

418  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO ELECTROFORETICO DE LAS ESTERASAS  
EN LAS POBLACIONES DE TILAPIA SUJETAS A  
EXPLOTACION EN EL ESTADO DE MORELOS.**

PINDARO

DIAZ

JAIMES

B I O L O G O

1 9 8 7



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C O N T E N I D O

	pag.
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	6
-Importancia de las Tilapias en la acuicultura	8
-Electroforesis	14
-Isoenzimas	16
OBJETIVO	21
MATERIALES Y METODOS	22
RESULTADOS	29
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	49

## R E S U M E N

Se realizó un estudio electrotorético del sistema isoenzimático correspondiente a las estererasas en las poblaciones de Tilapia mossambica y T. hornorum así como de sus híbridos, que son cultivadas en las piscifactorías de Zacatepec y El Rodeo en el estado de Morelos, con el fin de encontrar un marcador genético que nos sirva de base en la identificación y manejo adecuado de las especies parentales.

Las enzimas fueron obtenidas de un extracto proveniente de la mucosa superficial del pez. Los patrones electrotoréticos obtenidos muestran la presencia de tres estererasas que corresponden a tres loci los cuales muestran variación en las frecuencias de sus bandas.

## A B S T R A C T

Electrophoretic separation of esterases of the species Tilapia mossambica and T. hornorum, as well as those of the hybrid, - cultured in the fish farms Zacatepec and El Rodeo of the state of Morelos, México, were carried out, searching for a genetic marker that enabled its identification and management.

Samples were obtained from the mucus surface of live fish. Three esterase loci were resolved in each one of the populations and specific electrophoretic patterns were obtained for every one of the studied species, showing some variation in the bands frequencies.

**INTRODUCCION:**

Dentro de la vasta historia del hombre una de las actividades con mayor antigüedad ha sido sin lugar a dudas la piscicultura, ya que se conoció y se practicó aproximadamente desde el año 575 a. de C. en China. Existen datos que indican que en México, Netzahualcoyotl, y más tarde Moctezuma, poseían varios estanques que contenían peces destinados a la alimentación de aves acuáticas (Sevilla, 1981). Esta larga tradición cultural ha permitido que en los tiempos actuales, las técnicas de acuicultura, se encuentren en un activo desarrollo, además que el número de especies cultivadas en el mundo tiende a incrementar se constantemente.

La acuicultura es una serie de técnicas fundamentadas en gran parte en la Ecología, en la cual se busca el mejor aprovechamiento de los recursos con el fin de incrementar la productividad de los sistemas acuáticos, además de contribuir a la conservación de la productividad en los suelos.

Así pues, la acuicultura es una actividad de gran importancia para el hombre en la medida que constituye una manera de aprovechamiento de los recursos hidráulicos, los cuales si son adecuadamente controlados, generan una serie de beneficios, tales como la producción de alimentos, la creación de diversas fuentes de trabajo y fundamentan una mayor diversificación de la economía del país.

El reciente desarrollo del país, así como los innumerables problemas que se presentan con motivo de dicho desarrollo, - - hacen imprescindible la búsqueda de una pronta solución al problema alimentario. Con esta finalidad se ha recurrido a la acuicultura, la cual puede contribuir a la solución de dichos problemas mediante técnicas eficaces de producción de proteínas a corto plazo, de fácil manejo y sobre todo de bajo costo. Con tal objeto, se han creado en distintas partes del país numerosas piscifactorías dedicadas al cultivo de especies de importancia económica así como de gran potencial alimenticio tales como: la Carpa, Trucha, Mojarra, Bagre, Charal, etc..

Con tal motivo se introdujeron en 1964 a México para fines alimenticios, especies de Tilapia (Arredondo, 1964), debido a sus características reproductivas, a su amplio rango de adaptación a numerosos habitats y debido a su alto contenido proteico (Vera, 1985), además de su gran aceptación en el mercado. Por ello se han establecido importantes centros piscícolas dedicados al cultivo de estas especies como los de Temascal en Oaxaca, Tezontepec en Hidalgo, y en el Estado de Morelos las de Zacatepec y El Rodeo.

La hibridación que se dió entre las especies de Tilapia introducidas a México, dificultó la identificación de crías, e hizo necesario el desarrollo de un método eficaz para lograr identificar fácilmente los organismos destinados a la produc---

ción de peces de talla comercial ya que los caracteres merísticos resultaron insuficientes para su identificación. Sin embargo existen métodos más eficientes que nos permiten establecer diferencias a un nivel más específico entre los individuos muestreados tales como la citogenética y la bioquímica sistemática.

Dentro del campo de la bioquímica sistemática encontramos distintos métodos de separación de proteínas basados en las diferencias en la carga eléctrica de las mismas, tales como la electroforesis y el electroenfoque los cuales ofrecen ventajas adicionales de separar las proteínas por su tamaño molecular.

La separación de proteínas en base a su carga eléctrica es dependiente de sus propiedades ácido-básicas, determinadas por el número y los tipos de grupos R ionizables en sus cadenas de aminoácidos, lo cual les confiere una carga eléctrica determinada por el  $p^H$  en el que se encuentren, situación que hace posible separarlas al aplicar un campo eléctrico.

La electroforesis es una técnica que nos ofrece un método accesible para el estudio de los sistemas proteínicos de los seres vivos y de esta manera permite establecer patrones electroforéticos que nos faciliten la visualización de las variaciones existentes entre las diferentes especies de organismos, debido a que las proteínas son el producto de la expresión de los genes en el sistema hereditario de los organismos.

Tales variaciones son el resultado de la evolución de los

seres vivos, la cual es un reflejo de las modificaciones sufridas por el organismo en el material genético, ya sea a nivel cromosómico o a nivel molecular influidos por el ambiente dando como resultado diferencias morfofisiológicas a nivel poblacional, lo que nos permite ubicar la gran diversidad de especies a través de la sistemática.

En el estudio de la variación determinada por electroforesis se ha introducido un método alternativo consistente en la evaluación de variación de sistemas enzimáticos, ya que esta puede expresarse a través de las alteraciones en la actividad y movilidad enzimática como resultado de alguna mutación en donde no se producen cambios aparentes en la acción del producto del gen (Shaw, 1965).

Los métodos utilizados dentro de la genética bioquímica son de gran importancia en lo que se refiere al estudio de las variaciones genéticas a nivel proteico pues de acuerdo con Utter y colaboradores (1974), ofrecen la ventaja de utilizar datos simples para formular interpretaciones genéticas de gran valor en estudios de cultivo de especies, debido a que es posible obtener datos de variaciones alélicas resultantes de la expresión codominante de un locus determinado en un gel, es decir, cada uno de los alelos es expresado como una simple banda correspondiente a una proteína.

Dichas interpretaciones nos ofrecen la posibilidad de realizar cruces entre individuos caracterizados genéticamente, -



con la finalidad de obtener individuos con características genéticamente mejoradas y de un gran valor económico dentro de la acuicultura.

Así mismo, a partir de interpretaciones electroforéticas es factible la elaboración de modelos genéticos en los organismos, los cuales nos ofrecen la posibilidad de estudio en las variaciones intra e interespecificas con las cuales se puede inferir en el estudio de las poblaciones de individuos.

En última instancia, los métodos electroforéticos son una herramienta de gran utilidad en la resolución de problemas taxonómicos y evolutivos así como en la identificación de especies parentales destinadas a la acuicultura, lo que aunado a la simplicidad y sensibilidad de estas técnicas en el estudio de la variación genética a través de las proteínas, hace de este método una de las herramientas auxiliares fundamentales en el manejo de las especies dentro de la acuicultura.

## ANTECEDENTES:

El grupo de las tilapias pertenece a la familia Cichlidae, que comprende aproximadamente 600 especies de agua dulce. La familia se encuentra ampliamente distribuída en el continente - - Africano, Asia Menor, Centro y Sudamérica e igualmente en algunas partes de la India y Ceylán.

Según Chimits (1955), las tilapias son originarias de África y también abarcan el norte de Israel y la región de Jordán - dentro de su distribución natural. Su expansión a distintas partes del mundo hecha por el hombre, comenzó a finales de 1939. - Actualmente se encuentran ampliamente distribuídas en América - siendo Tilapia mossambica una de las principales especies introducidas a otros países y continentes.

La situación taxonómica actual de las tilapias es de gran complejidad, debido a que se carece de un criterio confiable para la ubicación de las diferentes especies, puesto que los organismos de este grupo presentan grandes semejanzas en su morfología. De esta manera se ha recurrido con frecuencia a los conocimientos sobre la biología de la conducta de estos peces, con el fin de tratar de ubicarlos con base a diferencias en la crianza e incubación de sus huevos (McAndrew 1983c), así como en sus hábitos alimenticios.

Así, diversos autores han propuesto la subdivisión del género Tilapia propuesto por Regan en 1920. En esta forma Trewa--

vas (1982, citado por McAndrew 1983c) divide a este grupo en -  
tre géneros diferentes: Tilapia, para los incubadores de sus--  
trato, Sarotherodon para los incubadores bucales tanto paterna  
les como maternas y Oreochromis, para aquellos que presentan  
incubación bucal maternal únicamente.

En contraste Peters y Berns (1982), apoyan el criterio -  
propuesto por Regan, argumentando que los incubadores de sus--  
trato sufrieron ramificaciones que dieron lugar posteriormente  
a los incubadores bucales, por lo que el nombre genérico para\_  
estos organismos debe ser el de Tilapia.

Con fines prácticos, en el transcurso de este Trabajo se\_  
hará referencia a este grupo con el nombre genérico de Tilapia

#### Características Generales de las Tilapias:

En general las tilapias presentan cuerpo oblongo comprimi  
do lateralmente y escamas ctenoides. Son organismos de aguas -  
lénticas, someras, claras o turbias; prefieren aguas cálidas -  
de fondo lodoso y toleran altas salinidades, incluso más altas  
que las del agua de mar. Su rango óptimo de temperatura se en-  
cuentra entre los 20°-35°C para su reproducción y crecimiento.  
Se encuentran restringidas a la isoterma mundial de 20°C, aun-  
que su temperatura letal mínima esta entre los 8 y 10°C y la -  
máxima entre los 38° y 39°C.

Las tilapias pueden soportar concentraciones de oxígeno -  
disuelto en el agua relativamente bajas. Son organismos euriha

linos que alcanzan un mayor crecimiento en aguas salobres. Su desarrollo óptimo se da en un  $p^H$  de 7-8 aunque son capaces de resistir rangos de 5 a 11.

Son especies micrófagas omnívoras, lo cual les confiere un carácter de peces forrajeros. Las tilapias tienen preferencias planctófagas alimentándose también de plantas superiores, algas filamentosas, detritus vegetales y pueden ser alimentadas con cualquier tipo de alimento artificial o con desperdicios de semillas. Por ello son consideradas como importantes transformadores de desechos y subproductos.

En estado natural las tilapias maduran, sexualmente alrededor de los nueve meses, en relación a la especie. En estanques alcanzan la maduración sexual en nueve semanas dependiendo de la temperatura y de la especie. El número de óvulos liberados es de aproximadamente 600 influenciado, al igual que en los casos anteriores por el tamaño de la hembra y la especie. Pueden alcanzar tallas de 30-40 cm. alcanzando un peso corporal de 500 a 1000 gramos a los 10 u 11 meses.

#### IMPORTANCIA DE LAS TILAPIAS EN LA ACUICULTURA:

De acuerdo con los textos convencionales sobre acuicultura, entre los factores biológicos que han de ser tomados en cuenta para el cultivo de una especie dada y para el mejor aprovechamiento del recurso, están las condiciones ecológicas y el ciclo biológico del pez que se desee cultivar.

En cuanto a los factores ecológicos básicos que deben ser tomados en cuenta tenemos: la distribución natural de la especie, el habitat, así como la información referente a los hábitos alimenticios, con la finalidad de analizar el aprovechamiento que pueden tener dichas especies al ser introducidas a un ecosistema que ofrezca ventajas adaptativas para su cultivo

Con respecto al conocimiento adecuado del ciclo biológico de la especie en cuestión, es necesaria información básica referente a su fecundidad; hábitos reproductivos, desarrollo gonádico y comportamiento reproductivo así como el tipo de incubación de los huevecillos a fin de poder analizar los recursos con los que contamos y así evaluar las posibilidades de incremento en la producción.

Sin embargo, es importante tomar en cuenta la procedencia de la especie que se desea cultivar pues existe un debate sobre la conveniencia e inconveniencia de transferir especies de un país a otro, aunque de acuerdo con Sevilla (1981), las especies dulceacuícolas ya han alcanzado un alto grado de dispersión geográfica, como es el caso de la carpa, la trucha, la tilapia, la lobina negra, etc., las cuales tienen actualmente una distribución mundial.

Las tilapias presentan características de gran valor dentro de la acuicultura en relación con los parámetros antes mencionados ya que, en cuanto a condiciones ecológicas estos organismos presentan alta resistencia a condiciones adversas extre

mas y gran adaptabilidad a hábitos exclusivos de otras especies, así como la capacidad de resistir bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el agua.

Otro carácter de no menor importancia es su tolerancia a las temperaturas extremas que aunada a su capacidad de resistir un amplio rango de salinidad, incrementa su capacidad para adaptarse a diferentes habitats.

En lo que se refiere a su ciclo biológico, apreciamos que las tilapias presentan un gran potencial reproductivo debido a que estos organismos alcanzan su maduración sexual a muy temprana edad, carácter que a través de un manejo adecuado puede ser aprovechado en el aumento de la producción.

En estos organismos existe la posibilidad de realizar cruces entre las diferentes especies dando como resultado peces con características mejoradas provenientes de la hibridación de genotipos, obteniéndose individuos con mayor resistencia a condiciones adversas.

La evaluación de las ventajas que ofrece el cultivo de las tilapias hace patente el valor potencial de estos organismos con respecto a la producción de alimentos. De esta manera el cultivo de estas especies se ha extendido a diversas partes del mundo: en el continente Africano; en Asia, en países como Israel, India, Japón. En Europa, Alemania, Francia, URSS. En Norteamérica: E.E.U.U. (Lousiana, Florida, California, Alabama), en México. En Centroamérica (Nicaragua, Costa Rica) Carib.

be (Cuba, Puerto Rico). Sudamérica (Colombia, Perú, Brasil).

En México, las tilapias fueron introducidas en el año de -- 1964 con fines de cultivo. Actualmente se encuentran en la mayo\_ ría de los cuerpos de agua en donde la temperatura les permite\_ su reproducción y crecimiento. Sevilla (1981) propone cuatro zo\_ nas piscícolas en nuestro país indicando la zona cálida como la apropiada para el desarrollo y crecimiento de las tilapias don\_ de la temperatura fluctúa entre los 25° y 30°C. Esta zona abar\_ ca casi toda la planicie costera y desde el nivel del mar hasta los 900 mts. de altitud.

La introducción de las Tilapias a nuestro país ocurre en -- 1964 (Rosas, 1976 tomado de Vera 1985), siendo T. mossambica, T nilotica y T. melanopleura las cuales fueron procedentes de - - Ausburn, Alabama en U.S.A y depositadas en Temazcal Oaxaca.

Las tilapias pueden presentar una reproducción excesiva que trae como resultado la producción de peces pequeños de talla no comercial debido a la presencia de hembras en la población, lo\_ cual desde el punto de vista de producción, resulta incosteable puesto que éstas desaprovechan la energía suministrada por el - alimento utilizándola con fines reproductivos y no con fines de crecimiento como es el caso de los machos. Esto incide en la -- disminución de la importancia comercial de estos organismos de\_ tal modo que la presencia de hembras aumenta considerablemente\_ el potencial reproductivo del stock. Esta circunstancia aunada\_ a la precocidad en la madurez sexual de estos organismos y a un

inadecuado control de los stocks, trae como resultado una reproducción incontrolada en los estanques que reduce cualquier rendimiento económico posible.

A raíz de la aparición de este problema se ha recurrido, al cruzamiento de especies genéticamente puras que producen progeñie monosexual masculina. Esto es posible debido al sistema de determinación sexual de estas especies, el cual parece estar compuesto por una interacción entre factores autosómicos y a los cromosomas sexuales, en donde la suma obtenida de dicha interacción puede dar como resultado un genotipo masculino.

Las especies de tilapias más utilizadas en distintas partes del mundo para realizar cruzamientos para la reproducción de híbridos 100% machos tenemos: Tilapia aurea, Tilapia mossambica, Tilapia hornorum, Tilapia galilei, Tilapia nigra, Tilapia macrochir, Tilapia vulcani, Tilapia melanopleura, Tilapia rendalli y Tilapia zilli.

En México se introdujeron en el año de 1980-1981 especies de T. hornorum y T. mossambica ésta última de una línea genética albina con la finalidad de producir cultivos de híbridos 100% machos resultantes de la cruce de estas dos especies.

Algunas de las cruces en las que existe información de la obtención de cultivos monosexuales de tilapias 100% machos son:

Tilapia mossambica ♀ X Tilapia hornorum ♂ = 100% (Hicklin 1960)

Tilapia nigra ♀ X Tilapia hornorum ♂ = 100% (Pruginin 1967)



T. <u>nilotica</u>	♀ X	T. <u>variabilis</u>	♂ = 100% (Pruginin 1967)
T. <u>nilotica</u>	♀ X	T. <u>macrochir</u>	♂ = 100% (Jalebort 1970)
T. <u>nilotica</u>	♀ X	T. <u>aurea</u>	♂ = 100% (Fishelson 1962)
T. <u>mossambica</u>	♀ X	T. <u>macrochir</u>	♂ = 100% (McAndrew 1983b)
T. <u>nigra</u>	♀ X	T. <u>leucostica</u>	♂ = 95% (Pruginin 1967)

Sin embargo, para la obtención de estos fenotipos masculinos es necesario realizar las cruzas a partir de especies puras y debido a la carencia de un método de control de éstas, ha existido infiltración de genotipos de otras especies, lo que ha creado un decremento en el porcentaje de machos en las cruzas. La cruce de la especie parental con sus híbridos debido a que es difícil la identificación de éstos por su gran semejanza durante la separación de los stocks puros puede producir la infiltración mencionada anteriormente. Este fenómeno también puede deberse al escape de individuos de otras especies provenientes de estanques cercanos (Avtalion 1982).

Por lo anterior se ha recurrido a la electroforesis como un método alternativo en la resolución de este problema, a fin de obtener marcadores genéticos en diversos sistemas proteínicos que nos ayuden a la identificación de las especies parentales y sus híbridos, (Avtali6n 1974, 1976, 1982; Chen y Tsuyuki, 1970; Herzberg, 1978; McAndrew, 1983 a; Camacho, 1984).

Así pues la importancia de las tilapias en la acuicultura -

depende, del incremento en la producción de alimentos que pueda ser producido. Las tilapias constituyen además una herramienta de gran utilidad en la investigación aplicada a la acuicultura debido a su mecanismo de determinación sexual, que parece ser - poligénico y/o multialélico (McAndrew 1983b).

#### ELECTROFORESIS:

La electroforesis es un método ampliamente utilizado en bioquímica y en diversas áreas de la biología, con la finalidad del estudio de las proteínas principalmente, así como de otras moléculas de gran importancia en los seres vivos. El método tiene como principal finalidad la separación de las proteínas de un complejo molecular con base en sus propiedades ácido-básicas con el objeto de estudiar cualitativa y cuantitativamente las proteínas separadas.

La electroforesis consiste en la utilización de las propiedades particulares de las proteínas en solución debido a que -- muestran un comportamiento anfotérico. Es decir, son capaces de cargarse positivamente o negativamente en relación al  $p^H$  del medio en el que se encuentran. Esta propiedad particular de poseer una carga eléctrica esta dada por la ionización de los grupos R de sus cadenas de aminoácidos de la proteína así como de los grupos carboxilo ( $COO^-$ ) y amino ( $NH^+$ ) terminales. La capacidad de las proteínas de poseer dicha carga esta en relación con su punto isoeléctrico de la proteína, que es el  $p^H$  en el cual - dicha proteína no posee carga neta, es decir, el número de car-

gas positivas y negativas es igual, de tal manera que al estar - la molécula en un  $p^H$  ácido en relación con su punto isoelectrico tendrá una carga positiva neta y si se encuentra en un  $p^H$  básico tendrá una carga negativa.

Si esta protefna poseedora de una carga neta se coloca en - una solución o en un medio de soporte como el agar, y es sometida a un campo eléctrico, ésta se desplazará hacia el electrodo - correspondiente. Cada protefna posee un número de cargas según - el número de grupos ionizables de tal manera que su movilidad -- electroforética es distinta por lo que existen diferencias en la migración de las protefnas hacia los electrodos, lo que hace posible separar las distintas protefnas de un complejo.

Existen dos tipos de electroforesis convencionales; la primera que es la electroforesis libre, en donde las protefnas se encuentran en un solución tamponada, desarrollada primeramente por Tiselius en 1930 y es la predecesora de todos los métodos actuales. La segunda que es la electroforesis de zona en donde la solución de protefnas es puesta en un medio de soporte semisólido, como: almidón ó agar.

La electroforesis de zona es uno de los métodos más utilizados actualmente en bioquímica debido a que poseen una mayor capacidad de resolución. En esta se encuentran diversas variantes de acuerdo al medio de soporte del que se trate, de este modo tenemos que son utilizados como medios de soporte el gel de almidón, agar, sílice, poliacrilamida y acetato de celulosa.

En los geles de almidón y poliacrilamida se logra una resoluy

ción más elevada debido a que en este tipo de geles es posible la regulación del tamaño del poro, obteniéndose así la separación de las proteínas con base en su carga y su tamaño molecular

El gel de poliacrilamida se ha utilizado ampliamente en la separación de las proteínas ya que ofrece una mayor resolución de las bandas en comparación con el gel de almidón, además de que al ser un polímero sintético su manejo es más fácil.

En esta forma la electroforesis constituye una herramienta de gran utilidad para el hombre, pues ha encontrado diferentes aplicaciones dentro del campo de la investigación científica así como en la diagnosis clínica y en diversas industrias.

#### ISOENZIMAS:

El término de isoenzimas se utiliza para denominar a un grupo de enzimas que presentan la misma afinidad hacia un sustrato pero con diferentes propiedades en cuanto a la estructura de sus moléculas. Estas isoenzimas pueden estar presentes en una sola especie de organismos e incluso en una misma célula.

Aparentemente las isoenzimas están codificadas por genes diferentes de ahí que su secuencia y composición de aminoácidos sea diferente, por lo que la existencia de estas formas múltiples de una enzima pueden ser detectadas mediante la electroforesis.

Al estar las isoenzimas determinadas genéticamente, su biosíntesis y sus cantidades relativas se encuentran reguladas mediante un mecanismo genético. De esta manera es posible encontrar los diversos tipos de una isoenzima en una diferente concentración en diversos tejidos e incluso en distintos organelos de una célula.

Este es el caso, de la LDH (Lactato-deshidrogenasa) la cual esta formada por dos cadenas polipeptídicas diferentes; la cadena M y H, la primera presente en grandes cantidades en el músculo esquelético y la segunda abundante en el músculo del corazón, - (Lenhinger, 1981).

Existen cinco isoenzimas de la LDH, las cuales están constituidas por las diferentes combinaciones de las subunidades M y H;  $M_4$ ,  $M_3H$ ,  $M_2H_2$ , y  $H_4$ . Estas isoenzimas de la LDH catalizan la misma reacción pero difieren en sus valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ , de ahí la diferencia existente en las cantidades relativas de los distintos tejidos.

Estas diferencias sugieren que las isoenzimas en general -- tienen una distribución específica en los diferentes tejidos -- por lo que es posible que a su vez éstas tengan igualmente cierta distribución en una población de organismos la cual está determinada por factores del medio externo, aunque este patrón de variación en la distribución no sea visible en la estructura y funcionamiento de los organismos.

Las isoenzimas fueron estudiadas primeramente por Market y colaboradores en 1959 quienes propusieron el término de isoenzimas para determinar este tipo de variantes enzimáticas. Se han propuesto diversos conceptos estructurales para explicar la heterogeneidad enzimática (Wilkinson 1970).

Se ha expuesto que en la LDH, las diversas combinaciones de las subunidades son las responsables de la variación. En el ca-

so de la fosfatasa alcalina se cree que la diferencia radica en las diferentes cantidades de ac.neuraminico que estas poseen -- (Fishman, 1967 tomado de Wilkinson, 1970), lo que les confiere\_ diferencias en su carga eléctrica. Para las colinesterasas, - - Bernsohm y colaboradores (1961) sugieren un mecanismo de polime\_ rización en diferentes estados.

Las estererasas están incluídas en el grupo de las hidrolasas dentro de las cuales encontramos también a las fosfatasas alcalinas. Agustínsson (1961), divide las estererasas en tres grupos\_ de acuerdo a su movilidad electrororética en el gel; la más rá\_ pida, la arylesterasa, se encuentra en la región de la albúmina y es cercanamente seguida por la aliesterasa en la región de la alfa globulina. La más lenta es la colinesterasa entre la re--- gión de la alfa y beta globulina. Estos tipos de estererasas han\_ sido encontrados en plasma de varias especies de organismos en\_ donde hay variación en sus movilidades electroforéticas aunque\_ las especificidades de sustrato fueron similares.

Existen problemas en cuanto a la consideración de las este\_ rasas como isoenzimas debido a que éstas poseen un amplio rango de especificidad a diversos sustratos, con muy pocas diferen--- cias en cuanto a la preferencia por los diferentes sustratos. - En general estas enzimas hidrolizan enlaces éster. Por su parte las aliesterasas hidrolizan un amplio rango de ésteres alipáti\_ cos mientras que la arylesterasa hidroliza ésteres aromáticos y las colinesterasas hidrolizan colinesteres (Wilkinson, 1970).

Al igual que las isoenzimas de la LDH, las estererasas también son encontradas en diferentes cantidades en los distintos tejidos de un organismo. Ecobicnan y Kalow, 1961 (tomado de Latner - 1968) hicieron estudios de las estererasas de suero sanguíneo e -- nfigado humanos obteniendo patrones diferentes. En peces se han - encontrado principalmente aliestererasas y colinestererasas, esta úl tima en bajas concentraciones.

La detección de las isoenzimas en general después de la elec troforesis, es llevada por medio de las técnicas de tinción his toquímica desarrolladas por Hunter y Market en 1957 (Shaw, 1970) y estan basados en la detección de la actividad de las enzimas - al aplicarles un sustrato, por medio de sales de diazonio que se ligan al producto de la reacción enzimática dando como resultado el patrón de bandas en el gel.

Las isoenzimas han sido, desde su descubrimiento, de gran in terés para los científicos de tal manera que en la actualidad és tas han llegado a tener una gran importancia en diversos campos de la biología y la medicina. Shaw (1965) indica que muchas de - sus aplicaciones resultan del polimorfismo que muestran las iso- enzimas al ser estudiadas mediante técnica electrororéticas. En- tre ellas están:

- a). Los marcadores genéticos en estudios de linaje.
- b). La caracterización de líneas celulares cultivadas, en las - cuales pueden proveer información sobre su función y diferen ciación celulares.

- c). En estudios ontogenéticos.
- d). En el análisis de la estructura compleja de subunidades de - enzimas.
- e). En medicina son utilizadas para la detección de células can- cerígenas, además de ser importantes en el diagnóstico clíni- co de algunas enfermedades.

La aplicación de las isoenzimas como marcadores genéticos, - tiene gran importancia en la acuicultura ya que provee de méto- dos auxiliares que permiten un mejor aprovechamiento de los re- cursos mediante métodos de monitoreo genético tales como los si- guientes:

1. En la identificación de la progenie resultante de las cruza- para preservar o mantener la pureza de las líneas.
2. Facilitan la realización de pruebas genéticas al ofrecer dise- ños experimentales como el caso de la crianza múltiple de di- ferentes grupos genéticos, reduciendo el número de estanques- necesarios para esta finalidad.
3. En la elaboración de estructuras familiares complejas, para - análisis genéticos en la producción de nuevas características en los individuos.

El estudio de las variaciones genéticas expresadas en las -- isoenzimas, detectadas electrororéticamente, ofrecen un campo -- muy amplio en la investigación científica lo que puede ser apro- vechado en la creación de nuevos métodos capaces de auxiliarnos\_ en la solución de diversos problemas, en el área de genética - - principalmente.



**OBJETIVO:**

La principal finalidad de este trabajo es el estudio de las estererasas provenientes de la mucosa superficial de los peces correspondientes a las poblaciones de Tilapia que son cultivadas en las piscifactorías del Estado de Morelos, incluyendo a sus híbridos, con objeto de evaluar la factibilidad de que constituyan un marcador genético de gran utilidad en la identificación de las poblaciones de Tilapia a nivel de individuos y de que -- auxilie en la resolución de la problemática existente en cuanto a la producción de la progenie híbrida. El uso de la mucosa superficial permite mantener vivos a los organismos muestreados con el fin de elaborar técnicas de monitoreo genético en donde las metodologías utilizadas sean de poca complejidad y accesibles de ser utilizadas en donde sean requeridas.

## MATERIALES Y METODOS:

## Procedencia de los organismos.-

Las muestras fueron obtenidas de organismos correspondientes a Tilapia mossambica (de una línea albina con colaboración naranja) y Tilapia hornorum procedentes de estanques destinados a especies reproductoras de la piscifactoría del Estado de Morelos - en Zacatepec; en donde se realizan cruza para la producción de dichas especies reproductoras. También fueron analizadas muestras de híbridos resultantes de las cruza de estas dos especies. Estos organismos híbridos fueron procedentes de la piscifactoría El Rodeo, también ubicada en el Estado de Morelos. Después de haber obtenido las muestras, estas fueron congeladas y transportadas al laboratorio de Genética de organismos acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en la Universidad Nacional Autónoma de México para el análisis electroforético correspondiente.

## Reactivos utilizados:

Los procedimientos electroforéticos utilizados en este trabajo fueron llevados a cabo en geles de poliacrilamida al 10% según la técnica propuesta por Fehrström y Moberg (1977) en donde se utilizaron los siguientes reactivos:

Acrilamida (Merck)	22.2 gr.	en 100 ml. de agua dest.
Bisacrilamida (Sigma)	0.6 gr.	
Persulfato de amonio	3.0 ml.	0.1M
TEMED	0.1 ml.	

## Sistema de buffers.-

Durante la electroforesis se utilizó un sistema de buffers - discontinuo consistente en dos tipos de buffer:

(1) Tris-Glicina  $p^H$  8.9; para el cátodo:

6.32 gr. de Tris (sigma).

En 1000 ml. de agua destilada  
y desionizada.

3.94 gr. de Glicina (Merck)

(2) Tris-HCL buffer  $p^H$  8.1; para el ánodo:

12.1 gr. de Tris (sigma)

En 1000 ml. de agua destilada  
y desionizada.

50 ml. de HCL 1N

## Preparación de los geles.-

En la elaboración de los geles se utilizó la técnica seguida por Fehrström y Moberg (1977), en donde la polimerización del gel es llevada a cabo en un dispositivo formado por una placa de plástico sobrepuesta a otra placa de vidrio, ambas unidas por pinzas y selladas por una liga de varios mm. de grosor. Después de haber preparado la solución de acrilamida, ésta fue introducida al dispositivo mencionado anteriormente y se guardó en refrigeración durante 24 hrs. para su polimerización. El gel se preparó de la siguiente manera:

Buffer Tris-Glicina  $p^H$  8.9 33.0 ml.

Solución de poliacrilamida 29.7 ml.

\*Se aplicó un vacío durante 20 segundos

Persulfato de amonio 0.1M 3.2 ml.

TEMED

\*finalmente se aplicó nuevamente vacío por 20 segundos.

#### Preparación de muestras.-

Se analizó el sistema isoenzimático correspondiente a las es ter as as, para la obtención y preparación de las muestras se siguió la técnica reportada por Herzberg (1977) con algunas modificaciones de Díaz y Uribe.\*

Las muestras utilizadas fueron procedentes de la superficie mucosa de las Tilapias la cual fue extraída con la ayuda de algodón esterilizado, raspando la superficie mucosa del pez y después difundida en 0.5 ml. de una solución de Trizma 0.001M (Tris hidroximetilaminometano). El extracto de la superficie mucosa fue posteriormente centrifugado a 15 000 rpm. durante 10 a 15 minutos. Finalmente los sobrenadantes de las muestras fueron colocados en tubos de vidrio etiquetados y guardados bajo refrigeración a -4°C durante 24 hrs. antes de realizar los corrimientos electroforéticos.

#### Material biológico.-

Se estudiaron un total de 95 organismos, de los cuales 40 corresponden a Tilapia mossambica, otros 40 fueron de Tilapia horonorum y 15 correspondientes a los híbridos de estas especies. Los organismos muestreados fueron seleccionados de una talla promedio de 15 a 20 cm. de longitud total.

#### Técnica electroforética.-

En la realización de los corrimientos electroforéticos, - -

\*Lab. de Genética de org. acuáticos.

fue seguida la técnica descrita por Fernström y Moberg (1977), - para electroforesis horizontal en gel de poliacrilamida. Realiza da en un equipo LKB de electroforesis consistente en una cuba mo delo Multipor horizontal 2117, una fuente de poder modelo 2103 y un sistema de refrigeración. Los corrimientos fueron iniciados, - en todos los casos, con una preelectroforesis sin muestras a 222 Volts, 400 mA y 280 Watts de poder durante 30 minutos con el pro pósito de limpiar al gel de impurezas e impregnario a su vez de las soluciones amortiguadoras, todos los corrimientos se realiza ron a una temperatura de 9°C. Después de esto, se colocaron las muestras en los pozos de gel y se realizó una preelectroforesis con muestras durante 10 minutos con el fin de compactar la mues tra con una corriente de 250 mA conservando las mismas condicio nes de voltaje y poder. Al pasar este tiempo se comenzó la elec troforesis a una corriente de 450 mA sin cambios en las otras va riables de voltaje y poder. Los corrimientos tuvieron una dura ción de una hora con 15 minutos en promedio. Se utilizó azul de bromofenol como indicador frontal de la electroforesis.

Luego de haber concluido los corrimientos se procedio a la - tinción histoquímica de las esterases de acuerdo con la técnica descrita por Shaw y Prasad (1970).

Después de la revelación de las izoenzimas mediante la técni ca mencionada anteriormente, se colocó la placa en una solución desteñidora a base de etanol-ac. acético y agua destilada, con - el fin de eliminar el exceso de colorantes durante algunos días

haciéndole varios cambios de solución hasta que el gel quedó totalmente desteñido. Posteriormente se colocó el gel en una solución preservadora a base de metanol-glicerol-ác. acético en agua destilada, durante una hora aproximadamente. Después de este tiempo se eliminó el exceso de solución y se colocó encima una placa de plástico para su conservación. Finalmente se tomaron las impresiones fotográficas correspondientes sobre un negatocopio y se guardaron los geles para análisis posteriores.

#### Tinción histoquímica.-

Después de los corrimientos se revelaron las esterasas mediante la tinción de la actividad enzimática en el gel desarrollado primeramente por Hunter y Market (1957), también llamado método del zimograma. El sustrato utilizado para la actividad enzimática fue el alfa y beta-naftil acetato y detectado mediante una sal de diazonio. En la elaboración de la mezcla reveladora formada por el sustrato y el colorante se emplearon las siguientes sustancias:

#### Sustrato: 1% de alfa y beta-naftil acetato.

alfa-naftil acetato (Sigma)	60mg
beta-naftil acetato (Sigma)	60mg
Acetona (Baker)	3ml
Agua destilada	3ml

#### Colorante (Sal de diazonio):

Azul Rápido RR (Fast Blue, Sigma)	200mg
-----------------------------------	-------

0.5M Tris-HCL, p <sup>H</sup> 7.1	20ml
Substrato (alfa y beta-naftil 1%)	6ml
Agua destilada	174ml

Al término de la electroforesis, la placa es colocada en esta solución incubándola a temperatura ambiente de 15 minutos a 2 horas o hasta que aparezcan las bandas. Los reactivos así como las soluciones, deben ser preparadas y mezcladas unos cuantos minutos antes de ser utilizados debido a que se descomponen fácilmente en unos cuantos minutos.

#### Densitometría.-

Después de haber realizado las impresiones fotográficas de las placas, se elaboraron los electroferogramas correspondientes y posteriormente se procedió a la lectura de las placas en un desintómetro LKB 2202 programable. Se analizaron los patrones de bandeo mediante un equipo de computación Apple IIe conectado al desintómetro obteniéndose así las gráficas correspondientes además de los valores de las intensidades de cada una de las bandas presentes en el gel. Para las lecturas en el densitómetro fueron seleccionados los patrones de bandas más definidos y más representativos de cada población analizada. Dichas gráficas son mostradas en las figuras 3,a-b-c.

En el análisis de los resultados se obtuvieron las frecuencias observada y esperada de acuerdo a la ecuación de equilibrio de Hardy-Wainberg, obteniéndose las frecuencias génicas y genotí

picas de las esterasas para cada población

Posteriormente se realizó una prueba de  $\chi^2$  entre dichas frecuencias, para los loci que presentaron variación alélica, con el fin de confirmar si las diferencias existentes en sus frecuencias son debido al azar.

La movilidad relativa ( $R_f$ ) para cada banda obtenida correspondiente a cada una de las enzimas, fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína}}{\text{Largo del gel después de seco.}} \times \frac{\text{Largo del gel antes de fijar}}{\text{Distancia de migración del bromofenol.}}$$



## RESULTADOS:

Los resultados de los patrones electroforéticos del sistema isoenzimático de las esterasas obtenidas de la mucosa superficial de las tilapias muestran algunas diferencias interespecíficas en cuanto a la ubicación, número e intensidad de las bandas

Las bandas presentes en los zimogramas fueron numeradas de acuerdo a su movilidad electroforética y denotadas por medio de una letra (tabla I) que corresponde al locus genético asignado. Así pues, estas fueron numeradas en el orden correspondiente -- iniciado por la región rápida del gel (región anódica).

De esta manera para las poblaciones de Tilapia hornorum y Tilapia mossambica los patrones electroforéticos de bandas son mostrados en la figura 1. En estos patrones se observan cinco -- bandas principales que corresponden a tres esterasas; dos de -- las cuales presentan variación alélica:  $EST_1^{aa'}$  y  $EST_3^{cc'}$ , mientras que la  $EST_2^b$  no manifestó variación alguna.

En la tabla I se muestra el patrón electroforético observado en T. hornorum, T. mossambica y el híbrido en donde se muestran las bandas así como la conformación estructural de los loci genéticos de las esterasas.

En la tabla II son mostradas las frecuencias génicas de las esterasas obtenidas junto con las movilidades relativas ( $R_f$ ) para cada banda. Asimismo en la tabla III son mostradas las frecuencias genotípicas observadas en las bandas correspondientes a los loci de las enzimas comparadas con las frecuencias esperadas para cada una. Podemos notar que no existen diferencias significativas en las frecuencias obtenidas lo que está confirmado


por la prueba de  $\chi^2$ .

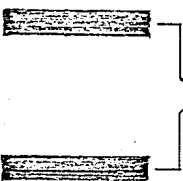
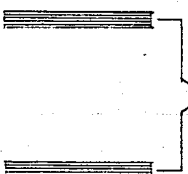
En relación con el híbrido de T. hornorum Y T. mossambica - tenemos que las bandas correspondientes a la  $EST_1^{aa'}$  se mostraron traslapadas no pudiendo ser bien diferenciadas (Fig.1), esto puede deberse a que el sistema de buffers utilizado nos permitió su resolución en dos bandas separadas.

Los valores de  $R_f$  (movilidad relativa) se encuentran dados con su respectiva desviación standart en la tabla II.

Las gráficas obtenidas por medio del desintómetro, correspondientes a T. hornorum, T. mossambica y el híbrido, fueron seleccionadas de los mejores geles y de acuerdo con los patrones de bandas más representativos de cada población, son mostrados en las figuras 3. a,b,c. junto con los valores de las intensidades de las bandas obtenidos por el computador.

Por otra parte podemos notar en las impresiones fotográficas así como en los valores de intensidad de las bandas, correspondientes a las  $EST_1^{aa'}$  junto con la  $EST_2^b$  que presentan valores de intensidad muy altos (ver gráfica 3 a-b-c-) en relación con las restantes. Situación que podemos constatar en la tabla I en donde la banda de la  $EST_2^b$  presentó una frecuencia del 100% superando las restantes, lo cual podría ser el significado de la importancia de esta enzima en esta poblaciones.


 ánodo

N <sup>o</sup> de Banda	Bandas	Estructura	N <sup>o</sup> de Loci
1	a	 EST <sub>1</sub> <sup>a<sup>a</sup>'</sup>	monomérica polimérica
2	a'		
3		EST <sub>2</sub> <sup>b</sup>	monomérica monomérica
4	c	 EST <sub>3</sub> <sup>c<sup>c</sup>'</sup>	monomérica polimérica
5	c'		



 cátodo

Tabla I.-

Patrón electroforético de esterases de las Tilapias. El número en subíndice indica el orden de migración de las bandas iniciado desde la región anódica y la letra el locus genético asignado a la proteína.

(EST=esterasa)

Banda	<u>T.hornorum</u>	Híbrido	<u>T.mossambica</u>
1	Frec = 0.690 $R_f = 4.034 \pm 0.11$	Frec = 1.000 $R_f = 4.036 \pm 0.11$	Frec = 0.166 $R_f = 4.036 \pm 0.11$
2	Frec = 0.310 $R_f = 3.741 \pm 0.072$	Frec = 1.000 $R_f = 3.741 \pm 0.072$	Frec = 0.833 $R_f = 3.741 \pm 0.072$
3	Frec = 1.000 $R_f = 2.428 \pm 0.164$	Frec = 0.920 $R_f = 2.428 \pm 0.164$	Frec = 0.900 $R_f = 2.428 \pm 0.164$
4	Frec = 0.500 $R_f = 1.975 \pm 0.287$	Frec = 0.920 $R_f = 1.975 \pm 0.287$	Frec = 0.900 $R_f = 1.975 \pm 0.287$
5	Frec = 0.500 $R_f = 1.086 \pm 0.143$	Frec = 0.070 $R_f = 1.086 \pm 0.143$	Frec = 0.010 $R_f = 1.086 \pm 0.143$

Tabla II

Frecuencias génicas y movilidad relativa ( $R_f$ ) para cada una de las bandas correspondientes a las esterasas obtenidas de las poblaciones de tilapia.

		T. hornorum n = 21		T. mossambica n = 21	
L o c i	Genotipo	Frec. esp	Frec. obs	Frec. esp	Frec. obs
1	a a	10	10	1	2
	a a'	9	9	4	1
	a' a'	2	2	10	12
3	c c	5	3	17	17
	c c'	11	15	4	4
	c' c'	5	3	0	0

Tabla III

Frecuencias genotípicas observadas y esperadas en las poblaciones de *T. hornorum* y *T. mossambica* de los loci correspondientes a las  $EST_{aa'}^1$  y  $EST_{cc'}^3$  respectivamente.

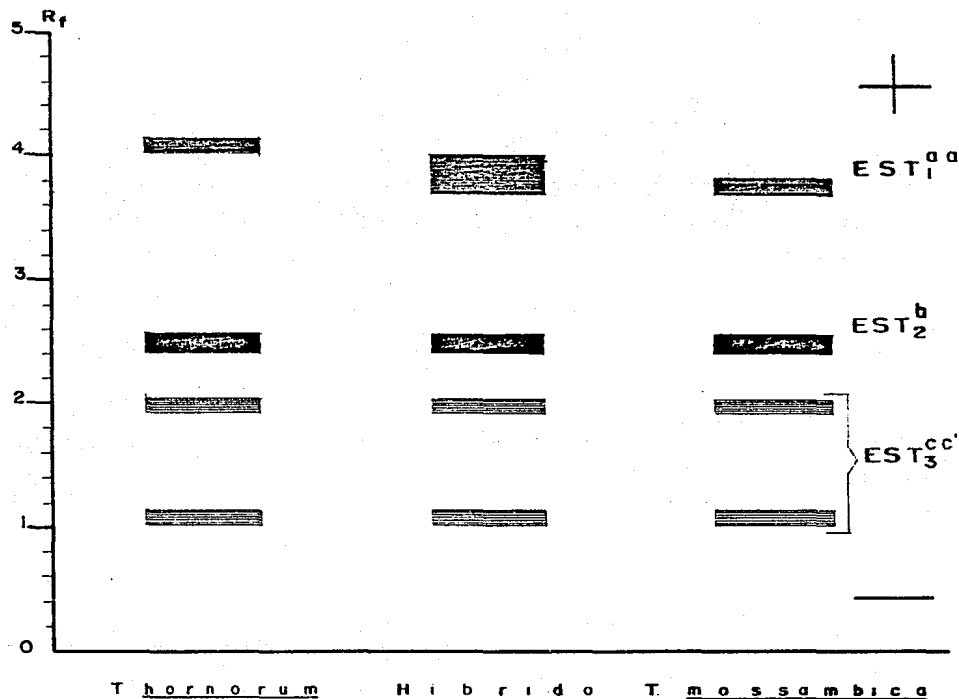


Figura 1

Electroferograma de los patrones de bandas de las esterases más frecuentes en las poblaciones de tilapia estudiadas con su respectivo locus asignado y su movilidad electroforética.

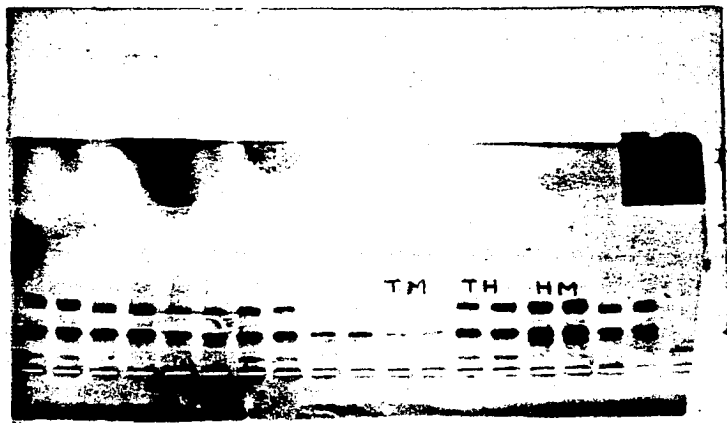


Figura 2.-

Patrones electroforéticos observados para el sistema isoenzimático de esterasas en las poblaciones de tilapia.

T. mossambica (TM), T. hornorum (TH), y su Híbrido (HB)

DATOS DE INTENSIDAD  
EST 1103 ISOENZIMAS Tilapia mossambica

Fecha; 9-seo-86  
(escala 6, abs. 2)

Pico #	Posición	Intensidad 1.000	Intensidad %	
*1	19.1	116.7	29.8	
2	20.5	22.1	5.7	EST <sub>3</sub> <sup>c</sup>
3	32.6	135.0	34.5	EST <sub>2</sub> <sup>b</sup>
4	60.5	17.9	4.6	EST <sub>1</sub> <sup>a</sup>

Intensidad total; 391.3 = 100%

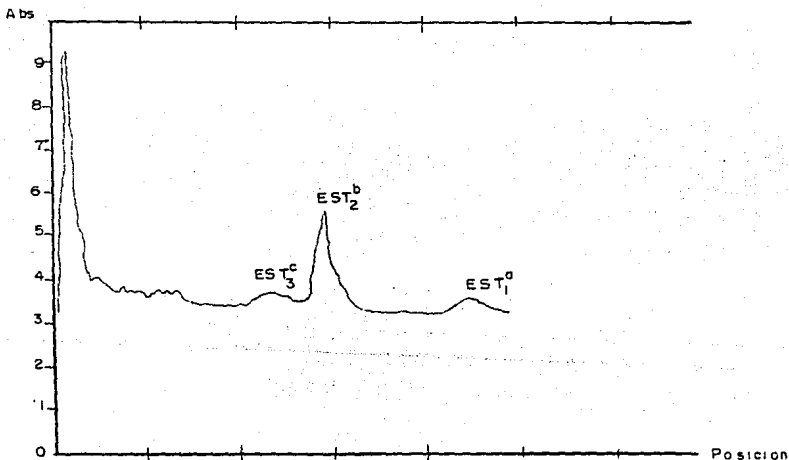


Figura 3a

Gráfica del patrón electroforético más frecuente de T. mossambica analizado por el densitómetro en donde se muestran los picos para cada esterasa obtenida así como sus respectivas intensidades.

\*No corresponde a ninguna banda en el gel



DATOS DE INTENSIDAD  
EST 1102 ISOENZIMAS Tilapia hornorum

Fecha; 9 sep-86  
(escala 6, abs. 2)

Pico #	Posición	Intensidad 1.000	Intensidad %	
1	22.9	60.1	11.2	EST <sub>3</sub> <sup>c</sup>
2	30.3	39.7	7.4	EST <sub>3</sub> <sup>c</sup>
3	32.3	242.8	45.2	EST <sub>2</sub> <sup>b</sup>
4	40.9	67.0	12.5	EST <sub>1</sub> <sup>a</sup>

Intensidad total; 537.6 = 100%

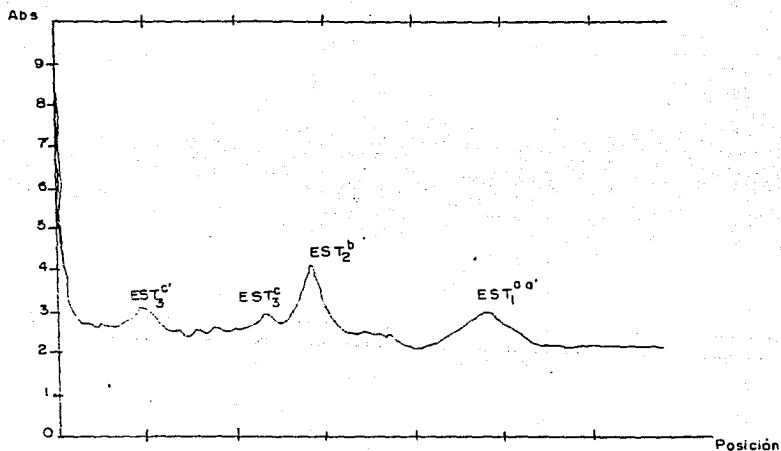


Figura 3b

Gráfica del patrón electroforético más frecuente de T. hornorum analizado por el densitómetro en donde se muestran los picos para cada esterasa obtenida así como sus respectivas intensidades.

DATOS DE INTENSIDAD  
EST-10 ISOENZIMAS TILAPIA (Híbrido)

Fecha; 9-sep-86  
(escala 10, abs 2)

Pico #	Posición	Intensidad 1.000	Intensidad %	
1	28.6	315.18	21.9	EST <sub>3</sub> <sup>c</sup>
2	30.5	247.3	17.2	EST <sub>2</sub> <sup>b</sup>
3	38.7	491.0	34.1	EST <sub>1</sub> <sup>aa'</sup>

Intensidad total; 1441.9 = 100%

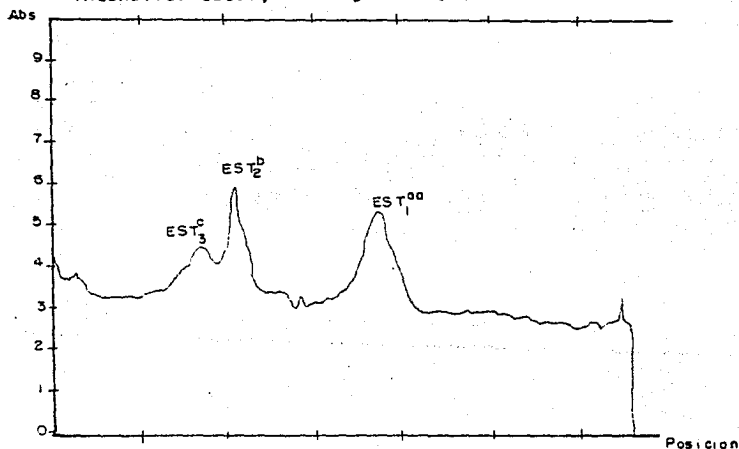


Figura 3c

Gráfica del patrón electroforético más frecuente del híbrido de *T. mossambica* y *T. hornorum* analizado por el densitómetro en donde se muestran los picos para cada esterasa obtenida así como sus respectivas intensidades.

## DISCUSION.-

Los patrones electroforéticos isoenzimáticos obtenidos para cada población de Tilapia fueron analizados tomando como principal criterio la presencia o ausencia de bandas, sus características de migración en el gel y sus intensidades respectivas. Un carácter de gran utilidad fue la interpretación gráfica de los patrones de bandas por medio de la desintometría ya que nos ofrece la posibilidad de visualizar de manera más objetiva el análisis de datos en comparación con la simplicidad, sin restarle su gran valor, de una impresión fotográfica o de un electroferograma.

Como primordial punto de discusión nos basaremos en la variación alélica obtenida en las esterasas con respecto a las frecuencias obtenidas de los diferentes genotipos de cada enzima para las poblaciones de Tilapia analizadas (tabla III).

El establecimiento del criterio tomado para la designación de los loci correspondientes a las esterasas obtenidas en los patrones electroforéticos fue basado en un modelo de variación Mendeliana procedente de estudios realizados sobre genética bioquímica por Utter y colaboradores (1974).

Dicho criterio se basa en la herencia Mendeliana en donde las bandas resueltas electroforéticamente deben darnos patrones interpretables basados en hipótesis genéticas sencillas. Estas hipótesis se fundamentan en las variaciones de los patrones observados en organismos heterocigotos en donde han sido obteni-

dos cuatro tipos básicos de variación (Shaw 1965, Utter et al.-1974), los cuales reflejan una expresión codominante de los alelos (Fig. 4).

Los patrones a, b y c de la figura 4, corresponden a una típica expresión alélica con las respectivas combinaciones de sus subunidades. Estos patrones son proteínas que consisten de una, dos y cuatro subunidades respectivamente. El patrón del tipo d consiste en una proteína dimerica con dos loci; uno fijado y el otro polimórfico y ha sido observado por la Malato deshidrogenasa (MDH) e Isocitrato deshidrogenasa (IDH) (Bailey y colaboradores 1970, Allendorf y Utter 1973).

Los patrones a, b y c son reflejo de variación alélica codominante.

De acuerdo con los tipos de variación alélica citados podemos asumir que los patrones de bandas para las esterasas estudiadas se encuentran constituidos por tres loci; dos de los cuales presentan polimorfismo ( $EST_1^{aa'}$  y  $EST_3^{cc'}$ ) y el restante, correspondiente a la  $EST_2^b$  no fue polimórfico (ver tabla I). Estas enzimas presentan un patrón de variación del tipo a, es decir, su estructura fue monomérica constante de dos subunidades que corresponden a los alelos a, a' y c, c' respectivamente.

En relación al locus correspondiente a la  $EST_2^b$ , éste no presentó polimorfismo, es decir, su estructura no está formada por subunidades por lo cual no presenta variación alélica. A pesar de que esta banda presentó una movilidad relativa muy cercana a

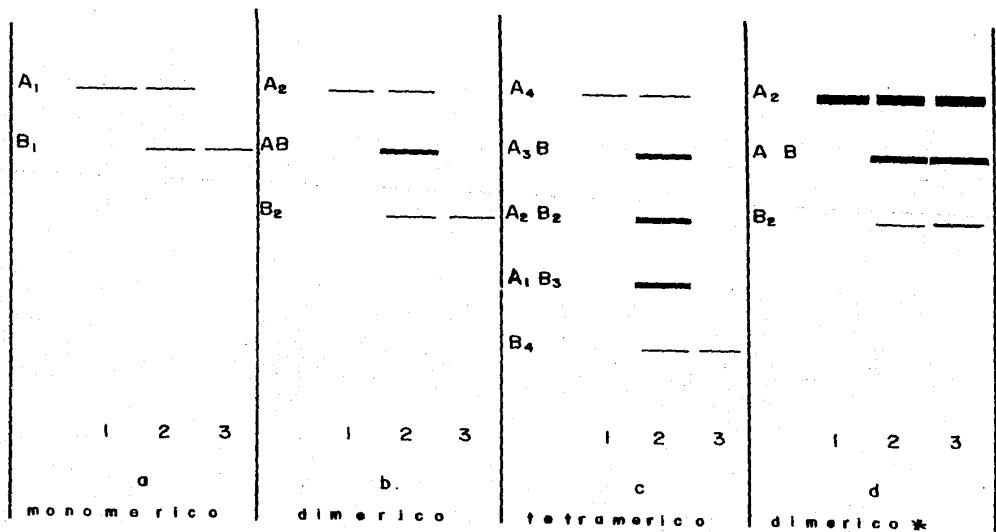


Figura 4

Patrones de variación alélica observada reflejando expresión codominante de dos alelos, las combinaciones de las subunidades son dadas con las letras mayúsculas. 1.Homozigoto rápido, 2.Heterozigoto, 3.Homozigoto lento. (Tomado de Utter, 1974)

la  $EST_3^C$ , no pudo ser considerada como un alelo de dicha banda - debido a que su frecuencia corresponde a la de una sola banda - ya que se presentó en la totalidad de los organismos muestreados.

De esta manera, dos de las estererasas obtenidas se manifiestan como genes polimórficos cada uno contando de dos alelos; estos a su vez teniendo diferentes frecuencias en cada población de Tilapia estudiada (tabla III).

En Tilapia hornorum las frecuencias observadas y esperadas en los genotipos de la  $EST_1^{aa}$  no mostraron diferencia alguna lo que nos indica que dicho gen corresponde al de una población -- equilibrada tipo Hardy-Weinberg, en donde el gen de este locus ha estado presente por lo menos en la primera generación. Con respecto a la  $EST_3^{cc}$  las diferencias entre las frecuencias (observada y esperada), no fueron significativas de acuerdo a los resultados de la prueba estadística  $\chi^2$ .

En lo referente a la T. mossambica notamos que las frecuencias observada y esperada en la  $EST_1^{aa}$  presentan algunas diferencias posiblemente debidas al azar ( $\chi^2=3.15$ ), por lo que podría existir la condición de equilibrio mencionada. En contraste con lo anterior, las frecuencias correspondientes a la  $EST_3^{cc}$  no presentaron diferencias aunque mostraron una proporción genotípica un poco desbalanceada (17:4:0) que puede deberse a una diferencia fisiológica fina, que confiere mayor adaptabilidad a los portadores del gen  $EST_3^C$ .

Por otro lado, las diferencias existentes en las frecuencias entre T. hornorum y T. mossambica, particularmente con respecto a la  $EST_3^{cc'}$ , podrían ser consideradas como errores técnicos o resultado de una muestra pequeña, o bien no ser considerados como errores. Esto puede representar una ventaja selectiva para T. hornorum o tal vez debido a la gran discrepancia de las frecuencias genotípicas en las poblaciones, existe la posibilidad de que la  $EST_3^{cc'}$  haya tenido su origen en T. hornorum y de esta manera exista una invasión genética de este gen hacia T. mossambica puesto que en esta población las frecuencias de dicho fueron bajas en contraste con las obtenidas para T. hornorum.

Por otra parte no podemos descartar la posibilidad de que la alta frecuencia del genotipo heterocigo de la  $EST_3^{cc'}$  en T. hornorum sea un reflejo del grado de heterocigocidad de esta población en contraste con lo observado en T. mossambica.

En lo que se refiere al híbrido observamos que las frecuencias para la  $EST_1^{aa'}$  correspondieron a un 100% contrariamente a las obtenidas para la  $EST_3^{cc'}$  en donde existe cierta discrepancia (frec.obs.; 4:3:0 y frec.esp.; 6:1:0) con una  $\chi^2=2.33$ , posiblemente influida por la posible invasión genética arriba mencionada.

Las diferencias intraespecíficas encontradas en las poblaciones de Tilapia, especialmente en la  $EST_1^{aa'}$  podrían ser una herramienta de gran importancia para la identificación de las líneas reproductivas al proporcionarnos un marcador genético capaz de

resolver la problemática existente en las piscifactorías de Morelos. Para fines de corroborar lo anteriormente mencionado sería recomendable realizar cruzas de laboratorio intra e interespecíficas y observar las frecuencias obtenidas de las esterasas ya que este trabajo es de tipo prospectivo.

Por otra parte, en lo que respecta a la  $EST_1^{aa}$ , es importante mencionar que tanto en *T. hornorum* y *T. mossambica* y el híbrido, las bandas integrantes de este locus algunas veces no presentaron una muy buena resolución (en el caso de los organismos que tuvieron los dos alelos) presentándose, especialmente en el híbrido, las bandas de dicho locus traslapadas, esto podría ser a causa del sistema de buffers utilizado u otra serie de factores electroforéticos como el tamaño del poro en el gel, en el tiempo de corrimiento, etc..

Es importante hacer notar que la banda correspondiente a la  $EST_2^b$  además de presentar una frecuencia del 100% muestra una alta intensidad en relación a las demás bandas. Lo que refleja la importancia de esta protefina ya que durante el tiempo de incubación de los geles fue la que presentó una actividad muy marcada. Esto nos hace pensar que esta protefina es una de las más indispensables, del sistema estudiado, y que ha sido conservada a lo largo de la línea evolutiva de estos organismos.

Otro criterio en que se basó el análisis de datos es el que se refiere a la intensidad de las bandas que integran los patrones isoenzimáticos, y a través de los cuales se encontró varia-



ción en las intensidades de sus bandas con respecto a las observadas en T. hornorum y el híbrido (Fig. 3a).

Aunque en este tipo de parámetros puede influir de una manera determinante la concentración de las muestras, además de otro número de factores, es importante tomar en cuenta este criterio puesto que de acuerdo con Shaw (1965), la variación genética de una enzima no sólo se debe a la alteración estructural en la molécula de la enzima, sino también puede ser alterada al mismo tiempo la actividad catalítica, como es el caso de la fosfatasa ácida y la anhidrasa carbónica (Hopkinson, - - 1964, Shaw, 1962) en eritrocitos humanos. También otros mecanismos pueden afectar la actividad enzimática, tal vez el más usual sea el control en la cantidad de la producción de enzimas sin cambiar su actividad catalítica.

En relación a los estudios realizados en las esterasas, T. mossambica principalmente, y en T. hornorum, observamos que -- existen ciertas discrepancias en los resultados obtenidos en -- el presente trabajo como es el caso de los datos reportados -- por Chen y Tsuyuki (1970), en donde fue encontrada sólo una esterasa con estructura monomérica de dos alelos, en donde T. mossambica presenta la banda con mayor migración electroforética que la banda presente en T. hornorum, mientras que el híbrido -- presenta éstas dos bandas. (Fig. 1)

Herzberg (1978) obtuvo para T. mossambica tres esterasas -- que corresponden a tres loci, mientras que McAndrew (1983a), -- reporta dos esterasas para la misma especie en donde una resultó polifórmica. Estos resultados son los que más se acercan a --

los obtenidos en el presente trabajo.

En otros aspectos, resulta de gran interés mencionar los resultados obtenidos con respecto a algunos corrimientos electroforéticos realizados con suero sanguíneo en busca de la proteína sexual masculina, que ha sido reportada por Avtalion (1975 y 1976), en algunas especies de Tilapia en donde sólo los machos son poseedores de dicha banda. Los corrimientos realizados no mostraron la existencia de alguna banda de origen sexual en -- la poblaciones de T. hornorum y T. mossambica. Estas bandas -- son encontradas en la región rápida del gel (prealbúmina) por -- lo que su resolución es muy difícil la cual depende fundamen-- talmente del tamaño adecuado del poro en el gel.

Son necesarios un número mayor de trabajos con respecto a -- la variación alélica de las isoenzimas en las diversas especies de Tilapia que son utilizadas en la acuicultura para la produc-- ción de progenie híbrida con un 100% de machos, con el fin de -- seleccionar cuales especies deben de ser utilizadas con dicho -- propósito así como la pureza de tales especies.

Sería de gran utilidad realizar estudios tratando de am---- pliar el tamaño de la muestra con el fin de observar con mayor -- precisión las frecuencias de cada una de las bandas, especial-- mente en el locus  $EST_1^{aa}$  para verificación de la utilidad de di -- cho locus como marcador genético. Asimismo es recomendable rea-- lizar cruza inter e intraespecíficas así como retrocruzamien-- tos para observar las frecuencias genotípicas y la dominancia --

alélica en las generaciones  $F_1$  y  $F_2$ . Además de hacer estudios - electroforéticos complementarios en este sistema isoenzimático\_ como la utilización de inhibidores de esterasas.

Debe pensarse en tomar alguna decisión con respecto al manejo de las poblaciones de Tilapia, McAndrew (1983a), propone las siguientes:

- a). Si las especies son puras, deben hacerse esfuerzos por mantener su pureza y así poder realizar cruzas para producir - 100% machos.
- b). Si las poblaciones están hibridizadas se puede tomar la alternativa de comenzar con nuevas especies puras tomando como referencia los estudios que se han realizado sobre las - poblaciones híbridas.

## CONCLUSIONES:

El análisis de los resultados obtenidos de los estudios realizados en este trabajo con el fin de encontrar un marcador genético que nos sirva de apoyo para la resolución de la problemática existente en la identificación de las Tilapia utilizadas en la acuicultura, podemos asumir lo siguiente:

- La técnica electroforética utilizada en este estudio fue adecuada. La utilización del gel de poliacrilamida, aún cuando la mayor parte de los trabajos con isoenzimas se hayan realizado en geles de almidón, permitió una mayor resolución de las enzimas estudiadas.
- Los patrones isoenzimáticos encontrados en las tres poblaciones de Tilapia estudiadas, mostraron claras diferencias inter e intraespecíficas. Las diferencias en la  $EST_1^{aa}$  podría servir como marcador genético en la identificación de las poblaciones híbridas.
- Los resultados nos muestran que probablemente existe cierto grado de heterocigocidad o hibridación en la población de T. hornorum usada como línea reproductiva en las piscifactorías del Estado de Morelos.
- Los patrones electroforéticos obtenidos en el presente trabajo difieren en cierto grado con los resultados obtenidos por otros autores que han estudiado este sistema, lo cual puede ser debido a la utilización de técnicas electroforéticas distintas o bien a que es posible que las poblaciones estudiadas sean distintas.

## REFERENCIAS:

- Allendofr, F.W. and Utter, M.F. 1973. Gene duplication within the Family Salmonidae: Disomic inheritance of two loci reported to be tetrasomic in Rainbow trout. *Genetics*. 74: 647-654.
- Arredondo, Figueroa. J. L., Situación taxonómica actual de las especies de la tribu Tilapiini (pisces, Cichlidae), introducidas en México. *Anales del Instituto de Biología UNAM*. ( En prensa).
- Avtalion, R.R. Pruginin Y. y Kotnbard, S. 1975. Determination of allogeneic and xenogeneic markers in the genus of Tilapia I. Identification of sex and hybrids in tilapia by electrophoretic analysis of serum proteins. - *Bamigeh*. 27: 8-13.
- Avtalion, R.R. Duczyminer, M. Wojdani, A. y Pruginin, Y. 1976. Determination of allogenic and xenogeneic markers in the genus of Tilapia. II. Identification of T. aurea, T. vulcani y T. nilotica by electrophoretic analysis of their serum proteins Aquaculture 7: 255-265
- Avtalion, R.R. 1982. Genetic markers in Sarotherodon and their use for sex and species identification. Pullin, R.S. V. y Lowe-McConnell (eds) *The biology and culture* -

of Tilapias ICLARM Conference International Center For Living Aquatic Resources, Manila Philippines.

- Ayala, J.F. y Kiger, A.J. 1984. Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano, S.A.: 600-637.
- Bailey, S.G. and Allan, C.W. 1970. Multiple Form of Supernatant Malate Dehydrogenase in Salmonid Fishes. J. Biol. Chem. 245: 5927-5940-
- Camacho, A. Rivalentia, V. Villaescusa, A. y Caballero, R. 1984. Las isoenzimas en el estudio de Tilapia y géneros afines existentes en Cuba. I. Características electroforéticas de seis sistemas proteínicos. Ciencias Biológicas, 12: 11-22.
- Chen, F. Y. y Tsuyuki, H. 1970. Zone electrophoretic studies on proteins of Tilapia mossambica and T. hornorum and their F. hybrids, T. zilli and T. melano pleura. Fish. Res. Bd. Can. 27: 2167-2177.
- Chimits, P. 1955. Tilapia and its culture. A preliminary bibliography. Fisheries Bulletin, FAO, Rome Italy, 8(1):1-33
- Chua, F.E. Crossman, E.J. y Gilmour, C.A. 1978. Lactate dehydrogenase (LDH) isozymes in muscle of freshwater fish - by isoelectric Focusing in Thin-layer polyacrylamide gel. Science tools. 25: 1, 9-11.
- Fehrström, H. Moberg, U. 1977. SDS and Conventional polyacrylamide

- wide gel electrophoresis with LKB 2117 multiphor. -  
LKB-Produkter; Note 306: 1-15.
- Herzberg, A. 1978. Electrophoretic esterase patterns of the -  
surface mucus for the identification of Tilapia spe--  
cies. Aquaculture, 13: 81-83.
- Rot, J. O. Schoeman, S. M. Grage, L. and Osterhoff, D.R. -  
1982. Biochemical polymorphisms in South African Fres  
hwater Fish. Isoenzyme patterns in fish of the famli  
es Cyprinidae and Salmonidae:  
Animal Blood Grups. and Biochemical Genetics. 13:1-9.
- Koehn, R.K. 1969. Esterase Heterogeneity: Dynamics of a Poly  
morphism. Science. 163: 943-944.
- Koehn, R.K. Pérez E. J. and Merritt B.R. 1971. Esterase enzy  
me function and genetical esturcture of populations -  
of the freshwater fish, Notropis stramineus. Am. Nat.  
105: 51-69.
- Latner, A.L. and Skillen, A.W. 1968. Isoenzymes in biology -  
and medicine. Academic Press, London. 289 pp.
- Lenhinger, A.L. 1981. Bioquímica. Omega. Barcelona, España 2a.  
Ed.: 1117 pp.
- Mc Andrew, B.J. and Majumdar, K.C. 1983a. Tilapia stock identi-  
fication using electrophoretic markers. Aquaculture -  
30: 249-261

- Mc Andrew, B.J. and Majumdar, K. C. 1983 b. Sex ratios from interspecific crosses within the Tilapias. ( in press).
- Mc Andrew, B.J. and Majumdar, K. C. 1983 c. Evolutionary relationships within three Tilapine genera ( Pisces: Cichlidae). ( In press).
- Moav, R. Brody, T. Wohlfarth, G. and Hulata, G. 1976. Applications of electrophoretic genetic markers to Fish breeding. 1. Advantages and methods. *Aquaculture*, a: 217-228.
- Nuño, M. 1978. Electro e inmunoelectro foreshis. *Internacional Científica*, S. A. México. 535 pp.
- Pérez, Salmerón, L. A. 1982. *Piscicultura: Ecología, explotación e higiene. El Manual Moderno*. S.A.México. 154 pp.
- Sevilla, H. M. 1981. *Introducción a la acuicultura*. CECSA. 111 pp.
- Shaw, C.R. 1965. Electrophoretic Variation in Enzymes. *Science*. 49: 936-943.
- Shaw, C.R. and Prasad, R. 1970. Starch Gel Electrophoresis of Enzymes-A Compilation of Recipes. *Biochemical Genetics*. 4: 297-320.



- Smith, P. J. 1979. Esterase gene frequencies and temperature relationships in the New Zealand Snapper Chryso-  
phrys auratus. Marine Biology. 53: 305-310.
- Tsuyuki, H, and Wold, F. 1964. Enolase: Multiple molecular forms in fish muscle. Science. 146: 535-537.
- Utter, M. F. Harold, O. and Allendorf W.F. 1974. Biochemical Genetic Studies of Fishes: Potentialities and Limitations. In: Biochemical and Biophysical perspectives - in Marine Biology. Ac. Press. N.Y. 1: 213-231.
- Vera, M. G. 1985. Caracterización electroforética de los peces Sarotherodon mossambicus y S. hornorum ( Pisces - Cichlidae). Tesis Posgrado. Facultad de Ciencias. UNAM. 56pp.
- Wilkinson, J. H. 1970. Isoenzymes. Science Paperbacks. by --  
Chapman and Hall. 2a. Ed. 369 pp.