Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente 43 (1&2): 27-32 (2004); 1 Fig., 1 Tab.

HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA Y LOCALIZACIÓN DE REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO EN *BATRACHOIDES PACIFICI* (GÜNTHER 1861) (TELEOSTEI: BATRACHOIDIDAE)

NIRCHIO[1] MAURO., PÉREZ[2] J. E., GÓMEZ[3] J. A., VILLALAZ[3], J. & VEGA C[3].

[1]*Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar. Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela.*
mnirchio@ci.udo.edu.ve

[2] *Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre , Cumaná, Venezuela.*

[3]*Centro de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad de Panamá, Panamá*

RESUMEN: *Batrachoides pacifici* posee un cariotipo 2n=46, NF=64 constituido por 3 pares metacéntricos (M), 4 pares submetacéntricos (SM), 2 pares subtelocéntricos (ST) y 14 pares acrocéntricos (A). Las Regiones Organizadoras del Nucleolo (RON) fueron detectadas en el extremo terminal de los brazos cortos de un par acrocéntrico de tamaño mediano. La tinción secuencial permitió identificar a estos elementos como el par 21. El bandeo C reveló bloques de heterocromatina constitutiva en las regiones centroméricas y pericentroméricas de casi todos los cromosomas. En algunos cromosomas también fueron observadas regiones intersticiales banda-C positivas. Los datos presentados y su comparación con los de otras especies de la familia indican que el estudio del cariotipo tiene un potencial citotaxonómico de gran valor que pueden contribuir a dilucidar las relaciones filogenéticas en los Batrachoididae.

Palabras Clave: Heterocromatina Constitutiva (Bandas-C), Regiones Organizadoras del Nucleolo (RON)

Abstract: *Batrachoides pacifici* has a karyotype 2n=46, NF=64 comprising 3 metacentric pairs (M), 4 submetacentric pairs (SM), 2 subtelocentric pairs (ST), and 14 acrocentric pairs (A). The Nucleolus Organizer Regions (NOR) were detected at the terminal short arm of a medium-size acrocentric pair. Sequential staining allowed for identification of these elements as pair 21. C-banding revealed clusters of constitutive heterochromatin located on the centromeric and pericentromeric regions of almost all chromosomes. Interstitial C-band positive regions were also observed in some chromosomes. The data presented and their comparison with those of the other species of the family indicate that the study of the karyotype has a valuable cytotaxonomic potential, a proposition which could prove very useful in contributing to elucidate the phylogenetic relationships of Batrachoididae.

Key words: *Batrachoides pacifici*, constitutive heterochromatin (C-bands), Nucleolus Organizer Regions (NOR)

INTRODUCCION

Los peces sapo pertenecientes a la familia Batrachoididae son principalmente marinos, aunque existen algunos dulceacuícolas en los océanos Atlántico, Pacífico e Índico. Y están agrupados en 3 subfamilias: Batrachoidinae con 15 géneros; Porichthyinae con 2 géneros y Thalassophryninae con 2 géneros (FROESE & PAULY, 2004). Entre las aproximadamente 70 especies contenidas en la familia, sólo se conocen detalles del cariotipo para *Amphychthys cryptocentrus, Batrachoides manglae,* y *Thalassophryne maculosa* de Venezuela (NIRCHIO *et al.* 2002, 2004a), *B. pacifici* de Panamá (NIRCHIO *et al.* 2001), *Porichthys porosissimus* de Brasil (BRUM *et al.* 2001), *P. plectrodon* de Venezuela (NIRCHIO *et al.* 2004b) y *Halobatrachus didactylus* de España (PALAZÓN *et al.* 2003).

B. pacifici es una de las 8 especies de peces sapo reconocidas en Panamá (ALLEN & ROBERTSON, 1994) y la información citogenética disponible para ella se limita al número diploide y fórmula cromosómica (NIRCHIO *et al.* 2001).

En este trabajo, se redescribe el cariotipo de *B. pacifici*, aportando nuevos datos que incluyen la distribución de heterocromatina constitutiva (Bandas-C) y localización de las Regiones Organizadoras del Nucleolo y, tomando en cuenta los datos citogenéticos existentes, se discute la evolución del cariotipo en la familia Batrachoididae

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron analizados diez especimenes sexualmente maduros (2 machos, 8 hembras) colectados en Puerto Caimito, Distrito de Las Chorreras, Panamá. Las preparaciones cromosómicas fueron obtenidas según NIRCHIO et al. (2001) pero reduciendo las dosis de colchicina de 0,5% a 0,0125% y el tiempo de exposición de 6 h a 50 min. Para la tinción convencional las preparaciones fueron teñidas durante 20 minutos con colorante de Giemsa 5%, diluido en tampón fosfato pH 6.88. La detección de las Regiones Organizadoras del Nucleolo (RON) se realizó siguiendo el método de impregnación argéntica de HOWELL & BLACK (1980). Las bandas C fueron visualizadas mediante tratamiento con Hidróxido de Bario, empleando el método descrito por SUMNER (1972). Las figuras metafásicas fueron fotografiadas utilizando una cámara digital Nikon COOLPIX® 995. Las imágenes fueron procesadas con el software ADOBE PHOTOSHOP v.7.0, para determinar la longitud de brazo largo (L), del brazo corto (S) y construir los cariogramas. La morfología de los cromosomas fue determinada con base en la relación del tamaño de los brazos cromosómicos LEVAN *et al.* (1964).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cromosomas de *B. pacifici* (2n = 46) dispuestos en orden decreciente de tamaño y posición del centrómero se presentan en la figura 1A. Los cromosomas se distribuyeron en cuatro categorías: 6M, 8SM, 4ST, 28A (NF = 64) (Fig. 1A).

Estos datos discrepan respecto al reporte previo en el que se indicó un complemento 2n=46 pero con 6M, 6SM, 34A y NF = 58 (NIRCHIO *et al.* 2001). En ese reporte, para la clasificación de los cromosomas los autores emplearon un vernier convencional (precisión = 0,05 mm), para medir la longitud de los brazos cromosómicos, mientras que para este nuevo reporte esas longitudes fueron obtenidas con la herramienta de medición (precisión = 0.01 mm) del software utilizado para procesar las imágenes digitalizadas de las figuras metafásicas, lo que permitió reducir sustancialmente el error en la medición. Además, gracias a la disminución de la concentración de colchicina de 0,5% a 0.0125% y del tiempo de exposición al alcaloide, 6h a 50 minutos, se obtuvieron preparaciones cromosómicas de mejor calidad (cromosomas adecuadamente condensados), que permitieron una determinación mas precisa de la longitud de los brazos cromosómicos y, por ende, una clasificación más exacta de los cromosomas, lo que explica las diferencias en el número de elementos de dos brazos (metacéntricos, subtelocéntricos) y consecuentemente en el valor del número fundamental (NF). La mejora en la calidad de las preparaciones cromosómicas por la reducción en el tiempo de exposición y concentración de colchicina ha permitido obtener detalles cromosómicos que no habían sido detectados en la caracterización citogenética de *Thalassophryne maculosa* debido a la excesiva condensación de los cromosomas por efecto de la sobre exposición a la colchicina (NIRCHIO *et al.* 2004a)

La técnica de impregnación argéntica reveló solo un par de cromosomas portadores de RON que corresponden a un par acrocéntrico de tamaño mediano, con las marcas localizadas en el extremo terminal de los brazos cortos. La tinción secuencial permitió identificar estos elementos como el par 21 (Fig. 1 A y B). Al comparar la localización de las RON de *B. Pacifici* con las de otras especies de Batrachoididae, destaca que estas señales se encontraron ubicadas en la región telomérica del brazo corto del par subtelocéntrico 21 en *P. plectrodon* (NIRCHIO *et al.* 2004b); *Halobatrachus didactylus* posee también un solo par de RON ubicadas en el extremo terminal de los brazos cortos de cromosomas submetacéntricos (PALAZÓN *et al.* 2003), mientras que en *T. maculosa* se localizan en la región telomérica del brazo corto del par subtelocéntrico mediano N° 16 (NIRCHIO *et al.* 2004a). Estos datos ponen en evidencia que la localización de las RONs en los Batrachoididae no parece ser una característica conservada y sugiere la ocurrencia en el grupo de translocaciones que incluyen las regiones que contienen los genes ribosomales.

El bandeo C reveló bloques de heterocromatina constitutiva en las regiones centroméricas y

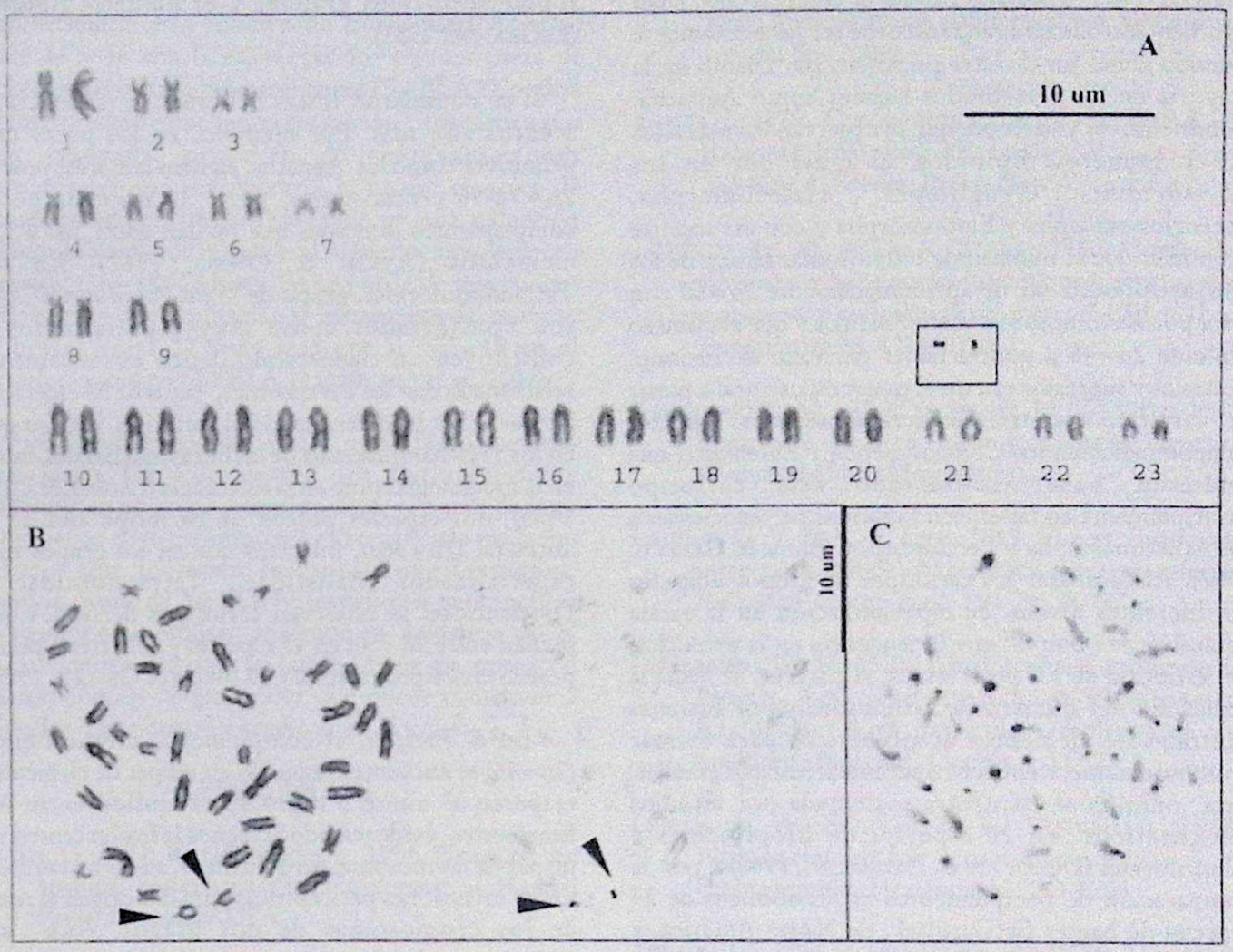


Fig. 1. Cariotipo de *Batrachoides pacifici*. Los cromosomas portadores de las Regiones Organizadoras del Nucleolo aparecen en el recuadro (A). Tinción secuencial de los cromosomas para identificar correspondencia entre los cromosomas portadores de las RON teñidos con $AgNO_3$, con los mismos cromosomas teñidos con Giemsa (señalados con las flechas). Metafase tratada para revelar la heterocromatina constitutiva (C).

pericentroméricas de casi todos los cromosomas. También fueron observadas regiones intersticiales banda-C positivas en algunos cromosomas del complemento (Fig. 1C). En *T. maculosa* la heterocromatina se encuentra restringida a las regiones centroméricas (NIRCHIO *et al.* 2004a), mientras que en *P. plectrodon* y *P. porosissimus* ocupa una amplia región pericentromérica en los pares 1 y 2, además de existir otras bandas pericentroméricas menos conspicuas en la mayoría de los cromosomas (NIRCHIO *et al.* 2004b, BRUM *et al.* 2001). Estos bloques de heterocromatina constitutiva pericentrómerica en un par de cromosomas metacéntricos en *P. plectrodon* y *P. Porosissimus,* ha sido explicado como evidencia de la fusión Robertsoniana de dos pares de cromosomas acrocéntricos grandes, a partir del complemento ancestral en esas últimas dos especies (NIRCHIO *et al.* 2004b, BRUM *et al.* 2001).

Los peces constituyen el grupo más diverso, entre los vertebrados, conformado por 57 Ordenes que agrupan un estimado de 24.618 especies reconocidas (NELSON, 1994), entre las cuales la última revisión publicada indica que, hasta ahora, apenas unas 2700 especies han sido estudiadas citogenéticamente (KLINKHARDT *et al.* 1995). Debido a que el complemento constituido por 48 cromosomas acrocéntricos es el que más se repite en el grupo, se ha sugerido como el cariotipo ancestral de los peces óseos (GOLD, 1979;

OHNO, 1974). No obstante, BRUM & GALETTI (1997) han argumentado que este rasgo no debe ser necesariamente asumido como un carácter primitivo por cuanto en la mayoría de los vertebrados basales como Agnatha, Condrichthyes y Sarcopteygii, se observan los más altos NF y números diploides, al igual que en los Chondrostei, Gynglimodi, Halecomorpha, Osteoglossomorpha y Elopomorpha y con ese soporte proponen que el número de cromosomas básico de los teleósteos podría ser de aproximadamente 2n=60 con unos pocos cromosomas metacéntricos y que el número diploide 2n=48 a podría haber derivado de fusiones centrales y supresiones a nivel macroestructural a partir del cariotipo ancestral, extendiéndose como carácter sinapomórfico en los Clupeomorpha y Euteleostei que pudieron haber conservado este cariotipo principalmente en las especies marinas pertenecientes a los Atherinimorpha y Percomorpha (BRUM & GALETTI, 1997). Al comparar los cariotipos de grupos ubicados en diferentes niveles de especialización en la escala evolutiva se observa que la tendencia en la evolución del cariotipo de los peces óseos, al parecer, es hacia la reducción del número de cromosomas por fusiones centrales de elementos acrocéntricos para formar cromosomas metacéntricos o submetacéntricos grandes. Esta opinión se encuentra sustentada por estudios citogenéticos en 20 especies de Elopiformes y Clupeiformes (DOUCETTE & FITZSIMONS, 1988) y por la comparación de complementos cromosómicos de 24 especies de bagres (Ictaluridae) de Norte América, a partir de las cuales se ha observado una relación inversamente proporcional, altamente significativa ($P<0.01$; $r^2=0.745$), entre el número de elementos meta-submetacéntricos grandes y el número diploide (LEGRANDE, 1981).

Si se consideran líneas extremas la tendencia se acentúa aún más. Por ejemplo, en los peces más primitivos como los Agnatha, algunas lampreas poseen 2n=76-96 cromosomas, pero la mayoría posee complementos diploides que oscilan entre 160 a 170 elementos (ATKIN & OHNO, 1967)- En los Tetraodontiformes, grupo de "Post-Perciformes", que son considerados como muy especializados y constituyen un clado monofilético estrechamente relacionado con los Perciformes, datos de 53 especies a las que se les ha determinado el cariotipo, indican que en los Triachantidae, una de las líneas más basales, tanto en la morfología como en la osteología (LAUDER & LIEM, 1983), dos especies poseen un cariotipo similar al ancestral (2n=48a), mientras que en los grupos más especializados (Balistidae,, Tetraodontidae y Diodontidae) se observan cariotipos derivados que oscilan entre 28 y 46 en 43 especies y solo tres especies poseen cariotipos entre 50 y 52 (BRUM & GALLETI, 1997).

En *B. Pacifici*, el complemento cromosómico (2n=46) se encuentra reducido en un par de elementos respecto al número diploide extendido entre los Euteleostei, evidenciando al menos la fusión central de un par de cromosomas acrocéntricos, así como también varias inversiones pericéntricas para dar origen al resto de los cromosomas de dos brazos. Aún así (considerando 2n=48 acrocéntricos como una condición sinapomórfica en los Euteleostei), el cariotipo de los Batrachoidiformes, (también

TABLA 1. Número de cromosomas, fórmula cromosómica, número fundamental en seis especies de peces sapo. (M) metacéntrico, (SM) submetacéntrico, (ST) subtelocéntrico, (A) acrocéntrico.

Especie	2n	Fórmula cromosómica	NF	Referencia
Amphychthys cryptocentrus	46	4M + 2SM + 40A	52	NIRCHIO *et al.* 2002
Batrachoides manglae	46	6M + 6SM + 34A	58	NIRCHIO *et al.* 2002
B. pacifici	46	6M + 6SM + 34A	58	NIRCHIO *et al.* 2001
Thalassophryne maculosa	46	8M + 6SM + 32A	60	NIRCHIO *et al.* 2002
Thalassophryne maculosa	46	12M + 6SM + 20 ST + 8A	84	NIRCHIO *et al.* 2004a
Halobatrachus didactylus	46	8M + 12SM + 26	66	PALAZÓN *et al.* 2003
Porichthys porosissimus	44	14M/SM:30ST/A	58	BRUM *et al.* 2001
P. plectrodon	44	8M + 10SM + 6St + 20A	62	NIRCHIO *et al.* 2004b

pertenecientes a la Subdivisión Euteleostei) variando entre 44 y 46 con la existencia de algunos pares de cromosomas meta-submetacéntricos (TABLA 1), podría ser interpretado como una constitución citogenética aún mas avanzada, producto de reorganizaciones estructurales que involucraría la fusión céntrica de elementos acrocéntricos, resultando en una reducción del número diploide respecto al supuesto complemento ancestral (2n=48a), además de una serie de inversiones pericéntricas que explicarían el incremento del número de brazos entre 52 y 84 respecto al NF=48 en el cariotipo ancestral (TABLA 1) (Nirchio *et al.* 2002).

Para concluir, los datos aquí presentados sugieren que, entre los Euteleostei, los Batrachoididae constituirían un grupo avanzado desde el punto de vista citogenético cuyo cariotipo se ha diversificado mediante eventos que incluyen fusiones Robertsonianas, translocaciones de las RON e inversiones pericéntricas en algunos cromosomas, poniendo en evidencia que el análisis citogenético en la familia tiene un potencial citotaxonómico de gran valor que puede contribuir a dilucidar relaciones filogenéticas en el grupo.

REFERENCIAS

Allen, G. & D. Ross-Robertson. 1994. Fishes of the tropical eastern pacific. University of Hawaii Press, Honolulu.USA.

Atkin, N. B. & S. Ohno. 1967. DNA values of four primitive chordates. *Chromosoma* (Berl.) 23: 10-13.

Brum, M., P. Affonso, L. C. G. Mota, E. Pauls & M. R. C.B. Netto. 2001. Cytogenetic characterization of *Porichthys porosissimus* (Valenciennes, 1857) (Batrachoididae, Batrachoidiformes) from the Rio de Janeiro Coast, Brazil. Chromosome Science 5: 15-18.

Brum, M. J. I. & P. Galetti JR. 1997. Teleostei ground plan karyotype. Journal of Comparative Biology 2: 91-102.

Doucette, J. R. A. J. & J. M. Fitzsimons. 1988. Caryology of Elopiform and Clupeiform fishes. Copeia, 1: 124-130.

Froese, R. & D. Pauly Editors. 2004. FishBase. World Wide Web electronic publication ww.fishbase.org, version (06/2004).

Gold, J. 1979. Cytogenetics. In: Hoar W S & DJ Randall (eds). Fish Physiology, Volume 8, pp, 353-405. Academic Press, New York.USA.

Howell, W. M. & D. A. Black. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015.

Klinkhardt, M., M. Tesche, & H. Greven. 1995. Database of fish chromosomes. Westarp Wissenschaften, Magdeburg.

Lauder, C. V. & K. F. Liem. 1983. The evolution and interrelationships of the Actinopterygian fishes. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 150 (3): 95-197.

LeGrande, W. H. 1981. Chromosomal evolution in North American catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, Noturus, Copeia, 1:33-52.

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

Nelson, J. S. 1994. Fishes of the world. Wiley, New York.

Nirchio, M., B. J. Turner, J. E. Pérez, J. I. Gaviria & H. Cequea. 2002. Karyotype of three species of toadfish (Batrachoididae: Teleostei) from Margarita Island, Venezuela. Scientia Marina 66 (1): 3-4.

———., A.S. Fenocchio, A. C. Swarça & J. E. Pérez 2004b. Karyology of the Toadfish *Porichthys plectrodon* (Jordan and Gilbert 1882) (Batrachoididae) From Margarita Island, Venezuela. Marine Biology 146 (1): 161-165.

———., A. S. Fenocchio, A. Swarça, A. L. Dias, L. Giuliano-Caetano, E. Ron, J. I. Gaviria & J. E. Pérez 2004a. Cytogenetic characterization of *Thalassophryne maculosa* Günther, 1861 (Pisces: Batrachoididae) from Margarita Island, Venezuela. Caribbean Journal of Science. 40 (2): 218-222.

————., J. A. GÓMEZ & J. VILLALAZ. 2001. Cariotipo del pez sapo *Batrachoides pacifici* (Batrachoididae: Teleostei) de la costa del Pacífico de Panamá. Saber 13 (1): 82-84.

OHNO, S. 1974. Protochordata, Cyclostomata and Pisces. In: John, B. (ed.) Animal Cytogenetics, vol. 4. Getrüder Borntaerger, Berlin.

PALAZÓN, J. L., M. NIRCHIO & C. SARASQUETE (2003) Conventional karyotype and nucleolar organizer regions of the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) (Pisces: Batrachoididae). Scientia Marina 67 (4): 445-449.

SUMNER, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. Exp. Cell Res. 75: 304-306.

RECIBIDO: 10 de enero 2005
ACEPTADO: 16 de marzo 2005