

00361

H
leg.

26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización electroforética de los peces *Sarotherodon mossambicus* y *S. hornorum* (Pisces Cichlidae).

EJEMPLAR UNICO

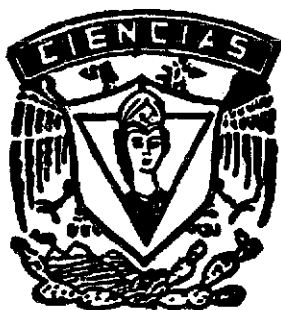
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

MA. GUADALUPE VERA MUÑOZ

MEXICO, D. F.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Dedico esta tesis:

A la memoria de mi padre quien
fomentó siempre el espíritu de
superación.

A mi madre por su amor y apoyo
constante.

A mi tía Lucita
con especial cariño.

A mis hermanos y cuñados con
cariño y agradecimiento por
la confianza que siempre me
brindaron.

A la Dra. Luz Ma. López de la
Rosa, por su amistad y apoyo
inquebrantable.

Agradezco

A la Dirección y Personal del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, en especial a los integrantes del Grupo de Genética de Peces del Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos, las facilidades y ayuda recibidas para la realización de este estudio.

A la Delegación Federal de la Pesca del Estado de Morelos, por proporcionar el material biológico objeto de este estudio.

A la Biol. Isabel Cadena Uchida, funcionaria de la Delegación Federal de la Pesca del Estado de Morelos, su interés en el establecimiento de esta línea de colaboración, y su continuo apoyo.

El financiamiento de este trabajo provino

a) del presupuesto otorgado por la U.N.A.M. para el proyecto 105 del I.C.M.y L. del Dr. Manuel Uribe Alcocer

b) del presupuesto otorgado por el CONACYT al proyecto PCCBBNA-021431 "Estudios genéticos en peces de importancia alimentaria y económica. A) Género Tilapia."

Mi más sincero reconocimiento

Al Dr. Manuel Uribe Alcocer, por su dirección y valiosas aportaciones durante la realización de esta tesis, por la lectura crítica del manuscrito y sugerencias, así como por su amistad y estímulo inagotable.

Al Dr. Barbarín Arreguín Lozano y al Quím. Julio Arreguín Espinosa por su valiosa ayuda y sus sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del Jurado dictaminador: Dr. Rodolfo Félix Estrada, Dra. Luz Ma. López de la Rosa, M. en IBB. Ma. Alicia González Manjarrez, M. en C. Concepción Sánchez Gómez, M. en C. Gabino García Lugo y M. en C. Luz del Carmen Calderón Aragón, por la lectura crítica del manuscrito y sus acertadas orientaciones.

Al Biol. Enrique Ayala Duval por su apoyo constante en la realización del trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos.

A todas aquellas personas que en una u otra forma participaron en la realización del presente estudio.

C O N T E N I D O

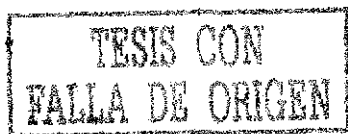
	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCION	i
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y METODOS	
A) Colecta de organismos	21
B) Transportación y mantenimiento	21
C) Reactivos utilizados	22
D) Soluciones amortiguadoras utilizadas	22
E) Métodos aplicados	
a) Preparación de las muestras	22
b) Preparación de los geles	24
c) Preparación de las soluciones amortiguadoras	25
d) Técnicas electroforéticas aplicadas	25
F) Aparatos	27
RESULTADOS	28
DISCUSIONES	43
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	51

RESUMEN

Las tilapias son peces de considerable importancia desde el punto de vista alimentario. Por ello en México existen piscifactorías, como las del Edo. de Morelos, dedicadas a su cultivo

A fin de contribuir a una caracterización más objetiva y al mejor manejo de estos recursos acuáticos, se estudiaron mediante técnicas electroforéticas en gel poliacrilamida, cinco sistemas de proteínas (suero sanguíneo total, transferrinas y hemoglobinas, suero de músculo y parvalbúminas) en los peces provenientes de las piscifactorías El Rodeo y Zacatepec del Edo. de Morelos. Los ejemplares estudiados son del género Sarotherodon mossambicus, S. hornorum así como el híbrido F_1 S. mossambicus x S. hornorum para tratar de localizar marcadores genéticos que permitan su mejor identificación, y el mantenimiento de cepas productoras de híbridos monosexuales.

Se encontraron patrones electroforéticos específicos de cada especie en los sistemas de proteínas hemoglobinas y parvalbúminas. El patrón electroforético del híbrido presentó - bandas intermediarias originadas en la interacción genotípica de los dos progenitores.



INTRODUCCION

Las especies Sarotherodón mossambicus y S. hornorum fueron introducidas a México en la década de los sesentas anticipando su gran potencial en la producción alimentaria mediante la acuicultura. Difieren notablemente en hábitos alimenticios, presentando ambas especies cualidades muy positivas para su cultivo extensivo en los grandes embalses cálidos del país, y su valor se ve realzado porque no depredan a especies nativas y por tener excelente carne blanca para el consumo alimentario, poca espina y buen sabor (Rosas, 1976).

Las especies introducidas del género Tilapia y Sarotherodon presentan muy poca diferenciación morfológica, salvo en algunas líneas de S. mossambicus (con ligeras manchas anaranjadas) y en S. hornorum (cuerpo de color negro) se pueden diferenciar por su pigmentación. Es por esto que los caracteres merísticos (caracteres medibles como el número de escamas en la línea lateral, número de radios y espinas de las aletas y

número de vértebras) y morfológicos usados para su identificación tienen un valor limitado. Además, el valor del diagnóstico basado en tales caracteres puede disminuir por el efecto de diversos factores ambientales sobre el fenotipo.

Existen, sin embargo algunas especializaciones técnico-científicas que permiten estudiar aspectos más finos, por Ejm. la bioquímica sistemática, que permite estudiar la variación bioquímica presente en las diferentes poblaciones con mayor confiabilidad. El método más ampliamente usado es el de electroforesis, que se basa en el movimiento relativo de partículas cargadas, bajo la influencia de un campo eléctrico.

Las proteínas son las unidades morfológicas principales y los instrumentos mediante los cuales se expresa la información genética, son además portadoras de una carga eléctrica determinada por su estructura primaria, o sea su composición de aminoácidos, y por el pH del medio. Es por ello que su estudio electroforético, permite la identificación de uno o de varios marcadores genéticos de una especie dada, originados en mutaciones puntuales surgidas fortuitamente a lo largo de sus líneas filéticas en los ácidos nucleicos y mantenidas ya sea por selección natural, o por deriva génica.

La determinación de los marcadores genéticos proteínicos puede lograrse con métodos electroforéticos que detecten dife

rencias estructurales por medio de diferencias en su peso molecular y carga neta. Para su estudio se pueden utilizar soluciones de protefñas, tales como sangre, plasma, leche etc., o bien se pueden extraer las protefñas de los tejidos, por me¹ dio de homogeneizados con soluciones amortiguadoras.

ANTECEDENTES

FAMILIA CICHLIDAE

Los cíclidos constituyen una de las familias más grandes de peces de agua dulce, con más de 600 especies, representadas abundantemente en las aguas tropicales y subtropicales de América, aunque son también numerosas en África.

En México la familia está representada por dos géneros na tivos y dos int roducidos, los géneros na tivos son Cichlasoma y Petenia, los géneros int roducidos son Tilapia y Sarotherodon. El género Cichlasoma tiene muchas especies en el país, que son explotadas en la región Neotropical, aunque se conoce poco de su biología. Estos peces son los comunmente denominados: chopá, tengucaya, zacatera, paleta y guapota según la localidad (R s a s, 1976).

Los cíclidos se caracterizan por tener cuerpo comprimido lateralmente, muy alto, y por poseer espinas en las aletas -

dorsal y anal, siendo estas últimas muy fuertes. Tienen orificios nasales simples, uno de cada lado. Su línea lateral interrupta al final de la aleta dorsal, continuándose nuevamente en la misma región pero a partir de dos a tres líneas de escamas más abajo, para continuar hasta la base de la aleta caudal (Rosas, 1976).

Generalmente como sucede en otros, los cíclicos padres cuidan de los huevos y de los alevines, y mientras los jóvenes están siendo "enseñados", los padres mantienen a la progenie en la "escuela". Esta pauta conductual tiene amplias repercusiones en el reclutamiento de las crías al stock de individuos adultos.

Los cíclicos africanos incluyen muchas especies del género Tilapia, son considerados como los peces que podrían proveer de proteína al mundo, debido a que se reproducen profusamente en estanques, son resistentes a las enfermedades, toleran conglomeraciones y además, su dieta es variada adaptándose fácilmente al alimento artificial.

Las tilapias han sido recientemente subdivididas en dos géneros: Tilapia y Sarotherodon, por Trewavas (1973, citado por Balarin, 1979) basándose en dos tipos distintivos de incubación y de alimentación, a saber:

Género Tilapia Incubación en el substrato donde se lleva al cabo el desarrollo de los huevecillos y de la crfa. Los individuos de este grupo son generalmente herbívoros, y presentan de 7 a 16 filamentos en la parte baja del primer arco branquial.

Género Sarotherodon Incuban bucalmente los huevos y la crfa, tienden a ser planctófagos, y tienen un fino juego de 10 a 20 filamentos en la parte baja del primer arco branquial.

USOS Y CUALIDADES DE LA TILAPIA

Las tilapias son valiosas en varios aspectos: a) por sus cualidades nutricionales b) por su aceptabilidad en el mercado y c) por su valor económico.

Balarin, (1979) recapitulando a varios autores que han estudiado al género Tilapia, afirma que aunque su cantidad de proteínas es inferior a la que contienen la carpa y la trucha es preferida la tilapia por su agradable sabor.

Generalmente las tilapias habitan aguas tropicales y subtropicales con temperatura media de 20°C, sin embargo se han encontrado en temperaturas extremas de 8°C y 40°C. La tilapia puede sobrevivir en condiciones extremadamente adversas y son frecuentemente encontradas en habitats donde otras especies no se pueden desarrollar, lo que incrementa su potencial para

la acuicultura. La baja demanda de oxígeno de este grupo es uno de los factores que lo capacita para ocupar tales medios-ambientes extremos, y favorece a su cultivo en estanques donde crecen más rápidamente que en su medio natural, en un período de 3 a 4 meses.

Las especies de tilapia son endémicas en Africa, encontrándose actualmente en numerosas áreas tropicales y subtropicales del mundo, debido a su naturaleza macro y microherbívora, por su eficiencia en reciclar la energía de los detritus al convertir los desechos orgánicos en carne de pescado y por su potencial de cría en estanques. Esto los ha convertido en uno de los grupos más utilizados en la acuicultura.

Según Rosas, (1976) fueron introducidas en México, procedentes de Auburn Alabama E.U.A., tres especies (T. nilotica, T. mossambica y T. melanopleura) y llevadas a la actual Estación de Acuicultura tropical de Temascal, en el estado de Oaxaca, distribuyéndolas posteriormente en algunos lagos y presas situadas en diversas regiones del país. Originando después de algunos años el establecimiento de pesquerías importantes.

Según Arredondo, (1984) al establecerse las pesquerías se hace evidente la necesidad de un manejo adecuado de las poblaciones de tilapias, presentándose entonces dificultades para la identificación de las distintas especies, ya que las características señaladas por algunos autores, no correspon-

dían con los rasgos morfológicos observados. El mismo Arredondo indica que se recurrió a los especialistas del grupo, y que en 1975 la Dra. Trewavas a través de una comunicación epistolar, indicó que las especies presentes en México y dado su origen de las mismas, correspondían a Tilapia rendalli (Boulenger, 1896) = Tilapia melanopleura y Sarotherodon mossambicus (Peters, 1852) = Tilapia mossambica.

Siendo los caracteres morfológicos y merísticos muy similares en el grupo de las tilapias Hickling, (1960, citado por Tsuyuki, 1970) menciona que Tilapia hornorum se introdujo en Málaga en 1958 desde Zanzibar como un miembro no identificado considerado como del grupo mossambica por su similitud biológica con dicho grupo. La especie fué más tarde nominada por Trewavas, (1966, citado por Tsuyuki, 1970) como T. hornorum, y posteriormente por la misma Trewavas en 1973, como S. hornorum, y aunque los conteos merísticos de los individuos pertenecientes a dichas poblaciones se traslapan, la moda de estos caracteres difieren entre ambos grupos. Por ejemplo, en S. hornorum la aleta caudal y los arcos branquiales presentan un número elevado de espinas, mientras que la aleta anal presenta un número reducido de rayos suaves, tiene un cuerpo delgado y el pedúnculo caudal es estrecho y aplanado. El macho es belicoso durante el período reproductivo. Los individuos del grupo T. mossambica tiene ojos amarillentos y los labios rosados, mientras que los de S. hornorum presentan ojos rojos y labios azulados. Ambos machos tienen una coloración "nupcial" común, presentando

en los márgenes de la aleta dorsal y caudal un color rosado de diferente intensidad.

La reproducción excesiva de las tilapias en estanques de cultivo, trae como resultado un gran número de peces pequeños no comerciales, por lo que la atención se ha enfocado recientemente en los cultivos de híbridos 100% machos (cultivos monosexuales), ya que presentan las características intermedias de los padres y más aún, estas son mejoradas.

A principios de 1981, fueron introducidas en México procedentes de Florida dos especies de tilapias para la producción intensiva de híbridos 100% machos Sarotherodon mossambicus (de una línea genética albina) y Sarotherodon hornorum. Siendo depositadas en la piscifactoría El Rodeo en el estado de Morelos (Arredondo, 1984).

Pruginin, y colaboradores (1975) sostienen que el cultivo monosexual está limitado por la dificultad de mantener stocks puros, esto es debido a la infiltración de peces en los estanques de incubación y también a la dificultad para distinguir entre padres e híbridos, cuando se seleccionan los stocks de cría, por lo que recomiendan el uso de marcadores genéticos para marcar a la especie pura.

Por ello Avtalion et al (1976) discuten que la posibilidad para producir híbridos 100% machos, se deberá a la pureza de las especies usadas.

El sistema de determinación sexual en las tilapias está compuesto por una interacción entre factores autosómicos y elementos cromosómicos. Los elementos cromosómicos son : el cromosoma sexual Y con influencia masculinizante, mayor que el de cualquier genosoma feminizante, y los cromosomas sexuales X Y W con influencia feminizante, el X mayor que el W. Los elementos autosómicos son A y el a., el primero masculinizante y el segundo feminizante, ambos con igual fuerza. Una especie es portadora de un solo tipo de factores autosómicos, de un tipo de cromosoma sexual feminizante, y de un cromosoma masculinizante. Así, Sarotherodon mossambicus y S. niloticus tienen una fórmula sexual AAXX ♀ y AAXY ♂, mientras que S. aureus y S. hornorum tienen una fórmula aaWY ♀ y aaYY ♂ de tal manera que cuando se llevan a cabo procesos reproductivos intraespecíficos no hay alteraciones significativas en las proporciones sexuales 1:1.

Sin embargo cuando se producen cruza interespecíficas se dan alteraciones notorias, que fueron estudiadas y documentadas por Chen, (1969), manifestando-

se en proporciones sexuales alteradas que cubren un rango desde 5:3 hasta 0:1. Estas proporciones especiales resultan de la interacción genotípica de los elementos autosómicos y genosómicos. Por ejemplo, - de una cruce S. mossambicus ♀ x S. hornorum ♂ cuyos genotipos son AAXX ♀ x aaYY ♂, toda la progenie tendrá el genotipo AaXY que debido a la suma de sus interacciones produce un fenotipo masculino. (Avtalion y Hammerman, 1978, Hammerman y Avtalion, 1979).

Sin embargo para obtener en un 100% el fenotipo masculino se requiere que las especies progenitoras sean puras, y siendo los caracteres merísticos y morfológicos de valor limitado para su identificación, - se realizaron estudios citogenéticos en las tilapias, los cuales tampoco han permitido distinguir las diferentes poblaciones. La mayor parte de las determinaciones cariotípicas han mostrado un cariotipo uniforme en las poblaciones analizadas formado por 44 elementos (Krishnaja y rege, 1980; Badr y El-Dib, 1977; Jalabert et al., 1971; Kornfield, 1979; Michele, et al., 1977). En los casos en los que la determinación cariotípica ha sido diferente, como la de $2n=40$ en S. niloticus (Badr y El-Dib, 1977), ha habido otros reportes en los que se ha informado de números diploides de 44 cromosomas en otras poblaciones de la mis-

ma especie (Jalabert, et al., 1971). La uniformidad cariotípica se ha visto confirmada por estudios citogenéticos realizados en híbridos en los que los cariotipos son iguales a los de las poblaciones progenitoras (Castorena, et al., 1983).

Es por esto que varios autores han recurrido a la técnica de electroforesis para su identificación más segura (Avtalion, 1976; Chen y Tsuyuki, 1970; Kornfield, 1979; y McAndrew, 1983).

ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas biológicas importantes como son las proteínas, las que poseen componentes cargados eléctricamente, cationes (+) y aniones (-) que se moverán en una cuba de electrolisis hacia el cátodo o hacia el ánodo. Las moléculas con cargas similares tendrán diferentes relaciones de carga/masa debido a las diferencias inherentes a su peso molecular. En resumen estas diferencias forman la base de la migración diferencial al someterlas a la acción de un campo eléctrico.

La electroforesis se puede llevar a cabo en me

dios de soporte semisólido para detectar la posición relativa de las proteínas después de su separación - como bandas discretas o zonas. Hay varios medios de soporte entre ellos, el acetato de celulosa, el agar los geles de almidón, la sílice y la poliacrilamida, los que favorecen a la conducción de las proteínas, disminuyendo la difusión.

En los soportes de geles de almidón y poliacrilamida el tamaño del poro es aproximado al tamaño molecular de las proteínas (Ferguson, 1980). No obstante se ha observado que el gel de poliacrilamida presenta más ventajas dado que: a) Es un polímero sintético, b) Puede ser preparado mediante reactivos altamente puros, c) Es reproducible, d) Las condiciones de polimerización son standard, y estables dentro de un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica, e) Es transparente, f) De acuerdo a la concentración de acrilamida y bis acrilamida, se pueden elaborar geles con diferente tamaño de poro y además g) Se pueden realizar reproducciones de la misma muestra. Es por esto que el gel de acrilamida se ha seleccionado para electroforesis de zona de un gran número de proteínas, mientras que el gel de

almidón se ha usado generalmente para el análisis de isoenzimas, ya que estas no requieren de variaciones en el tamaño de los poros del gel para su separación (Hames, 1981).

El gel de poliacrilamida resulta de la polimerización catalítica del monomero acrilamida y de un agente de enlaces cruzados tal como la bis acrilamida. La catálisis es iniciada por la adición de persulfato de amonio y de tetrametilenediamina (TEMED). La electroforesis en gel poliacrilamida puede llevarse a cabo de un modo horizontal o vertical de acuerdo a las necesidades del trabajo a realizar. El único inconveniente en el manejo de la acrilamida es que en su estado puro es neurotóxico, por lo que se deben extremar las precauciones durante su manejo.

PROTEINAS

Las proteínas son macromoléculas con carácter anfotérico, que contienen una carga eléctrica dada por los aminoácidos que la constituyen y por el pH del medio, por lo que pueden moverse en un campo eléctrico.

En la electroforesis además de las proteínas - a separar y que deben estar fuera de su punto iso - eléctrico, se necesitan otros iones para que la corriente pueda fluir en forma homogénea. La mayoría de los corrimientos electroforéticos son llevados a cabo en soluciones amortiguadoras pH 8-9, rango en el cual la mayoría de las proteínas son cargadas negativamente emigrando hacia el extremo anodal del gel).

Siendo las proteínas las principales unidades morfológicas del organismo y la expresión de la información genética, varios autores las han extraído de diferentes órganos de los peces, con el fin de auxiliarse en la identificación de las especies, tratando de identificar marcadores genéticos específicos.

HEMOGLOBINAS

Son los pigmentos respiratorios de la sangre - transportan el oxígeno a todas las células del organismo, cuando la hemoglobina del pez es sujeta a electroforesis, frecuentemente se separa en bandas - que se mueven a diferente velocidad, describiéndose esto como polimorfismo (Love, 1970).

Chandrasekhar (1959) en uno de los trabajos pioneros de la electroforesis aplicada a investigaciones icticas, estudió la sangre de varias especies, entre ellas T. mossambica detectando dos tipos de hemoglobinas en el gel de agar. Posteriormente Tsuyuki (1962, 1964, 1966, 1968) quien ha trabajado en las especies de las familias Salmonidae, Catostomidae, Cichlidae y otras, empleo técnicas electroforéticas en muestras de sangre, transferrinas y músculo, y encontró que las hemoglobinas, transferrinas y el miogeno eran proteínas polimórficas, demostrando que todos los patrones electroforéticos eran específicos de las especies estudiadas. Encontró también que los híbridos presentan los caracteres fenotípicos combinados de los padres, y que sus patrones electroforéticos son asimismo, una mezcla de los patrones de los progenitores, con alguna inclinación hacia uno de ellos. Wilkins (1977) estudiando suero y sangre de bacalao (Gadus morhua), también encontró polimorfismo en las hemoglobinas. Sharp (1969) diferenció electroforéticamente hemoglobinas de cinco especies del género Thunnus. En tres especies no encontró variación interespecífica, pero sí un pronunciado polimorfismo en la zona catódica de una de ellas.

Starmach (1977) trabajó proteínas del suero de sangre en siete familias de carpa (Cyprinus carpio), observando que los patrones electroforéticos eran diferentes en cada una de ellas, identificando dentro de las especies a organismos heterocigotos y homocigotos. Sick (1961) describió también el polimorfismo en hemoglobinas, encontrado en dos especies de peces, blanquecilla (Gadus morlangus) y bacalao (Gadus morhua),

identificó tres patrones diferentes en blanquecilla, Sick explica la determinación de los tres patrones por dos genes alélicos codominantes.

TRANSFERRINAS

La sangre del pez, contiene una globulina capaz de fijar hierro y su movilidad electroforética como la de otras proteínas varía dentro de las especies (Love, 1970)

Creysse (1966) detectó mediante marcaje con isotopos radioactivos en el suero de la carpa (Cyprinus carpio), tres variantes de transferrinas, que sugieren un polimorfismo controlado genéticamente. Dicho carácter polimórfico puede ser determinado por un gene con dominancia incompleta, con tres alelos. Asimismo Russell (1979) estudiando transferrinas en la trucha (Cynoscion regalis), separadas del suero con Rivanol, observó tres fenotipos de transferrinas, que pueden ser resultantes de la acción de dos alelos codominantes presentes en un simple gene. Moller (1966) estudió transferrinas en los peces (Gadus pollachius y G. merlangus), mediante técnicas autorradiográficas, encontrando tres fenotipos y propuso que el control genético se debía a dos alelos codominantes.

Raymond (1976) separó electroforéticamente proteínas del músculo de Menidia menidia, encontrando tres fenotipos, probablemente controlados genéticamente por dos alelos codominantes.

minantes. Munilla (1979) estudió las proteínas musculares de seis especies del género Raja, determinando un patrón electroforético para cada especie.

PARVALBUMINAS

Poteñas capaces de fijar moléculas de calcio (Ca^{2+}), de bajo peso molecular, encontradas en grandes cantidades en el sarcoplasma de peces y músculo esquelético de especies superiores. Actúa en la relajación muscular.

Gerday (1979) aisló cinco parvalbúminas del músculo blanco de (Protopterus dolloi), encontrando que hay relación entre la concentración de parvalbúminas y el miogeno.

Quienes han trabajado con Tilapia han encontrado también polimorfismo en algunos grupos de proteínas. Por ejemplo, Avtarljon y colaboradores (1975) trabajaron electroforéticamente tres especies (T. aurea, T. vulcani y T. nilótica) así como el híbrido del cruzamiento T. aurea x T. vulcani, encontrando polimorfismo en transferrinas. Observaron además un marcador genético del sexo masculino en la región rápida del electroferograma. Estos autores, quienes estudiaron el suero sanguíneo, encontraron también una banda específica en T. vulcani y otra en T. aurea observándose las dos solamente en los híbridos. Asimismo en 1982 reportan trabajos con las tilapias en las que utilizando tres marcadores genéticos (transferrinas, esterasas y -

la proteína del sexo masculino) provenientes únicamente del suero sanguíneo, identificaron un mínimo de cinco bandas de transferrinas en diferentes combinaciones.

Otros investigadores han estudiado los híbridos de algunas especies como Abramoff (1968) y Cross (1978). Abramoff demostró electroforéticamente el origen del híbrido (Poecilia formosa) ya que encontró que P. latipina y P. mexicana se caracterizaban por una sola banda de albúmina, mientras que P. formosa posee dos bandas de igual intensidad. Y Cross, comparó por electroforesis hemoglobinas de híbridos interespecíficos de varios salmonidos, encontrando que las hemoglobinas parentales estuvieron presentes en los electroferogramas de la progenie F_1 .

Todos los autores antes citados coinciden en que los patrones electroforéticos observados son específicos de las especies estudiadas, quedando entonces de manifiesto que las técnicas electroforéticas son de gran ayuda en la identificación de especies muy semejantes entre sí.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue el realizar un estudio prospectivo de cinco sistemas de proteínas (Suero sanguíneo total, transferrinas y hemoglobinas, suero de músculo y parvalbúminas) provenientes de muestras representativas de tres poblaciones: a) Sarotherodon mossambicus, b) S. hornorum y d) del híbrido F_1 S. mossambicus x S. hornorum, en búsqueda de marcadores genéticos, que permitan una caracterización más confiable de cada población.

Dado que este estudio fue iniciado por invitación de funcionarios de la Delegación Federal de la Pesca del Estado de Morelos, quienes detectaron problemas en la producción de progenie híbrida, probablemente por dificultad en la identificación de las poblaciones, se puso particular atención en el diseño de este estudio a:

- 1) La búsqueda de sistemas proteínicos que permitan una identificación clara y consistente a nivel de cada individuo estudiado.
- 2) Utilizar sistemas proteínicos que permitan conservar vivo al espécimen, con el fin de poder utilizar esta metodología en el monitoreo genético de, por ejemplo, reproductores vivos.
- 3) Utilizar metodologías que involucren la menor complejidad posible en equipo y reactivos, a fin de que puedan ser implementadas donde sean requeridas, a costos moderados.

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Colecta de organismos

Los organismos sujetos a estudio pertenecen a las especies mossambicus (línea albina con manchas anaranjadas) y honorum del género Sarotherodon introducidas a México en 1981 procedentes de Florida y depositadas en la piscifactoría El Rodeo en el estado de Morelos, también se estudió el híbrido F_1 del cruceamiento S. mossambicus x S. honorum (estas cruces se llevan a cabo en la piscifactoría Zacatepec, del estado de Morelos). -- Las especies mossambicus, honorum y el híbrido fueron transportadas periódicamente de las piscifactorías antes citadas, al laboratorio de genética de organismos acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. El tamaño de los organismos osciló entre 10 a 15 cm. en ambos sexos.

B) Transportación y mantenimiento

Los organismos se transportaron en bolsas cerradas con cierta cantidad de agua y aire inyectado. En el laboratorio se

les recibía en acuarios previamente acondicionados, evitando así la tensión por los cambios bruscos. Se les alimentó con a limento pelitizado Albamex y se les mantuvo a una temperatura aproximada de 22°C durante su permanencia en los acuarios.

C) Reactivos utilizados

En la separación de las muestras se usaron como medio de soporte geles de poliacrilamida al 10%, según la técnica descrita por Fehrström y Moberg, (1977). Los reactivos utilizados fueron:

Acrilamida	(Merck-Schuchardt)
Bis acrilamida	(Sigma)
Heparina	(de la mucosa intestinal de cerdo, Sigma)
Rivanol	(Sigma)
Kenacid blue R	(BDH Chemicals)
Persulfato de amonio	('Baker Analyzed' reagent)

D) Soluciones amortiguadoras utilizadas

Se usaron las soluciones amortiguadoras sugeridas por Sullivan (1981, comunicación personal)

Tris-Glicina	pH 8.9 (cátodo)
Tris-HCl	pH 8.1 (ánodo)

E) Métodos

a) Preparación de las muestras.- Se analizaron los siguientes sistemas de proteínas: suero de músculo y parvalbúminas, sue

ro total, hemoglobinas y transferrinas. Las técnicas que se siguieron para su preparación, estuvieron adaptadas a las condiciones del laboratorio según modificaciones hechas por Sullivan*, Arreguín, Ayala y Uribe¹ (comunicación personal).

Sangre.- La sangre se extraía de la vena principal caudal de los peces vivos con una jeringa de 1ml. de capacidad con aguja 25 x 16 con aproximadamente 0.5 ml. de solución heparinizada. A continuación se procesaba siguiendo el tratamiento que sigue: Las muestras se centrifugaban a 1600 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se guardaba en el refrigerador para estudios posteriores de suero total sanguíneo y transferrinas. Al botón se le añadía NaCl al 2.5% agitándolo en un vortex hasta obtener una solución homogénea, y volvía a centrifugarse. Esta operación se realizó tres veces; después de esto al botón se le agregaba agua fría, a fin de lisisar las células, agregándole posteriormente unas gotas de solución antioxidante. Dada la facilidad de oxidación de las hemoglobinas, se procedía a hacer su corrimiento electroforético lo más pronto posible.

Para la obtención de transferrinas se procedía de la siguiente manera: Se solubilizaba 0.15 gr. de Rivanol en solución amortiguadora pH 8.9, se mezclaba con una fracción del

* Duke Marine Laboratory

¹ Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Laboratorio de genética de organismos acuáticos)

sobrenadante obtenido al centrifugar las muestras de sangre, en una proporción de 3:1 gotas.

Suero de músculo.- Una vez obtenidas las muestras de -- suero total sanguíneo, de hemoglobinas y de transferrinas se procedió a sacrificar a los organismos en estudio, obteniéndose las muestras de músculo de la siguiente manera: A un área de aproximadamente 1.5 cm. en la parte media lateral del pedúnculo se le quitaron las escamas para extraer una por -- ción de músculo blanco. Se homogeneizó con un volumen igual de amortiguador Tris- Glicina ph 8.9, y se centrifugó a 1600 rpm durante un minuto . Posteriormente, con una pipeta Paus- ter se extrajo el sobrenadante en dos fracciones, una para -- correr proteínas del suero total del músculo y otra para par- valbúminas. Los organismos se sexaron y guardaron en el re- frigerador, a -5°C (aproximadamente) para su conservación. -- Posteriormente , las muestras de suero de músculo fueron dia- lizadas durante 12 horas contra agua destilada.

Para obtener parvalbúminas las muestras se sometieron a baño maría a 60°C durante cinco minutos con el fin de desna- turalizar otras proteínas.

b) Preparación de geles.- Para elaborar los geles se si- guió la técnica de Fehrström y Moberg (1977), de la mane- ra siguiente: Alrededor de una placa de plástico formadora -- de canales, se colocó una liga de dos milímetros de grosor, -- sobre de ésta se colocó una placa de vidrio, fijando el pa- -- quete con pinzas, dejando al mismo tiempo libre la abertura-

por donde se introducirá la poliacrilamida. Los geles se prepararon a una concentración del 10% como sigue:

Solución amortiguadora Tris-Glicina pH 8.9	33.0 ml
Solución de poliacrilamida	29.7 "
Después de aplicar durante 30 segundos un vacío se pasó a:	
Persulfato de Amonio	3.2 "
TEMED	0.1 "

Se aplicó un segundo vacío de 30 segundos.

c) Preparación de amortiguadores para los electrodos.- Se prepararon amortiguadores Tris-Glicina pH 8.9 pesando 6.32 gr. de Tris y 3.94 gr. de Glicina para 1000 ml. de agua destilada y desionizada. Para el amortiguador Tris-HCl pH 8.1 se pesó 12.1 gr. de Tris, y se preparó 50 ml. de HCl 1N para 1000 de agua destilada y desionizada.

d) Técnicas electroforéticas.- Se usó la electroforesis convencional en geles de poliacrilamida según Fehrström y Moberg (1977). La temperatura que se utilizó para el corrimiento de las muestras fué de 9°C, realizándose una preelectroforesis de 30 minutos a 222 Volts, 400 mA y 280 a fin de impregnar el gel de la solución amortiguadora y limpiarlo de impurezas. Pasado ese tiempo se aplicó 8 l. de las muestras en las concavidades del gel, en una de ellas se aplicó azul de bromofenol como indicador frontal de la electroforesis, las muestras se corrieron durante 10 minutos a 222 Volts, 200 mA con el ob-

jeto de que la muestra se compacte en una zona. Pasado ese tiempo las condiciones eléctricas se cambiaron a 222 V., -- 450 mA y 280 W. Según el tipo de muestra, el tiempo de corrimiento electroforético varió entre una hora y media y dos horas.

Después de concluida la electroforesis, la placa de gel se sumergió en una solución fijadora, durante una hora, tiñéndose posteriormente con Kenacid azul R. (= Coomassie).

El exceso de colorante fué retirado por difusión de la solución desteñidora y por último la placa de gel se dejó -- una hora en solución preservadora, pasado ese tiempo se colocó sobre la placa de gel, una placa de plástico para su conservación, posteriormente se fotografió y guardó para posteriores cálculos.

Las placas se fotografiaron sobre un negatoscopio con -- una cámara Reflex y un rollo Kodak Technical Pan Film. Se -- procuró que las impresiones fotográficas fueran del mismo tamaño, para poder identificar los sitios de las bandas en las diferentes placas.

Electroenfoque.- Se estudiaron muestras de hemoglobinas y suero sanguíneo total, según técnica descrita por Winter, -- Ek, y Anderson (1977).

F) Aparatos

Los corrimientos electroforéticos y de electroenfoque se realizaron en una cuba modelo Multipor horizontal 2117 LKB -- Bromma, conectada a una fuente de poder 2103 y a un Multitemperatura también LKB.

RESULTADOS

PARVALBUMINAS

Los patrones electroforéticos de parvalbúminas en las especies mossambicus, honorum y el híbrido correspondiente se dividieron en cinco zonas a partir de la zona más rápida hacia la más lenta, de acuerdo a bandas específicas observadas.

Zona I: dividida en Ia que contenía la banda 1 y Ib que contenía la banda 2.

Zona II: que comprendió las bandas 3 y 4.

Zona III: también dividida en dos, IIIa con la banda 5 y IIIb con las bandas 6, 7 y 8.

Zona IV: comprendió las bandas 9, 10, 11 y 12, y por último

Zona V: que incluyó las bandas 13 y 14 (Esquema 1)

Como se puede observar, la banda 5 es intensa y ancha, común a todos los organismos estudiados, las bandas 8 y 12 son delgadas e intensas siendo también comunes a todos los fenotipos, pudiendo ser proteínas básicas de los organismos.

La banda 1 es delgada y menos intensa que las tres anteriores, presentándose sólo en los organismos de la especie mossambicus, la banda 2 de las mismas características que la banda 1, se presentó sólo en los organismos de la especie honorum y ambas se presentaron en los híbridos, por lo que se pueden considerar tres patrones electroforéticos específicos de las especies y del híbrido correspondiente. Obsérvese el esquema 1 y la figura 1.

Se determinó también la frecuencia de las bandas presentes en los patrones electroforéticos de cada uno de los organismos estudiados, como se muestra en la tabla 1,

SUERO DE MUSCULO

Los patrones de músculo se dividieron en cuatro zonas:

Zona I: con dos divisiones a y b, la zona Ia comprendió la banda 1 y la zona Ib la banda 2.

Zona II: se dividió también en dos a y b, la zona IIa incluyó la banda 3 y la zona IIb la banda 4 (esto se hizo ya que las bandas son diferentes).

Zona III: comprendió las bandas 5 y 6.

Zona IV: incluyó las bandas 7 y 8.

Se observaron tres bandas comunes que son la 2, 3 y 5. No se detectó una diferencia significativa en los tres patrones salvo una banda que aparece en la especie mossambicus y honorum que no se presentó en los híbridos. (Esquema 2)

En la tabla 2 se presentan las frecuencias de las bandas.

Esquema 1.- Patrones con mayor resolución de parvalbúminas en las especies mossambicus, hornorum y el híbrido, divididos en cinco zonas principales.

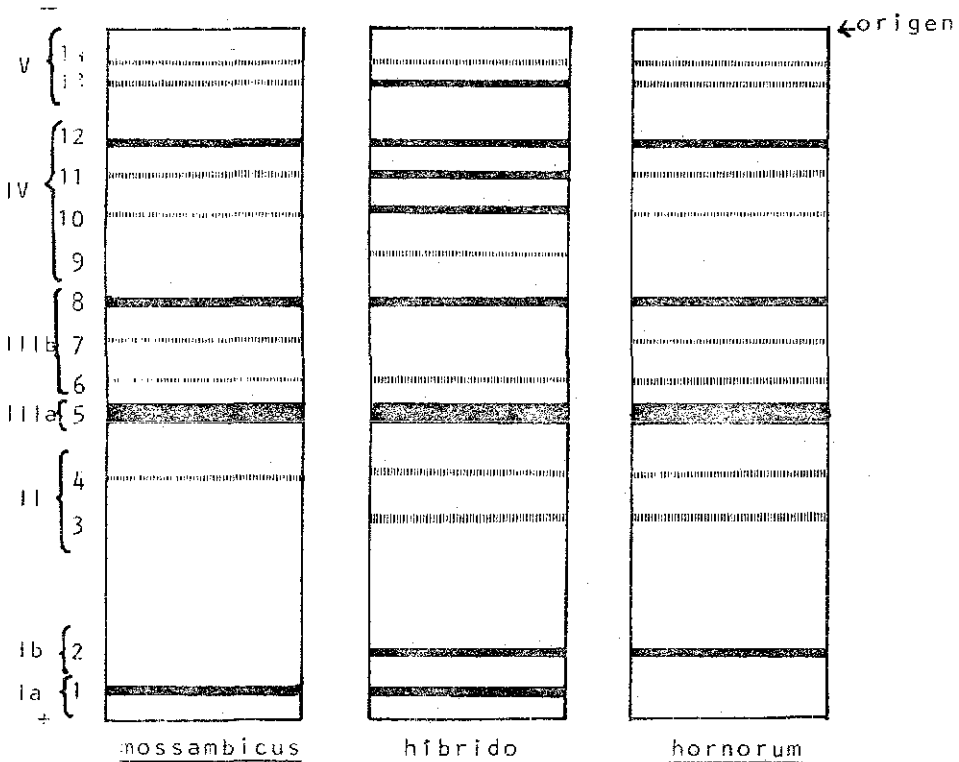


Tabla N° 1

Frecuencia de bandas del sistema de proteínas parvalbúminas:

Banda N°	Organismos		
	S. <u>moss.</u>	híbrido	S. <u>horn.</u>
14	* 66.6%	* 63.6%	* 66.6%
13	22.2 ^{''}	* 72.7 ^{''}	44.4%
12	* 88.8 ^{''}	* 81.8 ^{''}	* 88.8 ^{''}
11	*100.0 ^{''}	* 72.7 ^{''}	33.3 ^{''}
10	* 88.8 ^{''}	54.5 ^{''}	* 88.8 ^{''}
9	_____	* 90.9 ^{''}	_____
8	* 88.8 ^{''}	* 81.8 ^{''}	66.6 ^{''}
7	* 77.7 ^{''}	_____	66.6 ^{''}
6	33.3 ^{''}	* 72.7	44.4 ^{''}
5	*100.0 ^{''}	*100.0 ^{''}	*100.0 ^{''}
4	55.5 ^{''}	63.6 ^{''}	66.6 ^{''}
3	11.1 ^{''}	63.6 ^{''}	33.3 ^{''}
2	_____	* 90.9 ^{''}	*100.0 ^{''}
1	* 77.7 ^{''}	* 81.8 ^{''}	_____

* Bandas con mayor índice de frecuencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

31-A

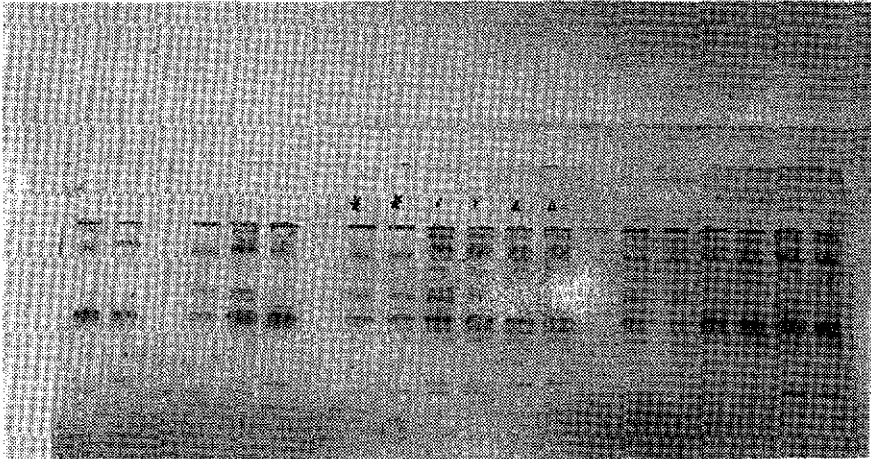


Fig. 1- Patrón electroforético del sistema de proteínas parvalbúminas en los peces S. mossambicus, híbrido y S. hornorum. 40mA, 9°C
(Duración del corrimiento, una hora y media)

Esquema 2.- Patrones con mayor resolución de suero de músculo en las especies mossambicus, hornorum y el híbrido, divididos en cuatro zonas principales.

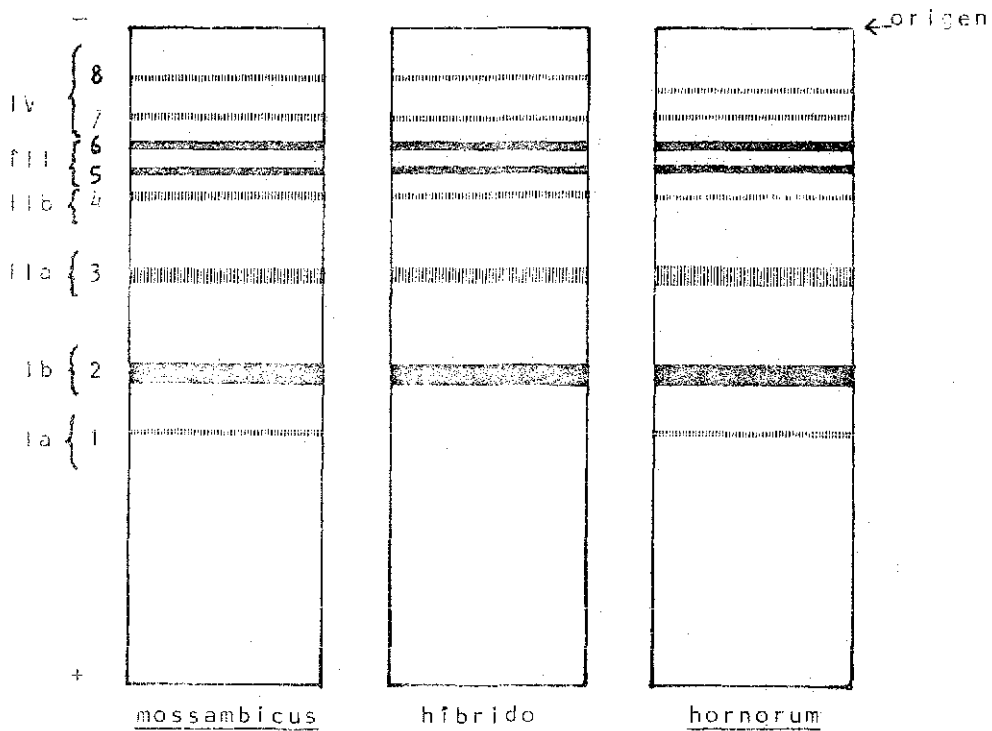


Tabla N°2

Frecuencia de bandas del sistema de protefmas de suero de músculo:

Organismos			
Banda N°	<u>S. moss.</u>	híbrido	<u>S. horn.</u>
8	* 88.8%	* 66.6%	* 66.6%
7	* 66.6''	50.0%	*100.0''
6	* 88.8''	* 75.0''	*100.0''
5	* 77.7''	*100.0''	* 88.8''
4	66.6''	16.0''	55.5''
3	* 77.7''	* 91.0''	55.5''
2	*100.0''	*100.0''	*100.0''
1	_____	_____	11.1''

* Bandas con mayor índice de frecuencia

TRANSFERRINAS

Los patrones electroforéticos de transferrinas se dividieron en cinco zonas a partir de la zona más rápida hacia la más lenta, a pesar de que no se pudieron observar todas las bandas en los organismos estudiados.

Zona I: se incluyeron en esta zona las bandas 1 y 2.

Zona II: incluyó las bandas 3 y 4.

Zona III: con las bandas 5 y 6.

Zona IV: bandas 7 y 8, por último

Zona V: con las bandas 9 y 10.

Las bandas 8, 7, 6, 5 y 4 generalmente eran intensas, las demás tenues. De los organismos muestreados de S. honorum, uno presentó exactamente el mismo patrón que S. mossambicus.

La banda 6 se presenta en mossambicus y la banda 5 en honorum y ambas en el híbrido, pudiéndose pensar que fuera un marcador genético de las especies. Obsérvese el esquema 3.

La tabla 3 muestra las frecuencias de las bandas observadas en los patrones electroforéticos de cada uno de los organismos estudiados.

SUERO SANGUINEO TOTAL

Los patrones de suero sanguíneo total se dividieron en cuatro zonas.

Zona I: comprendió las bandas 1 y 2.

Zona II: con las bandas 3 y 4.

Zona III: comprendió las bandas 5 y 6.

Zona IV: incluyó las bandas 7 y 8.

Esquema 3.- Patrones con mayor resolución de transferrinas en las especies mossambicus, hornorum y el híbrido, divididos en cinco zonas principales.

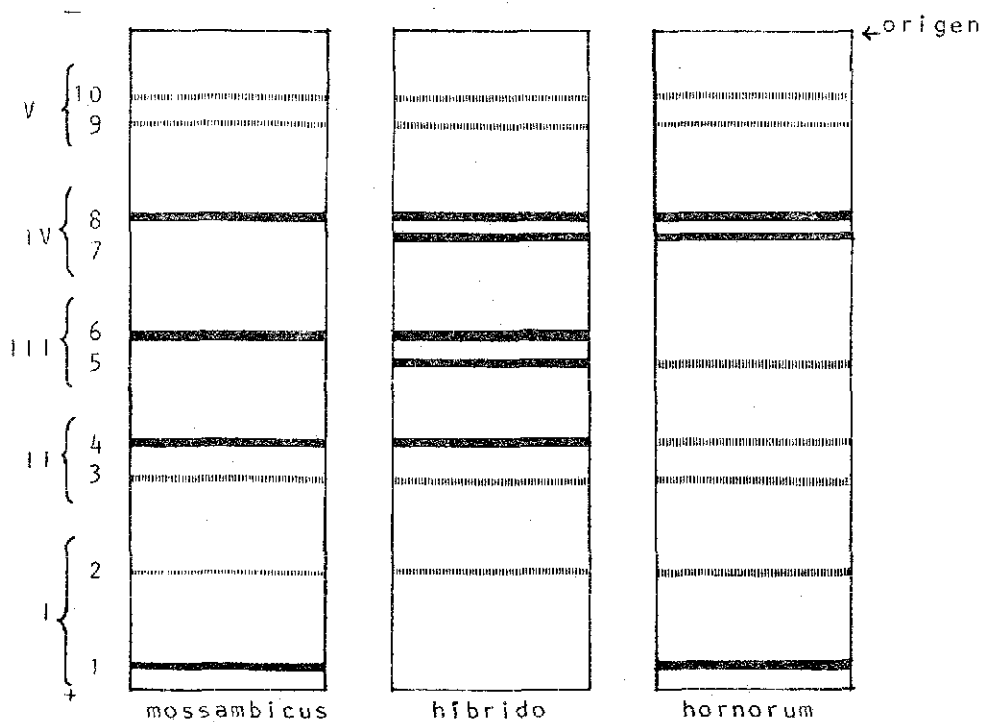


Tabla N° 3

Frecuencia de bandas del sistema de proteínas de transferrinas:

Organismos			
Banda N°	<u>S. moss.</u>	híbrido	<u>S. horn.</u>
10	25.0%	* 75.0%	* 83.3%
9	* 75.0 ¹¹	50.0 ¹¹	66.6 ¹¹
8	* 87.5 ¹¹	*100.0 ¹¹	*100.0 ¹¹
7	_____	* 83.3 ¹¹	66.0 ¹¹
6	50.0 ¹¹	*100.0 ¹¹	_____
5	_____	* 75.0 ¹¹	* 83.3 ¹¹
4	* 87.5 ¹¹	* 83.3 ¹¹	*100.0 ¹¹
3	12.5 ¹¹	* 75.0 ¹¹	*100.0 ¹¹
2	12.5	33.3 ¹¹	16.6 ¹¹
1	12.5	_____	16.6 ¹¹

* Bandas con mayor índice de frecuencia

Como se muestra en el esquema 4, los patrones fueron muy parecidos entre sí, excepto el patrón de S. hornorum que presenta la banda 6 en la región lenta, que en los otros está ausente. Se observa asimismo, que los patrones de suero sanguíneo se semejaban un poco con los de transferrinas, sobre todo el patrón de S. mossambicus.

HEMOGLOBINAS

Los patrones electroforéticos de hemoglobinas se dividieron en seis zonas. Las zonas se enumeraron a partir de la región más rápida hacia la región más lenta incluyendo la zona catódica.

Zona I: se incluyeron en esta zona las bandas 1, 2 y 3.

Zona II: incluyó las bandas 4 y 5.

Zona III: con las bandas 6, 7 y 8.

Zona IV: con la banda 9

Zona V: con las bandas 10 y 11, y por último

Zona VI: (región catódica) con la banda 12.

La banda 12 emigró hacia el cátodo, observándose sólo en algunos organismos de la especie hornorum y el híbrido. El patrón de mossambicus no presenta las bandas 12, 9, 6, 3, 2 y 1 observándose una movilidad común en seis bandas, el patrón del híbrido presenta una inclinación hacia el progenitor hornorum.

Se observan por lo tanto dos patrones diferentes a nivel de especie, y el del híbrido con bandas intermedias de ambos padres.

Esquema 4.- Patrones con mayor resolución de suero sanguíneo total en las especies mossambicus, hornorum y el híbrido, divididos en cuatro zonas principales.

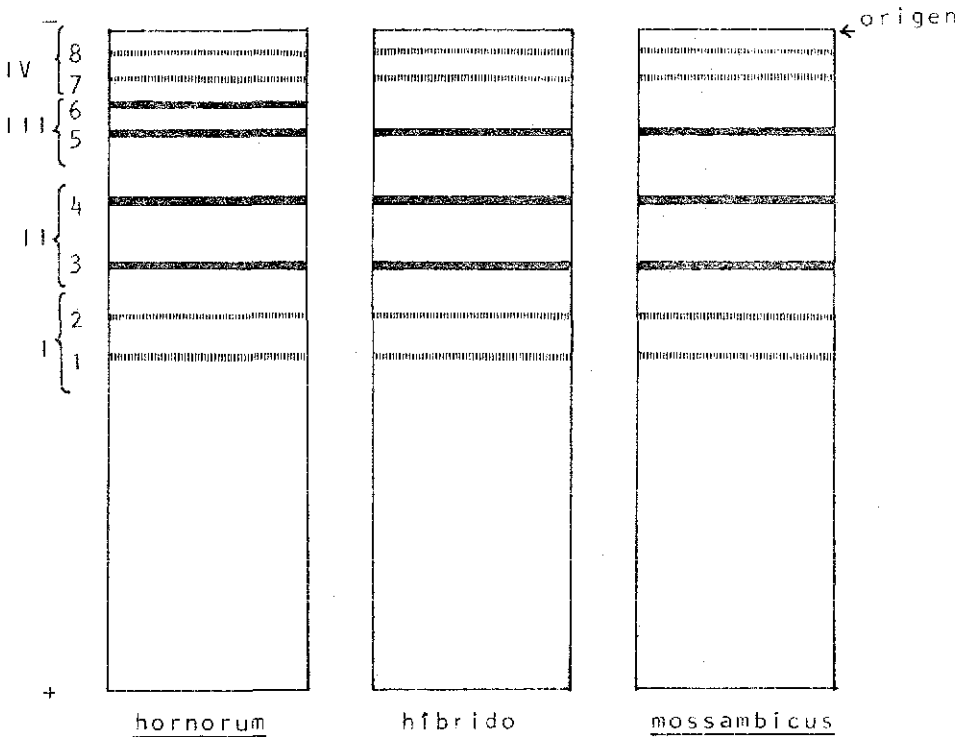


Tabla N° 4

Frecuencia de bandas del sistema de proteínas suero sanguíneo total:

Organismos			
Banda N°	<u>S. moss.</u>	híbrido	<u>S. horn.</u>
8	36.3%	* 92.8 %	* 70.0%
7	36.3''	64.3 ''	60.0''
6	_____	7.1''	50.0''
5	*100.0''	*100.0''	*100.0''
4	*100.0''	* 92.8''	*100.0''
3	*100.0''	* 92.8''	*100.0''
2	*100.0''	* 92.8''	*100.0''
1	54.5''	* 71.4''	50.0''

* Bandas con mayor índice de frecuencia

Las bandas 3 y 9 son bandas delgadas e intensas, las bandas 1, 2 y 6 son bandas delgadas y tenues todas se presentan sólo en la especie hornorum y el híbrido por lo que pueden ser considerados como patrones electroforéticos específicos de la especie, como se puede observar en el esquema 5 y figura 2.

La tabla 5 al igual que las anteriores (1, 2, 3, y 4) muestra las frecuencias de las bandas observadas en las placas de gel, como consecuencia del corrimiento electroforético de las muestras de proteínas de cada uno de los organismos estudiados, apoyando la determinación de los diferentes patrones electroforéticos observados.

ELECTROENFOQUE

Muestras de hemoglobinas y suero sanguíneo total se sometieron a electroenfoque con un rango amplio de pH 3.5 - 9.5, observándose que las bandas de hemoglobina se situaron en un rango de pH 7.6 - 5.3 y el suero sanguíneo total en un rango de pH 5.8 - 4.2 (Figura 3).

Una vez determinado el rango de pH en el cual corrieron las hemoglobinas, se volvieron a someter a electroenfoque -- muestras de hemoglobinas pero en un rango de Ph más estrecho 5.5 - 8.5 observándose que las bandas se establecieron en el gradiente de pH 7.7 al 5.5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-41-

Esquema 5.- Patrones con mayor resolución de hemoglobinas en las especies mossambicus, hornorum y el híbrido, divididos en seis zonas principales.

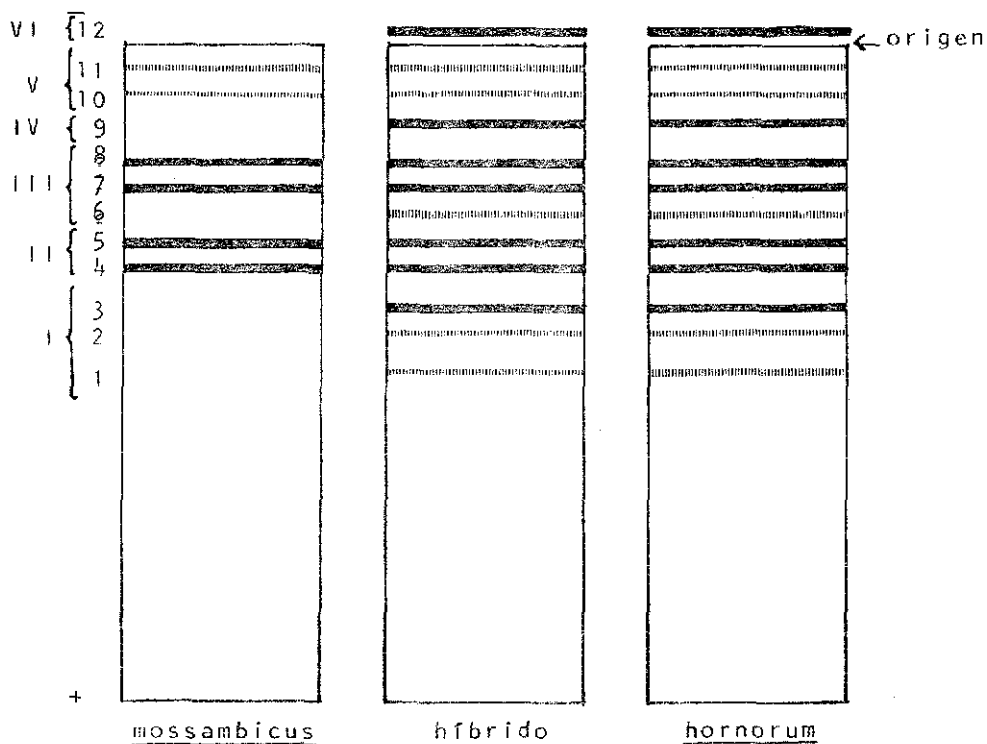


Tabla N° 5

Frecuencia de bandas del sistema de proteínas hemoglobinas:

Organismos			
Banda N°	<u>S. moss.</u>	híbrido	<u>S. horn.</u>
12	_____ %	25.0%	27.2%
11	* 70.0 "	25.0"	45.5"
10	60.0 "	_____	36.3"
9	_____	* 91.6"	* 90.9"
8	*100.0 "	*100.0"	*100.0"
7	*100.0 "	* 83.3"	* 72.7"
6	_____	25.0"	63.6"
5	*100.0 "	* 91.6"	*100.0"
4	*100.0 "	*100.0"	*100.0"
3	_____	* 75.0"	* 81.8"
2	_____	33.3"	* 45.0"
1	_____	16.6"	9.1"

* Bandas con mayor índice de frecuencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

42-A

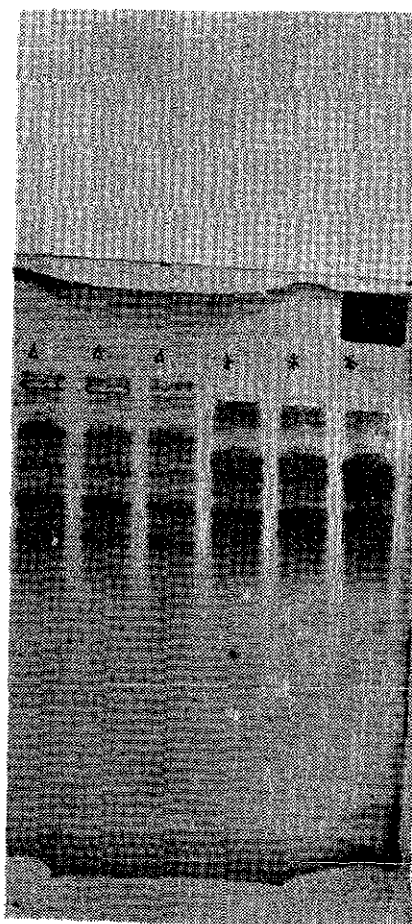


Fig. 2 Patrón electroforético del sistema de proteínas hemoglobinas de los peces

^A S. hornorum y ^B S. mossambicus. 30mA, 9°C

(Duración del corrimiento 3 hrs.)

A2-B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

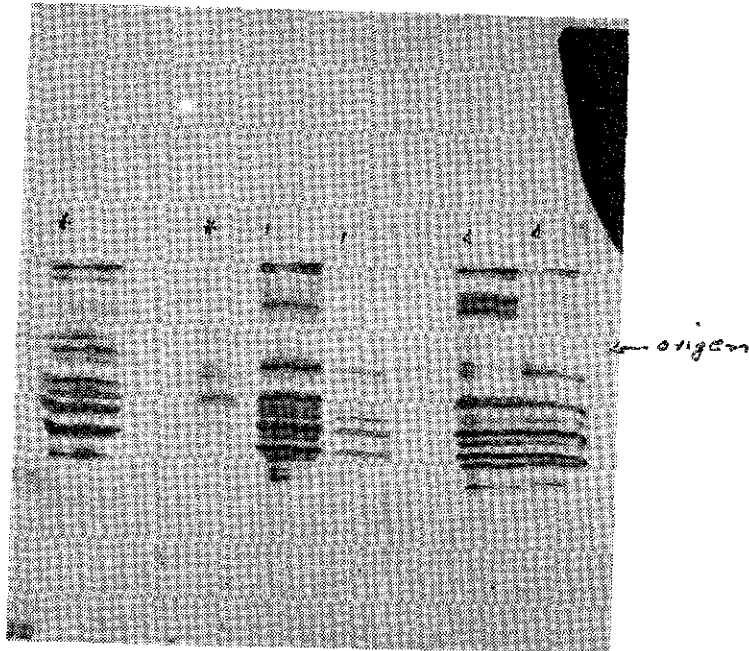


Fig. 3 Electroenfoque del sistema de protefnas hemoglobinas en los peces S. mossambicus híbrido y S. hornorum. Buffer electrodos ánodo 1 M H_3PO_4 pH 3.5, cátodo 1M NaOH pH 9.5, 20mA, 9°C (Duración del corrimien to, 2 hrs.)

DISCUSION

El análisis de los electroferogramas de las especies S. mossambicus, S. hornorum y el híbrido en los cinco sistemas de proteínas estudiados, se hizo de acuerdo a la migración anódica de las bandas, a su presencia o ausencia, y a la intensidad de las mismas, así como en la presencia de las bandas comunes.

Se pudieron detectar variaciones en las proteínas provenientes de las dos especies y el híbrido, originando patrones electroforéticos diferentes. Del análisis de las bandas de los electroferogramas, destaca que en todos los sistemas estudiados existen tres, o más bandas comunes a las distintas poblaciones, testigos de información genética que ha sido conservada a partir por lo menos, del tronco antes -

tral común. Por otra parte se ha encontrado gran variación en los diferentes sistemas, los puntos más relevantes de la cual se mencionan a continuación.

En el esquema 1 y figura 1 se comparan los patrones y electroferogramas de las proteínas parvalbúminas provenientes de las especies S. mossambicus, S. honorum y el híbrido. Se encontró una banda específica de cada especie y la consiguiente presencia conjunta en el híbrido, por lo que se les pudiera considerar como marcadores genéticos, originando por lo tanto patrones electroforéticos diferentes. Junto con las muestras se corrió un patrón de proteína de peso molecular conocido (Albúmina bovina PM 10,000) observándose que algunas bandas de las muestras emigraron más que el patrón.

Al comparar los patrones de suero de músculo y parvalbúminas, se observó que los patrones de parvalbúminas presentaron mayor resolución, reflejada en una separación más clara entre sus bandas, que los patrones de suero de músculo, probablemente debido al rompimiento de las proteínas (excepto, parvalbúminas) al ser sometida la muestra de suero de músculo a 60°C durante 5 minutos.

En el esquema 2 se puede observar la comparación de los patrones electroforéticos del suero de músculo

lo, observándose también varias bandas comunes. No se detectó una diferencia consistente entre los tres patrones: Chen y Tsuyuki (1970) han demostrado que los patrones de suero de músculo son específicos de las especies, lo que no fue detectado en este trabajo. Esta discrepancia se deba tal vez a la diferencia de técnicas manejadas, ya que el medio de soporte y soluciones amortiguadoras utilizadas por ellos difieren de las empleadas en este estudio.

Como se puede observar en el esquema 3 los patrones de las proteínas transferrinas presentan diferencias. Por ejemplo, la banda 6 se observa en S. mossambicus, las bandas 5 y 7 en S. hornorum y las tres se observan en el híbrido. Sin embargo por falta de nitidez en las placas debida tal vez a la variación en las concentraciones de las muestras, no se pudo observar en todos los organismos estudiados, no pudiendo considerarlos como marcadores al momento. Sin embargo se pudieron detectar tres frecuencias electroforéticas diferentes.

Se tiene el antecedente de que Chen y Tsuyuki (1970) estudiando transferrinas encontraron en S. hornorum dos bandas, en S. mossambicus una banda y en el híbrido dos bandas, una de cada progenitor. Es por esto que para estudios posteriores se tendrá

que ampliar la muestra, o auxiliarse de técnicas como la autorradiografía para mayor confiabilidad de los datos.

En el esquema 4 se muestran los tres patrones de suero sanguíneo total detectados en S. mossambicus, S. honorum y el híbrido, observándose muy poca diferencia. Esta diferencia se debe a que la banda 6, ausente en S. mossambicus, estaba presente en forma ocasional en los electroferogramas de S. honorum y del híbrido. Los patrones se semejaban un poco a los de transferrinas, ya que en este sistema hay una mezcla de proteínas entre ellas transferrinas.

El esquema 5 muestra la comparación de los tres patrones de hemoglobinas. En el se pueden observar los patrones característicos de las poblaciones estudiadas. La especificidad resulta de la presencia de algunas bandas exclusivas de los corrimientos de S. honorum y el híbrido, ausentes en los de S. mossambicus. Así, S. mossambicus presenta tres pares conspicuos de bandas, mientras que los corrimientos de S. honorum y el híbrido muestran dos zonas de tres bandas intensas cada una, además de bandas tenues intermedias y una banda con migración catódica. Como el patrón de bandas de las hemoglobinas de los híbridos se inclinan al de S. honorum no es posible discriminar entre estas poblaciones, pero sí se puede -

caracterizar sin ambigüedad S. mossambicus. (Obsérvese el esquema 5 y figura 2).

Los resultados de los estudios realizados de electroenfoque sobre las muestras de hemoglobinas y suero sanguíneo total en las especies ya mencionadas y en el híbrido fueron limitados, ya que se corrieron pocas placas. Se estableció que el rango de pH en el que se encontraban las diferentes bandas de hemoglobinas fue de 7.6 - 5.3 y que el de suero sanguíneo total fue de 5.8 - 4.2 (Obsérvese figura 3).

Una vez detectado el rango de pH de las hemoglobinas se utilizó para su corrimiento un rango de pH más estrecho (5.5 - 8.5) observándose que las bandas se establecieron en un gradiente de pH 7.7 a 5.5.

En el análisis de los resultados de este trabajo se cobró conciencia de las variaciones en los corrimientos debidos a factores técnicos tales como modificaciones en las cargas de las líneas eléctricas que alimentaban las fuentes de poder, o como la contaminación de reactivos para la elaboración de geles, o de los utilizados en los corrimientos propiamente dichos, tales como las soluciones amortiguadoras. No es ocioso enfatizar el cuidado riguroso que se debe tener en los factores controlables.

Existen otros posibles factores de variación que pudie --

ran enmascarar los resultados añadiendo variación. Por ejemplo, la posible utilización de cepas que en alguna etapa hayan sufrido contaminación genética por medio de la incorporación de individuos de otras cepas a las poblaciones reproductivas, hecho que muy posiblemente se dé en las piscifactorías. Esta variación sin embargo, se podrá demostrar al estudiar muestras más amplias, provenientes de diferentes lugares, en estudios posteriores.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio prospectivo de cinco sistemas de proteínas en busca de marcadores genéticos de las especies S. mossambicus, S. hornorum y del híbrido F_1 S. mossambicus x S. hornorum ha mostrado que:

- 1) Los patrones electroforéticos de la separación de las hemoglobinas muestra perfiles diferenciales entre las especies -- progenitoras que pueden servir como marcadores genéticos.
- 2) Los patrones de separación de las parvalbúminas muestran -- igualmente perfiles específicos en S. mossambicus y en S. hornorum.
- 3) Los patrones de separación del suero de músculo no concordan con los patrones electroforéticos reportados por otros autores que han hecho estudios semejantes, indicando que a): las poblaciones son diferentes de las estudiadas, b): las -- condiciones de las técnicas de separación electroforética -- realizada difiere de las utilizadas por otros autores.

Para verificar la posible utilidad de este patrón de separación sería conveniente ampliar la muestra en estudios posteriores así como verificar nuevas técnicas.

4) La utilización de marcadores radioactivos en la separación de transferrinas pueden incrementar notoriamente la resolución del estudio. Las bandas encontradas sugieren la presencia de un marcador peculiar a S. mossambicus y a S. hornorum.

5) Este estudio fué prospectivo, por lo tanto, es necesario que los sistemas que han mostrado presencia de marcadores genéticos moleculares, sean estudiados en muestras más amplias.

6) Como resultado global de este estudio se ha concretado que los sistemas de hemoglobinas y de parvalbúminas, previo un estudio de una muestra mayor que verifique nuestros resultados, pueden ser utilizados para caracterizar las poblaciones de Sarotherodon utilizadas en el piscifactoría de El Rodeo, Mor. y de Zacatepec, Mor. Se considera que una caracterización basada en características moleculares es objetiva y puede auxiliar significativamente al establecimiento de las bases de los criterios en el manejo integral de estas poblaciones a fin de lograr la óptima utilización de este importante recurso alimentario.

REFERENCIAS

- Abramoff, P. Darnell, M.R. y Balsano, S.J. 1968. Electrophoretic demonstration of the hybrid origin of gynogenetic teleost Poecilia formosa. The American Naturalist 102:928, 555-558
- Anderson, R.C. 1982. Electrophoretic analysis on Antarctic fish from Souts Georgia animal blood groups and biochemical. Genetics, 13: 11-18
- Arredondo, Figueroa. J.L., Situación Taxonómica actual de las especies de la tribu Tilapiini (Pisces, Cichlidae), introducidas en México. Anales del Instituto de Biología U.N.A.M. (En prensa)
- Avtalion, R.R. Pruginin, Y. y Rothbard, 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. Bamidgeh. 27: 8-13
- Avtalion, R.R. Duczyminer, M. Wojdani, A. y Pruginin, Y. 1976. Determination of allogeneic and xenogeneic markers in the genus of Tilapia II. Identification of T. aurea, y T. vulcani y T. nilotica by electrophoretic analysis of their serum proteins. Aquaculture 7: 255-265
- Avtalion, R.R. y Hammerman, J.S. 1978. Sex determination in Sa rotherodon (Tilapia). I. Introduction to a theory of autosomal influence. Bamidgeh 30:4, 110-115
- Avtalion, R.R. y Hammerman, J.S. 1979. Sex determination in Sa rotherodon (Tilapia). Part. 2: The sex ratio as a tool for the determination of genotype a model of autosomal and genosomal influence. Theor. Appl. Genet. 55:3/4, 177-187

- 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. 1978. Molecular Evolution (Selander, K.R. Genetic variation in natural populations cap. 2). Sinever - Associates Inc. Publishers.
- Balarin, J.D. 1979. Tilapia, A guide to their biology & Culture in Africa. University of Stirling. 5-8, 32-35 -- 43-52, 67-71
- Bossa, F. Savi, R. Barra, D. y Brunori, M. 1982. Structural - comparison of the haemoglobin components of the armoured catfish Pterygoplichthys pardalis. Biochem. J. 205: 39-42
- Blum, E.H. Lehky, P. et al 1977. Comparative properties of vertebrate parvalbumins. The J. of Biol. Chemistry. - 252:9, 2834-2838
- Broyles, H.R. Brian, M.P. Stuart, B. 1979. Quantification of small amounts of hemoglobins in polyacrylamide gels with benzidine. Analytical Biochemistry. 94: 211-219
- Castorena, S.I. Uribe, A.M. Arreguín, E.J. 1983. Estudio cromosómico de poblaciones del género Tilapia Smith - (Pisces Cichlidae), provenientes de tres regiones de México. Veterinaria Méx. 14:
- Chandrasekhar, N. 1959. Multiple haemoglobins in fish. Nature. 184:4699, 1652-1653
- Chen, F.Y. y Tsuyuki, H. 1970. Zone electrophoretic studies - on proteins of Tilapia mossambica y T. hornorum and their F₁ hybrids, T. zilli and T. melanopleura. Fish. Res. Bd Can. 27: 2167-2177

- Chua, K.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
- Cross, T.F. O'Rourke, F.J. 1978. An electrophoretic study of the haemoglobin of some hybrid fishes. PROC. R.I.A. Vol. 78 sect. B. 171-178
- Creysse, R. Silberzahn, P. 1966. Transferrin variants in -- Carp serum. Nature. 112: 1362 pp
- Djupsund, B.M. 1976. Protein taxonomical studies of whitefish and taperworms with layer electrofocusing. Application Note 242 LKB.
- Gerday, Ch. Joris, B. Gerardin-Otthiers, N. 1979. Parvalbumins from the lungfish Protopterus dalloii. Biochimie. extrait du tome 61, N° 5-6, 589-599
- Haiech, J. Derancourt, J. 1979. A new large-scale purification procedure for muscular parvalbumins. Biochimie. 61: 583-587
- Hames, B.D. y Rickwood, D. 1981. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Published by IRL Press Limited, London and Washington D.C.
- Jalabert, B. Kammacher, P. y Lessent, P. 1971. Determinism du sexe chez les hybrides du genre Tilapia. Ann. Biol. Anim. Bioch. Bioph. 11:1, 155-165
- Kornfield, I.L. Ritte, U. Richler, C. y Wahrman, J. 1979. Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes on the sea of Galilee. Evolution. 33:1, 1-14
- Krishnaja, A.P. and Rege, M.S. 1980. Some observations on the chromosomes of certain teleosts using a simple method. Indian J. Exp. Biol. 18:3, 268-270

- Love, M.R. 1970. The Chemical Biology of Fishes. Academic Press London and New York, 163, 231-243
- McAndrew, B.J. y Majumdar, K.C. 1983. Tilapia stock identification using electrophoretic markers. Aquaculture. 30: 249-261
- Michele, J.L. y Takahashi, C.S. 1977. Comparative cytology of Tilapia rendalli and Geophagus brasiliensis (Cichlidae, Pisces). Cytologia. 42: 535-537
- Munilla, T. y Matallanas, J. 1979. Electroforesis de proteínas musculares de Raja. Cahiers du Biologie Marine Tome XX, 165-170
- Morgan, P.R. y Ulanowics, I.N. 1976. The frequency of muscle protein polymorphism in Menidia menidia (Atherinidae) along the Atlantic Coast. Copeia N° 2, 356-360
- Nuño, M. 1978. Electro e inmuno-electroforesis. Internacional Científica, S.A. 1-25, 83-89
- Pérez, E.J. 1979. Respiración aérea y acuática en peces de la especie Hoplosternum littorale. I. Parámetros sanguíneos. Acta Cient. Venezolana. 30: 314-317
- Rosas, M.M. 1976. Peces dulceacuicolas que se explotan en México y datos sobre su cultivo. Ins. Nal. de Pesca. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. A.C. 75-85
- Russell, A.H. y Jeffrey, E.J. 1979. Serum transferrin polymorphism in grey trout (Cynoscion regalis), from the lower Rapphannock River. Estuaries. 2:4, 269-270
- Sick, K. 1961. Haemoglobin polymorphism in fishes. Nature. 192: 894-896
- Sharp, D.G. 1969. Electrophoretic study of tuna hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol. 31: 749-755

- Sotorres, A.M. Mulet, M.C. 1984. Características de los ferogramas en gel de poliacrilamida de extractos tisulares de pescadilla Cynoscion striatus (Pisces Scianidae). Hidrobiología Tomo 2, N° 10, 119-124
- Starmach, J. 1977. Electrophoretic separation of blood serum protein on polyacrylamide gel in seven carp families. Acta Hydrobiol. 19:2, 163-167
- Tsuyuki, H. Roberts, E. y Gadd, E.A. 1962. Muscle Proteins of Pacific salmon (Oncorhynchus). Can. Journal of Biochemistry and Physiology. 40: 929-936
- Tsuyuki, H. Roberts, E. y Vanstone, W.E. 1965. Comparative-zone electropherograms of muscle myogens and blood hemoglobins of marine and freshwater vertebrates - and their application to biochemical systematics. - J. Fish. Res. Bd Canada 22:1, 203-213
- Tsuyuki, H. y Eve, R. 1965. Zone electrophoretic comparison of muscle myogens and blood proteins of artificial hybrids of Salmonidae with their parental species. J. Fish. Res. Bd Canada 22: 3, 267-773
- Tsuyuki, H. Roberts, E. y Kerr, R.H. 1967. Comparative electropherograms of the family Catostomidae. J. Fish. Res. Bd Canada 24:, 299-304
- Tsuyuki, H. Roberts, E. Lowes, R.H. y Hadaway, W. 1968. Contribution of protein electrophoresis to Rockfish - (Scorpaenidae) systematics. J. Fish. Res. Bd Canada 25:11, 2477-2501
- Tsuyuki, H. y Best, E.A. 1969. Serum transferrin systems and the hemoglobins of the Pacific halibut (Hippoglossus stenolepis). J. Fish. Res. Bd Canada 26: 2351-2362

- Wilson, M.C. 1979. Studies and critique of Amido black 10B, Coomassie blue R. and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 96: 263-278
- Wilkins, N.P. 1967. Polymorphism of whole blood proteins in the cod (Gadus morhua).
J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer. 31:1, 77-88
- Winter, A. Ek, K. y Andersson, U. 1977. Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels.
Application Note 250 LKB