

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CAMPUS DEL MAR

TESIS

**ESTUDIO CITOGENÉTICO EN EL
ROBALO CONSTANTINO
CENTROPOMUS ROBALITO (JORDAN
Y GILBERT, 1882) (PISCES:
CENTROPOMIDAE)**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA
MARINA Y MANEJO
INTEGRAL DE CUENCAS**

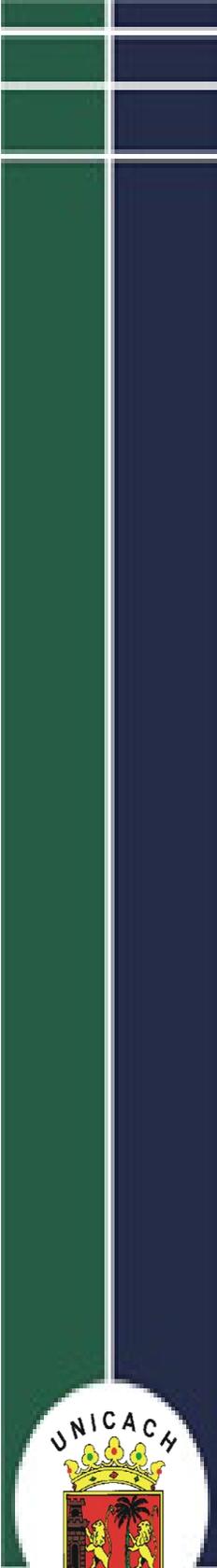
PRESENTA:

ABISAIT SANDOVAL VILLALOBOS

CIUDAD DE TONALÁ, CHIAPAS MÉXICO

SEPTIEMBRE DE 2014





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CAMPUS DEL MAR

TESIS

**ESTUDIO CITOGENÉTICO EN EL
ROBALO CONSTANTINO
CENTROPOMUS ROBALITO (JORDAN
Y GILBERT, 1882) (PISCES:
CENTROPOMIDAE)**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA
MARINA Y MANEJO
INTEGRAL DE CUENCAS**

PRESENTA:

ABISAIT SANDOVAL VILLALOBOS

DIRECTOR:

MC. ARKADY USCANGA MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR:

DR. LENIN ARIAS RODRÍGUEZ

ASESORES:

MC. NATALIA PERALES GARCÍA

DR. ALEJANDRO NETTEL HERNANZ



DEDICATORIA

Dedicado a esas dos maravillosas personas que me han dado el mayor de las herencias que un padre puede brindar a un hijo, una educación, apoyaron y dieron parte de su vida para que yo pudiera salir adelante a mi señora madre: **Lourdes Villalobos Guerra** y a ese grandioso hombre que tengo como padre: **Saúl Jarauta Villalobos**, como una humilde muestra de todo lo que ellos me han dado.

A mis tres maravillosos hermanos: **Guillermina, Edith y Eriván**, que a diario me ha dado cariño, amor y me han apoyado de diferentes formas para seguir adelante.

A mi hermosa novia, amiga de aventuras y locuras ósea mi todo: **Cristina Celaya Castillo**, por su amor, cariño y apoyo que me impulsa para continuar día con día.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	6
2.1 Estudios de biología y taxonomía de la especie.....	6
2.2 Estudios de citogenética.....	8
2.3 Citogenética aplicada a la acuicultura	10
2.4 Estudios del robalo.....	11
3. Justificación.....	13
4. Objetivos.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos particulares.....	14
5. Materiales y métodos.....	15
5.1 Recolecta de especímenes e identificación taxonómica.....	15
5.2 Procedimiento citológico y elaboración de preparaciones cromosómicas	16
5.3 Análisis microscópico y elaboración del cariotipo.....	21
5.4 Análisis de dato.....	22
6. Resultados.....	23
7. Discusión.....	30
8. Conclusión.....	33
9. Literatura citada.....	44
10. Anexos.....	41

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores las personas encargadas de la revisión de este documento al MC. Arkady Uscanga Martínez, MC. Natalia Perales García, Doctor Alejandro Nettel Hernanz, Doctor Juan Pedro Arias Arechiga profesores del Instituto de Ciencias Biológicas, Campus del Mar y al Doctor Ernesto Velásquez Velásquez profesor del Instituto de Ciencias Biológicas en la Lic. en Biología por los consejos y recomendaciones para la elaboración de este documento.

Un profundo agradecimiento especial y sincero a Doctor Lenin Arias Rodríguez profesor-investigador de tiempo completo del área de acuicultura tropical en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el tiempo dedicado para el proceso experimental, por todos los materiales, equipos proporcionados y el conocimiento transmitidos ya que si su apoyo no fuera posible la elaboración de esta tesis.

Agradezco a las instituciones involucradas en la fase experimental de esta tesis, ya que sin ellas esta no se habrá elaborado al Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Instituto de Ciencias Biológicas, Campus del Mar Tonalá, de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas y el Laboratorio de Acuicultura Tropical, en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Agradezco especialmente a la MC. Natalia Perales García, por la invitación, que me realizo para asistir a esa estancia académica en la ciudad de Villahermosa, ya que dicha invitación sirvió para comenzar con la elaboración de esta tesis.

Se le agradece a la familia Rodríguez Valencia, a la señora Blanca y Elías así como a su hijo el biólogo William, por el alojamiento prestados durante las estancias en la ciudad de Villahermosa Tabasco, durante las estancias de investigación.

Agradezco a mis dos compañeras de viaje y estancia María del Pilar y Celeste Isabel quienes me ayudaron a que las estancias y aprendizaje de las técnicas para el desarrollo de esta tesis hayan sido más amenas, ya que su amistad y compañía fue muy valiosa.

Un agradecimiento súper especial a esa bella dama que conocí una tarde y cuando la vi me enamore de ella, sinceramente cuando la conocí nunca pensé que sería tan importante en mi vida, gracias por estar a mi lado y ser parte de mi vida mi hermosa girasol mi Cris hermosa.

Mis más sinceros agradecimientos a esas personas que durante la carrera fueron mis amigos Karla, Jesús Alonso, Francisco Emmanuel, Diana por los grandes abrazos, que con su valiosa amistad me apoyaban todos los días.

Agradezco a todas las personas involucradas en las capturas de los peces para esta tesis, a ellos que todas esas noches se desvelaron para capturar los peces a: el señor Rubén Espinosa, al maestro Arkady Uscanga, a los biólogos William Rodríguez y Mario Alberto Gomes, al jóvenes Adrián y Sergio Alfredo Ríos Toledo, gracias por apoyarme en la captura de los peces.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de robalo en México tiene por único origen la pesca ribereña, a pesar de ser el sexto tipo de pescado más consumido en nuestro país, el robalo se ubica en la posición 19 en relación a la producción de especies marinas (CONAPESCA, 2009).

El cultivo de robalo se encuentra en fase experimental en el país, esto se debe principalmente a que existen pocos estudios relacionados con la biología de los robalos o Centropomidae (Zarza-Meza *et al.*, 2006), las estadísticas más recientes indican que la producción es insuficiente para la gran demanda del mercado nacional y que ésta presenta una clara disminución a lo largo del tiempo. Además a que la pesca del róbalo es estacional, misma que se ve afectada por las variaciones en la distribución y abundancia de los róbalos (Vidal *et al.*, 2012).

El cultivo de organismos acuáticos en la actualidad, es una de las actividades de mayor relevancia en el mundo; ya que es una alternativa para la producción de alimento de alto valor nutricional y comercial, existe una necesidad de mejorar las técnicas de producción acuícola para disminuir la presión por pesca sobre las poblaciones silvestres y aumentar las sustentabilidad (Woods, 2010).

Por ello también, se ha visto que el cultivo de organismos acuáticos aunado a estudios de tipo genético ha permitido mejoras en la producción acuícola. Para

lograr lo anterior, los estudios de genética básica son importantes para sentar las bases de la biología básica de la especie en estudio. Bajo el contexto anterior, y a través del análisis citogenético, es posible describir el número cromosómico de un organismo, lo que permite el establecimiento la identidad cromosómica (Li *et al.*, 2002) lo cual representa el primer paso para los estudios de mapeo cromosómico o cariotipo, estos también pueden ser utilizados en análisis taxonómicos, dado que diferentes taxones poseen un cariotipo distintivo, en términos de número y morfología cromosómica. Así mismo, mediante el análisis citogenético es posible reconocer y caracterizar los progenitores de un híbrido, además de que es posible identificar un organismo poliploide (Gersen y Keagle, 1999).

El estudio del número cromosómico, la estructura, función y comportamiento con relación a la herencia genética, es una parte integral en la citogenética, (Levan *et al.*, 1964, arias *et al.*, 2008). Dado que las características centrales de la estructura y función de los cromosomas están definidas a nivel del ADN, en el análisis citogenético se puede integrar información sobre la estructura molecular, permitiendo conocer como los genes están organizados dentro de los cromosomas, definiendo así su funcionalidad (Allen *et al.*, 1999).

El estudio de los cromosomas para mapeo genómico en peces, han permitido la identificación de regiones específicas de ADN; mediante técnicas de tinción e hibridación especiales a través de la observación microscópica para la localización de ciertas regiones en los cromosomas detectando así posibles cambios en la

estructura genómica por efecto de las afectaciones antropogénicas (Schwarzacher y Heslop, 2000).

Los estudios citogenéticos básicos, permiten identificar posibles características genéticas comunes entre las especies y las poblaciones (Burbano, 1995), aportando datos que permitan determinar un posible origen evolutivo común; además genera información de cómo está compuesto el material genético en las células, así como la estructura de los cromosomas y sus respectivas variaciones (Langer *et al.*, 2004).

Así mismo, permite clasificar dichos cromosomas dependiendo la posición del centrómero en metacéntricos cuando el centrómero se ubica exactamente a la mitad del cromosoma lo que permite establecer los pares homólogos, en metacéntricos, submetacéntricos, subteloecéntrico, telocéntrico, todo esto dependiendo de la posición del centrómero y del tamaño del cromosoma, lo cual es vital para determinar el tipo de cromosoma que presenta la especie, ya sea monorrámeos o birrámeos (Levan *et al.*, 1964).

Conjuntamente con la aplicación de técnicas moleculares en citogenética, se ha despertado un gran interés la integración de procedimientos de análisis de imágenes (Netten, 1997). Esto ha permitido obtener mayor información en imágenes fluorescentes adquiridas tanto desde microscopía confocal, como de microscopía convencional por epifluorescencia (Schwarzacher & Heslop, 2000).

En referencia a análisis de imágenes cromosómicas, actualmente están disponible numerosos programas de cómputo. Sin embargo, muchos de ellos están diseñados específicamente para preparaciones humanas, otros vertebrados y plantas, dichos programas se han desarrollado con diversas aplicaciones citogenéticas desde búsqueda de placas metafásicas sobre una preparación, generación automática de cariotipos, medición cuantitativa de señales de fluorescencia y posición, patrones de condensación cromosómica, alineamiento cromosómico, entre otras. (Houtsmuller *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2002; Weierich *et al.*, 2003; Langer *et al.*, 2004).

Entre las técnicas de bandas más utilizadas se encuentran las Bandas “Q y G”, las cuales forman bandas a lo largo de todo el cromosoma, los cromosomas homólogos de cada especie se tiñen de la misma forma en cada individuo, lo que ha permitido estudiar posibles arreglos que se evidencian por cambios en las posiciones de las bandas. Las bandas “Q y G” son esencialmente las mismas, diferenciándose solo por el colorante utilizado; en el primer caso (bandas “Q”) se utiliza Quinacrina, mientras que para las bandas “G” se utiliza colorante de Giemsa (Egozcue, 1971).

En un principio, se pensó que estas bandas claras y oscuras, se producían por acción del colorante Giemsa de allí la denominación de bandas “G”; Actualmente sabemos que las bandas “G” (las regiones oscuras), representan los segmentos cromosómicos que se condensan más temprano en la profase; en cambio las regiones claras o segmentos negativos para bandas “G” se condensan más

tardíamente en profase lo que permite aplicar otras técnicas importantes como las bandas “RON´s”, las cuales tiñen las Regiones Organizadoras del Nucleolo, y las Bandas “C”, las cuales tiñen específicamente los centrómeros (Verma, 1995).

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad, estudiar los cromosomas del *C. robalito*, a fin de establecer el número modal diploide, el número fundamental (N.F) de brazos. Así como el tamaño de los cromosomas, en mitosis y meiosis culminando con la elaboración del cariotipo con el propósito de incrementar con información básica sobre la biología de la especie y a partir de especímenes de la región pacífico de México en el estado de Chiapas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios de biología y taxonomía de la especie

Los róbalo del género *Centropomus* son peces generalmente de tamaño medio, de coloración plateada y de forma parecida a las percas, con frecuencia con una línea lateral oscura, poseen dos aletas dorsales separadas (la primera con ocho espinas), tres espinas anales, aleta caudal bifurcada, boca grande y protráctil, y el margen del preopérculo aserrado lo que los hace distinguibles (ARAP, 2011). También, son organismos con características de peces hermafrodita protándrico puesto que se presume que nacen siendo machos y posteriormente tienden a cambiar de sexo según las condiciones del ambiente y la proliferación y abundancia de organismos de un solo sexo (Vidal *et al.*, 2012 y Peters *et al.*, 1998).

En el Océano Pacífico, se han registrado seis especies de robalo (*C. nigrescens*, *C. viridis*, *C. armatus*, *C. robalito*, *C. medius*, y *C. unionensis*) de róbalo. Entre ellas, el robalo *C. robalito* es una de las especies marinas de mayor importancia en las pesquerías artesanales de la costa del Pacífico, ya que es el sustento de varias comunidades pesqueras (Vidal *et al.*, 2012).

Las características anatómicas del robalo *C. robalito* (Figura 1) son: color gris claro, dorso gris azulado, vientre blanco-plateado, una barra oscura en la base de la pectoral; aletas pélvicas y anales de color amarillo, aletas pectorales más largas

que las pélvicas, segunda espina anal conspicua, alcanza o rebasa la base caudal, frente ligeramente cóncava, todas las espinas dorsales y anales largas en proporción al tamaño del pez, 10 radios blandos dorsales, raramente 9 u 11.

Radios blandos anales 6, raramente 7, de 14-16 elementos pectorales, modalmente 15, escamas sobre la línea lateral 45-50, modalmente 48, escamas desde los orígenes de las aletas dorsal segunda y anal hacia la línea lateral 7-8 (moda 7) y 9-12 (modalmente 10), respectivamente, 18-22 escamas alrededor del pedúnculo caudal, modalmente 20. 2-3 dentículos largos en el ángulo del preopérculo, branquiespinas en el limbo inferior incluyendo rudimentos, 17-21 (moda 18), mientras que en el limbo superior presenta de 8-12 (moda 10) incluyendo rudimentos (Van der Heiden *et al.*, 1998).



Figura. 1. Espécimen adulto del pez marino robalo constantino *Centropomus robalito* (Jordan y Gilbert, 1882) Tonalá Chiapas

La ubicación taxonómica del robalo Constantino se describe detalladamente en la Tabla 1, desde reino y hasta nombre común.

Tabla 1. Ubicación taxonómica (FAO, 1995)

Reino:	Animalia
Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Clase:	Osteichthyes
Subclase:	Actinopterygii
Orden:	Perciformes
Suborden:	Percoidei
Familia:	Centropomidae
Género:	<i>Centropomus</i>
Especie:	<i>Centropomus robalito</i>
Nombre común:	Robalo constantino.

2.2. Estudios de Citogenética

La citogenética en organismos acuáticos sobre todo en peces ha sido ampliamente estudiado se ha realizado estudios en cíclidos (Arias-Rodríguez *et al.*, 2006, 2008,) diversos organismos marinos (Nirchio *et al.*, 2001, Vega *et al.*, 2002, Molina *et al.*, 2004) con relación a los estudios citogenéticos en organismos del orden de los perciformes se encuentran (Franco & Freitas 2006, Nirchio *et al.*, 2007, Mirian, *et al.*, 2007, Shu, *et al.*, 2007, Accioly & Molina, 2008, Xueliang *et al.*, 2009, Palma-Rojas *et al.*, 2012 y Calado *et al.*, 2013) y en cuanto a *Centropomus* (Netto *et al.*, 1999, Netto *et al.*, 2004 y Arias *et al.*, 2011)

La mayoría de los estudios de citogenética se han realizado en organismos acuáticos y estos se han centrado principalmente en peces y en moluscos. Diversos estudios citogenéticos en peces han sido llevados a cabo principalmente en salmónidos, ciprínidos y cíclidos (Mandrioli *et al.*, 2000; Inafuku *et al.*, 2002; Foresti *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004). Dentro de estos estudios, un especial interés ha despertado el estudio de la distribución genómica de regiones de ADN altamente repetitivas, ADN satélite, regiones teloméricas, ADN_r, y elementos nucleótidos intercalados (Martins *et al.*, 2004, Arias-Rodriguez *et al.*, 2007, 2008).

Recientemente, los estudios citogenéticos relacionados con los mecanismos de determinación sexual en peces han generado un especial interés debido a la posibilidad de producir líneas monosexuales en el cultivo de algunas especies, por la observación de mayor crecimiento en los machos de ciertas especies, como los cíclidos (Devlin y Nagahama, 2002, Plath, *et al.*, 2010). En cuanto a el monosexo o modificación del sexo del robalo, se ha trabajado solo con el robalo blanco *C. paralellus*, con el interés despertado por el cultivo de esta especie a fin de poder reproducirlo en cautiverio, utilizando en ocasiones hormonas para inducir la madurez gonadal y reversión sexual (Caballero-Chávez, 2011, Vidal-López *et al.*, 2012).

En cuanto a modificaciones de triploidia o poliploidia con el fin de generar organismos más aptos para el cultivo ya que tienen una serie de ventajas como es la esterilidad así como la posibilidad de que puedan tener un mayor crecimiento en relación con los organismos diploides (Arias-Rodriguez & Páramo-Delgadillo,

2000). Sin embargo, en peces es posible encontrar un amplio espectro de mecanismos genéticos de determinación sexual, con lo cual los estudios de mapeo cromosómico permanecen aún inconclusos (Nanda *et al.*, 2003).

Diversos estudios han revelado que la mayoría de los integrantes del orden de los perciformes presentan un cariotipo de tipo primitivo (poseen tan solo 48 cromosomas, los cromosomas que los integran son del tipo monorrámeo telocéntrico) y que son integrados por muy pocos cromosomas ya que solo cuentan con $2n = 48$ con un número fundamental de 48–56 y conformado por 24 pares de cromosomas (Galetti Jr. *et al.*, 2006, Froese & Pauly, 2007, Accioly & Molina 2008, Nirchio *et al.*, 2008, Calado *et al.* 2013)

2.3. Citogenética aplicada a la acuicultura

Dentro del terreno de estudios genéticos destinados a la acuicultura, han despertado gran atención aquellos relacionados con la manipulación cromosómica. Probablemente una de las aplicaciones citogenéticas en acuicultura que ha sido reportada más ampliamente es la referida a manipulaciones de ploidías o cromosómicas (Greg, 2001; Beaumont y Hoare, 2003, Sewalem *et al.*, 2002); en este sentido, los organismos triploides y tetraploides han sido utilizados principalmente en el cultivo de tilapias (Byamungu *et al.*, 2001), ciprínidos (Basavaraju *et al.*, 2002) y salmónidos (Johnson *et al.*, 2004).

En referencia a moluscos, Stanley *et al.*, (1981), fueron los primeros en reportar la producción de triploides en la ostra *Crassostrea virginica* mediante la incubación de los embriones en citocalasina “B”. El interés principal en desarrollar biotecnologías de ploidía, se centra en que los organismos inducidos presentan esterilidad parcial o total, lo que propicia que la energía que sería utilizada para reproducción, sea utilizada en crecimiento somático y obtención de organismos con mayor peso (Nell, 2002).

2.4 Estudios del robalo

En México, se han realizado diferentes estudios en manglares y estuarios en donde se reporta la presencia de género de los *Centropomus* lo que ha proporcionado información con respecto a su distribución y forma de vida (Caballero, 2007, Vidal *et al.*, 2012, Dios 2009), se ha hecho estudios acerca de su reproducción en cautiverio y posibles intentos para el cultivo artificial del robalo (Alvarez-Lajonchère & Tsuzuki, 2008, Cerqueira & Tsuzuki 2008, Wittenrich *et al.*, 2009) que lo reporta con asociación de la liza múgil curema.

Se ha trabajado en genética en cuestiones de cuantos genes poseen los organismos, clasificación genética de los robalos en Baja California (Prodocimo *et al.*, 2008, Sandoval-Castellanos *et al.*, 2005, Seyoum *et al.*, 2005), en relación a la citogenética Viestel *et al.*, (1996) reportaron para el *C. undecimalis* un cariotipo conformado por 48 cromosomas y 48 brazos fundamentales al igual que Arias-Rodriguez *et al.*, (2011), han trabajado en *C. undecimalis* provenientes de

Tabasco, en la fase mitótica se reportó $2n=48$ cromosomas y en la fase meiótica $1n=24$ cromosomas. Así mismo, describió un cariotipo conformado por 48 cromosomas monorrámeos de tipo telocéntrico (T).

Mientras que Netto *et al.* (1999), en un estudio citogenético en *C. mexicanus* y *C. undecimalis* encontró que ambas especies tienen $2n=48$ cromosomas. Por otro lado, Netto *et al.* (2004), describió que el robalo *C. parallelus* conserva $2n=48$ cromosomas mitóticos.

3. JUSTIFICACIÓN

La diversidad de especies de peces marinos y dulceacuícolas en México, es amplia. Desafortunadamente, en muchas de ellas se conocen muy pocos aspectos de su biología básica, siendo ellos una limitante para el buen manejo y aprovechamiento de las especies. En el caso particular de este trabajo de tesis que conlleva al estudio de los cromosomas y la elaboración del cariotipo es de gran importancia, ya que es la base para la observación de similitudes o diferencias cromosómicas que existen entre diferentes especies de una misma familia; lo que permite sentar las bases genético reproductivas para por ejemplo crear un híbrido de dos especies diferentes pero con similar número y forma cromosómica (Arias-Rodríguez, 2007). Además sienta las bases para la creación de organismos poliploides una vez que se describe el cariotipo de una especie, mediante la manipulación de los cromosomas y de la creación de líneas puras a través de métodos de androgénesis y ginogénesis (Arias-Rodríguez & Parámo-Delgadillo, 2000, Zhou, *et al.*, 2010).

El presente trabajo está enfocado al área de citogenética y permitirá obtener el cariotipo del robalo *C. robalito*, así mismo establecerá el número modal diploide, por lo tanto servirá de base para investigaciones de hibridaciones entre *Centropomus*, o en el caso de que se pretenda manipular los cromosomas para realizar mejoras de esta especie.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo General*

Establecer el cariotipo en mitosis y meiosis del robalo Constantino *C. robalito*.

4.2. *Objetivos Particulares*

4.2.1. Determinar el número modal diploide de la especie *C. robalito*.

4.2.2. Establecer la fórmula cromosómica de los cariotipos en mitosis y meiosis.

4.2.3. Determinar el número fundamental (N.F) o número total de brazos de los cromosomas de la especie.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Recolecta de especímenes e identificación taxonómica

Se capturaron un total de 15 organismos, diez hembras (18.7 ± 4.90 cm) y cinco machos (13.1 ± 3.00 cm) de longitud. La captura de los organismos se realizó en la comunidad Lázaro Cárdenas (La Barra) municipio de Tonalá Chiapas, utilizando una atarraya con un luz de malla 1.5" pulgadas. Posteriormente, los organismos fueron transportados en bolsas de plástico transparente (a fin de evitar el estrés) al Laboratorio de Sanidad y Nutrición Acuícola, Campus del Mar UNICACH, en donde se depositaron en estanque circulares con capacidad 1000 l (Figura. 2), provistos con un sistema de recirculación continua de agua y aireación constante, para su posterior empleo en el estudio. La identificación taxonómica de los ejemplares se basó en los caracteres merísticos y morfométricos señalados por Miller *et al.* (2005).



Figura 2. Sistema de recirculación empleado para el mantenimiento de los especímenes del robalo Constantino, utilizado en el campus del mar en Tonalá Chiapas.

5.2 Procedimiento citológico y elaboración de preparaciones cromosómicas

Los especímenes adultos del robalo Constantino, fueron procesados conforme a las recomendaciones de Arias-Rodríguez *et al.* (2011), con ligeras modificaciones y a como se describe a continuación:

Los ejemplares fueron anestesiados con MS222 (metasulfanato de tricaina) al 10% para determinar las medidas de la longitud total, longitud patrón (Figura 3) y el peso. Posteriormente los especímenes, fueron inyectados con una solución de cloruro de calcio (CaCl_2 0.2%) según su longitud (Tabla 2) sobre la región dorsal y a las 12 horas se aplicó una dosis similar (antes de cada tratamiento se anestesiaron los peces con el fin de reducir el estrés.

Una hora posterior al tratamiento anterior, se inyectó la solución acuosa de colchicina en proporción de 30 $\mu\text{g/g}$ de peso del ejemplar, disuelta en citrato de sodio al 0.1 % (con ayuda de agujas para insulina), la cual se inyectó sobre la aleta dorsal y en la región intraperitoneal (50 % / 50 %).



Figura 3: Toma de biometrías de los peces después de estar anestesiado.

Tabla 2. Proporción de CaCl_2 aplicada a los organismos (Subrahmanyam, 1969).

Longitud del pez en cm	Volumen a inyectar
5 a 10	0.5 cc
10 a 15	0.75 cc
15 a 20	1.0 cc

Cinco horas después, fueron sacrificados los peces y se retiraron los tejidos de interés: branquias, riñón, bazo y gónadas fueron removidos cada uno de los órganos fueron tratados con mucho cuidado para evitar la muerte de las células y fueron depositados en cajas petri individuales (Figura 4), donde se les agrego 2 ml de citrato de sodio al 2.0% durante una hora y a 37.0 ± 1.0 °C.

Posteriormente, los tejidos fueron disgregados y las células se depositaron en tubos de 1.5 ml lugar donde se les agrego el fijador 4:1 (metanol frio: ácido acético). Dicho tratamiento de prefijado se mantuvo por 96 hrs a 4°C; posteriormente, los tejidos, fueron fijados reemplazando el prefijador por el fijador 4:1, mediante el centrifugado a 1200 R.P.M durante 15 min a 4°C (Figura 5); dicha operación fue repetida hasta que los tejidos tomaron coloración blanquecina.



Figura 4. Hidratado de los tejidos.



Figura 5. Centrifugado de las muestras de tejidos para realizar el recambio del fijador.

La solución celular (a 4 °C) derivada de cada tejido, fue goteada desde de 1.70 m, con ayuda de pipetas pasteur sobre series de cuatro portaobjetos de vidrio, que previamente fueron colocados en etanol absoluto a 4°C. Subsiguientemente las preparaciones cromosómicas, fueron secadas con la flama de un mechero de alcohol y teñidas conforme a las recomendaciones de Denton (1973) y Kligerman & Bloom (1977) con giemsa al 10%, por 10 min en una caja coplin a $34.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ (Figura 6); al termino del tiempo señalado, las laminillas fueron extraídas de la caja, lavadas al chorro de agua corriente para eliminar los exceso del colorante y luego fueron secadas al aire.

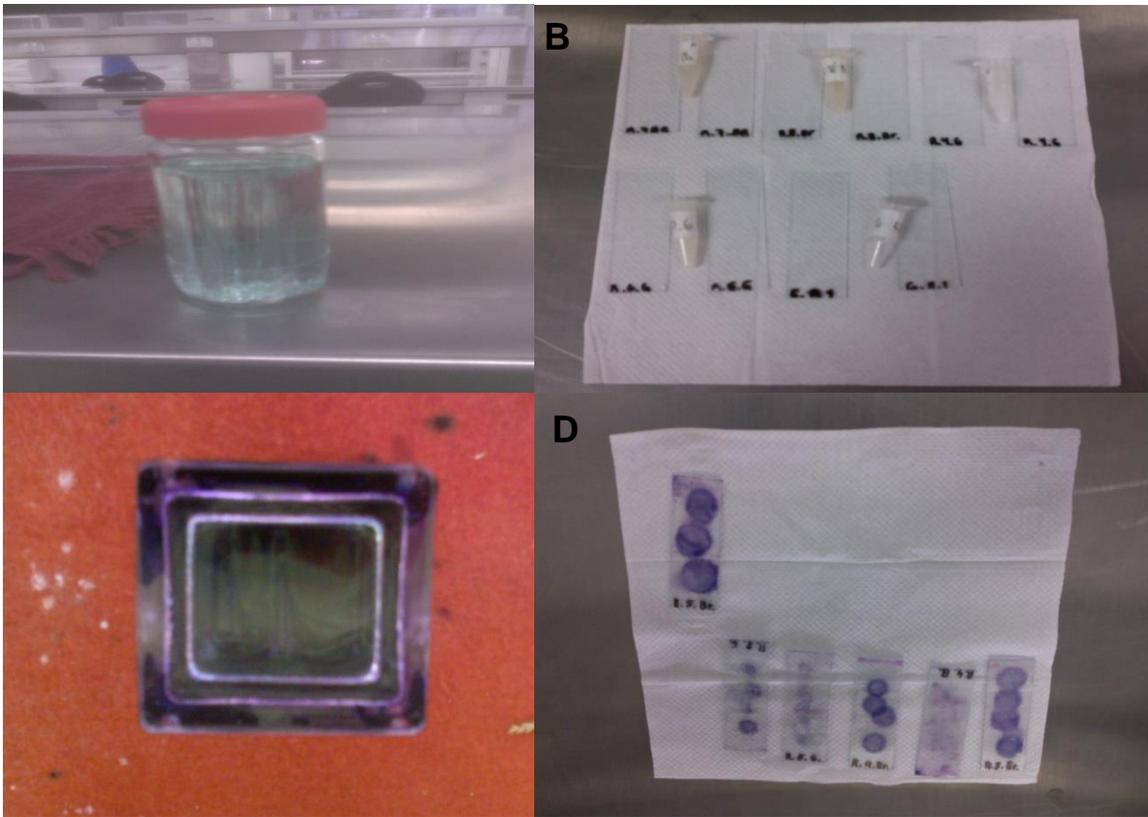


Figura 6: **A:** laminillas en metanol absoluto, **B:** laminillas goteadas, **C:** caja coplin con giemsa y laminillas en el interior tiñéndose y **D** laminillas teñidas secándose.

El sexo, se determinó después del sacrificio de los especímenes, una porción de la gónada se utilizó por la técnica de aplastado (squash) (Figura 7) y tinción con giemsa solución madre para su observación bajo el microscopio óptico con los objetivos 10X y 40X (Arias-Rodríguez *et al.*, 2008, 2009).

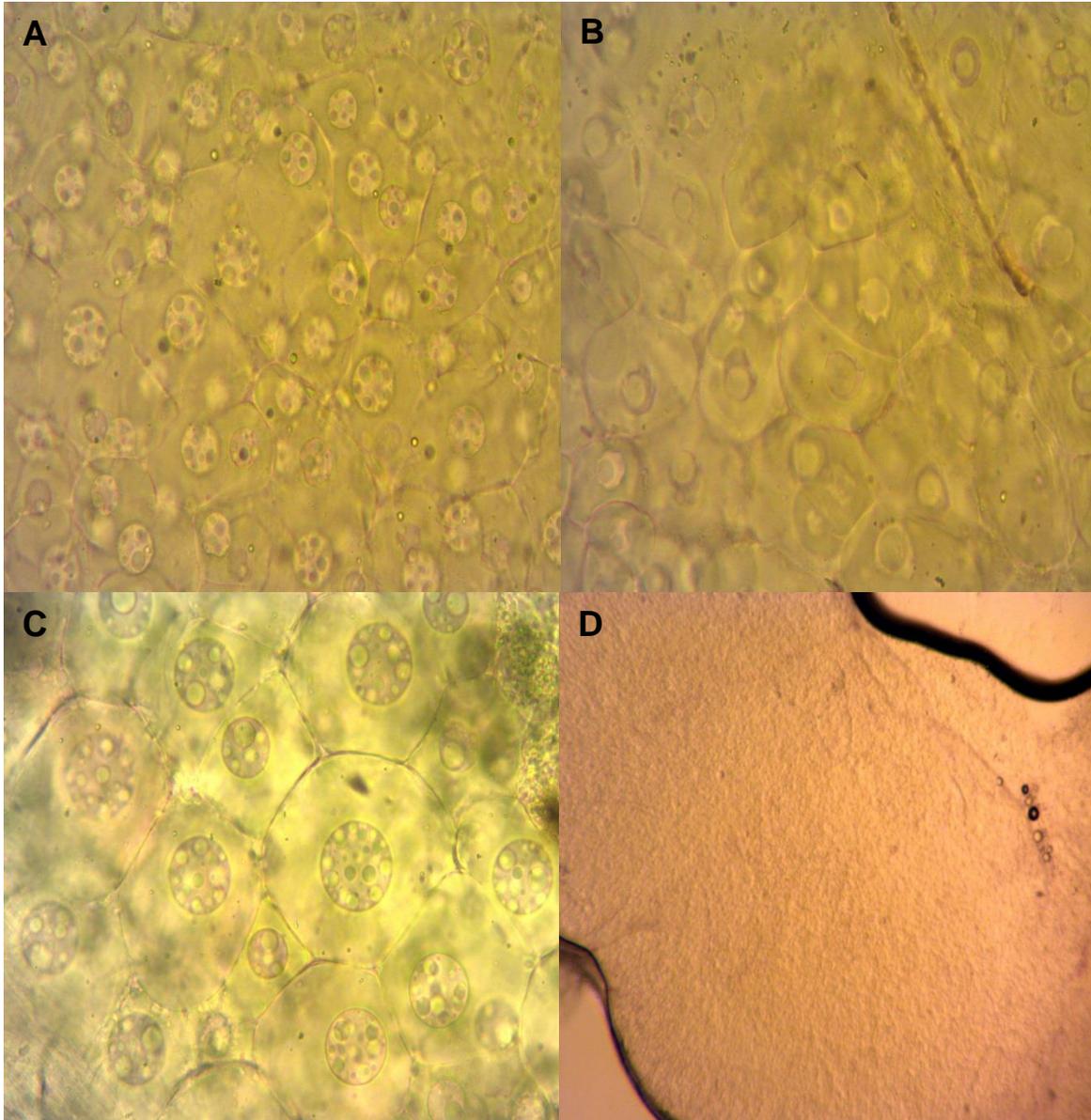


Figura 7. Gónadas de hembras de robalo observados bajo el microscopio a 40x (A, B y C) y de un macho (D).

5.3 Análisis microscópico y elaboración del cariotipo

Se seleccionaron y analizaron las mejores dispersiones cromosómicas mitóticas y meióticas (metafasas con los cromosomas no traslapados o encimados) con los objetivos 10X y 40X; y fueron fotodigitalizadas a 100X+1.25X del optovar del microscopio AxioScope-A1, con la AxioCam ERc5s y el programa ZEN/2011 (Carl Zeiss® microscopy GmbH, 2011).

El número cromosómico modal en mitosis y meiosis, se estimó con base en el análisis de frecuencias del número de cromosomas mostrado en las metafasas digitalizadas, fotos impresas en alta resolución y por conteo directo a 100X+1.25X con el microscopio óptico AxioScope-A1 (Carl Zeiss® microscopy GmbH, 2011).

Las mejores fotografías se imprimieron para elaborar el cariotipo y el arreglo/clasificación de los cromosomas del cariotipo en meiosis y mitosis, se realizó con referencia a la propuesta metodológica de Levan *et al.* (1964). Para ello se tomaron las medidas de longitud total del brazo q (brazo largo) de cada cromosoma en micrómetros (μm) de cinco metafasas en mitosis y cinco en meiosis.

Se calculó el valor medio, la desviación estándar y la longitud relativa de cada par de cromosomas [longitud de cada par de cromosomas q/longitud total del complemento cromosómico diploide (100)]. Los cromosomas individuales, del cariotipo representativo en ambos estadios celulares (mitosis y meiosis), fueron

recortados electrónicamente a partir de cuatro metafases para cada estadio celular, con el programa Photoshop CS 8.0.1 (Adobe®). Los cromosomas, fueron insertados individualmente, en base a su longitud para ensamblar el cariotipo con las herramientas de dibujo del programa Microsoft Word 2011®.

5.4 Análisis de datos

Los datos que fueron generados a partir de las mediciones realizadas a los cromosomas, permitieron crear una base de datos con el programa Excel 2010® con la cual se fue posible calcular los parámetros estadísticos anteriormente señalados.

6. RESULTADOS

Se analizaron en total 40 preparaciones cromosómicas, de las cuales se obtuvieron 131 campos cromosómicos, 72 metafases en estadio mitótico (riñón, baso y branquia) y 59 en meiosis I.

En mitosis 52 metafases que representaron el 72.22% del total de campos analizados, mostraron $2n=48$ cromosomas (Figura 9A), con ligeras variaciones en los números de cromosomas debido principalmente al procedimiento citológico empleado.

Para el caso de los conteos en estadio meiótico, 59 (92%) metafases haploides bivalentes provenientes de las gónadas (24 campos provenientes de machos y 35 de hembras), mostraron $1n=24$ cromosomas. Como resultado de dichos conteos, se encontró que hubo variaciones en el número de cromosomas en las metafases contabilizadas; las cuales variaron de 18 hasta 22 cromosomas por campo (Figura 9B).

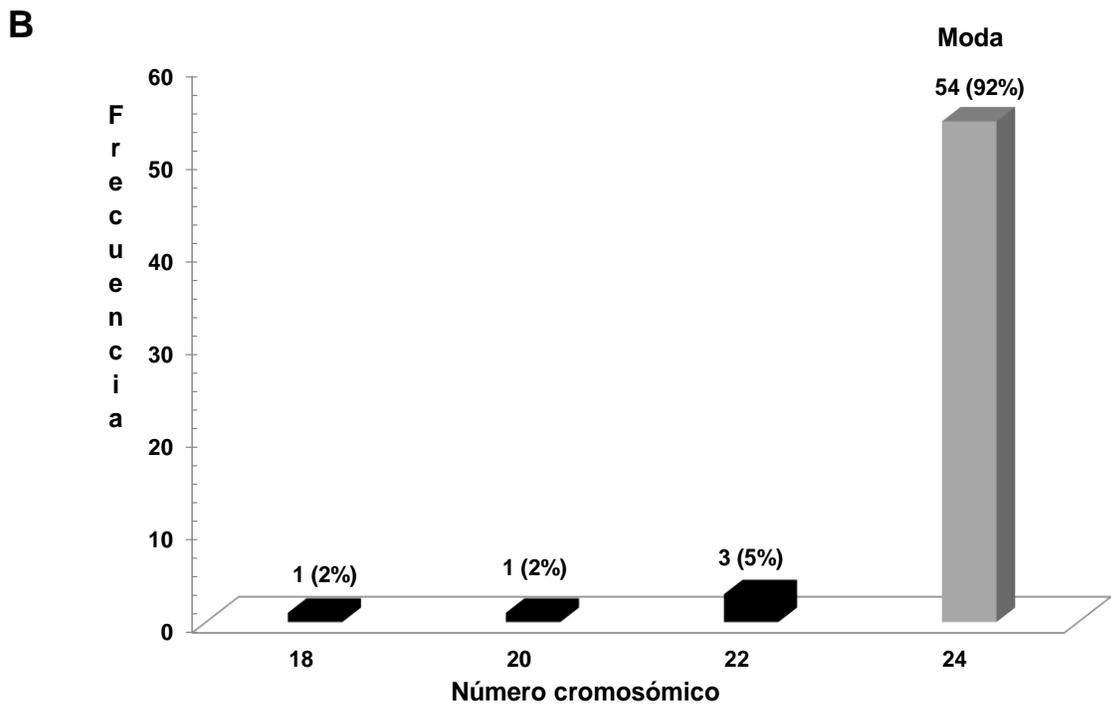
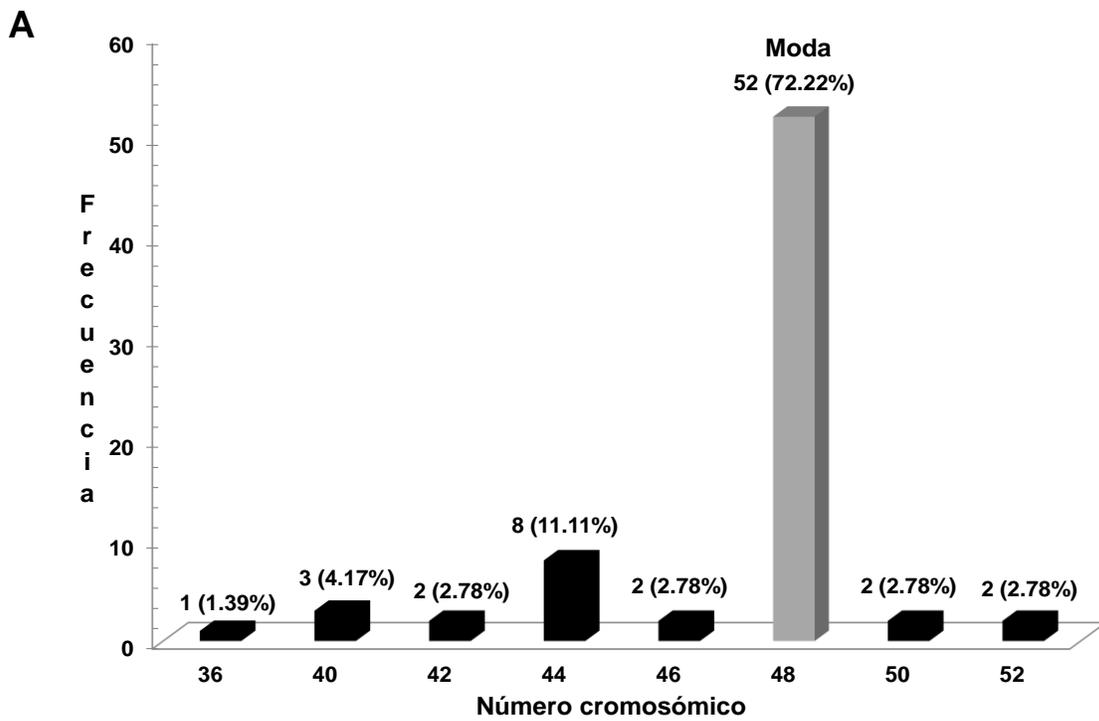


Figura 9. Frecuencias de los números cromosómicos (A) mitosis y (B) meiosis del pez marino *C. robalito*.

Los cromosomas que integran el cariotipo en mitosis y meiosis, variaron en tamaño, desde el primer par cromosómico uno y hasta el último par veintidós; se observó decremento en las longitudes en micrómetros en acuerdo con lo mostrado en el ideograma representativo para los cariotipos de la especie (Figura 10), condición que se vio reflejada también en las longitudes relativas (Figura 10A, Tabla 2).

En el cariotipo en mitosis constituido por 48 cromosomas, el primer par cromosómico mostró en promedio $1.20 \pm 0.10 \mu\text{m}$, con respecto a la longitud media del último par cromosómico veinticuatro de $0.36 \pm 0.0 \mu\text{m}$ (Tabla 2, Figura 11A). Mientras que el cariotipo promedio constituido por 24 cromosomas bivalentes (o con cromátidas dobles) y construido en base a células en profase I en estadio cigoteno, mostraron cromosomas bivalentes alargados con tamaños variables desde el primer par uno y hasta el último par veinticuatro (Figura 10B, Tabla 2). En el caso particular del primer par cromosómico bivalente, la longitud promedio mostrada fue de $6.02 \pm 0.85 \mu\text{M}$ y la del último de $1.54 \pm 0.83 \mu\text{M}$ (Tabla 2, Figura 11B).

Los cromosomas del cariotipo en mitosis y meiosis de *C. robalito*, son cromosomas monorrámeos, mismos que fueron clasificados en el tipo telocéntrico (T) o con centrómero en posición estrictamente terminal. El número fundamental (N.F) que caracterizo a los cariotipos de la especie, fue de 48 brazos cromosómicos (Figura 11).

Por otro lado, no se logró observar diferencias entre los cariotipos de las hembras y machos de la especie, por lo que se descartó la probable presencia de heteromorfismo cromosómico o presencia de cromosomas sexuales, basado en diferencias en su morfología y con el procedimiento citológico empleado en este estudio.

Tabla 2. Parámetros citogenéticos del cariotipo en mitosis y meiosis de *C. robalito* (Pisces: Centropomidae).

Mitosis			
Par cromosómico	Longitud promedio en μm de $q \pm \text{D.E.}$	Longitud relativa promedio de $q \pm \text{D.E.}$	Clasificación
1	1.20 \pm 0.10	4.10 \pm 0.30	T
2	0.99 \pm 0.10	3.38 \pm 0.19	T
3	0.90 \pm 0.18	3.05 \pm 0.31	T
4	0.84 \pm 0.14	2.84 \pm 0.20	T
5	0.78 \pm 0.10	2.66 \pm 0.11	T
6	0.72 \pm 0.12	2.45 \pm 0.21	T
7	0.69 \pm 0.10	2.35 \pm 0.13	T
8	0.65 \pm 0.07	2.20 \pm 0.16	T
9	0.62 \pm 0.10	2.09 \pm 0.19	T
10	0.60 \pm 0.10	2.04 \pm 0.15	T
11	0.60 \pm 0.10	2.04 \pm 0.15	T
12	0.60 \pm 0.10	2.04 \pm 0.15	T
13	0.59 \pm 0.08	1.99 \pm 0.11	T
14	0.56 \pm 0.07	1.90 \pm 0.09	T
15	0.54 \pm 0.09	1.85 \pm 0.11	T
16	0.51 \pm 0.05	1.75 \pm 0.13	T
17	0.51 \pm 0.05	1.75 \pm 0.13	T
18	0.48 \pm 0.05	1.65 \pm 0.07	T
19	0.44 \pm 0.03	1.49 \pm 0.14	T
20	0.41 \pm 0.05	1.39 \pm 0.19	T
21	0.38 \pm 0.03	1.29 \pm 0.19	T
22	0.36 \pm 0.00	1.24 \pm 0.13	T
23	0.36 \pm 0.00	1.24 \pm 0.13	T
24	0.36 \pm 0.00	1.24 \pm 0.13	T
Meiosis			
1	6.02 \pm 0.85	7.34 \pm 0.91	T
2	4.18 \pm 0.93	5.03 \pm 0.23	T
3	4.16 \pm 0.95	5.00 \pm 0.16	T
4	4.11 \pm 0.96	4.94 \pm 0.13	T
5	4.01 \pm 0.93	4.82 \pm 0.16	T
6	3.95 \pm 0.95	4.74 \pm 0.22	T
7	3.89 \pm 0.98	4.65 \pm 0.10	T
8	3.87 \pm 0.99	4.63 \pm 0.05	T
9	3.87 \pm 0.99	4.63 \pm 0.05	T
10	3.86 \pm 0.99	4.61 \pm 0.07	T
11	3.77 \pm 0.98	4.51 \pm 0.03	T
12	3.53 \pm 0.77	4.24 \pm 0.20	T
13	3.50 \pm 0.80	4.20 \pm 0.18	T
14	3.31 \pm 0.90	3.95 \pm 0.07	T
15	3.29 \pm 0.92	3.92 \pm 0.07	T
16	3.17 \pm 0.98	3.76 \pm 0.23	T
17	3.17 \pm 0.98	3.76 \pm 0.23	T
18	3.03 \pm 0.95	3.59 \pm 0.23	T
19	2.91 \pm 0.96	3.44 \pm 0.23	T
20	2.81 \pm 0.85	3.34 \pm 0.13	T
21	2.72 \pm 0.84	3.23 \pm 0.15	T
22	2.63 \pm 0.84	3.12 \pm 0.17	T
23	2.36 \pm 0.83	2.78 \pm 0.23	T
24	1.54 \pm 0.83	1.76 \pm 0.51	T

q=brazo largo, μm =micrómetros, D.E.=desviación estándar, T= cromosoma telocéntrico.

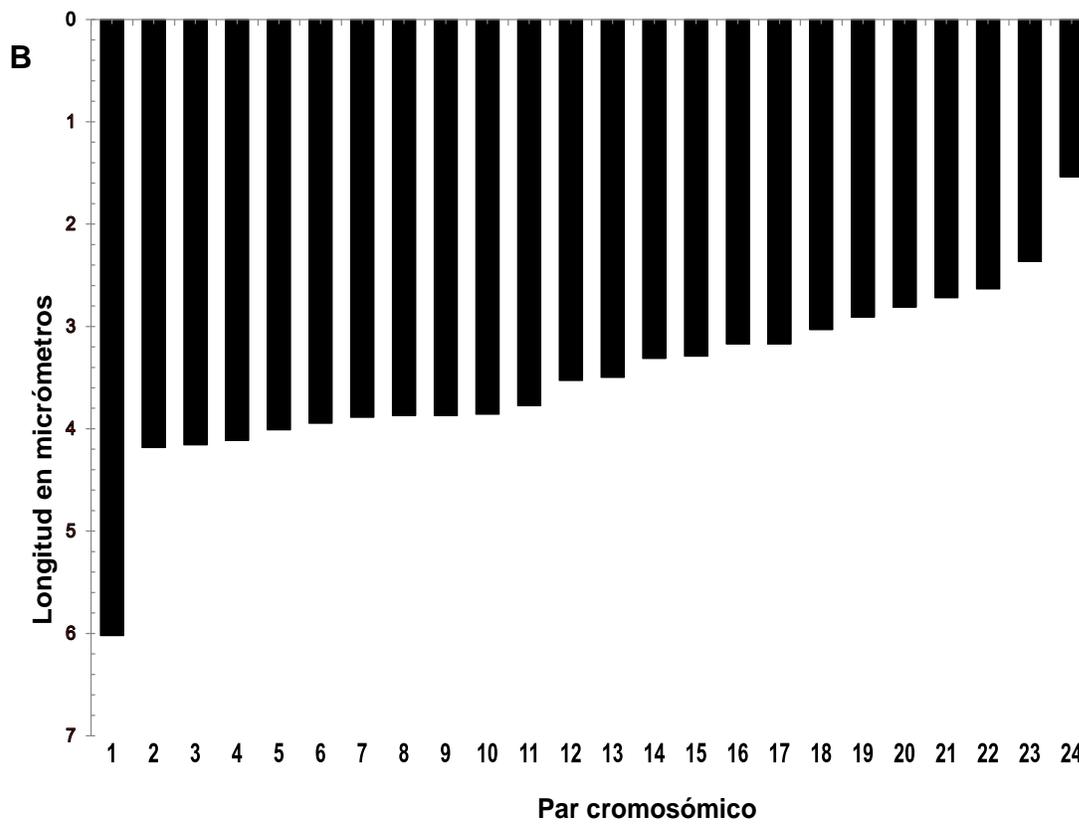
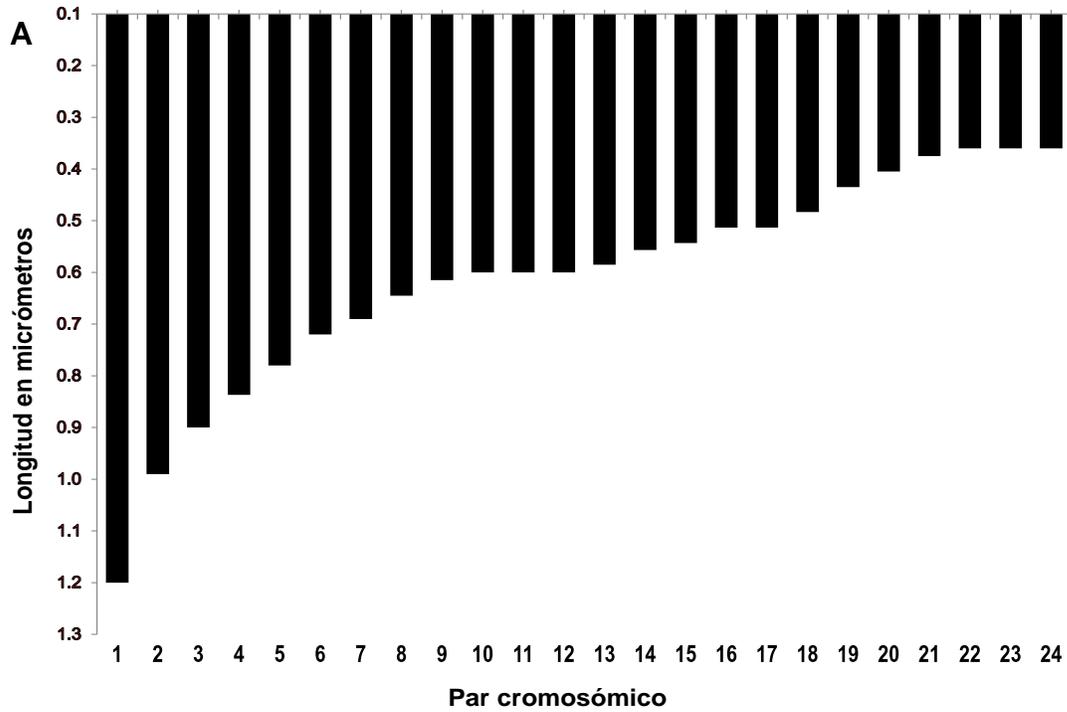


Figura 10. Ideograma representativo del cariotipo promedio por par cromosómico (A) mitosis y (B) meiosis del pez marino *C. robalito*.

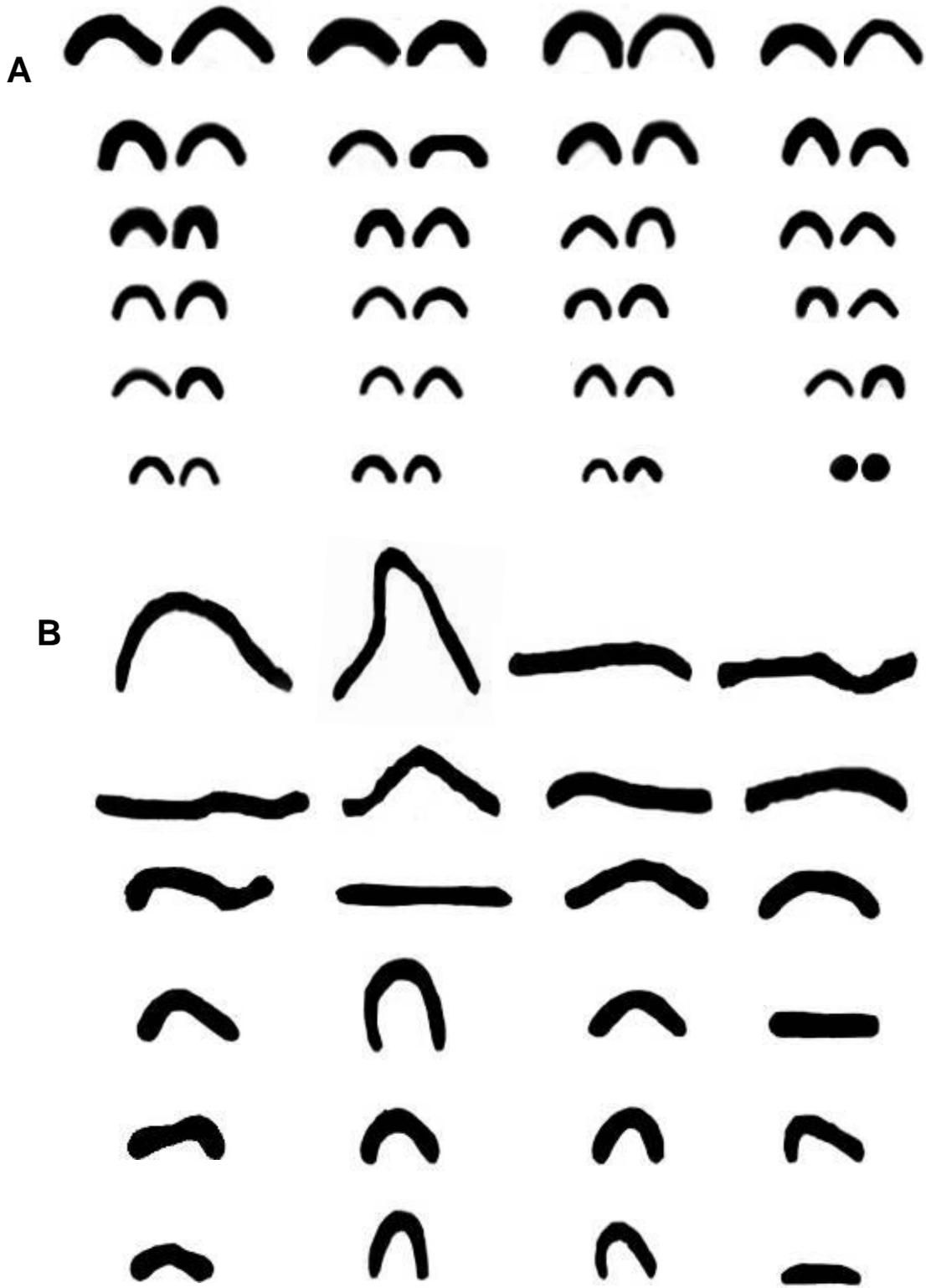


Figura 11. Cariotipo en mitosis integrado por $2n=48$ cromosomas monovalentes de tipo monorrámeo (A) y cariotipo bivalente profásicos en meiosis I (B) del pez marino *C. robalito*.

7. DISCUSIÓN

El cariotipo y número cromosómico encontrado en este estudio para el *C. robalito* en mitosis con $2n=48$ cromosomas y en meiosis con $1n=24$ cromosomas, coinciden con lo reportado por Arias-Rodríguez *et al.* (2011) en el robalo blanco *C. undecimalis*, empleando organismos de Tabasco. Así mismo, nuestro resultado, coinciden con lo reportado con Netto *et al.* (1999) para *C. mexicanus* y *C. undecimalis* y también con Netto *et al.* (2004) en *C. parallelus*. La morfología cromosómica de tipo monorrámea descrita para el cariotipo en mitosis y meiosis del *C. robalito*, también coinciden con lo reportado por Arias-Rodríguez *et al.* (2011) y Netto *et al.* (1999).

Los estudios de citogenética realizados en varias especies de peces del orden perciformes, coinciden en señalar que la mayoría de los peces marinos del orden perciformes es tan caracterizados por tener células diploides integradas por 48 cromosomas con número fundamental de 48 brazos cromosómicos (Tabla 3); con algunas excepciones (Franco y Freitas, 2006). El par cromosómico grande es muy común encontrarlo en los estudios de citogenética de perciformes ha sido reportado por (Frolov y Frolova, 2000, Vega *et al.*, 2002, Raupp *et al.*, 2008, Arias-Rodríguez *et al.*, 2011) Los cromosomas alargados encontrados en meiosis se debe al elevado número de divisiones celulares que no permiten la condensación adecuada de la cromatina dando como resultado cromosomas de grandes tamaños (Arias-Rodríguez *et al.*, 2007)

Las familias de peces más comunes incluyen la Pomacentridae, Sparidae, Sciaenidae, Blenniidae, Channichthyidae, Nototheniidae y Serranidae (Galetti *et al.*, 2000), los cariotipos formados por cromosomas monorráneos son considerados cariotipos de tipo ancestral y a los organismos se les considera organismos poco evolucionados o primitivos desde el punto de vista cariotípico (Galetti Jr. *et al.*, 2000, Trevizoli *et al.*, 2006, Arias-Rodriguez *et al.*, 2008, Ohno 1974).

Tabla 3. Parámetros citogenéticos en varias especies del orden de los peces perciformes.

Especie	2n	FN	Referencia
<i>Centropomus mexicanus</i>	48	48	Netto <i>et al.</i> , (1999)
<i>C. parallelus</i>	48	48	Netto <i>et al.</i> , (2004)
C. robalito	48	48	Presente estudio
<i>C. undecimalis</i>	48	48	Arias-Rodriguez <i>et al.</i> , (2011)
<i>Diapterus auratus</i>	48	48	Calado <i>et al.</i> , (2013)
<i>D. olithostomus</i>	48	48	Franco <i>et al.</i> , (2006)
<i>D. rhombeus</i>	48	48	Calado <i>et al.</i> , (2013)
<i>Eugerres brasiliensis</i>	48	48	Calado <i>et al.</i> , (2013)
<i>Haemulon aurolineatum</i>	48	48	Nirchio <i>et al.</i> , (2007)
<i>H. bonariense</i>	48	48	Nirchio <i>et al.</i> , (2007)
<i>H. plumierii</i>	48	48	Nirchio <i>et al.</i> , (2007)
<i>Menticirrhus americanus</i>	48	48	Accioly y Molina (2008)
<i>Ophioscion punctatissimus</i>	48	48	Accioly y Molina (2008)
<i>Pareques acuminatus</i>	48	48	Accioly y Molina (2008)
<i>Priacanthus arenatus</i>	52	52	Franco <i>et al.</i> , (2006)
<i>Selene vomer</i>	48	48	Mirian, <i>et al.</i> , (2007)
<i>Seriola lalandi lalandi</i>	48	52	Chai <i>et al.</i> , (2009)
<i>Seriolella violacea</i>	48	48	Palma-Rojas <i>et al.</i> , 2012
<i>Trachinotus ovatus</i>	48	56	Shu, <i>et al.</i> , (2007)

La homogeneidad en la morfología cromosómica en el *C. robalito* permitió garantizar la ausencia de heteromorfismo entre las dispersiones metafásicas derivadas de las hembras y de los machos, por lo que la probable presencia de cromosomas sexuales queda descartada en la especie, tal y a como fue señalada también por Arias-Rodríguez *et al.*, (2011) en el robalo blanco *C. undecimalis*.

8. CONCLUSIONES

En conclusión, el cariotipo típico en mitosis del *C. robalito*, se integró de $2n=48$ cromosomas monorrámeos de tipo telocéntrico (T) y sin presencia de cromosomas sexuales. Con ello, se contribuye con adicionar información básica sobre la genética de la especie. Tales resultados tienen potencial de uso en programas de mejoramiento genético, en los que se pretenda emplear las herramientas de la biotecnología cromosómica para la producción de organismos sin padre o ginogenéticos y sin madre o androgenéticos, así como la producción experimental de robalos triploides o poliploides con fines de acuicultura. Adicionalmente a la utilidad de la producción de haploides dobles para mapas de recombinación genética y mapeo genómico.

Por otro lado, se ha visto que especies con números cromosómicos similares tiene altas posibilidades de permitir la hibridación mediante técnicas artificiales de reproducción asistida, los peces híbridos han mostrado en cultivo mejor vigor híbrido lo que se ha derivado en la producción de mayor cantidad y calidad de carne en menor tiempo, con mejores rendimientos en cultivo.

Es importante también extender los estudios de citogenética en el resto de especies de robalos tanto de la vertiente atlántica como pacífica con el propósito de realizar comparaciones de carácter citogenético y filogeográfico.

9. LITERATURA CITADA

- Accioly I.V. y Molina W.F. 2008. Cytogenetic studies in Brazilian marine *Sciaenidae* and *Sparidae* fishes (Perciformes), *Genetics and Molecular Research* 7 (2): 358-370.
- Allen, T., H. García y J. Tucker. 1999. PCR in situ followed by microdissection allows whole chromosome painting probes to be from single microdissected chromosomes. *Mammalian Genome*. 10: 628-631.
- Alvarez-Lajonchere L & Tsuzuki M. 2008. A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin América, *Aquaculture Research*, 39: 684-700.
- ARAP. 2011. Guía de Peces para la Identificación de Especies Comerciales. Dirección de Investigación y Desarrollo. Documento Técnico de Pesca. Ciudad de Panamá, Panamá. 93 pp.
- Arias-Rodríguez, L. & S. Páramo-Delgadillo. 2000. Biotecnología cromosómica en peces producción de peces triploides. *Kuxulkab Revista de Divulgación V* (11). 8 – 12 pp
- Arias-Rodríguez, L., S. Páramo-Delgadillo, & Durán-González, A. L. 2006. Caracterización citogenética del pez tropical de agua dulce *Parachromis managuensis* (Pisces: Cichlidae). *Rev. Biol. Trop.* Vol. 54 (1): 35-42
- Arias-Rodríguez, L., K. Morishima and K. Arai, 2006, Genetically diversified populations in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* inferred from newly developed microsatellite markers, *Journal compilation* © 2006 Blackwell Publishing Ltd

- Arias-Rodríguez, L., L. Ibarra-Castro & S. Páramo-Delgadillo, 2008, Los cromosomas mitóticos y meióticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae), Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 56 (2): 895-907.
- Arias-Rodríguez, L., K. Morishima, K Arai, 2008, Inter-populational difference in microsatellite-centromere map distances in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, The Ichthyological Society of Japan.
- Arias-Rodríguez, L., J. Rimber Indy, R. I. Ahumada-Hernández, H. Barragán-Cupido, A. A. Ávalos-Lázaro & S Páramo-Delgadillo, 2011, Caracterización cariotípica en mitosis y meiosis del robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae), Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 59 (2): 683-692.
- Arias-Rodríguez, L., J.P. González-Hermoso, H. Fletes-Regalado, L.E. Rodríguez-Ibarra & G. Del Valle Pignataro. 2007. Cariotipos de los caracoles de tinte *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) y *Plicopurpura columellaris* (Lamarck, 1816) (Gastropoda: Muricidae). Rev. Biol. Trop. 55: 853-866.
- Arias-Rodríguez, L., S. Páramo-Delgadillo, W.M. Contreras-Sánchez & C.A. Álvarez-González. 2009. Cariotipo del pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) y variación cromosómica en sus larvas y adultos. Rev. Biol. Trop.57: 529-539.
- Basavaraju, Y., G. Mair, H. Mohan Kumar, S. Pradeep Kumar, G. Keshavappa y D. Beaumont, A. y K. Hoare. 2003. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Blackwell Science Ltd., Oxford. 158 pp.
- Beaumont, A. y K. Hoare. 2003. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Blackwell Science Ltd., Oxford. 158 pp.

- Burbano M, C. 1995, fundamentos de acuicultura continental. “Citogenética aplicada a peces” p. 219-232. Bogotá Colombia.
- Byamungu, N., V. Darras y E. Kuhn. 2001. Growth of heat-shock induced triploids of blue tilapia, *Oreochromis aureus*, reared in tanks and in ponds in Eastern Congo: Feeding regimes and compensatory growth response of triploid females. *Aquaculture*. 198 (1): 109-122.
- Calado, L. L., Bertollo L. A. C., Da Costa G. W. W. & Molina W. F., 2013, Cytogenetic studies of Atlantic mojarras (Perciformes – Gerreidae): chromosomal mapping of 5S and 18S ribosomal genes using double FISH, *Aquaculture Research*,, 44, 829–835
- Caballero-Chávez, V. 2011, Reproducción y fecundidad del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en el suroeste de Campeche, *Ciencia Pesquera*, Vol. 19, núm. 1
- Cerqueira, V R, & Tsuzuki M. Y. 2008. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*, *Fish Physiol Biochem*, 35:17–28
- Chai X., Xiaoxu L., Rongmao L. & Steven C., 2009, Karyotype analysis of the yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* (Perciformes: Carangidae) from South Australia, *Aquaculture Research*, 40, 1735-1741
- CONAPESCA 2009, anuario estadístico de acuicultura y pesca.
- Denton, T.E. 1973. *Fish chromosome methodology*. Springfield, Ill. Charles C. Thomas. 166 p.

- Devlin, R., Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191–364.
- Dios E., D. Alemán y J. Mendoza. 2009. Línea Base Ambiental del Santuario Nacional los Manglares de Tumbes Estudio Complementario para *Anadara grandis*, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* y tres especies de peces. MEDA Subsidiary Perú. Pp: 11
- Egozcue, J. 1971, Técnicas en citogenética. Edit. Espaxs. Barcelona. España.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro- Oriental. Roma, FAO. v. II, pt. I, 987-993 p. (Vertebrados).
- Foresti, F., C. Oliveira, Y. Aiko, y M. Rigolino. 2002. NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Hereditas*. 136: 227-230.
- Franco, Molina W & Freitas B. T. O., 2006, Structural and Numerical Chromosome Diversification in Marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae), *Cytologia* 71(3): 237–242
- Froese R and Pauly D (2007). Fishbase. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>. Accessed March 22, 2007.
- Galetti P.M., Aguilar C.T. & Molina W.F. (2000) An overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia* 420,55-62.

- Galetti PM Jr, Molina W. F., Affonso P. R. and Aguilar C. T. (2006). Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers. *Genetica* 126: 161-177.
- Gersen, S. y M. Keagle. 1999. The principles of clinical cytogenetics. Humana press Inc, New Jersey. 558 pp.
- Gray, B., R. Zori, P. Mcguire y R. Bonde. 2002. A first generation cytogenetic ideogram for the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) based on multiple chromosome banding techniques. *Hereditas*. 137: 215-223.
- Greg, C. 2001. Practical genetics for aquaculture. Fishing News Books, Oxford. 235 pp.
- Houtsmuller, A., J. Oud, M. Montijn, M. Worrying, A. Smeulders y N. Nanninga. 2000. Chromosome no. 1 of *Crepis capillaris* shows defined 3D-shapes in mitotic prophase. *Chromosome Research*. 8: 243-252.
- Inafuku, J., M. Nabeyama, Y. Kikuma, J. Saitoh, S. Kubota y S. Kohno. 2002. Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (*Osteichthyes*, Pisces). *Chromosome Research*. 8: 193-199.
- Johnson, R., J. Shrimpton, J. Heath y D. Heath. 2004. Family, induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*. 234 (1-4): 123-142.
- Kligerman, A.D. & S.E. Bloom. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 266-269.

- Langer, S., K. Jurgen, I. Jentsch y M. Speicher. 2004. Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications. *Chromosome Research*. 12: 12-15.
- Levan, A., K. Fredga & A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Li, Q., C. Park y A. Kijima. 2002. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Journal of Shellfish Research*. 21 (2): 811-815.
- Mandrioli, M. Colomba M. y Vitturi. R. 2000. Chromosomal analysis of repeated DNAs in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces, Labridae). *Genetica*. 108: 191-195.
- Martins, C., C. Oliveira, A. Wasko y J. Wright. 2004. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes a review. *Aquaculture*, 231: 37-49.
- Miller, R.R., W.L. Minckley & S.M. Norris. 2005. *Freshwater fishes of Mexico*. University of Chicago press, Chicago and London. PP 468
- Mirian M.R., Sabrina B. & Almeida-Toledo L.F. (2007) Karyological characterization of four marine fish species, Genera *Trachinotus* and *Selene* (Perciformes: Carangidae), from the Southeast Brazilian Coast. *Cytologia* 72,95-99.
- Molina WF and Galetti PM Jr (2004). Multiple pericentric inversions and chromosomal divergence in the reef fishes *Stegastes* (Perciformes, Pomacentridae). *Genet. Mol. Biol.* 27: 543-548.

- Nanda, I., U. Hornung, M. Kondo, M. Schmid y M. Scharthl. 2003. Common Spontaneous Sex-Reversed XX males of the Medaka *Oryzias latipes*. *Genetics*. 163: 245-251.
- Nell, J. 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*. 210 (1-4): 69-88.
- Netten, H. 1997. Automated image analysis of FISH--stained cell nuclei. Thesis Doctoral, Technische Universiteit Delft, Delft. 131 pp.
- Nirchio A, Rondón R, Oliveira C, Ferreira I. A, Martins C, Pérez J, Sola L & Rossi A.R., 2008, Cytogenetic studies in three species of *Lutjanus* (Perciformes: *Lutjanidae*: *Lutjaninae*) from the Isla Margarita, Venezuela., *Neotropical Ichthyology*, 6(1):101-108.
- Nirchio, M., J. A. Gómez Y J. Villalaz. 2001. Cariotipo del pez sapo batrachoides pacífico (Batrachoididae: teleostei) de la costa del Pacífico de Panamá. *Universidad de Oriente, Venezuela*. Vol. 13. Nº 1: 81-83.
- Nirchio, N., Gaviria, J.I., Oliveira C. Alves Ferreira I. & Martins C., 2007, Cytogenetic analysis of three species of the genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita Island, Venezuela, *Genetica* 131:135–140
- Netto, M. R. C. B., Foresti, F. and Oliveira, C., 1999, Caracterização Cromossômica de duas Espécies do Gênero *Centropomus*: *C. mexicanus* e *C. undecimalis* (*Centropomidae*, Perciformes). In: 45º Congresso Nacional De Genética, Sociedade Brasileira de Genética, Gramado, p. 79.
- Netto, M. R. C. B., Oliveira, C. and Foresti, F., 2004, Homogeneidade Cariotípica Populacional de *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis* de Diferentes Ambientes Costeiros. In: X Simpósio de citogenética e Genética de Peixes, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, p.110.

- Ohno S. (1974) Protochordata, Cyclostomata and Pisces. In Animal Cytogenetics, Vol. 4 (ed. by B. John), pp 38–46. Gebruder Borntraeger, Berlin, Germany.
- Palma-Rojas C, C Araya, E von Brand, P Jara-Seguel, A Silva, 2012, caracterización citogenética de *Seriolella violacea* (GUICHENOT, 1848) (perciformes: *centrolophidae*) bandeo cromosómico, Journal of Basic & Applied Genetics. Suppl. Vol XXIII (1).
- Plath M., R. Riesch, A. Oranth, J. Dzienko, N. Karau, A. Schießl, S. Stadler, A. Wigh, C. Zimmer, L. Arias-Rodríguez, I. Schlupp, M. Tobler. 2010, Complementary effect of natural and sexual selection against immigrants maintains differentiation between locally adapted fish. Springer-Verlag. 97:769–774
- Prodocimo V., Tscha M. K, Pie M. R., Oliveira-neto J. F, Ostrensky A. and Boeger W.A Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: *Centropomidae*) along the Brazilian coast, Journal of Fish Biology. 73, 2075–2082.
- Sandoval-Castellanos, E., Uribe-Alcocer, M & Díaz-Jaimes P., 2005, diferenciación genética poblacional en robalos (pisces: *Centropomidae*) del Pacífico Mexicano, Rev. Int. Contam. Ambient. 21 (Supl. 1) 35-4.
- Schwarzacher, T. y P. Heslop-Harrison. 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd., New York. 203 pp.
- Sewalem, A, D. M. Morrice, A. Law, D. Windsor, C. S. Haley, C. O. N. Ikeobi, D. W. Burt, and P. M. Hocking, 2002, Mapping of Quantitative Trait Loci for Body Weight at Three, Six, and Nine Weeks of Age in a Broiler Layer Cross, Poultry Science Association, Inc.

- Seyoum Seifu, Tringali Michael D. and Sullivan Jaime G. 2005. Isolation and characterization of 27 polymorphic microsatellite loci for the common snook, *Centropomus undecimalis*. Blackwell Publishing Ltd, *Molecular Ecology Notes*, 5, 924–927.
- Shu H., He M.L., Zhang H.F., Wang Y.X. & Liufu Y.Z. (2007) Study on the Karyotype in *Trachinotus ovatus*. *Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition)* 6, 23-25.
- Stanley, J., S. Allen y H. Hidu. 1981. Polyploidy induced in the American oyster *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*. 12: 1-10.
- Trevizoli Silveira F; Aparecida Ortolani F; Fiorese Mataqueiro M & Moro J R, 2006, Caracterização citogenética em duas espécies do gênero *Myrciaria*. *Revista de Biologia e ciências da terra*, vol. 6: 327-333
- Van der Heiden, A. M., Ruiz Guerrero, M. y A. Abreu Grobois. 2000. Genética y taxonomía de los robalos (*Centropomus* sp.) del golfo de California, México. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. G008. México, D.F.
- Vega L., E. Díaz, I. Cross y L. Rebordino. 2002. Caracterizaciones citogenética e isoenzimática del lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4). 245-250
- Verma, R., y A. Babu, 1995. Human Chromosomes: principles and techniques. 2a. ed. McGraw- Hill. New York.
- Vidal-López J. M., C. A. Álvarez-González, W. M. Contreras-Sánchez, R. Patiño, A. A. Hernández-Franyutti, U. Hernández-Vidal, R. Martínez-García, 2012,

Feminización de juveniles del robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch 1792) usando 17 β -Estradiol. Rev. Mar. Cost. 4: 83-93.

Viestel, M. A. D.; Pauls, E.; Affonso, P. R. A. M. & Netto, M. R. C. B., 1996, Levantamento Citogenético em Peixes Marinhos III: Família *Centropomidae*, *Centropomus undecimalis*. In: 42º Congresso Nacional de Genética, Sociedade Brasileira de Genética, Caxambu, p. 113.

Weierich, C., A. Brero, S. Stein, J. von Hase, C. Cremer, T. Cremer & S. I. 2003. Threedimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. Chromosome Research. 11: 485-502.

Wittenrich M.L., Rhody N.R., Turingan R. G., Main, K. L. 2009, Coupling osteological development of the feeding apparatus with feeding performance in common snook, *Centropomus undecimalis*, larvae: Identifying morphological constraints to feeding, Aquaculture 294 221–227.

Woods William A., programa activos productivos 2010, cultivo y engorda de mojarra tilapia en estanques rectangulares, marzo, secretaria de pesca, departamento de desarrollo de proyectos.

Zarza-Meza AE, Villalobos JB, Vásquez CP, Álvarez PT 2006. Cultivo experimental del robalo *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) y Chucumite *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) (*Perciformes: Centropomidae*) en agua dulce en un estanque de concreto en Alvarado, Veracruz, México. Vet. Méx. 37 (3): 327-333.

Zhou X., K. Abbas, M. Li, L. Fang, S. Li, W. Wang, 2010, Comparative studies on survival and growth performance among diploid, triploid and tetraploid dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquacult Int 18:349–359.

10. ANEXO

Preparación de soluciones que se utilizaron en el estudio.

Colchicina

Pesar 0.200 gr de colchicina, 1gr de sodio, diluir en 50 mililitros de agua biodespilada.

Citrato de sodio:

1 gramo de citrato de sodio diluido en 50 mililitros de agua biodespilada, aforada a 50 mililitro.

Solución buffer de sorensen. (Thogaard y Disney 1990):

Disolver 4.53 gr., de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y 4.72 gr., de fosfato de sodio dibasico (NO_2HPO_4) en un litro de agua desionizada y ajustar el pH entre 8 y 7.0.

MS 222. (Metasulfanato de tricaina):

Pesar 4 gr., de ms 222, diluir en 100 mililitros de agua destilada para preparar solución madre.

Fijador (3.1):

10 mililitros de ácido acético disuelto en 30 ml., de metanol frio.

Solución madre giemsa:

Giemsa en polvo 1.0 gr., glicerina 6.0 ml y metanol, realizar una mezcla y agitar durante 24 horas.

Cloruro de calcio 0.2 %:

Cloruro de calcio (CaCl_2) 0.2 gr, diluido en 99.8 ml de agua destilada.