NIRCHIO M, CERVIGÓN F, REVELO PORTO JI, PEREZ JE, GÓMEZ JA, VILLALAZ J. 2003. Karyotype supporting *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil "gaimardianus"* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as two valid nominal species. Sci. Mar. 67(1):113-115.

NIRCHIO M, GONZÁLEZ D, PÉREZ JE. 2001. Estudio citogenético de *Mugil curema* y *M. Liza* (Pisces: Mugilidae): Regiones organizadoras del nucleolo. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente 40(1-2): 3-7.

NIRCHIO M., GAVIRIA JI, OLIVEIRA C, FERREIRA I A, MARTINS C. 2007b. Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita Island, Venezuela. Genetica 131(2):135-140. DOI 10.1007/s10709-006-9123-4

NIRCHIO M, GAVIRIA JI, OLIVEIRA C. 2012. Classical cytogenetic characterization of *Opistognathus macrognathus* (Perciformes: Opistognathidae). Bo. . Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente, 51(2):123-127.

NIRCHIO M, OLIVEIRA C, FERREIRA I.A, PEREZ JE, GAVIRIA JI, HARRISON IJ, ROSSI AR, SOLA L. 2007a. Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubrioculus* and *M. curema* (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela. Interciencia 32(11):757-762.

OLIVEIRA C, NIRCHIO M, GRANADO A, LEVY S. 2003. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *S. laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela, Neotrop. Ichthyol. 1(1):47-52.

RUBER M, DA ROSA R, JEREPE FC, BERTOLLO LAC, GIULIANO-CAETANO L. 2011. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. Comp. Cytogen. 5(5):397-410.

SCZEPANSKI TS, NOLETO RB, CESTARI MM, ARTONI RF. 2010. A comparative study of two marine catfish (Siluriformes, Ariidae): Cytogenetic tools for determining cytotaxonomy and karyotype evolution. Micron 41: 193–197.

SUMNER AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75:304–306.

SUMNER AT. 1990. Chromosome Banding. Unwin Hyman Ltd., London, UK. 434 pp

SUMNER AT. 2003. Chromosomes Organization and Function. Blackwell Publishing Ltd., Oxford,. United Kingdom, 287 pp.

TENÓRIO RCCO, VITORINO C A, SOUZA IL, OLIVEIRA C, VENERE P C. 2013. Comparative cytogenetics in *Astyanax* (Characiformes: Characidae) with focus on the cytotaxonomy of the group. Neotrop. Ichthyol. 11(3):553-564.

ÚBEDA-MANZANARO M, MERLO M A, PALAZÓN J L, SARASQUETE C, REBORDINOS L. 2010. Sequence characterization and phylogenetic analysis of the 5S ribosomal DNA in species of the family Batrachoididae. *Genome* 53:723–730, doi:10.1139/G10-048.

VALENTE G T, DE ANDRADE VITORINO C, CABRAL DE MELLO D C, OLIVEIRA C, LIMA SOUZA I, MARTINS C, VENERE P C 2012. Comparative cytogenetics of ten species of cichlid fishes (Teleostei, Cichlidae) from the Araguaia Riversystem, Brazil, by conventional cytogenetic methods. *Comp. Cytogen.* 6(2):163–181.

Lista de Figuras:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 1

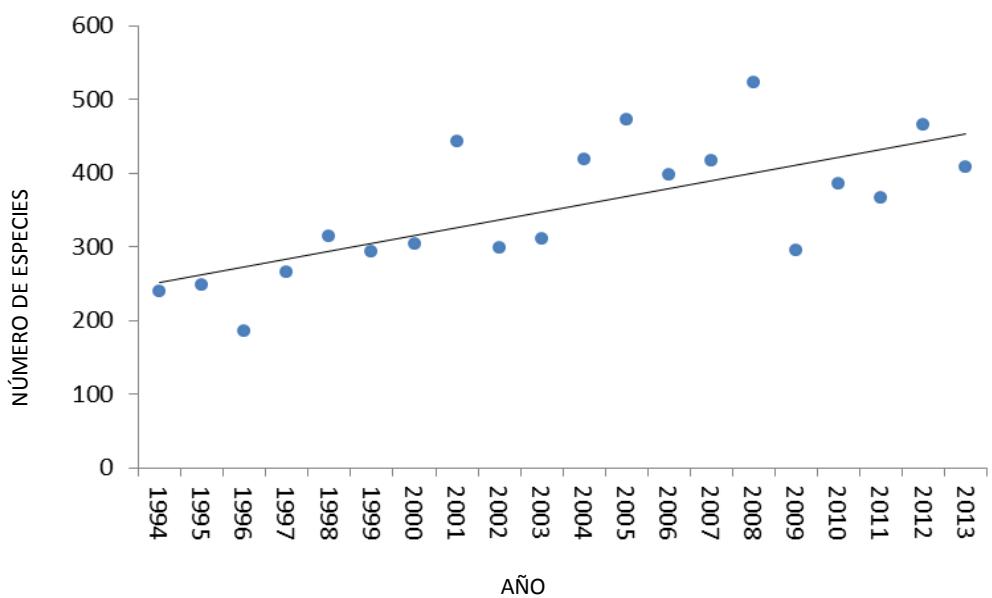


Fig. 2

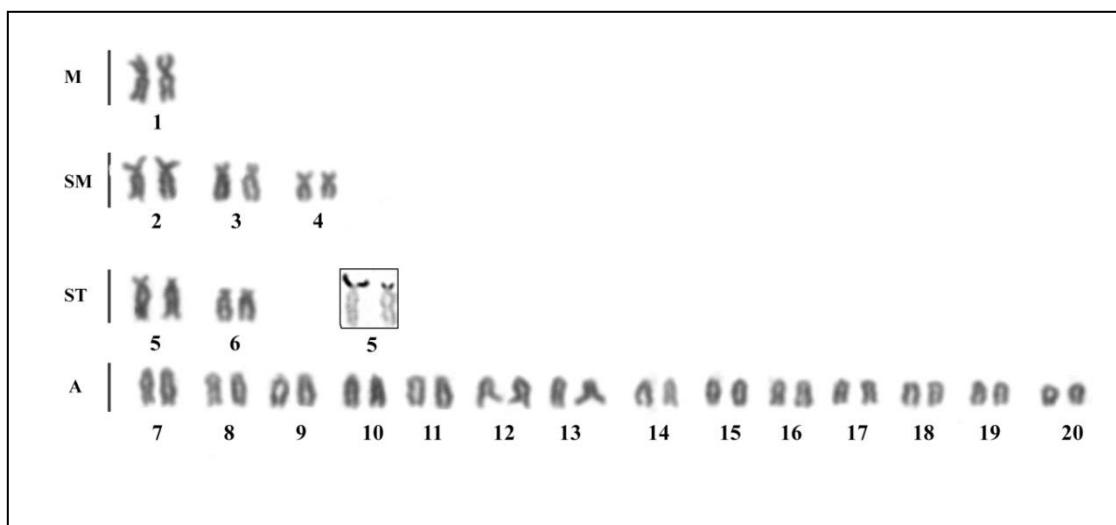


Fig. 3

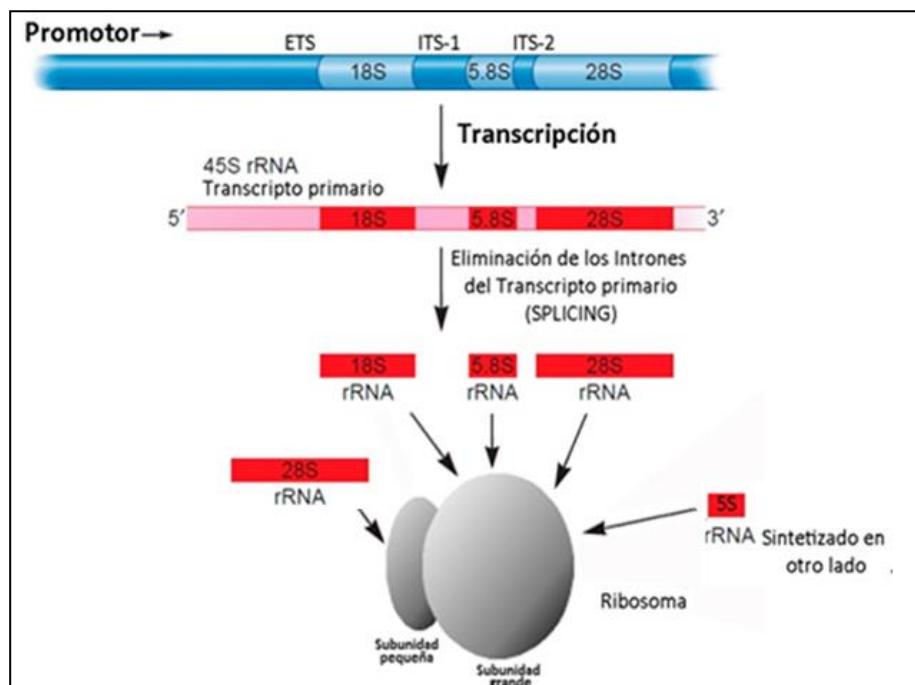
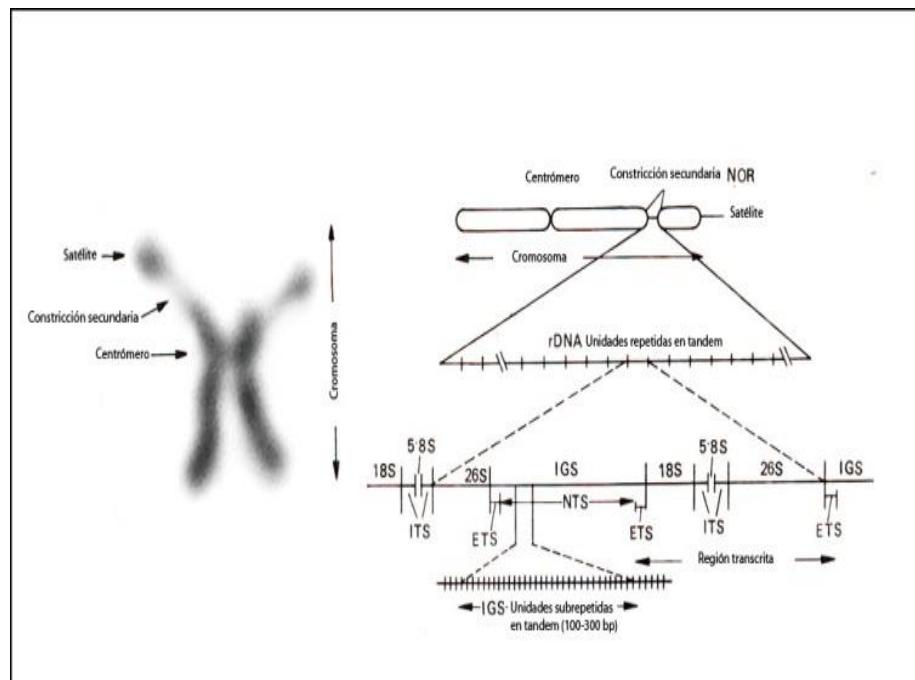


Fig. 4

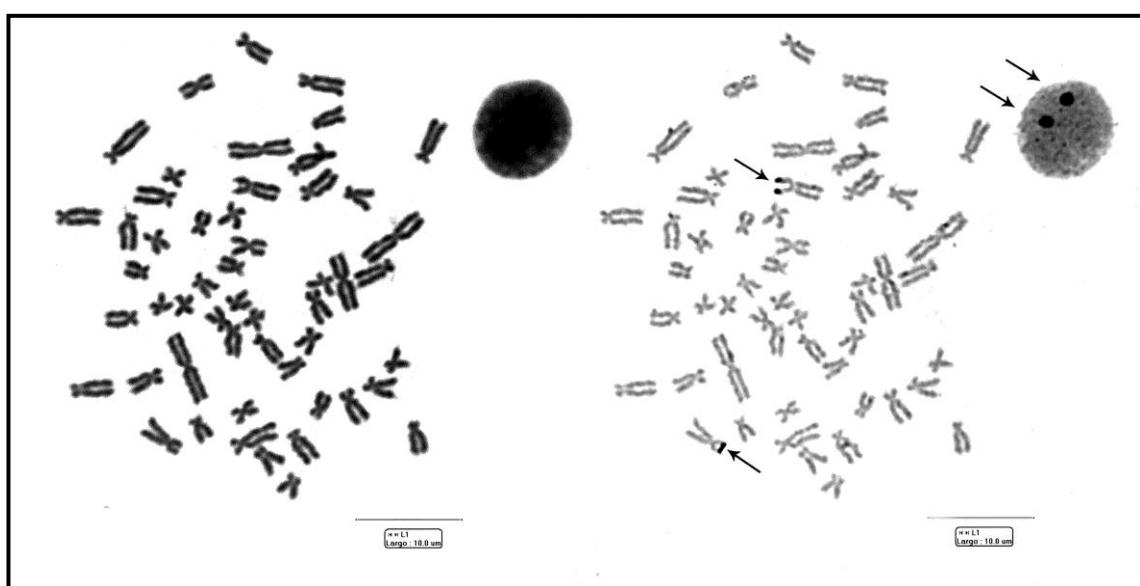


Fig. 5

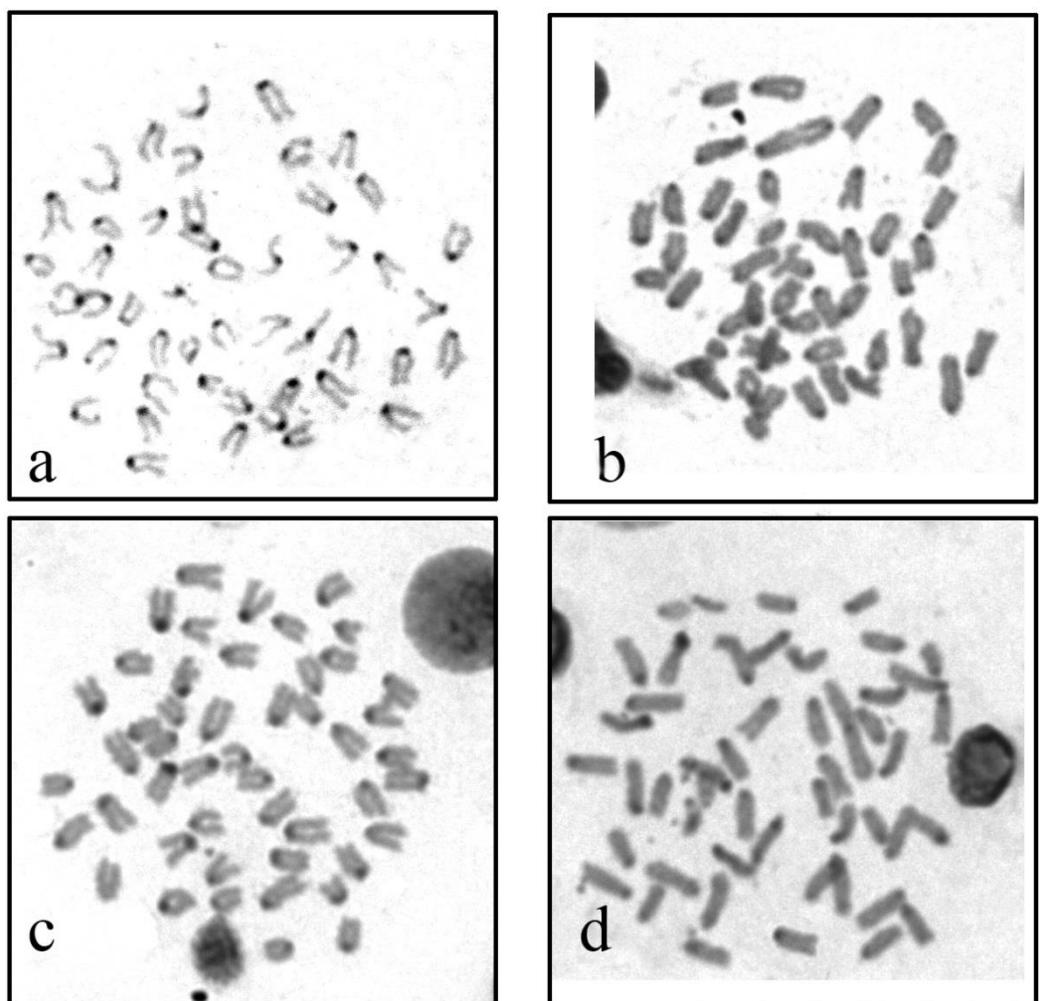


Fig. 6

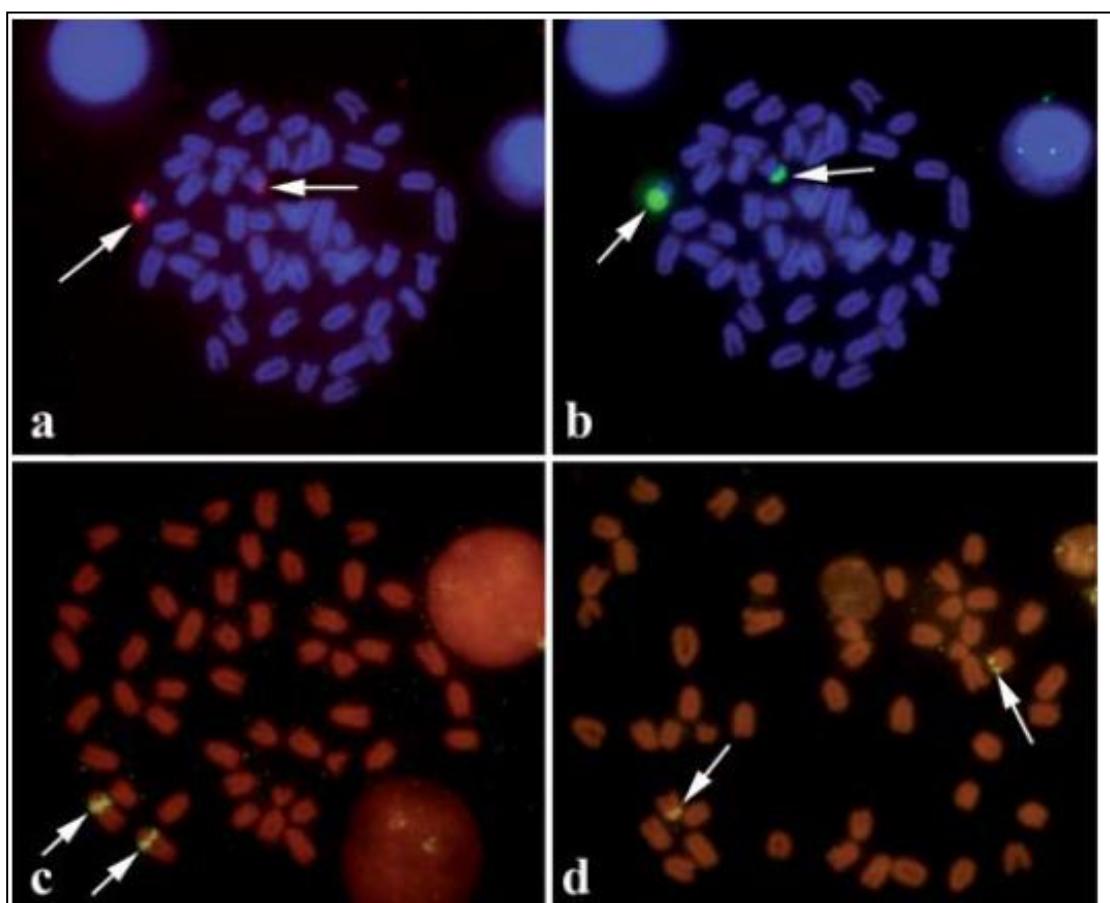


Fig. 7

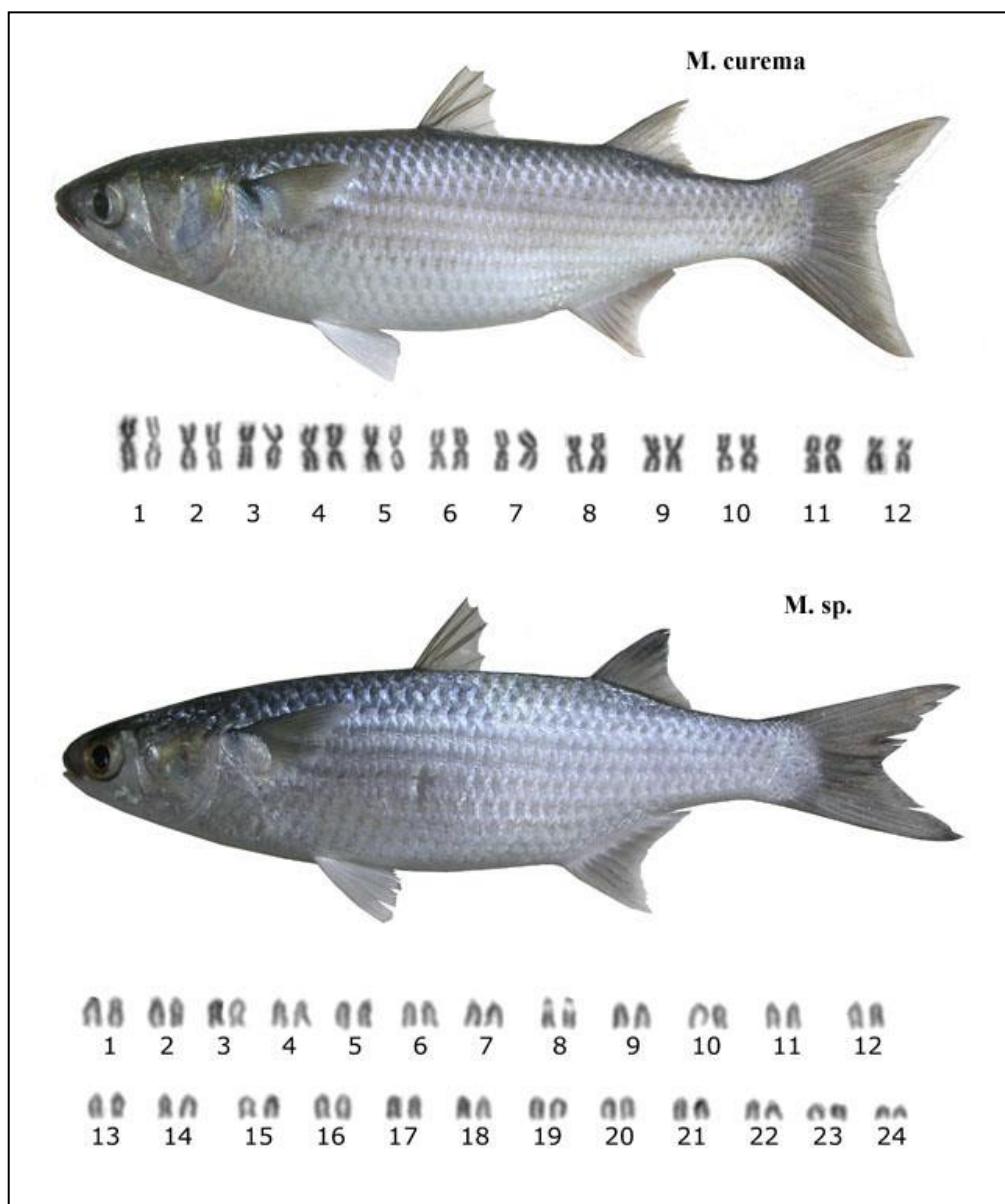


Fig. 8

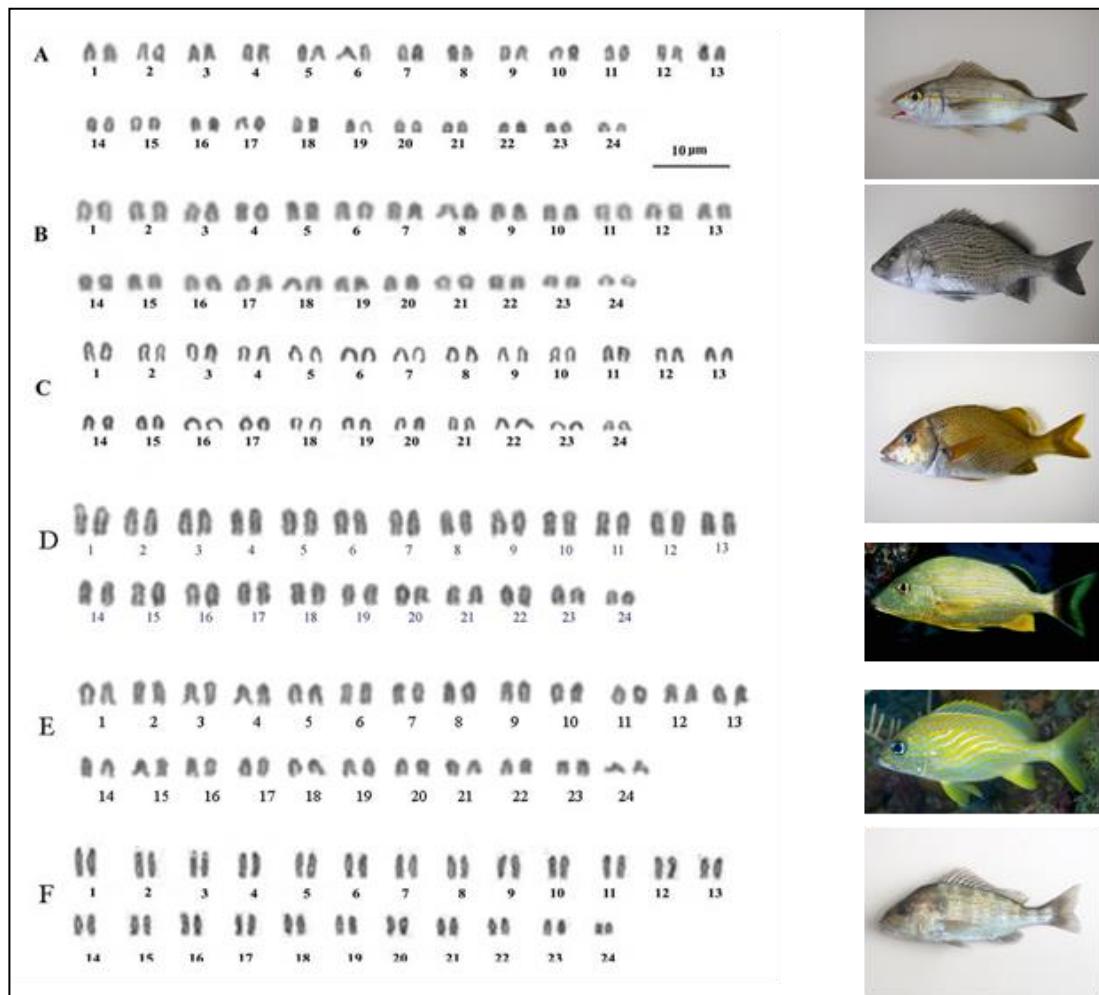
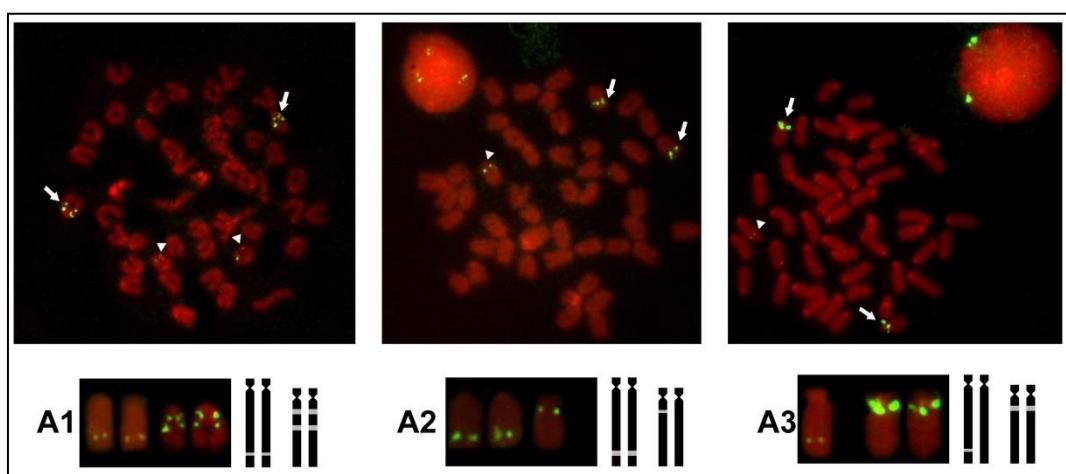


Fig. 9



Constancia de recepción de artículo "Sobre la introducción, manejo y cultivo de Tilapias en la República del Ecuador: un mensaje de alerta" por el editor de la revista Latin American Journal of Aquatic Research.



Mauro Nirchio <mauro.nirchio@gmail.com>

[LAJAR] Submission Acknowledgement

2 mensajes

Sergio Palma <spalma@ucv.cl>
Para: mauro.nirchio@gmail.com

7 de octubre de 2014, 13:47

Dr. Mauro Nirchio:

I have received the manuscript entitled "The introduction, management and cultivation of Tilapia in the Republic of Ecuador: an alert message.", sent for possible publication in Latin American Journal of Aquatic Research.

Your manuscript will enter into the review process with the ID number: 740.
Please use this number for further details on the progress of the review.

Finally I want to communicate to him, that since is expressed in the web site www.lajar.cl since 2012, the published articles will have to cancel a cost of US\$ 300, equivalent in national currency.

Please reply to confirm that you have received this message.

Sincerely yours,

Sergio Palma
Submission article platform - Latin American Journal of Aquatic Research
Chief Editor

Manuscript URL:
<http://www.rlajar.equipu.cl/index.php/rlajar/author/submission/740>
Username: nirchio

Latin American Journal of Aquatic Research
<http://www.lajar.cl/>
e-mail: lajar@ucv.cl
Phone: [+56\(32\) 2274276](tel:+56322274276)

**ISSN 0718-560X Latin American Journal
of Aquatic Research**

Latin American Journal of Aquatic Research - LAJAR

is the continuation of the *Investigaciones Marinas* published since 1970 by the Escuela de Ciencias del Mar, Facultad de Recursos Naturales of the Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. *LAJAR* publishes original papers, short communications and reviews, in Spanish or English, concerning research realized in marine and continental waters of Latin America.

The following topics are considered:

Physical Oceanography, Chemical Oceanography, Marine Pollution and Toxicology, Marine Geology and Geophysics, Biological Oceanography, Fisheries, Fish Management, Coastal Management, Limnology and Aquaculture.

Chief Editor:

Dr. Sergio Palma

Latin American Journal of Aquatic Research

Escuela de Ciencias del Mar

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

P.O. Box 1020, Valparaíso, Chile

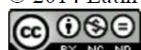
Telephone: (56-32) 227-4276 · Fax: (56-32) 227-4206

E-mail: lajar@ucv.cl

Latin American Journal of Aquatic Research is indexed in:

- Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts (ASFA)
- Information Service of Oceanic Abstracts (EBSCO)
- Web of Science (Thomson Reuters)
- Online Computer Library Center (OCLC)
- Regional on-line Information System for Scientific Magazines of Latin America, Caribe, Spain and Portugal (LATINDEX)
- Scientific Electronic Library Online (SciELO)
- Scientific Magazine Network of Latin America and Caribe, Spain and Portugal (REDALyC)
- SCImago Journal & Country Ranks
- Scopus
- Zoological Record (BIOSIS)

© 2014 Latin American Journal of Aquatic Research



Latin American Journal of Aquatic Research by [Pontificia Universidad Católica de Valparaíso](#)

is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported](#)

[License](#). Based on a work at www.lajar.cl.

[Home](#) | [Latest Issues](#) | [Editorial Board](#) | [Editorial Policy](#) | [Instructions to the Authors](#) | [Contact](#)

ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR / FACULTAD DE RECURSOS NATURALES / PONTIFICIA
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

Av. Altamirano 1480 · Valparaíso · Chile · Tel: +56 [32] 227 4241 · Fax: +56 [32] 227 4206 · Casilla 1020 ·
Valparaíso · Chile

© 2014 All Rights Reserved · WebDesign: nuovographics.com

Manuscrito de artículo intitulado "Sobre la introducción, manejo y cultivo de Tilapias en la República del Ecuador: un mensaje de alerta."

Sobre la introducción, manejo y cultivo de Tilapias en la República del Ecuador: un mensaje de alerta.

César Quezada Abad¹, Omar Sánchez Rogerio¹, Julio Eduardo Pérez², Juan I. Gaviria³ & Mauro Nirchio^{1,3}

¹ Universidad Técnica de Machala, Ecuador

² Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Venezuela

³ Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Venezuela.

RESUMEN. Se enfatiza el potencial invasivo de las tilapias y algunos aspectos de su biología que deberían ser tomados en cuenta por parte de los legisladores para dictar las normas para el manejo de las tilapias en el Ecuador. Creemos que es importante brindar detalles que permitan a los investigadores, administradores y a quienes corresponda tomar decisiones referentes a la conservación de la diversidad dulceacuícola de la Nación y advertir acerca de la magnitud y alcance de las potenciales consecuencias de las tilapias en cuerpos de agua dulce, salobre o marinos, a fin de facilitar la adopción de medidas para mitigar el impacto del escape y/o liberación sin control de estos peces, establecer planes de erradicación, donde sea posible, y desarrollar la capacidad de respuesta a los efectos negativos de la invasión, contribuyendo así con la preservación de la biodiversidad.

Palabras clave: Tilapia; acuacultura; especies exóticas; invasión; biodiversidad

Título corto: Tilapias en Ecuador: Un mensaje de alerta

Autor de correspondencia: Mauro Nirchio (mauro.nirchio@gmail.com)

The introduction, management and cultivation of Tilapia in the Republic of Ecuador: an alert message.

ABSTRACT. The invasive potential of tilapias and some aspects of their biology that should be taken into account by legislators to make regulations for the management of Tilapia in Ecuador are emphasized. We believe it is important to provide detailed information that will allow researchers, administrators and those concerned to take decisions regarding the conservation of freshwater diversity of the Nation and to alert about the magnitude and scope of the potential consequences of tilapias in fresh, brackish or marine water bodies, in order to facilitate the adoption of measures to mitigate the impact of the escape and/or uncontrolled release of these fish, establish eradication plans where possible, and to develop the capacity to respond to the negative effects of the invasion, thus contributing to the preservation of biodiversity.

Key words: Tilapia; aquaculture; exotic species; invasion; biodiversity.

Short title: Tilapia in Ecuador: an alert message

Corresponding author: Mauro Nirchio (mauro.nirchio@gmail.com)

INTRODUCCIÓN

Tilapia es el nombre común aplicado principalmente, entre otros, a tres géneros (*Tilapia*, *Sarotherodon* y *Oreochromis*) y más de 70 especies de peces de la familia Cichlidae (Perciformes). Varias características distinguen a estos tres grupos taxonómicos, pero posiblemente la más importante para diferenciarlas es el comportamiento reproductivo. Todas las especies de tilapia construyen nidos y los huevos fertilizados son protegidos por los padres. En las especies de los géneros *Sarotherodon* y *Oreochromis* los huevos son fertilizados en el nido pero los padres inmediatamente recogen los huevos en sus bocas y los incuban durante varios días después de la eclosión. En las especies de *Oreochromis* sólo las hembras practican la incubación bucal, mientras que en las de *Sarotherodon*, ambos sexos lo hacen (Tran *et al.*, 2011). Algunas especies (*Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus*) y algunas líneas

de color rojo (*Oreochromis spp.*) obtenidas por hibridación interespecífica, poseen cualidades como crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, resistencia a enfermedades, carne de amplia aceptación y alta capacidad de hibridación que pudiera permitir el vigorizar caracteres deseables (Boyd *et al.*, 2005; El-Sayed, 2006; Watanabbe *et al.*, 2002) que las hace catalogar como animales extraordinarios para la crianza y que cada vez desempeñan un papel más importante en el comercio internacional de alimentos.

Sin embargo, las mismas características que permiten justificar a las tilapias como organismos aptos para su cultivo, aunadas a otras como la agresividad, tolerancia a amplias variaciones de salinidad, temperatura y concentraciones de oxígeno disuelto, amplitud de alternativas de alimentos, adaptabilidad ecológica, plasticidad fenotípica y sobre todo la alta eficiencia reproductiva debido al cuidado parental de huevos y de alevines, y la reproducción semipermanente y precoz, las convierten en organismos con un enorme potencial para competir exitosamente con especies nativas (Stickney, 1993) y poner en peligro la biodiversidad de los ambientes en los que esos peces son introducidos debido a la capacidad que poseen para alterar la estructura de la cadena trófica, competir con otros peces y ejercer presión como predadores (Morgan *et al.*, 2004). La alteración del hábitat, la contaminación, la hibridación, la consanguinidad y la introducción de exóticos son actividades vinculadas a la acuicultura que conducen a la pérdida de biodiversidad y las actividades de acuicultura fundamentadas en especies exóticas puede ser un problema más que una solución (Pérez *et al.*, 2000, 2003; Gozlan, 2008).

Los escapes de las instalaciones de acuicultura son inevitables y, al respecto, la FAO (1997) ha señalado que: "en el caso del medio acuático, la experiencia ha demostrado que los animales rebasan fácilmente los límites de las instalaciones dedicadas a su cultivo. Por lo tanto, la introducción de organismos para actividades acuícolas debe ser considerada como una introducción deliberada en un espacio natural, aun cuando el centro de cuarentena o la piscifactoría puedan ser sistemas cerrados". Las tilapias que logran escapar, además de poder hibridarse con especies nativas silvestres, pueden introducir una amplia diversidad de patógenos y parásitos a las especies de peces silvestres y a otros peces cultivados incluyendo tilapias, afectando la biodiversidad (Senanan & Bart, 2012).

UN POCO DE HISTORIA:

La tilapia fue introducida al Ecuador desde Colombia el 19 de Octubre de 1965, en la zona de Santo Domingo de Los Colorados (actual Santo Domingo de Los Tsachilas). La ruptura del muro perimetral del estanque en el que se encontraban confinadas ocasionó el escape de la mayoría de los ejemplares y los pocos peces recapturados fueron trasferidos a la laguna de Yaguarcocha situada a 2.253 m.s.n.m, en la provincia de Imbabura (Ovychynnyk, 1971). Sobre este episodio no se ha hecho ninguna mención posterior y no encontramos información que indique si fueron realizados estudios para establecer cuál fue el impacto de ese escape.

Fue en la década de los 90 cuando el cultivo de tilapia se convirtió en una industria de gran importancia debido a la crisis de la industria camaronera. De hecho, la producción camaronera alcanzó en 1998 las 116.986 t de *Litopenaeus vannamei* (la mayor producción camaronera latinoamericana) pero debido a la aparición en 1999 de la enfermedad de tipo viral conocida como Síndrome de la Mancha Blanca causada por el virus VSMB (Nimaviridae), sufrió una drástica reducción a 35.939 t en el año 2000 (Suárez & Suárez, 2003; Briggs *et al.*, 2005). Aproximadamente 26.000 empleos directos fueron afectados, pero adicionalmente hubo pérdidas directas en los laboratorios de producción, alimentos y plantas empacadoras entre otras, con lo que se estima que un total de 150.000 empleos fueron afectados en el sector (Alday de Graindorge & Griffith, 2001). El colapso de la industria camaronera en el año 2000 condujo a una parte de los empresarios del sector a orientar la producción acuícola hacia la tilapia como alternativa, teniendo en cuenta la demanda en el mercado interno, así como los excelentes precios y demanda de filetes existente en el mercado norteamericano (Fitzsimmons, 2000; Watanabe *et al.*, 2002), además que se ha demostrado que el rendimiento y la supervivencia de los camarones en policultivo con tilapia son más altos que en monocultivo (Akiyama & Anggawati, 1999; Bessa Junior *et al.*, 2012; Hernández-Barraza *et al.*, 2012). De prácticamente no exportar producto alguno relacionado con la tilapia en 1992, Ecuador alcanzó

un pico de exportación de 881 t en 1997 a 9.726 t en el año 2003, convirtiéndose en el tercer exportador a nivel mundial y el primero de Latinoamérica. Según datos estadísticos de la Cámara Nacional de Acuacultura en Ecuador, las exportaciones sitúan la producción de tilapia como una actividad de gran importancia ([CNA, 2014](#)), con 6.047 t en el año 2013.

LEGISLACIÓN Y CONTRADICCIONES:

La Constitución de la República del Ecuador vigente establece claramente en su Artículo 72 que "...*En los casos de impacto ambiental grave o permanente, incluidos los ocasionados por la explotación de los recursos naturales no renovables, el Estado establecerá los mecanismos más eficaces para alcanzar la restauración, y adoptará las medidas adecuadas para eliminar o mitigar las consecuencias ambientales nocivas*"; en el Artículo 73 señala que "*El Estado aplicará medidas de precaución y restricción para las actividades que puedan conducir a la extinción de especies, la destrucción de ecosistemas o la alteración permanente de los ciclos naturales*" prohibiendo además, de manera expresa "*la introducción de organismos y material orgánico e inorgánico que puedan alterar de manera definitiva el patrimonio genético nacional*". Además, en su Artículo 400 define que el Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, y declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país ([Registro Oficial, 2008](#)).

Sin embargo, aun cuando el ente internacional "Invasive Species Specialist Group (ISSG)" clasifica a la Tilapia como una de las 100 peores especies invasoras ([Lowe et al., 2004](#)), y el Ministerio del Ambiente de Ecuador, a través de la Unidad de Vida Silvestre, Dirección Nacional de Biodiversidad, reconoce en una lista de especies exóticas e invasoras del Ecuador Continental que estos peces "...podrían llegar a ser una amenaza para las especies nativas por la competencia de alimento y espacio..." ([MAE, 2011](#)), existe un considerable volumen de anuncios *on line* sobre venta de tilapias y asesorías para operaciones de cultivo (Ver, por ejemplo: <http://www.olx.com.ec/nf/search/tilapia>; <http://listado.mercadolibre.com.ec/tilapia>). El propio Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca ecuatoriano (MAGAP) promueve la actividad en todo el territorio nacional (como se evidencia en <http://www.agricultura.gob.ec/?s=tilapia>) pero sin mencionar las consecuencias irreparables del escape de estos peces y su capacidad de invadir los cuerpos de agua dulce, estuarinos y marinos. De hecho, *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* y *O. aureus*, tan comúnmente utilizadas en la acuicultura mundial, representan un considerable riesgo ecológico en las regiones donde se maneja, dado que las liberaciones accidentales y/o deliberadas al medio son frecuentes, más aún si no se adoptan políticas suficientemente robustas para predecir el impacto a los ecosistemas por parte de especies invasoras.

¿POR QUÉ PROTEGER LA BIODIVERSIDAD?

La biodiversidad es el conjunto de especies y genes que la humanidad utiliza para su propio beneficio, bien sea la que deriva del entorno natural o a través de la domesticación y es percibida como naturaleza "útil". En este contexto, la biodiversidad se convierte en una forma de capital natural, sujeto a las fuerzas reguladoras del mercado y una fuente potencial de ganancias considerables para los países que poseen recursos genéticos ([Lévêque & Mounolou, 2009](#)). Es esencial para la seguridad alimentaria y la nutrición, pues según los criterios que maneja la FAO las miles de especies interconectadas constituyen una red vital en los ecosistemas de los que depende la producción mundial de alimentos ([Galuzzi et al., 2010](#)). De la enorme variedad de alimentos que pudieran ser objeto de comercialización a nivel mundial, apenas unas 150 especies de plantas se cultivan en una escala tal que entran en el comercio mundial de alimentos y sólo 24 especies son realmente conocidas y objeto de atención especial. Algo similar puede decirse de las especies animales que son explotadas y comercializadas internacionalmente ([Cartay, 1997](#)). Lo racional entonces sería apoyar e impulsar la búsqueda de otras alternativas que proporciona la biodiversidad y no ser dependiente de tan pocos productos, más si esos productos derivan de especies exóticas o introducidas.

La conservación de la diversidad biológica, su utilización sostenible y la distribución equitativa de sus beneficios, son los objetivos fundamentales de la Convención sobre la Diversidad Biológica (ONU, 1992). El razonamiento detrás de esta Convención y su ratificación por la gran mayoría de los países integrantes de las Naciones Unidas son relativamente simples. Proviene del reconocimiento que los impactos directos (sobreexplotación, destrucción de hábitats, etc.) y los efectos indirectos de las actividades humanas sobre los ambientes naturales constituyen una amenaza para el futuro de la diversidad biológica, la renovación de los recursos y, más generalmente, a las condiciones de vida en la tierra (Lévêque & Mounolou, 2009).

Para ilustrar lo peligroso que es perder la biodiversidad, particularmente la genética que es la materia prima que permite a las poblaciones adaptarse a los cambios del medio ambiente, hemos tomado el caso más dramático en la historia de la humanidad: la hambruna que azotó a Europa, especialmente a Irlanda, en el siglo pasado (1845-1851). Después de la introducción de la papa (*Solanum tuberosum*), originaria del Perú, de donde se llevó una pequeña cantidad a Europa en el siglo XVI, la población irlandesa aumentó considerablemente y superó los 8 millones (el doble de la actual), gracias a este importante alimento. Pero, debido a los muchos años de cultivo, la base genética se hizo cada vez más uniforme y cuando llegó la peste llamada roya de la papa, causada por el hongo *Phytophthora infestans*, no existían los genes que podían otorgarle resistencia, bien porque se perdieron en tantos años de cultivos o porque no vinieron cuando se trajo la papa por primera vez. Después de un período frío y lluvioso en el verano de 1845, las plantas se secaron y los tubérculos se pudrieron. La cosecha fracasó en toda Europa. En Irlanda, después de 6 años de hambruna, habían perecido más de un millón de personas y se calcula que otro millón de irlandeses emigró a los Estados Unidos, muchos de los cuales perecieron ahogados. Nuevas cepas de papa traídas de Sudamérica, con genes resistentes a la roya revivieron los cultivos (Rhoades, 1982).

Por lo tanto, la respuesta al por qué preservar la biodiversidad es simple: si no lo hacemos disminuirá drásticamente la calidad de vida.

¿POR QUÉ TENER PRECAUCIÓN CON LAS TILAPIAS?

El impacto de las especies exóticas se refleja a nivel biológico (ecológico y genético) y socioeconómico. DIAS, la base de datos sobre introducción de especies acuáticas de la FAO (www.fao.org), revela que la mayor parte de los efectos biológicos de especies introducidas han sido negativos, al igual que los costos económicos, que probablemente superen los US\$ 300 billones por año (Pimentel *et al.*, 2000, 2002, 2005). Sin embargo, aunque para los cultivadores los impactos socioeconómicos han sido en su mayor parte positivos, el costo de recuperar la biodiversidad es incalculable.

En el caso que nos ocupa, aun cuando las tilapias puedan generar oportunidades económicas en la acuicultura, suponen una amenaza seria para la biodiversidad continental ya que, al no encontrar en el nuevo ambiente sus predadores y parásitos naturales, pueden experimentar expansiones poblacionales. Para hacer un parangón, las tilapias son muy parecidas a las ratas en su gran capacidad de adaptación y aprovechamiento de recursos tróficos. Las consecuencias que causan las ratas en el campo, son ampliamente conocidas y equivalen a lo que hacen las tilapias en las aguas naturales. Ésa es la principal razón por la que esta especie exótica, cuando se convierte en invasora, es tan peligrosa para el equilibrio de los ecosistemas naturales.

Una revisión sobre el impacto ecológico de especies de peces dulceacuícolas no nativos a escala mundial entre 1999 y 2009 (Cucherousset & Olden, 2011) revela dos realidades: en primer lugar, peces de agua dulce han sido introducidos prácticamente en todos los ecosistemas en todo el mundo y muchas (si no la mayoría) de estas poblaciones nunca han podido ser erradicadas; en segundo lugar, aún con las mejores estrategias de prevención y voluntad política, las introducciones de nuevas especies de peces no-nativas inevitablemente ocurren y los modelos teóricos basados en el estudio de nichos ecológicos sobre la distribución potencial de, por ejemplo, la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) en las Américas, pronostican una invasión y establecimiento de esta especie exótica principalmente en los trópicos y las zonas de la costa con consecuencias profundas para la fauna acuática nativa, particularmente en

regiones que albergan alta diversidad biológica como Amazonas y centro de México (Zambrano *et al.*, 2006).

La documentación sobre el impacto negativo de las tilapias es bastante amplia y éste ya ha sido descrito con anterioridad (Pérez *et al.*, 2000, 2003, 2004; Nirchio & Pérez, 2002), por lo que nos limitaremos a citar algunos ejemplos relevantes:

- a) En Pakistán, la introducción de especies exóticas, entre ellas las tilapias, en reservorios de agua dulce han causado una gran catástrofe ecológica y existe una gran preocupación debido a las consecuencias adversas sobre peces nativos como *Labeo rohita*, *Cirrhinusmrigala*, *Gibelioncatla*, *Speratasarwari*, *Rita rita*, *Channa marulius* y *Wallago attu* debido a la competencia por alimento, espacio reproductivo, depredación y alteración del hábitat (Khan *et al.*, 2011).
- b) La ictiofauna de las capturas por pesca en el lago Malawi/Nyasa (África) contiene más de 835 especies de cíclidos endémicos. Mediante el empleo del gen mitocondrial que codifica para la proteína NADH-2 utilizado para resolver parcialmente las relaciones filogenéticas de *Oreochromis* en el Este de África (Klett & Meyer 2002) fue demostrado que las tilapia capturadas en las faenas de pesca en la cuenca del lago Malawi identificadas *in situ* como *O. niloticus* forman un clado monofilético con *O. niloticus* provenientes de su rango indígena en África (*O. niloticus volcane*; Lago Turkana) y con las introducidas en el Lago Victoria y muy distintos de los representantes autóctonos del género del lago Malawi, incluyendo *O. shiranus* y *O. karongae*, *O. squamipinnis* *O. chunguruensis*, demostrando así que su presencia obedece a eventos de invasión (Genner *et al.*, 2013). En el Lago Victoria, los cíclidos sufrieron una extinción a gran escala después de la introducción de perca del Nilo (*Lates niloticus*) y la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) en la década de 1950 (supuestamente para mejorar la pesca) (Barel *et al.*, 1985) que condujeron la pérdida de los Haplochromini y Tilapiini endémicos (Ogutu-Ohwayo 1990, Witte *et al.* 1992).
- c) En tres marismas salobres de Puerto Rico se encontró que las tilapias eran los peces más abundantes en las capturas (55-79%) muy por encima de las especies nativas, con una marcada reducción en la diversidad íctica, la cual resultó ser muy inferior a la informada para esa zona tan solo unos años antes (Burger *et al.*, 1992).
- d) Evaluaciones mensuales de la composición y abundancia de la pesquería en el embalse El Guájaro, en Colombia en 1988 y 2002 revelaron la presencia de 38 especies de peces, pertenecientes a 14 familias de las cuales sólo dos especies dominaron las capturas, la tilapia *O. niloticus* y la arenca *Triplophysa magdalena*. En 1988 el porcentaje de captura de estas dos especies estuvo representado en 13% y 73%, respectivamente y para el año 2002 el porcentaje de captura de *O. niloticus* aumentó a 53% y el de *T. magdalena* se redujo a 36%. Esto condujo a concluir que la variación en la composición y abundancia de la producción pesquera total implicó el desplazamiento de la especie nativa (*T. magdalena*) por la exótica (*O. niloticus*), y que además ese hecho fue observado en toda la cuenca del Magdalena durante esa década (Caraballo, 2009).
- e) Específicamente en Ecuador, un estudio realizado para establecer estrategias de prevención para especies invasoras en el interior del Golfo de Guayaquil y en el que se investigó la opinión de los pescadores artesanales respecto a las especies invasoras, destacó la percepción de que las especies de utilidad alimenticia y económica están disminuyendo o desapareciendo y que cada vez es más frecuente encontrar tilapias entre la captura de sus recursos (Torres, 2012).
- f) En el año 2006 se informó sobre una población de *Oreochromis niloticus* en la laguna de El Junco en la isla San Cristóbal (Jiménez-Uzcátegui *et al.*, 2007; McCosker & Rosenblatt, 2010). Esa laguna es el mayor reservorio de agua dulce del Archipiélago de las Galápagos situado a 1.050 km de la costa del Ecuador. La tilapia allí ocasionó la declinación de las especies de invertebrados acuáticos, incluyendo algunos endémicos. Para cuando el personal de la Dirección del Parque Nacional Galápagos comenzó las operaciones de erradicación, la situación era tan crítica que las tilapias de mayor tamaño se estaban comiendo a las pequeñas, por falta de alimento. Fue necesario emplear 920 L de Rotenona (Noxfish™) dispersada homogéneamente en la superficie y fondo de la laguna, con lo que fue posible remover 39.994 individuos, de entre 5 y 39 cm. Aunque la rotenona no afectó a insectos sí lo hizo en crustáceos

(Amphipoda) y en las larvas de dípteros (Chironomidae). Para mitigar el efecto negativo sobre las poblaciones de invertebrados susceptibles, éstas fueron alojadas en acuarios y piscinas artificiales y posteriormente introducidas de nuevo a la laguna (PCEIG, 2011).

Ante los riesgos de la introducción y cultivo de tilapias debido a la posibilidad cierta de escapes eventuales desde los sitios de cultivo al medio natural, organizaciones como el International Council for the Exploration of the Seas (ICES, 2014), Environmental Protection Agency EPA, 2014) y US Fish and Wildlife Service (FWS, 2014) han propuesto códigos de procedimientos de manejo para mitigar los efectos devastadores de su introducción en ambientes no autóctonos. Estos procedimientos deberían ser tomados en cuenta por la legislación Ecuatoriana sobre todo por el hecho de que las especies continentales de peces del Ecuador son muy atractivas como recursos alimentario y ornamental y tienen una gran importancia biológica debido a que muchas de ellas son endémicas.

¿SON LAS POBLACIONES MONOSEXUALES DE TILAPIAS LA SOLUCIÓN PARA PROTEGER LA BIODIVERSIDAD?

En el ciclo reproductivo de algunos peces, como las tilapias, se produce una maduración temprana, generalmente perjudicial desde el punto de vista económico, ya que origina una sobrepoblación y, a medida que los organismos alcanzan la madurez sexual, la velocidad de crecimiento se reduce. Basta con un porcentaje mayor del 5,0 % de hembras en el estanque de engorde para que se malogue el cultivo (Sauceda *et al.*, 2009). Debe considerarse además que en esos animales la energía que debía dedicarse al crecimiento es utilizada en procesos reproductivos. Por otra parte, en el caso de las tilapias, los machos alcanzan mayor tamaño que las hembras y esta diferencia se incrementa con la edad (Rutten *et al.* *et al.*, 2005) y por ello, disponer de poblaciones monosexuales o estériles permite acortar los períodos de cultivo y producir peces de tamaños más homogéneos. Así, es de interés el cultivar poblaciones “puros machos” (Hartley-Alcocer, 2014).

Desde hace décadas se ha usado el procedimiento de separación manual de sexos (sexado), que consiste en la inspección visual e identificación del sexo de juveniles con base en las características externas de la papila genital (Bocek, 1983). Esta técnica requiere labor intensiva y está sujeta a errores (raramente se llega a alcanzar un 80% de precisión), por variabilidad en las características de las papilas de los individuos y depende de la experiencia y entrenamiento de la persona que la realiza. Se ha intentado también una técnica que consiste en mantener individuos de tilapia del Nilo en un régimen de alta temperatura constante (36 °C parece ser la más eficiente) por 10 días (contando a partir del décimo día posfertilización), lo que incrementa sensiblemente el porcentaje de machos, hasta el 80% (Tessema *et al.*, 2006), pero no siempre estos resultados han sido repetibles (ver Delarete Drumond *et al.*, 2009). Evidentemente ambas técnicas resultan insuficientes para los fines deseados.

Antes de analizar en detalle otras técnicas más eficaces para producir poblaciones estériles y monosexuales, es necesario mencionar que en los peces, por constituir el grupo evolutivo más primitivo entre los vertebrados, no es sorprendente encontrar una gran variedad de mecanismos de determinación sexual (Nirchio & Oliveira, 2006). Los más comúnmente encontrados en tilapias son XY. En el sistema XY, los machos son XY (sexo heterogamético) y las hembras son XX (sexo homogamético) como en *Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus*. El sistema WZ es el opuesto al XY. En este caso, los machos son el sexo homogamético (ZZ) y las hembras determinan el sexo de la progenie como en *O. karongae*, *O. aureus*, *Tilapia mariae* (Gnaani *et al.*, 2008).

Aunque cultivar poblaciones “solo machos” podría ser la solución para evitar el problema de la reproducción no deseada y por lo tanto proteger la biodiversidad, la experiencia demuestra que ésta alternativa no es una medida exenta de riesgos, sobre todo cuando las poblaciones monosexuales son obtenidas por reversión hormonal. Varios tipos de hormonas, esteroides análogos o compuestos no esteroides han sido utilizados en la reversión al sexo masculino de varias especies de tilapia y el porcentaje de sexo machos revertidos depende principalmente del tipo de hormona, del tiempo y duración de la administración, las especies y talla/edad de

larvas (El-Sayed, 2006). La hormona más comúnmente empleada en la reversión sexual de la tilapia es la 17 α -metiltestosterona (MT) suministrada con el alimento en sus primeros 20 a 30 días de vida, iniciando a partir del tercer día poseclosión (Baroiller & Jalabert, 1989; Beardmore et al., 2001; Contreras-Sánchez et al., 2001; Mateen & Ahmed, 2007; Marjani et al., 2009; Homklin et al., 2009), pero de manera consistente el éxito en el procedimiento difícilmente alcanza el 95% de efectividad (ver referencias en Hahn Von-Hessberg et al., 2012) lo que equivale a decir que, con frecuencia, un porcentaje importante de los peces en los lotes que son objeto de reversión por administración de hormonas resultan hembras. Haciendo un simple cálculo, si consideramos el enorme volumen de alevines que son reversados en las instalaciones que se dedican al cultivo de tilapia y teniendo en mente que al menos 1-5% serán hembras, por cada millón de alevines reversados entre 10.000 y 50.000 peces serán hembras y, por lo tanto, un serio peligro en caso de producirse escapes desde el sistema de cultivo a cuerpos de agua naturales. Por otra parte, aun cuando el producto comestible esté exento de contenidos hormonales, los residuos del tratamiento van al ambiente y persisten en el sedimento por varias semanas (Tave, 1995) lo que entraña un riesgo adicional, ya que sus efectos sobre la biota no han sido aún establecidos.

Otra opción para la obtención de poblaciones monosexuales es mediante cruces entre especies de determinación sexual diferente. Por ejemplo, machos de *O. aureaus* (ZZ) x hembras de *O. niloticus* (XX), producirán machos híbridos (XZ), aun cuando pueden presentarse hembras, ya sea por la no pureza de las especies o por la presencia de factores autosómicos modificadores del sexo. Es de destacar que la determinación sexual en tilapias y en general en peces, puede comprender sistemas monogénicos o poligénicos, con factores localizados en autosomas o en cromosomas sexuales (Devlin & Nagahama, 2002).

La opción más segura para la producción de poblaciones “100% machos” podría ser la obtención de supermachos como pie de cría para producir poblaciones certificadas y quizás la más rentable (Putra et al., 2013). El procedimiento consiste en la administración de estrógenos a machos genéticos (XY), a fin de obtener hembras funcionales (XY) que, al ser apareadas con machos normales (XY) producen una descendencia constituida por machos XY (50 %), hembras XX (25 %) y supermachos YY (25%). El apareamiento de esos supermachos YY con hembras normales XX producirá descendencia 100 % machos XY (Pérez et al., 2012). Esta tecnología se está imponiendo con éxito a nivel comercial (McVeigh, 2003; Pang, 2005/2007) pero es un programa de cría laborioso de tres generaciones que requiere varios años y considerable crecimiento espacial, lo que se traduce en un incremento de los costos (Beardmore et al., 2001; Cnaani & Levavi-Sivan, 2009), aunque se han descrito opciones que pueden reducir el tiempo y esfuerzo requerido para la obtención de supermachos (Ezaz et al., 2004; Alcantar-Vazquez, 2014).

CULTIVO DE TILAPIAS EN EL MAR:

La escasez de fuentes de agua dulce en diferentes partes del planeta ha propiciado la planificación y puesta en marcha de ensayos de cultivo de tilapias en cuerpos de agua salobre y salada (Watanabe, 1991; Suresh & Lin, 1992).

Aun cuando no son habitantes naturales del medio marino, se cree que las tilapias evolucionaron de antepasados marinos (Kirk, 1972). Por eso no debe sorprender que puedan aclimatarse al agua salada con facilidad, reproducirse y tener descendencia viable (Watanabe, 1991) y que compañías como Aquasense International Corporation vuelquen su interés en el cultivo de tilapias en agua de mar. A través de su filial en Panamá, Aquasense Panama, S. de R.L. (ASP), la empresa ha entrado en conversaciones con varias compañías globales de productos marinos para vender tilapia roja cultivada en agua salada. ASP ha ofrecido suministrar, inicialmente, aproximadamente 500 TM de tilapia roja cultivadas en jaulas en aguas cristalinas de la costa del Pacífico de Panamá (Infofish, 2014). ¿Seguirán esas aguas siendo prístinas (ASP, 2014) después que se siembren jaulas con tilapias? Creemos necesario, antes que el proyecto comience, estudiar la severa contaminación que han provocado las jaulas de salmonídos que se cultivan en las aguas del mar del sur de Chile (Rojas & Wadsworth, 2008).

La aclimatación de las tilapias al agua de mar viene determinada por una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos (Nirchio & Pérez, 2002). En el caso de los híbridos conocidos como Tilapias Rojas, en los que pueden confluir los caracteres genéticos de las diferentes especies parentales (especialmente *O. mossambicus*) con relación a su capacidad de adaptación al agua de mar, la evidencia experimental indica que aun cuando la sobrevivencia promedio de los alevines en agua de mar es relativamente menor que en agua dulce (Watanabe, 1991), existen diferencias genéticas individuales que sugieren la posibilidad de efectuar selección para incrementar la capacidad reproductiva de stocks. En el caso de *O. niloticus*, estudios realizados para determinar las mejores condiciones de transferencia de agua dulce al agua salada, para el posterior control de su indican que hasta 17%, la transferencia directa al agua salada da una alta tasa de supervivencia (84,3% a 96,8%), pero a salinidades más elevadas la mortalidad es significativa. Sin embargo, si la transferencia se realiza de manera progresiva, se puede llegar hasta 30% con una alta tasa de supervivencia entre 78% y 81% (Yao et al., 2008)

Existen muchos ejemplos que demuestran la proliferación de las tilapias en agua de mar. En el sur de Florida, Estados Unidos, tres especies se han establecido como poblaciones reproductoras en los hábitats costeros luego de su introducción por escapes en actividades de acuacultura o de acuariofilia: la tilapia azul (*O. aureus*), especie que tolera elevadas salinidades y aguas frías, ha sido la de mayor impacto en esas aguas costera, la Tilapia de Mozambique (*O. mossambicus*), se encuentra presente en numerosas localidades y es común en los canales costeros del sudeste de Florida y en la Bahía Tampa, y la tilapia negra (*Sarotherodon melanotheron*) que fue la primera de estas especies en establecerse como población reproductora en ambientes marinos en Florida (Roberts, 1997).

También existen reportes de establecimiento de poblaciones de *O. mossambicus* en aguas marinas de algunas islas del Pacífico y constan reseñas que indican que pescadores locales atribuyen la disminución de algunas especies de más valor (lisas, bonefish" y "milkfish") al establecimiento de tilapias en las áreas costeras (Nirchio & Pérez, 2002).

En aguas marinas de las costas de Hawaii se han establecidos exitosamente dos especies de tilapias: *O. mossambicus* y *Sarotherodon melanotheron*. La primera fue introducida para el control de plantas acuáticas y como alimento para peces, pero ahora se cree que compite agresivamente con la lisa *Mugil cephalus*. La segunda escapó de tanques experimentales en los cuales se criaban como peces utilizados como carnada y ahora se han tornado tan abundantes que a menudo son capturados en las redes de los pescadores (Randall, 1987). También existen reportes que indican que en Cuba se han establecido poblaciones costeras de tilapia luego de escapes desde embalses (Tucker & Jory, 1991).

Es evidente entonces que, de producirse escape de híbridos de tilapias al mar desde los estanques de engorde en policultivo con camarón, de manera accidental o por mala praxis, se corre el riesgo que éstos se reproduzcan en el ambiente marino natural y se establezcan en el ecosistema, con todas las posibles consecuencias de la introducción de estos exóticos. El problema se vería agravado en caso de que el escape sea de ejemplares correspondientes a generaciones obtenidas por reproducción de progenitores ya aclimatados al agua de mar, por cuanto dichos ejemplares constituirían una generación con una alta probabilidad de ser genéticamente seleccionada y, en consecuencia, con mayores posibilidades de adaptarse exitosamente al ecosistema marino.

Es importante aclarar que las tilapias no aparecen en la lista de especies aptas (permitidas) para la maricultura en Ecuador emitida por MAGAP-INP (2014) pero, al parecer, existen proyectos en marcha para determinar la factibilidad económica y biológica del cultivo de tilapia para maricultura (CENAIM, 2014).

A MODO DE CONCLUSIÓN

Con base en la evidencia documentada del grave impacto a nivel internacional causado por la introducción de tilapias en ecosistemas en los que antes no existían, hemos destacado el riesgo de las consecuencias del inevitable escape de estos peces desde sus recintos de cultivo. Muchas especies nativas de los ríos ecuatorianos son endémicas o únicas y no pueden

competir con las ventajas de la tilapia que las desplazan de sus nichos. Además, la concentración de tilapias en los sistemas de cultivo intensivos puede facilitar la proliferación de enfermedades y aun cuando los productores puedan atender brotes de enfermedades y curar a sus tilapias, ¿se ha pensado en como afectarían esas epidemias a las comunidades naturales de peces, en caso de escape de las tilapias portadoras de patógenos?

La Constitución Política de Ecuador otorga el derecho a los ciudadanos para vivir en un ambiente saludable y obliga al Estado a preservar, conservar y rescatar el medio ambiente y sus recursos naturales y por lo tanto el Estado tiene la responsabilidad de realizar esfuerzos y contraer compromisos serios para la preservación de la Biodiversidad nacional.

Una de las formas de enfrentar los problemas asociados a las tilapias es conocerlas y por lo tanto, deben incrementarse los esfuerzos para establecer con urgencia un Plan Nacional para la Prevención, Manejo y Control de Invasiones por tilapia. Como ejemplo, ante la drástica reducción de la biodiversidad íctica por la invasión de *O. niloticus* en lagos de África, se ha recomendado cultivar la Tilapia autóctona del Lago Tanganyika, *Oreochromis tanganicae*, para evitar que la Tilapia del Nilo (*O. niloticus*) sea usada en cultivo en jaulas y contribuir así con la conservación de especies endémicas de tilapia (Van der Knaap, 2013).

Además, deben ser reforzadas las leyes existentes, promover el cumplimiento riguroso de las mismas y diseñar protocolos y entrenar grupos especializados para su erradicación y quizás lo más importante es que, independientemente de que el cultivo de tilapia se haya convertido en una práctica comercialmente exitosa basada en paquetes tecnológicos con probada eficiencia y altamente rentables desde el punto de vista económico, la promoción de la investigación para buscar especies autóctonas con potencial para explotación por acuicultura debería ser una prioridad para el estado Ecuatoriano a fin de diversificar la piscicultura con especies que no constituyan un riesgo para el ambiente y su biodiversidad en vez de recurrir a especies exóticas.

Tomar medidas como las sugeridas aquí implica inversión por parte del Estado. Aunque no existe una regla general que establezca cuánto debe invertir un Estado en la conservación de la biodiversidad, queremos resaltar, siguiendo a Rodríguez (2014), que el aporte de la biodiversidad al ser humano es infinito y que la inversión en su resguardo suele ser desproporcionadamente baja.

AGRADECIMIENTOS:

El desarrollo de este estudio fue posible gracias al apoyo del Proyecto PROMETEO de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República de Ecuador, el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Venezuela y la Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

REFERENCIAS

- Akiyama D.M. & A.M. Anggawati. 1999. Polyculture of *Penaeus monodon* and red tilapia in intensive pond culture conditions. ASA Technical Bulletin, Vol. AQ47: 1-7.
- Alcantar-Vazquez J.P., R. Moreno-De La Torre, D. Calzada-Ruiz, & C. Antonio-Estrada. 2014. Production of YY-male of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from atypical fish. Lat. Am. J. Aquat. Res. [online], 42(3): 644-648.
- Alday de Graindorge V. & D. Griffith. 2001. Ecuador. In: Thematic review on Management Strategies for Major Diseases in Shrimp Aquaculture. Subasinghe R., R. Arthur, M.J. Phillips & M. Reantaso (eds). Report of the workshop held in Cebu, Philippines from 28-30 November, 1999. A component of the WB/NACA/WWF/FAO Program on Shrimp Farming and the Environment. pp. 17-19.
- ASP (Aquasense Panama). 2014. Our Farm - Isla San Jose, Panama. [<http://www.aquasenseusa.com/#our-farm/c1gdh>]. Revisado: 6/10/2014.

- Barel C.D.N., R. Dorit, P.H. Greenwood, G. Fryer, N. Hughes, P.B.N Jackson, H. Kawanabe, R.H. Lowe-McConnell, M. Nagoshi, A.J. Ribbink, E. Trewavas, F. Witte & K. Yamaoka. 1985. Destruction of fisheries in African lakes. *Nature*, 315: 19–20.
- Baroiller J.F. & B. Jalabert. 1989. Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. *Aquatic Living Resour.*, 2(2): 105-116.
- Beardmore J., G. Mair & R. Lewis, 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197: 283–301.
- Beardmore J.A., G.C. Mair, R.I. Lewis. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapias: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, 197: 283–301
- Bessa Junior A.P., C.M. da Silveira Borges Azevedo, F.S. Thé Pontes & G.G. Henry-Silva. 2012. Polyculture of Nile tilapia and shrimp at different stocking densities. *R. Bras. Zootec.*, 41(7): 1561-1569.
- Bocek A. (ed), 1983. Culture of hand-selected male tilapia. Water harvesting and aquaculture for rural development. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Auburn University, Auburn AL, USA, 6 pp.
- Boyd C.E., A.A. McNevin, J. Clay & H.M. Johnson. 2005. Certification Issues for Some Common Aquaculture Species, *Reviews in Fisheries Science*, 13(4): 231-279, DOI: 10.1080/10641260500326867
- Briggs M., S. Funge-Smith, R.P. Subasinghe & M. Phillips. 2005. Introducciones y movimiento de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico. FAO Documento Técnico de Pesca No. 476. Roma, FAO;, 86pp.
- Burger J., K. Cooper, D.J. Gochfeld, J.E. Saliva, C. Safina, D. Lipsky & M. Gochfeld. 1992. Dominance of *Tilapia mossambica*, an Introduced Fish Species, in Three Puerto Rican Estuaries. *Estuaries*, 15(2): 239-245.
- Caraballo P. 2009. Efecto de tilapia *Oreochromis niloticus* sobre la producción pesquera del embalse El Guájaro Atlántico – Colombia. *Rev.MVZ Córdoba*. 14(3): 1796-1802.
- Cartay R. 1997. Una ojeada al comercio mundial de los alimentos. *Agroalimentaria*, 5: 25-32.
- CENAIM (Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas). 2014. Cultivo de Peces Marinos. Proyecto: Caracterización de cultivo de Tilapia en ambiente salino. [<http://www.cenaim.espol.edu.ec/node/95>]. Revisado: 6/10/2014
- CNA (Cámara Nacional de Acuacultura – Ecuador). 2014. Exportaciones de Tilapia Ecuatoriana a EEUU - Julio 2014. Categoría: Tilapia. [<http://www.cna-ecuador.com/comercio-exterior/estadisticas/tilapia>] Revisado: 15/8/2014.
- Cnaani A., B.Y. Lee, N. Zilberman, C. Ozouf-Costaz, G. Hulata, M. Ron, A. D'Hont, J.F. Baroiller, H. D'Cotta, D.J. Penman, E. Tomasino, J.P. Coutanceau, E. Pepey, A. Shirak & T.D. Kocher. 2008. Genetics of sex determination in tilapia species. *Sex. Dev.*, 2: 43–54.
- Cnaani A. & B. Levavi-Sivan. 2009. Sexual Development in Fish, Practical Applications for Aquaculture. *Sex. Dev.*, 3:164–175, DOI: 10.1159/000223080
- Contreras-Sánchez W.M., M.S. Fitzpatrick & Schreck. 2001. Fate of methyltestosterone in the pond environment: impact of MT-contaminated soil on tilapia sex differentiation. In: Gupta A., K. McElwee, D. Burke, J. Burright, X. Cummings, & H. Egna (Eds), Eighteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, 83-86.
- Cucherousset J. & J.D. Olden. 2011. Ecological impacts of nonnative freshwater fishes. *Fisheries*, 36 (5): 215-230, Doi:10.1080/03632415.2011.574578
- Delarete Drummond C., L.D. Solis Murgas & C. Vicentini. 2009. Crescimento e sobrevivência de tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) submetidas a diferentes temperaturas durante o processo de inversão sexual. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 33(3): 895-902.
- Devlin R.H. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- El-Sayed A-F.M. 2006. Tilapia Culture. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 277 pp.
- EPA. 2014. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/>. Revisado: 06/10/2014
- Ezaz M.T., J.M. Myers, S.F. Powell, B.J. McAndrew & D.J. Penman. 2004. Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 232: 205-214.
- FAO 1997. Enfoque precautorio para la pesca de captura y las introducciones de especies. FAO Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable. No 2, 64 pp.
- Fitzsimmons K. 2000. Tilapia and penaeid shrimp polycultures. *Pond Dynamics/Aquaculture CRSP*, Aquanews, 15(4): 1-3.

- FWS. 2014. US Fish and Wildlife Service . <http://www.fws.gov/>. Revisado: 06/10/2014
- Galluzzi G., C. van Duijvendijk, L. Collette, N. Azzu & T. Hodgkin. 2011. Biodiversity for Food and Agriculture - Contributing to food security and sustainability in a changing world. Outcomes of an expert workshop held by FAO and the Platform on Agrobiodiversity Research from 14–16 april 2010 in Rome, Italy. 66 pp.
- Genner M.J., E. Connell, A. Shechonge, A. Smith, J. Swanstrom, S. Mzighani, A. Mwijage, B.P. Ngatunga & G.F. Turner. 2013. Nile tilapia invades the Lake Malawi catchment, Afr. J. Aquat. Sci.,38:sup1, 85-90
- Goslan E.R. 2008. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad. Fish Fish., 9:106-115
- Hartley-Alcocer A.G. 2014. Potential Of YY Tilapia Male Technology. Global Aquaculture Advocate, March/April 38-40 [<http://www.til-aqua.com/images/pdf/Global-aquaculture-advocate-april2014.pdf>]. Revisado 2/10/2014.
- Hernández-Barraza C., J. Loredo, J. Adame & K.M. Fitzsimmons. 2012. Effect of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the growth performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a sequential polyculture system. Lat. Am. J. Aquat. Res., 40(4): 936-942.
- Homklin S., T. Wattanodorn, S. Kee-Ong, & T. Limpiyakorn. 2009. Biodegradation of 17a-methyltestosterone and isolation of MT-degrading bacterium from sediment of Nile tilapia masculinization pond. Water Sci. Technol., 59 (2): 261–265..
- ICES. 2014. Internaciona Council for the Exploration of the Seas. <http://www.ices.dk/explore-us/what-we-do/Pages/default.aspx>. Revisado: 06/10/2014
- Infofish Trade News. 2014; No. 7/2014 [<http://www.infofish.org/pdf/ITN/ITN%207-2014.pdf>]. Revisado: 10/9/2014.
- Jiménez-Uzcátegui G., V. Carrión, J. Zabala, P. Buitrón & B. Milstead. 2007. Status of introduced vertebrates in Galapagos. Galapagos Report 2006–2007: 136–141. Charles Darwin Foundation, Puerto Ayora, Ecuador.
- Khan A.M., Z. Ali, S.Y. Shelly, Z. Ahmad, & M.R. Mirza. 2011. Aliens: A catastrophe for native fresh water fish diversity in Pakistan. J. Anim. Plant Sci.. 21(2 Suppl.): 435-440
- Kirk R.G. 1972. A review of the recent development in tilapia culture with special reference to fish farming in the heated effluents of power stations. Aquaculture, 1: 45-60.
- Klett V. & A. Meyer. 2002. What, if anything, is a tilapia?—Mitochondrial ND2 phylogeny of tilapiines and the evolution of parental care systems in the African cichlid fishes. Mol. Biol. Evol., 19: 865–883.
- Lévêque C., J.-C. Mounolou. 2009. Biodiversity. John Wiley & Sons Ltd, 284 pp.
- Lowe S., M. Browne, S. Boudjelas & M. De Poorter. 2004. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 12pp. First published as special lift-out in Aliens 12, December 2000. (Updated and reprinted version: November 2004).
- MAGAP-INP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca – Instituto Nacional de Pesca). 2014. Memorando Nro. MAGAP-INP-2014-1867-M. Actualización de lista de especies marinas aptas para la maricultura. [http://www.acuacultura.gob.ec/pdf/listado_especies.pdf] Revisado: 2/10/2014.
- Marjani M., S. Jamili, P.G. Mostafavi, M. Ramin & A. Mashinchian. 2009. Influence of 17-alpha methyl testosterone on masculinization and growth in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). J. Fish. Aquat. Sci., 4 (1): 71-74.
- Mateen A. & I. Ahmed. 2007. Effect of androgen on sex reversal and growth of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Pak. J. Agri. Sci., 44 (2): 272-276.
- McCosker J.E. & R.H. Rosenblatt. 2010. The fishes of the Galapagos Archipelago: An update. Proc.Calif. Acad. Sci., Series 4, Vol 61, Supplement II (11): 167-195
- Mcveigh S. 2003. Super tilapia now produced in South Africa. FishFarm. (USA), 26: 31.
- Morgan D.L., H.S. Gill, M.G. Maddern & S.J. Beatty. 2004. Distribution and impact of introduced freshwater fishes in Western Australia. N.Z. J. Mar. Freshw. Res., 38: 511–523.
- Nirchio M. & J.E. Pérez. 2002. Riesgos del cultivo de Tilapia en Venezuela. Interciencia, 27(1): 39-44
- Ogutu-Ohwayo R. The decline of the native fishes of Lake Victoria and Kyoga (East Africa) and the impact of introduced species, especially the Nile perch *Lates niloticus* and the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Environmental Biology of Fishes 1990; 27: 81–96.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). 1992. Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), 32 pp. [<https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>]. Revisado: 29/8/2014.

- Ovychynnyk M.M. 1971. Unrecorded and new species of fishes from fresh waters of Ecuador. Zool. Anz., 187(1/2): 82-122.
- Pang K.C. 2005/2006. Production of marine tilapia hybrid for culture in a coastal fish farm. Singapore J. Pri. Ind. 32:93-105.
- PCEIG (Proyecto de Control de Especies Invasoras del Archipiélago de Galápagos). 2011. Resultado 3/Restauración Ecológica de la Laguna de El Junco. El Junco libre de la especie invasora tilapia (*Oreochromis niloticus*) [http://www.manejoespeciesinvasoras.info/wiki/index.php/Resultado_3/Restauraci%C3%A3o_B3n_Ecol%C3%A3o_B3gica_de_la_Laguna_de_El_Junco] Revisado: 6/9/2014.
- Penman D.J., B.J. McAndrew. 2000. Genetics for the management and improvement of cultured tilapia. In: Beveridge, M.C.M. & B.J. McAndrew, B.J. (eds) Tilapias: Biology and Exploitation,. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 227–266.
- Pérez J.E., C. Alfonsi, M. Nirchio, C. Muñoz & J.A. Gómez. 2003. The Introduction of exotic species in aquaculture: a solution or part of the problem. Interciencia, 28: 234-238.
- Pérez J.E., C. Muñoz, L. Huaquin & M. Nirchio. 2004. Riesgos de la introducción de tilapias (*Oreochromis* sp) (Perciformes: Cichlidae) en ecosistemas acuáticos de Chile, Rev. Chil. Hist. Nat., 77: 195-199.
- Pérez J.E., M. Nirchio & J.A. Gómez. 2000. Aquaculture: part of the problem, not a solution. Nature, 408: 514.
- Pérez JE, Alfonsi C, Salazar S, Nirchio M. Mejoramiento genético en acuicultura. Sistema de Bibliotecas Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela 2012; 220 pp.
- Pimentel D. 2002. Introduction: Non-native species in the world. In: Pimentel D. (ed.), Biological invasions: Economic and environmental costs of alien plant, animal and microbe Species.. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- Pimentel D., L. Lach, R. Zuniga & D. Morrison. 2000. Environmental and economic cost of nonindigenous species in the United States. BioSciences; 50: 53–65.
- Pimentel D., R. Zúñiga & D. Morrison. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. Ecol. Econ., 52: 273-288.
- Putra N.S.S.U., I. Lapong, Ma. Rimmer, S. Raharjo & N.K. Dhand. 2013. Comparative Performance of Four Strains of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brackish Water Ponds in Indonesia. J. Appl. Aquacult., 25:293–307, DOI: 10.1080/10454438.2013.834282
- Randall J.E. 1987. Introductions of marine fishes to the Hawaiian Islands. Bull. Mar. Sci., 41(2): 490– 502.
- Registro Oficial. 2008. Constitución de la República del Ecuador. Año II, Quito, Lunes 20 de Octubre del 2008 - Nº 449, 80 pp
- Roberts D.E. 1997. Non-indigenous fishes and invertebrates of concern to Florida's Gulf Coast. Paper presented at "Introduction of Nonindigenous Species Workshop" June 11-12, 1997; Gulf of Mexico Program, Metairie, Louisiana, USA.
- Rodríguez J.P. 2014. Inversión pública en el resguardo de la biodiversidad. Interciencia, 39(8): 1.
- Rojas A. & S. Wadsworth. 2008. Estudio de la acuicultura en jaulas: América Latina y el Caribe. In: Halwart M., D. Soto & J.R. Arthur (eds). Acuicultura en jaulas – Estudios regionales y panorama mundial. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 498. Roma, FAO, pp. 73– 104
- Rutten M.J.M., H. Komen & H. Bovenhuis. 2005. Longitudinal genetic analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) body weight using a random regression model. Aquaculture, 246: 101-113.
- Sauceda R., P. Rendón, E. Figueroa, A. Renón & C. López. 2009. Modelo tecnológico para el cultivo de tilapia (*Oreochromis* sp.) en jaulas. Comité Sistema Producto de Tilapia Mexico, A. C. 133 pp
- Stickney R.R. 1993. Tilapia. In: Stickney R.R. (ed) Culture of non-salmonid freshwater fishes. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 81-115.
- Suárez S.L.C. & S.R.D. Suárez. 2003. Impacto socioeconómico de la mancha blanca en el sector camaronerero del ecuador, con análisis en la provincia de Manabí, período 1999- 2003. Tesis de Grado. Universidad Laica 'Eloy Alfaro' de Manabí. Manta, Ecuador.
- Suresh A.V. & C.K. Lin. 1992. Tilapia culture in saline waters: a review. Aquaculture, 106(3&4): 201-226.
- Tave D. 1995. Production of all male *Tilapia aurea* by sex-reversed broodstock. Aquacu. Magaz. (USA), 21: 78-80.

- Tessema, M., A. Müller-Belecke & G. Hörstgen-Schwarz. 2006. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. Aquaculture, 258: 270–277.
- Torres C.G. 2012. Estrategias preventivas a especies invasoras acuáticas en el interior del golfo de Guayaquil en el 2011. Administración Ambiental. Universidad de Guayaquil, 229 pp. [<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec//handle/28000/982>]. Revisado: 4/9/2014.
- Tran, L.D., T.V. Dinh, T.P. Ngo & R. Fotedar. 2011. Tilapia. In: Fotedar R.K & B.F. Phillips (eds.). Recent Advances and New Species in Aquaculture. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 318-333.
- Tucker J. & D. Jory. 1991. Marine fish culture in the Caribbean region. World Aquacult., 22 (1): 10-27.
- Van der Knaap, M. 2013. May we eat biodiversity? How to solve the impasse of conservation and exploitation of biodiversity and fishery resources. Aquat. Ecosyst. Health., 16(2): 164-171
- Von-Hessberg H., C.M. Grajales-Quintero, A. Restrepo-Murillo & A. Martín. 2012. Monografía de protocolos para obtener poblaciones monosexo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*; TREW. 1983). Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas [online].., 16(1): 156-172.
- Watanabe W.O. 1991. Saltwater culture of tilapia in the Caribbean. World Aquacult., 22(1): 49-55.
- Watanabe W.O., T.M. Losordo, K. Fitzsimmons & F. Hanley. 2002. Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. Rev. Fish. Sci., 10(3&4): 465–498
- Yao K., M. Ouattara & A.F.A. Ahoussia. 2008. Survie du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) en eaux salées durant un transfert direct et progressif. Livest. Res. Rural Dev., 20(72). [<http://www.Irrd.org/Irrd20/5/yao20072.htm>]. Revisado: 30 septiembre 2014.
- Zambrano L., E. Martínez-Meyer, M. Menezes & A.T. Peterson. 2006. Invasive potential of common carp (*Cyprinus carpio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American freshwater systems. Can. J. Fish.Aquat. Sci., 63: 1903–1910.

Manuscrito de artículo intitulado " First description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in *Rhoadsia altipinna* (Characiformes: Characidae) from Ecuador." (En elaboración)

First description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in *Rhoadsia altipinna* (Characiformes: Characidae) from Ecuador

Omar Sánchez-Romero¹, César Quezada Abad¹, Patricio Quizhpe Cordero¹, Mauro Nirchio^{1,2}, Viviani Franca Sene³, Claudio Oliveira³

¹ Universidad Técnica de Machala, El Oro, Ecuador

² Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Estado Nueva Esparta, Venezuela.

³ Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Abstract:

Karyotypic characteristics of *Rhoadsia altipinna* from Ecuador, were investigated by examining metaphase chromosomes by Giemsa staining, C-banding, Ag-NOR, and two-colour-Fluorescent in situ hybridization (FISH) for mapping of 18S and 5S ribosomal genes. The species show a karyotype $2n = 50$, composed of 10 metacentric, 26 submetacentric and 14 subtelocentric elements, with a fundamental number FN=86 characterized by the presence of a larger metacentric pair (number 1), which is about 2/3 longer than the average length of the rest of the metacentric series. No evident morphologic dimorphism between sexes differences was found. Heterochromatin appears consistently reduced to 46 chromosomes distributed in paracentromeric position near the centromere. The first metacentric pair presents two well-defined heterochromatic blocks in paracentromeric position, near to the centromere. Impregnation with silver nitrate (Fig. 2) showed a single pair of Ag-positive NORs located at terminal regions of the short arms of the subtelocentric chromosome pair number twelve. FISH assay revealed that 18S rDNA and 5S rDNA genes are no co-located. Comparison of results here reported with available information permit to suggest that the presence of a very large metacentric pair may represent a unique and derived condition in Characidae.

Key Words: Karyotype, 18S and 5S ribosomal genes, C-bands, NORs, Characidae

Introduction:

The study of fish chromosomes has become an active area of research in recent decades providing basic information on the number, size and morphology of chromosomes, nucleolus organizers regions (NORS), distribution of constitutive heterochromatin and other more specific markers, detected through the application of molecular techniques. These features have been of great importance in allowing the diagnosis of species, identification of differentiate cryptic species and chromosomal races (Nirchio et al., 2003a, 2005), establishing the relationships between species within a genus or family (Nirchio et al., 2001, Oliveira et al., 2003), clarify the origin of natural hybrids (Nirchio et al., 2003b) and increasing the knowledge of evolutionary mechanisms and genetic question in fishes (Nirchio et al., 2014).

The Characiformes are exclusively freshwater fish distributed in America and Africa, with the greatest diversity in major neotropical watersheds (BUCKUP 1998). Within the order Characiformes, the Characidae is the largest and most complex family with 1063 valid species (Eschmeyer and Fong, 2014). These fish have the larger geographic distribution in this order (Menezes et al., 2007), occupying almost all environments of freshwater, with distribution in the Americas, from Mexico - United States to South of Argentina (Lucena 1993). Chromosome studies in the Neotropical area have been performed for 475 species of Characiformes (Oliveira et al., 2009). In Ecuador, among the freshwater fishes, the order Siluriformes has the largest number of species (365) followed by the Characiformes (345) and the Gymnotiformes (44) (Barriga, 2012), but there is an absolute absence of data on their cytogenetics features.

In this work we present for the first time the cytogenetic description of *Rhoadsia altipinna*, belonging to the subfamily Rhoadsiinae (Characidae: Characiformes), a species characterized by a striking sexual dimorphism (Fig 1). The genus contains only two species, *R. altipinna* and *R. minor* (Cardoso, 2003), from Ecuador and Peru where they are relatively common and ecologically important. *R. altipinna* occurs at low altitudes in the southwest region from the South of the Guayas River to North of the Peru, while *R. minor* occurs at higher altitudes and in river systems in the Northwest of Ecuador (Barriga, 2012). The low diversity of species and peculiar geographical distribution of Rhoadsiinae turns these fishes in an interesting group from the evolutionary and conservation perspective, mainly taking into consideration that, in the western part of Ecuador, many areas within the range of the subfamily are under the condition of relatively serious threat (Loh et al., 2014) for which, studies carried out in these species are of great importance.

Materials and methods.

Twelve specimens of *Rhoadsia altipinna* (6 males and 6 females) from locality known as Dos Bocas ($S03^{\circ}16'07.6''$ $W079^{\circ}44'14.8'$) in the Province El Oro, Ecuador (Fig 2) were analyzed. Kidney cells suspensions were obtained from fishes injected intramuscularly with yeast glucose solution for mitosis stimulation 24 hours before injecting colchicine (Lee & Elder, 1980). Following the guidelines of the American Veterinary Medical Association for euthanasia of

animals (AVMA, 2013), fish were sacrificed to numbing them with an overdose of Benzocaine (250 mg/L) until the cessation of the opercula movement, before removing the kidney. The specimens were fixed in 10% formalin, preserved in 70% alcohol, identified and vouchers deposited in the fish collection of the Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), UNESP, Botucatu (São Paulo State, Brazil) (collection numbers LBP 19362), and Universidad Técnica de Machala (UTMach-020, 021, 047-052).

Chromosome preparations were obtained from kidney cells as described in Nirchio & Oliveira (2006). Silver-stained nucleolus organizer regions (Ag-NORs) were obtained as described by Howell & Black (1980). C-bands were obtained following the method of Sumner (1972). Characterization of chromosomal morphology followed the nomenclature by Levan et al. (1964) based on centromeric position.

Position onto the chromosomes of major and minor ribosomal genes was mapped by fluorescence in situ hybridization (FISH), following the method of Pinkel et al. (1986). The 18S rDNA probe, used to localize the major ribosomal genes sites was obtained and labeled with Digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science) by polymerase chain reaction (PCR) from total DNA of Characidium zebra using the primers 18S F (5'CCG TGA TGG CTC CTT TTG AT3') and 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA3'). The signal detection was performed using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche Applied Science). The 5S rDNA repeat probe was generated and labeled with Biotin-16-dUTP (Roche Applied Science) by PCR from the total DNA of *Synbranchus marmoratus* using the primers 5S F (5'GCC CGA TAC CGT CCG ATC TCT 3') and 5S R (5'CAG GCT GCC ATG GGT GTA ACG3'). Major (18S rDNA) and minor (5S rDNA) ribosomal probes were isolated by PCR using primers described previously (Ijdo et al. 1991; Pendás et al. 1994). The signal detection was performed using Avidin-FITC/biotinylated Anti-avidin (Vector). Chromosomes were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and propidium iodide.

The mitotic figures were photographed using a Motic B410 microscope equipped with a Motic Moticam 5000C digital camera. Chromosomes were classified according to the arm ratio criteria (Levan et al., 1964). FISH metaphases were photographed with an Olympus BX61 photomicroscope equipped with a DP70 digital camera. Images were digitally processed with ADOBE PHOTOSHOP CS6 Extended.

Results:

The analysis of 234 mitotic metaphase cells of *Rhoadsia altipinna* revealed a diploid number 2n=50 count up in the 87,6% of total cells recorded. The karyotype consisted of 10 metacentric, 26 submetacentric and 14 subtelocentric elements, with a fundamental number FN=86 (Fig. 3). Karyotype in the species studied is characterized by the presence of a larger metacentric pair (number 1), which is about 2/3 longer than the average length of the rest of the metacentric series. Although *R. altipinna* presents an evident morphologic dimorphism between sexes differences between chromosome complement were not found.

Heterochromatin appears consistently reduced to 46 chromosomes distributed in paracentromeric position near the centromere (Fig. 4). The first metacentric pair presents two well-defined heterochromatic blocks in paracentromeric position, near to the centromere. Impregnation with silver nitrate (Fig. 5) showed a single pair of Ag-positive NORs located at terminal regions of the short arms of the subtelocentric chromosome pair number twelve.

FISH analyses using 18S rDNA probes confirmed the Ag-NOR sites and hence demonstrate that there are not additional inactive major ribosomal cluster. Dual Fish with 5S rDNA probes showed that minor rDNA clusters occur interstitially on the larger metacentric pair Number 1 and do not co-localize with the major rDNA clusters (Fig. 6)

Discussion:

Cytogenetic studies in Characidae disclose great karyotype diversity among species and populations. According to Arefjev (1994), the high morphological variability of karyotypes with simultaneous relatively constant diploid chromosome numbers is due to the occurrence of numerous chromosome inversions during the karyotype evolution in the group. Indeed, a study performed from 1135 living species contained in 12 families of the order Characiformes (Pazza & Kavalco, 2010) revealed that the high rate of chromosomal changes estimated at 5.65 / 1 x 10⁶ years, corresponded to the family Characidae. This agree with data on somatic chromosome formulae for species so far karyotyped (ARAI, 2011) that show a modal diploid number equal to 2n= 50-52 and FN varying from 56 in *Aphyocharax dentatus* (Souza et al., 1995) to 132 in *Astyanax scabripinnis* (Fauaz, 1994) evidencing a wide variation of morphological karyotype structure simultaneously with relatively constant diploid chromosome numbers.

The karyotype of *Rhoadsia altipinna* with a diploid number 2n=50 and a karyotypic formula 10m + 26sm + 14st elements, with a fundamental number FN=86 falls into de range of chromosome variation of Characidae. Since this work presents the first description of the chromosome complement for the species here studied and due that there is no any karyotype description for the sister species, *Rhoadsia minor*, it's not possible to establishing deeper comparisons. According to Oliveira et al. (2011), *Carlanna* (other genera in Rhoadsiinae) is close related to *Nematobrycon palmeri*. The karyotype of *N. palmeri* was published by Arefjev (1990) and, although the chromosomes are very condensed, their gross morphology is very similar to the observed here in *R. altipinna*.

An interesting detail of the karyotype of the species here studied is the presence of a larger metacentric pair (number 1) with a length of 2/3 the average length of the rest of the metacentric series. The more recent and comprehensive study on the phylogeny of the order Characiformes, mainly the family Characidae (Oliveira et al., 2011) shows that the subfamily Rhoadsiinae, belongs to a monophyletic group within the family Characidae identified as Clade C. Regardless of extensive karyotype variability in Characidae and despite a probable

difference in systematic and chromosomal classification by distinct authors it is clear that an important number of species belonging to Characidae presents the length of the first metacentric chromosome pair oversized in comparison with the rest of the chromosome complement as show reports on *Astyanax* (Carvalho et al., 2002), *Oligosarcus* (Kavalco, 2005; Shuhei et al., 2007), *Hollandichthys* (Carvalho et al., 2002), *Hemigrammus* (Arefjev, 1990), *Moenkhausia* (Foresti et al., 1989), *Hyphessobrycon* (Arefjev, 1990, Carvalho et al., 2002, Mendes et al., 2011) among others, all belonging to Characidae.

On the other hand, Oliveira et al. (2011) found other three groups in Characidae: (1) a clade composed by the single genus *Spintherobolus* (without cytogenetic information until now); (2) a clade named Stevardiinae where the species so far karyotyped do not have an oversized pair 1 (ex.: Guimarães et al. 1995); and (3) a clade named Clade B composed by the subfamilies Tetragonopterinae, Characinae, Cheirodontinae, Aphyocharacinae and some small genera, in which, until now, any karyotyped species has an oversized par 1 (Martins-Santos and Tavares, 1986; Souza et al., 1995; Alberdi and Fenocchio, 1997; Mariguela et al., 2011). Thus, the karyotypic information available permit to suggest that the presence of a very large metacentric pair may represent a unique and derived condition, that could characterize, cytogenetically, the Clade C of Oliveira et al. (2011).

Acknowledgements

This work was supported by Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación of República de Ecuador (to MN) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP-, Brazil and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq-, Brazil (to CO).

References:

- Alberdi, A.J. & A.S. Fenocchio. (1997). Karyotypes of five Tetragonopterinae species (Pisces, Characidae) from Argentina. *Cytologia*, 62: 171–176.
- Arefjev, V.A. (1990) Problems of karyotypic variability in the family Characidae (Pisces, Characiformes) with the description of somatic karyotypes for six species of tetras. *Caryologia*, 43: 305–319.
- AVMA (2013). Guidelines for the euthanasia of animals. 2013. Version 2013.0.1. <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf> (29/08/2014).
- Barriga R.S. 2012. Lista de peces de agua dulce e intermareales del Ecuador. Revista Politécnica 30(3): 83-119
- Cardoso, A. R. (2003). Subfamily Rhoadsiinae (Characins, tetras). In: Reis RE, Kullander SE, Ferraris CJ Jr (eds) Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, pp 213–214

Carvalho M L., C. Oliveira, & F. Foresti. (2002). Cytogenetic analysis of five species of the subfamily Tetragonopterinae (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Caryologia*, Vol. 55, no. 3: 181-188, 2002.

Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. Species by Family/Subfamily. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 18/09/2014.

Fauaz, G., Vicente, V.E. & Moreira-Filho, O. (1994) Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). *Brazil. J. Genet.*, 17: 157–163.

Foresti, F., Almeida-Toledo, L.F., Toledo-Filho, S.A. Supernumerary Chromosomes And Multiple Nors In *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). GENETICA, The Hague, v. 79, p. 107-114, 1989.

Guimaraes, I. N., L.F. Almeida-Toledo, C. Oliveira, F. Foresti, S.A. Toledo-Filho. (1995). Cytogenetic studies of three species of *Glandulocaudinae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, RIBEIRÃO PRETO, SP, v. 18, p. 185-189.

Howell, W. M, & D. A. Black (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 3:1014-1015.

Ijdo, J. W., R. A. Wells, A. Baldini & S.T. Reeders. (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nuclear Acids Research* 19: 4780.

Kavalco, K. F., R. Pazza, L.A.C. Bertollo, O. Moreira-Filho. (2005). Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica*, 124 (1): 85-91.

Levan. A., A. Fredga & A. Sandburg. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

Loh, M., W. F. Vita, V. Vu, R. Navarrete, P. Calle, V.R. Shervette, A. Torres & W. E. Aguirre. (2014). Isolation of sixteen microsatellite loci for *Rhoadsia altipinna* (Characiformes: Characidae) from an impacted river basin in western Ecuador. *Conservation Genet Resour*, 6:229-231, DOI 10.1007/s12686-013-0062-y.

Mendes, M.M., R. da Rosa, L. Giuliano-Caetano & A.L. Dias. (2011). Karyotype diversity of four species of the incertae sedis group (Characidae) from different hydrographic basins: analysis of AgNORs, CMA3 and 18S rDNA. *Genetics and Molecular Research* 10 (4): 3596-3608

Nirchio, M. & C. Oliveira. 2006. Citogenética de peces, 216 pp. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 216 pp.

Nirchio, M. & C. Oliveira. 2007. First description of the karyotype and Ag-NORs localization of *Stephanolepis setifer* (Bennett, 1831) (Tetraodontiformes: Monacanthidae) with remarks

- on sex chromosome differentiation. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela. Univ. Oriente*. 46 (2): 117-123.
- Nirchio, M., A. R. Rossi, F. Foresti, C. Oliveira. (2014). Chromosome evolution in fishes: a new challenging proposal from Neotropical species. *Neotrop. ichthyol.* [online]. ahead of print, pp. 00-00. Epub Oct 24. ISSN 1679-6225.
- Nirchio, M., C. Oliveira, I.A. Ferreira, J.E. Pérez, J.I. Gaviria, I. Harrison, A.R. Rossi & L. Sola. 2007. Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubrioculus* and *M. curema* (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela. *Interciencia*, 32 (11): 757-762.
- Nirchio, M., D. González, J.E. Pérez. 2001. Estudio citogenético de *Mugil curema* y *M. liza* (Pisces: Mugilidae): Regiones organizadoras del nucléolo. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela Univ. Oriente* 40: 3-7.
- Nirchio, M., F. Cervigón, J. Porto, J. Pérez, J.A. Gómez &, J. Villalaz. 2003b. Cytogenetic confirmation of *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil gaimardianus* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as valid nominal species. *Scientia Marina*, 67(1):113-115.
- Nirchio, M., J.I. Gaviria, C. Oliveira, I.A. Ferreira & C. Martins. 2006. Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita island, Venezuela. *Genetica*, 131 (2): 135-140.
- Nirchio, M., R. Cipriano, M.M. Cestari, A. Fenocchio. 2005. Cytogenetical and morphological features reveal significant differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema* (Teleostei: Mugilidae). *Neotropical Ichthyology*, 3 (1): 99-102.
- Nirchio, M., R. Rondón, C. Oliveira, I.A. Ferreira, C. Martins, J. Pérez, L. Sola & A.R. Rossi (2008). Cytogenetic studies in three species of *Lutjanus* (Perciformes, Lutjanidae, Lutjaninae) from the Island of Margarita, Venezuela. *Neotropical Ichthyology*, 6(1):101-108.
- Oliveira, C., F. Foresti & A.W.S. Hilsdorf. 2009. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology Biochemistry*, 35: 81-100.
- Oliveira, C., G. S Avelino, K. Abe, T.C Mariguella, R. C. Benine, G. Ortí, R. P. Vari, R M Corrêa e Castro (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11:275
- Pazza, R & K.F Kavalco. (2010). Rates of chromosomal changes in neotropical Characiformes (Teleostei). *Currents Topics in Genetics*, 4:11-19
- Pendás, A.M., P. Morán, J.P. Freije & García-Vásquez, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic and Cell Genetic*, 67: 31-36.

- Reis, R. E., S.O. Kullander & C. Ferraris. (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 pp.
- Shuhei, H. R., D-S. M. de F. Zambelli & L. Almeida-Toledo Foresti. (2007). Karyotype characterization and gene mapping of 5S and 18S rDNA in three species of *Oligosarcus* (Teleostei: Characidae). *Caryologia*, 60 (4): 372-378.
- Souza, I.L., O. Moreira-Filho &, L.A.C. Bertollo. (1995). Karyotypic characterization of *Aphyocharax difficilis* (Pisces, Characidae): C-banding, Ag-NORs and occurrence of diplochromosomes. *Cytobios*, 83: 33–39.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306.

Figure Captions.

Figure 1. Photography of *Rhoadssia altipinna*: male (a) and female (b)

Figure 2. Mapa de localización de zona de colecta

Figure 3. Giemsa-stained karyotype of *Rhoadssia altipinna*. Bar = 10 μ m. M: Metacentric; ST: Subtelocentric; A: Acrocentric

Figure 4. Somatic metaphases of *Rhoadssia altipinna*. Thick arrows indicate chromosomes without positive C-bands. The thin arrows points to heterochromatin on the pair number 1.

Figure 5. Metaphase spread of *Rhoadssia altipinna* Ag-stained for evidencing NORs

Figure 6. Dual Fluorescence in situ hybridization of 5S rRNA and 18S rRNA genes in male and female of *Rhoadsia altipinna*. Arrowheads indicate hybridization signal of 5S rDNA. Arrows points hybridization signal of 18S rDNA. Chromosomes are counterstained with DAPI Bar=10 μ m.

Fig.1

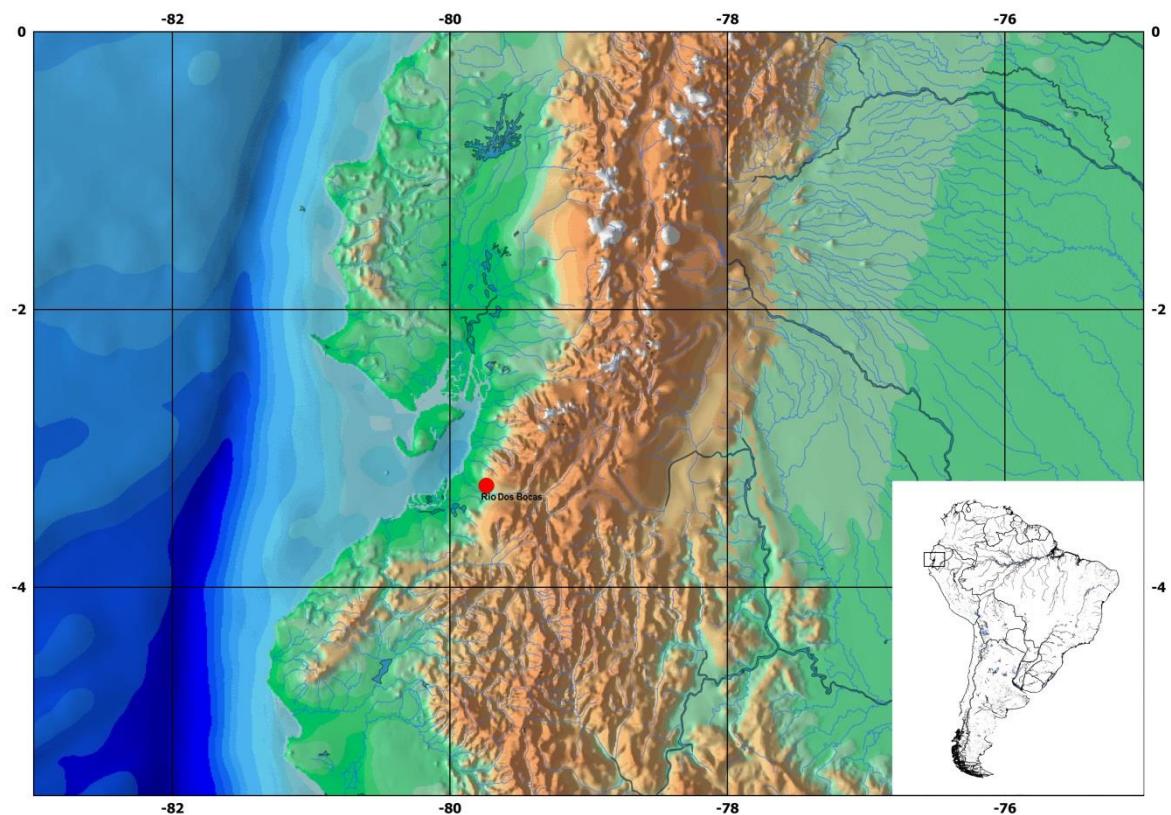


Fig. 2



Fig 3

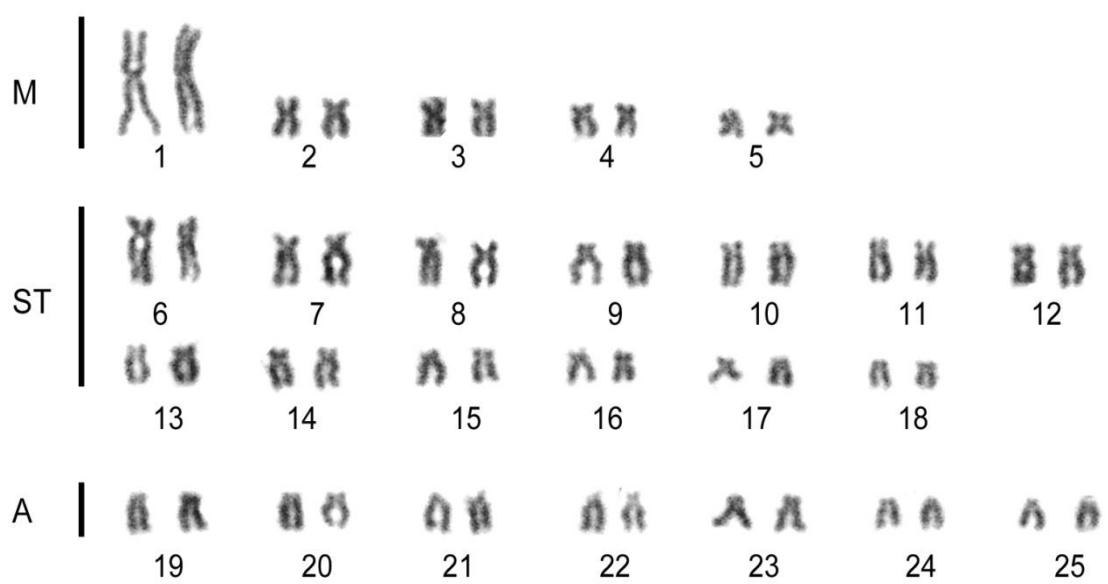


Fig. 4



Fig. 5

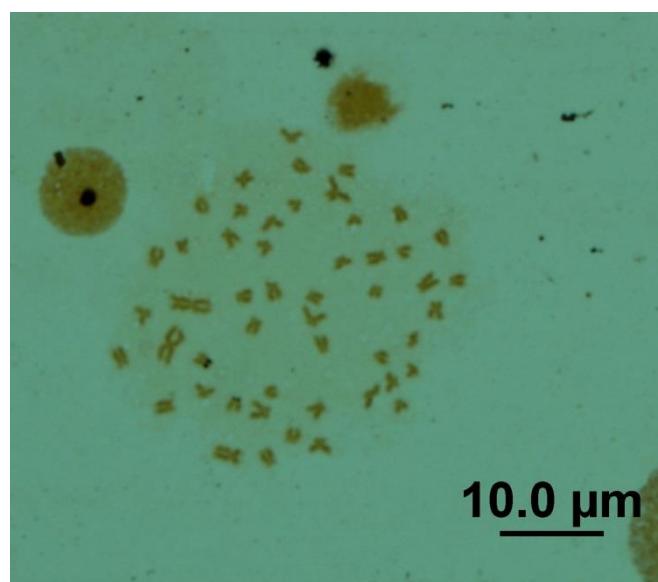
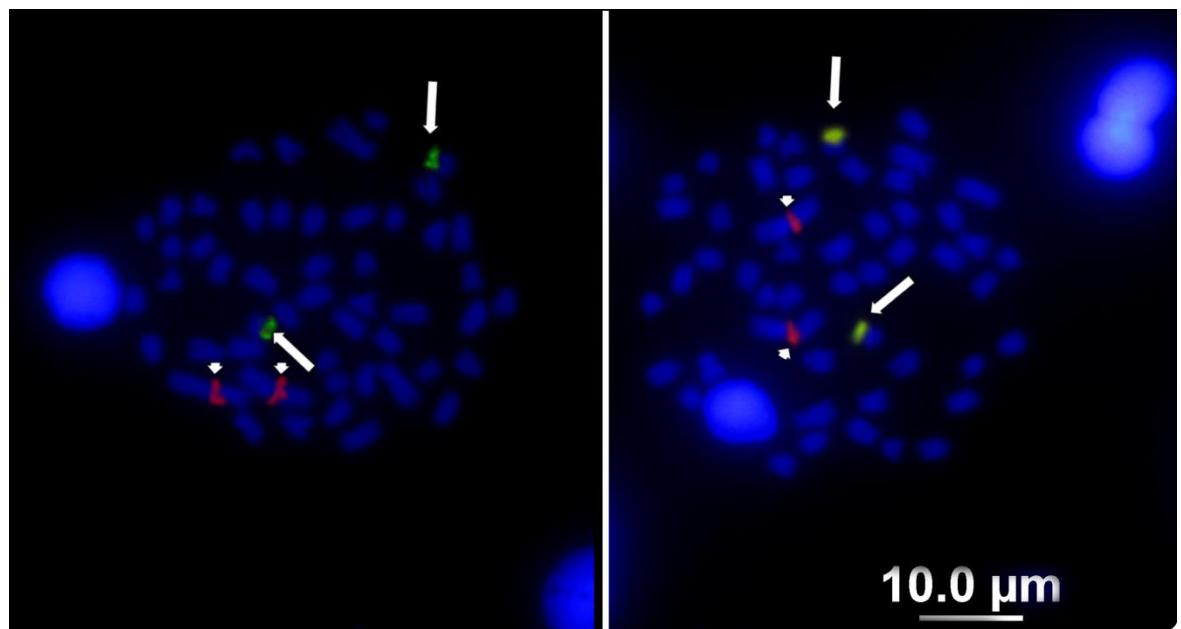


Fig. 6



Manuscrito de artículo A putative new Caribbean species of *Scorpaena* (*Actinopterygii*: *Scorpaeniformes*) revealed by cytogenetic and molecular techniques.

A putative new Caribbean species of *Scorpaena* (*Actinopterygii*: *Scorpaeniformes*) revealed by cytogenetic and molecular techniques

Mauro Nirchio^{1,2}, Claudio Oliveira³, Zoila Raquel Siccha-Ramirez³, Viviani França de Sene³, Omar Rogerio Sanchez², Valentina Milana⁴, Anna Rita Rossi⁴, Luciana Sola⁴

¹ Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela.

²Universidad Técnica de Machala, Ecuador

³ Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁴Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “C. Darwin”, Sapienza - Università di Roma, Via Alfonso Borelli 50, 00161 Roma, Italia

Corresponding author: Luciana Sola

Key words: mtDNA, Cytochrome b, 16S rDNA, karyotype, cryptic species

Running title: A putative new species of *Scorpaena*

Abstract

Cytogenetic and molecular analyses were performed in presumptive specimens of *Scorpaena plumieri* from Venezuela and in specimens of *S. mystes* from Ecuador. Two cytotypes of *S. plumieri* were identified: cytotype 1, characterized by 2n=48, all subtelocentric chromosomes, and NF=48; cytotype 2 characterized by 2n=48, 2 metacentric+46 subtelocentric chromosomes, and NF=50. The two cytotypes also show a different location of the major ribosomal clusters, which are non-syntenic with minor ribosomal clusters, and a different constitutive heterochromatin distribution. *S. mystes* shows a Giemsa karyotype similar to *S. plumieri* cytotype 1, i.e. it is characterized by 2n=48, all subtelocentric chromosomes. Mitochondrial molecular markers (COI and 16S rRNA gene sequences) disclosed the existence of two distinct lineages, corresponding to the two cytotypes, in *S. plumieri*. *S. mystes* also cluster into a distinct and well supported clade. However, their phylogenetic relationships appear to be unresolved. To summarize, both cytogenetic and molecular data identify two distinct entities within the presumptive *S. plumieri* specimens from Venezuela, possibly disclosing the existence of two cryptic species in the area.

Introduction

The fish family Scorpidae includes 223 valid species (Eschmeyer and Fong 2014) which inhabit all tropical and temperate seas (Nelson 2006). They are commonly known as scorpionfishes, for the well-developed venom glands associated with their fin-spines (Poss and Eschmeyer 2002). The genus *Scorpaena* contains more than 60 worldwide distributed species (Eschmeyer 2014; Froese and Pauly 2014). The spotted scorpionfish, *Scorpaena plumieri* Bloch, 1789, is a reef associated subtropical fish occurring in the West Atlantic, from Massachusetts to southern Brazil, and around Ascension and St. Helena islands, in the East Atlantic (Froese and Pauly 2014), at a depth between 1 and 60 m. The taxonomy of the species has been debated as demonstrated by its synonymization with ten previously described species, e.g., *Scorpaena albofasciata*, *S. bufo*, *S. colonensis*, *S. ginsburgi*, *S. nuttingi*, *S. rascacio*, *S. rascasio*, *S. scrofa*, *Apistes exul* and *Holoscorpaena didymogramma* (Eschmeyer 2014). Moreover, two *S. plumieri* subspecies were originally proposed, *S. plumieri plumieri* and *S. plumieri mystes* (Gunter 1942; Hubbs 1945), which are currently recognized as two valid nominal species, namely *S. plumieri* and *S. mystes* (Eschmeyer 2014). This latter species is commonly known as Pacific spotted scorpionfish, as it occurs in the Eastern Pacific, from California to northern Chile, including the Galapagos Islands (Froese and Pauly 2014). The two species share very similar external morphology and pigmentation, and have largely overlapping meristic traits. Only minor differences are reported for the number of cycloid scales present in vertical rows (42-47 in *S. plumieri*, 42-48 in *S. mystes*) and in lateral line (23-27 in *S. plumieri* and 24-25 in *S. mystes*) (Poss 1995; Poss and Eschmeyer 2002).

Cytogenetic and molecular data have proven to be useful tools to identify new and/or cryptic species and chromosomal races in fishes (see Nirchio et al. 2003, 2005; Bernardi and Goswami 1997; Hyde et al. 2008; Durand et al. 2012; Kon et al. 2007, 2011, among the others). Their combined use strengthens their potential in solving taxonomic issues and in species identification (Santos et al. 2009; Ryazanova and Polyakova 2012).

The karyotypes of the two spotted scorpionfish species are still undescribed and a molecular phylogeny of the genus *Scorpaena* is still missing. Only few *Scorpaena* spp. have been included in barcoding surveys of different geographic area (Costa et al. 2012; de Oliveira Ribeiro et al. 2012; Weigt et al. 2012) or used to assess Scorpidae monophyly and relationships (Smith and Wheeler 2004).

Preliminary cytogenetic and molecular data (Nirchio et al. 2013) of *S. plumieri* specimens from Isla de Margarita, Venezuela, have suggested the existence of two distinct taxa in the area. This prompted us to deepen the analysis of specimens of *S. plumieri* from Venezuela and to undertake a comparative investigation on specimens of *S. mystes* from Ecuador. This study was therefore carried out to: 1) investigate genetic differentiation among specimens of *S. plumieri* from Venezuela and 2) identify possible molecular and chromosomal markers useful to clarify their relationships with the Pacific *S. mystes*. To this purpose, specimens of the two species were karyologically analysed and their mitochondrial COI and 16S gene sequences were used to infer their phylogenetic relationships.

Material and Methods

Sample Collection

Twenty-two specimens of putative *Scorpaena plumieri* were collected in the Caribbean Sea, from south-east of Peninsula of Macanao ($10^{\circ}55'24.01''$ N, $64^{\circ}11'25.75''$ W) and North of Cubagua Island ($10^{\circ}49'41.74''$ N, $64^{\circ}09'57.59''$ W), Nueva Esparta, Venezuela, and two specimens of *S. mystes* were collected in the Pacific Ocean, from Santa Elena, Ecuador ($1^{\circ}55'56.2''$ S, $80^{\circ}47'31.3''$ W). Specimens were analysed with the different techniques (Table 1). *S. plumieri* specimens were morphologically identified according to Poss and Eschmeyer (2002); *S. mystes* specimens according to Poss (1995). The voucher specimens were deposited at the fish collection of the Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil (Voucher number LBP 19335), and at the Ichthyology Collection of the Escuela de Ciencias Aplicadas Del Mar, Universidad de Oriente, Venezuela (ECAM-875, ECAM-904, ECAM-919, ECAM-932, ECAM-945, ECAM-946, ECAM-1012, ECAM-1069, ECAM-1070, ECAM-007, ECAM-006, ECAM-899, ECAM-905, ECAM-1011, ECAM-1039, ECAM-1041, ECAM-1042, ECAM-1068, ECAM-1071, ECAM-1072

Cytogenetic analysis

Cytogenetic analyses were applied to a subset of sixteen individuals of *S. plumieri* and on the two specimens of *S. mystes*. Twenty four hours before chromosome preparations, the fishes were intramuscularly injected with a yeast glucose solution (Oliveira et al. 1988) to stimulate mitosis. Chromosome preparations were obtained from kidney cells according to the techniques described by Nirchio and Oliveira (2006). Active nucleolus organizer regions (NORs) were revealed by silver (Ag) staining as described by Howell and Black (1980). C-banding was performed following the method of Sumner (1972). Major and minor ribosomal gene clusters were mapped by fluorescence in situ hybridization (FISH), following the method of Pinkel et al. (1986). The 18S rDNA probe, used to localize the major ribosomal genes sites was obtained and labeled with Digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science) by polymerase chain reaction (PCR) from total DNA of *Characidium zebra* using the primers 18S F (5'CCG TGA TGG CTC CTT TTG AT3') and 18S R (5'CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA3'). The signal detection was performed using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche Applied Science). The 5S rDNA repeat probe was generated and labeled with Biotin-16-dUTP (Roche Applied Science) by PCR from the total DNA of *Synbranchus marmoratus* using the primers 5S F (5'GCC CGA TAC CGT CCG ATC TCT 3') and 5S R (5'CAG GCT GCC ATG GGT GTA ACG3'). Major (18S rDNA) and minor (5S rDNA) ribosomal probes were isolated by PCR using primers described previously (Ijdo et al. 1991; Pendás et al. 1994). The signal detection was performed using Avidin-FITC/biotinylated Anti-avidin (Vector). Chromosomes were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and propidium iodide.

Conventionally stained metaphases were photographed using a Motic B400 microscope, equipped with a Moticam 5000C digital camera. Chromosomes were classified according to the arm ratio criteria (Levan et al. 1964). FISH metaphases were photographed with a Olympus BX61 photomicroscope equipped with the appropriate selective filters and with a DP70 digital camera and then artificially coloured and edited with Photoshop CS5 (Adobe Systems, Inc).

Molecular analysis

Genomic DNA of all sampled individuals was extracted from muscular tissue preserved in 95% ethanol, according to Aljanabi and Martínez (1997). Fragments of the mitochondrial citochrome oxidase subunit I (COI) and 16S ribosomal DNA (16S) genes were amplified through PCR using the primers: Fish F1 - Fish R1 (Ward et al. 2005) and 16S-F - 16S-R (Kocher et al. 1989), respectively, following the procedures reported by Milana et al. (2011). The sequences obtained were deposited into the GenBank database (Acc. No. XXX) and aligned using the program MEGA5 (Tamura et al. 2011). BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) software was used for similarity searching of each sequence in GenBank.

For each gene, sequence diversity indices, standard polymorphism statistics and nucleotide composition were calculated in Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer 2010).

For phylogenetic reconstructions, all the COI longer than 530 bp and 16S rDNA sequences of *Scorpaena plumieri* and *S. mystes* available in GenBank (consulted 30 October 2014) were included (Table S1). COI (FJ584092) and 16S (AY538983) sequences of *Scorpaena brasiliensis* were used as outgroup in both phylogenetic reconstructions. Phylogenetic analyses were performed independently on sequences of each gene using neighbor-joining (NJ) (1000 bootstrap replicates) and MEGA5. Genetic distances were estimated with the program MEGA5 using the Kimura-2-parameters (K2P) substitution model (Kimura 1980).

Results

Cytogenetic analysis

All the 16 cytogenetically examined specimens of *S. plumieri* have 2n=48 chromosomes. Regardless of sex and sampling site two cytotypes were identified: cytotype 1 (Fig. 1a), shown by seven specimens, is made of 24 subtelocentric chromosome pairs (FN=48) and cytotype 2 (Fig. 1b), shown by nine specimens, is made of one metacentric and 23 subtelocentric chromosome pairs (FN=50). In both cytotypes subtelocentric chromosomes gradually decline in size, and only the smallest chromosome pair a can be identified unequivocally due to its size, approximately one-third of the largest chromosome pair. Specimens of *S. mystes* have 2n=48 chromosomes and show a karyotype (Fig. 1c) made of 24 pairs of subtelocentric chromosomes (FN = 48), similar to *S. plumieri* cytotype 1.

In *S. plumieri* sequential Giemsa-silver staining allowed the identification of two Ag-positive signals on the terminal position of the short arms of a medium-sized subtelocentric chromosome pair (classified as chromosome pair 11) in cytotype 1 (Fig. 1b) and of an apparently larger

subtelocentric chromosome pair (classified as chromosome pair 5) in cytotype 2 (Fig. 1b). In both cytotypes, FISH with the 18S rDNA probe revealed two hybridization signals on the same location of the Ag-positive signals, confirming that Ag was detecting active NORs; no additional NOR sites were detected (Fig. 2a,b). FISH assay with the 5S rDNA probes revealed that in both cytotypes minor rDNA clusters interstitially occur on one medium-sized chromosome pair and do not co-localize with the major rDNA clusters (Fig. 2a,b).

In both cytotypes of *S. plumieri*, C-banding showed centromeric and telomeric heterochromatic blocks in a large number of chromosomes (Fig. 3). Some cytotype-specific marker chromosomes can apparently be identified, regardless of the sex of the examined specimens. In cytotype 1 (Fig. 3a) a conspicuous heterochromatic block can be observed in the terminal region of a large chromosome pair (likely chromosome pair number 1). In addition, C-positive constitutive heterochromatin can be observed on a medium-sized chromosome pair, interstitially located in proximity of the telomere. In cytotype 2 (Fig. 3b) a conspicuous heterochromatic block can be observed in the terminal region of one of the arms of the single metacentric chromosome pair number 1. In addition, C-positive constitutive heterochromatin can be observed on a large-sized ST/A chromosome pair, interstitially located in proximity of the centromere.

Molecular analysis

Details on sequence analysis of COI (621 bp) and 16S (575 bp) mtDNA fragments are reported in Table 2. In *S. plumieri* 9 haplotypes were identified for both COI and 16S sequences. With both genes, these haplotypes cluster in two well defined haplogroups, named 1 and 2. The two haplogroups show different variability parameters: haplogroup 2 show a higher number of haplotypes and of both haplotype and nucleotide diversities than haplogroup 1. *S. mystes* shows high haplotype and low nucleotide diversities, similarly to *S. plumieri* haplogroup 1.

A high number of diagnostic substitutions is detected when comparing the two *S. plumieri* haplogroups: 51 and 9 for COI and 16S fragments, respectively. This number is even higher when comparing each *S. plumieri* haplogroup with *S. mystes*: 90 and 19 for COI and 16S fragments for *S. plumieri* haplogroup 1; 89 and 20 for COI and 16S fragments for *S. plumieri* haplogroup 2. A similarity of 91 and 98% was obtained for COI and 16S sequences, respectively, between *S. plumieri* clade 1 and clade 2; a similarity of 86% (COI) and 96% (16S) was obtained comparing *S. mystes* with both clades of *S. plumieri*. The sequences of COI and 16S genes of both *S. plumieri* clades and *S. mystes* were compared with those available in the GenBank database for the *Scorpaena* species distributed in the Western Atlantic and Eastern Pacific areas. The obtained similarity values are reported in Table 3. Very few sequences are available for 16S gene. Different similarity values are obtained when the two *S. plumieri* haplogroups are compared with sequences available in GenBank, and for each of them two different values/ranges are obtained, indicating the heterogeneity of deposited sequences. In addition our *S. mystes* specimens show a low value of similarity with sequences deposited under the same specific name, collected in Costa Rica (COI) and California (16S).

Neighbor-joining phylogenetic reconstruction based on COI and 16S rDNA sequences produced trees with a similar but not identical topology. In the COI tree (Fig 4) the presence of two different and well-supported clusters of *S. plumieri*, named clade 1 and clade 2, can be identified. Clade 1 groups the 8 sequences of *S. plumieri* (haplogroup 1) specimens collected in this study, in Venezuela, with those of 3 specimens from South Brazil, retrieved from GenBank. Clade 2 groups 13 sequences of *S. plumieri* (haplogroup 2) collected in this study, in Venezuela, with all the remaining sequences available in GenBank, obtained from specimens collected in Florida and in the Caribbean Sea. Clade 2 appear to be closer to *S. mystes* from Costa Rica (KC616458- KC616460), retrieved from GenBank, than to Clade 1 of *S. plumieri*. Sequences from samples of *S. mystes* collected during this survey, in Ecuador, separately cluster in a well supported clade. In the 16S tree (Fig. 5) the two *S. plumieri* clades are also evident and well supported and appear to be separated from the specimens of *S. mystes* collected during this survey, in Ecuador. However the three lineages show a different (and unresolved) topology. In addition, samples of *S. mystes* from California (HQ127642, HM998553), retrieved from GenBank, are arranged within *S. plumieri* lineage 2. Genetic distances (Kimura 2 parameters, K2P) between *S. plumieri* clade 1 and clade 2 were D=0.098 for COI, and D=0.016 for 16S. Genetic distances between *S. plumieri* clade 1 and Ecuadorean *S. mystes* was D=0.166 for COI and D=0.035 for 16S, and between *S. plumieri* clade 2 and Ecuadorean *S. mystes* was D=0.158 for COI and D=0.038 for 16S.

DISCUSSION

Both cytogenetic and molecular data identify two distinct entities within the presumptive *S. plumieri* specimens from Venezuela. Most importantly, correspondence exists among cytotypes 1 and 2 and mtDNA haplogroups 1 and 2. Both *S. plumieri* haplogroups appear to be molecularly distinct from *S. mystes*, that clusters in a different lineage. The two sets of data will be discussed separately and then integrated in the final conclusion.

By adding the chromosome complement of *S. plumieri* and *S. mystes* reported in this study, the number of the *Scorpaena* species so far cytogenetically analysed rises to 9 (Table 4), out of the approximately 60 recognized species (Eschmeyer 2014; Froese and Pauly 2014). The *Scorpaena* species show variable diploid number, ranging from 34 to 48, and FN from 34 to 86 (Table 4). Different karyotype formulae can be observed, with several species showing up to 16 M/SM chromosomes and others only ST/A chromosomes. This suggests that chromosomal rearrangements like centric fusions and pericentric inversions have occurred in the diversification in this group. All the species in which nucleolar organizer regions have investigated show a single NOR bearing chromosome pair, conforming to the evidence that this is the most common condition in Teleosts, being shown by 72% of the species (Gornung 2013). In this study two cytotypes have been observed for presumptive *S. plumieri* samples from Venezuela, differing for karyotype formula: cytotype 1 is characterized by $2n=48$, all subtelo/acrocentric chromosomes, and NF=48; cytotype 2 is characterized by $2n=48$, 2 metacentric+46 subtelo/acrocentric chromosomes, and NF=50. The two cytotypes also show a different location of the major ribosomal clusters, which are non-syntenic with minor ribosomal clusters and a different constitutive heterochromatin distribution.

The interspecies variation in location of NORs has been already observed in other *Scorpaena* species. Corrêa and Galetti (1997) identified NORs in telomeric position on the short arms of the submetacentric chromosome pair 2 in *S. brasiliensis*, and in a comparable chromosome region, but on chromosome pair 5 in *S. isthmensis*. Similarly, Thode et al. (1985) reported NORs on chromosome pair 13 in *S. notata* and on chromosome pair 18 in *S. porcus*.

Distribution of constitutive heterochromatin in fish chromosomes has been often associated with karyotype diversification (Mantovani et al. 2000; Molina and Bacurau 2006) and appears to have had an important role in the chromosomal evolution of Scorpaenidae (Thode et al. 1985), particularly in the genus *Scorpaena* (Yokoyama et al. 1992). C-banding patterns observed in this study in the two *S. plumieri* cytotypes analyzed are different. The differential presence of conspicuous heterochromatic blocks on different chromosome pairs in the two cytotypes might be interpreted on the light of the occurrence of a couple of pericentric/paracentric inversion (Fig. 6). Cytogenetic studies in other fish groups suggest that this type of chromosome mutation represent the major rearrangement involved in chromosome evolution of other cryptic species belonging to Carangidae (Caputo et al. 1996), Gymnotidae (Milhomem et al. 2008; Nagamachi et al. 2010), Characidae (Pazian et al. 2012) and Loricariidae (Endo et al. 2012).

Multiple inversions involving many chromosomes are potentially effective postmating isolating mechanism (see Coates and Shaw 1984). Indeed, in heterozygous for extensive chromosomal rearrangements, recombination between chromosomes results in duplication and/or deficiency that often generates unbalanced gametes that might themselves die or cause zygotes to die (see Rieseberg, 2001). Thus, structural differences between the two *S. plumieri* cytotypes may act as reproductive barrier between the two cytotypes, considering that individuals carrying either cytotypes were found in sympatry.

When comparing the two *S. plumieri* cytotypes with *S. mystes* karyotype, this latter species shows a Giemsa karyotype similar to *S. plumieri* cytotype 1, i.e. it is characterized by $2n=48$, all subtelo/acrocentric chromosomes. Unfortunately, no further data derived from other staining techniques and FISH on this species are available, so that not other comparisons are possible. Molecular analysis, both in sequence similarity and clustering, supports *S. mystes* as a valid species, distinct from *S. plumieri*. Indeed a high number of diagnostic substitution and a divergence of 15.8-16.6% for COI and 3.5-3.8% for 16S has been observed between specimens of *S. mystes* and *S. plumieri* collected in this study, respectively from Ecuador and from Venezuela. In both phylogenetic trees *S. mystes* from Ecuador and *S. plumieri* are organized in three well distinct and supported clusters. However, there are two main crucial points. First of all there are two different mtDNA lineages of *S. plumieri*, which show two different cytotypes. One of this is widespread across the Caribbean and northward to Florida, the other one shows southward distribution, including samples exclusively from Venezuela and Brazil. Similar results were obtained for *S. notata* specimens collected from Portugal by Costa et al. (2012), within a research that attempted to establish a system to rank barcode records. Second, sequences of *S. mystes* collected in this study are very different from those deposited in GenBank, and do not cluster with them in the phylogenetic trees. Although in the 16S tree *S. mystes* from California are arranged within *S. plumieri* clade 2, in the COI tree samples from Costa Rica are grouped in their own clade, showing 3.8% of genetic divergence from *S. plumieri* clade 2. Ward (2009) in a review on barcoded divergence in fishes noted that the genetic divergence values among congeneric species were less than 3% in about 17% of the cases and that the value of divergence drop down to less than 1% in about 3.7% of the cases. On this basis, the author suggests that if the unknown specimen is more than 2% divergent from the known specimens, it is very likely that it belongs to a different species with a probability greater than 95%. Thus we might conclude that both under the name *S. plumieri* and *S. mystes* there are different cryptic species.

Conclusions

The Caribbean region contains the greatest concentration of marine species in the Atlantic Ocean. This region is a global-scale hotspot of marine biodiversity (Roberts et al. 2002; Miloslavich et al. 2010) as demonstrated by the “continuous” description of new marine fish species in this area (e.g., Conway et al. 2010; Baldwin and Johnson 2014).

Both cytogenetic and molecular data obtained in this research frame in this picture, as they identified two distinct entities within the presumptive *S. plumieri* specimens from Venezuela, possibly disclosing the existence of two cryptic species. Fourteen *Scorpaena* species, i.e. *S. agassizii*, *S. albifimbria*, *S. bergii*, *S. brachyptera*, *S. brasiliensis*, *S. calcarata*, *S. dispar*, *S. elachys*, *S. grandicornis*, *S. inermis*, *S. isthmensis*, *S. melasma*, *S. petricola*, *S. plumier*, are present in the western Atlantic area. Nevertheless, in addition to morphological data, the comparison of the sequences obtained in this study allows us to exclude a misidentification with most of the above mentioned species, considering that sequences were not available for only four taxa among them, i.e. *S. brachyptera*, *S. elachys*, *S. melasma*, *S. petricola*.

There are no morphological diagnostic characters that clearly allow the taxonomic distinction between the two *S. plumieri* cytotypes/clades, thus it is reasonable to suggest a recent speciation event in which chromosomal reorganization has had a role in separating these taxonomic units. Thus, results here presented, framed into the existing data, lead us to propose that cytotype 1/mtDNA clade 1 specimens belong to the valid *S. plumieri* species, whereas cytotype 2/mtDNA clade 2 specimens represent a new taxon, still undescribed in the Caribbean Sea. This latter taxon, based on cytogenetical and molecular data, differs from both *S. plumieri* and *S. mystes*, despite of the absence of morphological differences with the sympatric *S. plumieri*, stressing the importance of conventional and molecular cytogenetic techniques as powerful tools for the identification of cryptic species. As far as *S. mystes* is concerned, the comparison of molecular data obtained in this study with those from GenBank identifies again distinct lineages, and a possible complex systematic situation: this certainly indicates the need of additional sampling/ karyotyping/sequencing also for this species.

Acknowledgements

This work was supported by Consejo de Investigación, Universidad de Oriente, Venezuela; Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación of República de Ecuador (to MN); Sapienza University, Rome, Italy (to LS, VM, AR), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP-, Brazil and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq-, Brazil (to CO).

References

- Aljanabi SM, Martínez L (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Res* **25**:4692-4693.
- Arai R (2011) Fish Karyotypes A Check List. Springer, Tokyo.
- Baldwin CC, Johnson GD (2014) Connectivity across the Caribbean Sea: DNA barcoding and morphology unite an enigmatic fish larva from the Florida Straits with a new species of sea bass from deep reefs off Curaçao. *PLoS ONE* **9**:e97661.
- Bernardi G, Goswami U (1997) Molecular evidence for cryptic species among the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and *Trematomus hansonii*. *Antarct Sci* **9**:381-385.

- Cano J, Thode G, Alvarez M (1982) Karyoevolutive considerations in 29 Mediterranean teleost fishes. *Vie Milieu* **32**:21–24.
- Caputo V, Cerioni PN, Caniglia M, Giovannotti M (2003) Chromosomal studies of five tropical Scorpaeniform fishes (Teleostei, Scorpaenidae). *Ital J Zool* **70**:201-204.
- Caputo V, Marchegiani F, Olmo E (1996) Karyotype differentiation between two species of carangid fishes, genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae). *Mar Biol* **127**:193-199.
- Caputo V, Sorice M, Vitturi R, Magistrelli R, Olmo E (1998) Cytogenetic studies in some species of Scorpaeniformes (Teleostei: Percomorpha). *Chromosome Res* **6**:255-262.
- Cataudella S, Civitelli MV, Capanna E (1973) The chromosomes of some Mediterranean teleosts: Scorpaenidae, Serranidae, Labridae, Blenniidae, Gobiidae (Pisces—Scorpaeniformes, Perciformes). *Boll Zool* **40**:385–389.
- Coates DJ, Shaw DD (1984) The chromosomal component of reproductive isolation in the grasshopper *Caledia captiva*. III. Chiasma distribution pattern in a new chromosomal taxon. *Heredity* **53**:85-100.
- Conway KW, Baldwin C, White MD (2014) Cryptic diversity and venom glands in Western Atlantic clingfishes of the genus *Acyrtus* (Teleostei: Gobiesocidae). *PLoS ONE* **9**:e97664.
- Corrêa M, Galetti Jr P (1997) Chromosomal diversity in Scorpaenidae (Teleostei, Scorpaeniformes): cytogenetic studies in *Scorpaena brasiliensis* and *Scorpaena isthmensis* from the coast of Rio de Janeiro, Brazil. *Cytologia* **62**:397–404.
- Costa FO, Landi M, Martins R, Costa MH, Costa ME., Carneiro M, Alves MJ, Steinke D, Carvalho GR (2012) A ranking system for reference libraries of DNA barcodes: application to marine fish species from Portugal. *Plos ONE* **7**:e35858.
- de Oliveira Ribeiro A, Caires RA Casagrande MT, Garcia Pereira LE, Hanner R, Oliveira C (2012). DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. *Mol Ecol Resour* **12**:1012–1020.
- Durand JD, Chen WJ, Shen KN, Jamandre BW, Blel H, Diop K, Nirchio M, Garcia de León FJ, Whitfield AK, Chang C-W, Borsig P (2012) Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): Molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. *Mol Phylogenet Evol* **64**:73–92.
- Endo KS, Monteiro MER, Zawadzki CH, De Souza PLR, Ferreira HJ (2012) Karyotype description of possible new species of the *Hypostomus ancistroides* complex (Teleostei: Loricariidae) and other Hypostominae. *Acta Scientiarum. Acta Sci-Biol Sci* **34**:181-189.
- Eschmeyer WN (Ed) (2014) Catalog of fishes. California Academy of Sciences, <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Electronic version accessed 2014-11-05.
- Eschmeyer WN, Fong JD (2014) Species by family/subfamily. In: Catalog of fishes. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/> SpeciesByFamily.asp. Electronic version accessed 2014-11-05.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* **10**:564–567.

- Froese R, Pauly D (2014) FishBase. World Wide Web electronic publication. Available at: www.fishbase.org, version (02/2014). Last accessed 2014-11-05.
- Gornung E (2013) Twenty years of physical mapping of major ribosomal rna genes across the teleosts: A review of research. *Cytogenet Genome Res* **141**:90-102.
- Gunter G (1942) A new *Scorpaena* from the Texas Coast, with notes on *Scorpaena mystes* Jordan and Starks. *Copeia* **2**:105-111.
- Howell W, Black D (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* **36**:1014-1015.
- Hubbs C (1945) The record of a fish, *Scorpaena mystes*, from California: A comedy of errors. *Copeia* **3**:129-133.
- Hyde J, Kimbrell C, Budrick J, Lynn E, Vetter D (2008) Cryptic speciation in the vermillion rockfish (*Sebastodes miniatus*) and the role of bathymetry in the speciation process. *Mol Ecol* **17**:1122-36.
- Ijdo J. W, Wells RA, Baldini A and Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)n generated by PCR. *Nuclear Acids Research* **19**: 4780.
- Keith P, Lord C, Lorion J, Watanabe S, Tsukamoto K, Couloux A, Dettai A (2011) Phylogeny and biogeography of Sicydiinae (Teleostei: Gobiidae) inferred from mitochondrial and nuclear genes. *Mar Biol* **158**:311-326.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Biol* **16**:111-120.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:6196-6200.
- Kon T, Yoshino T, Mukai T, Nishida M (2007) DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: A lesson from gobioid fish *Schindleria*. *Mol Biol Evol* **44**:53-62.
- Kon T, Yoshino T, Nishida M (2011) Cryptic species of the gobioid paedomorphic genus *Schindleria* from Palau, Western Pacific Ocean. *Ichthyol Res* **58**:62-66.
- Levan A, Fredga K, Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**:201-220.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* **109**:161–168.
- Milana V, Fusari A, Rossi AR, Sola L (2011) Molecular and morphological identification of an uncommon centrolophid fish. *Cent Eur J Biol* **6**:440-445.
- Milhomem SSR, Pieczarka JC, Crampton WGR, Silva DS, De Souza ACP, Carvalho JR, Nagamachi CY (2008) Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genet* **9**:75.
- Miloslavich MP, Díaz JM, Klein E, Alvarado JJ, Díaz C, Gobin J, Escobar-Briones E, Cruz-Motta JJ, Weil E, Cortés J, Bastidas AC, Robertson R, Zapata F, Martín A, Castillo J, Kazandjian

- A, Ortiz M (2010) Marine biodiversity in the Caribbean: Regional estimates and distribution patterns. PLoS ONE **5**:e11916.
- Molina WF, Bacurau TOF (2006) Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Percidae and Gerreidae). Cytologia **71**:237–242.
- Murofushi M, Yoda K, Deguchi Y (1987) Karyological study of four species in scorpionfishes. Report of the Mishima Research Institute of Science for Living, Nihon University **10**:37–42.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, De Souza ACP, Ferguson-Smith MA (2010) Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. BMC Genet **11**:28.
- Nelson JS (2006). Fishes of the World, 4th edn. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ.
- Nirchio M, Cervigón F, Porto J, Pérez J, Goméz J, Villalaz J (2003) Cytogenetic confirmation of *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil gaimardianus* Desmerest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as valid nominal species. Sci Mar **67**:113-115.
- Nirchio M, Cipriano R, Cestari M, Fenocchio A (2005) Cytogenetical and morphological features reveal significant differences among Venezuelan and Brazilian samples of *Mugil curema* (Teleostei: Mugilidae). Neotrop Ichthyol **3**:99-102.
- Nirchio M, Eheman N, Ron E, Siccha-Ramirez ZR, Foresti F, Oliveira C, Rossi AR, Sola L (2013) Preliminary cytogenetic and molecular analyses of *Scorpaena plumeri* from Venezuela identify two distinct taxa. 19th International Chromosome Conference Bologna, p. 164
- Nirchio M, Oliveira C (2006) Citogenética de peces. Editado por la Coordinación de publicaciones del rectorado de la Universidad de Oriente, Nueva Esparta, Venezuela.
- Nishikawa S, Honda M, Wakatsuki A (1977) Comparative studies on the chromosomes in Japanese fishes—II. Chromosomes of eight species in scorpion fishes. J Shimoneseki Univ Fish **25**:187–191.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA (1988) Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. Rev Brasil Genet **11**:577-624.
- Pazian MF, Garcia Pereira LH, Shimabukuru-Dias CK, Oliveira C, Foresti F (2012) Cytogenetic and molecular markers reveal the complexity of the genus *Piabina* Reinhardt, 1867 (Characiformes: Characidae). Neotrop Ichthyol **10**:329-340.
- Pendás AMP, Morán JP, Freije & García-Vázquez (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. Cytogenetics and Cell Genetics. **67**: 31–36.
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. PNAS **83**:2934-2938.
- Poss SG (1995) Scorpaenidae. In: Fischer W, Krupp F, Schneider W, Sommer C, Carpenter K, Niem V (eds), Pacifico centro-oriental. Vol. 3: Vertebrados-Parte 2. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. FAO, Rome, pp 1544-1564.
- Poss SG, Eschmeyer W (2002) Scorpaenidae. In: Carpenter KE (ed), The living marine resources of the Western Central Atlantic. Vol. 2: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to

- Grammatidae). FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologist and Herpetologist Special Publication No.5. FAO, Rome, pp 1232–1265.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol* **16**:351–358
- Roberts C, McClean C, Veron J, Hawkins J, Allen G, et al. (2002) Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science* **295**:1280–1284.
- Ryazanova IN, Polyakova NE (2012). Differentiation of large scaled redfin *Tribolodon hakonensis* (Pisces, Cyprinidae) in the Russian part of the range as inferred from the data of karyological analysis and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Russ J Genet* **48**:199–207.
- Santos U, Volcker C M, Belei FA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Paiva SR, Dergam JA (2009) Molecular and karyotypic phylogeography in the neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *J Fish Biol* **75**:2326–2343
- Smith WL, Wheeler WC (2004) Polyphyly of the mail-cheeked fishes (Teleostei: Scorpaeniformes): evidence from mitochondrial and nuclear sequence data. *Mol Phylogenet Evol* **32**:627–646.
- Sofradzija A (1984) First data on the chromosomes of the three Adriatic fish species (*Scorpaena porcus*, *S. ustulata* and *Corvina nigra*). *Ichthyologia* **16**:57–61.
- Sola L, Cataudella S (1978) I cromosomi di quattro specie di Scorpaenidae mediterranei (Pisces, Scorpaeniformes). *Rend. Acc. Naz. Lincei* **64**:393–396.
- Sumner A (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* **75**:304–306.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**:2731–2739.
- Thode G, Alvarez M, García E, Giles V (1985) Variations in C-banding patterns and DNA values in two scorpion-fishes (*Scorpaena porcus* y *S. notata*, Teleostei). *Genetica* **68**:69–74.
- Victor BC (2013) *Scorpaena wellingtoni* n. sp., a new scorpionfish from the Galapagos Islands (Scorpaeniformes: Scorpaenidae). *J Ocean Sci Found* **8**:30–43.
- Ward R, Zemlak B, Innes P, Last P, Hebert P (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**:1847–1857.
- Ward RD (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol Ecol Resour* **9**:1077–1085.
- Weigt LA, Baldwin CC, Driskell A., Smith DG, Ormos A, Reyier EA (2012) Using DNA barcoding to assess Caribbean reef fish biodiversity: expanding taxonomic and geographic coverage. *PLoS ONE* **7**:e41059.
- Yokoyama T, Ebitani N, Kubo T (1992) Karyotypes and banding patterns in eight species of the scorpionfish (Scorpaenidae). *Zool Sci* **9**:1210.

Figure Legends

Fig. 1. Conventional Giemsa-stained karyotype of a) *Scorpaena plumieri*, cytotype 1; b) *Scorpaena plumieri*, cytotype 2; c) *S. mystes*. In the insets the NOR-bearing chromosomes identified through sequential staining.

Fig. 2. Somatic metaphases of *Scorpaena plumieri* stained with the FISH technique: a) cytotype 1; b) cytotype 2. Arrows indicate the 18S genes location, arrowheads the 5S genes.

Fig. 3. Somatic C-banded metaphases of *Scorpaena plumieri*. a) cytotype 1; b) cytotype 2. Arrows indicate interstitial heterochromatic blocks (idiograms on the right), arrowheads terminal heterochromatic blocks (idiograms on the left).

Fig. 4. Neighbor-joining phylogenetic reconstruction based on COI sequences. Only bootstrap values > 70% are indicated

Fig. 5. Neighbor-joining phylogenetic reconstruction based on 16S sequences. Only bootstrap values > 70% are indicated

Fig. 6. Possible chromosome rearrangements involving the C-banded chromosome markers. a) pericentric inversion not involving the large heterochromatic block; b) paracentric inversion involving the interstitial heterochromatic block. C1: cytotype 1; C2: cytotype 2.

Fig. 1

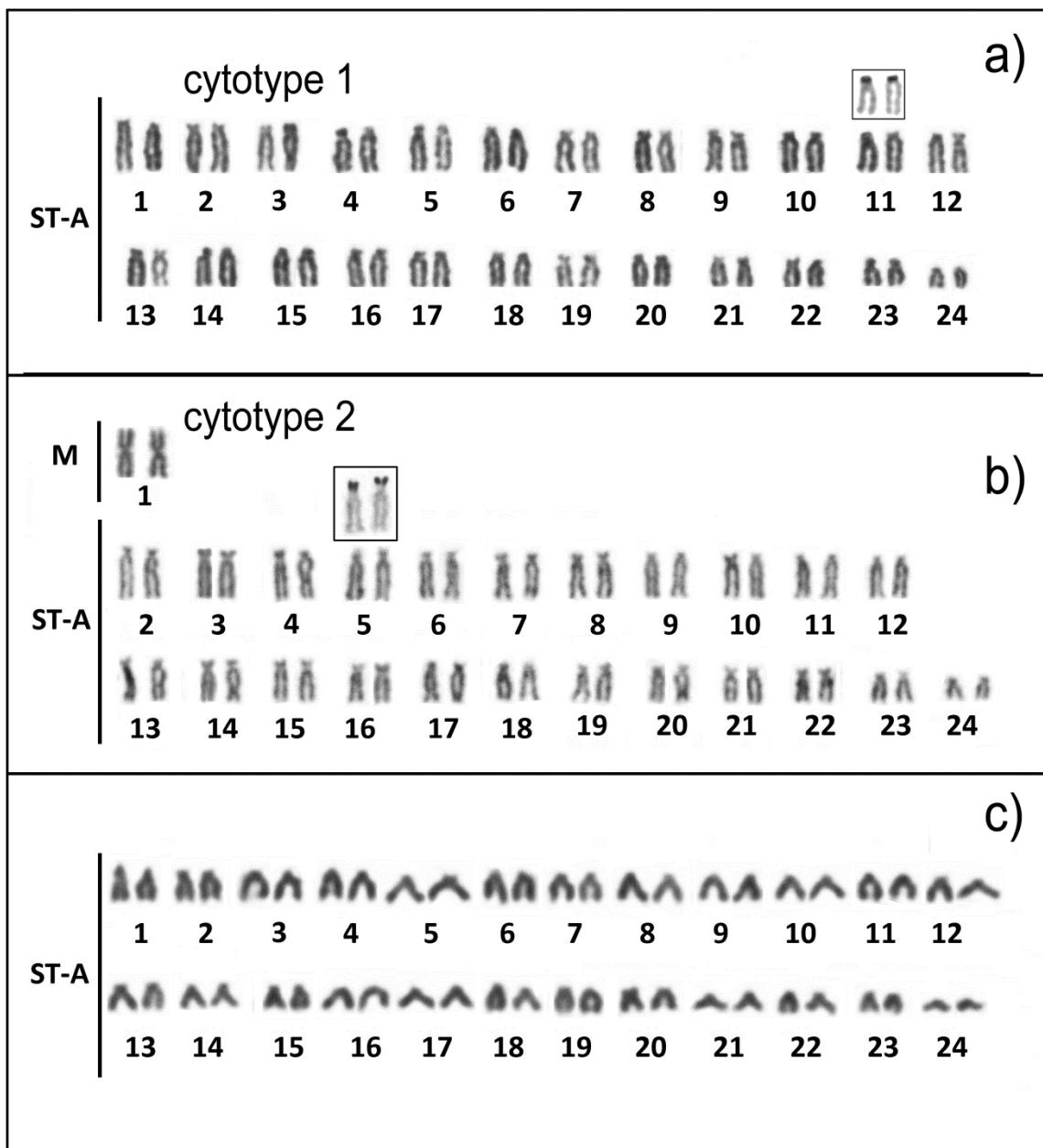


Fig.2

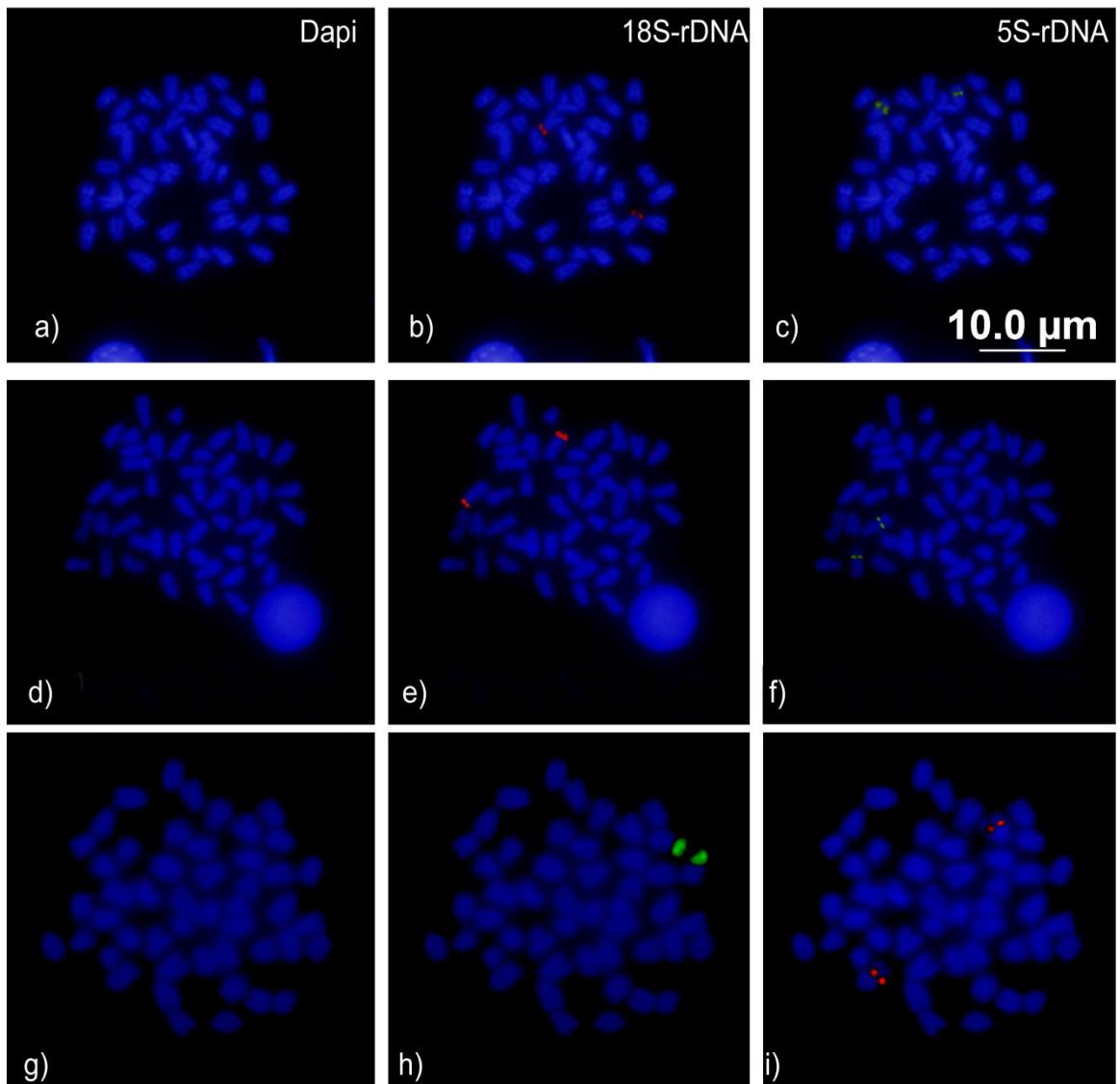


Fig.3

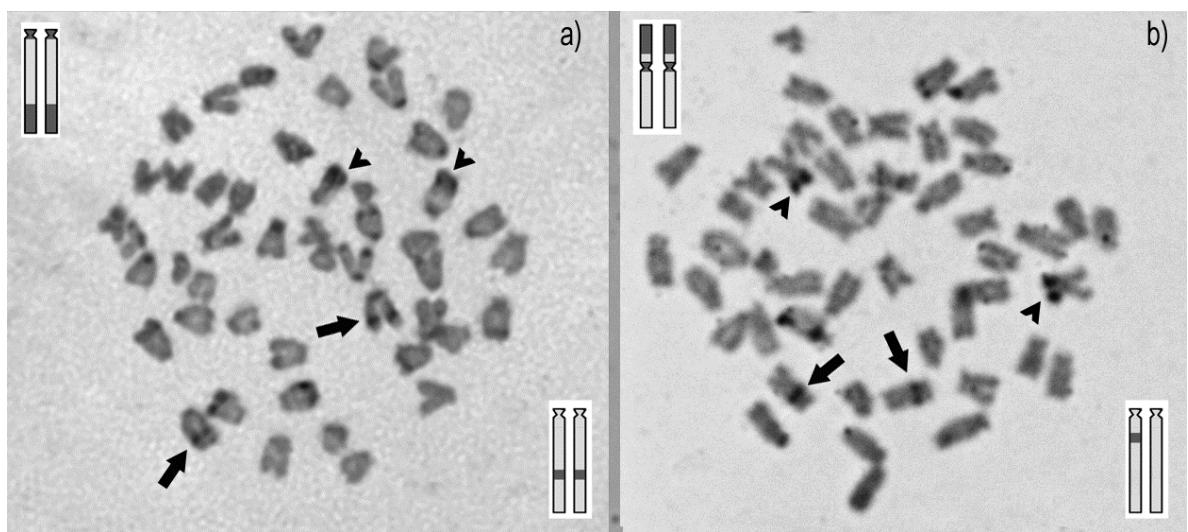
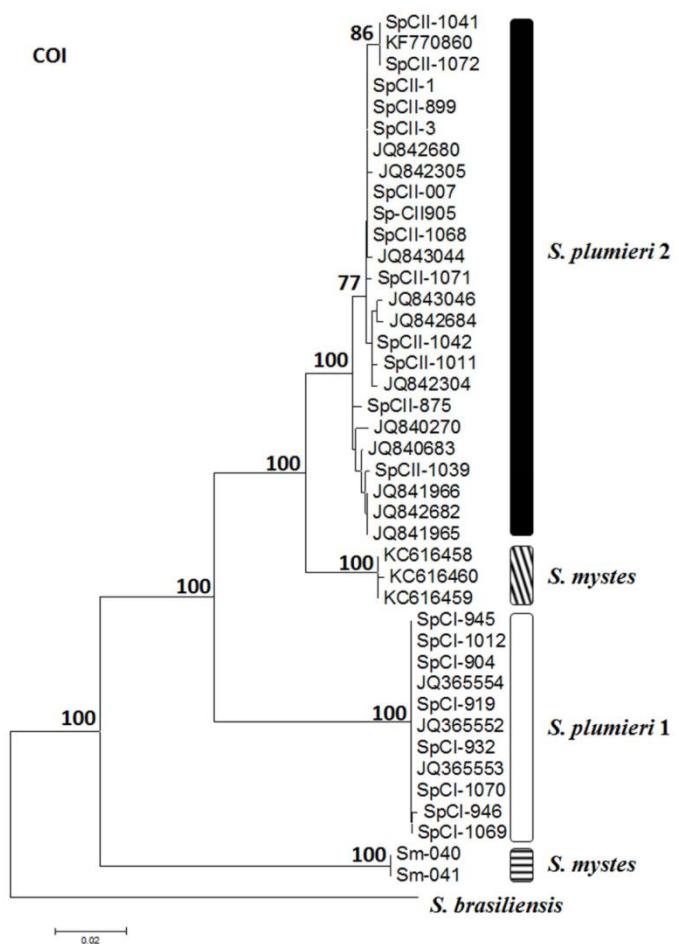


Fig. 4



100

Fig.5

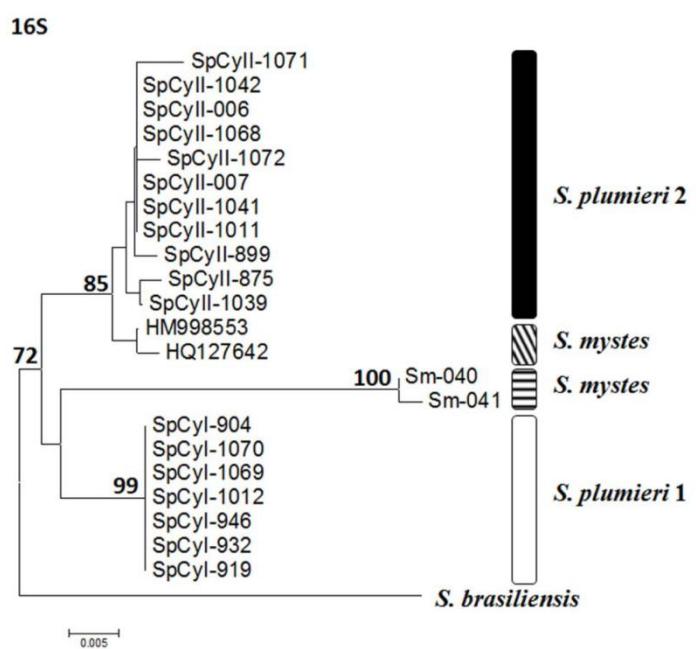


Fig 6

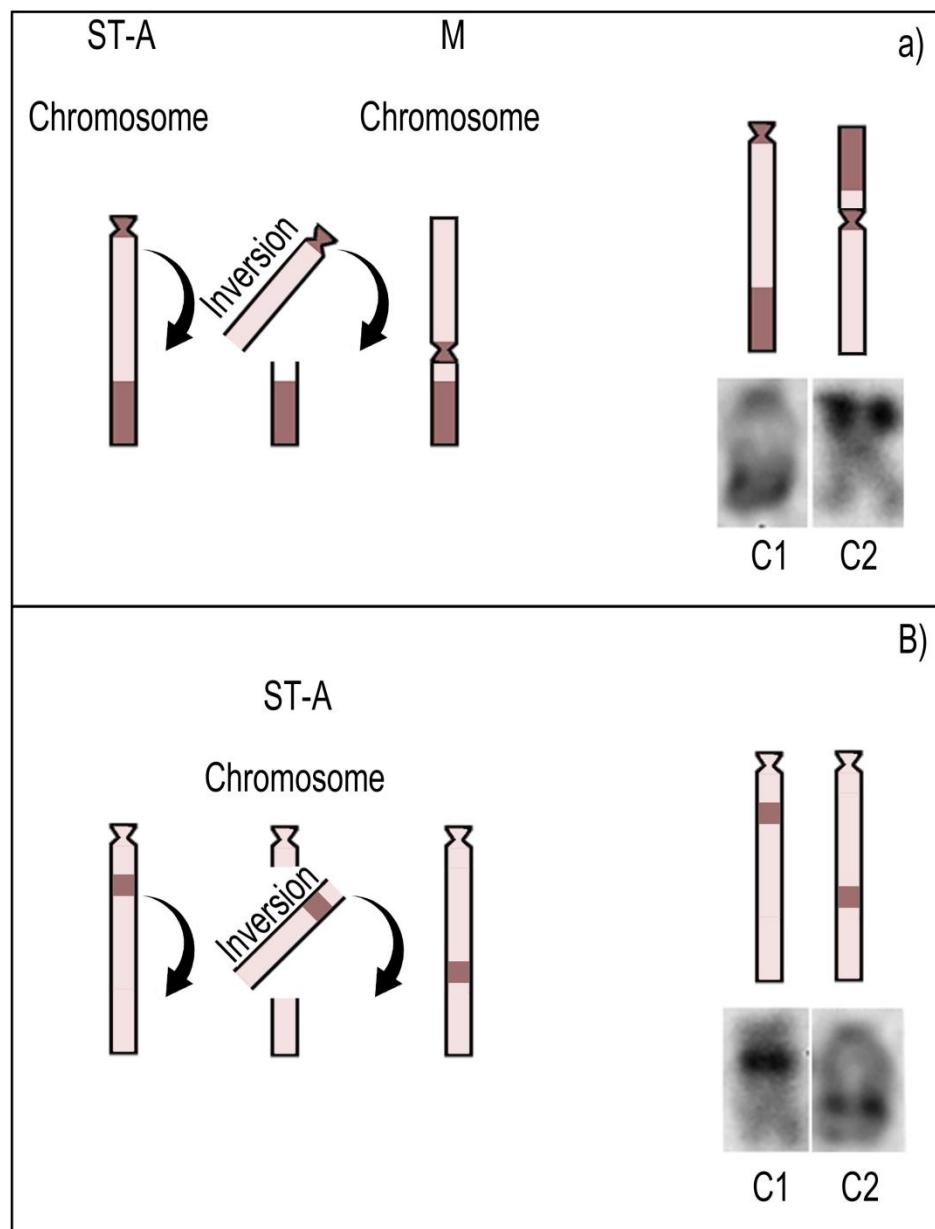


Table 1. Specimen code, haplotype number (Hp) for each mtDNA region and clade to which the haplotype belongs. Karyotype and *S. plumieri* cytotype. n.a.: not available.

Species	Specime n code	COI		16S		Karyotype	Cytotype
		Hp	clade	Hp	clade		
<i>S. plumieri</i>	904	1	1	2	1	n.a.	n.a.
	919	1	1	1	1	2n= 48 (48 st,a)	1
	932	1	1	2	1	2n= 48 (48 st,a)	1
	945	1	1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	946	2	1	2	1	2n= 48 (48 st,a)	1
	1012	1	1	2	1	2n= 48 (48 st,a)	1
	1069	1	1	2	1	2n= 48 (48 st,a)	1
	1070	1	1	2	1	2n= 48 (48 st,a)	1
	SP1	3	2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	SP2	3	2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	007	3	2	3	2	n.a.	n.a.
	006	n.a.	n.a.	4	2	n.a.	n.a.
	875	8	2	8	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	899	3	2	7	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	905	3	2	n.a.	n.a.	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	1011	6	2	4	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	1039	9	2	9	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	1041	4	2	4	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	1042	7	2	4	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	1068	3	2	4	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	1071	5	2	5	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
	1072	4	2	6	2	2n= 48 (2m+ 46 st,a)	2
<i>S. mystes</i>	40	10	-	10	-	2n= 48 (48 st,a)	-
	41	10	-	11	-	2n= 48 (48 st,a)	-

Table 2. Genetic variability. Sv: variable sites, Pi: parsimony-informative sites, N: number of sequences, N_H : number of haplotypes, Hd: haplotype diversity, π : nucleotide diversity. For *S. plumieri* data are shown for the total sample and for each haplogroup separately.

S. <i>plumieri</i>		Nucleotide composition (%)				S v	Pi	N	N_H	Hd	π
		A	T	C	G						
		Total									
	COI	24. 4	30. 6	26. 7	18. 4	64	5 8	2 1	9 0	0.824±0.06 0	0.04593±0.0049 9
	16S	28. 7	23. 6	25. 5	22. 1	17	1 0	1 8	9 6	0.837±0.06 6	0.00963±0.0009 6
	Haplotype 1										
	COI	23. 5	30. 6	26. 2	19. 6	1	-	8	2 0	0.250±0.18 0	0.00040±0.0002 9
	16S	28. 9	23. 7	25. 4	22. 1	1	-	7	2 6	0.286±0.19 4	0.00050±0.0003
	Haplotype 2										
	COI	24. 9	30. 5	27. 0	17. 6	12	5	1 3	7 9	0.795±0.10 1	0.00401±0.0040
	16S	28. 6	23. 6	25. 6	22. 2	8	1	1 1	7 9	0.818±0.11 1	0.00278±0.0007
S. <i>mystes</i>	COI	24. 6	30. 3	26. 4	18. 7	-	-	2	1	-	-
	16S	28. 1	24. 2	25. 4	22. 2	1	-	2	2	1.000±0.50 0	0.00174±0.0008 7

Table 3. Percentage of similarity between sequences obtained from *S. plumieri* and *S. mystes* specimens collected in this study and all the sequences available in GenBank for Scorpaena species present in the Western Atlantic (in grey) and Eastern Pacific (in white) areas. N: number of sequences, n.a.: not available.

	N	COI %			N	16S %		
		<i>S. plumieri</i>		<i>S. mystes</i>		<i>S. plumieri</i>		<i>S. mystes</i>
		Clade 1	Clade 2			Clade 1	Clade 2	
<i>S. agassizii</i>	2	79	80-81	81	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. albifimbria</i>	5	83	83	79	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. bergii</i>	4	82-83	81-82	81-82	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. brasiliensis</i>	2	81	82	81	2	95	95	94
<i>S. calcarata</i>	4	82	82	79-80	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. dispar</i>	3	80	82	81	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. elachys</i>	-	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. grandicornis</i>	6	81	82	80	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. guttata</i>	5	81	82-83	79-80	-	94	93	91-92
<i>S. histrio</i>	6	81-83	81-82	79-81	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. inermis</i>	29	81	81	78-79	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. isthmensis</i>	1	82	81	82	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. mystes</i>	3	91	96	86	2	98	99	96
<i>S. petricola</i>	-	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. plumieri</i>	18	81 (Belize) 100 (Brazil) 90-92 (others)	81 (Belize) 91 (Brazil) 99-100 (others)	81-87	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S. sonorae</i>	1	82	82	82	-	n.a.	n.a.	n.a.

Table 4. Summary of cytogenetic data available for the genus *Scorpaena*. Column NF1 shows fundamental arm number, when M and SM are counted as two-armed. Column NF2 contains fundamental arm number, when also ST are counted as two-armed. In the AgNOR column number of NOR bearing chromosome pair is reported in parenthesis

Species	2n	Karyotype	NF1	NF2	Ag-NORs	Locality	Reference
<i>S. brasiliensis</i>	46	2M+12SM+32ST/A	60		2 (pair 2, SM)	Brazil	Corrêa and Galetti Jr. 1997
<i>S. isthmensis</i>	40	6M+8SM+26ST/A	54		2 (pair 5, SM)	Brazil	Corrêa and Galetti Jr. 1997
<i>S. izensis</i>	48		56			Japan	Yokoyama et al. 1992
<i>S. miostoma</i>	48	6M+22ST+20A	54	76		Japan	Murofushi et al. 1987
<i>S. miostoma</i>	48			82		Japan	Yokoyama et al. 1992
<i>S. mystes</i>	48	48ST/A	48			Ecuador	Present study
<i>S. notata</i>	34	26ST+8A	34	60	2 (medium, ST)	Italy	Caputo et al. 1998
<i>S. notata</i>	34	18ST + 16A	34			Italy	Sola et al. 1978
<i>S. notata</i>	34	10M/SM+24ST/A	44			Croatia	Sofrodažija et al. 1984
<i>S. notata</i>	34	24ST+10A	34	58	2 (pair 13, ST)	Spain	Thode et al. 1985
<i>S. onaria</i>	48	6SM+32ST+10A	54	86		Japan	Murofushi et al. 1987
<i>S. onaria</i>	47	7SM+32ST+8A	54	86		Japan	Murofushi et al. 1987
<i>S. onaria</i>	48	6M+14SM+18ST+10A	68	86		Japan	Nishikawa et al. 1977
<i>S. onaria</i>	47	7M+14SM+18ST+8A	68	86		Japan	Nishikawa et al. 1977
<i>S. onaria</i>	48			56		Japan	Yokoyama et al. 1992
<i>S. plumieri</i> Cyt 1	48	48ST/A	48		2 (pair 11, ST)	Venezuela	Present study
<i>S. plumieri</i> Cyt 2	48	2M+46ST/A	50		2 (pair 5, ST)	Venezuela	Present study
<i>S. porcus</i>	42	4M+2SM+10ST+26A	48	58	2 (medium, ST)	Italy	Caputo et al. 1998
<i>S. porcus</i>	42	6M+10ST+26A	48	58		Italy	Cataudella et al. 1973
<i>S. porcus</i>	42	16M/SM+26A	58	58		Croatia	Sofrodažija et al. 1984
<i>S. porcus</i>	42	6M+10ST+26A	48		2 (pair 18, ST)	Spain	Thode et al. 1985
<i>S. porcus</i>	42		48	58		Spain	Cano et al. 1982
<i>S. porcus</i>	42	6M +10ST + 26A	48			Italy	Sola et al. 1978
<i>S. scrofa</i>	46	20ST +26A	46			Italy	Sola et al. 1978

Table S1. GenBank accession number, reference and sampling area of all the *S. plumieri* and *S.mystes* sequences used in phylogenetic reconstruction

Species/gene	Reference	Sampling area
<i>S. plumieri</i>		
COI		
JQ840270	Weigt et al. 2012	Belize
JQ840683	Weigt et al. 2012	Belize
JQ841965	Weigt et al. 2012	USA: Florida
JQ841966	Weigt et al. 2012	USA: Florida
JQ842680	Weigt et al. 2012	USA: Florida
JQ842304	Weigt et al. 2012	Netherlands Antilles
JQ842305	Weigt et al. 2012	Netherlands Antilles
JQ842682	Weigt et al. 2012	USA: Florida
JQ843044	Weigt et al. 2012	Trinidad and Tobago
JQ843046	Weigt et al. 2012	Trinidad and Tobago
JQ365552	de Oliveira Ribeiro et al. 2012	Brazil
JQ365553	de Oliveira Ribeiro et al. 2012	Brazil
JQ365554	de Oliveira Ribeiro et al. 2012	Brazil
KF770860	Baldwin and Johnson 2014	Netherlands Antilles
<i>S. mystes</i>		
COI		
KC616458	Victor 2013	Costa Rica
KC616459	Victor 2013	Costa Rica
KC616460	Victor 2013	Costa Rica
16S		
HQ127642	unpublished	USA: California
HM998553	unpublished	USA: California