



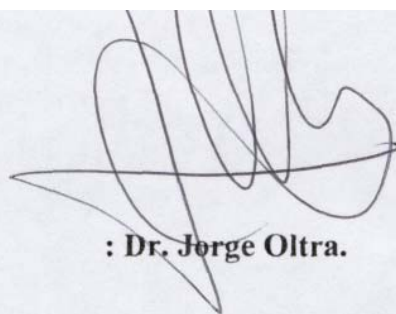
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Veterinarias**  
**Centro de Inseminación Artificial**

**Determinación de Polimorfismos Bioquímicos Sanguíneos en Salmonídeos de cultivo. Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus Mykiss*), Salmón Coho (*Oncorhynchus Kisutch*) y Salmón del Atlántico (*Salmo Salar*)**

**Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA**

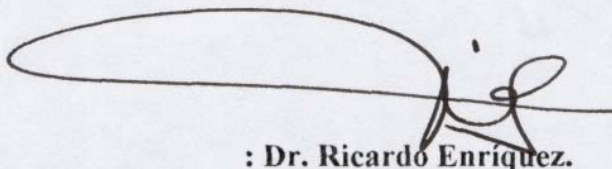
**Rodrigo Andrés Esquivel López**  
**Valdivia Chile 1997**

**PROFESOR PATROCINANTE**

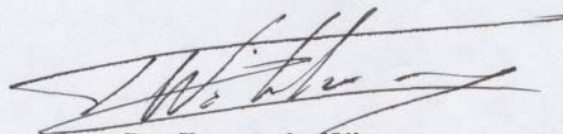


**: Dr. Jorge Oltra.**

**PROFESORES CALIFICADORES**



**: Dr. Ricardo Enríquez.**



**Dr. Fernando Wittwer.**

**FECHA DE APROBACION**

**: 19 de Noviembre de 1997.**

**A MI PADRE,  
POR SU GRAN PACIENCIA  
Y A LA MEMORIA DE MI MADRE.**

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. SUMMARY</b> .....	2
<b>3. INTRODUCCION</b> .....	3
3.1 Salmonicultura en Chile.....	4
3.2 Polimorfismos bioquímicos sanguíneos.....	5
3.3 Objetivos.....	8
<b>4. MATERIAL Y METODOS</b> .....	9
4.1 Muestras.....	9
4.2 Electroforesis.....	9
4.3 Análisis Estadístico.....	15
<b>5. RESULTADOS</b> .....	16
5.1 Trucha arcoiris .....	16
5.2 Salmón Coho.....	19
5.3 Salmón del Atlántico.....	21
<b>6. DISCUSION</b> .....	25
6.1 Sistemas polimórficos .....	26
6.2 Sistemas monomórficos .....	27
6.3 Conclusiones .....	30
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	31
<b>8. ANEXOS</b> .....	33

## 1. RESUMEN

Utilizando dos métodos de electroforesis horizontal (almidón hidrolizado y poliacrilamida) aplicados en la tipificación sanguínea equina y bovina, se estudiaron siete proteínas y enzimas sanguíneas, tanto séricas como eritrocitarias en salmonídeos de cultivo de las especies trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y salmón del atlántico (*Salmo salar*).

Las proteínas y enzimas estudiadas fueron: transferrina (Tf), fosfoglucomutasa (PGM), anhidrasa carbónica (AC), albúmina (AI), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD), esterases (Es) y hemoglobina (Hb).

La técnica de electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida resulta un método eficiente para la diferenciación de especies de salmonídeos, mostrando un patrón de migración electroforética diferente en las 3 especies. No ocurre lo mismo con las técnicas utilizadas para geles de almidón, en que es muy difícil discriminar de que especie de pez se trata. Dos sistemas, Tf y AI mostraron polimorfismo en trucha arcoiris, mientras que en salmón coho y salmón del atlántico sólo Tf se mostró polimórfica. El sistema AI se mostró monomórfica en salmón del atlántico y salmón coho, mientras que 6-PGD se mostró monomórfica en trucha arcoiris, y en las otras especies no fue posible realizar la tipificación.

Según los resultados obtenidos, es posible recomendar el uso de electroforesis con geles de poliacrilamida, para detectar polimorfismos bioquímicos en salmonídeos. Se discuten los resultados y se señala su implicancia biológica y práctica.

Palabras claves: *Electroforesis, salmonídeos, marcador genético, polimorfismo bioquímico.*

## 2. SUMMARY

Two methods of horizontal gel electrophoresis (starch and polyacrylamide) applied in the equine and bovine blood typing, were used in the study of seven blood proteins and enzymes, in farmed salmon of the species rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*).

The proteins and enzymes systems studied were: transferrin (Tf), phosphoglucomutase (PGM), carbonic anhydrase (AC), albumin (Al), 6-phosphogluconate deshydrogenase (6-PGD), esterase (Es) and hemoglobin (Hb).

The horizontal electrophoretic technique in polyacrylamide gels is shown to be an efficient method for the differentiation of salmon species, with a different electrophoretic migration in the 3 species. This is not the case for starch gels, because is very difficult to discriminate between the different species. Two systems, Tf and Al showed polymorphism in rainbow trout, while in Coho salmon and Atlantic salmon only Tf was shown polymorphic. The Al system was shown to be monomorphic in *Salmo salar* and Coho salmon, while 6-PGD was shown monomorphic in rainbow trout, and in the other species was not possible to carry out the typing. It was not possible to identify the others systems.

According to the results obtained, it is possible to recommend the use of polyacrilamide gel electrophoresis (PAGH) in differentiating genetic markers in fishes. Results are discussed and its biologic and practical implicances are pointed out.

Key words: *Genetic marker, biochemical polymorphism, electrophoresis, salmon, trout.*

### 3. INTRODUCCION

La fecha de aparición del salmón en el escenario acuático, no está determinada con precisión; sin embargo, la información que existe señala que el grupo de los peces teleósteos, al cual pertenecen los salmones, dominó en el período Cretáceo que se inició hace unos 135 millones de años (Méndez y Munita, 1989).

Durante un lapso de 60 millones de años los teleósteos se esparcieron por el mundo y se adaptaron mediante largos procesos evolutivos en las hoy numerosas familias, entre las que se incluyen los salmonídeos, que prefieren aguas frías y oxigenadas ubicadas en el Hemisferio Norte (Méndez, y Munita, 1989).

En términos evolutivos, el género *Salmo* es el más antiguo y en términos geológicos, el género *Oncorhynchus* es una derivación reciente del *Salmo*. Se presume que la primera derivación del *Salmo salar* puede ser el *Oncorhynchus masou* (Salmón cereza) encontrado sólo en Asia; éste tiene una biología más cercana al *Salmo salar* que el resto de los salmones del pacífico, especialmente en la composición de su sangre (Méndez y Munita, 1989).

Los biólogos europeos del siglo pasado tenían algún conocimiento sobre el salmón del Pacífico. Este conocimiento derivaba principalmente de los estudios efectuados sobre el salmón del Atlántico (género *Salmo*) un pariente cercano al salmón del Pacífico (género *Oncorhynchus*). De este último género existen seis especies cuyos nombres domésticos son sockeye, rosado, plateado, perro, rey y cereza. Sus nombres científicos son: *Oncorhynchus ischawytscha*, *Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus keta*, *Oncorhynchus gorbusha*, *Oncorhynchus masou*.

El desarrollo del cultivo de especies salmonídeas es iniciado por los ingleses en el año 1868. Luego se suman Estados Unidos y Japón. Con el pasar de los años, esta actividad de cultivo artificial, experimenta un gran desarrollo y muy pronto comienzan los esfuerzos orientados a transplantar estas especies hacia otros lugares y otras latitudes, Estados Unidos lideró los esfuerzos para introducir ovas de salmón del Pacífico a diferentes países europeos, como también a países del Hemisferio sur, donde Chile al igual que Nueva Zelanda, ocupó un importante lugar de destino (Méndez y Munita, 1989).

### 3.1 SALMONICULTURA EN CHILE

La introducción del salmón a Chile, ha sido un proceso de casi un siglo. Ya en el año 1875 y 1885 se realizaron los primeros intentos por particulares, sin que llegaran a su cometido (Méndez y Munita, 1989).

El real interés por el cultivo de salmónes en forma comercial se inició en el año 1979 con el cultivo del salmón enjaulas (Méndez, 1985). Desde ese momento hasta la actualidad la actividad salmonera se ha caracterizado por un vertiginoso crecimiento, contando en la actualidad con más de 1000 centros autorizados (Méndez, 1997).

La actividad se concentra principalmente en el sur del país (Décima Región, 41° - 44° latitud sur), donde operan aproximadamente el 81% de las empresas que se dedican al cultivo intensivo de salmonídeos. Las especies más cultivadas corresponden a salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), estimándose una producción total para la temporada 1996 de 158.560 toneladas (Méndez, 1997).

Además, cabe destacar que del total de ovas requeridas por la industria salmonera (179 millones) un 48,2% son producidas en el país y el 51,8% restante proviene del extranjero, principalmente de Irlanda, Escocia, Estados Unidos y Noruega en el caso del salmón del Atlántico; de Estados Unidos, Dinamarca, Suecia, Noruega y Finlandia para la trucha; y de Estados Unidos y Canadá para el salmón Coho (Aquanoticias Internacional, 1997).

Hoy en día, Chile es el segundo productor mundial de especies salmonídeas, destacando la excelente calidad del producto final.

La intensificación de la producción de peces en Chile y el mundo, especialmente de especies salmonídeas, hizo que los cruzamientos sistemáticos de peces sean más y más importantes (Diebig y col., 1979). Por esto es de especial importancia el uso de marcadores genéticos (polimorfismos) para determinar la estructura genética y grados de parentesco en peces, al igual que en animales domésticos, donde es posible usar muestras de sangre (suero, plasma, eritrocitos), hígado, tejido muscular, mucus, etc.



### 3.2 POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS SANGUINEOS

Polimorfismo bioquímico sanguíneo de las proteínas puede definirse como las distintas variantes genéticas de enzimas y proteínas que se encuentran tanto en suero como en eritrocitos.

Marcadores genéticos se denomina a los genes que determinan los factores de los grupos sanguíneos y a las variantes polimórficas bioquímicas de las proteínas (Mitat, 1985).

El polimorfismo bioquímico de las proteínas representa un inmenso campo de investigación, tanto en los humanos como en los animales. Las variabilidades estructurales de las proteínas y enzimas, determinadas genéticamente, que se encuentran en las células, el plasma sanguíneo, las secreciones y otros líquidos del organismo, han contribuido a aumentar el número de marcadores genéticos (Mitat, 1985).

Estas variantes de enzimas y proteínas sanguíneas constituyen marcadores genéticos de importancia en la caracterización de individuos y poblaciones. Para que sean considerados como tales, deben presentar algunas características definidas como son: herencia simple y conocida, codominancia; deben desarrollarse desde el nacimiento del individuo o inmediatamente después; no deben variar con las influencias del ambiente, permaneciendo inalterables durante toda la vida y su detección debe ser a través de pruebas confiables y objetivas (Stormont y Suzuki, 1964).

Ahora bien, el valor individual de cada uno de ellos dependerá del número de alelos que presente el marcador, como también de la frecuencia que tenga en una determinada población (Mitat, 1985).

Al igual que en los grupos sanguíneos, existen sistemas polimórficos bioquímicos de proteínas con mayor o menor variabilidad que otros. Para algunas especies y razas, ciertos sistemas se manifiestan monomórficos y por consecuencia no tienen utilidad como marcadores genéticos. Un sistema polimórfico es de interés como marcador genético, cuando la variante menos frecuente más bien está presente en una frecuencia moderada en un grupo étnico particular, por lo que la variabilidad y la utilidad de cada sistema debe ser primero probado en cada población, ya que un sistema puede ser polimórfico y útil en una población y no en otra (Mitat, 1985).

La determinación de los polimorfismos bioquímicos sanguíneos, se realiza mediante técnicas de electrofresis que son métodos confiables y objetivos.

Estas técnicas se basan en el movimiento de partículas cargadas en solución bajo la influencia de un campo eléctrico. Es un método analítico que permite separar diversas fracciones según la movilidad que les imprime su carga eléctrica y en tal forma que su constitución no se altere (Castagnino, 1968). Basándose en este principio, las partículas cargadas de una muestra son conducidas en solución y se separan de acuerdo a la densidad de su carga eléctrica. Los métodos más frecuentes, usan como medio de soporte geles de poliacrilamida, almidón y agarosa. Así, con estos soportes que agregan un efecto de cribado, las partículas pueden ser caracterizadas por tamaño y carga eléctrica (Gombocz, 1995). Los geles de poliacrilamida constituyen generalmente la mejor matriz de rutina en el fraccionamiento de proteínas séricas, por cuanto se combina el fenómeno de migración electroforética con el fenómeno de ultrafiltración molecular (Hyslop, 1972). Esta técnica de fraccionamiento electroforético se ha extendido al estudio de los polimorfismos bioquímicos sanguíneos los cuales integran la mayor parte del campo de la investigación genética y se basan en la distinta velocidad de migración en un medio de soporte (Ariza, 1979).

Dentro de los productos que corresponden a marcadores genéticos, que se pretenden detectar se encuentran las siguientes proteínas y enzimas:

### 3.2.1 Transferrina (Tf)

Las transferrinas (siderofilinas) son  $\beta$  - globulinas que se encuentran en forma universal en el suero de todos los vertebrados. Esta proteína tiene una alta capacidad de ligarse con el hierro, siendo su rol principal transportar este elemento por el sistema circulatorio, hasta los órganos de depósito y lugares de síntesis de hemoglobina. El polimorfismo genético de la transferrina ha sido descrito para muchas especies de vertebrados (Paynecol., 1971).

### 3.2.2 Fosfoglucomutasa (PGM)

Cataliza reversiblemente la transferencia del fosfato en la glucosa de la primera a la sexta posición (Op't Hof y col., 1982). Roberts y col. (1969) utilizando muestras de músculo esquelético de trucha arcoiris, mediante electrofresis vertical en geles de almidón, describieron la enzima como polimórfica, encontrando 3 fenotipos distintos.

### 3.2.3 Anhidrasa Carbónica (AC)

Esta enzima después de la hemoglobina, es el segundo componente mayor en los eritrocitos, y una de las enzimas más importantes de estas células. Esta enzima cataliza la conversión reversible del dióxido de carbono y el agua a ácido carbónico (Mitat, 1985). Diebig y col. (1979), observaron en trucha arcoiris tres diferentes fenotipos de la enzima, usando como muestra hígado. Las bandas tenían una gran intensidad lo que expresaría una alta actividad de anhidrasa carbónica.

### 3.2.4 Albúmina (Al)

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo, y es también la más homogénea, soluble, estable y de mayor velocidad electroforética de todas las fracciones de proteínas plasmáticas. Su principal función es la de mantener el equilibrio osmótico entre la sangre y los líquidos de los tejidos. Es responsable de alrededor del 80% del total de la presión osmótica de las proteínas del plasma. También desempeña la función de transporte, por poseer una gran capacidad para fijar sustancias de tipo fisiológico como bilirrubina, ácido úrico, ácidos grasos, así como vitaminas, antibióticos y otras sustancias (Mitat, 1985).

### 3.2.5 6 - Fosfogluconato deshidrogenasa (6 - PGD)

Es la enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato a 5-fosfato ribulosa (Mitat, 1985). Diebig y col. (1979) analizaron 600 muestras de suero de trucha arcoiris y no encontraron evidencia de que esta enzima tuviera características polimórficas.

### 3.2.6 Esterasas (Es)

En consideración a su actividad catalítica en la hidrólisis de los ésteres, las esterasas son incluidas dentro del grupo de las hidrolasas. Estas enzimas producen la disociación de un enlace estérico entre el carboxilo del ácido orgánico y el hidroxilo del fenol, naftol, glicerol o de otros alcoholes (Mitat, 1985).

### 3.2.7 Hemoglobina (Hb)

La Hemoglobina es el pigmento rojo de los eritrocitos que causa el color de la sangre. Es una proteína compleja que se caracteriza por su contenido de hierro. Por medio de los ácidos o de los álcalis tiene lugar el desdoblamiento del cromo proteico en sus componentes: globina (proteína) y hemo (materia colorante). La principal función de la hemoglobina es el transporte del oxígeno desde los órganos respiratorios a los tejidos, donde se consume el

oxígeno para la oxidación de los hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas y otras sustancias orgánicas (Mitat, 1985).

En nuestro país hay poco conocimiento sobre polimorfismos bioquímicos en peces, y su determinación y eventual utilidad en la identificación de individuos y poblaciones de salmonídeos.

### 3.3 OBJETIVOS

#### 3.3.1 Objetivo general

Caracterizar polimorfismos bioquímicos sanguíneos en salmonídeos de cultivo, en las especies trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

#### 3.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de las técnicas de electroforesis de uso en bovinos y equinos para ser usadas en la identificación de proteínas en peces.
- Determinar las frecuencias de presentación de polimorfismos bioquímicos sanguíneos.
- Comparar en las poblaciones en estudio los distintos polimorfismos observados.

## 4. MATERIAL Y METODOS

### 4.1 MUESTRAS

Se obtuvieron 610 muestras sanguíneas de salmonídeos en cultivo, provenientes de pisciculturas ubicadas entre la IX y X región (Anexo N°1).

Del total de muestras, 320 corresponden a Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), 174 a Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y 116 a Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*).

Las muestras se tomaron individualmente en tubos sin anticoagulante por medio de punción de la vena caudal o intracardiaca usando el sistema de Venoject<sup>1</sup>. También fueron tomadas durante la cosecha, directamente de la arteria branquial en tubos numerados en forma correlativa.

Las muestras fueron dejadas coagular a temperatura ambiente y el suero fue separado por centrifugación (2500 r.p.m. por 10 minutos). Posteriormente el suero y coágulo fueron almacenados separadamente en envases plásticos de 5 ml a -20 °C hasta su utilización.

### 4.2 ELECTROFORESIS

Se aplicaron las técnicas de : Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida descrita por Yokohama y col. (1987) y electroforesis horizontal en geles de almidón hidrolizado descritas por Gahne y col. (1960), Kristjansson (1963), Scott (1970), Sandberg y Bengtsson (1970), Sartore y col. (1969), ambas utilizadas para la tipificación de polimorfismos bioquímicos sanguíneos en bovinos y equinos.

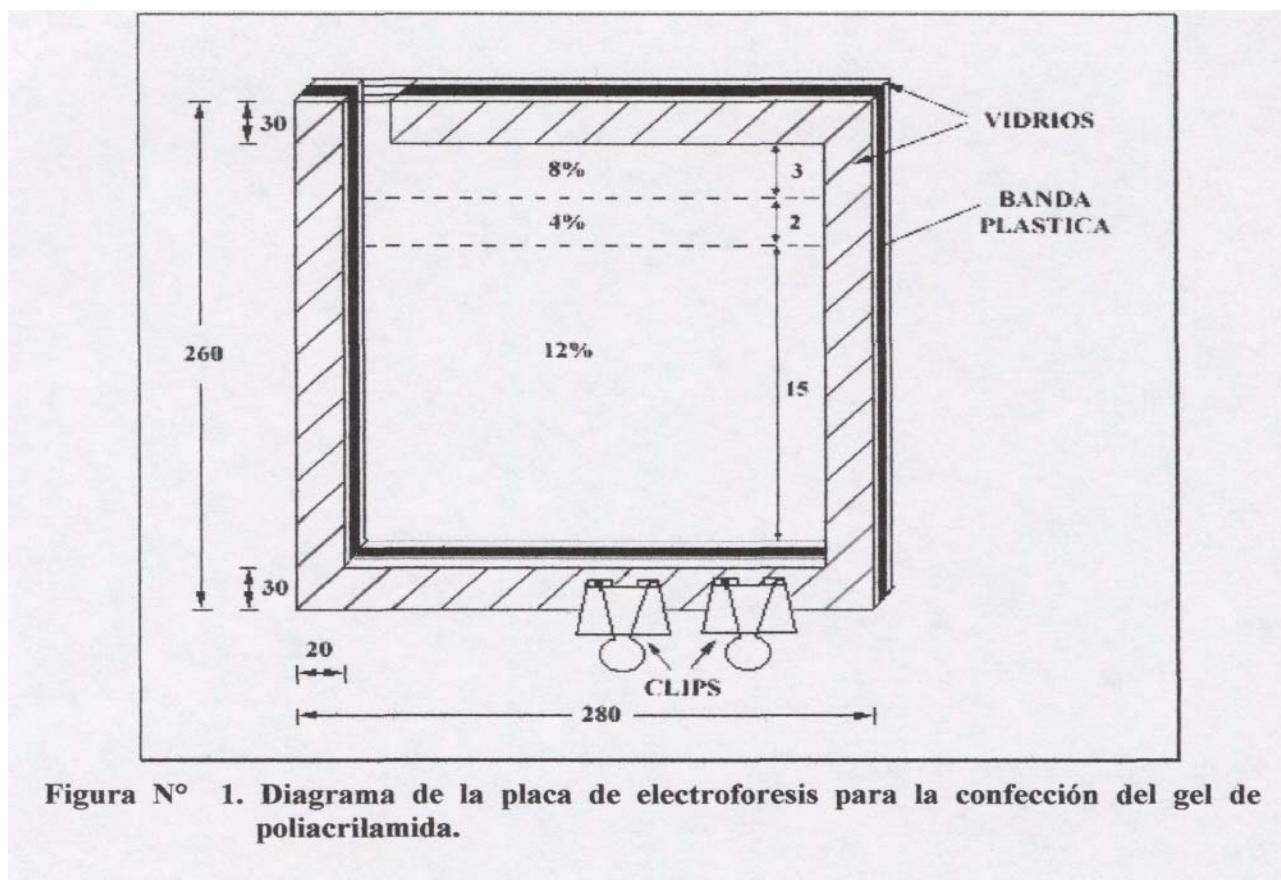
#### 4.2.1 Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida

Con esta técnica se determinó los sistemas transferrina, albúmina y esterasas.

---

<sup>1</sup> Venoject II, Blood collection needles. TERUMO.

Se utiliza el gel de poliacrilamida, compuesto por tres zonas de diferente tamaño y concentración de acrilamida y bis-acrilamida, formadas por la unión de tres soluciones las cuales son depositadas en la placa de electroforesis (Figura N° 1).



Esta placa está formada por dos vidrios de 26 por 28 cm., unidos por una banda plástica, la cual deja una separación en el borde superior para ser llenado con las siguientes soluciones:

- Solución A: Acrilamida <sup>2</sup>	80 g
Bis-acrilamida <sup>2</sup>	2 g
Agua destilada	250 ml

<sup>2</sup> Wako pure chemical industries, Ltd.

- Solución B:	1.49 M Tris <sup>3</sup> (180 g/l)	50 ml
	TEMED <sup>3</sup>	300 µl
	2 Mercapto etanol <sup>4</sup>	150 µl
	1 M Acido cítrico	21,6 ml
	Agua destilada	100 ml

- Solución C :	Persulfato de amonio	200 mg
	Agua destilada	100 ml

#### Preparación de geles

TAMAÑO	CONCENT.	SOLUCION A	SOLUCION B	AGUA	SOLUCION C
15 cm	12%	11.2	7.5	3.8	7.5
2 cm	4%	1	1 + 5 µl TEMED	4.125	2
3 cm	8%	1.5	0.75 + 3.75 µl TEMED	2.25	1.5

Una vez mezcladas las soluciones en las cantidades antes indicadas, se depositan en la placa mediante una jeringa de 20 cc, agregando previamente alcohol isobutanol (2 ml), con el fin de producir polimerización de la acrilamida. Se llena primero el gel de 12 % y una vez solidificado se retira del alcohol; luego se procede al llenado del gel de 4 % y finalmente el gel de 8 % de concentración de acrilamida y bis-acrilamida.

Luego la placa se deja en refrigeración a 5 °C hasta su utilización, la cual no debe exceder los cinco días post elaboración.

Al momento de su utilización la placa se abre separando ambos vidrios y cuidando de no dañar el gel; se procede a la siembra de las muestras, usando papel filtro N° 3 de 0.3 por 0.5 cm., embebidos en las muestras de suero y puestos en la mitad del gel de 4 %, en línea recta. La cantidad de muestras procesadas por corrida electroforética fue de 55. Se utilizaron como controles muestras de equino, para tener un patrón de referencia de la migración de los distintos sistemas que se trataron de detectar.

<sup>3</sup> Merck A. G., Darmstadt

<sup>4</sup> Wako pure chemical industries, Ltd.

Una vez realizada la siembra, se cubre el gel con papel nylon y se coloca en la cámara de electroforesis, uniendo el gel a los electrodos positivos y negativos mediante bandas de papel filtro (26 por 1.5 cm) y sobre éste, papel absorbente, los cuales han sido embebidos en solución buffer para electrodos (Anexo N° 2).

Todo el sistema está controlado por una fuente de poder<sup>5</sup>, la cual regula el miliamperaje y voltaje aplicados.

El proceso electroforético se divide en dos etapas:

- Tiempo de inserción: es el tiempo en que las muestras permanecen sobre el gel hasta que éstas son retiradas. Se aplicaron 40 mA y 950 V por 8 minutos.
- Tiempo de corrida: este proceso utiliza una intensidad de 35 mA y un voltaje de 1000 V por el lapso de 6 horas. En esta etapa se debe tener cuidado de no sobrepasar los 1000 V.

Para evitar aumentos de temperatura, producido por los altos voltajes utilizados, el aparato de electroforesis posee una cámara tabicada por la cual circula agua corriente, la que es impulsada por un enfriador de agua<sup>6</sup>.

Una vez finalizado el proceso electroforético la placa se retira, se extrae el gel y se somete a proceso de tinción con una solución de tinción específica de esterasas por 2 minutos, luego se retira el colorante y se somete a una solución de azul brillante de Coomassie (Anexo N° 3) por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente, al cabo de los cuales se retira el colorante y se le agrega solución decolorante (Anexo N° 4) por 2 horas. Posteriormente el gel se lava con agua corriente y se procede a secar colocándolo en una placa de vidrio cubriendo el gel por ambos lados con papel celofán y dejándolo en posición vertical.

Luego, sobre una pantalla luminosa se realiza la observación y análisis de las bandas para determinar los diferentes polimorfismos bioquímicos.

---

<sup>5</sup> AE - 8400 CROSSPOWER 1000

<sup>6</sup> Cool Ace, Tokyo Rikakikai Co., CA - 101



#### 4.2.2 Electrolbresis horizontal en geles de almidón hidrolizado

Esta técnica utiliza el gel de almidón hidrolizado como medio de soporte y de acuerdo a la enzima o proteína que se quiere tipificar, se usan distintas soluciones y tinciones. Con éste tipo de soporte se utilizó un mismo sistema de cámara electroforética y fuente de poder<sup>7</sup>. Además, debido a que se utilizan altos voltajes que pueden producir aumentos de temperaturas, todas las corridas electroforéticas se llevan a cabo dentro de una cámara refrigerada a 5° C. En cada corrida electroforética se agregaron muestras de equinos como controles.

##### 4.2.2.1 Detección de albúmina:

Preparación del gel : Se toman 39 g de almidón hidrolizado y se le agregan 350 ml de buffer (Anexo N° 5). Se mezcla y una vez disuelto el almidón se calienta por 3 minutos aproximadamente, sin dejar de agitar. Luego se vacía en la placa (19 x 20 x 0.6 cm) y se deja enfriar. Si no se usa inmediatamente, se debe guardar en condiciones de humedad y temperatura (28°C) adecuadas, hasta por 3 días.

Siembra de las muestras : Papeles filtros N° 3 de 0.5 por 0.7 cm se embeben con las muestras de suero y se colocan en forma vertical en las ranuras que previamente se le han hecho al gel, en línea recta, a 3 cm y a 8 cm del cátodo. La cantidad de muestras procesadas por corrida electroforética fue de 42.

Una vez realizada la siembra, se llenan los electrodos con la solución buffer para electrodos (Anexo N° 6) (el ánodo se diluye 1 : 2). Posteriormente se une el gel al cátodo y ánodo mediante papel absorbente, los cuales han sido impregnados previamente en la solución buffer para electrodos.

La condición de la corrida electroforética es la siguiente:

- a) Corriente constante a 90 mA lo cual da un voltaje inferior a 300 V.
- b) Duración de aproximadamente 4.5 - 5 horas.
- c) No se sacan los papeles filtros con las muestras.

Una vez transcurrido el tiempo de corrida la placa se retira, se corta el gel, se divide en dos, y la parte inferior del gel se somete a tinción con una solución de Amido black 10 B

---

<sup>7</sup> Electrophoresis Power Supplies, Toyo "Elepos" Series, PS-1 510.

<sup>8</sup> Nk System electric temperatura chamber.

(Anexo N° 7) por 30 minutos a temperatura ambiente; luego se retira el colorante y se le agrega solución de lavado (Anexo N° 8) toda la noche a temperatura ambiente, para posteriormente proceder a la lectura de las bandas.

#### 4.2.2.2 Detección de 6 - fosfogluconato deshidrogenasa:

Preparación del gel : Se procede igual a lo descrito en el punto 4.2.2.1 excepto que se usan 37 g de almidón hidroxilado y 370 ml de buffer para gel (Anexo N° 9).

Siembra de las muestras : Papeles filtros N° 3 de 0.5 por 0.7 cm se embeben con las muestras (solución de ei inocuos hetero! izados ai 50%) y se colocan en posición vertical en las ranuras que previamente se le han hecho al gel, en línea recta, a 5 cm y a 11 cm del cátodo. La cantidad de muestras procesadas por corrida electroforética fue de 42.

La condición de la corrida electroforética es la siguiente:

- a) Solución buffer para electrodos utilizada está descrita en Anexo N° 10.
- b) Voltaje constante a 100 V lo cual da un miliamperaje aproximadamente de 20 - 25 mA.
- c) Los papeles filtros se sacan luego de 60 minutos.
- d) Posteriormente se aumenta a 150 V (30 - 35 mA).
- e) Tiempo de duración aproximadamente 5 horas.

Al finalizar el tiempo de corrida se retira el gel, se corta en dos, y la parte inferior se somete a tinción específica para 6-FGD (Anexo N°11). Posteriormente se procede a la lectura de las bandas.

#### 4.2.2.3 Detección de anhidrasa carbónica y hemoglobina:

Preparación del gel : Se utilizan 50 g de almidón hidroxilado, pero ésta vez se disuelven en gel buffer descrito en el Anexo N° 12, utilizándose una placa de 17 x 25 x 0.6 cm. Luego se procede como lo descrito en el punto anterior, excepto la distancia de inserción de las muestras que es a 6 cm del cátodo. La cantidad de muestras procesadas por corrida electroforética fue de 25.

La condición de la corrida electroforética es la siguiente:

- a) Cubetas de electrodos se llenan con solución para electrodos descrita en el Anexo N° 13.
- b) Voltaje constante a 175 V con un miliamperaje de 45 mA.
- c) Los papeles filtros se sacan 30 minutos después del inicio de la corrida.
- d) Se continúa con 300 V y 30 mA
- e) La corrida electroforética dura 2 - 3 horas.
- f) Cantidad de muestras procesadas por corrida : 25.

Al finalizar el proceso, el gel se corta, se divide en dos, y la parte inferior del gel se somete a tinción específica para anhidrasa carbónica (AC) y hemoglobina (Hb)(Anexo N° 14).

#### 4.3 ANALISIS ESTADISTICO

Para la presentación de los resultados se realizaron cálculos de frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas observadas, absolutas y relativas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 TRUCHA ARCOIRIS

Todas las muestras colectadas (174) fueron tipificadas. De los 7 sistemas que se trataron de identificar, sólo 2 sistemas se encontraron polimórficos (Tf, Al), mientras que de los restantes, 1 se presentó monomórfico (6-PGD) y los otros cuatro no fue posible identificarlos.

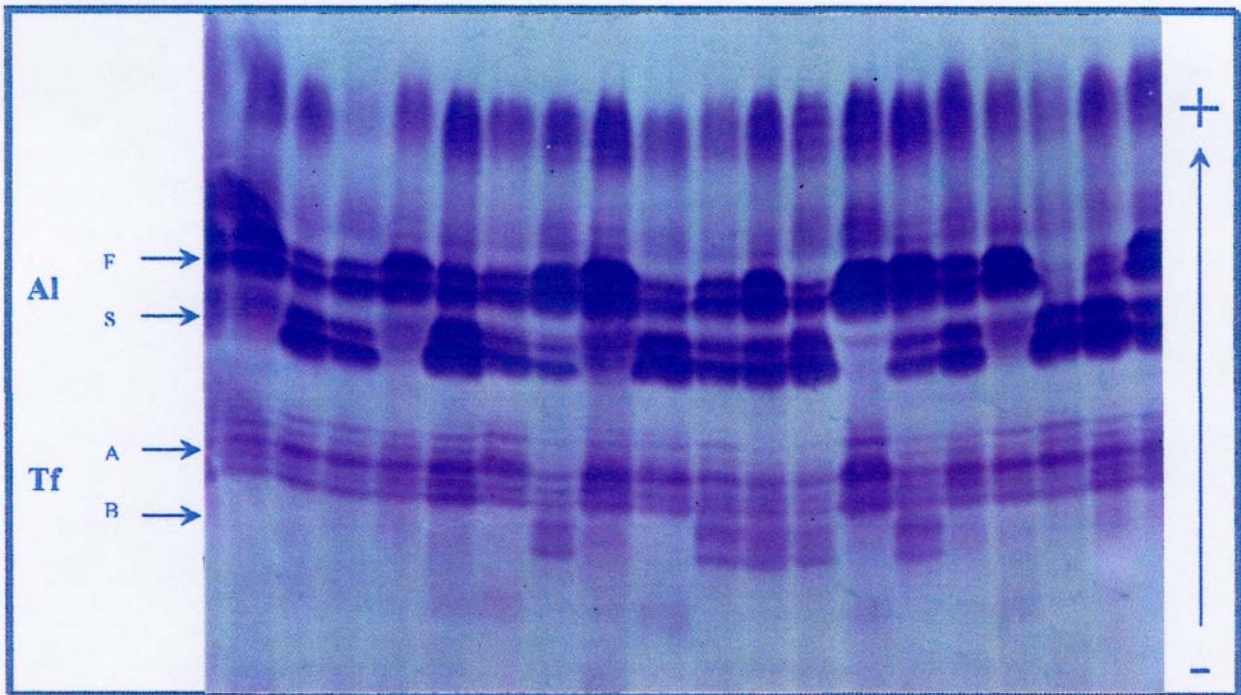
#### 5.1.1 Transferrina

La electroforesis de transferrina, utilizando como medio de soporte poliacrilamida, demostró que *Oncorhynchus mykiss* presenta un patrón de migración anódica, segregando 2 posibles alelos (A, B). A, fue el alelo de migración más rápida. Cada alelo presentó 5 bandas que cuando se expresaron en forma simultánea (heterocigosis) mostraron 8 bandas debido a la superposición de las mismas (Figura N° 2). Se identificaron 2 fenotipos: AA (homocigoto) y AB (heterocigoto).

Las frecuencias genotípicas y alélicas se muestran en la tabla N° 1.

**Tabla N° 1 : Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas observadas en el sistema transferrina de trucha arcoiris.**

	<i>Genotipos</i>			<i>Alelos</i>	
	<b>AA</b>	<b>AB</b>	<b>BB</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Frec. Absoluta</b>	144	30	0	318	30
<b>Frec. Relativa</b>	0.8276	0.1724	0	0.9138	0.0862



**Figura N° 2 : Migración electroforética en el sistema transferrina y albúmina de trucha arcoiris, con los alelos encontrados en gel de poliacrilamida.**

### 5.1.2 Albúmina

Esta proteína muestra la presencia de 2 alelos de migración anódica: F, de migración más rápida y el alelo S, más lento, que se manifiestan en estado homocigoto (FF, SS) y heterocigoto (FS) (Figuras N° 2 y 3). La electroforesis realizada en almidón (Figura N°3), demostró la presencia de una sola banda para cada alelo, mientras que, la realizada con poliacrilamida (Figura N° 2) demuestra la presencia de dos bandas en cada alelo.

Las frecuencias genotípicas y alélicas se muestran en la tabla N°2.

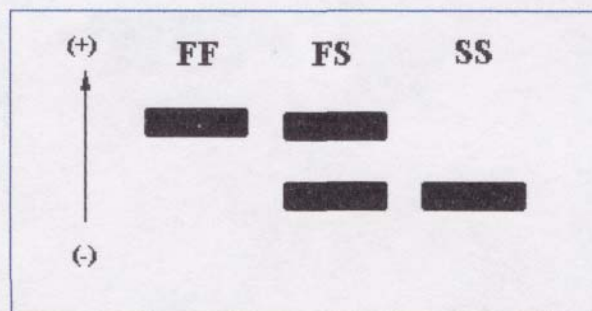


Figura N° 3 : Migración electroforética en el sistema albúmina de trucha arcoiris en gel de almidón hidrolizado.

Tabla N° 2 : Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas observadas en el sistema albúmina de trucha arcoiris.

	<i>Genotipos</i>			<i>Helos</i>	
	<b>FF</b>	<b>FS</b>	<b>SS</b>	<b>F</b>	<b>S</b>
<b>Frec. Absoluta</b>	18	142	14	178	170
<b>Frec. Relativa</b>	0.1034	0.8161	0.0805	0.5115	0.4885

### 5.1.3 6 - Fosfogluconato deshidrogenasa

La electroforesis de 6 - PGD evidenció una banda monomórfica de migración anódica. Cabe hacer notar que sólo se observaron bandas en 50 muestras.

### 5.1.4 Hemoglobina

La electroforesis para la hemoglobina, demostró un patrón de migración catódica, presentando una banda confusa y de difícil lectura.

La lectura de bandas de PGM, AC y Es no fue posible realizarla.

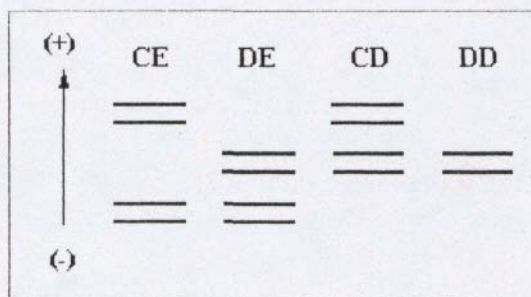
## 5.2 SALMON COHO

Todas las muestras colectadas (116) fueron tipificadas. De los 7 sistemas que se trataron identificar, sólo 1 sistema se encontró polimórfico, mientras que los otros restantes, se determinaron como monomórficos o no se lograron detectar.

### 5.2.1 Transferrina

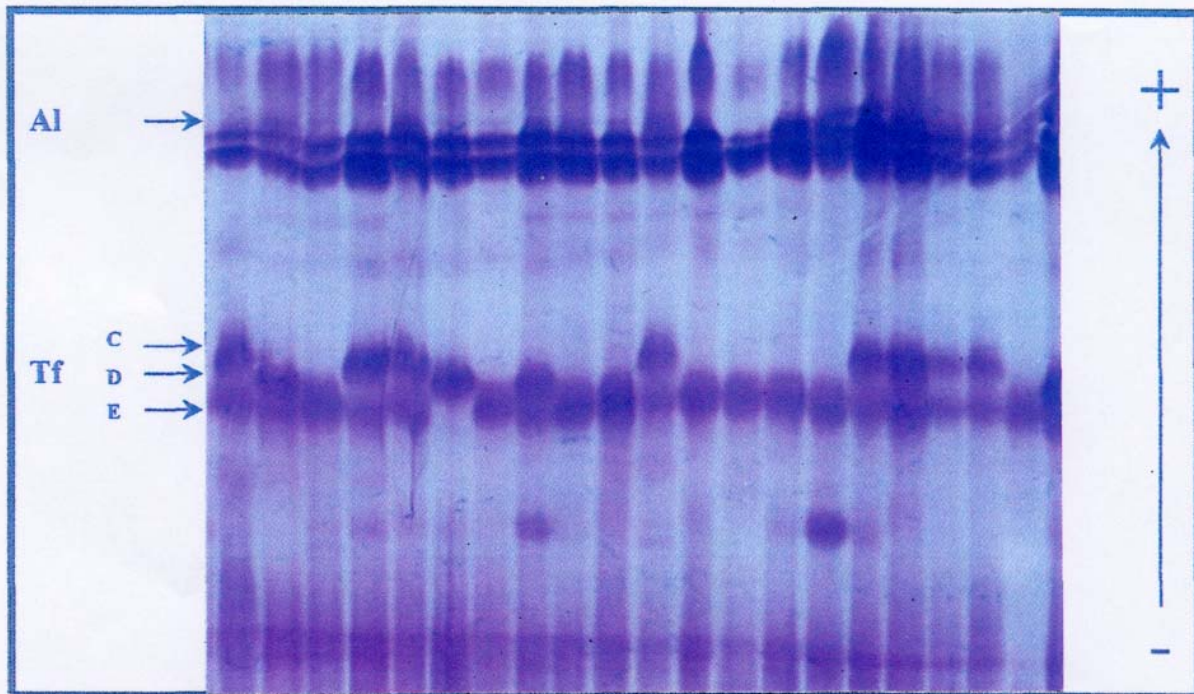
Su comportamiento electroforético para el *Oncorhynchus kisulch* demuestra la presencia de tres alelos (C, D, E), que se manifiestan en estado de heterocigoto (CE, CD, DE) y homocigoto (DD), en las poblaciones estudiadas. Cada alelo estaba formado por 2 bandas de migración anódica (Figuras N° 4 y 5).

Las frecuencias genotípicas y alélicas se muestran en la tabla N° 3.



**Figura N° 4 : Diagrama de bandas en el sistema transferrina de salmón Coho en geles de poliacrilamida.**





**Figura N° 5 : Migración electroforética en el sistema transferrina y albúmina de salmón Coho, con los alelos encontrados en gel de poliacrilamida.**

**Tabla N° 3 : Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas observadas en el sistema transferrina de salmón Coho.**

	<i>Genotipos</i>						<i>Alelos</i>		
	CC	CD	CE	DD	DE	EE	C	D	E
<b>Frec. Absoluta</b>	0	8	37	2	59	0	45	71	96
<b>Frec. Relativa</b>	0	0.0755	0.3491	0.0189	0.5565	0	0.2123	0.3349	0.4528

### 5.2.2 Albúmina

Esta proteína evidenció un sólo alelo de carácter monomórfico de migración anódica. En el gel de poliacrilamida reveló la presencia de 2 bandas (Figura N° 5) y en el gel de almidón sólo una banda.



### 5.2.3 Hemoglobina

Presentó un patrón de migración catódica.

La lectura de bandas de 6-PGD, PGM, AC, Es; no fue posible realizarla.

## 5.3 SALMON DEL ATLANTICO

Se tipificaron 320 muestras. De los 7 sistemas que se trataron identificar, sólo 1 sistema se encontró polimórfico (Tf), mientras que los otros restantes, se determinaron como monomórficos o no se lograron detectar.

### 5.3.1 Transferrina

El polimorfismo de la transferrina para el *Salmo salar* presenta un comportamiento electroforético de migración anódica que demuestra la presencia de 7 alelos (A, B, C, D, E, F, G), que se manifiestan en estado de homocigoto (AA, BB, CC, DD, EE, FF, GG) y heterocigoto (MI, AG, BC, BD, CF) en las poblaciones en estudio (Figuras N° 6 y 7). Cada alelo presentó un patrón de banda doble.

Las frecuencias genotípicas y alélicas se muestran en la tabla N° 4 y 5 respectivamente.

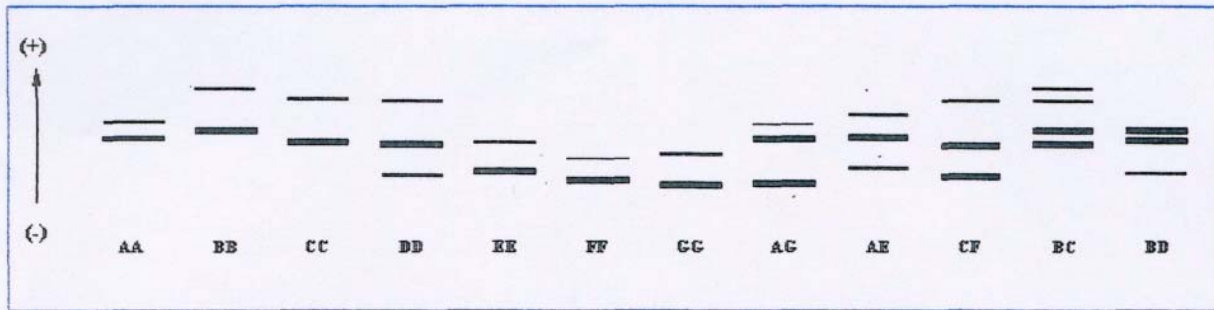


Figura N° 6: Diagrama de bandas en el sistema transferrina en geles de poliacrilamida para salmón del Atlántico.

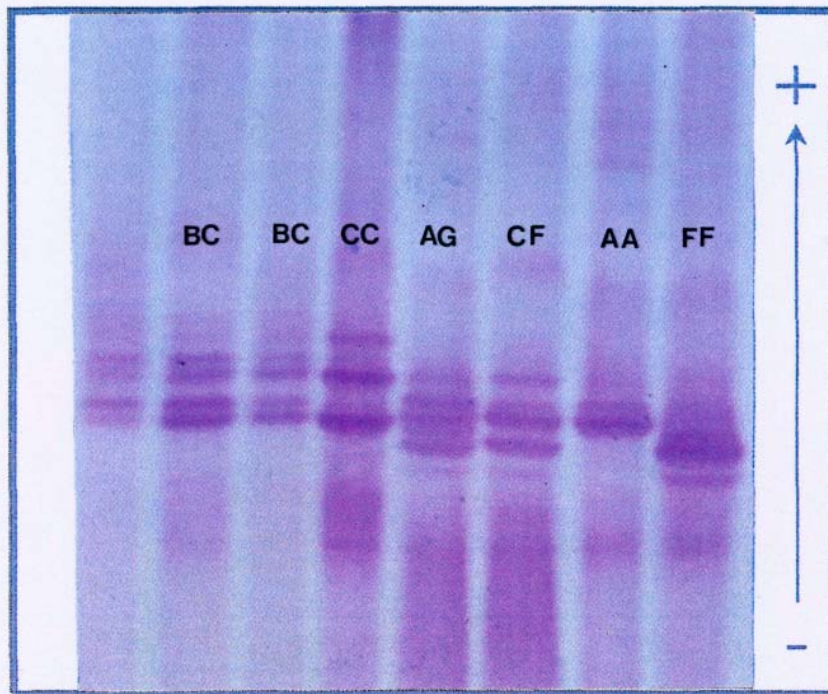


Figura N° 7: Algunos genotipos encontrados en el sistema transferrina en geles de poliacrilamida para salmón del Atlántico.

**Tabla N° 4: Distribución de frecuencias genotípicas observadas en el sistema transferrina en salmón del Atlántico.**

<i>Frecuencias genotípicas observadas</i>		
<b>Fenotipo</b>	<b>Absoluta</b>	<b>Relativa</b>
<b>AE</b>	1	0.0031
<b>AG</b>	1	0.0031
<b>BC</b>	3	0.0095
<b>BD</b>	21	0.0656
<b>CF</b>	5	0.0156
<b>AA</b>	1	0.0031
<b>BB</b>	3	0.0095
<b>CC</b>	1	0.0031
<b>DD</b>	5	0.0156
<b>EE</b>	276	0.8625
<b>FF</b>	1	0.0031
<b>GG</b>	2	0.0063

**Tabla N° 5: Distribución de frecuencias alélicas observadas en el sistema transferrina en salmón del Atlántico.**

<i>frecuencias alélicas observadas</i>		
<b>Alelo</b>	Absoluta	Relativa
<b>A</b>	4	0.0064
<b>B</b>	30	0.0468
<b>C</b>	10	0.0156
<b>D</b>	31	0.0484
<b>E</b>	553	0.8640
<b>F</b>	7	0.0110
<b>G</b>	5	0.0078

### 5.3.2 Albúmina

Esta proteína evidenció un sólo alelo de carácter monomórfico de migración anódica. Tanto en el gel de poliacrilamida, como en el gel de almidón, se reveló la presencia de 1 banda.

### 5.3.3 Hemoglobina

Presentó un patrón de migración catódica.

La lectura de bandas de 6-PGD, PGM, AC, Es; no fue posible realizarla.

## 6. DISCUSION

Se estudiaron siete proteínas y enzimas sanguíneas, tanto séricas como eritrocitarias en salmonídeos de cultivo: trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Fueron escogidas esas especies de salmonídeos, debido a que representan las especies de mayor importancia productiva y económica en las pisciculturas del país.

El número de muestras utilizadas (610), fue establecido en base a la posibilidad de obtención y por razones prácticas de trabajo en laboratorio.

El tipo de muestra utilizada, sangre; se escogió debido a que las técnicas a utilizar estaban montadas para ser utilizadas con muestras de sangre y por lo fácil y bajo costo de su obtención. Se debe tener en cuenta la relación que hay entre el tipo de muestra utilizada y el marcador genético que se quiera detectar, ya que algunos autores utilizan para detectar algunos polimorfismos, extractos de músculo esquelético o de hígado entre otros tipos de muestra, obteniendo buenos resultados.

Se aplicaron dos métodos de electroforesis horizontal (almidón hidrolizado y poliacrilamida). Estas técnicas son usadas en el laboratorio de grupos sanguíneos, Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile, aplicadas a bovinos y equinos aunque, también utilizadas en camélidos. Estos métodos no fueron adaptados ni modificados para ser usadas en el trabajo con salmonídeos, ya que uno de los objetivos de este trabajo fue establecer si las técnicas utilizadas para la tipificación sanguínea en bovinos y equinos eran útiles en peces.

La técnica de electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida resulta un método eficiente para la diferenciación de especies de salmonídeos. Entre las principales ventajas de estos geles están: se puede controlar el tamaño de los poros, disminuyen los procesos de difusión, no poseen grupos ionisables que provoquen fenómenos de electroosmosis, su consistencia permite manipularlos sin dificultad, son termoestables y transparentes (Gerver y col., 1977). Se pudo constatar que el patrón de migración electroforética en las 3 especies era diferente. No ocurre lo mismo con las técnicas utilizadas para geles de almidón, en que es muy difícil discriminar de que especie de pez se trata.

La técnica que utiliza geles de poliacrilamida entrega una alta resolución de bandas y permite la identificación de distintos polimorfismos en bovinos y equinos. En el caso de los salmonídeos se pudo identificar claramente los sistemas albúmina (Al) y transferrina (Tf), para las tres especies. También con esta técnica es posible la identificación de esterasas (Es), pero en salmonídeos la técnica no presenta una buena resolución de bandas, por lo cual fue imposible hacer la tipificación.

Con el gel de almidón se pueden detectar una gran cantidad de proteínas y enzimas. En el presente trabajo se trató de detectar Al, Hb, AC, PGM y 6-PGD, obteniendo resultados positivos para el caso de Al y 6 PGD. En algunos casos no fue posible llegar a resultados concretos en la identificación de enzimas, lo cual podría deberse a que el método no discrimina suficientemente para ese caso en particular o puede haber ocurrido algún fenómeno de destrucción enzimática en el proceso de almacenaje de las muestras, en que puede haber influido la temperatura utilizada (-20°C). Una temperatura óptima para el almacenaje sería superior a 25°C.

Para el sistema Al, es posible realizar la lectura de las bandas tanto en geles de poliacrilamida como en almidón, aunque se optó por el último método para realizar la tipificación, por ser una técnica más específica para dicha proteína. Se recurrió al gel de poliacrilamida sólo para confirmar los resultados en las muestras que no presentaban bandas muy bien definidas.

## 6.1 SISTEMAS POLIMORFICOS

Dos sistemas, Tf y Al mostraron polimorfismo en trucha arcoiris, mientras que en las muestras de salmón Coho y salmón del Atlántico sólo Tf se mostró polimórfica.

### 6.1.1 Sistema transferrina

En las tres especies se presenta como un polimorfismo bioquímico de migración anódica más lenta que el sistema albúmina en geles de poliacrilamida.

Para el caso de trucha arcoiris se logró identificar 2 alelos (A y B), los cuales, controlan la presentación de tres fenotipos (AA, AB, BB). El alelo A, se encontró en estado de homocigosis. Sólo dos fenotipos se identificaron claramente (AA, AB). No se encontró homocigotos para el tipo lento (B) de Tf, lo que probablemente se deba al tamaño de la muestra (Figura N°2).

En el salmón Coho se lograron identificar 3 alelos: C, D, E, con frecuencias de 0.2123, 0.3349 y 0.4528 respectivamente, lo que es similar a lo descrito por Utter y col. en 1970. Sólo se identificó el alelo D en estado de homocigoto, mientras que los alelos C y E se manifestaron en estado de heterocigoto, presentándose sólo 4 fenotipos (CD, CE, DD, DE) de los 6 posibles (Figuras N° 4 y 5).

*Salmo salar* fue el que mayor polimorfismo demostró para este sistema. Se encontró la presencia de 7 alelos: A, B, C, D, E, F, G (Figura N° 6) a diferencia de lo encontrado por Payne y col. (1971), que sólo describen 4 alelos para el sistema transferrina en salmón del Atlántico. Esto puede deberse a que Payne y col. (1971), trabajaron en una comparación de 2 poblaciones de diferentes orígenes y en el presente estudio las muestras para *Salmo salar* provenían de al menos 4 orígenes y variedades diferentes. Destaca el genotipo EE con una frecuencia genotípica de 0.8625 (Tabla N° 4). Las muestras con ese genotipo provenían de una piscicultura, con lo que podría relacionarse origen de las muestras con genotipo encontrado. La mayor variabilidad de *Salmo salar*, respecto a las otras 2 especies podría explicarse por los diversos orígenes del Salmón del atlántico (provenientes de distintos países europeos), a diferencia de Salmón coho que nuestro país se abastece básicamente de ovas de Estados Unidos y de producción nacional.

#### 6.1.2 Sistema albúmina

Sólo en trucha arcoiris el sistema albúmina presenta un carácter polimórfico. Se identificaron 2 alelos, F y S, los cuales controlan la presentación de tres fenotipos: FF, SS y FS. Las bandas en geles de poliacrilamida fueron las que migraron más anódicamente, mostrándose por delante de las bandas de Tf. Los tres fenotipos, fueron identificados claramente y coinciden con lo descrito por Diebig y col. en 1979.

Las frecuencias alélicas en este sistema registraron valores de 0.5115 y 0.4885 para los alelos F y S respectivamente (Tabla N° 2), lo que coincide en general, con lo reportado por otros autores (Diebig y col., 1979), en el sentido de que el alelo F, posee una mayor frecuencia que S.

#### 6.2 SISTEMAS MONOMORFICOS

De los 7 sistemas estudiados, Al, sólo se mostró monomórfica en salmón del atlántico y salmón coho, mientras que 6-PGD se mostró monomórfica en trucha arcoiris, y en las otras especies no fue posible realizar la tipificación.

### 6.2.1 Sistema Albúmina

Se encontró un alelo monomórfico compuesto de 1 banda en geles de almidón, tanto para salmón Coho como para salmón del Atlántico. En geles de poliacrilamida salmón Coho demostró que el alelo monomórfico presentaba 2 bandas, mientras que para *Salmo salar* sólo presentaba una banda.

### 6.2.2 6 - Fosfogluconato deshidrogenasa

No se evidenció polimorfismo para 6-PGD en trucha arcoiris, lo que coincide con lo descrito por Diebig y col. en 1979. Del total de muestras de trucha arcoiris, sólo se tipificaron 50, debido a que eran las muestras de menor tiempo de almacenaje y aún era posible detectar la enzima. Se detectó una banda de migración anódica. 6-PGD no fue posible detectarla en salmón Coho y *Salmo salar* por que la enzima posiblemente sufrió un proceso de destrucción.

En los demás sistemas (PGM, Es, Hb, AC), no fue posible su identificación.

Para el caso de PGM, la enzima probablemente se inactivo por lo que fue imposible realizar la tipificación. Diversos autores describen para trucha arcoiris, utilizando muestras de músculo esquelético, que esta enzima se presenta como polimórfica, presentando 3 fenotipos electroforéticos (FF, FS, SS) controlados por 2 alelos (F, S) (Roberts y col., 1969, Op't Hof y col., 1982).

Como ya se expuso anteriormente, Es se detecta fácilmente en geles de poliacrilamida en equinos, pero en el caso de salmonídeos sólo se observa una mancha uniforme imposible de diferenciar.

Hb, tampoco se detectó debido a que presentaba un patrón de migración catódica y sin una definición clara de bandas.

En el caso de AC puede deberse al tipo de muestra (solución de eritrocitos hemolizados) y la técnica utilizada, ya que Diebig y col. en 1979, utilizaron muestras de hígado para separar la enzima y lograron identificarla, la cual presentaba 3 fenotipos electroforéticos (AA, AB, BB), controlados por dos alelos (A, B). También determinaron que, por la gran intensidad de expresión que tenían las bandas, indicaría una alta actividad de la enzima, permitiendo que las muestras puedan ser separadas, luego de un año de estar almacenadas. Esto podría descartar en nuestro caso una inactivación de la en/ima como causa



de no poder ser tipificada, siendo posible explicarlo por las condiciones de la técnica, que pueden no ser las óptimas para ese caso en particular.

En el caso de los sistemas AC y Hb se trató de detectar tanto con técnicas específicas para bovinos como también para equinos, sin que con ninguno de los dos se llegara a resultados satisfactorios. Esto nos podría señalar que para estos sistemas las técnicas no son adecuadas y habría que adaptarlas para su uso específico en peces.

En cuanto a la procedencia de las muestras, no se evidenció una clara diferencia respecto de donde provenían y los resultados electroforéticos. Sólo destacan las muestras de *Salmo salar* provenientes de una piscicultura determinada en que presentan una gran similitud en el marcador transferrina (homocigosis), respecto a otras muestras tomadas en pisciculturas con peces de otros orígenes. No ocurre lo mismo con salmo Coho y trucha arcoiris en que peces provenientes de los mismos lugares presentaban una diferencia notoria. Es recomendable, para un trabajo posterior diseñar un estudio de procedencia de los peces, ya que hay alguna evidencia de relación entre lugar de obtención de las muestras y polimorfismos encontrados.

En aquellos casos en que no fue posible la detección de algunos sistemas analizados sería adecuado efectuar mayores estudios referentes a las condiciones usadas en la electroforesis y por otra parte se deberá tener precauciones en relación a la integridad enzimática.

Es importante conocer la estructura genética y grados de parentesco entre las especies y sus distintas variedades en salmonídeos, ya que conociendo el genotipo del individuo o la población y su relación con ciertos aspectos productivos (eficiencia de conversión de alimento, mejor asimilación de pigmentos), se puede seleccionar aquellos que presenten las mejores características. Un punto importante es el demostrado por algunos autores como Suzumoto y col. (1977) y Winter y col (1980), en que observaron que un determinado genotipo del sistema Tf de *Oncorhynchus kisutch* y de *Oncorhynchus mykiss* era menos susceptible a la enfermedad bacteriana del riñón (BKD), que los otros 2 genotipos estudiados.

Además, el conocimiento de éstos marcadores genéticos puede tener importancia biológica por un lado, ya que podría ayudar a aumentar la eficiencia productiva y resistencia a enfermedades, y práctica por otro, ya que, por ejemplo, podría ayudar a resolver el conflicto que hoy sostienen salmicultores y pescadores artesanales sobre el derecho a pescar fuera de las concesiones de aguas, salmones provenientes de escapes de centros de cultivo, ya que aún

no es posible diferenciar un salmón silvestre de uno cultivado, por lo tanto no se puede determinar su propiedad.

### 6.3 CONCLUSIONES

- Las técnicas electrofóreticas utilizadas en la tipificación sanguínea en equinos y bovinos, se mostraron útiles para la determinación de marcadores genéticos en especies salmonídeas.
- Fue posible observar claros polimorfismos en los sistemas Tf, en las tres especies estudiadas y en el sistema Al sólo en trucha arcoiris.
- Utilizando geles de poliacrilamida es posible diferenciar especies de salmonídeos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AQUANOTICIAS INTERNACIONAL. 1997. Ovas: Producción nacional gana terreno. Fundación Chile. 8: 6-15.
- ARIZA, A. 1979. Las transferrinas como marcadores genéticos en caballos. *Arch. Zoot.* 28: 51-58.
- CASTAGNINO, J. 1968. Electroforesis. Aplicaciones biológicas y clínicas. Universitaria. Buenos Aires.
- DIEBIG, E., J.N. MEYER, P. GLODEK. 1979. Biochemical polymorphisms in muscle and liver extracts and in the serum of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.* 10: 165-174.
- GAHNE, B., J. RENDEL, O. VENGE. 1960. Inheritance of (-glubulins in serum and milk of cattle. *Nature.* 186:907-908.
- GERVEY, J., N. CREMER, D. SUSSDORF. 1977. Methods in Immunology. 3th Edition, W.A. Benjamin, Inc. Massachusetts.
- GOMBOCZ, CORTEZ. 1995. Appl. Theor. Electrophoresis. 4: 197-209.
- HYSLOP, N. 1972. Application of an improved system of electrophoresis in acrylamide gel to studies on the sera of different species. *J. Clin. Pathol.* 25: 508-511.
- KRISTJANSSON, F. K. 1963. Genetic control of two prealbumins in pigs. *Genetics.* 48: 1059-1063.
- MENDEZ, R. 1985. El salmón del Pacífico. ¿Una nueva pesquería en Chile?. Chile pesquero. 33: 18-22.
- MENDEZ, R. 1997. La acuicultura a tres lustros de su partida. *Aquanoticias Internsional.* 8:21-33.
- MENDEZ R., C. MUNITA. 1989. La salmonicultura en Chile. Fundación Chile.
- MITAT, J. 1985. Inmunogenética animal. Editorial Científico-Técnica. Cuba

- OPT HOF, J., S.M. SCHOEMAN, L LE GRANGE, D.R. OSTERHOFF. 1982. Biochemical polymorphisms in South African freshwater fish. Isoenzyme patterns in fish of the families Cyprinidae and Salinonidae. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.* 13: 1-9.
- PAYNE, R.H., A. R. CHILE), A. FORRES!. 1971. Geographical Variation in the Atlantic Salmón. *Nature.* 231 : 250-252.
- ROBERTS, F.L., J.F. WOHNUS, S. OHNO. 1969. Phosphoglucomutase polymorphism in the rainbow trout. *Experienta.* 25 : 1109-1110.
- SANDBERG, K., S. BENGTSÖN. 1970. Polimorphism of hemoglobin and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in Horse Erythrocytes. En: Proc. XII Europ. Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorph. Budapest, Bulgaria, pp. 527-531.
- SARTORE, G., C. STORMONT, B. MORRIS, A. GRUNDER. 1969. Múltiple electrophoretic fornis of carbonic anhidrase in red cells of domestics cattle (*Bos Taurus*) and American Buffalo (*Bison Bison*). *Genetics.* 61:48-49.
- SCOTT, A. 1970. Improved separation of polymorphic esterases in horses. En: Proc. XII Europ. Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorph. Budapest, Bulgaria, pp. 551-553.
- STORMONT. C., Y. SUZUKI. 1964. Paternity tests in horses. En: Ninth European Conference of Animal Blood Groups. Prague, Checoslovaquia pp. 365-377
- SUZUMOTO, B. K., C.B. SCHRECK, J. D. MCINTYRE. 1977. Relative resistances of three transferrin genotypes of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. *J. Fish. Res. Board Canada.* 34: 1-8.
- UTTER, F. M., W. E, AMES, H. O. HODGINS. 1970. Transferrin polymorphism in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Canada.* 22: 2371-2373.
- YOKOHAMA, M., H. WATANABE, H. GAWAHARA, E. KOBAYASHI. 1987. Horizontal polyacrilamide gel electrophoresis for equine serum protein types. ABRI. 3: 11-21.
- WINTER, G.. C. SCHRECK, J. MCINTYRE. 1980. Resistance of different stocks and transferrin genotypes of Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, and steelhead trout, *Salmo gairdneri*, to bacterial kidney disease and vibriosis. *Fishery Bulletin.* 77: 795-802.

## 8. ANEXOS

### ANEXO N° 1

Número de muestras obtenidas por especie y lugar de procedencia.

ORIGEN	N° MUESTRAS OBTENIDAS POR ESPECIE		
	Trucha Arcoiris	Salmón coho	Salmón del atlántico
AQUASUR	137	89	0
LA CASCADA	7	0	0
BEST SALMON	5	3	5
MARES AUSTRALES	5	4	5
MARINE HARVEST	0	0	276
EICOSAL	0	10	0
SALMO AMERICA	0	0	14
CHISAL	0	0	10
UNIMARC	5	10	0
PACIFIC STAR	5	0	5
PACIFICO SUR	10	0	5
<b>Total</b>	<b>174</b>	<b>116</b>	<b>320</b>

### ANEXO N° 2

Solución buffer electrodos para electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida:

Tris	8g	
Acido bórico <sup>9</sup>	2 g	
Agua destilada	1000 ml	(pH 9.0).

<sup>9</sup> Merck A.G., Darmstadt

### ANEXO N° 3

Soluciones de tinción de esterasas y azul brillante de Coomasie para geles de poliacrilamida:

Tinción de esterasas :	0.19 M Tris (23g / 1 litro)	: 150 ml
	0.5 M Ac. cítrico (10.5 g/ 1 litro)	: 200 ml
	1% Naftil acetato <sup>10</sup> (80 mg / 8 ml Acetona)	: 8 ml
	Fast blue BB salt <sup>11</sup>	: 30 mg

Teñir pocos minutos y lavar con agua destilada.

Tinción de proteínas :	Coomasie B.B.R. <sup>12</sup>	: 2g
	Agua destilada	: 1500 ml

Mezclar 2 horas, adicionar lentamente 60 ml de ácido perclórico 60%, mezclar 2 horas más, filtrar y llevar a 1 litro. Teñir 20 minutos a t° ambiente.

### ANEXO N° 4

Solución decolorante para geles de poliacrilamida:

Metanol <sup>13</sup>	: 200 ml
Ac. acético	: 70 ml

Enrasar a 1 litro con agua destilada.

### ANEXO N° 5

Gel buffer para confección de gel de almidón hidrolizado.

Buffer electrodos (Anexo N° 6)	: 44 ml
Agua destilada	: <u>306 ml</u>
	350 ml

<sup>10</sup> Wako pure chemical industries, Ltd.

<sup>11</sup> Sigma.

<sup>12</sup> Fluka AG CH-9470 Buchs.

<sup>13</sup> Merck. A.G., Darmstadt.

## ANEXO N° 6

Solución buffet electrodos para detección de albúmina:

Acetato de sodio trihidratado <sup>14</sup>	:17.01 g
Acido etilendiaminotetraacético (EDTA sin sodio) <sup>15</sup>	: 2.48 g

Enrasar a 1 litro con agua destilada. pH : 5.4 (No es necesario ajustar)

## ANEXO N° 7

Solución de tinción para albúmina, Amido black 10 B:

- Amido black 10 B<sup>13</sup>: 5 g + 10 ml de agua destilada.
- Enrasar a 5 litros con solución de lavado (Anexo N° 8).
- Mezclar 2 - 3 horas.

## ANEXO N° 8

Solución de lavado para tinción de albúmina:

Metanol : agua : ácido acético (5:5:1).

## ANEXO N° 9

Buffer para confección de gel de almidón hidrolizado: 6 fosfogluconatodeshidrogenasa (6-PGD):

Buffer electrodos (Anexo N° 9)	: 66.7 ml
Agua destilada	:1000 ml

---

<sup>14</sup> Wako pure chemical industries, Ltd.

<sup>15</sup> Fluka AG CH-9470 Buchs.

## ANEXO N° 10

Solución Buffer electrodos para detección de 6 - fosfogluconatodeshidrogenasa (6-PGD):

Tris : 16.35g  
Acido cítrico : 9.04 g

Enrasar a 1 litro con agua destilada. pH : 7.0

## ANEXO N° 11

Método de tinción para detección de 6 - fosfogluconatodeshidrogenasa (6-PGD):

a) Solución Tris 0.1 M

Tris : 12.1 g  
MgCl x 6 H<sub>2</sub>O<sup>16</sup> : 10 g  
1 N HCl<sup>17</sup> : 65 ml

Enrasara 1 litro con agua destilada.

b) Solución de agar

0.1 M Tris : 24ml  
Agar<sup>18</sup> : 0.24g

Esta solución se calienta hasta que se solubiliza, luego se deja en baño maría a 50 °C por 30 minutos. Se comienza a preparar antes de cortar el gel.

---

<sup>16</sup> Wako pure chemical industries, Ltd

<sup>17</sup> Reactivos limitada

<sup>18</sup> Bacto - Agar. Difco laboratories. Detroit, Michigan, U.S. A.



Posteriormente se pesan los reactivos que se indican a continuación y se le agrega la solución Tris 0.1 M (cantidad indicada en el cuadro), según si se va a teñir un gel o dos.

<b>Reactivo</b>	<b>Un gel</b>	<b>Placa doble</b>
NADP (TPN) <sup>19</sup>	2 mg/2 ml	4 mg/4 ml
MTT <sup>20</sup>	4 mg/2 ml	8 mg / 4 ml
PMS <sup>21</sup>	3 mg/ 2 ml	6 mg/4 ml
6 - PG <sup>22</sup>	10 mg/2 ml	10 mg/4 ml

#### Procedimiento para tinción

Una vez cortado el gel se mezcla la solución agar más los 4 reactivos, en un mismo matraz y se deposita sobre el gel; todo esto se realiza en la misma placa. Se lleva a estufa a 37°C, por un período de 30 minutos, al cabo de los cuales se procede a la lectura de las bandas.

#### ANEXO N° 12

Gel buffer para confección de gel de almidón hidrolizado. Detección de anhidrasa carbónica (CA) y hemoglobina (Hb):

Tris : 1.74 g  
 Acido cítrico : 0.88 g

Enrasar a 1 litro con agua destilada

#### ANEXO N° 13

Solución Buffer electrodos para detección de anhidrasa carbónica (CA) y hemoglobina (Hb):

Acido bórico 37.14 g  
 Hidróxido de sodio 8 g

Enrasar a 2 litros con agua destilada.

<sup>19</sup> β - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate N-5755. Sigms

<sup>20</sup> (3- [4,5 - Dimethylthiazol - 2 - YL] - 2,5 - Diphenyltetrazolium bromide) Approx. 98%(TLC). M-2128. Sigma.

<sup>21</sup> Phenazine methosulfate P-9625 Sigma.

<sup>22</sup> 6 - Phosphogluconic acid (Barium salt Grade II).P-7627.Sigma.

## ANEXO N° 14

Método de tinción y decoloración para anhidrasa carbónica (CA) y hemoglobina (Hb):

a) Solución de tinción

0.1% Coomasie brillant blue - R, diluido en la solución de lavado (Anexo N° 8).

Teñir por 30 minutos.

b) Decoloración

Agregar solución de lavado y dejarla por 3 horas, reemplazar por agua y guardar toda la noche.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer sinceramente a:

Mi profesor patrocinante, Dr. Jorge Oltra, por su apoyo, confianza y preocupación.

Dr. Manuel Ortíz, por su gran colaboración en la parte práctica y consejos.

Dr. Ricardo Enríquez, Dr. Alejandro Rojas y Dr. Mauro Araneda, por las facilidades otorgadas en la obtención de muestras.

Sra. Elizabeth Stange y Sra. Nora Barrientes, por su ayuda y buena voluntad de siempre.

Macarena Rioseco y Alejandro González, por su ayuda en la recolección de muestras.

El personal administrativo y técnico del Centro de Inseminación Artificial.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de esta tesis.