



Journal of Basic & Applied Genetics

(Formerly MENDELIANA)

JOURNAL OF THE ARGENTINE SOCIETY OF GENETICS
REVISTA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA



BUENOS AIRES - ARGENTINA

OB
A
B

Included in:



Cited by:



COMITÉ EDITORIAL

Editor General:

Dra. Elsa L. Camadro

Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Mar del Plata
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Balcarce, Argentina
camadro.elsa@inta.gob.ar

Editores Asociados:

Citogenética Animal

Dra. Liliana M. Mola

Departamento de Ecología, Genética y Evolución
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Buenos Aires
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Buenos Aires, Argentina
limola@ege.fcen.uba.ar; lilimola@yahoo.com.ar

Citogenética Vegetal

Dr. Julio R. Daviña

Instituto de Biología Subtropical
Universidad Nacional de Misiones
Posadas, Argentina
juliordavina@fceqyn.unam.edu.ar

Genética de Poblaciones y Evolución

Dr. Jorge Cladera

Instituto de Genética "Ewald A. Favret"
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y
Agronómicas
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Castelar, Argentina
cladera.jorge@inta.gob.ar

Dra. Noemí Gardenal

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Córdoba, Argentina
ngardenal@unc.edu.ar

Dr. Juan César Vilardi

Departamento de Ecología, Genética y Evolución
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Buenos Aires
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Buenos Aires, Argentina
vilardi@bg.fcen.uba.ar

Genética Humana, Médica y Citogenética

Dra. Silvia Adela Ávila

Hospital Castro Rendón
Universidad Nacional del Comahue
Nuequén, Argentina
silvia347@gmail.com

Dra. María Inés Echeverría

Instituto de Genética
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Cuyo
Mendoza, Argentina
miecheve@fcm.uncu.edu.ar

Dra. María Purificación Galindo Villardón

Facultad Medicina, Campus Miguel de Unamuno.
Universidad de Salamanca.
Salamanca, España
pgalindo@usal.es

Dr. Santiago Lippold

Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas
Buenos Aires, Argentina
sel1@fibertel.com.ar

Dr. José Arturo Prada Oliveira

Facultad de Medicina. Departamento de Anatomía
Humana y Embriología
Universidad de Cádiz.
Cádiz, España
arturo.prada@uca.es

Genética Molecular (Animal)**Dr. Guillermo Giovambattista**

Instituto de Genética Veterinaria
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
La Plata, Argentina
ggiovam@fcv.unlp.edu.ar

Genética Molecular (Vegetal)**Dr. Alberto Acevedo**

Centro de Investigación de Recursos Naturales
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Castelar, Argentina
acevedo.alberto@inta.gob.ar

Dr. Andrés Zambelli

Fac. de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional
de Mar del Plata.
Balcarce, Argentina
andres.d.zambelli@gmail.com

Genética y Mejoramiento Animal**Dra. Liliana A. Picardi**

Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Rosario
Zavalla, Argentina
lpicardi@fcagr.unr.edu.ar

Dra. María Inés Oyarzábal

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de Rosario
Rosario, Argentina
moyazabr@unr.edu.ar

Genética y Mejoramiento Genético Vegetal**Dra. Natalia Bonamico**

Facultad de Agronomía y Veterinaria
Universidad Nacional de Río Cuarto
Río Cuarto, Argentina
nbonamico@ayv.unrc.edu.ar

Dr. José Crossa

Unidad de Biometría y Estadística
Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
(CIMMYT)
México, D.F., México
j.crossa@cgiar.org

Dr. Ricardo W. Masuelli

Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Cuyo
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Mendoza, Argentina
rmasuelli@fca.uncu.edu.ar

Dr. Rodomiro Ortiz

Department of Plant Breeding
Swedish University of Agricultural Science
Uppsala, Suecia
rodomiro.ortiz@slu.se

Dra. Mónica Poverene

Departamento de Agronomía
Universidad Nacional del Sur
Bahía Blanca, Argentina
poverene@criba.edu.ar

Mutagénesis**Dr. Alejandro D. Bolzán**

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
La Plata, Argentina
abolzan@imbice.gov.ar

Mutaciones Inducidas en Mejoramiento Vegetal**Ing. Agr. (M.Sc.) Alberto R. Prina**

Instituto de Genética "Ewald A. Favret"
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y
Agronómicas
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Castelar, Argentina
prina.albertoraul@inta.gob.ar

FOTOGRAFÍAS Y AUTORES

Consultor Estadístico:

Dr. David Almorza

Facultad de Ciencias del Trabajo, Departamento
de Estadística e Investigación Operativa
Universidad de Cádiz.
Cádiz, España
david.almorza@uca.es

Ing. Agr. Francisco J. Babinec

Estación Experimental Agropecuaria Anguil
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Facultad de Agronomía
Universidad Nacional de La Pampa
Santa Rosa, Argentina
babinec.francisco@inta.gob.ar

Secretaría de Redacción:

Dra. María de las Mercedes Echeverría

Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Mar del Plata
Balcarce, Argentina
echeverria.maria@inta.gob.ar

Diseño y maquetación:

Lic. Mauro Salerno

maurosalerano92@gmail.com

Corrección de estilo:

Dr. Mariano Santini

marianosantini@yahoo.com.ar



Línea genética valenciana de conejos. Núcleo genético, Universidad Politécnica de Valencia, España.
Provista por: Fernández E.N.



Domesticación de calabazas

Autor: Fernando López Anido



Pies ambulacrales, *Isostichopus isabellae* n sp.
Autor: Vergara W. et al.

ÍNDICE

9 - 10

Editor's note

ÉTICA EN LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS ETHICS IN SCIENTIFIC PUBLICATIONS

Elsa L. Camadro

11 - 19

Article 1 - research

COMPARACIÓN DEL ORDENAMIENTO DE PREDICCIONES BLUP Y LA RESPUESTA A LA SELECCIÓN EN CONEJOS CUANDO EL EFECTO AÑO-ESTACIÓN SE CONSIDERA FIJO O ALEATORIO

COMPARISON OF THE BLUP PREDICTION
ORDER AND THE RESPONSE TO SELECTION
IN RABBITS WHEN THE EFFECT YEAR-SEASON
IS CONSIDERED TO BE EITHER FIXED OR
RANDOM

Fernández E.N., Abbiati N.N., Rovegno M.S., Gonzalez
C.P., Martínez R.D.

21 - 31

Article 2 - research

NUEVOS MARCADORES MITOCONDRIALES MEJORAN LA FILOGENIA DE LA TORTUGA CAREY *Eretmochelys imbricata* (TESTUDINES: CHELONIIDAE)

NEW MITOCHONDRIAL MARKERS IMPROVE
THE PHYLOGENY OF THE HAWKSBILL
TURTLE *Eretmochelys imbricata* (TESTUDINES:
CHELONIIDAE)

Beltrán-Torres G.C., Hernández-Fernández J.

33 - 48

Article 3 - research

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Isostichopus* sp. IN THE COLOMBIAN CARIBBEAN SEA.

CHARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DE *Isostichopus* sp. EN EL MAR
CARIBE COLOMBIANO

Vergara, W., Agudelo, V., Castro, L., R. Rodríguez A.,
Eeckhaut, I.

49 - 57

Article 4 - short communication

POLLEN VIABILITY AND MEIOTIC IRREGULARITIES IN A COLLECTION OF *Stevia rebaudiana* (BERTONI) BERTONI CULTIVATED IN TUCUMÁN, ARGENTINA

VIABILIDAD DE POLEN E IRREGULARIDADES
MEIÓTICAS EN UNA COLECCIÓN DE *Stevia
rebaudiana* (BERTONI) BERTONI CULTIVADA EN
TUCUMÁN, ARGENTINA

Budeguer C.J., Camadro E.L., Erazzú L.E.

59 - 63

Article 5 - short communication

ESTUDIO CARIOLÓGICO DE *Chrysobalanus icaco* (CHRYSOBALANACEA) EN PARAÍSO, TABASCO, MÉXICO

CARYOLOGICAL STUDY OF *Chrysobalanus icaco*
(CHRYSOBALANACEA) IN PARAÍSO, TABASCO,
MÉXICO

Méndez-Badal E.S., Molina-Martínez R.F., Hernández-
Martínez R., Leshner-Gordillo J.M.

Nota del Editor General

ÉTICA EN LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS
ETHICS IN SCIENTIFIC PUBLICATIONS

En los procesos de revisión de manuscritos se plantean cuestiones éticas y legales, las que se han ahondado con el acceso masivo a internet y el incremento constante y significativo del número de publicaciones electrónicas. Algunas de estas cuestiones pueden deberse al desconocimiento por parte de los autores de lo que entraña la propiedad intelectual (derechos de autor o *copyright*) y de los consensos mínimos alcanzados por la comunidad científica sobre ética en las publicaciones de este tipo. Ese desconocimiento puede conducir a situaciones indeseables, que pueden llegar hasta el rechazo de manuscritos como único motivo.

Para mantener la calidad académica de las revistas científicas, desde hace varios años las editoriales de prestigio aplican herramientas para la detección de plagio. Más recientemente, el uso de dichas herramientas (u otra forma de detección de plagio) forma parte de los protocolos que deben cumplimentar las revistas científicas de acceso abierto (*Open Access Journals = OAJ*), para la acreditación por parte de instituciones u organizaciones científicas nacionales o extranjeras. Por eso, el objetivo de esta nota es brindar algunas definiciones, reglas y sugerencias para evitar cuestiones éticas y/o legales indeseables en la elaboración de manuscritos para publicación en revistas científicas en general.

DERECHOS DE AUTOR (*copyright*)

Es un conjunto de normas jurídicas y principios que afirman los derechos morales y patrimoniales que la ley concede a los autores, por el simple hecho de la creación de una obra literaria, artística, musical, científica o didáctica, publicada

o inédita¹. Protege la expresión original contenida en un trabajo (palabras, sonidos o imágenes utilizados para expresar una idea o transmitir una información). No protege el material conceptual o fáctico. Se otorga sólo a trabajos originales (que no hayan sido copiados, consciente o inconscientemente, de alguna otra fuente) sin considerar calidad o novedad.

El autor controla el *copyright* desde el inicio y automáticamente posee ciertos derechos sobre el trabajo, los cuales se transfieren (ej., a la editorial, si es un trabajo científico) y administran.

PLAGIO

Es el uso o imitación cercana del lenguaje y los pensamientos de otro autor, y la representación de ellos como trabajo original propio². Puede tomar diferentes formas, que se describen a continuación en orden creciente de gravedad, con los correspondientes motivos y/o consecuencias³:

- 1. De Fuente Secundaria (Citación Inexacta):** se utiliza una fuente secundaria, pero se cita una fuente primaria contenida en dicha fuente secundaria. No se reconoce el trabajo de otros autores y se da un falso sentido de la magnitud de la revisión de la literatura que se utilizó en la investigación informada.
- 2. De fuente inválida (Citación Inconducente, Fabricación, Falsificación):** se hace referencia a una fuente inexistente o incorrecta. Puede ser el resultado de una investigación poco cuidadosa, o una forma de incrementar el número de referencias, ocultando investigaciones inadecuadas.

¹ Dirección Nacional de Derecho del Autor (DNDA). www.argentina.gob.ar/justicia/derechodeautor (consultado oct. 2018).

² Boss J.M. (2010) The Ethics of Scientific Publishing. In: Dos and Don'ts for Authors and Reviewers, p.8-10. Reprinted from AAI Newsletter November 2009-May 2010. www.aai.org/AAISite/media/Publications/AAI_Dos_Donts (consultado oct. 2018).

³ iThenticate: Plagiarism detection software. www.ithenticate.com (consultado oct. 2018)

3. **Duplicación (Autoplagio, Reutilización):** el autor usa trabajos o publicaciones de sus estudios previos sin atribuirlos a esas fuentes. Para algunos es debatible y depende del contenido duplicado; para otros, constituye plagio (ver Boss, 2010³).
4. **Parfraseo (Plagio, Robo Intelectual):** Se toma lo elaborado por otro y se le cambian palabras, dando a entender que es creación intelectual propia y no de otra fuente. Va desde el simple parfraseo hasta la reescritura completa del contenido, manteniendo la idea o concepto original.
5. **Investigación Repetitiva (Autoplagio, Reutilización):** se repiten datos o textos propios de similares estudios y metodologías, sin la apropiada atribución a la fuente. Ocurre generalmente cuando se repiten investigaciones que dan resultados similares, sin citar el trabajo anterior.
6. **Repetición (Violación del Envío del Autor):** se envía un mismo manuscrito a distintas editoriales. Se recarga el sistema de gestión editorial y no se cumple con el principio de “originalidad” en el envío.
7. **Atribución Engañosa (Autoría Inexacta):** la lista de autores es inexacta o incompleta. Si es incompleta, se niega reconocimiento a quien(es) ha(n) realizado contribuciones parciales relevantes; si es inexacta, se incluyen autores que no han hecho ninguna contribución, otorgando méritos indebidamente.
8. **Colaboración No Ética (Autoría Inexacta):** quienes trabajan juntos violan algún código de conducta. El uso del trabajo escrito, las ideas, etc., que surgen de investigaciones colaborativas sin aclarar la naturaleza de las mismas y sin mencionar a los participantes, es un problema ético. El uso el trabajo o ideas de otro sin la atribución apropiada, es plagio
9. **Plagio Literal (Copiar y Pegar; Robo Intelectual):** se copian palabras de otro sin atribución apropiada (la que debe indicarse, por ej., mediante indentación, encomillado, uso de letra cursiva). Puede tomar dos formas: (a) se realiza la atribución apropiada, pero no se aclara que lo escrito es copia textual; (b) no se realiza la atribución apropiada y se usan palabras de otro como propias.
10. **Plagio Completo (Robo Intelectual):** es la situación extrema, de carácter gravísimo.
- De todos modos, conviene aclarar que se pueden volver a publicar datos que han sido publicados como resúmenes de eventos científicos (excepto los expandidos, con gráficos y figuras); tesis de grado y posgrado (algunas revistas otorgan permiso automático si se aclara que son parte de tales obras; en otras, se debe solicitar permiso), y artículos completos, acompañados de comentarios, o traducciones (en este caso debe figurar el número de permiso otorgado por la editorial que administra el *copyright*). Para las revistas *OAJ* se debe considerar el tipo de licencia de uso que poseen (ej., *Creative Commons=CC*)
- Para finalizar, y como lo han expresado repetidamente editores y revisores, el respeto por las reglas estándares consensuadas por la comunidad científica global facilita la toma de decisiones sobre los trabajos sometidos a evaluación, el reconocimiento de los aportes individuales de los involucrados en las distintas etapas de las investigaciones –que serán considerados por otros para el otorgamiento de subsidios y/o becas competitivas, ingresos y promociones en el sistema de CyT y Educación Superior, entre otros–, y el mantenimiento de la calidad académica de las revistas científicas, propiciando el avance del conocimiento científico y sus aplicaciones para el desarrollo y bienestar de la sociedad.

Elsa L. Camadro
Editor General



COMPARACIÓN DEL ORDENAMIENTO DE PREDICCIONES BLUP Y LA RESPUESTA A LA SELECCIÓN EN CONEJOS CUANDO EL EFECTO AÑO-ESTACIÓN SE CONSIDERA FIJO O ALEATORIO

COMPARISON OF THE BLUP PREDICTION ORDER AND THE RESPONSE TO SELECTION IN RABBITS WHEN THE EFFECT YEAR-SEASON IS CONSIDERED TO BE EITHER FIXED OR RANDOM

Fernández E.N.^{1,2,*}, Abbiati N.N.^{1,2}, Rovegno M.S.¹, Gonzalez C.P.¹, Martínez R.D.^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Lomas de Zamora;

² IIPAAS (Instituto de Investigación en Producción Agropecuaria Ambiente y Salud), FCA-UNLZ

* Autor correspondiente: ednfer@yahoo.com

ABSTRACT

In close reproductive lines of rabbits reared in discrete generations, there is a strong association between the year-season (AE) and the levels of consanguinity (F). Previous studies have shown that when AE and F were considered as fixed effects in a model, the heritability and the genetic tendency were overestimated. The objective of this work was to investigate the consequences of considering AE as either a fixed (M1) or random (M2) effect on the selection of animals. A total of 15,671 records corresponding to the number of rabbits weaned in line A, from the Department of Animal Science of the Polytechnic University of Valencia, Spain, were used. The comparison of models was based on the rankings of the estimated additive genetic values in each generation and the expected response to the selection. Six scenarios were proposed, varying in selection intensities. In each one, the Spearman correlation was estimated and the percentage of discordance (D) between the animals chosen for M2 but not for M1 was calculated. The response to selection for the animals chosen by either M1 or M2, was estimated as the slope of the regression line between the means of the genetic values predicted by M2 through generations. As the selection pressure decreased, the Spearman correlations increased, decreasing the D. However, at the generation level, both estimators did not always maintain that relationship. The estimated responses to selection were similar when the selection was based on estimated breeding values obtained by using either M1 or M2. Therefore, no differences are expected between both models with respect to selection.

Key words: mixed models, Spearman's correlation, genetic trend, rabbits

RESUMEN

En líneas de conejos reproductivamente cerradas, criadas con generaciones discretas, existe una fuerte asociación entre el año-estación (AE) y los niveles de consanguinidad (F). Estudios realizados anteriormente mostraron que, cuando AE y F son considerados como efectos fijos en un modelo, la heredabilidad y la tendencia genética se sobreestiman. El objetivo del trabajo fue investigar las consecuencias de considerar AE como fijo (M1) o aleatorio (M2) sobre la selección de animales. Se utilizaron 15671 registros correspondientes al número de destetados de la línea A, del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia, España. Los modelos fueron comparados en base a: los ordenamientos de los valores genéticos aditivos estimados en cada generación y la respuesta esperada a la selección. Se plantearon seis escenarios según intensidades de selección. En cada uno se estimó la correlación de Spearman y se calculó el porcentaje de discordancia (D) entre los animales elegidos por M2 y no por M1. La respuesta a la selección para los animales escogidos por M1 o M2, fue estimada como la pendiente de la recta de regresión entre las medias de los valores genéticos predichos por M2 a través de las generaciones. A medida que disminuyó la presión de selección, aumentaron las correlaciones de Spearman, disminuyendo los D. Aunque, a nivel generación ambos estimadores no mantuvieron siempre la misma relación. Las respuestas a la selección estimadas fueron similares para los animales seleccionados por M1 o M2, con lo cual no se esperan diferencias entre ambos modelos respecto a la selección.

Palabras clave: modelos mixtos, correlación de Spearman, tendencia genética, conejos

Fecha de recepción: 29/05/2018
Fecha de aceptación de versión final: 07/08/2018

INTRODUCCIÓN

El primer programa de mejora genética formal en conejos a nivel internacional, fue desarrollado por el INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*) en Francia a comienzo de la década de los años 70 (Legault *et al.*, 1996). A principios de la década del 80, se iniciaron en España los programas de selección de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y del IRTA (*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*) en Cataluña (Blasco, 2002). Los programas de mejora genética tienen por objeto producir el material que luego es difundido a los productores (Rochambeau, 1988). Estos programas, combinan selección dentro de líneas y cruzamientos entre líneas. Los núcleos de selección realizan el trabajo de formar y seleccionar líneas maternas y paternas especializadas, que luego son utilizadas en un cruzamiento de tres vías; en una primera etapa se cruzan dos líneas maternas que producen hembras cruza, que luego son apareadas en criaderos comerciales con machos provenientes de una línea paterna (Matheron y Rouvier, 1977; Blasco, 1996; Baselga, 2004; Antonini y Cordiviola, 2010; Lavara *et al.*, 2011). En el caso de las líneas maternas, el rasgo a mejorar se relaciona con el tamaño total de camada al nacimiento (NT) o al destete (ND) ya sea por selección directa o indirecta (Estany *et al.*, 1989; Garreau *et al.*, 2004). Si bien estos rasgos tienen baja heredabilidad y los machos no los expresan de manera directa, son fáciles de medir a un costo bajo (Santacreu, 2002; Baselga *et al.*, 2003; Sorhue *et al.*, 2013). A los efectos de estimar la respuesta a la selección para ND en la línea A de origen español, García y Baselga (2002) condujeron un experimento en el cual se compararon dos métodos de estimación. El primero consistió en la comparación de medias de dos grupos, uno control (criopreservado en la generación 19), y otro con selección hasta la generación 26. El segundo se basó en la utilización de un modelo mixto que incluyó como efectos aleatorios al valor genético aditivo (a) y al efecto permanente de la hembra (p) y como fijos al estado fisiológico de la hembra al momento de la monta (EF) y al año estación (AE). La respuesta a la selección estimada con el primer enfoque fue de 0,085 gazapos destetados por generación, valor coincidente con la tendencia fenotípica del carácter a través de las generaciones. Sin embargo, la respuesta basada en el modelo mixto fue de 0,175 gazapos por generación. Este resultado condujo a los autores a cuestionar el modelo de predicción empleado y a plantear la hipótesis de que dichas diferencias podrían atribuirse a

efectos dominantes, no considerados en el modelo. Por otro lado, en líneas reproductivamente cerradas y criadas en generaciones discretas (como la línea A), existe una fuerte asociación o co-linealidad entre AE y los niveles de consanguinidad (F) (Ragab y Baselga, 2011). Esto conduce a estimaciones de la depresión consanguínea con altos errores, que no permiten estadísticamente declarar su signo, tal como fue observado por diversos autores (Nagy *et al.*, 2013^a; Ragab *et al.*, 2015). Estudios posteriores realizados en varias líneas maternas de conejos, mostraron que cuando AE y F son considerados como efectos fijos en el modelo mixto, ambos efectos se estiman inadecuadamente, observándose una tendencia negativa para el AE, una estimación de la depresión consanguínea positiva y con elevado error estándar (Fernández, 2016; Fernández *et al.*, 2017). Los autores concluyeron que, en líneas cerradas reproductivamente donde se espera una co-linealidad entre AE y F, la inclusión del AE como efecto aleatorio en el modelo mixto, produce estimaciones de la depresión consanguínea interpretables biológicamente (con menores errores estándar), tendencias genéticas comparables a las fenotípicas y, en el caso de la línea A, similar a la respuesta obtenida mediante una línea control por García y Baselga (2002).

El objetivo de este trabajo fue comparar dos modelos mixtos, diferenciados por incluir al AE como fijo o aleatorio, en relación al *ranking* de los valores genéticos aditivos predichos y a la respuesta estimada a la selección para el carácter ND.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Animal

Los datos analizados provienen de la línea materna A, fundada a partir de 1976 en el departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), España. La misma fue seleccionada por ND por medio de un índice de selección con información variable y el núcleo de selección se mantuvo cerrado reproductivamente desde su fundación (Baselga *et al.*, 1984; Estany *et al.*, 1989; Mínguez, 2011). Las hembras de la siguiente generación fueron seleccionadas de entre los mejores 25 a 30% apareamientos evaluados, con un límite de 4 hembras por apareamiento. Cada macho contribuyó con un hijo a la siguiente generación, que se seleccionó del mejor apareamiento de cada macho, como una medida de reducir

el incremento de la consanguinidad. La selección fue realizada sin superposición de generaciones (generaciones discretas). Las hembras fueron servidas por primera vez alrededor de las 17 semanas de edad y posteriormente a los 10-12 días post destete, realizándose el diagnóstico de gestación mediante palpación abdominal el día 12 post-cubrición. Las hembras que no aceptaron el macho, fueron nuevamente presentadas al macho una semana después y las conejas que no resultaron gestantes fueron vueltas a servir. Siempre se evitaron los apareamientos entre animales con abuelos comunes para controlar el incremento de la consanguinidad. A los mismos efectos, el número de machos utilizados por generación fue muy superior al necesario para la producción (25 machos para 120-150 hembras). Las camadas se criaron con sus madres durante 28 días, momento en el cual se realizó el destete y se registró el ND.

Los datos analizados abarcaron un período de 30 años, comprendidos entre los años 1980 y 2009. Se dispuso de una base de datos de ND de 15671 registros provenientes de 4853 conejas. El archivo de genealogía presentó 5668 registros con la identificación del animal, su padre y madre. El número de madres y padres únicos en este archivo fue de 1663 (67%) y 812 (33%), respectivamente. Se cubrió un total de 38 generaciones incluyendo la población base, de la que no se dispuso la identificación de padre y madre.

Modelos Estadísticos

Se emplearon dos modelos animales con repetibilidad (M1 y M2) que incluyeron los efectos fijos: el estado fisiológico de la hembra al momento del apareamiento (EF) con 5 niveles (nulípara, primípara lactante, primípara no lactante, múltipara no lactante y múltipara lactante), el coeficiente de consanguinidad de las conejas (F) como co-variable y en el caso de M1 el año-estación (AE) con 114 niveles como una combinación entre estaciones y el año de la parición. Como efectos aleatorios se incluyeron el valor genético aditivo (a), el efecto permanente de la hembra (p) y en M2 el AE. En notación matricial los modelos pueden escribirse como:

Modelo 1:

$$ND = \mu + X_{EF} t + X_{AE} s + F b + Z_a a + Z_p p + e$$

Donde μ , t y s son los vectores de efectos fijos para la media general, EF y AE respectivamente. F representa el vector de consanguinidades y b su coeficiente de regresión lineal. Los vectores a , p y e son las componentes aleatorias del

modelo: valor genético aditivo, efecto permanente de la hembra y el error, respectivamente. X_{EF} , X_{AE} , Z_a y Z_p son matrices de incidencia que asocian ND a sus respectivos efectos.

Modelo 2:

$$ND = \mu + X_{EF} t + F b + Z_a a + Z_p p + Z_{ae} ae + e$$

donde ae es el vector de efectos aleatorios para AE y Z_{ae} su respectiva matriz de incidencia.

Los componentes de varianza fueron estimados mediante Máxima Verosimilitud Restringida (REML) con el algoritmo *Average Information* (AI). Para los efectos aleatorios se consideraron distribuciones normales. Para el caso de M2, la matriz de (co) varianzas fue:

$$Var \begin{bmatrix} a \\ p \\ ae \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & I\sigma_p^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & I\sigma_{ae}^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

donde A es la matriz de relaciones genéticas aditivas de Wright (Faux y Gengler, 2014), I la matriz de identidad y σ_a^2 , σ_p^2 , σ_{ae}^2 y σ_e^2 , las varianzas: genética aditiva, permanente, del año-estación y del error, respectivamente. El M1 no incluyó la matriz de varianzas asociada al efecto AE.

Criterios de comparación de los Modelos

Ambos modelos fueron comparados en base a dos criterios. Por un lado, se compararon los ordenamientos de los valores genéticos aditivos estimados (BLUP(a)) de las hembras en cada generación y por otro, ambos modelos se contrastaron en relación a la respuesta esperada a la selección estimada incluyendo machos y hembras.

Para el primer criterio se confeccionó, por generación, un ordenamiento descendente de los BLUP(a) para M1 y M2 (*ranking*). Se plantearon seis escenarios acordes a diferentes intensidades de selección en cada generación: generación completa (T), y las mejores 5 (T5), 10 (T10), 20 (T20), 30 (T30) y 40 (T40) conejas, basadas en las predicciones de M2. Para los animales escogidos en cada escenario, se estimó la correlación de Spearman entre los *rankings* de ambos modelos. A excepción del escenario T, el estudio de los ordenamientos fue completado con el cálculo del porcentaje de discordancia (D), como una medida de la cantidad porcentual de animales que fueron elegidos por M2 y no por M1. Para la estimación de la respuesta a la selección esperada cada uno de los escenarios, T5 a T40, fue incrementado con los mejores animales

machos en una cantidad equivalente al 50% del número de hembras respectivas (por ejemplo, el T20 conformado por 20 hembras, fue incrementado con 10 machos). En todos los casos se armaron dos grupos, el primero estuvo representado por los animales escogidos según los BLUP(a) de M1 y el otro, por los seleccionados según los BLUP(a) de M2. La respuesta a la selección fue estimada en ambos grupos de animales y cada escenario como la pendiente de la recta de regresión entre las medias de los BLUP(a) predichos por M2 a través de las generaciones. Se empleó un modelo autorregresivo de orden 1 (AR(1)) que contempló la falta de independencia entre las medias involucradas a lo largo de las generaciones. La elección de la estructura de la matriz de covarianzas del error del modelo de regresión se basó en el criterio de información de Akaike.

Las estimaciones de los componentes de varianza y de los efectos fijos y aleatorio de ambos modelos fueron obtenidos mediante el software Wombat (Meyer, 2007). Para el resto de los análisis se empleó el software SAS (2016).

RESULTADOS

Las estimaciones de las correlaciones de Spearman fueron, en términos generales, altas. Los valores medios, considerando todas las generaciones, van en aumento a medida que disminuyó la presión de selección (T5 a T), mientras que los errores estándares (EE) decrecieron en

dicha dirección. Las correlaciones y sus EE, oscilaron entre 0,84 (0,043) y 0,99 (0,001), tal como puede observarse en la Tabla 1. El porcentaje de discordancia promedio, para el conjunto de todas las generaciones, disminuyó al decrecer la presión de selección (T5 a T40). Es importante destacar que la variabilidad fue alta, en especial para los escenarios de altas intensidades de selección, por ejemplo, el coeficiente de variación para T5 fue del 81% y para T40 del 54%. Los valores estimados oscilaron entre 6,18 (0,539) y 16,84 (2,203). Las estimaciones se muestran en la Tabla 2. Analizando ambos enfoques, se detectó la presencia de generaciones con el mismo porcentaje de discordancia y correlaciones de Spearman diferentes, como en las generaciones 5 y 11 de T20 con un porcentaje de discordancia del 5% y correlaciones de 0,70 y 0,97, respectivamente. Además, se detectaron generaciones con correlaciones bajas y discordancias diferentes, por ejemplo, en las generaciones 5 y 28 de T20 con correlaciones de 0,70 y 0,76 y discordancias del 5% y el 15%, respectivamente (Figura 1). Casos similares se observaron para las T40 pero con menor variabilidad en las discordancias y correlaciones a lo largo de las generaciones. Las pendientes estimadas entre las medias generacionales de los BLUP(a) obtenidos con M2 fueron similares para los animales seleccionados por M1 o M2 en todos los escenarios. Al aumentar la intensidad de selección (T40 a T5) se observó un incremento en las estimaciones de la ordenada al origen. Estos resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 1. Promedio generacional y Error Estándar de las Correlaciones de Spearman entre los BLUP(a) de los modelos M1 y M2, para el carácter Número de Destetados en la Línea A.

Escenarios de intensidad de selección					
T5	T10	T20	T30	T40	T
0,84 (0,043)	0,85 (0,020)	0,91 (0,010)	0,93 (0,008)	0,94 (0,005)	0,99 (0,001)

T, T5, T10, T20, T30 y T40 representan a todas o a las 5, 10, 20, 30 y 40 mejores conejas en cada generación, respectivamente.

Tabla 2. Promedio generacional y Error Estándar de los Porcentajes de Discordancia entre las conejas elegidas por M2 y no por M1 sobre la base de los BLUP(a) para el carácter Número de Destetados en la Línea A.

Escenarios de intensidad de selección				
T5	T10	T20	T30	T40
16,84 (2,203)	10,79 (1,430)	8,55 (0,820)	7,37 (0,521)	6,18 (0,539)

T5, T10, T20, T30 y T40: representan a las 5, 10, 20, 30 y 40 mejores conejas en cada generación, respectivamente.

Tabla 3. Estimaciones de los parámetros (Ordenada y Pendiente) y Errores Estándares de las regresiones de las medias de los valores genéticos aditivos desde el Modelo 2, a lo largo de las generaciones

Escenario	Animales seleccionados por			
	M1		M2	
	Ordenada	Pendiente	Ordenada	Pendiente
T5	0,68 (0,147)	0,10 (0,006)	0,69 (0,145)	0,10 (0,006)
T10	0,56 (0,146)	0,10 (0,006)	0,57 (0,146)	0,10 (0,006)
T20	0,42 (0,148)	0,10 (0,006)	0,42 (0,148)	0,10 (0,006)
T30	0,32 (0,156)	0,10 (0,006)	0,32 (0,156)	0,10 (0,006)
T40	0,27 (0,156)	0,10 (0,006)	0,27 (0,156)	0,10 (0,006)

T5, T10, T20, T30 y T40: representan a las 5, 10, 20, 30 y 40 mejores hembras y los 3, 5, 10, 15 y 20 mejores machos en cada generación, respectivamente.

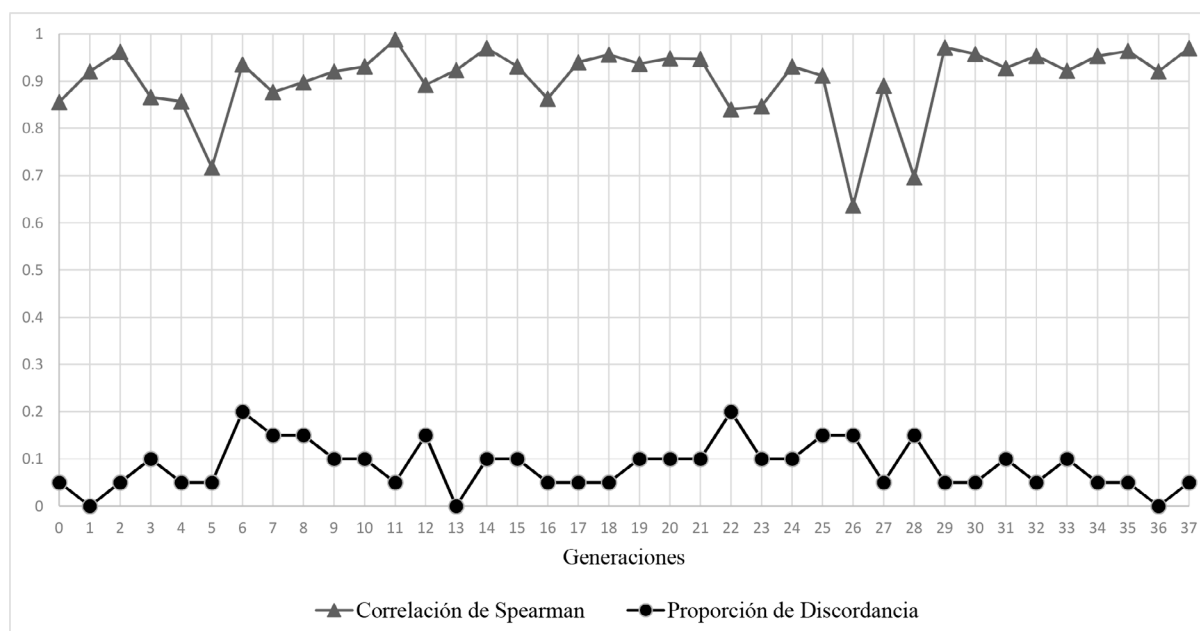


Figura 1. Porcentaje de discordancias y correlaciones de Spearman a través de las generaciones en el escenario T20 para el carácter ND en la Línea A.

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos evaluado dos modelos donde el AE, grupo de contemporáneos (GC), ha sido tratado como fijo o aleatorio. Los criterios de comparación han sido el *ranking* de los valores genéticos predichos y la respuesta esperada a la selección. La conveniencia de tratar a un GC de una u otra manera ha sido abordada por muchos autores. Henderson (1973), propuso considerar al efecto rodeo-año estación en bovinos como fijo, para evitar el sesgo producido por la asociación direccional entre padres y rodeos. Estudios de simulación, indicaron que la varianza de predicción de los valores aditivos aumenta cuando los GC fueron fijos y que el modelo con GC aleatorio con una estructura AR(1) fue superior en términos de respuesta a la selección, exactitud y error cuadrático medio (Vitezica, 1999). Fernández *et al.* (2017) concluyeron que, en líneas cerradas reproductivamente donde se espera un incremento considerable de la consanguinidad, la inclusión del AE como efecto aleatorio mejora la estimación de parámetros genéticos tales como la heredabilidad, la depresión consanguínea y la respuesta a la selección (sobrestimada cuando el AE fue fijo). Algunos trabajos han evaluado diferencias en el ordenamiento de los valores genéticos aditivos entre diferentes modelos diferenciados por presentar o no algún efecto específico (Varona *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2013a, 2013b; Nagy *et al.*, 2014; Gallardo *et al.*, 2010). En cerdos, también se estudió la capacidad de predecir observaciones excluidas del modelo de análisis cuando el efecto rodeo-período fue tratado como fijo o aleatorio, recomendándose esta última opción (Frey *et al.*, 1997). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos relacionados a diferencias de ordenamiento de los valores genéticos aditivos, cuando los modelos a comparar sólo difieren en la consideración de un efecto como fijo o aleatorio. En este estudio, las correlaciones de Spearman fueron altas, cercanas a la unidad, en especial cuando se consideran las generaciones completas (T), disminuyendo al simular mayores intensidades de selección. Esta disminución promedio de la correlación de Spearman para los escenarios T a T5, fue acompañada con un aumento en el porcentaje de discordancia promedio (Tablas 1 y 2). Este resultado es compatible con el hallado por Nagy *et al.* (2014) en conejos y Gallardo *et al.* (2010) en peces, quienes sin discriminar por generación, encontraron en el grupo de los animales con mejor valor de cría estimado cierto grado de reordenamiento en la comparación de

sus modelos, independientemente de la alta correlación hallada. En este trabajo, además, las estimaciones en los diferentes escenarios fueron realizadas en cada una de las generaciones, observándose variaciones en la relación entre el coeficiente de Spearman y el porcentaje de discordancias, como por ejemplo la que se muestra en la Figura 1 para el escenario T20. Las estimaciones de la respuesta a selección por caracteres de prolificidad, expresadas en gazapos por generación, son variables en la bibliografía. En general oscilan entre 0,05 y 0,13 gazapos por generación (Ragab, 2009). En particular para el carácter ND se han reportado estimaciones de 0,08; 0,07 y 0,05 en las líneas francesas INRA1077 y INRA2066 (Bolet y Saleil, 2002a; 2002b) y la española V (Fernández *et al.*, 2017). Estimaciones más bajas entre 0,04 y 0,03 fueron reportadas por Moura *et al.* (2001) en la raza Botucatu desarrollada en Brasil y por Fernández *et al.* (2017) en la línea H de origen español. Como se mencionó anteriormente, García y Baselga (2002) estimaron respuestas de 0,085 (usando una línea control) y de 0,175 (mediante modelos mixtos con AE como efecto fijo), empleando 26 generaciones para la línea A. Posteriormente Fernández *et al.* (2017) en esta línea y con datos de 38 generaciones, obtuvieron una estimación de 0,10 cuando emplearon el M2, compatibilizando de esta manera con la respuesta obtenida mediante la población control y con la tendencia fenotípica mostrada por este carácter. Un resultado equivalente se obtuvo en este trabajo considerando diversos escenarios. En ellos, las pendientes de las regresiones de las medias de los valores genéticos aditivos predichos por M2 sobre las generaciones (de los animales elegidos por M1 o M2), no mostraron diferencias a favor de M2 y fueron las mismas en todos los escenarios. Como era esperable las ordenadas al origen incrementaron con la presión de selección.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos para el número de gazapos destetados en la línea A de conejos, indicaron que a los efectos de estudiar la estabilidad de las predicciones genéticas al comparar los modelos que sólo se diferencian en considerar al factor año-estación como fijo o aleatorio, es necesario complementar el estudio de la correlación entre ordenamientos, con el porcentaje de discordancias. Esto se debe a que las estimaciones de las correlaciones no siempre fueron consistentes con los cambios en los

ordenamientos de los valores de cría estimados. Hemos verificado en esta línea, que cuando se empleó el modelo con el año año-estación aleatorio, las medias de los valores genéticos estimados de los animales escogidos por ambos modelos siguieron la misma tendencia a lo largo del tiempo en cualquiera de los escenarios propuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Antonini A.G., Cordiviola C. (2010) Mejoramiento genético en conejos para carne (*Oryctolagus cuniculus*). BAG, J. Basic Appl. Genet. 21 (2): 1-7.
- Baselga M., Blasco A., Estany J. (1984) Índice de selección de caracteres reproductivos con información variable. En Proc. 3rd World Rabbit Congress, Rome, Italy; I: 62-65.
- Baselga M., García M.L., Sánchez J.P., Vicente J.S., Lavara R. (2003) Analysis of reproductive traits in crosses among maternal lines of rabbits. Anim. Res. 52: 473-479.
- Baselga M. (2004) Genetic improvement of meat rabbits. Programmes and diffusion. En Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico; pp. 1-13.
- Blasco A. (1996) Genetics of litter size and does fertility in the rabbit. En Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France; 2: 219-227.
- Blasco A. (2002) La mejora genética del conejo en España en los últimos 25 años. En XXVII Symposium de Cunicultura, Reus, España.
- Bolet G., Saleil G. (2002a) Strain INRA1077. In: Khalil M.H., Baselga M. (Eds.) Rabbit genetic resources in Mediterranean countries. Options méditerranéennes, SERIE B: Etudes et recherches, Número 38, CIHEAM, Zaragoza, España; pp. 109-116.
- Bolet G., Saleil G. (2002b) Strain INRA2066. In: Khalil M.H., Baselga M. (Eds.) Rabbit genetic resources in Mediterranean countries. Options méditerranéennes, SERIE B: Etudes et recherches, Número 38, CIHEAM, Zaragoza, España; pp. 117-124.
- Estany J., Baselga M., Blasco A., Camacho J. (1989) Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits. Livest. Prod. Sci. 21: 67-76.
- Faux P., Gengler N. (2014) A review of inversion techniques related to the use of relationship matrices in animal breeding. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 18 (3): 397-406.
- Fernández E.N. (2016) Estimación de efectos genéticos aditivos y no aditivos en líneas maternas de conejos. Tesis Doctoral, Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Fernández E.N., Sánchez J.P., Martínez R., Legarra A., Baselga M. (2017) Role of inbreeding depression, non inbred dominance deviations and random year season effect in genetic trends for prolificacy in closed rabbit lines. J. Anim. Breed. Genet. 134 (6): 441-452.
- Ferreira G.B., MacNeil M.D., Van Vleck L.D. (1999) Variance components and breeding values for growth traits from different statistical models. J. Anim. Sci. 77 (10): 2641-2650.
- Frey M., Hofer A., Künzi N. (1997) Comparison of models with a fixed or a random contemporary group effect for the genetic evaluation for litter size in pigs. Livestock Production Science 48 (2): 135-141.
- Gallardo J.A., Lhorente J.P., Neira R. (2010) The consequences of including non-additive effects on the genetic evaluation of harvest body weight in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Genetics Selection Evolution 42 (1): 19.
- García M.L., Baselga M. (2002) Genetic response to selection for reproductive performance in a maternal line of rabbits. World Rabbit Sci. 10: 71-76.
- Garreau H., Piles M., Larzul C., Baselga M., Rochambeau H. (2004) Selection of maternal lines: last results and prospects. En Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico; pp. 14-25.

- Henderson C.R. (1973) Sire evaluation and genetic trends. En Proc. Animal Breeding and Genetics Symposium in Honor of Dr. Jay L. Lush. ASAS, ADSA, PSA, pp. 10-41.
- Lavara R., Vicente J.S., Baselga M. (2011) Genetic parameter estimates for semen productive traits and growth rate of a paternal rabbit line. *J. Anim. Breed. Genet.* 128: 44-51.
- Legault C., Menissier F., Merat P., Ricordeau G., Rouvier R. (1996) Les lignées originales de l'INRA: historique, développement et impact sur les productions animales. *INRA. Prod. Anim. Hors-série*, pp. 41-56.
- Matheron G., Rouvier R. (1977) Optimisation du progrès génétique sur la prolificité chez le lapin. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 9: 393-405.
- Meyer K. (2007) WOMBAT – A tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8 (11): 815-821.
- Mínguez C. (2011) Comparación de cuatro líneas maternas de conejo en caracteres de crecimiento. Tesis de Maestría, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Moura A.S.A.M.T., Costa A.R.C., Polastre R. (2001) Variance components and response to selection for reproductive litter and growth traits through a multipurpose index. *World Rabbit Sci.* 9: 77-86.
- Nagy I., Gorjanc G., Curik I., Farkas J., Kiszlinger H., Szendrös Z. (2013a) The contribution of dominance and inbreeding depression in estimating variance components for litter size in Pannon White rabbits. *J. Anim. Breed. Genet.* 130: 303-311.
- Nagy I., Gyovai P., Radnai I., Nagyné-Kiszlinger H., Farkas J., Szendrös Z. (2013b) Genetic parameters, genetic trends and inbreeding depression of growth and carcass traits in Pannon terminal line rabbits. *Archiv. Tierzucht.* 56: 191-199.
- Nagy I., Farkas J., Curik I., Gorjanc G., Gyovai P., Szendrös Z. (2014) Estimation of additive and dominance variance for litter size components in rabbits. *Czech J. Anim. Sci.* 59 (4): 182-189.
- Ragab M. (2009) Productive characteristics of four maternal lines of rabbits. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Ragab M., Baselga M. (2011) A comparison of reproductive traits of four maternal lines of rabbits selected for litter size at weaning and founded on different criteria. *Livest. Sci.* 136: 201-206.
- Ragab M., Sánchez J.P., Baselga M. (2015) Effective population size and inbreeding depression on litter size in rabbits. A case study. *J. Anim. Breed. Genet.* 132: 68-73.
- Rochambeau H. (1988) Genetic of rabbit for wool and meat production. En Proc. 4th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary; pp. 1-68.
- Santacreu M.A. (2002) Estado y demandas actuales de los programas de mejora del conejo de carne. *I.T.E.A. A:* 89-97.
- SAS Institute Inc. (2016) SAS/STAT ® 9.4. Cary, NC: SAS Institute Inc., USA.
- Sorhue G.U., Akporhwarho P.O., Udeh I., Mmereole F.U.C. (2013) Estimates of genetic parameters of litter size traits at birth and weaning in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) raised in Anwai community, South Nigeria. *Rabbit Gen.* 3 (1): 7-14.
- Varona L., Misztal I., Bertrand J.K., Lawlor T.J. (1998) Effect of full sibs on additive breeding values under the dominance model for stature in United States Holsteins. *J. Dairy Sci.* 81 (4): 1126-1135.
- Vitezica Z.G. (1999) Especificación de la distribución de los efectos de grupos de contemporáneos en poblaciones bajo selección. Tesis de Magister Scientiae, Área Biometría y Mejoramiento, Universidad de Buenos Aires, Argentina.



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los responsables del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia, España, por permitirnos utilizar la base de datos histórica de la línea maternal de conejos A.



NUEVOS MARCADORES MITOCONDRIALES MEJORAN LA FILOGENIA DE LA TORTUGA CAREY *Eretmochelys imbricata* (TESTUDINES: CHELONIIDAE)

NEW MITOCHONDRIAL MARKERS IMPROVE THE PHYLOGENY OF THE HAWKSBILL TURTLE *Eretmochelys imbricata* (TESTUDINES: CHELONIIDAE)

Beltrán-Torres G.C.¹, Hernández-Fernández J.^{1,*}

¹ Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Grupo de Investigación en Genética, Biología Molecular y Bioinformática-GENBIMOL, Carrera 4 No. 22-61, Bogotá, Colombia.

* Autor correspondiente: javier.hernandez@utadeo.edu.co

ABSTRACT

The sea turtles (Cheloniidae) are a group of seven species of cretaceous origin. Analyses of partial mitochondrial sequences have revealed phylogenetic inconsistencies within this group. Nevertheless, these mitochondrial markers have allowed us to understand, explain and clarify population composition in areas of foraging, reproductive habits, inferences of migration patterns and, also, to define management units in the world, in order to trace conservation and monitoring plans. In this study, four methods were evaluated and compared for phylogenetic inference (Neighbor-Joining-NJ, Maximum Likelihood-ML, Maximum Parsimony-MP and Bayesian inference-BI) by using coding genes, ribosomal genes and full mitogenomes of the hawksbill, *E. imbricata*, and other six species of sea turtles obtained from GenBank. The sequences were analyzed independently and jointly to identify the method and marker that better explain the phylogenetic relationships among this group of reptiles. The NJ, ML, MP and BI trees showed that ND2, COX1, 16S rRNA, ND5, 12S rRNA, ND4 and COX3 are the markers that give phylogenetic trees with better resolution and support, with bootstrap values ranging from 89.0% to 99.98%. ATP6, ATP8, COX2, ND1, ND3, ND5 and ND4L genes presented polytomies. The analysis with full mitogenome often provides highly supported trees (bootstrap 98.0%) compared with single marker analysis. Trees obtained with the BI method and the ND2 gene is the one that better resolved the evolutionary relationships among the species, consolidating the position of *E. imbricata* within the Caretini tribe with a value of posterior probability of 0.98-1.0. The markers ND2, ND4, ND5 and COIII, not used in previous works, represent a new alternative to explain the phylogeny in this group of marine reptiles. In the present study, a complete mitogenome analysis produced robust and highly supported trees.

Key words: phylogenetic relationships, *Eretmochelys imbricata*, mitogenoma, sea turtles, *bootstrap*, polytomies

RESUMEN

Las tortugas marinas (Cheloniidae) son un grupo de siete especies originadas en el cretáceo. Análisis de secuencias parciales de DNA mitocondrial han revelado inconsistencias filogenéticas dentro de este grupo de quelonios. Sin embargo, estos marcadores mitocondriales han permitido entender y dilucidar la composición de las poblaciones en áreas de forrajeo, hábitos reproductivos, inferencias de patrones de migración y también definir las unidades de manejo en el mundo, con el fin de proponer planes de manejo y conservación. El objetivo de este estudio fue evaluar la posición de la tortuga carey *E. imbricata* dentro de la familia Cheloniidae y la filogenia de las tortugas marinas utilizando genes mitocondriales codificantes de proteínas, genes ribosómicos y el genoma mitocondrial completo de la tortuga carey anidante del Caribe colombiano, al compararlo con las otras seis especies de tortugas marinas disponibles en GenBank. Se utilizaron cuatro métodos de inferencias filogenéticas: Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verosimilitud (ML), Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB). Los árboles NJ, ML, MP e IB mostraron que ND2, COX1, 16S ARNr, ND5, 12S ARNr, ND4, COX3 y ND1 son los marcadores que presentan una mejor resolución filogenética con sustentos *bootstrap* entre 89,0% y 99,98%. Los genes ATP6, ATP8, COX2, ND3, ND4L y ND5 presentaron politomías y establecieron relaciones filogenéticas equivocadas. El análisis con el mitogenoma completo presentó árboles altamente sustentados (*bootstrap* de 98,0%) en comparación con el análisis con marcadores individuales. Los árboles obtenidos con el gen ND2 e IB resolvieron con buen sustento las relaciones evolutivas entre las especies comparadas, consolidándose la posición de *E. imbricata* dentro de la tribu Caretini con probabilidad posterior de 0,98-1,0. Los marcadores ND2, ND5, ND4, COX3 y ND1 no han sido utilizados en trabajos previos y representan una nueva alternativa para explicar la filogenia en este grupo de reptiles marinos. En el presente caso utilizando mitogenomas completos se obtuvieron árboles robustos y altamente sustentados.

Palabras clave: relaciones filogenéticas, *Eretmochelys imbricata*, mitogenoma, tortugas marinas, *bootstrap*, politomías

INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas son reptiles que aparecieron en el cretácico, han poblado los mares del mundo por más de 200 millones de años (Márquez y del Carmen Farías, 2000) y ocupan una amplia diversidad de hábitats oceánicos y costeros. La tortuga carey es componente relevante de diferentes hábitats vitales para el ecosistema (arrecifes de coral, praderas de pastos marinos, fondos blandos) (Kinan, 2002). Las tortugas marinas realizan migraciones de miles de kilómetros y tardan décadas para madurar sexualmente, por lo tanto, sirven como importantes indicadores de la salud de los ambientes costeros y marinos tanto a escala local como global (Eckert *et al.*, 2000; Heithaus, 2013).

Actualmente existen dos familias de tortugas marinas, Cheloniidae, representada por seis especies, la tortuga plana (*Natator depressus*), la tortuga golfinia (*Lepidochelys olivacea*), la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*), la tortuga caguama (*Caretta caretta*), la tortuga carey (*E. imbricata*) y la tortuga verde (*Chelonia mydas*) (Pritchard, 1999); y la familia Dermochelyidae, representada hoy en día por una sola especie, la tortuga laud (*Dermochelys coriacea*) (Trujillo-Arias *et al.*, 2014). De la primera familia anidan y/o se alimentan en las costas colombianas: *C. caretta*, *C. mydas*, *E. imbricata*, *L. olivacea* y *L. kempii*, mientras que de la segunda familia se encuentra a *D. coriacea*. Todas estas especies anidan en las dos costas, con excepción de *L. kempii* que lo hace únicamente en la costa Atlántica (Ceballos-Fonseca, 2000).

La tortuga carey *E. imbricata* (Linnaeus, 1766), es considerada una especie circumtropical que se encuentra en aguas costeras y se distribuye en las playas de 108 unidades geopolíticas (Meylan y Donnelly, 1999). Esta tortuga se reportó por primera vez como especie en peligro por la IUCN en 1968. En 1996 su estatus cambió a especie en peligro crítico, además, se encuentra registrada en el apéndice I del CITES (Amarocho, 1999; Revuelta y Tomás, 2010; Tabib *et al.*, 2011).

Estudios realizados por Bass *et al.* (1996), Bowen *et al.* (1996; 2007), Bass (1999), Abreu-Grobois (1999), Troeng *et al.* (2005), Lara-Ruiz *et al.* (2006), Velez-Zuazo *et al.* (2008), Blumenthal *et al.* (2009), Browne *et al.* (2010), Monzón-Arguello *et al.* (2010; 2011), Leroux *et al.* (2012) y Trujillo-Arias *et al.* (2014) con marcadores moleculares mitocondriales han permitido establecer la composición poblacional de la tortuga carey y describir parte de su historia de vida. Además, estos estudios basados en marcadores mitocondriales han permitido evaluar hipótesis

sobre comportamientos reproductivos y filogeográficos, composición de poblaciones de forrajeo e inferencia de patrones de migración. El conocimiento de la estructura genética puede ser utilizada para definir unidades de manejo, estrategia útil en planes de conservación (Kinan, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que en el ADNmt se acumulan y fijan mutaciones con mayor rapidez que en el nuclear, proceso que ha sido atribuido a una tasa de mutación rápida durante la replicación y a un tamaño poblacional menor por su herencia estrictamente maternal (Awise *et al.*, 1992; Liu y Cordes, 2004; Drosopoulou *et al.*, 2012).

EL ADNmt de tortugas marinas y de vertebrados en general, consiste en una molécula circular de doble cadena la cual codifica para 22 ARNt, 2 ARNr, 13 proteínas, y una región mayor no codificable (región control, D-loop) la cual contiene señales para la transcripción y replicación mitocondrial (Boore, 1999; Drosopoulou *et al.*, 2012).

Los primeros estudios de filogenia sobre tortugas marinas fueron realizados por Zangerl *et al.* (1988) y Limpus *et al.* (1988), ellos trabajaron en morfología y electroforesis de proteínas respectivamente. Sin embargo, estos primeros árboles presentaron inconsistencias dentro de la familia Cheloniidae. Estudios realizados por Bowen *et al.* (1993), Dutton *et al.* (1996) y Naro-Maciel *et al.* (2008) presentaron resultados en los que se demuestra la formación de un grupo monofilético y de dos tribus, Chelonini (*C. mydas* y *N. depressa*) y Caretteni (*L. olivacea*, *L. kempii*, *C. caretta* y *E. imbricata*). El uso de diferentes marcadores moleculares ha permitido dilucidar diferentes relaciones filogenéticas, tal es el caso de la tortuga plana (*N. depressa*) que se situaba como taxón hermano de Caretteni, basándose en los genes ND4, Cytb y la región control (Dutton *et al.*, 1996). Utilizando una mayor cantidad de datos, los genes 12S ARNr, 16S ARNr y cuatro genes nucleares, *N. depressa*, se agrupó con *C. mydas* (Naro-Maciel *et al.*, 2008).

Actualmente se ha podido secuenciar mitogenomas completos de tortugas marinas (Duchene *et al.*, 2012; Frey y Dutton, 2012; Shamblin *et al.*, 2012), aumentando la cantidad de información generada, pasando de estudios que producían conclusiones basadas en secuencias de genes de 2000 pb a estudios que utilizan más de 16000 pb. Los nuevos estudios han permitido proponer nuevas relaciones evolutivas entre las especies de quelonidos (Duchene *et al.*, 2012) y confirmar evidencias previas en las que se determinaba que el reloj molecular en tortugas marinas es

mucho más lento que otros linajes de vertebrados (Avisé *et al.*, 1992; Duchene *et al.*, 2012). El uso de esta información filogenética ha permitido resolver un debate en ecología evolutiva al realizar un mapeo sobre el árbol de relaciones de los hábitos alimenticios, el cual indicó que la tortuga espongiadora *E. imbricata* evolucionó de un antepasado carnívoro y no de uno herbívoro como se tenía entendido (Bowen *et al.*, 1993).

En el presente estudio, con los datos obtenidos en estudios previos de la secuencia del mitogenoma de una tortuga carey y las secuencias de mitogenomas obtenidos en bases de datos para otras seis tortugas marinas, se realizaron análisis en primer término para estudiar cual de 15 marcadores resuelven con mayor sustento la posición de la tortuga carey *E. imbricata* dentro de la familia Cheloniidae y la filogenia de las tortugas marinas, y en segundo término, para evaluar el uso del mitogenoma completo y compararlo con los análisis filogenéticos realizados con fragmentos parciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuenciación:

La estandarización y obtención del mitogenoma de la tortuga carey *E. imbricata* se publicó previamente en GenBank (KP221806) (Beltran-Torres *et al.*, 2013). Este mitogenoma se obtuvo amplificando 24 fragmentos contiguos de 800-1000 pb solapados en 50-100 pb. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en ambas direcciones (5'-3' y 3'-5') utilizando el método automatizado tagDyeDeoxy Terminator Cycle-sequencing en un secuenciador 3730XL (Applied Biosystems) en SSGMOL (Universidad Nacional de Colombia: <http://www.ssigmol.unal.edu.co/>). Las secuencias obtenidas se alinearon y ensamblaron utilizando el programa Geneious R6 (Biomatters Ltda., Nueva Zelanda), posteriormente se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI para todas las tortugas carey (Tabla 1) mediante la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar su identidad, y de la misma forma, identificar los genes mitocondriales.

Análisis de datos

Se realizaron cuatro análisis filogenéticos utilizando los algoritmos Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verosimilitud

(ML) e Inferencia Bayesiana (IB) utilizando el programa Geneious R6 (Biomatters Ltda., Nueva Zelanda) y Máxima Parsimonia (MP), utilizando MEGA 5.2. (Tamura *et al.*, 2011). Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando genes individuales (12S ARNr, 16S ARNr, COX1, COX2, COX3, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, CytB, ATP6 y ATP8) y mitogenomas completos de la tortuga carey, anidante del Caribe colombiano de este estudio, y cuatro individuos de carey previamente descritos (Duchene *et al.*, 2012 y Tandon *et al.* (datos no publicados) con secuencias de seis tortugas marinas disponibles en la base de datos de GenBank (Tabla 1). Adicionalmente, se utilizaron las secuencias de la tortuga acuática, *Trachemys scripta*, y de la tortuga terrestre, *Geochelone nigra*, como grupo externo. Los modelos de sustitución Tamura-Nei (TN), Hasegawa, Kishino y Yano (HKY) y Generalised Time Reversible (GTR) usados para realizar los árboles filogenéticos de NJ, ML e IB, respectivamente, se escogieron con base a los menores puntajes obtenidos en los resultados de Bayesian Information Criterion (BIC) utilizando MEGA 5.2. (Nei y Kumar, 2000; Tamura *et al.*, 2011) y de forma independiente para cada juego de datos y cada gen analizado. Para NJ, ML y MP se realizaron 1000 réplicas de *bootstrap*. Se consideraron valores *bootstrap* $\geq 70\%$ como sustento aceptable para los diferentes clados obtenidos, de acuerdo a Hillis y Bull (1993). Para el algoritmo de IB se utilizaron cuatro cadenas de MCMC, por 20 millones de generaciones, muestreando cada 2000 generaciones. El árbol consenso fue construido con los últimos 1000 árboles (*burn-in*=9000 muestras), y se obtuvo un árbol consenso con valores de probabilidad posterior (PP).

RESULTADOS

El mitogenoma completo obtenido de la tortuga carey anidante del Caribe colombiano posee un tamaño de 16386 pb. Al analizar la secuencia con la herramienta BLASTX se identificaron los trece genes codificantes de proteínas (ATP6, ATP8, COX1, COX2, COX3, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 y CytB), dos genes ribosómicos completos (12S ARNr y 16S ARNr) y 22 ARNt.

Mediante el análisis BIC se evaluaron los modelos de sustitución (Tabla 2). El mejor modelo para interpretar los genes 12S ARNr, ATP6, COX1, COX2, COX3, ND2, ND4 y ND6 fue TN, para los genes ATP8 y ND4L fue HKY y para los genes 16S ARNr, CytB, ND1, ND3, ND5

y el mitogenoma completo fue GTR (Tabla 2). De acuerdo con estos resultados se realizaron los análisis filogenéticos.

En la Figura 1 se muestran los árboles obtenidos con los diferentes análisis filogenéticos realizados con los cuatro criterios de búsqueda y generando un árbol consenso en aquéllos que demostraron una asociación congruente para este grupo de reptiles. Se demostró que los dos genes ribosómicos, 12S ARNr y 16S ARNr, y los cinco genes codificantes de proteínas COI, COIII, ND2, ND4 y ND5 son los marcadores que resuelven con la misma topología la filogenia de este grupo de reptiles, diferenciando las dos familias existentes, Dermochelyidae, con una única especie, *D. coriácea*, y Cheloniidae, donde se encuentran las otras seis especies de tortugas marinas. Se agrupan de forma congruente las dos tribus: la tribu Chelonini, con *N. depressa* y *C. mydas*, y la tribu Caretini, con las tortugas *L. kempii*, *L. olivácea*, *C. caretta* y *E. imbricata*. Dentro de la tribu Caretini las dos especies de *Lepidochelys* forman un grupo hermano, uniéndose basalmente al taxón hermano de *C. caretta*; estas tres especies forman un grupo hermano con *E. imbricata*. En todos los casos siempre se agrupan bajo un

mismo nodo las diferentes tortugas carey utilizadas como referencia y la secuenciada obtenida por Beltrán-Torres *et al.* (2013) como parte de este estudio. En las Figuras 1A, 1B, 1C y 1E, construidas con los genes individuales 12S ARNr, 16S ARNr, COI y ND2 respectivamente, se presenta una politomía dentro del grupo carey, que corresponde a las tortugas del Pacífico; se observa que estos genes explican una diferenciación geográfica en forma general pero no específica entre regiones.

A pesar de que estos siete genes mitocondriales explican de la misma manera la filogenia de las tortugas marinas (Figura 1), no todos los algoritmos usados muestran la misma filogenia en los diferentes casos. Para el gen ribosómico 12S ARNr se descartó el árbol por NJ debido a la baja resolución obtenida de la tribu Caretini. Lo mismo ocurrió con el árbol generado por NJ con el gen COIII, que presentó politomías en la diferenciación de las familias y dentro de la tribu Caretini. Para el gen ND2 los algoritmos NJ y MP presentaron politomías y sustentos inferiores al 50%, además de asociaciones atípicas dentro de la tribu Caretini (figura no presentada).

Tabla 1. Referencia de los mitogenomas de las especies de tortugas analizadas. Se presenta la longitud de la secuencia en pares de bases (pb), referencia bibliográfica y el número de entrada para la base de datos de GenBank.

Especie	Longitud (pb)	Referencia	Número de Entrada	Origen Geográfico
<i>Dermochelys coriacea</i>	16,420	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454969	México
<i>Caretta caretta</i>	16,737	Drosopoulou <i>et al.</i> (2012)	FR694649	Grecia
<i>Natator depressa</i>	16,281	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454975	Australia
<i>Chelonia mydas</i>	16,497	Kumazawa y Nishida (1999)	AB012104	Océano Atlántico
<i>Eretmochelys imbricata</i>	16,386	Beltrán-Torres <i>et al.</i> (2013)	KP221806	Colombia
<i>Eretmochelys imbricata*</i>	16,347	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454986	Costa Rica
<i>Eretmochelys imbricata*</i>	16,349	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454980	Singapur
<i>Eretmochelys imbricata*</i>	16,354	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454970	Hawái
<i>Lepidochelys kempii</i>	16,382	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454981	USA
<i>Geochelone nigra</i>	16,164	Lourenço, Claude, Galtier y Chiari (2012)	JN999704	Francia
<i>Trachemys scripta</i>	16, 810	Russell y Beckenbach (2008)	NC_011573	Canadá

*referencia para análisis BLAST de la tortuga carey del presente estudio.

El árbol generado por NJ utilizando el gen ND5 presentó politomías en diferentes ramas.

El método IB permite mostrar siempre un árbol dicotómico, el cual presenta los mejores sustentos por nodo desarrollando de manera congruente la filogenia típica de este grupo de reptiles, seguido por ML, MP y NJ.

Los árboles generados por los genes ATP6, ATP8, COII, ND3, ND4L, ND6 y CytB se descartaron ya que los sustentos *bootstrap* que presentaron en diferentes clados se encontraron por debajo del 70%. Además, mostraban politomías y generaron asociaciones atípicas de las especies en las diferentes metodologías.

Tabla 2. Puntajes BIC para los trece genes codificantes de proteínas y dos genes ribosomales evaluados. Referencia BLAST: *E. imbricata* números de entrada NC_012398, JX454986, JX454980, JX454970.

Gen	BLASTX	BLAST	TN93	HKY	GTR
12S ARNr	---	99%	6,492,221	6,538,245	6,495,769
16S ARNr	---	99%	10,943,286	11,058,623	10,903,611
ATP6	99%	99%	5,738,487	5,749,197	5,756,097
ATP8	96%	98%	1,718,933	1,712,776	1,739,859
COX1	99%	99%	11,779,484	11,828,592	11,783,044
COX2	99%	99%	5,041,942	5,064,424	5,063,247
COX3	98%	99%	5,605,387	5,664,730	5,621,455
ND1	98%	99%	7,771,880	7,783,839	7,763,348
ND2	99%	98%	7,997,499	8,019,636	8,005,685
ND3	95%	99%	3,093,563	3,098,822	3,088,590
ND4	98%	99%	11,775,272	11,817,615	11,783,704
ND4L	100%	99%	2,529,381	2,526,712	2,549,514
ND5	98%	99%	16,454,976	16,500,061	16,450,638
ND6	100%	99%	4,394,187	4,416,221	4,415,817
CytB	99%	99%	9,242,529	9,255,393	9,237,105
Genoma Completo	---	99%	131,872,559	132,454,583	131,625,283

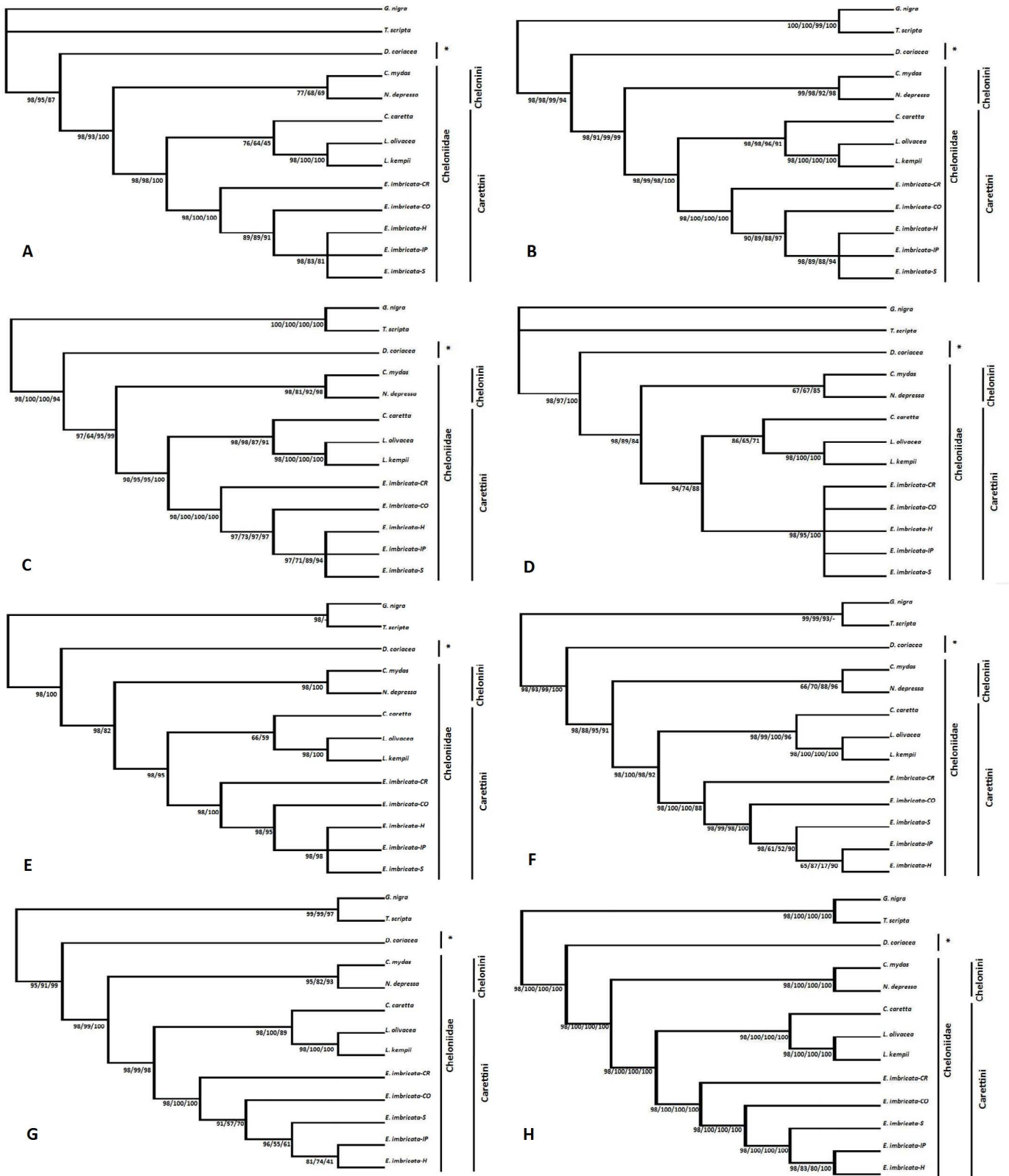


Figura 1. Árbol consenso por regla de mayoría obtenido A. Análisis del gen ribosomal 12S ARNr (993 pb) B. Análisis del gen ribosomal 16S ARNr (1,663 pb) C. Análisis del gen COI (1,556 pb) D. Análisis del gen COIII (786 pb) E. Análisis del gen ND2 (1,048 pb) F. Análisis del gen ribosomal ND4 (1,385 pb) G. Análisis del gen ND5 (1,846 pb) H. Análisis de mitogenomas completos (>16 500). Los valores ubicados en los nodos hacen referencia a la probabilidad posterior de IB/ y bootstrap obtenidos con los métodos de ML/ MP/ y NJ/. * Familia Dermochelyidae.

DISCUSIÓN

Las secuencias obtenidas de todos los genes y el genoma mitocondrial completo de la tortuga carey de este estudio mostraron una alta similitud con las secuencias de la tortuga carey previamente descritas en la base de datos de GenBank. Cuando se utilizaron los mitogenomas completos para generar la filogenia se obtuvieron árboles más robustos y con mejores sustentos (81,0-100%), debido a que son genes que se encuentran estrechamente ligados en una sola molécula y ofrecen en conjunto una mayor información de datos y de esta manera permiten obtener resultados más robustos. En cuanto a los árboles con base en genes individuales, los que presentaron mejores conformaciones con sustentos más altos fueron: 16S ARNr (88,0-100%), COI (64,0-100%), ND2 (59,0-100%), ND4 (56,0-100%), ND5 (55,0-100%), 12S ARNr (50,0-100%) y COIII (50,0-100%).

En estudios previos los métodos utilizadas de filogenia se basaron en sólo uno de los diferentes algoritmos, NJ (Duchene *et al.*, 2012), MP (Dutton *et al.*, 1996; Naro-Maciel *et al.*, 2008) ML (Duchene *et al.*, 2012) e IB (Naro-Maciel *et al.*, 2008; Drosopoulou *et al.*, 2012). En este estudio se utilizaron los cuatro algoritmos más comunes para determinar cual de ellos explica mejor y se ajusta a las representaciones filogenéticas en tortugas marinas. Los árboles producidos por NJ son árboles fenéticos; es un algoritmo muy popular que se basa en el agrupamiento por similitudes entre secuencias, con un modelo de evolución molecular básico y de probabilidades, lo que lo hace un árbol sencillo y básico para unos primeros análisis filogenéticos (Willems *et al.*, 2014). Los otros tres métodos producen una resolución más robusta, poseen algoritmos que identifican similitudes y dependiendo del modelo de sustitución utilizado, generan puntajes y penalidades a las diferencias que se encuentren, ya sea por transiciones o transversiones entre bases nucleotídicas, y tienen en cuenta variaciones de frecuencia de cada nucleótido (Nei y Kumar, 2000). En el presente estudio se encontró que los árboles generados por IB son los que poseen la mejor representación filogenética en las tortugas marinas, obteniendo valores de probabilidades posteriores promedio de 0,94. IB no sólo tiene en cuenta transiciones y transversiones en las bases nucleotídicas, sino que también se basa en probabilidades posteriores de cambios en dichas bases, teniendo en cuenta: tasas mutacionales, probabilidades anteriores del parámetro y verosimilitud de

los datos (Nei y Kumar, 2000). IB es un método completo que evalúa también relojes moleculares y da ventajas en los análisis por el uso de información *a priori* y su velocidad de procesamiento (Nei y Kumar, 2000; Duchene *et al.*, 2011).

Los marcadores moleculares con base en genes individuales utilizados para explicar la filogenia de tortugas marinas y que han generado las mejores explicaciones y propuesto las mejores relaciones han sido construidos con los genes 12S ARNr y 16S ARNr (Naro-Maciel *et al.*, 2008), Región Control (Dutton *et al.*, 1999) y el conjunto de ND4-tRNA^{Leu}-citocromo B-región control (Dutton *et al.*, 1996). Sin embargo, no en todos los estudios realizados tienen en cuenta el análisis por modelos de sustitución de bases nucleotídicas. Además, tampoco describen los valores *bootstrap* que dan sustento a los árboles descriptos, para determinar si tienen el índice de confianza mínimo necesario para explicar la filogenia en este grupo de reptiles.

Duchene *et al.* (2012) determinaron mediante análisis BIC, que el modelo que se ajusta para realizar la filogenia con base en mitogenomas completos es GTR, resultado igual al obtenido en este estudio. Duchene *et al.* (2011) realizaron este mismo análisis para genes mitocondriales individuales en delfines y orcas, encontrando que el modelo de sustitución varía dependiendo de la secuencia del gen analizado, al igual que lo observado en el presente estudio, donde con ocho de los genes (12S ARNr, ATP6, COX1, COX2, COX3, ND2, ND4 y ND6) se utilizó el modelo TN, con dos genes (ATP8 y ND4L) se utilizó HKY y cinco genes (16S ARNr, CytB, ND1, ND3 y ND5) y el mitogenoma completo, se utilizó el modelo GTR.

Los adelantos en tecnologías de secuenciación han permitido ampliar el uso de rango de los marcadores moleculares, especialmente en mitogenomas, ya sea usando los genes a nivel individual o en conjunto con genomas mitocondriales parciales o completos (Kumazawa y Nishida, 1999; Duchene *et al.*, 2012). Duchene *et al.* (2011) realizaron trabajos de filogenia con marcadores moleculares mitocondriales en delfines y ballenas orcas, demostrando de esta manera que no todos los marcadores poseen la misma resolución para generar relaciones filogenéticas, sino que por el contrario, dependiendo de la especie o grupo taxonómico al que pertenezcan, algunos marcadores pueden generar explicaciones con mejores sustentos.

En estudios previos los marcadores moleculares 16S ARNr y COX1, son los que han explicado con mayor soporte las relaciones filogenéticas de las tortugas marinas (Naro-Maciel *et al.*, 2008), así como también el gen

ND4 en conjunto con otros genes (Dutton *et al.*, 1996). Sin embargo, este estudio presenta los marcadores ND2, ND5, ND4, COX3 Y ND1 como nuevas alternativas para este tipo de análisis, debido a que no han sido utilizados con anterioridad y generaron un sustento suficiente, produciendo arboles robustos y explicaciones filogenéticas satisfactorias para las tortugas marinas.

Los estudios de Drosopoulou *et al.* (2012), Duchene *et al.* (2012), Hernández *et al.* (2017) y Hernández y Delgado (2018) utilizaron los mitogenomas completos de las tortugas para realizar los análisis filogenéticos, demostrando de esta forma lo descrito por Duchene *et al.* (2011) quienes concluyeron que entre mayor información genética se posea (pares de bases), los árboles filogenéticos y los sustentos de las diferentes ramas van a ser mucho más robustos y con mejor confianza al momento de obtener los análisis. En este estudio se muestra la misma tendencia ya que el mejor marcador molecular individual fue el gen ND2 (1048 pb) mediante el algoritmo IB con valores de probabilidad posterior de 0,948. El árbol filogenético obtenido utilizando el algoritmo IB y mitogenomas completos fue el más robusto, con un soporte de probabilidad posterior de 0,98.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Grobois F.A. (1999) Genética poblacional y filogeografía de las tortugas marinas golfina (*Lepidochelys olivacea*) y laúd (*Dermochelys coriacea*) en el Pacífico mexicano. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. G007, México.
- Amoroch D.F., Network W.C.S.T. (1999) Status and distribution of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the wider Caribbean region. In: Proceedings of the Regional Meeting “Marine Turtle Conservation in the Wider Caribbean Region: A Dialogue for Effective Regional Management”, Santo Domingo pp. 16-18.
- Avise J.C., Bowen B.W., Lamb T., Meylan A.B., Bermingham E. (1992) Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Mol. Biol. Evol.* 9 (3): 457-473.
- Bass A., Good D., Bjorndal K., Richardson J., Hillis Z., Horrocks J., Bowen B. (1996) Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* 5: 321-328.
- Bass A.L. (1999) Genetic Analysis to Elucidate the Natural History and Behavior of Hawksbill Turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Wider Caribbean: a Review and Re-Analysis. *Chelonian Conservation and Biology* 3 (2): 195-199.
- Beltrán-Torres G., Otálora-Acevedo K., Daza L.A., Hernández-Fernández J. (2013) Estandarización de la técnica de PCR para amplificar el genoma mitocondrial de las tortugas cabezazona (*Caretta caretta*) y carey (*Eretmochelys imbricata*) anidantes del Caribe colombiano. *Mutis* 3 (2): 21-30.
- Blumenthal J., Abreu-Grobois F., Austin T., Broderick A., Bruford M., Coyne M., Ebanks-Petrie G., Formia A., Meylan P., Godley B. (2009) Turtle groups or turtle soup: dispersal patterns of hawksbill turtles in the Caribbean. *Mol. Ecol.* 18: 4841-4853.
- Boore J.L. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic acids research* 27 (8): 1767-1780.
- Bowen B.W., Nelson W.S., Avise J.C. (1993) A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90 (12): 5574-5577.
- Bowen B.W., Bass A.L., García-Rodríguez A., Diez C.E., Van Dam R., Bolten A., Bjorndal K.A., Miyamoto M.M., Ferl R.J. (1996) Origin of hawksbill turtles in a Caribbean feeding area as indicated by genetic markers. *Ecol. Appl.* 566-572.
- Bowen B., Grant W., Hillis-Starr Z., Shaver D., Bjorndal K., Bolten A., Bass A. (2007) Mixed-stock analysis reveals the migrations of juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Sea. *Mol. Ecol.* 16: 49-60.
- Browne D.C., Horrocks J.A., Abreu-Grobois F.A. (2010) Population subdivision in hawksbill turtles nesting on

- Barbados, West Indies, determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Conservation Genetics* 11: 1541-1546.
- Ceballos-Fonseca C.P. (2000) Tortugas (Testudinata) marinas y continentales de Colombia. *Biota Colombiana* 1 (2): 187-194.
- Drosopoulou E., Tsiamis G., Mavropoulou M., Vittas S., Katselidis K.A., Schofield G., Palaiologou D., Sartsidis T., Bourtzis K., Pantis J., Scouras Z.G. (2012) The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): Genome description and phylogenetic considerations. *Mitoch. DNA* 23 (1): 1-12.
- Duchene S., Archer F.I., Vilstrup J., Caballero S., Morin P.A. (2011) Mitogenome phylogenetics: the impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation. *PLoS One* 6 (11): e27138.
- Duchene S., Frey A., Alfaro-Núñez A., Dutton P.H., Thomas P., Gilbert M., Morin P.A. (2012) Marine turtle mitogenome phylogenetics and evolution. *Mol. Phylo. Evol.* 65 (1): 241-250.
- Dutton P.H., Davis S.K., Guerra T., Owens D. (1996) Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-leucine tRNA and control regions of mitochondrial DNA. *Mol. Phylo. Evol.* 5 (3): 511-521.
- Dutton P.H., Bowen B.W., Owens D.W., Barragan A., Davis S.K. (1999) Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Zool.* 248 (3): 397-409.
- Eckert K.L., Bjørndal K.A., Abreu-Grobois F.A., Donnelly M. (2000) Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo especialista en Tortugas Marinas. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Comisión de Supervivencia de Especies. Frey A., Dutton P.H. (2012) Whole Mitogenomic Sequences for Further Resolution of Ubiquitous D-Loop Haplotypes in Pacific Green Turtles. In: Jones T.T., Wallace B.P. (Eds.) *Proceedings of the Thirty-first Annual Symposium on a Turtle Biology and Conservation.*
- Heithaus M.R. (2013) Chapter 10: Predators, Prey and the Ecological Roles of sea turtles. In Wyneken J., Lohmann K.J., Musick J.A. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles* (Vol. 3), CRC Press.
- Hernandez J., Beltran G., Mariño-Ramirez L. (2017) Complete mitochondrial genome of the nesting Colombian Caribbean Hawksbill Turtle. *Mitochondrial DNA Part B*, 2 (1): 128-129, DOI: 10.1080/23802359.2017.1292477.
- Hernandez J., Delgado D. (2018) Complete mitochondrial genome of the three Colombian Caribbean loggerhead sea turtles, using next-generation sequencing. *Mitochondrial DNA Part B*, 3 (2): 626-627, DOI: 10.1080/23802359.2018.1450664.
- Hillis D.M., Bull J.J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *System Biol.* 42 (2): 182-192.
- Kinan I. (2002) *Proceedings of the Western Pacific Sea Turtle Cooperative Research and Management Workshop, Western Pacific Regional Fishery Management Council, Honolulu.*
- Kumazawa Y., Nishida M. (1999) Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. *Mol. Biol. Evol.* 16 (6): 784-792.
- Lara-Ruiz P., López G., Santos F., Soares L. (2006) Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conservation Genetics* 7: 773-781.
- Leroux R.A., Dutton H.P., Abreu-Grobois F.A., Lagueux C.J., Campbell C.L., Delcroix E., Chevalier J., Horrocks J.A., Hillis-Starr Z., Troëng S., Harrison E., Stapleton S. (2012) Re-examination of population structure and phylogeography of hawksbill turtles in the wider Caribbean using longer mtDNA sequences. *J. Hered.* 103 (6): 806-820.

- Limpus C.J., Gyuris E., Miller J.D. (1988) Reassessment of the Taxonomic Status of the Sea Turtle Genus *Natator* McCulloch, 1908, With a Redescription of the Genus and Species. *Transactions of the Royal Society of South Australia Incorporated* 112: 1-10.
- Liu Z.J., Cordes J.F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238 (1): 1-37.
- Márquez R., del Carmen Farías M. (2000) Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de Cultura Económica.
- Meylan A.B., Donnelly M. (1999) Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. *Chelonian Conservation and Biology* 3 (2): 200-224.
- Monzón-Argüello C., Rico C., Marco A., López P., López-Jurado L. (2010) Genetic characterization of eastern Atlantic hawksbill turtles at a foraging group indicates major undiscovered nesting populations in the region. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 387: 9-14.
- Monzón-Argüello C., Loureiro N., Delgado C., Marco A., López J., Gómez M., Abreu-Grobois F. (2011) Príncipe island hawksbills: Genetic isolation of an eastern Atlantic stock. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407: 345-354.
- Naro-Maciel E., Le M., FitzSimmons N.N., Amato G. (2008) Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Phylo. Evol.* 49 (2): 659-662.
- Nei M., Kumar S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.
- Pritchard P.C.H. (1999) Status of the black turtle. *Conserv. Biol.* 13: 1000-1003.
- Revuelta O., Tomás J. (2010) Tortuga carey-*Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766). En: Salvador A., Marco A. (Eds.) *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Shamblin B.M., Bjorndal K.A., Bolten A.B., Hillis-Starr Z.M., Lundgren I., Naro-Maciel E., Nairn C.J. (2012) Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. *Mol. Ecol.* 21 (10): 2330-2340.
- Tabib M., Zolgharnein H., Mohammadi M., Salari-Aliabadi M.A., Qasemi A., Roshani S., Rajabi-Maham H., Frootan F. (2011) mtDNA variation of the critically endangered hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting on Iranian islands of the Persian Gulf. *Gen. Mol. Res.* 10 (3): 1499-1503.
- 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 (10): 2731-2739.
- Troeng S., Dutton P., Evans D. (2005) Migration of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* from Tortuguero, Costa Rica. *Ecography* 28: 394-402.
- Trujillo-Arias N., Amorocho D.F., López-Álvarez D., Mejía-Ladino L.M. (2014) Relaciones filogeográficas de algunas colonias de alimentación y anidación de la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) en el Pacífico y Caribe Colombianos. *Bol. Invest. Mar. y Cost.* 43: 159-182.
- Velez-Zuazo X., Ramos W.D., van Dam R.P., Diez C.E., Abreu-Grobois A., McMillan W. (2008) Dispersal, recruitment and migratory behavior in a hawksbill sea turtle aggregation. *Mol. Ecol.* 17 (3): 839-853.
- Willems M., Tahiri N., Makarenkov V. (2014) A new efficient algorithm for inferring explicit hybridization networks following the Neighbor-Joining principle. *J. Bioinf. Comput. Biol.* 12 (5): 1450024.
- Zangerl R., Hendrickson L.P., Hendrickson J.R. (1988) A redescription of the Australian flatback sea turtle, *Natator depressus*. Bishop Museum Press.

AGRADECIMIENTOS

Al Oceanario CEINER en la Isla de San Martín de Pajarales (Bolívar) y a Jaime Rojas quienes cedieron gentilmente las muestras de sangre de las tortugas para poder realizar esta investigación. La Financiación de este estudio fue realizada por el Departamento de Investigación, Creatividad e Innovación de La Universidad Jorge Tadeo Lozano. Al Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible por otorgar el permiso de Investigación Científica en diversidad Biológica N° 24 de Junio 22 de 2012 y el ANLA por el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos N° 64.



MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Isostichopus* sp. IN THE COLOMBIAN CARIBBEAN SEA

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Isostichopus* sp. EN EL MAR CARIBE COLOMBIANO

Vergara, W. ¹, Agudelo, V.¹, Castro, L.², R. Rodríguez A.^{1*}, Eeckhaut, I. ³

¹ Aquaculture Laboratory, Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura, Fisheries Engineering Program. Universidad del Magdalena. Cra. 32 No 22-08, Santa Marta, Colombia.

² Grupo de Investigación en Evolución, Sistemática y Ecología Molecular. Biology Program. Universidad del Magdalena. Cra. 32 No. 22 - 08, Santa Marta, Magdalena.

³ Laboratoire de Biologie des organismes marins et Biomimétisme, Umons, 7000 Mons, Belgique.

* Corresponding author: arodriguezf@unimagdalena.edu.co

ABSTRACT

Isostichopus sp. (Aspidochirotida: Stichopodidae) are sea cucumbers widely distributed in the Caribbean Sea. Amongst them, *Isostichopus badionotus* is one of the most harvested species. It shows a wide range of morphotypes widespread in the Caribbean region including different habitats (muddy, sandy and rocky bottoms, and sea grass beds). In Colombia, three morphotypes can be distinguished; two of them live in sea grass beds while the third one is found on rocky substrates. The present study describes the morphological characteristics of these morphotypes and analyzes their genetic structures through 16S rDNA and COI data. Our phylogenetic analyses show that the morphotype living on rocky substrates is morphologically and genetically distinct from the two other morphotypes and might not correspond to *I. badionotus*, the only species of the *Isostichopus* genus previously reported for this region.

Key words: cucumbers, COI, 16S rDNA, *Isostichopus badionotus*

RESUMEN

Isostichopus sp. (Aspidochirotida: Stichopodidae) son pepinos de mar ampliamente distribuidos en el mar Caribe. Entre ellos, *Isostichopus badionotus* es una de las especies más cosechadas. Muestra un amplio rango de morfotipos extendidos en la región caribeña, incluyendo diferentes hábitats (fondos barrosos, arenosos y rocosos, y bancos de pastos marinos). En Colombia, se pueden distinguir tres morfotipos; dos de ellos viven en los bancos de pastos marinos mientras que el tercero se halla sobre sustratos rocosos. En el presente estudio se describen las características morfológicas de esos morfotipos y se analizan sus estructuras genéticas mediante datos de 16S rDNA y COI. Nuestros análisis filogenéticos muestran que el morfotipo que vive sobre sustratos rocosos es morfológica y genéticamente distinto de los otros dos morfotipos y puede no corresponder a *I. badionotus*, la única especie del género *Isostichopus* previamente reportada para esta región.

Palabras clave: pepinos, COI, 16S rDNA, *Isostichopus badionotus*

Fecha de recepción: 23/07/2018
Fecha de aceptación de versión final: 07/12/2018

INTRODUCTION

Sea cucumbers are over-exploited in the three main oceans, and started to be recently targeted in the Caribbean sea (Purcell *et al.*, 2012). *Isostichopus badionotus* is one of the sea cucumber species widespread in the Caribbean region (Guzman *et al.*, 2003), ranging from North Carolina to northern Brazil. In addition, this species has been previously reported in the east to the middle-Atlantic and in the Gulf of Guinea (western Africa) (Hendler *et al.*, 1995). It is found at depths from 0–55m (Miller and Pawson, 1990). *I. badionotus* is a common shallow water species that inhabits rocky bottoms, as well as sea grass beds (Hendler *et al.*, 1995). In Colombia, there is an illegal, unregulated and unquantified fishery (Toral-Granda, 2008), and it is of potential commercial interest in Florida, Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands (Bruckner, 2006).

At present, Colombian Caribbean Sea cucumbers have not been well studied (Rodríguez *et al.*, 2013; Agudelo and Rodríguez, 2015) and there are many gaps in their knowledge especially related to their taxonomic characterization (Honey-Escandon *et al.*, 2012; Smirnov, 2012). The advances in this regard allowed the reporting of around 44 species, most of which have been captured by exploratory fishing, and identified mainly as deep-sea species (Caycedo, 1978; Borrero *et al.*, 2003; Borrero-Pérez *et al.*, 2012; Toral-Granda, 2008; Toral-Granda *et al.*, 2008).

Since sea cucumbers are an important source of animal proteins, studies in Colombia are beginning to develop the conditions for their production under controlled environments (Rodríguez *et al.*, 2013; Agudelo and Rodríguez, 2015; Vergara and Rodríguez, 2015; 2016). In this way, part of the present team studied the gonad morphology and the larval development of a species, *Isostichopus* sp. aff *badionotus*, including its spawning period (Agudelo-Martínez and Rodríguez-Forero, 2017).

According to Guzmán and Guevara (2002) and Toral-Granda (2008), there are three species of *Isostichopus* including *I. badionotus*, *I. fuscus*, and *I. macroparentheses* distributed in Central and South America. However, the observation of various morphotypes inside the species groups suggests the occurrence of more than three species for this region. In Colombia, three morphotypes can be distinguished in *I. badionotus*. The morphotypes studied are similar because they all have a robust body, a mouth located ventrally, twenty pelleted tentacles, anus in terminal position, gonads in the form of tufts, podias or ambulatory

feet distributed in three rows, one or two poly vesicles, all these, distinctive characteristics of the Stichopodidae family. Preliminary phylogenetic analyses showed two morphotypes that cluster together and one that is well separated from the others. Two of them live in sea grass beds while the third is found on rocky substrates. Also, histological studies revealed a different structure of the body wall. The present study describes the morphological characteristics of these morphotypes and analyzes their genetic structures through 16S rDNA and COI data.

This research can be very useful to increase the knowledge about the taxonomy status of some Colombian sea cucumbers and to find out the morpho-anatomical and genetic differences between species of genus *Isostichopus*, from the native populations of the Santa Marta, Caribbean Sea. This information will also be useful for conservation and management purposes.

MATERIAL AND METHODS

Collection of animals

During one year, two hundred sea cucumbers were purchased from local artisanal fishermen in Rodadero Bay (11° 13' 22.73" N - 74° 13' 32.59" W), Airport Bay (11° 07' 10" N - 74° 13' 50" W), and Taganga Bay (11° 16' 03.4" N - 74° 11' 32.3" W), located in Santa Marta, Magdalena, Colombia (Figure 1) and transferred to the Aquaculture Laboratory (Universidad del Magdalena, Colombia). Most of the material was collected in shallow waters (1 to 20 m depth). One hundred and thirty sea cucumbers were collected between Rodadero and Airport bays while seventy were obtained from the bay of Taganga. Individuals from the three morphotypes were weighed with an analytical scale Ohaus (0.001 g), and their length was measured with a standard measuring board (mm). Photographs of the dorsal and ventral sides of the body were taken by using digital camera (Cannon EOS, Rebel XTi). Besides the external and internal anatomical observations, skin samples, tentacles and podia were taken for reviewing ossicles. Samples were dissolved in 10% sodium hypochlorite for 10 min and rinsed with water as described by Lambert (1985), and examined microscopically through slide preparations. For this, the animals were anesthetized by immersion in sea water with ice and then sacrificed. The characterization was made by comparison with Tommasi (1969) and Purcell *et al.*,



Figure 1. Marine and coastal areas of Colombia Caribbean Sea (modified by José Viillacob). Blue points in the studied areas.

(2012). Our results showed that the specimens of the three morphotypes came from two lineages of *Isostichopus* species (*Isostichopus badionotus* and *Isostichopus* sp., characterized in this report) that were recorded in the Center of Biological Collections of Universidad de Magdalena (Santa Marta, Magdalena, Colombia) (CBUMAG:ECH:00001, CBUMAG:ECH:00002, CBUMAG:ECH:00003).

DNA extraction, amplification and sequencing

Twenty-seven individuals were dissected and preserved in absolute ethanol (99.5%). DNA extraction was performed from up to 15 mg of muscle tissue using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). The quality of the DNA was verified on a 1% agarose gel stained with GelRed (Biotium). PCR amplification of the *COI* gene was performed using the

primers *co1eF* (5'-ATAATGATAGGAGGRTTTGG-3') and *co1eR* (5'-GCTCGTGTRTCTACRTCCAT-3') (Arndt *et al.*, 1996), and of the *16S* gene with the primers *16Sas* (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') and *16Sbr* (5'-CTCCGTTTGAAGTCAAGATCA-3'). PCR reactions were performed with 2 μ L template in a 25 μ L volume with final concentrations of 2 mM MgCl₂, 5X PCR buffer (no MgCl₂ BIOLINE®), 0.4 μ M of each primer, 0.4 μ M of each dNTP, and 2 units Taq (BIOLASE™, BIOLINE®). PCR amplifications were performed under the following conditions: 1 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 40 °C, 1.5 min at 72 °C, and there was a final extension period of 5 min at 72 °C. The PCR products were verified on a 2% agarose gel stained with GelRed (Biotium). Following

amplification, PCR products were purified using the MACHEREY-NAGEL kit (NucleoSpin® Extract II), and both strands were sequenced in both directions.

Sequence analyses and molecular phylogenetic analyses

Primer sequences were removed from the start and the end of the obtained sequence and sequence ambiguities were resolved by comparing the electropherograms using the program BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). After trimming, forward and reverse sequences for each specimen were assembled. Each assembled sequence was examined and edited by hand, and each sequence was checked for stop codons (in the case of the *COI* data file). Finally the consensus sequence from each contig was verified using the Blast tool on NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). The obtained sequences and downloaded sequences from GenBank were aligned using the ClustalW algorithm (Thompson *et al.*, 1997) in MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). The downloaded sequences were, for the *COI* data set, one sequence of *I. badionotus* (EU848276.1), one *COI* sequence of *Isostichopus* sp. (FJ971400.1), five sequences of *I. fuscus* (AF486424.1/28.1), three sequences of *S. herrmanni*, and one sequence of *Holothuria leucospilota* (KC405565.1); for the *16S* data set, one sequence of *I. macroparentesis* (AY338415.1), two sequences of *I. badionotus* (JN207495.1, EU822435.1), six sequences of *I. fuscus* (AY153494.1, AY153499.1), three sequences of *Stichopus herrmanni* (EU822451.1, EU856636.1, FJ223863.1), and one sequence of *Holothuria leucospilota* (JQ657266.1). The *COI* final alignment was of 665 bp, and the *16S* final alignment was of 508 bp. Sequences were submitted to GenBank under accession numbers KX383967-KX384018.

Sequence divergences were calculated using the K2P distance model (Kimura, 1980) following the barcoding approach suggested by Hebert *et al.* (2003; 2004). Phylogenetic analyses were made performing a Neighbour-Joining (NJ) tree with a distance matrix generated by using MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Bootstrap values were obtained by making 1,000 replicates. Bayesian analyses were also performed using MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), by considering the best substitution models for each region using MrModelTest 3.7 (Nylander, 2004). Two independent runs of 2,000,000 generations were performed, with trees sampled every 100 generations, 25% of the trees were discarded as burning. Convergence was validated by the standard deviation of split frequencies (<0.01), by plotting the likelihood values over time, and

by using the sump command in MrBayes. The percentage of trees recovering a particular clade was used as a measure of that clade's posterior probability (Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

RESULTS

Morphological analyses

Morphotype I

Description

Seventy adults with average weight 232.4 ± 44.7 g, one specimen of 1 kg. Body is elongated, cylindrical, completed in rounded ends. The species presents varieties in body colorations (brown, reddish, yellow), size and in the ending of the body edges (Figure 2).

Specimens have brown coloration and numerous conical warts colouring brown. The dorsal side of the body presents a variable number of rectangular shape protuberances caused by depressions at the corners. This morphotype has an organization similar to four rows of low projections with small central spots that give it an appearance of breasts. In the two dorso-lateral margins there is only one row of warts and two more in the ventro-lateral body. The ambulacral feet are of brown color with three lines of longitudinal podiums.

Calcareous ring composed of projections in the form of pyramid and tower by way of a wheel, with a marked invagination at the base, with two small mountains or bumps on its outer edge. A respiratory tree and one or two poly vesicles are present. No presence of tubules of Cuvier. Gonads are placed in clusters, coloring white-creamy, depending on the maturity gonad stage. Mature from July to November. Digestive tract is two times longer than body length, cylindrical beige, which occupies three times the length of their body.

Ossicles: Towers, canes, in the shape of s and c, in badges perforated (Figure 3).

Habitat (or ecology)

These specimens have been found in Colombia Caribbean Sea in Rodadero beach ($11^{\circ} 12' 25.5''$ N - $74^{\circ} 13' 54.8''$ W), Airport beach ($11^{\circ} 09' 20.2''$ N - $74^{\circ} 13' 56.6''$ W), and mainly in Taganga bay ($11^{\circ} 15' 53.0''$ N - $74^{\circ} 11' 32.0''$ W). They inhabit sandy bottoms and have cryptic behavior. They feed on particulate material that includes algae, bacteria and marine sediment. Mature from July to November.

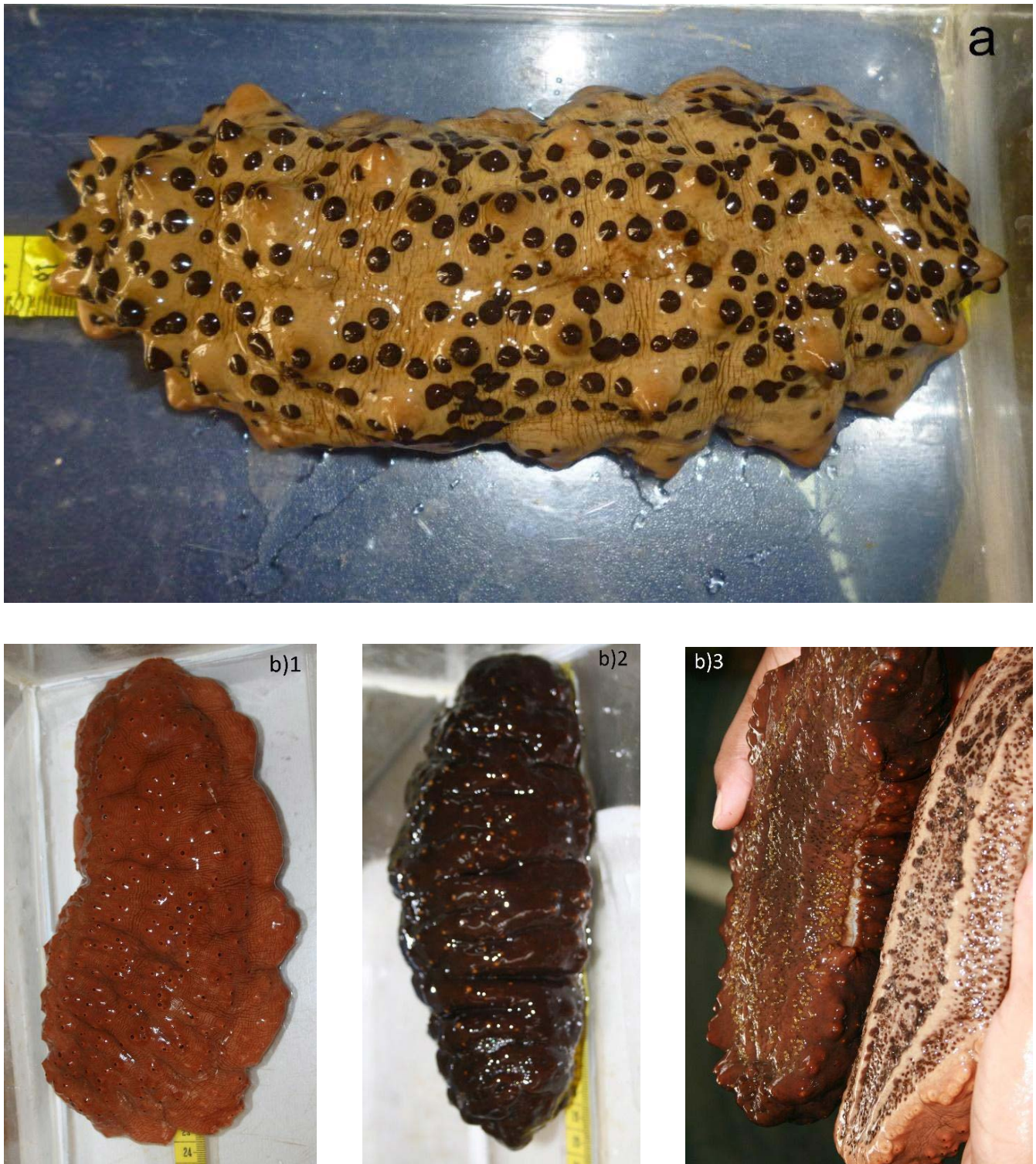


Figure 2. *Isostichopus badionotus*. a) Morphotype I. Typical morphotype, solid beige in the dorsal side, which is covered with dark chocolate round warts. b) Morphotype II. 1) Orange sea cucumber. The dorsal side is covered by orange warts that end in a dark color. 2) Dark sea cucumber surrounded by yellow round warts. 3) Ambulacral feet organized in three rows with podias that end in a dark color.

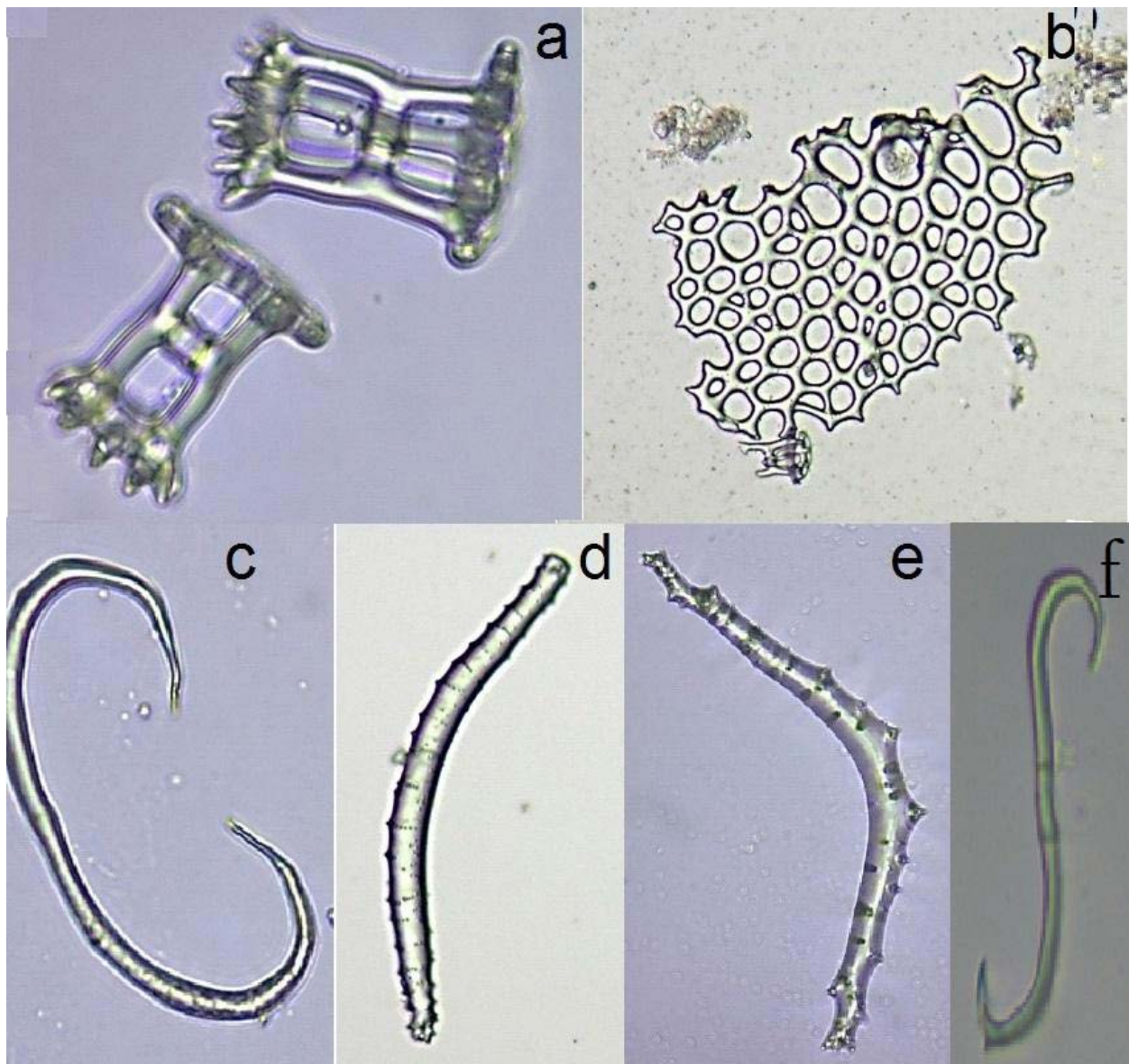


Figure 3. *Isostichopus badionotus* ossicles. a) Perforated tables, b) larger plates, c), d) and e) C-shaped rods, f) S-shaped rods.

Morphotype II

Description

Adults with average weight 470.4 ± 162.8 g, one specimen of 1 kg. Body is elongated, cylindrical, completed in rounded ends. These specimens present varieties in colorations (brown, reddish, yellow), size and in the ending of the edges (Figure 2).

The body is light brown and on its surface has tiny pale spots with small, almost imperceptible dark papillae. They showed elongated body, cylindrical or fusiform, robust, with blunt edges. The ventral region is flat and the dorsal

region is concave. The ventro-lateral margin is devoid of fleshy projections. The podiums are dark coffee arranged in three longitudinal rows, the middle one being thicker than those of the lateral ones. They have dark brown coloration with tiny conical pinnules, which colouring reddish-brown, whose endings are yellow in colour (Table 1). The mouth position is ventral and the anus, terminal. Eighteen to twenty peltates tentacles and anal opening without teeth. Presence of tube feet arranged in three rows, which become six rows when observed in the water. Their terminal colour is brown (Figure 2).

Table 1. Comparative characters among sea cucumber species

Species	<i>New proposed species (MIII)</i>	<i>Isostichopus badionotus MI</i>	<i>Isostichopus badionotus MII</i>
Total length (mm)	20	≥25	≥30
Average weight (g)	192.9 ± 61.6	243.3 ± 70	470.4 ± 162.8
Body shape	Thin and rigid	Robust and flexible	Robust
Body color	Brown with coffee, orange or reddish dermal spots	From yellow to diverse brown coloration	Most of them have brown coloration
Spots	Irregular	Rounded	Rounded
Dermal papillae shape	Sharp-pointed	Rounded with of chocolate chip terminations	Very small rounded endings with yellow terminations
Podia	3 beige rows	3 beige rows	3 rows, with brown terminal color
Mouth	Ventral	Ventral	Ventral
Anus	Terminal	Terminal	Terminal
Respiratory tree	Presence	Presence	Presence
Gonads	Arranged in clusters, beige, green and yellow-greenish coloration	Arranged in clusters, white-creamy coloration	Arranged in clusters, white-creamy coloration
Mature broodstock	July to November	July to November	July to November
Digestive tract	Long, cylindrical digestive tube, beige, with reddish pharynx. Twice the length of its body	Long, cylindrical digestive tract, beige. Occupies three times the length of its body	Long, cylindrical digestive tract, beige. Occupies three times the length of its body
Digestive tract weight (g)	7.9 ± 3.0	8.2 ± 4.0	12.1 ± 5.0
Habitat	Sandy bottoms	Rocky bottoms	Rocky bottoms

Calcareous ring composed of projections in the form of pyramid and tower by way of a wheel, with a marked invagination at the base, with two small mountains or bumps on its outer edge. A respiratory tree and one or two poly vesicles without tubules of Cuvier are present. Gonads are placed in clusters, coloring white-creamy, depending on the maturity gonad stage. Mature from July to November. Digestive tract long, three times longer than body length cylindrical beige, which occupies three times the length of their body.

Ossicles: Towers, canes, in the shape of s and c, in badges perforated (Figure 3).

Habitat (or ecology)

These specimens have been found in the Colombia Caribbean Sea, mainly in Taganga bay (11° 15' 53.0" N - 74° 11' 32.0" W), inhabiting sandy bottoms. They feed on particulate material that includes algae, bacteria and marine sediment. Mature from July to November.

Morphotype III

Description

Adults with average weight around 192.9 ± 61.6 g. Body is elongated, cylindrical, completed in blunt ends. The species presents varieties in colorations in the dorsal

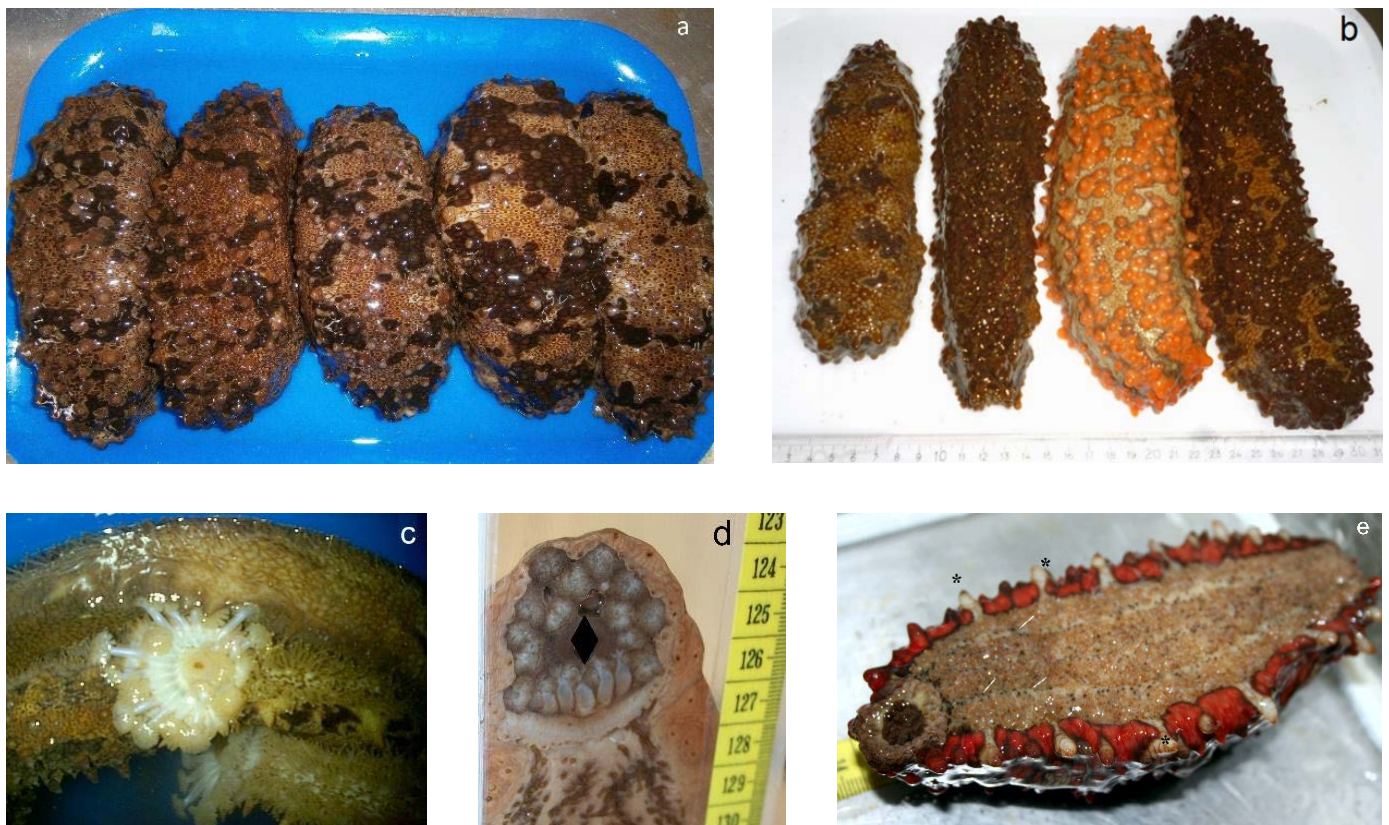


Figure 4. New proposed species. a) Variations in irregular spots. Trapezoidal-shaped body. 1cm bar scale. b). Variations in body color. c) Close view of the peltates tentacles of *Isostichopus isabellae* n sp. d) Peltates tentacles contracted of the new proposed species. Lateral view. e) Ambulacral feet organized in three rows (arrows) with most of the podia ending in a cream color rather than in black (white line). Mouth (◆), pinules (*).

region, which are cream-yellow with irregular spots: coffee, orange or reddish. Its ventral region and the tube feet are beige (Figure 4) (Table 1).

Mouth is ventral with 16-20, peltate tentacles, anus is terminal without teeth (Figure 4). Presence of ambulacral feet arranged in three rows. The dorsal region was slightly curved while the ventro-lateral margin of the wall was thick and provided with extensions called papillae.

The calcareous ring has a pyramid form and tower with two small bumps on its top edge. Presence of respiratory tree. Presence of poly (1-2) vesicles without tubules of Cuvier. Gonads arranged in clusters, beige, green and yellow-greenish coloration, depending on the maturity gonad stage. Female gonads tubules reaching a diameter of $405.07 \pm 248.19 \mu\text{m}$. Male gonads with thinner tubules which diameter was around of $272.18 \pm 56.37 \mu\text{m}$. Mature oocyte diameter: $125.24 \pm 13.11 \mu\text{m}$. Cuvierian organ absent. Long, cylindrical digestive tube of beige colour, with

reddish pharynx, twice the length of its body (Figure 5).

Ossicles: tables terminated in a crown, perforated by four central holes, c and s shaped rods, rounded and larger plates whit several holes (Figure 6).

Habitat (or ecology)

It inhabits rocky and sandy and feeds on particulate material that includes algae, bacteria and marine sediment. The species have been found in Rodadero beach, Airport beach, Taganga bay. Gonochoric species with bifurcated gonad attached to dorsal mesentery. Mature from July to November.

Remarks

Most of them are smaller in size than Morphotype I and II. They have a trapezoidal-shaped body, which is thin and rigid. They show dorsal irregular spots and different colours that varies from coffee, to red, orange and beige,

depending on the individual. Conical pinnules. Ossicles are similar to that other *Isostichopus*. Seasonal spawning from July to November.

Sequence and phylogenetic analyses

Tables 2 and 3 show the divergent nucleotide sequences of the *COI* and *16S* nucleotide alignments. For the *COI* gene three haplotypes corresponding to the three morphotypes where found (Table 2). The *16S* gene is more variable, as expected, and we found more than one haplotype for morphotype III (Table 3). The results of our phylogenetic analyses are presented in Figure 7 and Figure 8. Both the NJ and the Bayesian analyses, for both genes (*COI* and *16S*), recovered the same tree topology.

The phylogram obtained by Neighbor-joining and Bayesian analysis derived from *COI* sequences (Figure 7) showed that the three morphotypes of the so-called *Isostichopus badionotus* species form two well separated clades: one with all morphotype III (M3) individuals and the other including all morphotypes I (MI) and II (MII). The “morphotype III” clade also includes a sequence retrieved from GenBank identified as *Isostichopus* sp.,

the sister group of the “morphotype III” clade *I. fuscus*. The “morphotype I+II” clade also includes a sequence retrieved from GenBank identified as *Isostichopus badionotus*. This clade forms the sister group of the clade formed by morphotypes III and *I. fuscus*.

The *COI* distance matrix indicated that the average distance percentage for *Isostichopus* was 0.20%, while the average between species distance value was 7.80%. Comparisons with *S. herrmanni* sequences indicated that the between genera distance average value was 16% (Table 2).

For the *16S* distance matrix we obtained similar results, however, the sequence of *I. macroparentheses* available in Genbank is genetically very different from other *Isostichopus* sequences. In this case the average within species distance percentage for *Isostichopus* was of 0.5%, while the average between species distance value was of 13.78%. The distance values between *I. macroparentheses* and the other *Isostichopus* species were higher than the distance values obtained between the other *Isostichopus* species and *Stichopus herrmanni* (Table 3). One *16S* sequence of *I. badionotus* (JN207495.1) clusters within the “Morphotype III” clade.



Figure 5. Internal morphology of the new specie proposed. 1) Pigmented polian vesicle; 2) Respiratory tree; 3) Gonads; 4) Intestine; 5) Internal muscle; 6) Skin.

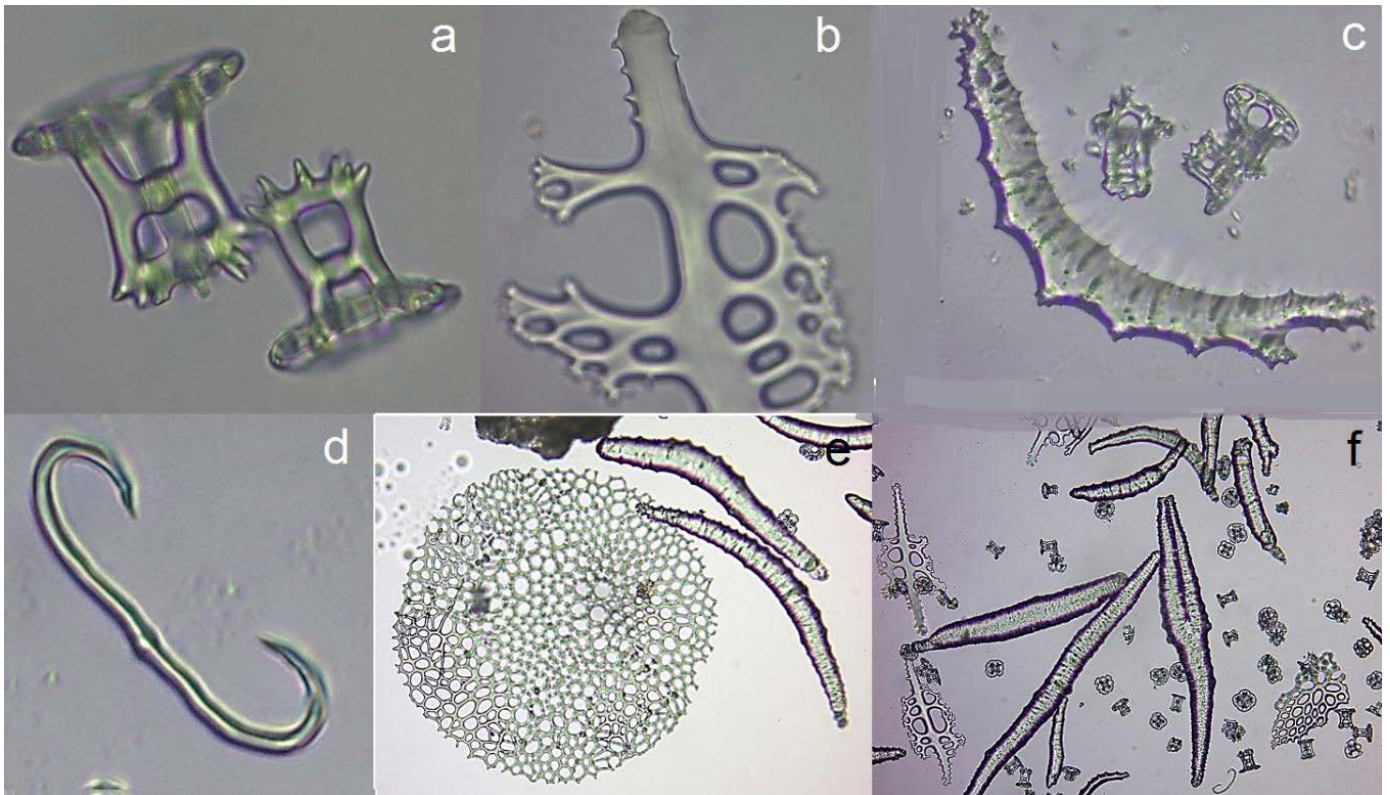


Figure 6. Ossicles of the dorsal body wall of the new specie proposed. a) Perforated tables with a single central hole, four smaller peripheral holes that end in crown as towers b) Rod with small holes, c) Rod of tentacles d) C-shaped rod, e) Perforate round plates of the dorsal body wall, f) Panoramic view of ossicles samples: very small tables, larger plates, rods some with holes.

Table 2. Comparison of Santa Marta *Isostichopus* COI sequences from the three found morphotypes and other sequences available in Genbank. Numbers indicate divergent nucleotide positions along the alignment. Dots correspond to conserve nucleotides. Only sequences representative of each different haplotype are shown.

Organism	Nucleotide position																											
	9	12	36	42	48	64	69	75	84	96	114	120	138	141	144	153	159	160	162	165	177	195	199	205	208	214	229	253
FJ971400.1 <i>Isostichopus</i> sp.	C	C	A	C	C	T	T	T	G	A	C	T	T	T	G	T	C	T	A	C	C	C	A	T	C	C	T	T
A5 co1 (Morpho 3- <i>Isostichopus</i> sp.)
EU848276.1 <i>I. badionotus</i>	T	A	G	A	T	C	C	C	A	.	A	C	C	A	C	T	C	T	T	T	.	G	C	T	T	C	.	
Br1 co1 (Morpho 1- <i>I. badionotus</i>)	T	A	G	A	T	C	C	C	A	.	A	C	C	A	C	T	C	T	T	T	.	G	C	T	T	C	.	
H2 co1 (Morpho 2- <i>I. badionotus</i>)	T	A	G	A	T	C	C	C	A	G	.	A	C	C	A	C	T	C	T	T	T	.	G	C	T	T	C	.
AF486428.1 <i>I. fuscus</i>	.	.	G	A	T	C	C	.	A	.	T	A	.	C	A	.	T	C	G	.	T	T	.	T	.	.	A	.
AF486425.1 <i>I. fuscus</i>	.	.	G	A	T	C	C	.	A	.	A	.	C	A	.	T	C	G	.	T	T	.	T	.	.	A	.	

Table 3. Comparison of Santa Marta *Isostichopus* 16S sequences from the three found morphotypes and other sequences available in Genbank. Numbers indicate divergent nucleotide positions along the alignment. Dots correspond to conserve nucleotides. Only sequences representative of each different haplotype are shown.

Organism	Nucleotide position																								
	1	2	7	49	89	91	93	95	110	111	114	115	116	117	128	129	144	145	146	147	148	149	150	151	
JN207495.1 <i>Isostichopus</i> sp.	T	T	C	C	T	T	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T	A	A	T	T	T	C	A	C	
SPA5 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	
SPA4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	
SPA2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	.	C	
SPA1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	
A4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	
R2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	
2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	
A1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	
EU822435.1 <i>I. badiionotus</i>	.	.	.	T	C	C	T	G	A
H1 16S (Morpho 2 - <i>I. badiionotus</i>)	.	.	.	T	C	C	T	G	G
Br2 16S (Morpho 1 - <i>I. badiionotus</i>)	.	.	.	T	C	C	T	G	A
AY338415.1 <i>I. macroparentesis</i>	A	C	A	T	C	C	A	A	A	G	C	A	G	A	G	C	T	A	A	A	A	A	A	A	
AY153499.1 <i>I. fuscus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
AY153498.1 <i>I. fuscus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	

Organism	Nucleotide position																							
	152	181	183	184	185	193	194	195	196	197	198	200	201	203	204	205	206	207	208	211	213	214	215	218
JN207495.1 <i>Isostichopus</i> sp.	A	C	G	C	T	G	G	-	-	T	T	C	-	T	A	C	T	T	T	T	T	A	A	
SPA5 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
A4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
R2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	C	.	.
A1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
EU822435.1 <i>I. badiionotus</i>	C	A	.	T	C	C	C	.	T	C	.	T	.	C	C	C	A	G	.	
H1 16S (Morpho 2 - <i>I. badiionotus</i>)	C	A	.	T	C	C	C	.	T	C	.	T	.	C	C	C	A	G	.	
Br2 16S (Morpho 1 - <i>I. badiionotus</i>)	C	A	.	T	C	C	C	.	T	C	.	T	.	C	C	C	A	G	.	
AY338415.1 <i>I. macroparentesis</i>	G	T	A	T	C	.	A	-	-	A	A	A	C	A	T	.	A	A	A	C	C	C	G	T
AY153499.1 <i>I. fuscus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
AY153498.1 <i>I. fuscus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?

Organism	Nucleotide position																							
	222	223	224	225	227	228	229	231	232	237	238	240	241	242	265	267	270	271	273	281	284	286	289	290
JN207495.1 <i>Isostichopus</i> sp.	A	T	A	A	T	T	C	T	C	C	T	A	G	C	C	A	G	C	G	A	T	C	G	T
SPA5 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
A4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
R2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
A1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
EU822435.1 <i>I. badiionotus</i>	.	G	T	.	A	G	T	C	T	A	C	.	.	.	T	.	A	.	.	T
H1 16S (Morpho 2 - <i>I. badiionotus</i>)	.	G	T	.	A	G	T	C	T	A	C	.	.	.	T	.	A	.	.	T
Br2 16S (Morpho 1 - <i>I. badiionotus</i>)	.	G	T	.	A	G	T	C	T	A	C	.	.	.	T	.	A	.	.	T
AY338415.1 <i>I. macroparentesis</i>	-	-	-	G	G	A	T	G	A	T	A	C	.	A	C	T	A	T	A	A
AY153499.1 <i>I. fuscus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
AY153498.1 <i>I. fuscus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?

Organism	Nucleotide position																							
	291	294	295	296	298	300	303	304	309	310	311	312	314	316	318	319	320	321	329	330	331	335	378	379
JN207495.1 <i>Isostichopus</i> sp.	A	A	A	A	C	T	T	C	G	-	A	T	C	-	C	T	T	A	A	A	A	T	T	T
SPA5 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	C
SPA2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
A4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
R2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
A1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
EU822435.1 <i>I. badiionotus</i>	T	.	.	.	A	T	.	.	.	T	.	.	T
H1 16S (Morpho 2 - <i>I. badiionotus</i>)	T	.	.	.	A	T	.	.	.	T	.	.	T
Br2 16S (Morpho 1 - <i>I. badiionotus</i>)	T	.	.	.	A	T	.	.	.	T	.	.	T
AY338415.1 <i>I. macroparentesis</i>	T	G	T	C	T	C	A	A	-	-	-	A	C	A	C	A	G	G	T	T	C	C	C	
AY153499.1 <i>I. fuscus</i>	A	T	.	C	.	A	.	.	C
AY153498.1 <i>I. fuscus</i>	A	T	.	C	.	A	.	.	C

Table 3. (continues)

Organism	Nucleotide position							
	383	389	391	401	402	407	437	438
JN207495.1 <i>Isostichopus</i> sp.	A	T	T	A	A	T	C	G
SPA5 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
SPA1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	.	C	?	?
A4 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	C	.	.
R2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	C	.	.
2 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)
A1 16S (Morpho 3 - <i>Isostichopus</i> sp.)	C	.	.
EU822435.1 <i>I. badionotus</i>	G	C	A	.
H1 16S (Morpho 2 - <i>I. badionotus</i>)	G	C	A	.
Br2 16S (Morpho 1 - <i>I. badionotus</i>)	G	C	A	.
AY338415.1 <i>I. macroparentesis</i>	G	.	A	G	G	.	T	A
AY153499.1 <i>I. fuscus</i>	G	C	A	.
AY153498.1 <i>I. fuscus</i>	G	C	A	.

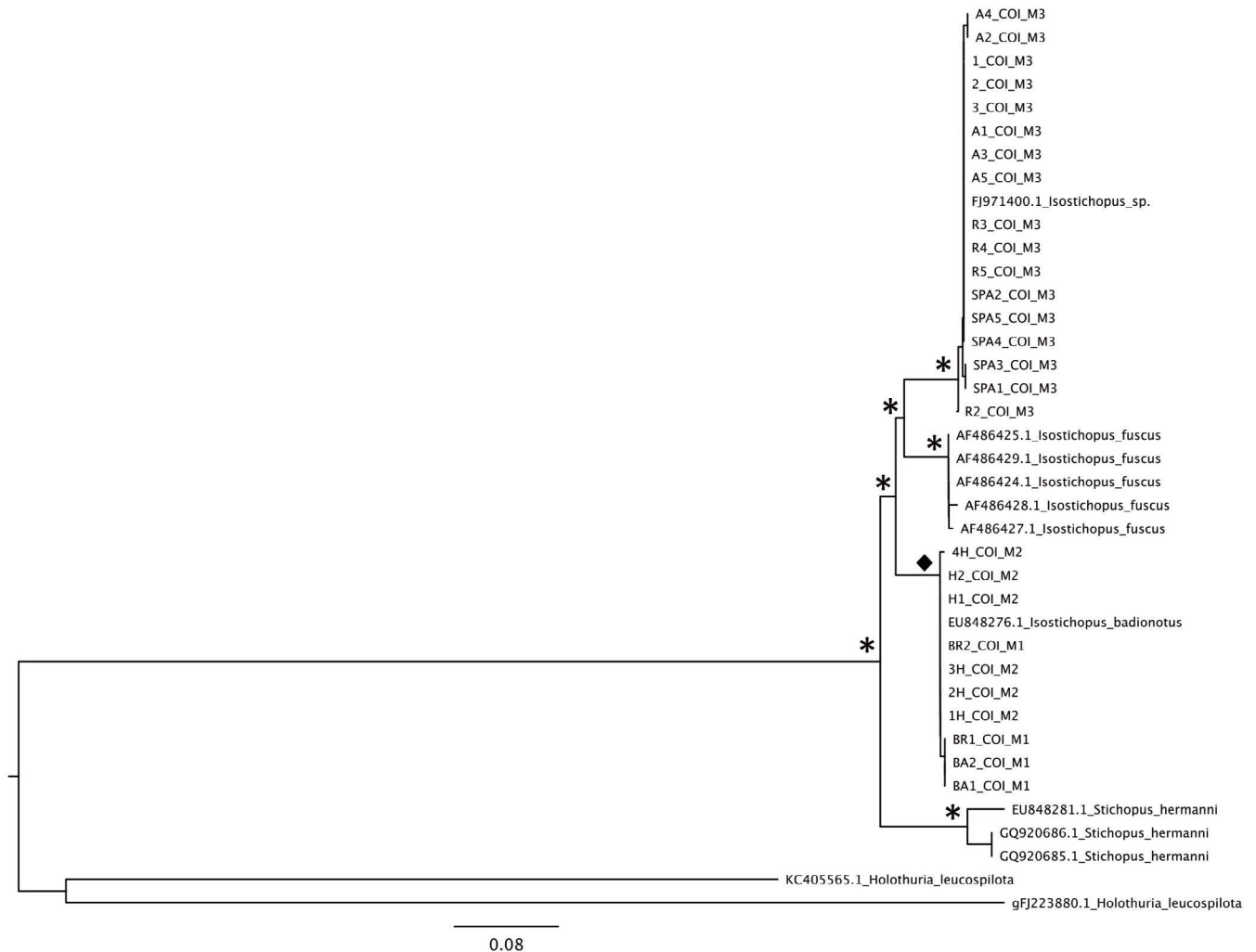


Figure 7. Tree topology obtained by Neighbor-joining and Bayesian analyses derived from COI (cytochrome c oxidase I) sequences showing two genetically distinct lineages of *Isostichopus* in Colombia. Sequences downloaded from GenBank are coded with each accession number. Asterisks represent posterior probabilities/booststraps that were > 0.90/90%, diamonds represent posterior probabilities/booststraps that were > 0.80/80%.

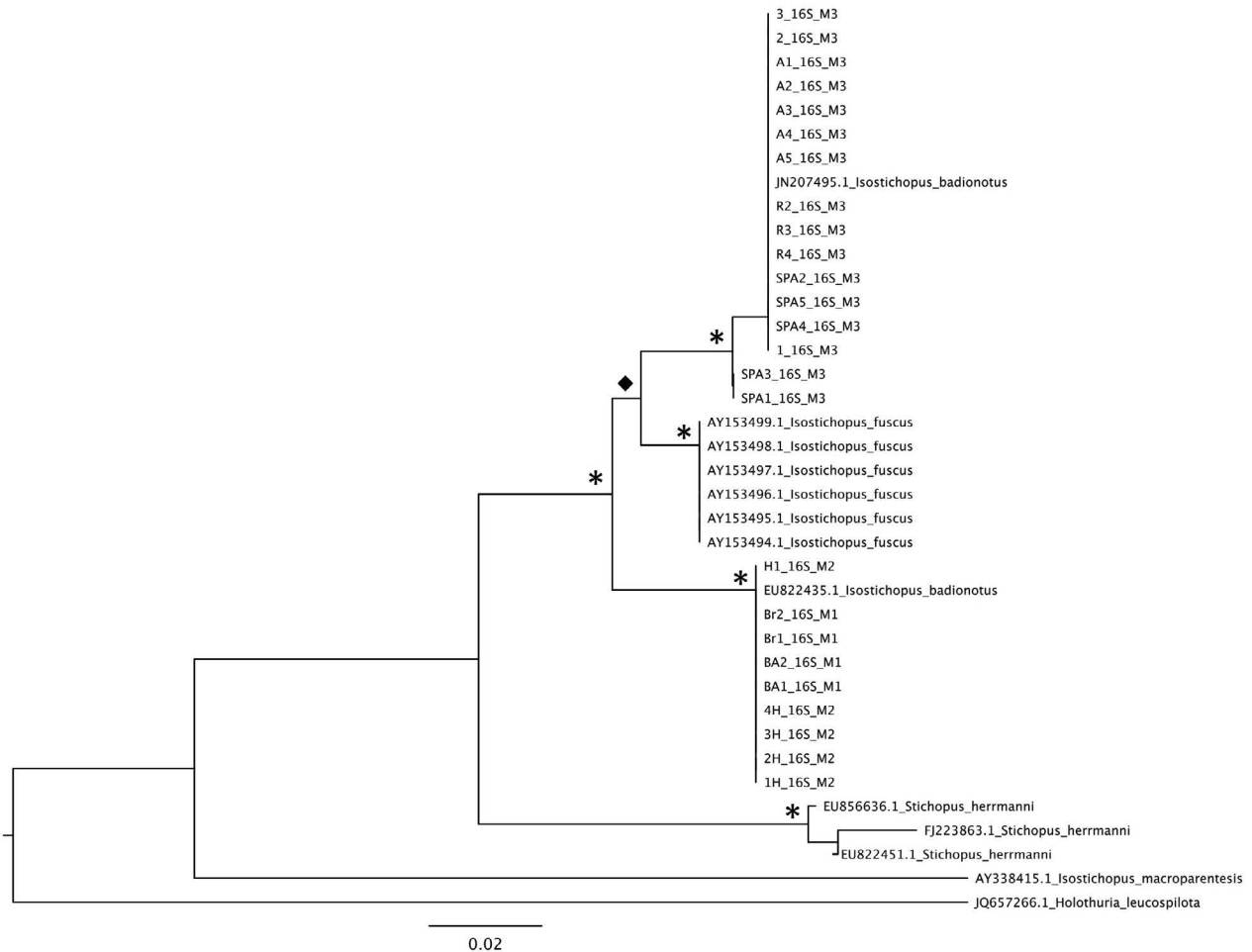


Figure 8. Tree topology obtained by Neighbor-joining and Bayesian analyses derived from 16S rRNA sequences showing two genetically distinct lineages of *Isostichopus* in Colombia. Sequences downloaded from GenBank are coded with each accession number. Asterisks represent posterior probabilities/booststraps that were > 0.90/90%, diamonds represent posterior probabilities/booststraps that were > 0.80/80%.

DISCUSSION

For years, there have been great controversy around the categorization of species worldwide and Colombian sea cucumber is no exception. Genetic studies are definitive for the understanding of the taxonomic identification of sea cucumbers. A species under a certain area can be easily confused or mistakenly classified if only its macroscopic characters are observed. There are pronounced differences between the two lineages studied in this work. One of the main features is that *I. badionotus* has strong chocolate spots with well pronounced edge, while *Isostichopus* sp. (morphotype III) presents different brownish spots distributed on the dorsal surface of the body. This morphotype was characterized by having a trapezoidal-shaped body, which is in contrast to *I. badionotus* who

has the ventral region flat and the dorsal region concave. *Isostichopus* sp. (morphotype III) was found always in rocky bottoms while *I. badionotus* was found in sandy bottoms as was state by Purcell *et al.*, (2012). Additionally, the morphotype III digestive tract length, which occupies twice the length of its body in contrast to three times the length for *I. badionotus*. Our findings suggest morphotype III, could be a different species of *Isostichopus*.

Genetic evidence for taxonomic divergence

Since its appearance the DNA barcoding approach has been proposed as a strategy that could help on species characterization and discovery by allowing taxonomists to rapidly sort specimens and by highlighting divergent taxa that may represent new species (Hebert and Gregory, 2005). The increase in DNA-barcoding initiatives has

led to the realization that, for a significant proportion of species, there is an actual correlation between genetic divergence and taxonomic status (Hebert *et al.*, 2004). For the application of genetic barcodes we need to analyze the genetic divergence between and within species (inter- and intra-genetic distances), so that, for a given genetic marker (typically the *COI* gene), the lowest interspecific value does not overlap with the highest intraspecific value, maintaining a gap also called the “barcoding-gap” (Hebert *et al.*, 2003). This threshold, depending on the organisms and the study, seems to lie around 2–4% (Hebert *et al.*, 2003; Meyer and Paulay, 2005). Although the *COI* has proven to be a useful tool for the characterization of species in the Holothuroidea (Uthicke *et al.*, 2010), the 16S rRNA gene has also been successfully tested for this purpose (Kamarudin, 2015; Wen and Zeng, 2014). In this study we evaluated the potential use of the *COI* and 16S rRNA genes for the characterization of *Isostichopus* species in Colombia.

In Uthicke’s *et al.* (2010) barcoding study with *COI*, conspecific sequence variation averages of 1.3% (numbers between 2.0 and 4.5%) and a congeneric average value of 16.9% were obtained, showing a clear “barcoding gap”. In our study, the average *COI* within-species distance value was of 0.20%, while the average between-species distance value was of 7.80%. We also obtained a clear “barcoding gap”. Comparisons with *S. herrmanni* sequences indicated that the average between-genera distance value was of 16%. Both for the *COI* and the 16S genes we found larger genetic distances values between *Isostichopus* sp. morphotype III and *I. badionotus* (morphotypes I and II) than between either of those with *I. fuscus*. Unfortunately there is very little genetic information published in Genbank for the group. Although we tried to include the only 16S sequence available for *I. macroparentheses*, this sequence clearly does not belong to this species. When the sequence is compared to others in the dataset using the Blast tool, it matches another *Istichopodid*, *Astichopus multifidus*. Our tree reconstructions (both genes) showed the presence of two *Isostichopus* well differentiated groups. These barcoding results, corroborated by the morphological analyses, suggest that there might be two *Isostichopus* lineages or species in our Colombian samples.

Furthermore, although we initially thought that the morphotype II could also be different to *I. badionotus* due to its external morphology, as proposed in Vergara and Rodríguez (2015), the genetic results revealed that it is

part of the variety of morphotypes of the *I. badionotus* species. Nevertheless, its external characteristics, as well as the ossicles conformation directed the studies to analysis of genetic sequences that allowed us to confirm the presence of two lineages of *Isostichopus* in the Colombian Caribbean.

Isostichopus includes ten nominal Atlantic species: *I. assimilis*, *I. maculatus*, *I. acanthomela*, *I. badionotus*, *I. diaboli*, *I. errans*, *I. haytiensis*, *I. macroparentheses*, *I. moebii* and *I. xanthomela* (Heilprin, 1888). While in the present literature only two Atlantic species are recognized, it is quite possible that the morphotype III encountered here represents a described species currently relegated into the synonymy of *I. badionotus*. In order to confirm the taxonomical status of the Colombian *Isostichopus*, all these nominal species need to be evaluated on the basis of their descriptions and types.

It is well known that studies that confirm the taxonomic classification of the species are an essential tool for the implementation of management plans and conservation programs for sea cucumbers. This study can be a tool to establish the plans that currently do not exist in the country.

BIBLIOGRAPHY

- Agudelo-Martínez V., Rodríguez-Forero A. (2017) Gametogenesis, spawning and larval development of *Isostichopus* sp. aff *badionotus*. SPC Beche-de-mer Information Bulletin 37: 65-74.
- Agudelo V.Y., Rodríguez A. (2015) Advances on spontaneous captive breeding and culture conditions of Caribbean Sea cucumber *Stichopus* sp. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin 35: 50-57.
- Arndt A., Marquez C., Lambert P., Smith M.J. (1996) Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. Mol. Phylogenet. Evol. 6: 425-437.
- Borrero-Pérez G., Benavides-Serrato M., Solano O., Navas G. (2003) Holothuroideos (Echinodermata: Holothuroidea) recolectados en el talud continental superior del Caribe colombiano. Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad de Oriente 42: 65-85.

- Borrero-Pérez G.H., Benavides-Serrato M., Diaz-Sanchez C.M. (2012) Equinodermos del Caribe colombiano II: Echinoidea y Holothuroidea. Serie de Publicaciones Especiales de Invemar N° 30.
- Bruckner, A. (2006). The proceedings of the technical workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR 44. NOAA, Silver Spring, MD.
- Caycedo I.E. (1978) Holothurioidea (Echinodermata) de aguas someras en la costa norte de Colombia. Anales Inst. Invest. Mar. Punta Betín 10: 149-198.
- Guzmán H.M., Guevara C.A. (2002) Population structure, distribution and abundance of three commercial species of Sea Cucumber (Echinodermata) in Panama. Caribb. J. Sci. 38(3-4): 230-238.
- Guzmán, H., Guevara, C., Hernández, I. (2003). Reproductive cycle of two commercial species of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from Caribbean Panama. Marine Biology, 142(2), 271-279.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. Nucleic Acids Res. 41: 95-98.
- Hebert P.D., Cywinska N.A., Ball S.L., de Waard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 270: 313-321.
- Hebert P.D., Penton N., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes ulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14812-14817.
- Hebert P.D., Gregory T.R. (2005) The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. Syst. Biol. 54(5): 852-859.
- Heilprin A. (1888) Contributions to the Natural History of the Bermuda Islands. P.Ac. Philad. pt. Iii, pp. 309-318.
- Hendler G., Miller J.E., Pawson D.L., Kier P.M. (1995) Sea Stars, sea urchins and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean. Smithsonian Institution Press.
- Honey-Escandon M., Laguardia-Figueras A., Solis-Marin F.A. (2012) Molecular phylogeny of the subgenus Holothuria (Selenkothuria) Deichmann, 1958 (Holothuroidea: Aspidochirotida). Zool. J. Linn. Soc. 165: 109-120.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17: 754-755.
- Kamarudin K.R. (2015) 16SrDNA Barcoding Technique for Molecular Identification of Processed Sea Cucumbers from Selected Malaysian Markets. Conference: IPCSM'15, At Convention Hall, E-Learning Building, Sultan Idris Education University (UPSI), Tanjong Malim, Perak Darul Ridzuan, MALAYSIA, pp. 22-26.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-120.
- Laguardia-Figueras A. (2002) Equinodermos del Caribe de México: Puerto Morelos, Quintana Roo. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Informe final SNIBCONABIO proyectos N° S091. México, D.F.
- Lambert P. (1984) British Columbia marine faunistic survey report holothurians from the Northeast Pacific. Canadian Technical Reports of Fisheries and Aquatic Sciences 1234: 1-30.
- Meyer C.P., Paulay G. (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. Public Library of Science Biology 3 e422, pp. 10.
- Miller, J. E., Pawson, David L. (1990). "Swimming sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea): a survey, with analysis of swimming behavior in four bathyal species." *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences*. 1-18. <https://doi.org/10.5479/si.01960768.35.1>.
- Nylander J. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evol. Biol. Uppsala University.

- Pawson D.L. (2007) Phylum Echinodermata. In: Zhang Z.Q., Shear W.A. (Eds.) Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. Zootaxa 1668: 1-766.
- Purcell S.W., Samyn Y., Conand C. (2012) Commercially important sea cucumbers of the world. FAO. Species Catalogue for Fishery Purposes N° 6.
- Rodríguez A., Agudelo V.Y., Vergara W.O. (2013) First insight into Colombian Caribbean sea cucumbers and sea cucumber fishery. SPC Beche-de-mer Information Bulletin 33: 9-13.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- Smirnov A.V. (2012) System of the class Holothuroidea. Paleontol. J. 46(8): 793-832.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
- Tommasi L.R. (1969) Lista dos Holothuroidea recentes do Brasil. Contribuições Avulsas do Instituto Oceanográfico, série Oceanografia Biológica 15: 1-29.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25, 24, 4876-4882.
- Toral-Granda V. (2008) Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Latin America and the Caribbean. Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 516: 213-229.
- Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. (2008) Sea cucumbers: A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper N° 516. Rome, FAO.
- Uthicke S., Byrne M., Conand C. (2010) Genetic barcoding of commercial Beche-de-mer species (Echinodermata: Holothuroidea). Mol. Ecol. Res. 10: 634-646.
- Vergara W., Rodríguez A. (2015) Histología del tubo digestivo de tres especies de pepino de mar *Isostichopus badionotus*, *Isostichopus* sp. y *Stichopus hermanni* (Aspidochirotida: Stichopodidae). Rev. Biol. Trop. 63(4): 1021-1033.
- Vergara W., Rodríguez A. (2016) Nutritional composition of sea cucumber *Isostichopus* sp. Nat. Resour. 7: 130-137.
- Wen J., Zeng L. (2014) Use of species-specific PCR for the identification of 10 sea cucumber species. Chin. J. Oceanol. Limnol. 32(6): 1257-1263.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Vicerrectoría de Investigación of the Universidad del Magdalena and Sistema General de Regalías Grant (Gobernación del Magdalena-Convenio 090/2014-2015). Authors would like to thank Eng. Yahir Mendoza Vanegas and fisherman Jorge Polo who helped collecting holothurians and to the Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura (GIDTA).



POLLEN VIABILITY AND MEIOTIC IRREGULARITIES IN A COLLECTION OF *Stevia rebaudiana* (BERTONI) BERTONI CULTIVATED IN TUCUMÁN, ARGENTINA

VIABILIDAD DE POLEN E IRREGULARIDADES MEIÓTICAS EN UNA COLECCIÓN DE *Stevia rebaudiana* (BERTONI) BERTONI CULTIVADA EN TUCUMÁN, ARGENTINA

Budeguer C.J.^{1*}, Camadro E.L.², Erazzú L.E.³

¹ Cátedra de Genética, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina;

² Unidad Integrada EEA "Domingo Pasquale" Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-Facultad de Cs. Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata y CONICET, Argentina;

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agrícola Famaillá, Tucumán, Argentina.

* Autor correspondiente: carlosjbudeguer@gmail.com

ABSTRACT

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni ($2n=2x=22$) (Asteraceae family) is a species of economic value due to the presence of steviol glycosides in leaves –mainly stevioside and rebaudioside A– which are non-caloric sugars. In 2013, a collection of plants (genotypes) from four contrasting environments was established in Tucumán, Argentina, for evaluation under local conditions and, eventually, breeding purposes. As a first step, pollen viability and meiosis was studied in a sample of 56 plants. The percentage of pollen viability varied from medium (69.4%) to high (99.6%) in 52 of them, but from low (36.5%) to relatively low (51.5%) in the remaining four. The latter four plants also presented pollen grains of heterogeneous size, which were classified as n (normal, the most frequent size in the sample), <n and >n. Abnormalities were observed in meiosis and at the tetrad stage. Pollen viability appears not to be a problem for planning crossing experiments within the collection. Moreover, the observation of parallel spindles at Anaphase II and dyads and triads at the tetrad stage entails the possibility of eventually exploring ploidy manipulations in breeding.

Key words: *Stevia*, pollen viability, meiosis, sporads

RESUMEN

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni ($2n=2x=22$) (familia Asteraceae) es una especie de valor económico debido a la presencia de glucósidos de esteviol en sus hojas, principalmente esteviósido y rebaudiósido A, que son azúcares no calóricos. En 2013, se estableció una colección de plantas (genotipos) provenientes de cuatro ambientes contrastantes en Tucumán, Argentina, para su evaluación en condiciones locales y, eventualmente, con fines de mejoramiento genético. Como primer paso, se estudió la viabilidad del polen y la meiosis en una muestra de 56 plantas. El porcentaje de viabilidad del polen fue de medio (69,4%) a alto (99,6%) en 52 de ellas, pero de bajo (36,5%) a relativamente bajo (51,2%) en las cuatro restantes. Las últimas cuatro plantas también presentaron granos de polen de tamaño heterogéneo, que se clasificaron como n (normal, el tamaño más frecuente en la muestra), <n y >n. Se observaron anomalías en la meiosis y en el estadio de tétrada. La viabilidad del polen no parece ser un problema para planificar cruzamientos experimentales en la colección. Además, la observación de husos paralelos en Anafase II de díadas y tríadas en la etapa de tétrada conlleva la posibilidad de explorar, eventualmente, manipulaciones de ploidía en el mejoramiento de esta especie.

Palabras clave: *Stevia*, viabilidad de polen, meiosis, espórada

Fecha de recepción: 01/11/2018
Fecha de aceptación de versión final: 03/12/2018

INTRODUCTION

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni ($2n=2x=22$) belongs to the Asteraceae family. This species, native to the Amambay region of Northeastern Paraguay (Soejarto, 2002; Brandle and Telmer, 2007), was introduced for cultivation in Argentina by the end of the XXth century. Its leaves accumulate steviol glycosides, mainly stevioside and rebaudioside A, which are non-caloric natural sugars widely used in food products and as dietary supplements in many countries (Kinghorn and Soejarto, 1985; Brandle and Rosa, 1992; Brandle and Telmer, 2007). Several of the widely cultivated lines of *S. rebaudiana* were experimentally obtained at the University of New Mexico, USA, in a program designed to develop polyploids richer in stevioside than their diploid counterparts (Valois, 1992). In Brazil, triploid and tetraploid lines from those experiments were initially cultivated at the CENARGEN/EMBRAPA germplasm bank before the transference of part of the collection to CPQBA/UNICAMP (Oliveira *et al.*, 2004). In Argentina studies on glycoside content, plant morphology and reproductive biology in different lines or varieties were carried out by Kolb *et al.* (2001), Kryvenki *et al.* (2007), Taiariol and Molina (2010), Guerrero *et al.* (2015) and Caponio *et al.* (2016).

Stevia rebaudiana has a complex reproductive system, which is not completely understood. Its flowers are hermaphrodite, and also protandry has been reported, thus, cross-pollination appears to be the prevalent mode of sexual reproduction (Yadav *et al.*, 2014; Caponio *et al.*, 2016; Benelli *et al.*, 2017). In addition, a sporophytic homomorphic autoincompatibility system would further promote cross-pollination (Monteiro, 1980; Brandle *et al.*, 1998; Yadav *et al.*, 2014; Caponio *et al.*, 2016). For commercial production, however, it is reproduced agamically via stem cuttings (Kryvenki *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 1984a;b) or micropropagation (Miyagawa *et al.*, 1986; Swanson *et al.*, 1992; Akita *et al.*, 1994; Constantinovici and Cachita, 1997) due the poor and highly variable percentage of viable seed production (Monteiro, 1980; Duke, 1993; Carneiro *et al.*, 1997).

Besides the described sexual and agamic reproduction, in embryological studies Monteiro (1980) observed that *S. rebaudiana* can also reproduce apomictically. Along with agamospermy, this author reported the production of viable pollen in sexual plants and sterile pollen in the apomictics, as well as relatively low (65%) pollen viability

in three batches of 10 plants each, introduced in Brazil from Paraguay in the 1960 and 1970 decades. Furthermore, Oliveira *et al.* (2004) only observed sterile pollen in diploid, triploid and tetraploid lines obtained from CENARGEN/EMBRAPA, in Brasilia. Caponio *et al.* (2016), however, reported pollen viability values between 94.8 and 97.9% in six plants from two geographic provinces of Argentina: Misiones (four ecotypes) and Entre Ríos (two ecotypes).

Pollen viability can be used as an indicator of regularities/irregularities in the nuclear division processes during male sporogenesis and/or gametogenesis. Low pollen viability in higher plants might have a genetic and/or an environmental base (Larrosa *et al.*, 2012; Farco and Dematteis, 2014). Thus, meiotic analyses can provide relevant information for both basic and applied studies (De Souza *et al.*, 2003), particularly for parental selection in breeding. In *S. rebaudiana*, Raina *et al.* (2013) observed mostly normal chromosome behavior in two morphotypes with low pollen viability, but they also observed a few univalents at diplotene and diakinesis in some meiocytes, which revealed synaptic problems underlying the sterility.

In 2013, a collection of *Stevia rebaudiana* was established in Tucumán, Argentina, to evaluate germplasm from four contrasting environments for adaptation to local conditions and, eventually, breeding purposes. The aim of this communication is to report the results of pollen viability and meiotic studies carried out in a sample of plants of this collection.

MATERIALS AND METHODS

In November 2013, 120 plants from four origins (30 plants/origin) were established in the experimental field at *Estación Experimental Agropecuaria Famaillá, INTA* (27° 00' 49" S - 65° 22' 32" W), in Tucumán province, Argentina. This locality has an average annual temperature of 20° C and an average annual precipitation of 965 mm. From this collection, 56 plants from the "criolla" landrace were included in the study, which were assigned the codes T (Tucumán), J (Jujuy), M (Misiones) and F (Formosa), according to their provenance, followed by consecutive numbers (Table 1). Plants were placed in the field, in furrows at a distance of 1 m between furrows and 0.4 m between plants; irrigation was provided by dripping as needed. The field grown plants were vegetatively propagated in September–October 2014 by stem cuttings,

and the derived plantlets were cultivated in 2 l pots in the open, also with irrigation by dripping. Pollen viability was determined in 56 well-grown plants. Pollen samples were obtained from mature anthers prior to anthesis, from florets of 14 of the pot-grown plants per origin (56 plants in total) in February 2015. From each plant, four florets were analyzed, and significant differences between means were detected by Fisher's Least Significant Difference (LSD) test at the 5% level with Infostat 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Fresh pollen from five anthers per floret were placed on glass slides and stained with a 0.5% acetocarmine solution (0.5 g carmine, 45 ml glacial acetic acid and 55 ml distilled water, 50 ml glycerol) (Marks, 1954), for observation under an optical microscope at 125x. On average, 300 pollen grains per plant were observed. Pollen grains that were fully stained with well-defined contours were considered viable, whereas those that were poorly (or not) stained were considered sterile. In plants with pollen of heterogeneous size, 200 pollen grains per plant were

measured with a micrometric eyepiece and, according to diameter, were classified as n (normal, most frequent diameter in the sample), <n and >n. Following Larrosa *et al.* (2012) and based on the volume of a sphere, pollen grains with diameters 1.26 times larger than the average pollen diameter of each sample were considered to be chromosomically unreduced (2n), and those with diameters 1.59 times larger were considered to be chromosomically double unreduced (4n).

Meiosis was studied in plants with low pollen viability (<52%) and heterogeneity in pollen size. To that end, immature flower buds at various developmental stages were fixed in absolute ethanol: glacial acetic acid (3:1, v/v) for 24 hs, and stored in 70% ethanol until use (Mok and Peloquin, 1975). Meiocytes were removed from anthers placed on a drop of 0.5% acetocarmine (0.5 g carmine, 45 ml glacial acetic acid and 55 ml distilled water) for staining, and observed with an optical microscope, starting from the most advanced stages and working backwards.

Table 1. Geographical provenance of the *Stevia rebaudiana* plants collected in Argentina.

Plant code	Locality, province	Geographic coordinates
T1.1, T2.12, T1.6, T1.2, T2.4	Las Mesadas, Tucumán	27° 06' S 65° 30' W
J3.16, J3.14, J3.2, J3.12, J3.15, J6.5, J6.16, J6.20, J8.9	Perico, Jujuy	24° 22' S 65° 08' W
M9.18, M11.7, M11.11, M11.6, M11.2	Cerro Azul, Misiones	27° 39' S 55° 26' W
F12.1, F12.3, F12.4, F12.11	Colonia Laishí, Formosa	26° 28' S 58° 38' W

RESULTS

Fifty-two out of the 56 analyzed plants had medium to high pollen viability (69.4 to 99.6%), whereas the remaining plants had low viability (36.5 to 51.5%) (Table 2). Plants with low to relatively low pollen viability (M10.8, M11.7, M11.11 and F12.1) also produced pollen grains of heterogeneous size (Table 3, Figure 1A, B).

Pollen grains were classified as *n* (mean diameter \bar{x} = 20.37 μ , the most common in the sample), $>n$ (\bar{x} = 33.83 μ) and $<n$ (\bar{x} = 11.55 μ) (Table 4). The mean diameter of the largest-sized pollen was 1.66 times that of the *n* pollen, and the mean diameter of the smallest-sized pollen was 0.57 times the diameter of the *n* pollen. Plant M10.8 had the highest percentage of $<n$ pollen (24.0%), whereas M11.11 and M11.7 had the highest percentages of $>n$ pollen (12.0% and 11.9%, respectively).

All plants produced normal tetrads; nevertheless, abnormalities were observed in the four plants with low

pollen viability (Table 3). These abnormalities included monads in M10.8 (2.6%) and M11.7 (1%) (Figure 2A); dyads in M11.7 (20.8%), M11.11 (2%), and F12.1 (1.4%) (Figure 2B); and triads in M11.7 (0.9%), M11.11 (16%), and F12.1 (12.7%) (Figure 2C). Moreover, pentads were observed in M11.7 (0.9%) and M10.8 (0.5%).

The number of cells of the previously mentioned four plants (M10.8, M11.7, M11.11 and F12.1) analyzed at various meiotic stages and the irregularities observed are presented in Table 5. In Metaphase I, out of plate chromosomes (Figure 3A) were observed in 18.5% of the cells of M10.8, whereas in the other three plants, this percentage varied from 2.4 to 6.2%. In Anaphase I, laggards (Figure 3B) were observed in percentages varying from 2.7 to 7.9. Metaphases II (not included in the table) were normal, except for the presence of parallel spindles (Figure 3C) in F12.1. In Telophase II, 2.8 to 6.7% of the cells presented chromosomes grouped in three poles instead of four (Figure 3D).

Table 2. Percentage of pollen viability in individual plants of *Stevia rebaudiana*.

Plant	%	Plant	%	Plant	%	Plant	%
T1.1	98.0a	J3.12	98.2a	M9.1	99.1a	F12.1	51.5b
T1.2	89.8a	J3.14	97.4a	M9.4	88.5a	F12.2	97.1a
T1.5	94.0a	J3.15	83.8a	M9.8	95.6a	F12.3	98.5a
T1.6	98.6a	J3.16	97.7a	M9.12	97.8a	F12.4	97.1a
T1.8	87.3a	J3.2	99.4a	M9.18	98.3a	F12.5	98.7a
T2.2	97.0a	J4.3	98.8a	M10.2	78.5a	F12.6	87.8a
T2.4	95.6a	J5.5	98.8a	M10.4	98.9a	F12.7	99.3a
T2.5	99.5a	J6.16	99.0a	M10.6	89.7a	F12.8	99.3a
T2.10	92.4a	J6.20	96.8a	M10.8	36.5b	F12.10	98.4a
T2.12	99.2a	J6.5	98.7a	M10.10	95.5a	F12.11	99.6a
T2.15	95.5a	J7.5	94.3a	M11.2	98.5a	F12.12	98.3a
T2.16	97.3a	J8.12	69.4a	M11.6	98.0a	F12.13	95.5a
T2.18	79.4a	J8.7	98.4a	M11.7	38.4b	F12.14	79.6a
T2.4	95.6a	J8.9	98.5a	M11.11	38.1b	F12.15	92.4a

*Different letters indicate significant differences based on Fisher's LSD ($\alpha=5\%$).

Table 3. Percentage of pollen according to size and sporad types in plants of *Stevia rebaudiana* with low pollen viability.

Plant	Pollen			Sporad Type (%)			
	Viability (%)	Size (%)		Monad	Dyad	Triad	Pentad
		< n	> n				
M11.7	38.4	2.59	11.94	1.0	20.8	21.3	0.9
M10.8	36.5	24.04	1.24	2.6	0.0	0.0	0.5
M11.11	38.1	0.0	12.0	0.0	2.0	16.0	0.0
F12.1	51.5	0.0	9.6	0.0	1.4	12.7	0.0

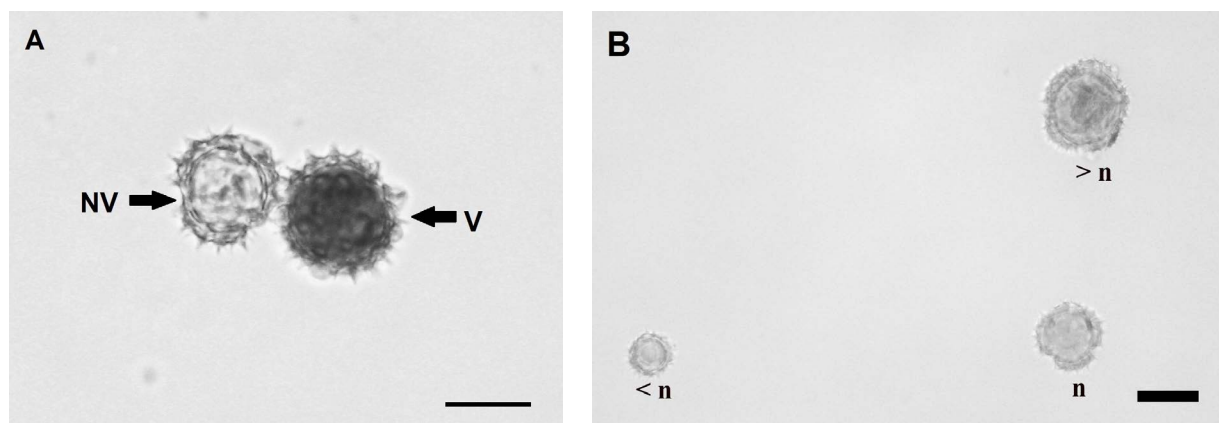


Figure 1. Variability in pollen grain viability and size: viable (stained), inviable (non-stained) (A); n, <n, >n, (B). Bar=20µ.

Table 4. Mean, minimum and maximum pollen diameter (µ) and standard deviations in *Stevia rebaudiana*.

Statistics	Pollen diameter (µ)		
	n	< n	> n
Mean	20.37	11.55	33.83
Minimum	18.80	8.48	30.78
Maximum	22.37	15.06	36.00
SD	1.02	2.52	1.32

SD: standard deviation.

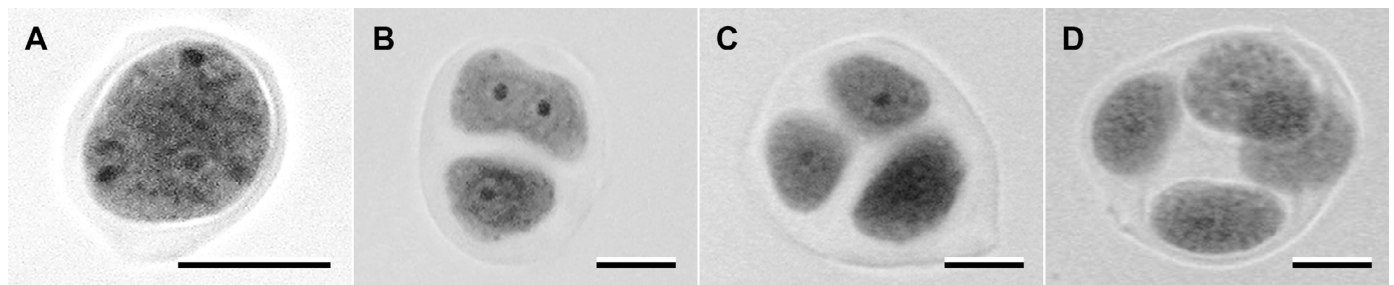


Figure 2. Normal and abnormal sporads in *Stevia rebaudiana*: monad (A), dyad (B), triad (C), normal tetrad (D). Bar=20 μ .

Table 5. Percentage of meiotic abnormalities in plants of *Stevia rebaudiana* with low pollen viability.

Phase/Type	Plant			
	M10.8	M11.7	M11.11	F12.1
Metaphase I				
regular	81.54	93.8	97.65	92.7
out-of-plate chromosomes	18.46	6.2	2.35	3.3
<i>Total # analyzed cells</i>	65	130	170	60
Anaphase I				
regular	95	97.3	92.12	92.4
laggards	5	2.7	7.88	7.6
<i>Total # analyzed cells</i>	80	150	203	104
Telophase II				
regular	95.8	94.4	97.2	93.3
irregular	4.2	5.6	2.8	6.7
<i>Total # analyzed cells</i>	110	187	170	165

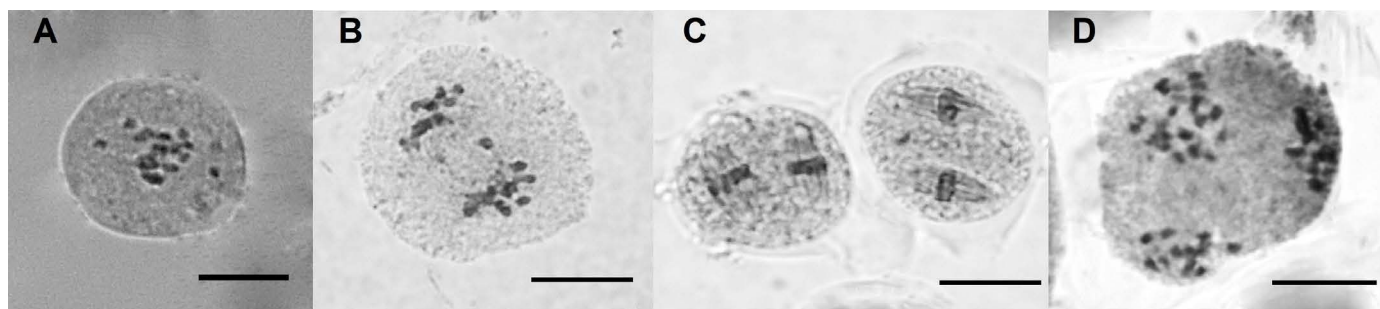


Figure 3. Meiotic abnormalities in *S. rebaudiana*: out of plate chromosomes at Metaphase I (A), laggards at Anaphase I (B), parallel spindles (der.) at Metaphase II (C), chromosomes grouped in three poles in Telophase II (D). Bar=20 μ .

DISCUSSION

Most plants analyzed in this study (92.9%) had more than 85.0% pollen viability, thus, this factor is not expected to be a problem in planning crossing experiments with the *Stevia rebaudiana* collection established in Tucumán. However, abnormalities were detected in meiosis and at the tetrad stage in the other 8.0%, which could account for their low pollen viability.

Following Larrosa *et al.* (2012), 2n and 4n pollen grains were identified, along with n, <n and other >n pollen grains. The observation of monads, dyads and triads at the tetrad stage gave further support to this classification. Although there are reports on 2n pollen production in the Asteraceae family (*i.e.*, Noyes and Allison, 2005; Echeverría and Camadro, 2017), this is the first report on 2n and 4n pollen production in *S. rebaudiana*.

In Dicotyledons, the first meiotic division is not followed by cytokinesis; rather, two spindles are formed in the second division, which are oriented such that their poles define a tetrahedron; finally, simultaneous cytokinesis occurs yielding a tetrad of four n microspores. Abnormalities in spindle orientation and/or cytokinesis due to the action of meiotic mutants can lead to the formation of meiocytes with different numbers of microspores at the tetrad stage (Mok and Peloquin, 1975). In the present study, the presence of monads, dyads, triads, and parallel spindles in plants M10.8, M11.7, M11.11 and F12.1 allows the presumption of the presence of meiotic mutants. Similarly, the production of <n and other > n pollen grains could be due to the action of other types of mutants.

In summary, pollen viability was high in most of plants of the *S. rebaudiana* collection sample grown in Tucumán,

but low pollen viability was also detected, which was underlined by meiotic irregularities. Some of these irregularities leading to 2n and 4n pollen formation are, presumably, under control of meiotic mutants. Thus, for breeding purposes, it is advisable to previously screen the collection for selecting fertile male parents. Moreover, it is feasible to explore heterotic responses for the traits of interest at higher ploidy levels by sexual polyploidization via 2n pollen.

BIBLIOGRAPHY

- Akita M., Shigeoka T., Koizumi Y., Kawamura M. (1994) Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using large scale bioreactor. *Plant Cell Rep. Jpn.* 13: 180-183.
- Benelli G., Canale A., Romano D., Flamini G., Tavarini S., Martini A., Angelini L.G. (2017) Flower scent bouquet variation and bee pollinator visits in *Stevia rebaudiana*. Bertoni (Asteraceae), a source of natural sweeteners. *Arthropod-Plant Interactions*, 11 (3): 381-388.
- Brandle J.E., Starratt A.N., Gijzen M. (1998) *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science* 78 (4): 527-536.
- Brandle J.E., Rosa N. (1992) Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.* 72: 1263-1266.
- Brandle J.E., Telmer P.G. (2007) Steviol glycosides biosynthesis. *Phytochemistry* 68: 1855-1863.

- Caponio I., Torres S.C., Andersson G., Norrmann G.A. (2016) Aspectos de la biología reproductiva de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). *Bonplandia* 25 (1): 59-71.
- Carneiro J.W.P., Muniz A.S., Guedes T.A. (1997) Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. *Can. J. Plant Sci.* 77: 473-474.
- Constantinovici D., Cachita C.D. (1997) Aspects of in vitro multiplication in *Stevia rebaudiana* Bert. *Cercetari Agronomic in Moldova* 30: 80-86.
- De Souza M.M., Pereira T.N., Viana A.P., Pereira M.G., Bernacci L.C., Sudré C.P., Da Cruz Silva L. (2003) Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). *Caryologia* 56 (2): 161-169.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. (2018) InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Duke J. (1993) *Stevia rebaudiana*. In: Duke J. (Ed.) CRC handbook of alternative cash crops. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 422-424.
- Echeverría M.L., Camadro E.L. (2017) Chromosome numbers, meiotic abnormalities, and 2n pollen formation in accessions of the wild species *Chrysolepis flexuosa* (Vernonieae, Compositae) from its distribution range in Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 52 (4): 737-752.
- Farco G.E., Dematteis M. (2014) Meiotic behavior and pollen fertility in triploid and tetraploid natural populations of *Campuloclinium macrocephalum* (Eupatorieae, Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 300 (8): 1843-1852.
- Guerrero D.R., Bär A., Kryvenki M., Domínguez M. (2015) Evaluación morfológica y fenológica de 10 clones de yerba dulce (*Stevia rebaudiana*) según el tiempo térmico. *RIA* 41 (3): 317-324.
- Kinghorn A.D., Soejarto D.D. (1985) Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: Wagner H., Hikino H., Farnsworth N.R. (Eds.) *Economic and Medicinal Plant Research*, vol. 1. London Academic Press, pp. 1-52.
- Kolb N., Herrera J.L., Ferreyra D.J., Uliana R.F. (2001) Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia Rebaudiana*: Improved HPLC Method. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4538-41.
- Kryvenky M., Domínguez M., Guerrero D. (2007) Evaluación de reguladores de crecimiento en el enraizamiento de estacas de Yerba Dulce (*Stevia Rebaudiana* Bert.). INTA Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul. Informe Técnico N° 93.
- Larrosa F.H., Maune J.F., Erazzú L.E., Camadro E.L. (2012) Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. *Plant Biology* 14: 223-233.
- Marks G.E. (1954) An Aceto-Carmine Glycerol jelly for use in pollen fertility counts. *Stain Technology* 29 (5): 277.
- Miyagawa H., Fujikowa N., Kohda H., Yamasaki K., Taniguchi K., Tanaka R. (1986) Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components (II): Induction of shoot primordia. *Planta Med.* 4: 321-324.
- Mok D.W.S., Peloquin S.J. (1975) Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 217-225.
- Monteiro R. (1980) Taxonomia e biologia da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.). Thesis, Univ. Estadual de Campinas, Brasil.
- Noyes R.D., Allison J.R. (2005) Cytology, ovule development, and pollen quality in sexual *Erigeron strigosus* (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences*, 166 (1): 49-59.
- Oliveira V.M.D., Forni-Martins E.R., Magalhães P.M., Alves M.N. (2004) Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 27 (2): 215-222.
- Raina R., Shes Kanta B.H., Yashpal S. (2013) Strategies to

- improve poor seed germination in *Stevia rebaudiana*, a low calorie sweetener. *Journal of Medicinal Plants Research* 7 (24): 1793-1799.
- Soejarto D.D. (2002) Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In: Kinghorn A.D. (Ed.) *Stevia: The genus Stevia*. Taylor and Francis, London and New York, pp. 18-39.
- Swanson S.M., Mahady G.B., Beecher C.W.W. (1992) Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 28: 151-157.
- Taiariol D., Molina N. (2010) Producción de *Stevia Rebaudiana* Bertoni (Ka'a He'è) En Bella Vista (Corrientes). Bella Vista, Corrientes. EEA INTA Bella Vista, Corrientes, Informe Técnico N° 37.
- Tamura Y., Nakamura S., Fukui H., Tabata M. (1984a) Comparison of *Stevia* plants grown from seeds, cuttings and stem tip cultures for growth and sweet diterpene glycosides. *Plant Cell Rep.* 3: 180-182.
- Tamura Y., Nakamura S., Fukui H., Tabata M. (1984b) Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. *Plant Cell Rep.* 3: 183-185.
- Valois A.C.C (1992) *Stevia rebaudiana* Bert: una alternativa económica. Comunicado Técnico, CENARGEN 13: 1-13.
- Yadav A.K., Singh S., Rajeev R. (2014) Self-incompatibility evidenced through scanning electron microscopy and pollination behaviour in *Stevia rebaudiana*. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 84 (1): 93-100.



ESTUDIO CARIOLÓGICO DE *Chrysobalanus icaco* (CHRYSOBALANACEA) EN PARAÍSO, TABASCO, MÉXICO

CARYOLOGICAL STUDY OF *Chrysobalanus icaco* (CHRYSOBALANACEA) IN PARAÍSO, TABASCO, MÉXICO

Méndez-Badal E.S.^{1*}, Molina-Martínez R.F.¹, Hernández-Martínez R.¹, Leshner-Gordillo J.M.¹

¹Laboratorio de Genómica, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas, Carretera Villahermosa-Cárdenas, Km 0,5 entronque con Bosques de Saloya, C.P. 86000, Villahermosa, Tabasco, México.

* Autor correspondiente: refermol@gmail.com

ABSTRACT

Chrysobalanus icaco is a plant that belongs to the Chrysobalanaceae family. In Tabasco, Mexico, this plant is distributed in the municipalities of the coastline. The main purpose of this research was to characterize the chromosomal structure of phenotypes with pink and purple fruits by the use of conventional staining. To this end, mature fruits were collected in the community of Pénjamo, Paraíso, Tabasco. Seeds were allowed to germinate for 30 days at a constant temperature of 30° C. Roots of 1.00 cm in length were subjected to acid hydrolysis and subsequent staining with orcein. A total of 295 metaphases were photographed and chromosomes of 35 metaphases of the purple phenotype and 30 of the pink phenotype were measured. Both phenotypes presented 18 small chromosomes, which were ordered in nine homologous pairs according to their relative size. No morphological or numerical differences were observed between the karyotypes of both phenotypes. In addition, the t-Student ($\alpha=0.05$) test did not reveal significant differences between the chromosomes complements of both phenotypes.

Key words: karyotype, tropical shrubs

RESUMEN

Chrysobalanus icaco es una planta que pertenece a la familia Chrysobalanaceae. En Tabasco, México, esta planta se distribuye en los municipios de la costa. La finalidad de esta investigación fue la caracterización cromosómica de dos fenotipos con color de fruto rosa y púrpura mediante tinción convencional. Con tal fin, se recolectaron frutos maduros en la comunidad de Pénjamo, Paraíso, Tabasco. Las semillas se dejaron germinar por 30 días a una temperatura constante de 30 °C. Se utilizaron raicillas de 1,00 cm de longitud, las cuales fueron sometidas a hidrólisis ácida y posterior tinción con orceína. Se fotografiaron 295 metafases y se midieron los cromosomas de 35 placas metafásicas del fenotipo púrpura y 30 del fenotipo rosado. Ambos fenotipos presentaron 18 cromosomas pequeños, los cuales se ordenaron en nueve pares homólogos según su tamaño relativo. No se observaron diferencias morfológicas ni numéricas entre los cariotipos de ambos fenotipos. Además la prueba de t-Student ($\alpha=0,05$) reveló que no se encuentran diferencias significativas entre los complementos cromosómicos de ambos fenotipos.

Palabras clave: cariotipo, arbustos tropicales

Fecha de recepción: 29/03/2018
Fecha de aceptación de versión final: 17/08/2018

INTRODUCCIÓN

Chrysobalanus icaco (L.) L. (icaco) es un integrante de la familia Chrysobalanaceae (Prance, 1972), que forma parte de la vegetación de playa o asociada a manglares, aunque, también se le encuentra en huertos familiares (Maldonado *et al.*, 2004). Los estudios realizados sobre esta especie son escasos y están focalizados en caracterizaciones morfológicas y análisis fitoquímicos (Vargas *et al.*, 2000). El conocimiento de la estructura genética de las especies es de suma importancia para elaborar estrategias para su conservación, además de permitir la distinción genética y fenotípica (Wen y Hsiao, 2001). La estabilidad genética en plantas puede evaluarse mediante métodos citogenéticos, isoenzimáticos y moleculares (González *et al.*, 2007). En particular, los estudios citogenéticos brindan valiosos aportes para la resolución de problemas taxonómicos, evolutivos y aplicados, contribuyendo al conocimiento del origen y evolución de distintos grupos. Asimismo los estudios cromosómicos permiten realizar valiosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo y modos de especiación en plantas (Poggio *et al.*, 2008). Cabe indicar que la mayor cantidad de datos cariológicos provienen del análisis de metafases somáticas (Guevara *et al.*, 2000). En la metafase, los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación, se encuentran individualizados y presentan una forma característica que permite diferenciarlos y clasificarlos morfológicamente (Valladolid *et al.*, 2004). La aplicación de algunas técnicas de fijación, tinción e inhibidores mitóticos ha permitido estudiar aspectos más detallados como la forma, tamaño, número y presencia de constricciones secundarias en cromosomas de organismos eucariontes (Avisé, 2004).

Debido a que la escasa información cariológica de la familia Chrysobalanaceae, el objetivo de este trabajo es contribuir a los estudios cromosómicos de la misma a partir de la caracterización citogenética de dos fenotipos para color del fruto: rosado y púrpura de *Chrysobalanus icaco*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron frutos maduros de icaco en la comunidad de Pénjamo, ubicada cerca de la costa en el municipio de Paraíso, Tabasco, México. Las semillas fueron puestas a germinar durante 30 días a 30 °C en cajas húmedas de

Petri previamente esterilizadas. El proceso citológico fue una modificación de la técnica utilizada por García (1988).

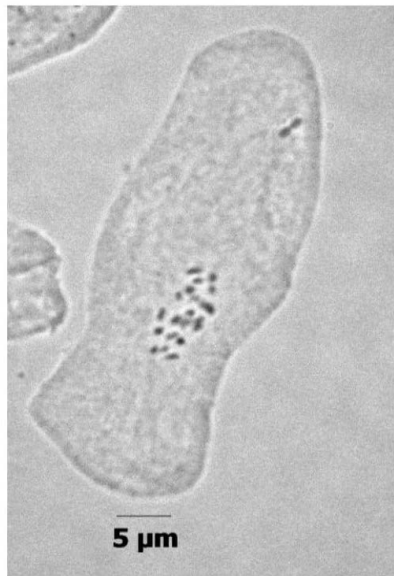
Se procedió al pre-tratamiento de las raicillas de 1,00 cm de longitud en una solución de colquicina al 0,1% diluida en citrato de sodio al 0,1% por 3,5 hs. Posteriormente, los meristemas de las raicillas fueron fijadas en Carnoy por 2 horas a 4 °C. Se realizó una hidrólisis ácida en HCl 10 N a temperatura ambiente por un lapso de 12 min. La tinción de los cromosomas se realizó en orceína FLP al 2%, y aplastado (*squash*) en ácido acético al 45%. El conteo se realizó con la ayuda del software ADOBE® PHOTOSHOP® CS4 versión 11.0. Se obtuvieron las medidas relativas de los cromosomas utilizando el software Axion Vision Rel. 4.7. Los cromosomas fueron clasificados por su longitud total siguiendo los criterios establecidos por Stebbins (1938). Se aplicó una prueba de t-Student ($\alpha=0,05$) para comparar el complemento cromosómico de ambos fenotipos.

RESULTADOS

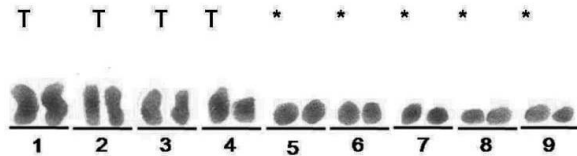
Se determinó que el horario óptimo para realizar el pre-tratamiento fue alrededor de las 10:00 a.m., debido a que se encontraron un mayor número de células en metafase. Conforme transcurrían las horas del día se presentaba un decremento considerable en el índice mitótico. En total se contabilizaron 295 metafases, 180 del fenotipo púrpura y 115 del fenotipo rosado. Se analizaron 65 placas metafásicas, 35 del fenotipo púrpura y 30 del fenotipo rosado. El número más frecuente en los conteos fue de $2n=18$ cromosomas independientemente de cuál fuera el color del fruto de las plantas analizadas. Los datos cariomorfológicos se detallan en la Tabla 1, en la que se reflejan las medidas de los cromosomas en pares y su clasificación de acuerdo al tamaño relativo. Ambos complementos presentan nueve pares de cromosomas pequeños (Figura 1) que varían entre $1,87\mu\text{m}$ a $0,95\mu\text{m}$ con una longitud cromosómica media de $1,38\mu\text{m}$ para el fenotipo púrpura y un rango de $2,06\mu\text{m}$ a $0,97\mu\text{m}$ con una longitud cromosómica media de $1,34\mu\text{m}$ para el fenotipo rosado. La longitud total de complemento fue de $12,45\mu\text{m}$ y $12,07\mu\text{m}$ para los fenotipos púrpura y rosado, respectivamente. Los complementos cromosómicos de ambos fenotipos no presentaron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en tamaño.

Tabla 1. Datos cromosómicos para dos fenotipos para color de fruto de *Chrysobalanus icaco*

Fenotipo rosado			Fenotipo púrpura		
PAR CROMOSÓMICO	C	D. E.	PAR CROMOSÓMICO	C	D. E.
1	1.87	±0.26	1	2.06	±0.57
2	1.72	±0.18	2	1.81	±0.49
3	1.57	±0.23	3	1.64	±0.41
4	1.44	±0.23	4	1.53	±0.39
5	1.36	±0.22	5	1.4	±0.28
6	1.28	±0.21	6	1.31	±0.25
7	1.18	±0.21	7	1.22	±0.23
8	1.08	±0.21	8	1.13	±0.28
9	0.95	±0.19	9	0.97	±0.2



a) Célula en metafase



b) Ordenamiento y morfología de los cromosomas

Figura 1. Célula en metafase y morfología de los cromosomas ordenados en pares homólogos encontrados en *Chrysobalanus icaco*

DISCUSIÓN

Los estudios de cromosomas en plantas son de gran valor ya que proporcionan información acerca de la relación filogenética en diferentes familias de plantas e incluso a nivel de poblaciones, y ayudan a entender procesos de especiación y comportamientos de posibles híbridos (Stebbins, 1966; Harrison y Schwarzacher, 2011). En el presente estudio se encontró que el icaco presenta 18 cromosomas pequeños en fenotipos de frutos rosados y púrpura. Estos cromosomas pudieron ordenarse en nueve pares homólogos, lo que sugiere que se trata de una especie diploide con un número básico de $x=9$ (Figura 1). Este número ya ha sido reportado por García *et al.* (2014). Sin embargo, Prance y White (1988) reportan recuentos cromosómicos de algunas especies de la familia Chrysobalanaceae (como *Maranthes* sp., *Parinari* sp., *Dactyladenia* sp., *Licania* sp.) con rangos cromosómicos de $2n=20-22$, lo que sugiere que se debería proponer un nuevo número básico para la familia. En esta caracterización cariológica no se observaron diferencias morfológicas ni numéricas en los cariotipos de ambos fenotipos evaluados. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Jiménez (2011), quien, utilizando marcadores moleculares del tipo “RAPD” concluyó que no existen diferencias en la constitución génica de los dos fenotipos del icaco analizados y que la variación de los colores de los frutos se debía a la acción que ejerce el ambiente en el genoma de la especie. Los criterios establecidos por Levan *et al.* (1964) como: longitud de brazos largo y corto (p y q), proporción de brazos, índice centromérico, diferencia entre brazos, no se utilizaron en este estudio debido a la talla tan pequeña de los cromosomas por lo que se optó por seguir los criterios establecidos por Stebbins (1938). La talla tan pequeña de los cromosomas posiblemente se debe a rearrreglos cromosómicos que se pudieran estar presentando a nivel de la familia e incluso del género. Según Stebbins (1966), es común encontrar cromosomas pequeños en plantas superiores. Cabe destacar que los cromosomas pequeños en plantas son difíciles de identificar, ya que a veces presentan cierta similitud en el tamaño (Fukui y Mukia, 1988).

CONCLUSIÓN

Se da a conocer por primera vez el cariotipo para *Chrysobalanus icaco*. Los dos fenotipos para el color del fruto (púrpura y rosado) evaluados presentaron el mismo complemento cromosómico con $2n=18$.

BIBLIOGRAFÍA

- Awise J.C. (2004) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Sinauer Assoc. Sunderland, Massachusetts.
- Fukui K., Mukai Y. (1988) Condensation pattern as a new image parameter for identification of small chromosomes in plants. *Jpn. J. Genet.* 63: 359-366.
- García V.A. (1988) Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- García M.E.J., Badal E.S.M., Gordillo J.M.L., Martínez R.F.M., Martínez R.H. (2014) Una ventana al estudio del genoma del *Chrysobalanus icaco* L. *Kuxulkab'*, 17:33.
- González O., Fernández A., Fraga Y., Pino B., Hernández M.M., Silva J.J. (2007) Evaluación de la Estabilidad Genética Mediante Marcadores RAPD en plantas de *Ipomoea batatas*. *Cult. Trop.* 28: 39-43.
- Guevara M., Siles M., Bracamonte O. (2000) Análisis Cariotípico de *Capsicum pubescens* (SOLANACEAE) “Rocoto”. *Revis. Peru. Biol.* 7: 2-7.
- Harrison-Heslop J.S., Schwarzacher T. (2011) The plant genome: an evolutionary view on structure and function. Organization of the plant genome in chromosomes. *The Plant J.* 66: 18-33.
- Jiménez G.M.E. (2011) Determinación de la diversidad genética de *Chrysobalanus icaco* L; mediante la técnica de RAPD'S. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Biológicas. Villahermosa, Tabasco.

- Levan A., Fredga K., Sandberg A. (1964) Nomenclature for Centromeric Position on Chrom. Hered. 53: 201-220.
- Maldonado M.F, Vargas S.G., Molina M.R.F, Sánchez S.A. (2004) Frutales Tropicales de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Prance G.T. (1972) Chrysobalanaceae. Flora Neotropica Monogr. 9: 1-409.
- Prance G.T., White F. (1988) The Genera of Chrysobalanaceae: A study in Practical and Theoretical Taxonomy and its Relevance to Evolutionary Biology. Philosophical Transactions of Royal Society. Biol. Sci. 320: 1-184.
- Poggio L., Espert S.M., Fortunato H. (2008) Citogenética Evolutiva en Leguminosas Americanas. Rodri. 59: 423-433.
- Stebbins G.L. (1938) Cytological characteristics associated with the different. American J. Bot. 25: 189-198.
- Stebbins G.L. (1966) Polyploidy and chromosome size and number shed light on evolutionary processes in higher plants. Science 152: 1463-1467.
- Vargas S.G., Soto H.R., Rodríguez G.M.T., Escalante E.J. (2000) Análisis Fitoquímico Preliminar del Fruto de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.): flavonoles y flavonas. Revista Chapingo, Ser. Horti. 6: 195-202.
- Valladolid A., Blas R., González R. (2004) Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. En: Seminario J. (Ed.) Raíces Andinas. Contribuciones al conocimiento y la Capacitación. Serie: Conservación y Uso de la Biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigaciones para el desarrollo (1993-2003). N° 6. C.I.P. agencia suiza para el desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú.
- Wen C.S., Hsiao J. (2001) Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan lily (*Lilium longiflorum* var. Formosanum; Liliaceae) using RAPD markers and morphological characters. Int. J. Plant Sci. 162: 287-295.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Edmundo Rosique y Silvia Capello del Laboratorio de Micología de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el apoyo en la toma de las microfotografías.



BAG
Journal of Basic & Applied Genetics