

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJERCITO  
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
“GRAD. CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”**

**“OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION  
DE ADN EN LAS ESPECIES *Oncorhynchus mykiss* Y  
*Astroblepus ubidiai* Y SU CUANTIFICACION CON TECNICAS  
MOLECULARES PARA LA ACUICULTURA”**

**ALFREDO XAVIER DAVILA CEVALLOS**

**JENNY ELIZABETH GARCES ACOSTA**

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACION PRESENTADO COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO  
AGROPECUARIO**

**SANGOLQUÍ - ECUADOR**

**2007**

I.A.S.A.

**“OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION  
DE ADN EN LAS ESPECIES *Oncorhynchus mykiss* Y  
*Astroblepus ubidiai* Y SU CUANTIFICACION CON TECNICAS  
MOLECULARES PARA LA ACUICULTURA”**

**2007**

# CERTIFICACIÓN

DIRECTOR DE TESIS  
Ing. M. Sc. Juan Ortiz

CODIRECTOR DE TESIS  
Dr. Darwin Rueda

## CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación titulado “**OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION DE ADN EN LAS ESPECIES *Oncorhynchus mykiss* Y *Astroblepus ubidiai* Y SU CUANTIFICACION CON TECNICAS MOLECULARES PARA LA ACUICULTURA**” y realizado por los Sr(s) **Alfredo Xavier Dávila Cevallos** y **Jenny Elizabeth Garcés Acosta**, ha sido elaborado prolijamente y cumple con los requerimientos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la ESPE, por lo que nos permitimos acreditarlos y autorizar a los Sr(s) **Alfredo Xavier Dávila Cevallos** y **Jenny Elizabeth Garcés Acosta** para que lo sustenten públicamente.

DIRECTOR  
Ing. M. Sc. Juan Ortiz

CODIRECTOR  
Dr. Darwin Rueda

Sangolquí, Julio del 2007

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme la fortaleza y el carácter para concluir este trabajo.

A mi padre, que estuvo todo éste tiempo a mi lado guiándome.

A mi madre, a quien le debo la vida y el ejemplo de vivirla con coraje y valor. Ninguna otra persona conocí con semejante temple.

A mi hermana, quien es mi amiga y me apoyó incondicionalmente.

**Alfredo Dávila Cevallos**

## **DEDICATORIA**

Dedico mi esfuerzo y trabajo a toda la gente que me ha visto crecer, a mi familia que me ha prodigado un hogar feliz, a mis amigos que han llenado mi mundo con detalles e instantes eternos de vida, de sonrisas, de palabras que colman el alma cuando son sinceras. Este logro es para ti mami, papi, Gioco, abuelito Gerardo.

A mi querido Marito, me siento muy complacida por compartir mis días contigo, gracias por ser el soporte moral en mi vida, por acompañarme en los buenos y malos momentos.

**GET**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por concederme la fuerza que me permitió sumar un escalón más en mi vida.

A mi madre y hermana que estuvieron en el preciso momento para aconsejarme y apoyarme.

Al Dr. Marcelo Muñoz y a todo el personal de la ESPOLE que me brindó su apoyo y conocimiento.

Al Dr. Franklin Pérez y al personal de lab One, que supieron brindarme su experiencia y amistad.

A Alejandra Valladares, quien puso un granito de arena para que este proyecto concluyera satisfactoriamente.

A Natalia Erazo, por su acertada participación y colaboración para el desarrollo de esta investigación.

A Jessie por su colaboración desinteresada.

Al Ing. Oleas, excelente profesional y maravillosa persona.

A Juan Giacometti por brindarme su ayuda y participar activamente en esta investigación.

A todas las personas que de alguna u otra manera apoyaron la ejecución de este proyecto.

A mis verdaderos amigos, quienes me brindaron su apoyo en todo momento.

**Alfredo Dávila Cevallos**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco infinitamente el amor providencial y paternal de mi Dios, el constante apoyo de mi familia para alcanzar mis sueños, a mi abuelito por procurarme siempre bienestar y felicidad, a mi mami por ser mi estímulo diario y representante de lo divino en esta tierra, a mi papi por velar incansable e inagotablemente por mi educación, a mi hermana por tenerme como su ejemplo y ser mi silenciosa compañera.

No puedo dejarles a un lado a mis amigos que han sido parte importante no solo en la época de la universidad sino de mi vida entera: Belén, José Eduardo, Mishelle, María José, Carmita, Adriana, Dieguito Pa, José Luis, David, Daniel, Xavier, Diego Cedeño, José Proaño, gracias por compartir esos momentos especiales.

Gracias a personas como Ing. Ortiz, Dr. Rueda, Dr. Muñoz, Juan Giacometti, Natalia Erazo, Dr. Barriga se ha podido culminar este proyecto. En cada párrafo de este texto están plasmados sus conocimientos y sus experiencias que han sido de gran ayuda.

**GET**

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR:**

**DAVILA CEVALLOS ALFREDO XAVIER  
GARCES ACOSTA JENNY ELIZABETH**

**DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**CRNL. ESP. RONALD RUNRUIL**

**AB. CARLOS OROZCO  
SECRETARIO ACADÉMICO**

*Sangolquí, Julio del 2007*



**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A.**

**“OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION DE ADN EN LAS  
ESPECIES *Oncorhynchus mykiss* Y *Astroblepus ubidiai*, Y SU  
CUANTIFICACION CON TECNICAS MOLECULARES PARA LA  
ACUICULTURA”**

**DAVILA CEVALLOS ALFREDO XAVIER  
GARCES ACOSTA JENNY ELIZABETH**

**2007**

**IX**

I.A.S.A.

**“OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION DE ADN EN  
LAS ESPECIES *Oncorhynchus mykiss* Y *Astroblepus ubidiai* Y SU  
CUANTIFICACION CON TECNICAS MOLECULARES PARA LA  
ACUICULTURA”**

2007

X

**“OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION  
DE ADN EN LAS ESPECIES *Oncorhynchus mykiss* Y  
*Astroblepus ubidiai* Y SU CUANTIFICACION CON TECNICAS  
MOLECULARES PARA LA ACUICULTURA”**

DAVILA CEVALLOS ALFREDO XAVIER  
GARCES ACOSTA JENNY ELIZABETH

REVISADO Y APROBADO

---

Ing. M.Sc. Norman Soria  
COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS

---

Ing. M.Sc. Juan Ortiz  
DIRECTOR INVESTIGACION

---

Dr. Darwin Rueda  
CODIRECTOR INVESTIGACION

---

Ing. Marco Luna  
BIOMETRISTA

CERTIFICO QUE ESTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN ORIGINAL  
(ELECTROMAGNETICAMENTE) E IMPRESO EN DOS EJEMPLARES.

---

Dr. Carlos Orozco  
SECRETARIO ACADEMICO

**“OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION  
DE ADN EN LAS ESPECIES *Oncorhynchus mykiss* Y  
*Astroblepus ubidiai* Y SU CUANTIFICACION CON TECNICAS  
MOLECULARES PARA LA ACUICULTURA”**

ALFREDO XAVIER DAVILA CEVALLOS

JENNY ELIZABETH GARCES ACOSTA

REVISADO Y APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL  
TRIBUNAL DE CALIFICACION DEL INFORME TECNICO

	CALIFICACION	FECHA
Ing. M. Sc. Juan Ortiz DIRECTOR INVESTIGACION	-----	-----
Dr. Darwin Rueda CODIRECTOR INVESTIGACION	-----	-----

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN  
ESTA SECRETARIA

Ab. Carlos Orozco  
SECRETARIO ACADEMICO

## AUTORIZACION

Por medio del presente documento autorizamos a quién corresponda a publicar nuestro proyecto de investigación titulado **“OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION DE ADN EN LAS ESPECIES *Oncorhynchus mykiss* Y *Astroblepus ubidiai* Y SU CUANTIFICACION CON TECNICAS MOLECULARES PARA LA ACUICULTURA”**, en la página Web de la Escuela Politécnica del Ejército, ESPE.

-----

Alfredo Dávila Cevallos  
EGRESADO

-----

Jenny Garcés Acosta  
EGRESADO

El Prado, Julio del 2007

## INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO.....	XIV
INDICE DE CUADROS .....	XXI
INDICE DE FIGURAS .....	XXIV
INDICE DE FOTOGRAFIAS.....	XXV
INDICE DE GRAFICOS.....	XXVI
INDICE DE ANEXOS .....	XXVII
RESUMEN .....	XXVIII
ABSTRACT .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	4
1. OBJETIVO GENERAL .....	4
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
III. REVISION DE LITERATURA .....	5
1. DESCRIPCION DE LA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS).....	5
1.1. Generalidades.....	5
1.2. Clasificación Taxonómica.....	7
1.3. Características .....	8
1.4. Condiciones de Cultivo.....	10
1.4.1. Agua y Oxígeno .....	10
1.4.2. pH.....	11
1.4.3. Salinidad.....	11
1.4.4. Densidad.....	12
1.5. Reproducción .....	12
2. DESCRIPCIÓN DE LA PREÑADILLA (ASTROBLEPUS UBIDIAI).....	14
2.1. Origen y distribución.....	14
2.2. Clasificación taxonómica.....	16
2.3. Morfología .....	17



4.3.4. (VNTR) Repeticiones en Tándem en Número Variable .....	49
4.3.4.1. Minisatélites .....	49
4.3.5. (STR) Repeticiones en Tándem de Secuencias Cortas o Microsatélites) .....	49
5. EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN .....	52
5.1. Aislamiento de ADN .....	52
6. PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA) .....	57
6.1. Introducción.....	57
6.2. El Ciclo .....	59
6.2.1. Desnaturalización .....	59
6.2.2. Hibridación.....	60
6.2.3. Replicación .....	62
6.3. Tipos de PCR.....	65
6.3.1. PCR anidada .....	65
6.3.2. PCR in situ.....	65
6.3.3. PCR múltiplex.....	66
6.3.4. RT-PCR .....	66
6.3.5. PCR en tiempo real .....	66
7. CUANTIFICACION DE ADN .....	67
7.1. Electroforesis.....	67
7.1.1. Geles de Agarosa (AGE) .....	69
7.1.1.1. Fluorescencia del Bromuro de Ethidio.....	71
7.1.2. Geles de Poliacrilamida (PAGE).....	73
7.2. Análisis óptico por absorción de luz .....	75
7.2.1. Espectrofotometría .....	75
7.2.1.1. Espectrofotómetro .....	76
7.2.1.2. Protocolo de Cuantificación de ADN por Espectrofotometría.....	77
IV. MATERIALES Y METODOS .....	78
1. UBICACION GEOGRAFICA .....	78
1.1. Localización.....	78
1.2. Características Agroclimáticas .....	78



2. MATERIALES .....	79
2.1. <i>Cariotipo</i> .....	79
2.1.1. Materiales .....	79
2.1.2. Equipos.....	79
2.1.3. Reactivos .....	79
2.2. <i>Hemograma</i> .....	80
2.2.1. Materiales .....	80
2.2.2. Equipos.....	80
2.2.3. Reactivos .....	80
2.3. <i>Recolección de Muestras para Extracción de ADN</i> .....	81
2.3.1. Materiales .....	81
2.3.2. Reactivos .....	81
2.4. <i>Extracción de ADN</i> .....	81
2.4.1. Materiales .....	81
2.4.2. Equipos.....	81
2.4.3. Reactivos .....	82
2.5. <i>Visualización de ADN</i> .....	83
2.5.1. Materiales .....	82
2.5.2. Reactivos .....	82
2.5.3. Equipos.....	83
2.6. <i>Espectrofotometría</i> .....	83
2.6.1. Materiales .....	83
2.6.2. Equipos.....	83
2.6.3. Reactivos .....	83
3. METODOS .....	84
3.1. <i>Material Experimental</i> .....	84
3.2. <i>Metodología Experimental</i> .....	85
3.2.1. Ubicación .....	85
3.2.2. Protocolo para la obtención de Cariotipo .....	86
3.2.2.1. Protocolo de preparación de cariotipos para trucha .....	86
3.2.2.2. Protocolo de preparación de cariotipo de preñadilla .....	89
3.2.3. Metodología para Hemograma de Trucha .....	92

3.2.4. Metodología para Hemograma de Preñadilla .....	94
3.2.5. Recolección de Muestras para extracción .....	96
3.2.6. Extracción de ADN .....	97
3.2.6.1. Protocolo de Extracción CTAB 5% (Doyle & Doyle, 1987) modificado.....	97
3.2.6.2. Protocolo de Extracción SDS 10% (Shagui – Morroof, 1994) modificado.....	98
3.2.6.3. Protocolo de Extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modificado.....	99
3.2.7. Cuantificación .....	100
3.2.8. Cuantificación con geles de agarosa 2%.....	101
3.2.8.1. Preparación del Gel de Agarosa 2% .....	101
3.2.8.2. Carga de muestras y corrida del gel .....	101
3.2.9. Cuantificación con geles de poliacrilamida 5% .....	102
3.2.9.1. Geles de Poliacrilamida 5% .....	102
3.2.10. Metodología para cuantificación de ADN por Espectrofotometría	104
V. RESULTADOS.....	105
1. ANÁLISIS DEL COMPONENTE CROMOSÓMICO.....	105
1.1. <i>Trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)</i> .....	105
1.2. <i>Preñadilla (Astroblepus ubidiai)</i> .....	106
2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	108
2.1. <i>Tamaño de Muestras</i> .....	108
2.2. <i>Concentración Media de ADN</i> .....	109
2.3. <i>Cuantificación de concentración de ADN (µg/µl) por Espectrofotometria</i> .....	110
2.3.1. Cuantificación de concentración de ADN (µg/µl) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (aletas caudal, dorsal) en las especies trucha arco iris y preñadilla. ....	110
2.3.2. Cuantificación de concentración de ADN (µg/µl) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla.....	112

2.3.3. Cuantificación de concentración de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) del protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System de tejido sanguíneo en las especies trucha arco iris y preñadilla.....	114
2.4. <i>Cuantificación de concentración de ADN (<math>\text{ng}/\mu\text{l}</math>) con análisis comparativo de muestras coloreadas en geles.....</i>	115
2.4.1. Cuantificación de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio (10 mg/ml) en geles de agarosa (2%).....	116
2.4.1.1. Cuantificación de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (Aletas caudal, dorsal) en las especies trucha arco iris y preñadilla. ....	116
2.4.1.2. Cuantificación de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en muestras sanguíneas en las especies trucha arco iris y preñadilla .....	118
2.4.1.3. Cuantificación de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) del protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System de tejido sanguíneo en las especies trucha arco iris y preñadilla .....	119
2.4.2. Cuantificación de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en geles de poliacrilamida (5%). .....	120
2.4.2.1. Cuantificación de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (Aletas caudal, dorsal) en las especies trucha arco iris y preñadilla. ....	120
2.4.2.2. Cuantificación de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en muestras sanguíneas en las especies trucha arco iris y preñadilla. ....	121
2.4.2.3. Cuantificación de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) del protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System de tejido sanguíneo en las especies trucha arco iris y preñadilla .....	123

3. ANÁLISIS ECONÓMICO.....	124
VI. DISCUSION .....	136
VII. CONCLUSIONES .....	146
VIII. RECOMENDACIONES.....	149
IX. BIBLIOGRAFIA.....	150
X. ANEXOS .....	165
ANEXO 1. DENOMINACIONES TAXONÓMICAS ACTUAL DE LAS TRUCHAS DE LA VERTIENTE DEL PACÍFICO DE AMÉRICA DEL NORTE .....	165
ANEXO 2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS) EN SUS DIFERENTES ETAPAS.....	166
ANEXO 3. SOLUCIONES STOCK .....	167
ANEXO 4. RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN ENTRE 5 MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE TRIATOMÍNEOS: SU UTILIZACIÓN EN LA TÉCNICA DE ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD).....	170
ANEXO 5. GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	171
ANEXO 6. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	181

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 3.1.</b> Clasificación Taxonómica de la Trucha Arco iris	7
<b>Cuadro 3.2.</b> Características, ventajas y desventajas que presentan algunos marcadores moleculares	43
<b>Cuadro 3.3.</b> Características operativas y técnicas de algunas técnicas de Marcadores Moleculares	43
<b>Cuadro 3. 4.</b> Algunas enzimas de restricción y sus sitios de Restricción	45
<b>Cuadro 3.5.</b> Reactivos utilizados en la Extracción de ADN	56
<b>Cuadro 3.6.</b> Enzimas ADN polimerasas comúnmente utilizadas para la reacción de polimerización en cadena (PCR)	64
<b>Cuadro 3.7.</b> Volumen de cada componente para polimerizar geles en varias concentraciones	73
<b>Cuadro 4.1.</b> Cantidades (masa) de ADN en nanogramos (ng) y en pares de bases (bp), en base a la cantidad de solución patrón	101
<b>Cuadro 5.1.</b> Pesos de aletas (dorsal y caudal) y volúmenes de sangre utilizados como muestras para la extracción de ADN en trucha y preñadilla	108
<b>Cuadro 5.2.</b> Concentración media de ADN cuantificado por espectrofotometría y análisis comparativo en geles de agarosa y poliacrilamida, para cada protocolo de extracción (CTAB 5%, SDS 10% y Kit) en las tres zonas corporales de extracción (aletas dorsal, caudal y sangre) en trucha arco iris y preñadilla	109
<b>Cuadro 5.3.</b> Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (aletas dorsal y caudal), en las especies trucha arco iris y preñadilla	111
<b>Cuadro 5.4.</b> Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla	113

<b>Cuadro 5.5.</b> Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras sanguíneas con el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System en las especies trucha arco iris y preñadilla	115
<b>Cuadro 5.6.</b> Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (aletas dorsal y caudal), en las especies trucha arco iris y preñadilla	116
<b>Cuadro 5.7.</b> Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla	119
<b>Cuadro 5.8.</b> Prueba de Kruskal – Wallis con el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System en las especies trucha arco iris y preñadilla	120
<b>Cuadro 5.9.</b> Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (aletas dorsal y caudal), en las especies trucha arco iris y preñadilla	121
<b>Cuadro 5.10.</b> Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla	122
<b>Cuadro 5.11.</b> Prueba de Kruskal – Wallis con el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System en las especies trucha arco iris y preñadilla	124
<b>Cuadro 5.12.</b> Reactivos utilizados en el protocolo de extracción CTAB 5% y su cuantificación en geles de agarosa 2% y poliacrilamida 5%	125
<b>Cuadro 5.13.</b> Reactivos utilizados en el protocolo de extracción SDS 10% y su cuantificación en geles de agarosa 2% y poliacrilamida 5%	126
<b>Cuadro 5.14.</b> Reactivos utilizados en el protocolo de extracción DNA Ready Amp™) y su cuantificación en geles de agarosa 2% y poliacrilamida 5%	127
<b>Cuadro 5.15.</b> Reactivos utilizados para la Cuantificación de ADN en geles de Agarosa 2%	127

<b>Cuadro 5.16.</b> Reactivos utilizados para la Cuantificación de ADN en geles de Poliacrilamida 5%	128
<b>Cuadro 5.17.</b> Detalle de costo de equipos necesarios para desarrollar las técnicas de extracción de ADN (Protocolos CTAB 5%, SDS 10%, ADN Ready Amp™) y su cuantificación en geles de Agarosa 2% y poliacrilamida 5%	129
<b>Cuadro 5.18.</b> Costo de Materiales requeridos para desarrollar las Extracciones de ADN (Protocolos CTAB 5%, SDS 10%, ADN Ready Amp™) y su Cuantificación con geles de Agarosa 2% y Poliacrilamida 5%	130
<b>Cuadro 5.19.</b> Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo CTAB 5% y su Cuantificación con Gel de Agarosa 2%	132
<b>Cuadro 5.20.</b> Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo CTAB 5% y su Cuantificación con Gel de Poliacrilamida 5%	132
<b>Cuadro 5.21.</b> Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo SDS 10% y su Cuantificación con Gel de Agarosa 2%	133
<b>Cuadro 5.22.</b> Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo SDS 10% y su Cuantificación con Gel de Poliacrilamida 5%	133
<b>Cuadro 5.23.</b> Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo ADN Ready Amp™ y su Cuantificación con Gel de Agarosa 2%	134
<b>Cuadro 5.24.</b> Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo ADN Ready Amp™ y su Cuantificación con Gel de Poliacrilamida 5%	134
<b>Cuadro 5.25.</b> Análisis Comparativo de costos de los tres protocolos de extracción y cuantificados en geles de agarosa (2%) y poliacrilamida (5%)	135

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Trucha Arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	10
<b>Figura 3. 2.</b> Relación espacial de las Bases Purídicas y Pirimidínicas	22
<b>Figura 3.3.</b> Doble hebra antiparalela de ADN	23
<b>Figura 3.4.</b> Gen para la proteína triptófano sintetasa A	25
<b>Figura 3.5.</b> Partes de un cromosoma	28
<b>Figura 3.6.</b> Formas de los cromosomas	28
<b>Figura 3.7.</b> Mapeo Genético	40
<b>Figura 3.8.</b> RFLPs	44
<b>Figura 3.9.</b> Descripción de la técnica AFLP	48
<b>Figura 3.10.</b> Principio del análisis con Amplificación de Microsatélites	50
<b>Figura. 3.11.</b> Diagrama General de Extracción de ADN	54
<b>Figura. 3.12.</b> Diagrama de extracción de ADN con los protocolos CTAB y SDS	55
<b>Figura 3.13.</b> Amplificación Exponencial de la doble cadena de ADN	58
<b>Figura 3.14.</b> Desnaturalización del ADN	60
<b>Figura 3.15.</b> Hibridación con cebadores	61
<b>Figura 3.16.</b> Extensión con Taq polimerasa	62
<b>Figura 3.17.</b> Proteínas implicadas en el mecanismo de replicación del ADN	63
<b>Figura 3.18.</b> Cuantificación de ADN humano	69
<b>Figura 3.19.</b> Visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa de diferente concentración	71
<b>Figura 3.20.</b> Tres bandas de ADN plásmido	72
<b>Figura 3.21.</b> Diagrama en bloques de un espectrofotómetro	76
<b>Figura 3.22.</b> Fórmula de cuantificación de la concentración de ADN mediante espectrofotometría	77
<b>Figura 4.1.</b> Puntos de extracción de sangre en Trucha	92
<b>Figura 4.2.</b> Punto de extracción de sangre en preñadilla	94
<b>Figura 5.1.</b> Cariotipo de trucha arco iris	106
<b>Figura 5.2.</b> Cariotipo de preñadilla	107



## INDICE DE FOTOGRAFIAS

<b>Fotografía 3.1.</b> Preñadilla ( <i>Astroblepus ubidiai</i> )	16
<b>Fotografía 3.2.</b> Preñadilla macho	18
<b>Fotografía 3.3.</b> Preñadilla hembra	18
<b>Fotografía 3.4.</b> Preñadilla macho y hembra	19
<b>Fotografía 3.5.</b> Boca cartilaginosa a manera de ventosa	20
<b>Fotografía 3.6.</b> Procedimiento para la utilización de geles de agarosa	70
<b>Fotografía 4.1.</b> Materiales y reactivos utilizados en el Hemograma	81
<b>Fotografía. 4.2.</b> Materiales, reactivos y equipo para cuantificación de ADN por espectrofotometría	83
<b>Fotografía 4. 3.</b> Cromosomas de Trucha. Vista en el microscopio	89
<b>Fotografía 4.4.</b> Cromosomas de Preñadilla. Vista en microscopio	91
<b>Fotografía 4.5.</b> Eritrocitos nucleados, glóbulos blancos de trucha	93
<b>Fotografía 4.6.</b> Eritrocitos nucleados y teñidos de preñadilla	95
<b>Fotografía 4.7.</b> Capilar con sangre centrifugada sobre una tabla hematocrítica	95
<b>Fotografía 4.8.</b> Corrida electroforética de la solución patron Low DNA Mass Ladder para estimar la masa desconocida de muestras de AND por tinción con bromuro de etidio en gel de agarosa 2%, y en presencia de luz ultravioleta	100
<b>Fotografía 4.9.</b> Cuantificación Visual Comparativa de muestras de ADN y solución patrón Low DNA Mass Ladder en gel de agarosa 2% y visualizado con bromuro de etidio (10 mg/ml)	102
<b>Fotografía 4.10.</b> Cuantificación de ADN en gel de poliacrilamida 5%, mediante análisis comparativo con Low DNA Mass Ladder	104

## INDICE DE GRAFICOS

<b>Gráfico 5.1.</b> Cuantificación de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) por espectrofotometría, de dos protocolos de extracción (CTAB 5% y SDS 10%) de muestras de aletas dorsal y caudal en las especies (trucha arco iris y preñadilla) (Criterio de selección = Especie)	112
<b>Gráfico 5.2.</b> Cuantificación de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) por espectrofotometría con respecto a los protocolos de extracción (CTAB 5% y SDS 10%) en las especies trucha arco iris y preñadilla para muestras de sangre (criterio de selección = protocolos)	114
<b>Gráfico 5.3.</b> Cuantificación de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio (10 mg/ml) en gel de agarosa (2%) con dos protocolos de extracción para muestras de aleta dorsal y caudal en trucha y preñadilla (criterio de selección = protocolos)	117
<b>Gráfico 5.4.</b> Cuantificación de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio (10 mg/ml) en gel de agarosa (2%) con dos protocolos de extracción para muestras de aleta dorsal y caudal en trucha y preñadilla (criterio de selección = especies)	118
<b>Gráfico 5.5.</b> Cuantificación de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida (5%) con dos protocolos de extracción de muestra de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla (criterio de selección = protocolos)	123

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Denominaciones taxonómicas actual de las truchas de la vertiente del Pacífico de América del Norte	165
<b>ANEXO 2.</b> CONDICIONES DE CULTIVO DE LA TRUCHA ARCO IRIS ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) EN SUS DIFERENTES ETAPAS	166
<b>ANEXO 3.</b> SOLUCIONES STOCK	167
<b>ANEXO 4.</b> RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN ENTRE 5 MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE TRIATOMÍNEOS: SU UTILIZACIÓN EN LA TÉCNICA DE ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)	170
<b>ANEXO 5.</b> Glosario de Términos	171
<b>ANEXO 6.</b> ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	181

## RESUMEN

Uno de los procedimientos básicos para iniciar un programa de mejoramiento, caracterización o mapeo genético de poblaciones basado en la selección asistida por marcadores moleculares (MAS), es la extracción del ADN genómico, para lo cual se optimizaron tres protocolos (CTAB 5%, SDS 10% y ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System) de tres tipos de muestras (aleta dorsal, aleta caudal y sangre) en dos especies acuícolas, trucha arco iris y preñadilla, y cuantificados por espectrofotometría y comparación de muestras coloreadas en geles de agarosa y poliacrilamida.

El protocolo de extracción CTAB 5% modificado presentó la mayor concentración media de ADN de muestras de aleta dorsal y caudal (0.98  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y sangre (0.53  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), seguido por el protocolo ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modificado con una concentración media de 0.825  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para muestras sanguíneas, cuantificados por espectrofotometría.

La cuantificación con análisis comparativo de muestras coloreadas en gel de agarosa, demostró la misma tendencia (66.25  $\text{ng}/\mu\text{l}$  y 50.83  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , respectivamente) para el protocolo CTAB 5%, pero seguido del protocolo SDS 10% con una concentración de 29.17  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , para muestras de aletas, y 6.67  $\text{ng}/\mu\text{l}$  para muestras sanguíneas.

Las muestras de aletas dorsal y caudal de trucha arco iris, demostraron mayor concentración de ADN que sus similares de preñadilla, al parecer por la diferencia en el peso obtenido de las muestras extraídas de cada especie. Sin embargo, muestras de sangre de preñadilla, exhibieron una mayor concentración de ADN que aquellas tomadas de trucha arco iris. Así mismo, se encontró una mayor concentración de ácidos nucleicos en muestras de aleta caudal en las dos especies, cuantificados con análisis comparativo en gel de agarosa y poliacrilamida (60.83  $\text{ng}/\mu\text{l}$  y 19.58  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , respectivamente), aunque al cuantificar por espectrofotometría, los resultados demostraron una mayor concentración en muestras de aleta dorsal (0.87  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

El análisis económico demostró que el protocolo de extracción de ADN CTAB 5% y cuantificado con análisis comparativo de muestras coloreadas en gel de agarosa, presenta el menor costo de producción por ciento de muestras a extraer y por unidad (\$ 143.23 y \$ 1.43, respectivamente); mientras que, el protocolo ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modificado, y cuantificado con análisis comparativo de muestras coloreadas en gel de poliacrilamida, exhibió el mayor costo de extracción por ciento de muestras y por unidad (\$ 194.55 y 1.95).

Los protocolos de extracción cuantificados en geles de agarosa presentaron un menor costo de producción, que aquellos cuantificados en geles de poliacrilamida (CTAB 5%: \$1.43 - \$1.46) (SDS: 10% \$1.46 – 1.49) (ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System: \$1.92 - \$1.95) respectivamente.

## ABSTRACT

A basic procedure to begin a program of improvement, characterization or populations' genetic mapping based on the selection attended by molecular markers (MAS), it's the extraction of the DNA genomic, for that which three protocols were optimized (CTAB 5%, SDS 10% and ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System) of three types of samples (dorsal fin, caudal fin and blood) in two acuicola species, rainbow trout and preñadilla, also quantified by espectrophotometry and comparison of samples colored in agarosa and poliacrilamida gels.

The extraction protocol CTAB 5% modified presented the biggest DNA's average concentration of samples of dorsal fin and caudal fin (0.98 µg/µl) and blood (0.53 µg/µl), followed by the protocol ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modified with a average concentration of 0.825 µg/µl for sanguine samples, quantified by espectrophotometry.

The quantification with comparative analysis of samples colored in agarosa gel, showed the same tendency (66.25 ng/µl and 50.83 ng/µl, respectively) for the protocol CTAB 5%, but followed by the protocol SDS 10% with a concentration of 29.17 ng/µl, for fins samples, and 6.67 ng/µl for sanguine samples.

The fins samples of rainbow trout showed bigger concentration of DNA that their similar of preñadilla, apparently for the difference in the weight obtained of the samples extracted of each species. However, sanguineous samples of preñadilla exhibited a bigger concentration of DNA that those taken of trout rainbow. In the same way, there was a bigger concentration of nucleic acids in samples of dorsal and caudal fins, in the two species, quantified with comparative analysis in agarosa and poliacrilamida gels (60.83 ng/µl and 19.58 ng/µl, respectively), nevertheless, the espectrophotometry results showed a bigger concentration in samples of dorsal fin (0.87 µg/µl).

The economic analysis demonstrated that the protocol of extraction of DNA, CTAB 5% and quantified with comparative analysis of samples colored in agarosa gel, it displayed the smallest cost of production percent of samples to extract and for unit (\$143.23 and \$1.43, respectively); whereas, the protocol ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modified, and quantified with comparative analysis of samples colored in poliacrilamida gel exhibited the biggest cost of extraction percent of samples and for unit (\$194.55 and 1.95).

The extraction protocols quantified in agarosa gels presented a smaller production cost that those quantified in poliacrilamida gels (CTAB 5%: \$1.43 - \$1.46) (SDS: 10% \$1.46 - 1.49) (ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System: \$1.92 - \$1.95) respectively.

# I. INTRODUCCIÓN

La ingeniería genética es actualmente una herramienta indispensable dentro del mejoramiento y conservación de especies, en la Acuicultura, también representa el camino para lograr incrementos productivos. Es por esto que la biotecnología se adentra y aplica a especies como la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) cuya explotación es intensiva y su producción mundial anual es de 300 000 TM aproximadamente (Buxadé, 1997).

En Ecuador es la especie acuícola de agua dulce más apreciada, que desde 1980 se constituyó como una de las actividades pecuarias más productivas y más tecnificadas, por estos motivos se presentó una gran demanda de alevines o semilla y en 1994 nace el Centro de Investigaciones Acuícolas de Papallacta CENIAC, el cual registró una producción de más de tres millones de alevines hasta octubre del 2004 y con lo cual se produjo aproximadamente 1200 TM de carne/año, con un incremento anual del 20%<sup>1</sup>.

En el transcurso del tiempo se ha registrado la pérdida de variabilidad genética entre los reproductores del CENIAC, lo cual se traduce en decrementos en el rendimiento y malformaciones en los individuos debido a que existe algún parentesco entre los reproductores y por ende los alevines que son usados como semilla.

Corregir esta situación implica seleccionar fenotípicamente y genéticamente a los individuos utilizados en la reproducción, la identificación y la selección genética se lo hace mediante técnicas moleculares para determinar el grado de consanguinidad y los cruzamientos adecuados que deben hacerse en dicha población de

---

<sup>1</sup> Santiestevan, PM. 2004. Historia del Centro de Investigaciones Acuícolas CENIAC. (entrevista). Papallacta, Ec, Ministerio de Industria, Comercio, Integración y Pesca MICIP



reproductores, además se establecen bases genéticas que proporcionan información individual y familiar de cada reproductor, con el objetivo principal de dar un diagnóstico de la situación actual del centro, mejorar e incrementar los rendimientos de la trucha arco iris producida y distribuida en toda la región interandina del Ecuador.

Las técnicas biotecnológicas también se enfocan en la ecología y conservación de las especies, es así que la preñadilla (*Astroblepus ubidiai*), es considerada como especie en peligro de extinción en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Moreano *et al*, 2005).

Recientemente se iniciaron estudios a nivel molecular para obtener información sobre su genoma e investigaciones sobre las poblaciones todavía existentes en la zona norte de nuestro país. Las pocas investigaciones que se han hecho en el Ecuador han sido realizadas por profesionales como el Dr. Ramiro Barriga que se ha centrado en la clasificación taxonómica de las especies de preñadillas o del género *Astroblepus* existentes en el país, la morfología, fisiología, además se cuenta con trabajos hechos por Antonio Vélez y Agustín Rueda sobre los componentes y calidad del hábitat de la preñadilla, también acerca de la ecología y biología de la conservación de esta especie.

En este trabajo de investigación se presenta información citogenética de las especies en estudio como es el la confirmación del cariotipo de *Oncorhynchus mykiss* y la realización y publicación del cariotipo de *Astroblepus ubidiai*, además la caracterización poblacional de esta especie, mediante la utilización de marcadores moleculares, es así que la obtención de su ADN es vital y para conseguirlo se propone la optimización de protocolos de extracción de ADN según las especies en estudio y recursos fácilmente asequibles en nuestro medio, además se establece técnicas de colección de muestras que permitan mantener vivo a los individuos en estudio.

El ADN obtenido debe tener altos rendimientos en cuanto a pureza y cantidad para ser calificado como material apto para estudios moleculares (Sambrook & Russell, 1989).

Cabe recalcar que este trabajo fue realizado por completo en las instalaciones del Laboratorio de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA, constituyendo un proyecto pionero en la aplicación de la biotecnología en la carrera y en nuestro medio. El laboratorio cuenta con una sección específica para biología molecular dotada de los equipos apropiados, así mismo de reactivos y materiales.

La hacienda donde funciona el laboratorio se encuentra ubicada en el cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando, a una altitud de 2748 msnm, temperatura media anual de 13.5°C y una precipitación media anual de 1200mm. (Pozo *et al.*, 2003).

## II. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

Optimizar protocolos de extracción de ADN y su cuantificación bajo condiciones técnicas del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el cariotipo de las especies acuícolas en estudio.

Establecer el protocolo de extracción de ADN en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y preñadilla *Astroblepus ubidiai* que permita obtener muestras confiables.

Determinar el costo en los diferentes protocolos de extracción en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y preñadilla *Astroblepus ubidiai*.

Evaluar la calidad del producto mediante su cuantificación en geles de agarosa y poliacrilamida, tanto para las especies *Oncorhynchus mykiss* y preñadilla *Astroblepus ubidiai*.

### III. REVISION DE LITERATURA

#### 1. DESCRIPCION DE LA TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

##### 1.1. Generalidades

La crianza o cultivo de peces bajo condiciones controladas se ha practicado durante milenios, pero el cultivo de peces salmónidos, como la trucha y el salmón, son actividades bastantes recientes. Estas especies se criaron por primera vez en condiciones artificiales durante el siglo XIX, principalmente para repoblar los ríos para los pescadores de caña, siendo los daneses los pioneros en criar la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) para el consumo humano. Posteriormente, llegó a ser popular en la mayor parte del mundo, la producción para mesa de la trucha arco iris; por lo que en la década de los 1870's y 1880's, se hicieron intentos por cultivar el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en Escocia y Noruega, y el salmón del Pacifico (*Oncorhynchus* sp.) en EE.UU. y Canadá. Otros salmónidos cultivados son la trucha común (*Salmo trutta*) y el salvelino (*Salvelinus fontinalis*) con fines de repoblación (Roberts & Shepherd, 1980; Bastardo & Sofía, 2003; Alvarado, 2004).

Los salmones y truchas ocupan el tercer lugar de producción, con un montante total en toneladas, que no llega a ser el 10% de de los ciprínidos (carpas). La trucha arco iris (300 000 toneladas aprox.) y el salmón del Atlántico (casi 250000 toneladas) son las dos especies mas representativas. En esta ultima especie, por ejemplo, la acuicultura proporciona el 98.6% del total comercializado y las capturas en medio natural solo el 1.4% (Buxadé, 1997).

La trucha arco iris procede de la vertiente del O. Pacífico de América del Norte, y fue importada por Europa en 1880. Vive en los cursos de agua de la cadena costera desde el sur de Alaska hasta el sur de Oregón y California. En la misma se distinguen variedades continentales que no emigran hacia el mar denominadas rainbow trout, y variedades que si emigran o trucha cabeza de acero, llamadas steelhead trout (Huet, 1998).

La capacidad productiva, a nivel mundial, sobrepasa el millón de toneladas métricas; Chile es principal productor, seguido de Dinamarca y Finlandia, aunque el primer exportador de filetes es Noruega (619 000 TM), seguido de Chile (Alvarado, 2004; Panorama Acuícola, 2007).

La trucha arco iris es la especie mas cultivada dentro de la salmonicultura mundial. En la actualidad esta distribuida por completo en el área natural de los salmónidos, el hemisferio norte, se ha introducido en numerosas y amplias regiones de ambos hemisferios, en Asia, África, América y Oceanía (Buxadé, 1997).

Según Blanco (1995), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) fue introducido en Hispanoamérica a inicios del siglo pasado (1900) y en el transcurso de los años se ha adaptado a la climatología, de tal forma, que se encuentra ampliamente diseminada, ocupando numerosos ecosistemas acuáticos. En el Ecuador, la trucha Arco iris fue introducida en la década de 1930, siendo la principal especie acuícola de la sierra, la mejor productora de carne que hasta 1980 logra asentarse como un cultivo industrial y técnicamente manejado.

La trucha arco iris crece en agua dulce mucho mas deprisa que el salmón común o que la trucha común, y en consecuencia, son las mas frecuentemente cultivadas para fines culinarios; mientras que, la trucha común se cría exclusivamente para fines de repoblación, y el salmón común se crió, para soltarlo en las corrientes de agua con el objetivo de aumentar el numero de adultos (Roberts & Shepherd, 1980; Blanco, 1995).

Su fácil adaptación, mayor rusticidad y domesticidad; resistencia a las temperaturas elevadas, bajo contenido de oxígeno y enfermedades; mejor rendimiento con alimentación artificial; desarrollo mas rápido, mayor gregarismo; pero, sobre todo, su rápido crecimiento (alcanza el tamaño comercial en aproximadamente un año), han sido razones para su cría industrial, no sólo en el Ecuador, sino también a nivel mundial (Buxadé, 1997).

## 1.2. Clasificación Taxonómica

La clasificación de la Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), al igual que el de otros salmónidos, ha sido objeto de debate y numerosas discusiones. Se ha demostrado que el número de vértebras de la trucha arco iris difiere de unos lotes a otros lotes, y se encuentra supeditado a la temperatura del agua de incubación del huevo, especialmente en el periodo embrionario de formación vertebral. El número de vértebras decrece cuando aumenta el grado de desarrollo, es decir, incubaciones a temperaturas altas y viceversa (Garside, 1966; Blanco, 1995).

**Cuadro 3.1. Clasificación Taxonómica de la Trucha Arco iris**

CATEGORIA	NOMBRE
Reino	Animal
Subreino	Metazoos
Tipo	Cordados
Subtipo	Vertebrados
Superclase	Gnatostomados
Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinoptergios
Orden	Salmoniformes
Suborden	Salmonoidei
Familia	Salmonidae
Subfamilia	Salmoninae
Género	<i>Oncorhynchus</i>
Especie	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Suckley)
Nombre común	Trucha Arco iris

Fuente: Blanco, 1995

En la década de los 80, existió cierta controversia entre los investigadores, acerca del origen taxonómico de las denominadas truchas del Pacífico Norte, por lo que en Octubre de 1988, la American Fisheries Society's Comité on Names of Fishes, mostró que, las truchas nativas de las cuencas del Pacífico-Norte se encuentran genéricamente más cerca del salmón del Pacífico *Oncorhynchus* que las especies *Salmo* del Atlántico y Europa (como el salmón del Atlántico *S. salar* y la trucha común europea *S. trutta*), esto gracias a los trabajos presentados en la reunión de junio de 1988 de la American Society of Ichthyologist and Herpetologists (Blanco, 1995). Las especies afectadas por estos cambios se pueden ver en el **Anexo 1**.

### **1.3. Características**

Los salmónidos se caracterizan por una segunda aleta dorsal adiposa que los distingue de otras especies. De todos los salmónidos, la trucha arco iris se caracteriza por tener un rápido crecimiento en cautiverio, excelente adaptación al alimento artificial y tolerancia a aguas más calientes (Pérez, 1982; Blanco, citado por Alvarado, 2004).

La trucha arco iris es un pez teleosteo de aguas frías y de alimentación carnívora. Proviene de la costa del Pacífico de Norteamérica, desde California hasta Alaska (Aguirre, 1976; Foerster, 1968; Isayev, 1961; Krupitskiy y Ustyugov, 1978; Krokhin, 1967; Leim y Scout, 1966, citados por Coll, 1991; Blanco, 1995). Posee una asombrosa variedad de formas; las principales variedades eran primitivamente más o menos distintas, por ejemplo, por el número de escamas de su línea lateral y el color, pero han sufrido tal cantidad de hibridaciones en el curso de su cultivo artificial que es prácticamente imposible identificarlas y, sobre todo, obtener huevos de legítima procedencia, correspondientes a los troncos primitivos (Huet, 1983).

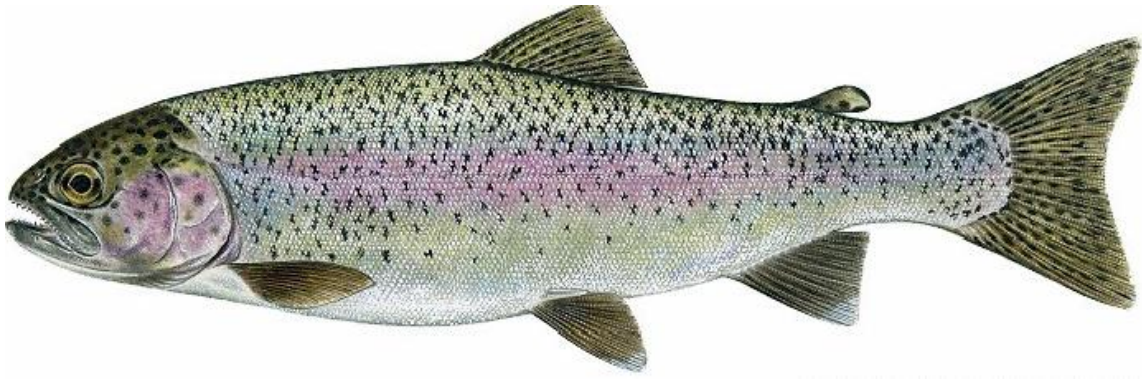
La trucha arco iris tiene el dorso azulado, flancos plateados con una inconfundible faja rojiza e iridiscente a lo largo, cuerpo y aletas con manchas negras, mandíbulas y vientre color crema; tiene una excelente adaptación a las condiciones subtropicales, ya que tolera temperaturas mayores de 20° C. Se alimenta de insectos, moluscos, crustáceos y peces. Es una especie muy usada para la cría industrial en todo el mundo por su adaptabilidad al manipuleo, condiciones de alta densidad y alimentación artificial. Esta especie llega a pesar hasta 12 kg y 65 cm de longitud (Valladares, 2002).

Wegrzyn y Ortubay, citados por López & Cartagena (2002), afirman que su dorso es oscuro con reflejos verde oliváceos, con motas negras igual que en los flancos. Vientre claro. Una franja purpúrea longitudinal desde el ojo hasta la aleta caudal, más notable con los ejemplares maduros, carácter que los distingue de los demás salmónidos. Aleta dorsal y caudal moteada. La aleta anal puede presentar el borde externo blanco. Existen formas plateadas y con la franja rojiza poco conspicua.

Su cuerpo está cubierto por numerosas escamas pequeñas. Peces provistos de una aleta adiposa por detrás de la aleta dorsal, que junto a la aleta anal, son de base corta. Boca grande con dientes cónicos en las quijadas y paladar (Del Valle & Núñez, citados por López & Cartagena, 2002).

Según Pérez (1982), su cuerpo es pisciforme típico, algo aplanado lateralmente, recubierto de escamas cicloide, grandes y caducas, posee manchitas negras y una banda lateral rosada iridiscente, que se hace más vistosa en la época de reproducción. La **Figura 3.1.** muestra las características físicas de una trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).





Fuente: Wyoming Game & Fish Wyoming Wildlife Magazine  
**Figura 3.1. Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)**

## **1.4. Condiciones de Cultivo**

### **1.4.1. Agua y Oxígeno**

La trucha arco iris, en condiciones naturales, es un pez que puede vivir en aguas comprendidas entre 0 – 25° C. Sin embargo, cabe indicar que, los límites industriales, entre los cuales su crecimiento y desarrollo son los adecuados para estos fines, corresponden a 9° C, como límite inferior, y 17° C como límite superior. La temperatura más adecuada para la trucha arco iris en producción cárnica, en la que sus funciones fisiológicas se realizan de forma óptima es de 15° C (Haskel, 1955; Kennedy y Mihurs, 1969 citados por Blanco, 1995).

El agua debe ser abundante, fresca, continuamente en renovación y rica en oxígeno disuelto en agua (9 mg/l). El mínimo para cultivar salmónidos es de 6 mg/l, ya que por debajo de 5.5 – 5 mg/l, las truchas en crecimiento presentan dificultad para respirar. Las exigencias térmicas de los salmónidos varían según la especie, la procedencia y el estado de desarrollo, aunque se puede decir que, en general, son especie de aguas frías (Ferron y Davis, 1975; Buxadé, 1997).

Según Huet (1983), el contenido mínimo de oxígeno del agua de 9 mg/l, sólo se encuentra generalmente en aguas renovadas cuya temperatura permanece por debajo de los 20° C. Según Blanco, citado por Alvarado (2004), aunque son peces de aguas frías, aunque el grado de tolerancia a las temperaturas es amplio, que puede subsistir en temperaturas mantenidas de 25° C, durante varios días.

#### **1.4.2. pH**

Los valores normales de pH para el cultivo de la trucha, varían entre 5 y 9. En explotaciones industrializadas se necesita un pH de 6 – 7, pues uno de los productos finales del metabolismo protéico de las truchas es el NH<sub>3</sub>, producto tóxico, con carácter limitante en su forma ionizada (NH<sub>3</sub>) lo cual, bajo la acción del pH ácido se transforma en ión amonio (NH<sub>4</sub>) forma ionizada, no tóxica, lo que no ocurre en condiciones básicas (Blanco, 1995). En el **Anexo 2**, se resumen las condiciones de cultivo.

#### **1.4.3. Salinidad**

La salinidad tiene gran importancia cuando los cultivos de trucha arco iris se realizan en agua salobre o marina, ya que cuanto mayor sea el grado de salinidad, menor será la concentración del oxígeno (20% menor). Muchos de los cultivos de trucha realizados en aguas saladas, han arrojado grandes resultados, mostrando un óptimo índice de crecimiento (Blanco, 1995). El cultivo en agua salada se puede realizar en estanques de hormigón o en cajas flotantes situadas en zonas protegidas del oleaje y del viento. La densidad es de 30 – 40 kg/m<sup>3</sup> (Sedgwick, Jensen, Edwards citados por Buxadé, 1997).

#### **1.4.4. Densidad**

La densidad de animales está en función de la posibilidad de renovación del medio, es decir, del caudal de agua limpia disponible, y también de la temperatura. Los valores normales son de 10 – 20 kg/m<sup>3</sup> con renovación de agua cada hora o dos horas, aunque es posible alcanzar cargas de 50 - 60 kg/m<sup>3</sup> con aireación artificial (Buxadé, 1997).

#### **1.5. Reproducción**

La reproducción de la trucha arco iris es sexual, lo realizan el macho y la hembra. Una característica peculiar, es que sus órganos sexuales presentan, en los primeros períodos de la vida, una indiferencia, es decir, no es posible determinar microscópicamente si la glándula sexual de un ejemplar es testículo u ovario, este fenómeno es denominado gonocorismo indiferenciado que presentan las truchas en los primeros meses de vida, de tal forma, que aproximadamente hasta los cuatro meses estos órganos no adquieren la estructura histológica funcional típica (Padoa, 1937; 1939; Robertson, 1953 citados por Blanco, 1995; Buxadé, 1997).

Según Bastardo (1994), los especímenes menores de 5 cm automáticamente entran en la categoría de juveniles indeterminados; la maduración en ambos sexos se da a partir de 12 cm de longitud estándar.

Además de ser sexual es externa, no teniendo lugar copulación como en algunas especies, sino que tanto la hembra como el macho depositan libremente en el agua, sus productos sexuales. Los procedentes de la hembra son depositados en el fondo de los ríos, en un nicho o nido previamente preparado, en donde inmediatamente después, el macho deposita el esperma, teniendo lugar en escasos segundos la fusión entre el espermatozoide y el óvulo (Blanco, 1995).

En la época de reproducción, los sexos se reconocen fácilmente. Las hembras, desde antes de la freza, tienen el vientre abultado y el ano prominente, redondeado y rojizo, mientras que en los machos es pequeño, alargado y pálido. Además, en esta época los colores del macho están muy acentuados. En los machos de la trucha común, el vientre es negruzco; en los salvelinos machos, los tintes son muy vivos. En los machos viejos de todas las especies, la mandíbula inferior está convertida en un pico curvo (Huet, 1983).

Huss (1988) señala que la mayoría de los peces llegan a su madurez sexual cuando han alcanzado cierto tamaño, el cual es característico de las especies y no está directamente correlacionado con la edad. Según Blanco (1995), los machos son sexualmente maduros cuando la estación climática de maduración coincide con una edad de 13 – 15 meses y un peso de 200 – 250 g/ unidad. Como la velocidad de crecimiento disminuye cuando el pez alcanza la madurez sexual, es ventajoso criar hembras en las explotaciones acuícolas.

En general, este tamaño crítico es alcanzado primero por los machos, por lo que en sus primeras etapas utilizan la energía procedente de los alimentos para reproducirse y no para crecer, lo que explica que los machos sean más pequeños que las hembras. Por el contrario, las hembras durante el primer año aprovechan la energía para crecer y no para reproducirse. Esta característica de las hembras se está aprovechando a nivel mundial para obtener poblaciones completamente hembras y de esta manera el productor logra la trucha porción en un lapso de tiempo más corto (Blanco, 1995).

Desova 1,500 - 2,500 huevecillos por kilogramo de peso vivo, de 3 – 6 mm de diámetro. La duración de su incubación es de 300 a 320 grados día, es decir los días que se necesitarían para que se incuben los huevecillos a 1° C. Aunque factores individuales y genotípicos pueden influir en este parámetro, el factor más influyente es la temperatura del agua (Pérez, 1982).

Blanco (1995), coincide indicando que necesita una suma acumulativa de 300° / día para alcanzar la eclosión, observándose variaciones entre 290 – 330° / día, dependiendo de varios factores. Según Ortiz (2007)<sup>2</sup>, en Papallacta se registra una incubación de 384° / día a una temperatura de 8° C.

Según Pennel y Barton (1996), el porcentaje de reproductores estériles aumenta con la edad. Se estima que para la trucha arco iris, el % de esterilidad pasa del 15% a los 3 años, al 50-60% a los 6-7 años. La cantidad de huevos y lecha aumenta con el tamaño de los reproductores; el diámetro de los huevos aumenta con el tamaño de la hembra; cuanto mayor es el huevo, mayor y más resistente es el alevín.

## **2. DESCRIPCIÓN DE LA PREÑADILLA (*Astroblepus ubidiai*)**

### **2.1. Origen y distribución**

Según Barriga (1991), a lo largo de la cordillera de los Andes existen alrededor de 15 especies de preñadillas, desde el nivel del mar hasta más de 2500 metros sobre el nivel del mar. En la provincia de Imbabura, en el Lago San Pablo existe aún la única especie de preñadilla endémica de los Andes del Ecuador, *Astroblepus ubidiai* o conocida por los indígenas como chalúa o imba (INSTRUCT, PUCE, CEPCU, CODELSPA, 2002).

El Lago San Pablo, llamado por los aborígenes Chicapán y después Imbakucha se encuentra en el cantón Otavalo, en la provincia de Imbabura entre las coordenadas 78° 15' 32" y 78° 07' 44" de longitud oeste y 0° 07' 34" a 0° 15' 27" de longitud norte; a una altura de 2666 metros sobre el nivel del mar, esta cuenca se encuentra formada por los volcanes Imbabura, Cusín, las estribaciones del Nudo de

---

<sup>2</sup> Ortiz, J. 2007. Manejo de trucha arco iris (Entrevista Personal) Sangolquí, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército, ESPE

Mojanda-Cajas y Reyloma. Tiene una superficie de 148.69 Km<sup>2</sup>, dividida en 11 microcuencas (INSTRUCT, PUCE, CEPCU, CODELSPA, 2002).

El Imbakucha es un lago activo, es decir, tiene renovación permanente de agua que proviene de manantiales, ríos y riachuelos que son sus afluentes, los principales son: las vertientes de Araque, Río Itambi, Riachuelo San Agustín y Pivarinche. El efluente se denomina Jatunyacu (Ubidia, 1953).

La preñadilla es la especie símbolo de la Provincia de Imbabura, ya que de ella se deriva el nombre; proviene del quichua *imba* que significa preñadilla y *bura* que es criadero o sea Criadero de Preñadillas.

Habita en los ríos, acequias, algunos lagos, pero principalmente se conoce que las poblaciones actuales de preñadillas habitan en los nacimientos de agua, manantiales. El hábitat de este pez se relaciona directamente con la presencia de berro (*Cardamine nasturtioides*) que es una planta acuática y le sirve de refugio, además le provee de los invertebrados acuáticos de los que se alimenta la preñadilla (Vélez & Rueda, 2002). La preñadilla es un indicador biológico de la calidad del agua de las vertientes (INSTRUCT, PUCE, CEPCU, CODELSPA, 2002).

En el año 2000, se iniciaron varios estudios sobre la preñadilla y en uno de ellos se encuentran determinados los lugares donde aún existen poblaciones de preñadilla en la provincia de Imbabura: en la Cuenca del Imbakucha en Proaño, Quinde, Gallopogyo, en Yanayacu en El Batán, en Chaupiyacu en Pataquí y en Tatuando en San Eduardo. (Vélez & Rueda, 2002)

La preñadilla ha estado presente en la historia de la provincia de Imbabura, en algunos documentos históricos aparecen datos sobre este pez, el sitio donde la población era muy numerosa se consideraba un lugar privilegiado y estaba en manos de los caciques y terratenientes, eran muy codiciados en la repartición de

herencias, también se cuenta que los indígenas entregaban su tributo anual con preñadillas a los encomendados españoles y posteriormente a la iglesia en Cuaresma. Desde aquellos tiempos hasta hoy la preñadilla ha constituido parte de la alimentación de las familias indígenas imbabureñas, además se cuenta que tradicionalmente su consumo servía para estimular la producción y secreción de leche materna (Moreano *et al*, 2005).



**Fotografía. 3.1. Preñadilla (*Astroblepus ubidiai*)**

## **2.2. Clasificación taxonómica**

Humboldt, en 1805, clasificó a la peñadilla como *Pimelodus cyclopum*, y señalaba que este pez podía vivir en aguas subterráneas. Tal comportamiento nunca fue probado pero se cree que tiene algo de verdad según conclusiones y correlaciones de otros estudios actuales.

En 1931, se hizo una reclasificación taxonómica de la preñadilla a cargo del científico francés Jacques Pellegrin (INSTRUCT, PUCE, CEPCU, CODELSPA, 2002), y determinó que la preñadilla pertenece a: Clase: Osteichthyes, Subclase: Actinopterygii, Orden: Siluriformes, Familia: Astroblepidae, Género: Astroblepus, Especie: *Astroblepus ubidiai* (Vélez & Espino, 2004).

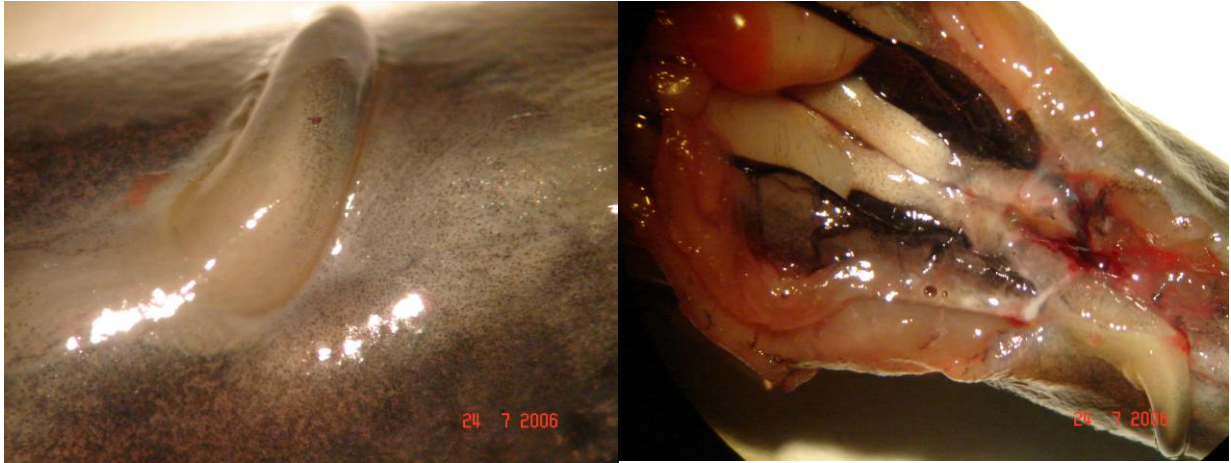
### **2.3. Morfología**

Existe una diferenciación sexual clara entre los dos sexos. Los machos presentan un órgano reproductor externo, el cual aparece cuando el pez alcanza más o menos los 5 centímetros de longitud. El hecho de que exista un órgano sexual externo en los machos indica que muy probablemente la fertilización de los huevos es interna, o en otras palabras macho y hembra deben copular para fertilizar los óvulos. Dependiendo el tamaño de una hembra puede contener en su vientre y depositar entre 40 y 150 huevos.

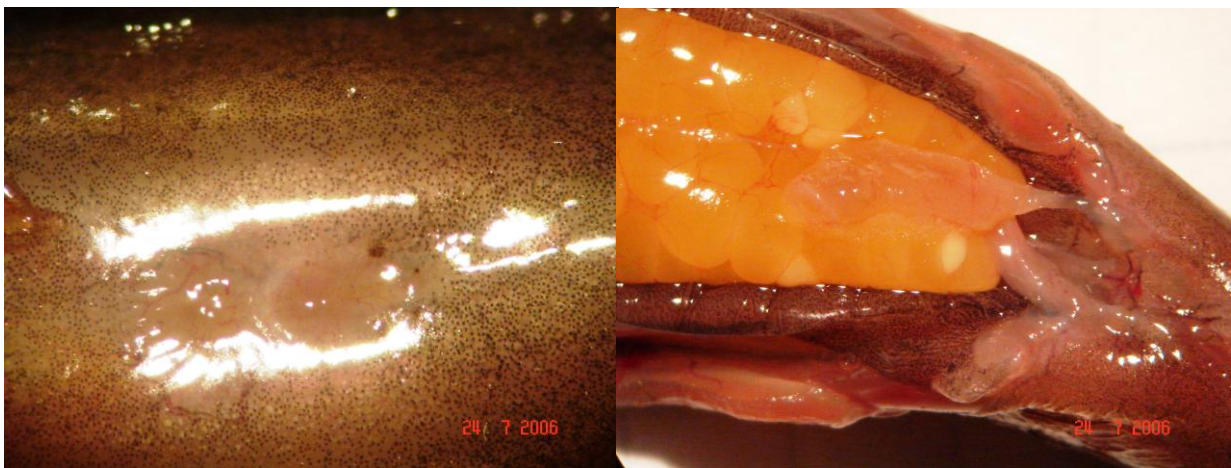
No se han observado hembras con embriones, lo cual indica que a pesar de que es interna la fertilización, la hembra deposita los huevos fertilizados en algún lugar. Hasta ahora no se ha encontrado una sola huevo de preñadilla en los cientos de muestreos que se han hecho. A esta observación se le suma que todos los refugios de este pez están cercanos o adjuntos a los manantiales, por lo tanto se cree que la hembra deposita los huevos en aguas subterráneas donde las bajas concentraciones de oxígeno y la oscuridad son adversas a invertebrados que intenten depredar los huevos. (Vélez & Rueda, 2002).

En cuanto a los órganos reproductivos internos se refiere, se ha observado tanto en los machos como en las hembras que los testículos y los ovarios, respectivamente, se encuentran ocupando gran parte de la cavidad interna y están ubicados longitudinalmente, además la coloración de dichos órganos depende del estado de madurez de los mismos.

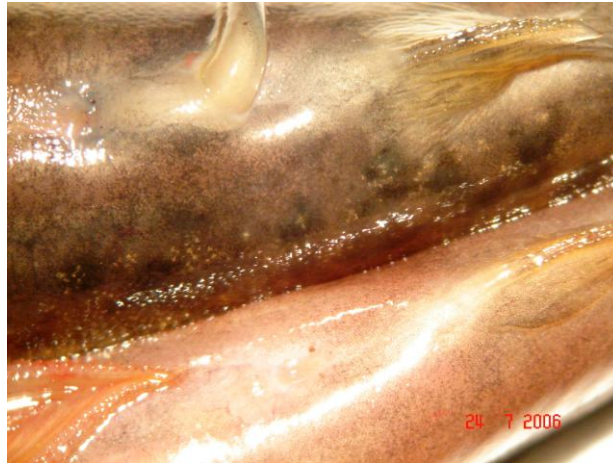




**Fotografía 3.2. Preñadilla macho. Papila genital externa (izq.). Testículos y conductos espermáticos (der.)**



**Fotografía 3.3. Preñadilla hembra. Poro urogenital (izq.). Ovarios (der.)**



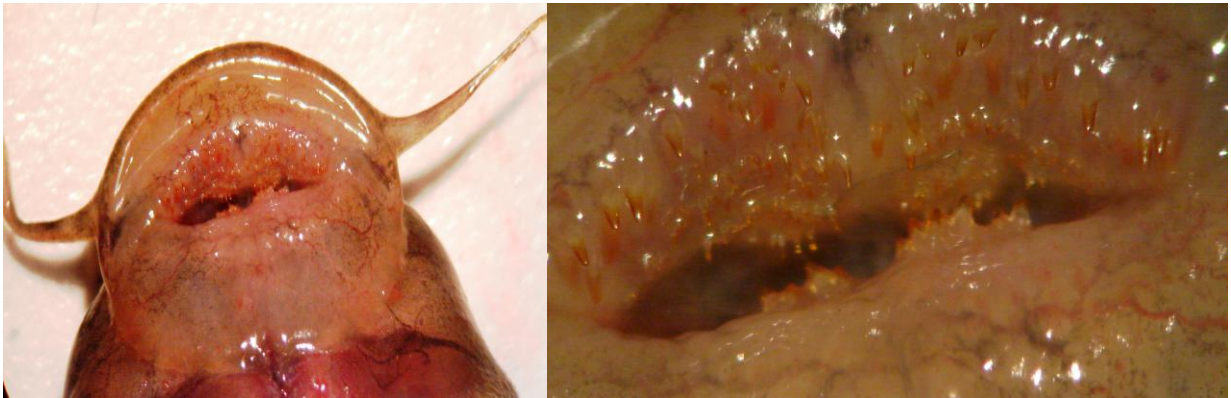
**Fotografía 3.4. Preñadilla macho y hembra. Papila genital y poro urogenital.**

Alguna vez Humboldt indicó que la preñadilla vivía también en aguas subterráneas. Existe mucha probabilidad que sea de esta manera, por lo menos la primera etapa de la vida luego de eclosionar (Vélez & Rueda, 2002).

Cuando el pez eclosiona del huevo mide 1.6 centímetros de longitud y alcanza una talla máxima de 13 centímetros. La preñadilla se alimenta de pequeños invertebrados, dentro de los cuales los anfípodos son la dieta principal. (Vélez & Rueda, 2002).

La preñadilla, al ser un pez siluriforme, permanece la mayor parte del tiempo en el fondo o adherido al sustrato mediante la ventosa en su boca, es decir presenta una conducta bentónica (Vélez & Rueda, 2002). Esta modificación de la boca, los labios prominentes le permite fijarse a las superficies; del labio superior se desprenden dos apéndices a cada lado lo que le da la denominación de pez gato, la cavidad bucal es pequeña. Además, presenta varias hileras de dientes afilados que le permiten raspar, atrapar, adherirse, y engullir el alimento que generalmente se encuentra en la cubierta vegetal de las rocas. Por anatomía y morfología de la boca se concluye que no es una especie depredadora.

La preñadilla no presenta vejiga natatoria. Tampoco tiene escamas pero el cuerpo está recubierto por una película mucosa. Presenta a nivel pélvico un par de aletas que están unidas a manera de “V”. Esta característica, junto con la presencia de la ventosa bucal, permite a la preñadilla desplazarse en tierra y trepar en posición vertical (Vélez & Rueda, 2002).



**Fotografía 3.5. Boca cartilaginosa a manera de ventosa (izq.).  
Varias hileras de dientes.**

Los resultados preliminares de la investigación muestran que la preñadilla mide al primer año de vida entre 4 y 5 centímetros, de 7 a 8 centímetros al segundo año, 10 centímetros al tercer año, y un pez mayor de 11 centímetros sobrepasa los 4 años de edad. Aún no se sabe cuál puede ser la edad máxima que esta especie puede alcanzar (Vélez & Rueda, 2002).

## 2.4. Ecología

### 2.4.1. Factores que afectan el hábitat de la Preñadilla

Existen varias circunstancias que han llevado a la preñadilla a considerarse como una especie en peligro de extinción y a ingresar en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Moreano *et al.*, 2005).

Según los estudios realizados en los hábitats de la preñadilla, *in situ*, se ha verificado que:

1. El hábitat de *Astroblepus* ha sido alterado por la intervención de las comunidades cuando realizan mingas y limpian las acequias.
2. La introducción de la lobina (*Micropterus salmonoides*) en el Lago San Pablo ha provocado la migración de la preñadilla
3. La obtención de agua potable mediante el entubamiento de las acequias disminuye el caudal de los manantiales en los que se refugia la preñadilla.
4. El agua contaminada de las vertientes producto de las actividades ganaderas y de las comunidades cercanas.
5. El ganado que se encuentra cerca de los refugios, compactan, destruyen y eliminan grandes cantidades de excrementos y orina. (Vélez & Rueda, 2002).

### 2.4.2. Ecología de *Astroblepus ubidiai*

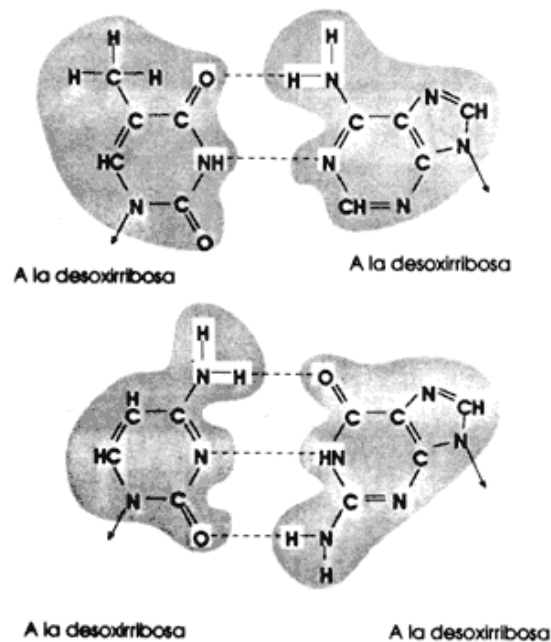
En la actualidad las poblaciones de preñadillas sobreviven en manantiales o nacimientos de agua que desembocan principalmente en el lago. El manantial de El Batán es el refugio con mayor ICH (Índice de Calidad de Hábitat), es decir, que este lugar reúne las mejores condiciones para que la preñadilla habite y se reproduzca (Vélez & Rueda, 2002).

### 3. COMPONENTE GENÉTICO Y HEMOGRAMA

#### 3.1. Estructura del ADN

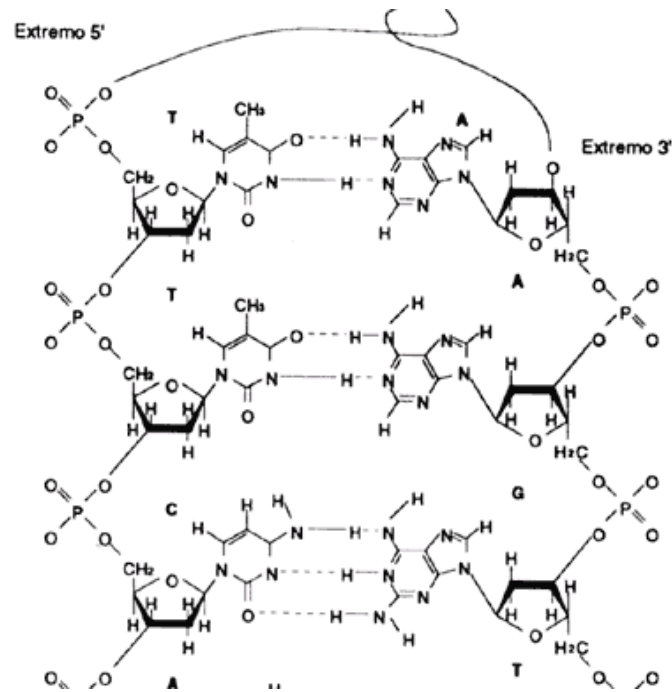
Según Passarge (2004), el descubrimiento de la estructura del ADN de doble hélice y el modelo semiconservativo, realizada en 1953 por Watson y Crick, permitió explicar procesos celulares como la transcripción y la replicación de la información genética, así como la capacidad de mutación, proponiendo y justificando el modelo semiconservativo de la formación de una nueva cadena de ADN.

El ADN es un polímero constituido por nucleótidos constituidos por un grupo fosfato, una desoxirribosa y por dos grupos de bases nitrogenadas, purínicas (adenina(A) y guanina(G)) y pirimidínicas (timina(T) y citosina(C)); formando dos cadenas enrolladas, una alrededor de la otra, a lo largo de un eje común. En esta estructura las bases se disponen enfrentadas y unidas por medio de enlaces de hidrógeno de la siguiente manera: A con T y C con G (Liu, 1998).



**Figura 3. 2. Relación espacial de las Bases Purínicas y Pirimidínicas. Citosina - Guanina y Timina – Adenina (Fuente: Passarge, 2004)**

Las dos cadenas del doble helicoide son antiparalelas: el extremo de una cadena inicia con un grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  unido al carbono 5', mientras que la otra cadena inicia con otro grupo fosfato unido al carbono 3' (**Figura 3.3.**), enfrentadas entre sí, ya que las dos cadenas son exactamente complementarias (Stansfield, 1971).



Fuente: [http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/125/htm/sec\\_5.htm](http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/125/htm/sec_5.htm)

**Figura 3.3. Doble hebra antiparalela de ADN**

Una secuencia de tres pares de bases representa una palabra codificadora (codón) para un aminoácido; una secuencia de codones determina una secuencia de aminoácidos; estos forman un polipéptido. Para ello, la secuencia de bases es transferida (transcripción) desde una cadena de ADN hacia una molécula que transporta la información (mARN, ARN mensajero). La secuencia del mARN sirve como molde para una secuencia de aminoácidos que se corresponde con el orden de los codones (traducción) (Passarge, 2004).

La función principal del ADN es mantener a través de un sistema de claves (código genético) la información necesaria para que las células hijas sean idénticas a las progenitoras (información genética). La información se encuentra en forma de genes, que consisten en un fragmento de ADN que tiene alguna función, generalmente especificar la secuencia de una proteína, pero sólo el 3 - 5% del genoma son secuencias codificantes (exones); el resto del ADN no codificante (intrones), tiene funciones en la regulación de la expresión génica, en la estructura de los cromosomas y su segregación en la división celular (Sudbery, 2004).

El genoma es el conjunto total de moléculas de ADN que se encuentran en las células de un individuo (casi en su totalidad en el núcleo, aunque existe también en mitocondrias y cloroplastos) (Hillis *et al.*, 1996). Cada organismo tiene un genoma diferente, que varía por su contenido total de ADN, nivel de ploidía, número de cromosomas, distancia total de recombinación en el genoma, naturaleza y número de genes funcionales (Liu, 1998).

El ADN codificante y su correspondiente polipéptido son colineales. Una alteración (mutación) de la secuencia de bases del ADN puede dar lugar a un codón diferente; la posición de este cambio en la secuencia de aminoácidos corresponde a la posición de la mutación. Existen tres tipos de mutaciones que involucran un solo nucleótido (mutaciones puntuales): sustitución (intercambio), delección (pérdida) e inserción (adición). Las secuencias que siguen a continuación ya no codifican para un producto génico funcional (Passarge, 2004).







## **3.2. Análisis Cromosómico**

### **3.2.1. Generalidades**

El uso de caracteres cariotípicos, tales como número diploide y haploide, la estructura y tamaño de los cromosomas, etc., permiten una mejor comprensión de la herencia, del flujo genético, de la adaptación y de las mutaciones en relación al medio en que se desenvuelven las poblaciones, así como del parentesco filogenético entre las especies debido a que son caracteres particularmente estables y específicos en cada una de las especies (Sota, 1967). Esta estabilidad del cariotipo permite que sea considerado como un rasgo muy confiable en la determinación específica (García & Uribe, 1988).

### **3.2.2. Cromosomas**

Es el material microscópico constituido del ADN y de proteínas especiales llamadas histonas que se encuentra en el núcleo de las células eucariotas en las cuales los cromosomas se ven como una maraña de hilos delgados, llamada cromatina. Cuando la célula comienza su proceso de división (cariocinesis), la cromatina se condensa y los cromosomas se hacen visibles como entidades independientes. La unidad básica de la cromatina son los nucleosomas. Se suelen representar por pares, en paralelo con su homólogo (Winchester, 1986).

La palabra cromosoma etimológicamente proviene (del griego *chroma*, color y *soma*, cuerpo o elemento) y es cada uno de los pequeños cuerpos en forma de bastoncillos en que se organiza la cromatina del núcleo celular en la mitosis, cada uno de los cuales se divide longitudinalmente, dando origen a dos cadenas gemelas (iguales) (Wikipedia, 2001).

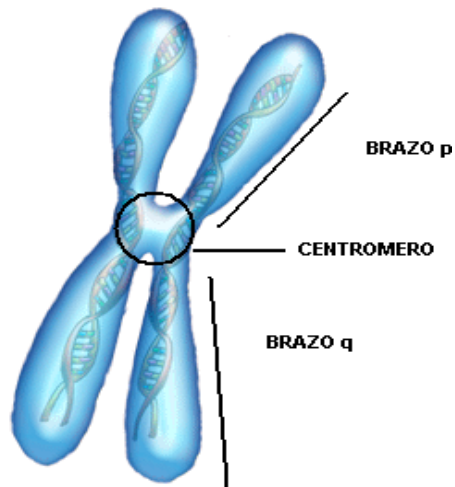
Su número es constante para una especie determinada; en *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris), el estudio del componente citogenético reveló un número diploide de 60 cromosomas, de los cuales: siete pares fueron cromosomas metacéntricos grandes, 7 pares submetacéntricos grandes, 8 pares metacéntricos medianos, 7 pares telocéntricos y 1 par sexual que diferencia a machos de hembras y en *Astroblepus ubidiai* (preñadilla) se encontró que su cariotipo se compone de un número diploide de 52 cromosomas, de los cuales: ocho pares fueron cromosomas submetacéntricos, 11 pares metacéntricos, 6 pares telocéntricos y 1 par sexual que diferencia a machos de hembra. En el caso de *Arius felis* (bagre marino), el número diploide de esta especie es de 54 con una fórmula cromosómica 8 cromosomas metacéntricos, 6 submetacéntricos, 10 acrocéntricos y 3 telocéntricos (García & Uribe. 1988).

Usualmente las especies animales y vegetales tienen un número de cromosomas constante y determinado que constituyen su cariotipo (ley de la constancia numérica de los cromosomas), aunque existen especies con una alta variabilidad cariotípica, no sólo en número sino en forma y tamaño de los cromosomas.(Solomon *et al.*, 1998).

### **3.2.3. Forma de los cromosomas**

La forma de los cromosomas es para todas las células somáticas constante y característica de cada especie. La forma depende fundamentalmente de las constricciones que presente el cromosoma y de su localización en la cromátida.

El cromosoma se encuentra constituido básicamente por el centrómero que divide el cromosoma en un brazo corto o brazo p y un brazo largo o brazo q. Algunos cromosomas presentan satélites en el brazo corto.



Fuente: Wikipedia, 2001

**Figura 3.5. Partes de un cromosoma.**

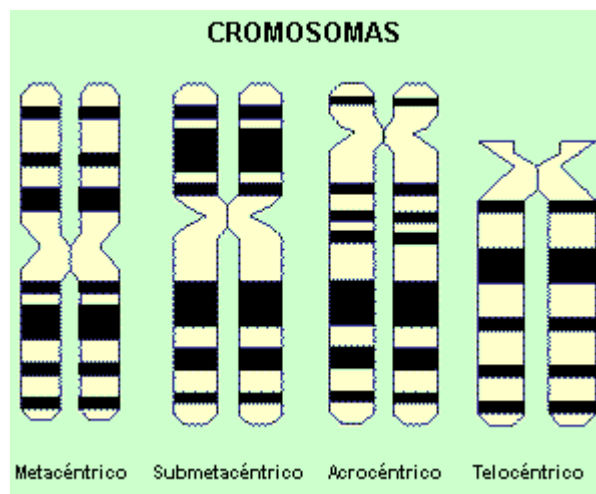
Según la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican en:

**Metacéntricos:** el centrómero se localiza a mitad del cromosoma y los dos brazos presentan igual longitud.

**Submetacéntricos:** la longitud de un brazo del cromosoma es algo mayor que la del otro.

**Acrocéntrico:** un brazo es muy corto (p) y el otro largo (q).

**Telocéntrico:** sólo se aprecia un brazo del cromosoma al estar el centrómero en el extremo.



Fuente: Wikipedia, 2001

**Figura 3.6. Formas de los cromosomas.**

### **3.2.4. Cromosomas Sexuales**

En muchos organismos, uno de los pares de los cromosomas homólogos es distinto al resto, realizando la determinación genética del individuo. A estos cromosomas se les llama cromosomas sexuales o heterocromosomas e incluso gonosomas, porque determinan el sexo por la proporción de los dos cromosomas homólogos (Solomon *et al.*, 1998).

#### **3.2.4.1. Sistema de determinación XY**

Es propio del ser humano y muchos otros animales. Las hembras, siendo XX, darán gametos iguales con cromosoma X, sexo homogamético y los machos, siendo XY, darán dos tipos de gametos, uno con el cromosoma X y otro con el cromosoma Y. La probabilidad de que en la fecundación, al unirse los gametos, resulte una combinación XX (hembra) o XY (macho) es del 50%.

#### **3.2.4.2. Sistema de determinación XX/XY**

En el caso de los salmónidos y entre ellos la truchca arco iris, se utiliza este sistema de determinación de sexo similar al del ser humano, sin embargo se diferencia en muchos detalles según la especie y no es una norma universal, por ejemplo, las hembras pueden ser homogaméticas y los machos heterogaméticos, esto sucede en la mosca de la fruta, en aves, mariposas y algunos peces, se invierte esta situación (Solomon *et al.*, 1998); cabe recalcar que también existe influencia del ambiente, de hormonas que pueden alterar el sexo de los peces (Díaz & Neira, 2005).

### **3.2.4.3. Sistema de determinación XO**

Otras especies (peces, insectos, anfibios) que no tienen el cromosoma Y, determinándose el sexo por el número de cromosomas X, macho XO y hembra X.

### **3.2.5. Cariotipo**

Es la forma, cantidad y tamaño de los cromosomas. Aunque la diferencia entre un individuo y otro es la información especificada en los genes de estos cromosomas.

#### **3.2.5.1. Cariotipo Clásico**

Existen varios métodos para la visualización mediante microscopía óptica de los cromosomas. Los procedimientos más clásicos consisten en la tinción con sustancias como la mostaza de quinacrina, que permite la observación de las bandas Q; giemsa, que permite la observación de las bandas G, R o C (dependiendo del tratamiento que se realice con el ADN). Este bandeo característico de cada uno de los cromosomas está relacionado con regiones de eucromatina (bandas R), heterocromatina facultativa (bandas G), heterocromatina constitutiva (bandas C). No obstante existen distintas visiones del motivo por el cual se pueden hacer estas correlaciones (Solomon *et al.*, 1998).

#### **3.2.5.2. Cariotipo Espectral**

El análisis espectral de los cariotipos (o SKY) se trata de una tecnología de citogenética molecular que permite el estudio y visualización de los pares de cromosomas en forma simultánea. Los cromosomas se marcan con diferentes colores fluorescentes. El análisis espectral de la señal fluorescente consigue la discriminación (Solomon *et al.*, 1998).

### **3.2.5.3. Protocolo para la obtención de Células Mitóticas (Martino, 2004)**

Se usan técnicas air drying modificadas por Foresti & Cols (1988).

#### Preparación de Cromosomas mitóticos

- ⊕ Inyectar vía intraperitoneal una solución acuosa de colchicina al 0.08% en proporción de 1ml/100gr de peso del animal.
- ⊕ Dejar en el acuario al pez con oxígeno, por un período de 1 – 1h30 horas; sacrificar inmediatamente al animal y retirar los órganos deseados.
- ⊕ Lavar rápidamente el fragmento de tejido que se va a utilizar en una solución hipotónica de KCl 0.075M.
- ⊕ Transferir el material a un tubo de vidrio con 5 - 6 ml de KCl 0.075M.
- ⊕ Separar el material con ayuda de pinzas de disección.
- ⊕ Resuspender cuidadosamente el material y transferir la suspensión celular a un tubo de centrífuga, los pedazos de tejido son descartados.
- ⊕ Incubar en una estufa a 37°C por 30 minutos.
- ⊕ Agregar 5 gotas de fijador Carnoy (Metanol: Acido. Acético (3:1)) como prefijado y mezclar cuidadosamente con una pipeta pasteur. Dejar 5 minutos.
- ⊕ Adicionar con cuidado 6 ml de fijador, dejando escurrir por las paredes del tubo.
- ⊕ Centrifugar las suspensiones por 10 minutos a 1000 rpm.
- ⊕ Repetir el paso anterior 3 veces.
- ⊕ Conservar las muestras en refrigeración durante 12 horas.
- ⊕ Sumergir las placas portaobjetos en etanol; con una pipeta pasteur dejar caer unas gotas en la placa portaobjetos, fijar en un mechero.
- ⊕ Teñir las placas en una solución de 30 ml de colorante giemsa y 90 ml de agua destilada por 20 minutos o más.
- ⊕ Observar al microscopio los cromosomas metafásicos
- ⊕ Armar el cariotipo.

### **3.3. Hemograma**

Los exámenes hematológicos constituyen actualmente, para la acuicultura, una de las herramientas más precisas en la determinación del estado fisiológico, nutricional y para el diagnóstico rápido y acertado de enfermedades, sobre todo aplicada a especies en confinamiento.

Los métodos más comúnmente empleados son los que miden el nivel de hemoglobina, el hematocrito y el recuento eritrocitario, además de estudios rutinarios sobre la morfología y distribución de los elementos celulares formados en la sangre periférica (FAO, 1987).

Cuellar citado por Acosta (2006), indica que la respuesta inmunitaria de los peces es primitiva en relación a las aves y mamíferos, aunque los mecanismos inmunológicos no son diferentes. La producción de anticuerpos depende de la temperatura del agua y factores de comportamiento asociados a la densidad de población, manejo, iluminación, jerarquía social y en general a los fenómenos de estrés. En algunas especies no se detectan anticuerpos por debajo de los 10° C (Acosta, 2006).

#### **3.3.1. Hemoglobimetría**

Es la determinación del contenido de hemoglobina en la sangre y muy importante en el diagnóstico de algunas condiciones patológicas, es también un indicador de la condición fisiológica y nutricional del pez. Las técnicas más precisas se fundamentan en la determinación del contenido férrico de la sangre. Al ser estas técnicas poco prácticas, en las piscifactorías se utiliza el método de cianmethemoglobina es una técnica bastante confiable, dado que la oxihemoglobina, carboxihemoglobina, methemoglobina y hemoglobina reducidas se convierten en cianmethemoglobina, cuya concentración se mide colorimétricamente.

Las hemoglobinas se oxidan por la acción de ferricianuro a methemoglobina, la cual queda convertida en cianmethemoglobina por la acción de cianuro (FAO, 1987).

La determinación de la concentración se hace mediante la lectura en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 540 nm y se expresa de la manera convencional como g Hb / 100 ml de sangre total. También existen otros métodos para calcular los resultados como son: el patrón artificial que utiliza una solución con una concentración de hemoglobina conocida y cuya longitud de onda a 540 nm le corresponde una determinada cantidad de hemoglobina en 100 ml. Después se mide en el espectrofotómetro cada una de las muestras, y se aplica la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{\text{Densidad óptica de la muestra} \times \text{Hb g\% del patrón}}{\text{densidad óptica del patrón}} = \text{Hb g 100 ml de la muestra diluida}$$

Fuente: FAO, 1987

donde la concentración de hemoglobina del patrón está indicada en cada envase del producto comercial. Para determinar la concentración de hemoglobina en cada muestra se utiliza el factor de dilución y se obtiene el contenido de hemoglobina en 100 ml de sangre total (FAO, 1987).

### **3.3.2. Hematocrito**

El hematocrito es el volumen ocupado por los elementos celulares en 100 ml de sangre total. La técnica se fundamenta en la centrifugación de las células en una masa compacta, cuando la altura de la masa de células se expresa como un porcentaje de la altura total de la columna de células y plasma.



La técnica indica que deben extraerse las muestras y deben ser introducidas en tubos capilares, en los cuales uno de sus extremos esté sellado, luego se centrifuga por 5 minutos a 3500 rpm. Después se compara la altura de las masas celulares de cada tubo capilar en la tabla hematocrítica, o se hace una extrapolación.<sup>3</sup>

### **3.3.3. Recuento Eritrocitario**

Es determinar el número exacto de hematíes en la sangre. Hay que tomar en cuenta que morfológicamente los eritrocitos de los peces son diferentes a otros animales, pues éstos son nucleados.

La técnica dicta que la muestra sanguínea anticoagulada debe estar bien mezclada antes de efectuarse el recuento propiamente dicho. Se utiliza una pipeta cuenta-glóbulos rojos, con la cual se lleva la sangre hasta la marca '0,5'. La parte externa de la pipeta se limpia cuidadosamente y se ajusta la columna de sangre en la línea '0,5'. Se llena la pipeta con suero fisiológico al 0.85%. Tapando la pipeta con el pulgar y el dedo anular, se agita suavemente con la mano para asegurar una mezcla uniforme.

Una vez efectuada la mezcla y dilución de la sangre, se prepara una cámara cuenta-glóbulos de tipo Neubauer.

Se deshecha las primeras gotas del contenido de la pipeta. Una gota de la dilución se agrega a la cámara cuenta-glóbulos, dejándose correr por capilaridad hasta llenar la cámara. La cantidad de eritrocitos se cuentan en cinco (5) campos de la cámara cuenta-glóbulos (Reina, 2003).

---

<sup>3</sup> Giacometti, J. 2006. Análisis Sanguíneo (entrevista). Sangolquí. Facultad de Ciencias Agropecuarias

Para calcular el número de eritrocitos/mm<sup>3</sup> de sangre total, se utiliza la siguiente fórmula, donde N representa el número de eritrocitos/mm<sup>3</sup>.

$$N = \frac{4000}{80} \times 200$$

Esta fórmula se fundamenta en las consideraciones que a continuación se detallan:

Dilución de la sangre	= 1:200
Profundidad de la cámara cuenta-glóbulos	= 0.1 mm
Cada cuadro pequeño	= 1/400 mm <sup>2</sup>
Número de cuadros pequeños contados	= 80

En la práctica rutinaria, es suficiente multiplicar × 10 000 el número total de eritrocitos en los cinco (5) grupos de pequeños cuadros. (FAO, 1987).

La trucha arco iris es la especie más representativa de la producción acuícola intensiva por lo que ha sido tan estudiada, se han obtenido datos hematológicos importantes.

Valores hematológicos normales de trucha arco iris son los siguientes:

Hemoglobina:	6-18 Hb/100 mL
Hematocrito:	36% mínimo
Contaje Eritrocitario:	800 000 – 1'200 000 mm <sup>3</sup> . <sup>4</sup>

---

<sup>4</sup> IDROBO, L. 2005. CENIAC (Centro Nacional de Investigaciones Acuícolas). MICIP. Ecuador (referencia verbal).

Según Ortiz *et al.*, 2006 en la preñadilla se han encontrado valores hematológicos que se muestran a continuación:

Hemoglobina	7.7 ± 1.3 g/dl
Hematocrito	28 ± 5.2 %
Contaje Eritrocitario	522 666.6 ± 102 378.3 eritrocitos/ ml

#### **4. MARCADORES MOLECULARES**

##### **4.1. Variación Genética y Polimorfismo**

Uno de los aspectos que caracterizan a la evolución, es la variación; es decir que la selección natural cambiará las frecuencias de los distintos tipos dentro de una especie, sólo si hay variantes que seleccionar. Es así como, la variación intra e interpoblacional se origina por la existencia de varios alelos en los diferentes loci génicos (Fernández *et al.*, 2002).

Según Nussbaum *et al.* (2004), la secuencia del ADN nuclear es idéntica en cerca del 99%, y es esa pequeña fracción diferente entre individuos la responsable de la variabilidad genética; mientras algunas diferencias tienen poco o ningún efecto sobre el fenotipo, otras son responsables directas de enfermedades.

La mayoría de las variaciones se dan en todas las poblaciones con frecuencias similares, mientras que algunas variantes alélicas están restringidas a determinadas poblaciones, aunque no se presenten en todos sus miembros. Otros alelos se presentan en todos los grupos, pero pueden mostrar diferencias en las frecuencias entre los grupos de la población, pudiendo ser alelos causantes de enfermedades, así como marcadores genéticos desde el punto de vista de la selección, para lo cual el locus marcador debe exhibir experimentalmente una

variación detectable en los individuos a prueba, en un test de población tales como: Marcadores Morfológicos, Marcadores en base a proteínas y Marcadores de ácidos nucleicos (Liu, 1998; Nussbaum *et al.*, 2004).

El primer tipo de variación estudiada en las poblaciones humanas, fue el de los polimorfismos de genes nucleares codificadores de proteínas. Posteriormente, aparecieron otros tipos de variabilidad genética como los polimorfismos moleculares de tipo RFLP, elementos Alu, Microsatélites y Minisatélites utilizados en los mapeos genéticos. Otros polimorfismos interesantes son los que afectan al ADN mitocondrial y al cromosoma Y, que se transmiten sin recombinación (Sudbery, 2004).

Las poblaciones naturales muestran una gran cantidad de variación manifestada en diferentes niveles, originando polimorfismos (del griego, *poli* = muchas; *morphos* = formas), definidos como una variación heredada detectable en un locus, los cuales pueden ser morfológicos: afectando el fenotipo de los individuos en una misma población (Fernández *et al.*, 2002); un ejemplo representativo lo constituye el patrón del color de las vainas de las alas del escarabajo asiático (*Harmonia axyridis*), cuya área de distribución es extensa, y en la que pueden distinguirse múltiples variantes, las cuales se deben a distintos alelos del mismo gen (Passarge, 2004).

El polimorfismo bioquímico, resultado de las diferencias individuales en las secuencias de las bases nitrogenadas del ADN, conducen a cambios en los codones, pudiendo incorporarse un aminoácido diferente en el sitio correspondiente a la proteína; existen además polimorfismos inmunológicos, basados en las distintas especificidades antigénicas determinadas por diversos loci, así como polimorfismos cromosómicos, de acuerdo a las distintas constituciones cromosómicas de cada individuo en una misma población (Liu, 1998; Fernández *et al.*, 2002; Passarge, 2004; Ayala citado por Passarge, 2004).

Una medida de la variación genética de una población es la proporción de loci polimórficos, que son considerados como tales si hay más de una forma alélica en dicha población en una frecuencia significativa mayor del 1% (polimorfismo genético); otros alelos localizados en regiones no codificantes, no llegan a tener consecuencias en el funcionamiento de ningún gen (Fernández *et al.*, 2002).

Cabe considerar que, un loci con dos alelos es tan polimórfico como uno que presente múltiples alelos, por lo que el estudio y caracterización de todos estos polimorfismos dentro y entre las poblaciones es importante, ya que de una forma alélica en la población con una frecuencia significativa mayor del 1%, tiene una relación directa con el diseño e interpretación de los estudios poblacionales en búsqueda de alelos de riesgo (Nussbaum *et al.*, 2004; Sudbery, 2004).

Según Passarge (2004), un locus génico se define como polimorfo si el/los alelo(s) raro(s) tiene(n) una frecuencia de al menos 2%.

El análisis de polimorfismos de ADN, es el sistema más eficaz para la identificación de individuos, análisis de filiación y proximidad genética y detección de genes de interés comercial o causantes de enfermedades, por lo que constituyen los más eficientes marcadores genéticos para identificar alelos en un locus génico y determinar su origen paternal, o en el caso de genoma mitocondrial, que responde a un modelo de herencia materna, la reconstrucción de los árboles filogenéticos y determinar un ancestro común (Cejas, 2000).

El uso de enzimas de restricción puso de manifiesto la existencia de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) que son polimorfismos de ADN originados por cambios en la secuencia diana de enzimas de restricción (Fernández *et al.*, 2002).

Otros polimorfismos del ADN son los SNP (Single Nucleotide Polymorphism), que son variantes alélicas que difieren en un solo nucleótido en una posición específica, y que no requieren la realización de una electroforesis en gel, sino que pueden visualizarse mediante Southern blot, y son usados para estudios de ligación y tratar enfermedades hereditarias (Pasarge, 2004; Brookes citado por Butler, 2005), y los VNTRs (Variable Number Tandem Repeats), es decir repeticiones en tándem en número variable, que incluyen a Minisatélites y Microsatélites, éste último también denominado como STR (Short Tandem Repeats), que son variantes alélicas que difieren en el número de repeticiones en tándem de secuencias de nucleótidos cortas no codificantes (Cejas, 2000; Claros, 2002).

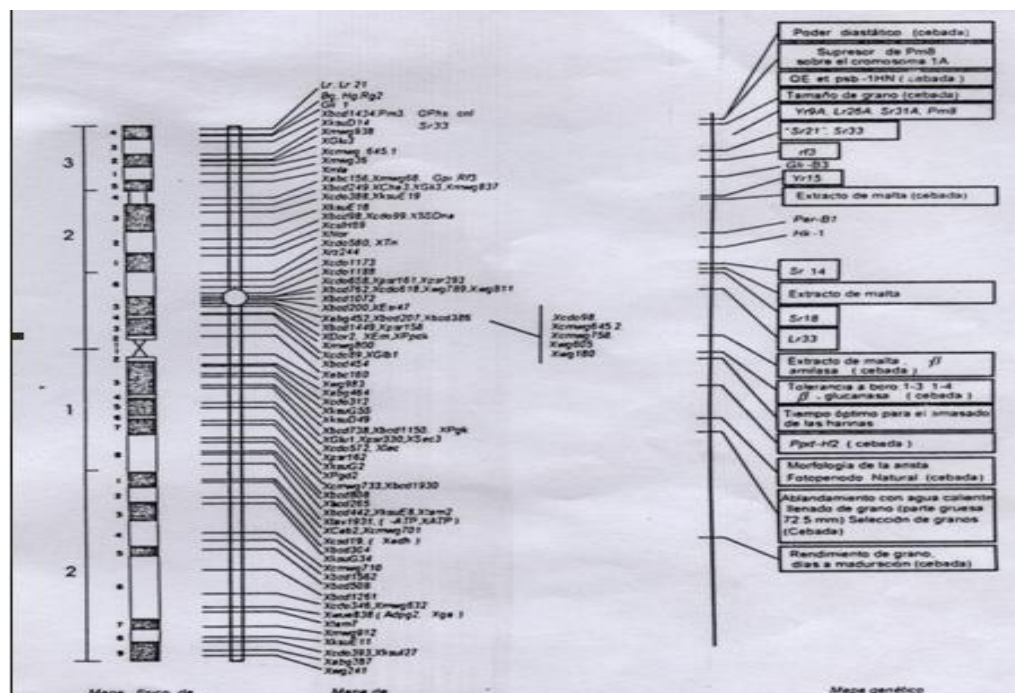
La mayor parte del ADN de los mamíferos consiste en secuencias repetidas. Por ejemplo, el genoma humano se puede clasificar en las siguientes características:

1. ADN de secuencia única, o con pocas copias de ADN (aprox. 45% del total). Esta clase contiene las secuencias que forman los genes. Las regiones codificantes corresponden a un 1.5% del total del genoma. El ADN restante corresponde a intrones o las regiones espaciadoras (secuencias sin aparente función que separan los genes).
2. ADN moderadamente repetitivo, constituido por secuencias repetidas entre  $10^2$  y  $10^5$  copias por genoma (45% del total).
3. ADN altamente repetitivo, formado por secuencias repetidas hasta  $10^6$  copias por genoma (casi un 10% del total) (Puertas, 1999; Sudbery, 2004).

## **4.2. Mapeo Genético**

En un inicio, los estudios de mapeo se concentraron en la discreción de rasgos físicos de acuerdo a la herencia Mendeliana, ya que algunos rasgos morfológicos a menudo corresponden con los genes que controlan dichos rasgos (Liu, 1998).

Un mapa genético describe la posición de genes o marcadores genéticos presentes en los cromosomas (Russell, 1992), que pueden ser mapas físicos, que describen la posición de un locus génico y su distancia hacia otros genes en el mismo cromosoma en valores absolutos, o de ligamiento, que son construidos en base a distancias de recombinación que resultan del entrecruzamiento o intercambio físico de ADN entre los cromosomas homólogos de los padres durante la meiosis (**Figura 3.7.**) (Russell, 1992; Miesfeld, 1999; Davis & Hetzel, 2000; Passarge, 2004).



Fuente: Davis & Hetzel, 2000  
**Figura 3.7. Mapeo Genético. A la izquierda se representa el Mapa Físico, al centro el Mapa de Ligamiento Genético, y a la derecha el Mapa de Genes y QTL's**

El mapa genético da la posición relativa de los loci génicos de acuerdo con la frecuencia de recombinación, expresada en unidades de recombinación o centimorgans (cM), que corresponde a una frecuencia de recombinación del 1% (Passarge, 2004).

Según Sudbery (2004), un cM se define como la fracción de recombinación del 0.01 es decir la aparición de 1 gameto recombinante entre 100, mientras que los 99 restantes tendrán la configuración parental. Físicamente, 1 cM corresponde a una secuencia de ADN de entre 0.7 y 1 Mb, pero no hay una relación fija entre las distancias genéticas y físicas.

Según Miesfeld (1999), el mapeo genético por recombinación, es un análisis estadístico de los patrones de herencia de los genes y sus variantes (alelos), basado en las frecuencias de recombinación entre los genotipos paterno y materno; sin embargo, estas frecuencias no son uniformes en todas las regiones del genoma, por lo que se utilizan funciones de mapeo para corregir estos valores (Haldane, 1919; Kosambi, 1944).

### **4.3. Marcadores Moleculares**

Los marcadores moleculares son biomoléculas, fragmentos o secuencias que se pueden relacionar con un rasgo genético y poseen un patrón de herencia caracterizable (DOE Human Genome Program, 1992). Estas pueden ser proteínas (antígenos e isoenzimas) y ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida) (Montaldo & Meza-Herrera, 1998; Davis & Hetzel, 2000).

Según Ferreira & Grattapaglia (1998), marcadores moleculares son cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada. A diferencia de los marcadores morfológicos y bioquímicos, no son afectados por el ambiente, no varían con la edad del individuo, y pueden ser regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones) (Botstein *et al.*, 1980).



Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico (Miesfeld, 1999).

Estos marcadores se distinguen por ser variaciones genéticas que caracterizan poblaciones y subpoblaciones, denominados polimorfismos. Cuando varios marcadores se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables). Estas regiones del genoma pueden controlar caracteres cuantitativos tales como resistencia a enfermedades, producción, conversión alimenticia y cualquier característica que posea una base genética. Estos marcadores se utilizan para realizar Mapas Genéticos por ligamiento, los cuales permiten localizar QTLs de interés en el genoma (Moreno, 2002; López *et al.*, 2003).

Para ser útil, un marcador molecular debe reunir las siguientes propiedades:

1. Que sea altamente polimórfico, es decir, que permita claramente diferenciar dos individuos;
2. Que sea codominante, para que permita discriminar un individuo homocigoto de un heterocigoto;
3. Que este distribuido a través del genoma;
4. Que no presente efecto pleiotrópico, es decir, que un gen no afecte más de una característica;
5. Que sea de fácil y rápida ejecución, con mira a una posible automatización;
6. Que tenga alta reproducibilidad;
7. Que permita el fácil intercambio de datos entre los laboratorios.

(Roca y Ramírez, 1999)

En el **Cuadro 3.2.**, se muestran las principales características, ventajas y desventajas que presentan algunos de los más importantes marcadores moleculares, y en el **Cuadro 3.3.**, se indican las características operativas y técnicas de cada una de las técnicas.

**Cuadro 3.2. Características, ventajas y desventajas que presentan algunos marcadores moleculares**

	<u>Abundancia</u>	<u>Nivel de Polimorfismo</u>	<u>Especificidad de locus</u>	<u>Codominancia de Alelos</u>	<u>Reproducibilidad</u>	<u>Laboriosidad</u>
<u>Aloenzimas</u>	bajo	bajo	Si	Si	Alto	bajo
<u>RFLP</u>	alto	medio	Si	Si	Alto	alto
<u>Minisatellites</u>	medio	Alto	No / Si	No / Si	Alto	alto
<u>secuenciamiento PCR</u>	bajo	bajo	Si	Si	Alto	alto
<u>RAPD</u>	alto	medio	No	No	Bajo	bajo
<u>Microsatellites</u>	alto	Alto	Si	Si	Alto	bajo
<u>ISSR</u>	medio - alto	medio	No	No	medio – alto	bajo
<u>SSCP</u>	bajo	bajo	Si	Si	Medio	bajo - medio
<u>CAPS</u>	bajo	bajo - medio	Si	Si	Alto	bajo - medio
<u>SCAR</u>	bajo	medio	Si	Si / No	Alto	bajo
<u>AFLP</u>	alto	medio	No	No / Si	Alto	medio
<u>TaqMan</u>	bajo		Si	No / Si	Alto	bajo

Fuente: Melcher, 2006

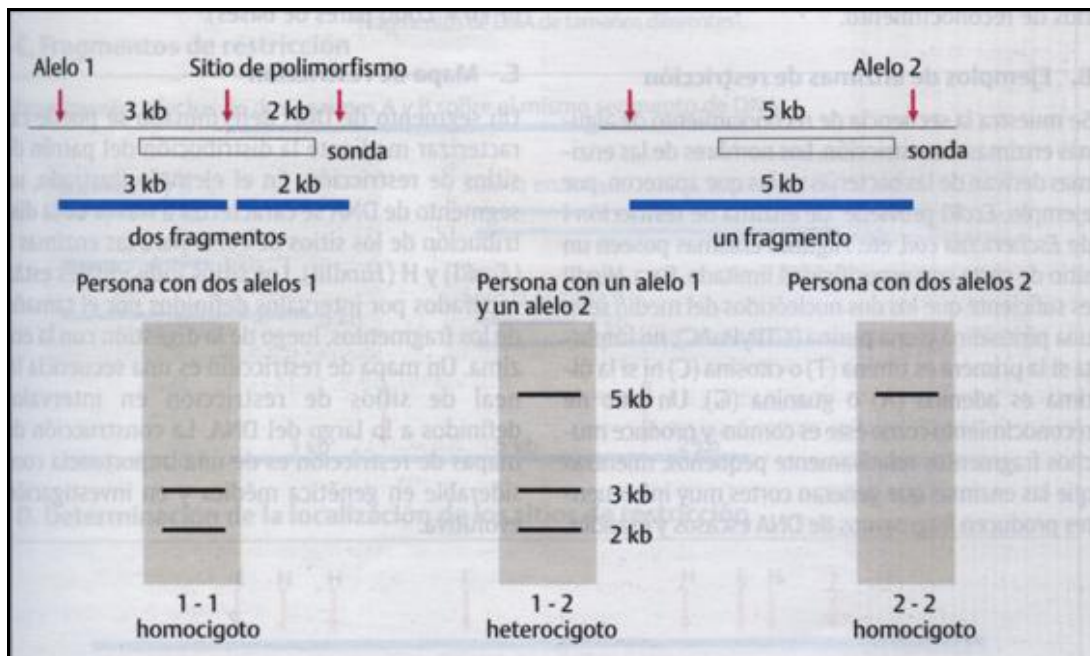
**Cuadro 3.3. Características operativas y técnicas de algunas técnicas de Marcadores Moleculares**

	<u>Demanda Técnica</u>	<u>Costo Operacional</u>	<u>Costo para Desarrollarlo</u>	<u>Cantidad de ADN requerido</u>	<u>Automatización</u>
<u>Aloenzimas</u>	bajo	bajo	Bajo	-	No
<u>RFLP</u>	alto	alto	medio - alto	alto	No
<u>Minisatellites</u>	alto	alto	medio - alto	alto	No
<u>secuenciamiento PCR</u>	alto	alto	Alto	bajo	Si
<u>RAPD</u>	bajo	bajo	Bajo	bajo	Si
<u>Microsatellites</u>	bajo - medio	bajo - medio	Alto	bajo	Si
<u>ISSR</u>	bajo - medio	bajo - medio	Bajo	bajo	Si
<u>SSCP</u>	medio	bajo - medio	Alto	bajo	No
<u>CAPS</u>	bajo - medio	bajo - medio	Alto	bajo	Si
<u>SCAR</u>	bajo	bajo	Alto	bajo	Si
<u>AFLP</u>	medio	medio	Bajo	medio	Si
<u>TaqMan</u>	bajo		Alto	bajo	Si

Fuente: Melcher, 2006

### 4.3.1. (RFLPs) Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción

Esta tecnología expresa diferencias en sitios específicos del ADN que fueron reconocidos por enzimas de restricción particulares (endonucleasas), resultando fragmentos de distinto peso molecular (Grodzicker *et al.*, 1974; Botstein *et al.*, 1980; Valadez & Kahl, 2000). Los RFLP se basan en la presencia o ausencia de una secuencia para una enzima de restricción, generalmente debido a un polimorfismo en una sola base (Sudbery, 2004). Como resultado, la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción puede estar presente en un cromosoma pero no en otro. En este caso los tamaños de los fragmentos de restricción difieren en ese sitio (Passarge, 2004).



Fuente: Passarge, 2004

**Figura 3.8. RFLPs. Dos segmentos de ADN de 5 kb; en uno hay un sitio de restricción en el medio (alelo 1); en el otro (alelo 2) está ausente. Con un Southern blot puede determinarse si en esta localización un individuo es homocigoto 1-1 (dos alelos 1, ausencia de fragmento de 5 kb), heterocigoto 1-2 (un alelo de cada uno, 1 y 2), u homocigoto 2-2 (dos alelos 2). Si la mutación existe en el cromosoma que lleva el fragmento de 5 kb, la presencia del fragmento indica la presencia de la mutación.**

Los fragmentos resultantes son separados de acuerdo a su longitud en un gel de electroforesis y posteriormente son transferidos a un soporte sólido (membrana de nylon o nitrocelulosa) en el cual los fragmentos de interés son identificados por hibridación con sondas de ADN marcadas con radioisótopos. La visualización se realiza por autoradiografía (Beckmann & Soller, 1986).

Según Liu (1998), la detección de los RFLPs se basa en el uso de enzimas de restricción, cada una de las cuales, corta una secuencia específica en la cadena de ADN. También llamadas como endonucleasas que son de origen bacteriano; reconocen y cortan solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas) (Yunis & Yunis, 2002). En el **Cuadro 3.4.**, se pueden observar las principales endonucleasas y sus sitios de restricción.

**Cuadro 3. 4. Algunas enzimas de restricción y sus sitios de restricción**

Enzima	Microorganismo	Sitio de Restricción
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5' GAA TTC 3' 3' CTT AAG 5'
EcoRV	<i>Escherichia coli</i>	5' GAT ATC 3' 3' CTA TAG 5'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' AAG CTT 3' 3' TTC GAA 5'
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' GG CC 3' 3' CC GG 5'
HpaI	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5' GTT AAC 3' 3' CAA TTG 5'
HpaII	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	5' CC GG 3' 3' GG CC 5'
BamHI	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	5' G GATCC 3' 3' CCTAG G 5'
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5' AG CT 3' 3' TC GA 5'

Fuente: Liu, 1998; Puertas, 1999; Valadez & Kahl, 2000; Fernández *et al.*, 2002; Sudbery, 2004

El problema de los RFLP es que la técnica requiere grandes cantidades de ADN, sondas pre-establecidas y elevados costos, por lo que ha sido reemplazada (Puertas, 1999; Cejas, 2000; Valadez & Kahl, 2000 y Sudbery, 2004).

#### **4.3.2. (MAAP) Perfiles Múltiples y Arbitrarios de Amplificación**

Técnicas que emplean oligonucleótidos arbitrarios para generar huellas complejas o patrones genéticos (Kang Fu Yu citado por Erazo, 2006).

##### **4.3.2.1. (RAPD) Polimorfismo del ADN Amplificado Aleatoriamente**

RAPD Random Amplified Polymorphism DNA (por sus siglas en inglés), es una técnica versátil que utiliza iniciadores de secuencias arbitrarias que amplifican por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma (Williams *et al.*, 1990).

Esos iniciadores usualmente tienen un contenido de GC mayor a 50% y no contienen secuencias repetidas inversas internas (autocomplementarias) y se pegan a distintos sitios en un genoma de existirlos (Valadez & Kahl, 2000).

Los fragmentos amplificados resultantes pueden ser separados en geles de agarosa o poliacrilamida, con el fin de obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos (Dinesh *et al.*, 1995).

Esta técnica es cómoda, rápida, requiere poco ADN, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia. Sin embargo los fragmentos amplificados no suelen corresponder a ADN ligado a algún carácter, sino redundante, y su repetibilidad puede variar si las condiciones experimentales cambian levemente (Benecke, 1998; López *et al.*, 2003).

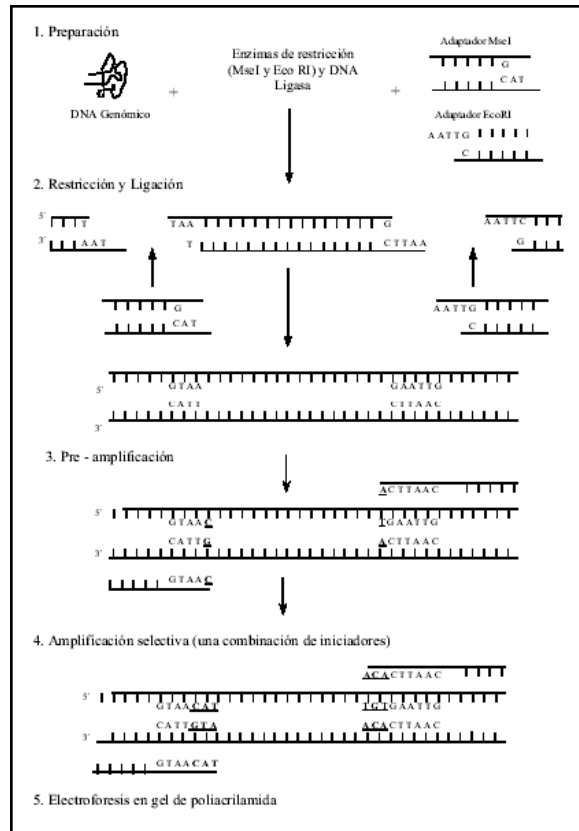
#### **4.3.2.2. (AP-PCR) PCR con oligonucleótidos arbitrarios**

Similar a los RAPDs. Los oligonucleótidos han de ser largos (no menos de 20 pb), y la PCR consta de dos de ciclos de baja astringencia (poco específicos) que permiten la polimerización de una batería de fragmentos característicos de cada variedad. Esta fase va seguida de ciclos de alta astringencia para amplificar (visualizar) específicamente las bandas anteriores. Los fragmentos amplificados se pueden migrar en un gel de agarosa para observar las grandes diferencias entre especies, o bien se puede marcar radiactivamente y migrar en gel de poliacrilamida para obtener resultados mucho más finos y precisos. Existe una variación denominada DAF (Huellas dactilares por amplificación de DNA) que utiliza oligonucleótidos de 5 a 15 bases, pero a concentraciones altas (3 – 30  $\mu\text{M}$ ), respecto de otras metodologías (0.3 – 3  $\mu\text{M}$ ) (Valadez & Kahl, 2000; Claros Díaz, 2002).

#### **4.3.3. (AFLP) Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados**

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism (por sus siglas en inglés), es una técnica desarrollada por Vos *et al.*, (1995); combina el uso de enzimas de restricción e iniciadores (oligonucleótidos) para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad (Erazo, 2002).

El ADN es cortado con dos enzimas de restricción, una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente. A los fragmentos se les ligan oligonucleótidos de extremos compatibles con las enzimas usadas y se amplifican y analizan los fragmentos resultantes por PCR. Una ventaja especial de esta técnica es la de generar muchos marcadores moleculares de bajo peso en una sola reacción, por esta razón el resultado debe resolverse en geles de electroforesis de poliacrilamida, capaces de detectar los pequeños fragmentos (**Figura 3.9.**) (Savelkoul *et al.*, 1999).



Fuente: Erazo, 2002

**Figura 3.9. Descripción de la técnica AFLP**

Esta técnica necesita de ADN de alta calidad para su desarrollo, para lo cual el método de extracción de CTAB es uno de los más recomendados (Stewart & Via, 1993). Para la visualización de los fragmentos se han desarrollado métodos como la tinción de plata (Briard *et al.*, 2000; Mano *et al.*, 2001) y la tinción con bromuro de etidio (Scott *et al.*, 1998) que permiten visualizar los fragmentos producidos con alta resolución.

Los AFLPs, son marcadores dominantes, lo cual no permite diferenciar individuos homocigotos de heterocigotos. El poder de la técnica de AFLP se basa en las variaciones genéticas que existen entre especies, variedades o cultivares estrechamente relacionados. Estas variaciones en su secuencia de DNA son explotadas por esta técnica para la obtención rutinaria de “fingerprintings” (huellas dactilares) de un genotipo en particular (Claros Díaz, 2002).

#### **4.3.4. (VNTR) Repeticiones en Tándem en Número Variable**

Regiones de ADN altamente repetitivo que consiste en unas cortas secuencias repetidas en el genoma hasta un millón de veces (Sudbery, 2004).

##### **4.3.4.1. Minisatélites**

Consisten en secuencias de entre 10 y 100 pb de longitud, repetidas en tándem en un número variable, alcanzando una longitud de entre 0.5 y 40 kb. Aunque pueden estar presentes en cualquier parte de los cromosomas, tienden a localizarse preferentemente en los telómeros. Pueden utilizarse como marcadores en la construcción de mapas genéticos a pesar de su tendencia a localizarse cerca de los telómeros, dificultando su uso como marcador (Sudbery, 2004).

Algunos minisatélites son hipervariables. Su hipervariabilidad es debida a la diversidad en el número de reiteraciones de determinadas secuencias de nucleótidos las cuales para estos loci, oscilan entre 7 y unos 100 nucleótidos (Pineda *et al.*, 2006).

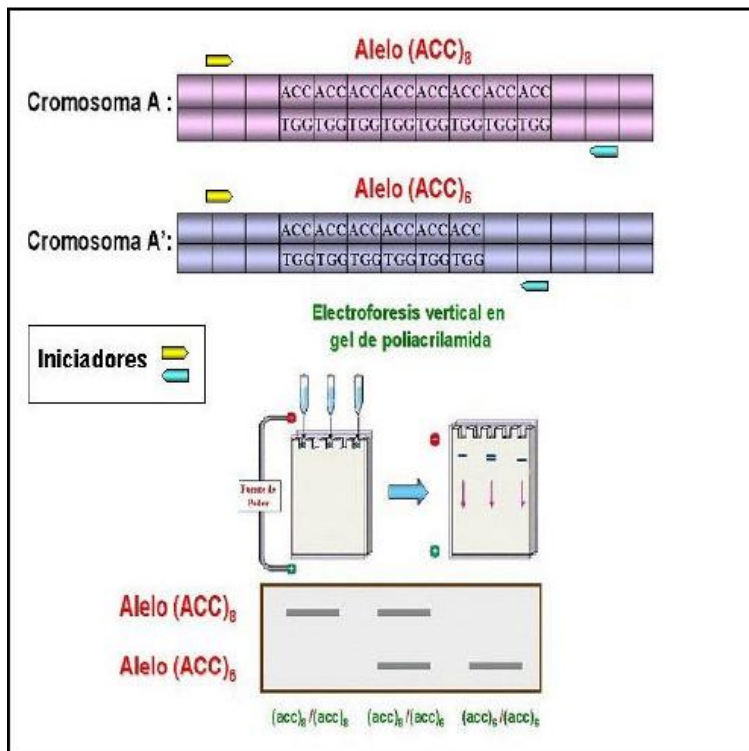
La variabilidad de los loci de los minisatélites origina las bases de la huella genética utilizada en medicina forense y la determinación de paternidad (Yunis & Yunis, 2002).

#### **4.3.5. (STR) Repeticiones en Tándem de Secuencias Cortas o Microsatélites)**

Es una técnica que utiliza secuencias polimórficas y abundantes en los genomas, denominadas "microsatélites", que consisten en mono-, di-, tri- y tetranucleótidos repetidos en tándem a lo largo del ADN (Weber & May, 1989; Passarge, 2004), por ejemplo  $(CA)_n$  o  $(CCA)_n$ , donde n puede variar de 10 a más de 30 (Williams *et al.*, 1993).



Estos microsatélites son clonados y secuenciados para generar iniciadores que por medio de PCR amplifiquen fragmentos específicos en un genoma determinado. Al ser separados en geles de electroforesis conforman marcadores de tipo codominante con patrón de herencia mendeliana (Senior *et al.*, 1998).



Fuente: Yáñez, 2002

**Figura 3.10. Principio del análisis con Amplificación de Microsatélites**

Se encuentran en todas las partes del genoma, incluso dentro de las regiones codificantes de proteína. Los microsatélites son muy polimórficos y buenos marcadores genéticos. Su uso ha sido más difundido que los minisatélites debido a que su distribución es más uniforme a través del genoma. El microsatélite más utilizado en este sentido ha sido el (CA)<sub>n</sub>. Los STR tetraméricos son la base del método de perfil genético en los casos forenses (Yunis & Yunis, 2002; Sudbery, 2004).

La razón principal del incremento del uso de los microsatélites como una herramienta molecular, es que proveen la más alta incidencia de polimorfismo o PIC (Polymorphic Information Content) en comparación con otras técnicas (Powell *et al.* citado por Yáñez, 2002).

Según Roca y Ramírez (1999) y Yáñez (2002), los microsatélites ofrecen ventajas como:

- ⊕ Altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.
- ⊕ Técnicamente simples; el uso de PCR automatiza su uso.
- ⊕ Es una técnica sensible: requiere pequeñas cantidades de ADN.
- ⊕ Analíticamente simples: datos producidos son confiables y altamente reproducibles.
- ⊕ Abundantes: dispersos uniformemente a través del genoma (aprox. c/10 kb).
- ⊕ Ampliamente aplicables: los loci son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros, y;
- ⊕ Fácil intercambio de datos: la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin la necesidad de la transferencia física de los mismos.

Existen variantes de la técnica mediante Microsatélites: AMP-PCR (PCR Iniciada con Microsatélites Anclados), RAMPO (Amplificación Aleatoria del Polimorfismo de Microsatélites), RAMP (Amplificación del Polimorfismo del Microsatélite), STMS (Polimorfismo de Marcadores de Secuencias Específicas Vecinas a microsatélites).

## **5. EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN**

En la Biología Molecular, específicamente en el análisis del genoma se aplican diferentes técnicas las cuales parten y dependen de la obtención de ADN puro, que tenga un alto rendimiento y sea de muy buena calidad. Para lograr este fin se utilizan diferentes métodos de extracción dependiendo del tipo de tejido que se emplee.

Parte importante en la extracción de ADN es la utilización del método apropiado para el tejido, es decir si el tejido es fresco o seco, generalmente en tejidos animales el mejor resultado se obtiene empleando muestras frescas y en el caso de ser conservadas se lo hace con alcohol etílico absoluto. El propósito de la colección de tejidos es conservarlas de forma que sus componentes no sean degradados con el paso del tiempo, sin embargo se debe tratar de utilizarlas inmediatamente.

### **5.1. Aislamiento de ADN**

El ADN debe ser liberado de las células, para esto, las membranas tienen que ser destruidas mediante un método mecánico como la maceración y contenidas en un medio tampón de extracción; el cual está compuesto por detergentes y soluciones de baja o alta fuerza iónica, ya que, los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN para disolverse y poder extraerlos.

El ADN debe ser protegido de la acción enzimática de las nucleasas por lo que se utiliza EDTA (ácido etilen-diamintetraacético) que es un agente quelante que une iones de magnesio y es considerado un cofactor necesario para las nucleasas. Posterior a la incubación inicial, las proteínas denaturadas y carbohidratos son separados al emulsificar la mezcla tampón-tejido con fenol o

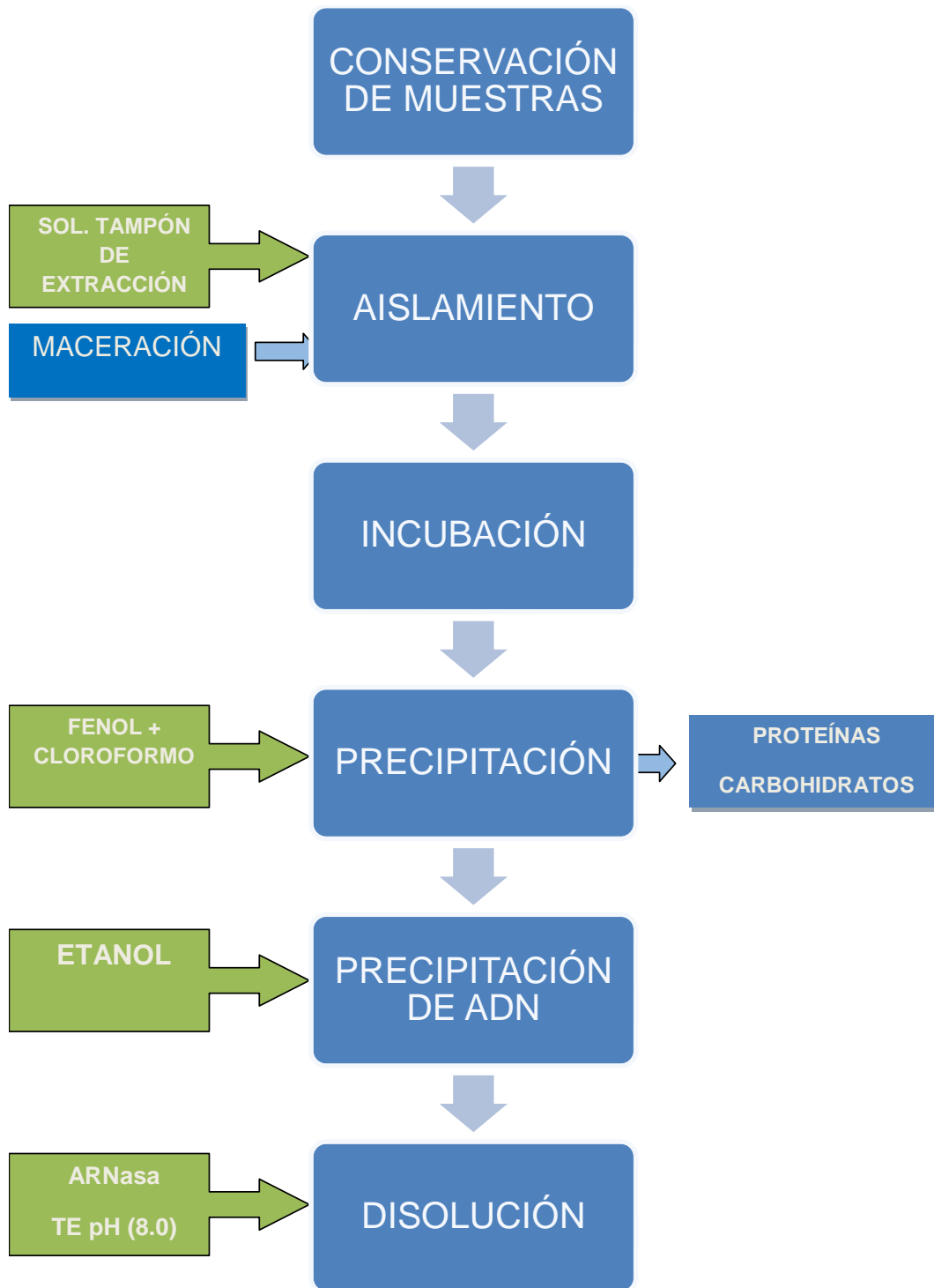
cloroformo (Rogers & Bendich. 1988). Para asegurar la remoción de proteínas se puede repetir la emulsificación con cloroformo; quedando el ADN atrapado en la fase acuosa de la solución.

Después, se debe precipitar el ADN en etanol puro o isopropanol, el cual es específico para precipitar ADN en presencia de ARN. Sin embargo, el isopropanol necesita de altas concentraciones de ADN para obtener un mejor resultado. (Howell, 1973).

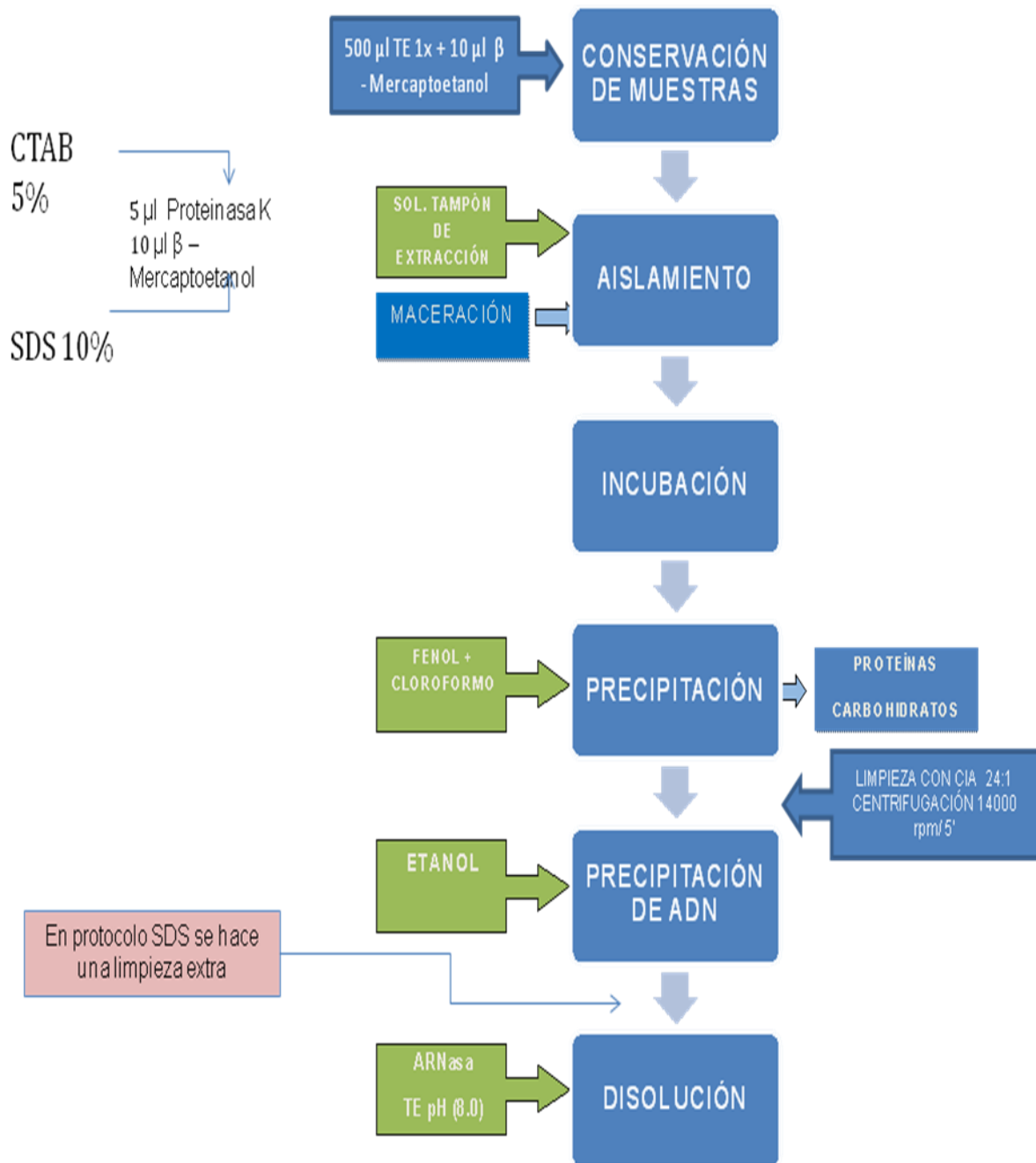
Para finalizar, el ADN precipitado tiene que ser disuelto en una solución tampón (TE pH: 8.0) o en agua ultrapura (Ferreira & Grattapaglia, 1996). El ARN presente debe ser disuelto adicionando la enzima ARNasa en la solución.

Se debe tener en cuenta, en este proceso, que algunos polisacáridos no van a ser removidos por completo durante la extracción y afectan significativamente a la pureza del ADN; éstos inhiben la actividad de algunas enzimas como: polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción, lo cual puede producir la digestión parcial del ADN (Taylor, 1993).

La contaminación puede ser evitada tomando en cuenta que la separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos dada por su diferencial de solubilidad en presencia de detergentes catiónicos como CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio), que se lo utiliza también en la solución tampón de extracción con altas concentraciones (0.5 – 3.0 M) de NaCl (cloruro de sodio); o combinar CTAB con un paso posterior de fenol-cloroformo para eliminar carbohidratos (Rogers & Bendich, 1988).



**Figura. 3.11. Diagrama General de Extracción de ADN.**



**Figura. 3.12. Diagrama de extracción de ADN con los protocolos CTAB y SDS.**

**Cuadro 3.5. Reactivos utilizados en la Extracción de ADN**

REACTIVO	CARACTERÍSTICA	FUNCIÓN
<b>Acetato de Potasio</b>	Sal	Precipita proteínas al aumentar el poder iónico de la solución
<b>Acetato de Sodio</b>	Sal	Precipita ADN al aumentar el poder iónico de la solución
<b>Cloroformo</b>	Solvente orgánico	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Remueve lípidos</li> <li>•Desnaturaliza y evita la precipitación de proteínas</li> <li>•Solubiliza y elimina al fenol de la solución</li> </ul>
<b>CTAB</b> (Hexadecil trimetil bromuro de amonio)	Detergente Catiónico fácilmente removible por dilución.	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Solubiliza polisacáridos</li> </ul>
<b>EDTA</b> (Ácido Etilen diamino tetra acético)	Agente quelante	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Atrapa iones de <math>Ca^{++}</math> y <math>Mg^{++}</math>.</li> </ul> Inhibe acción de nucleasas al no haber cofactores libres para su acción.
<b>Etanol/Isopropanol</b>	Alcoholes	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Precipita ácidos nucleicos (a bajas temperaturas)</li> </ul>
<b>Fenol</b>	Solvente orgánico	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Desnaturaliza proteínas</li> <li>•Purifica ácidos nucleicos</li> </ul>
<b>NaCl</b> (cloruro de sodio)	Sal	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Equilibra fuerzas iónicas</li> </ul>
<b>SDS</b> (Dodecil sulfato de sodio)	Detergente Aniónico	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Solubiliza proteínas, tejidos y membranas</li> </ul>
<b>TRIS</b> (Hidroximetil amino metano)	Tampón biológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Mantiene estable el pH de la solución (pH: 7.0 – 8.0)</li> </ul>
<b>β - Mercaptoetanol</b>	Antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Evita colores pardos de las muestras</li> <li>•Escinde enlaces disulfuro en forma reversible</li> </ul>

Fuente: Rogers & Bendich (1988).

## 6. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

### 6.1. Introducción

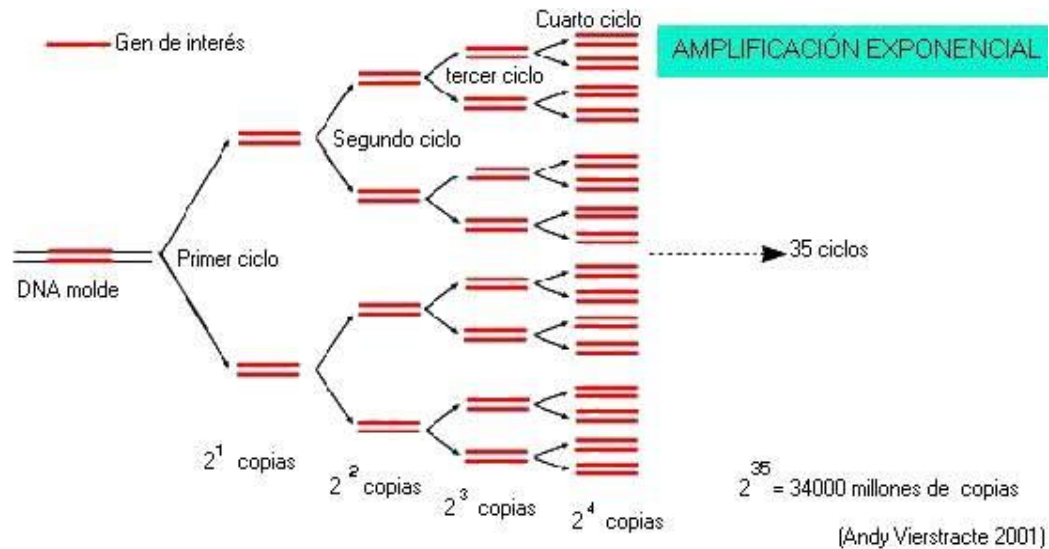
La Reacción en Cadena de la Polimerasa o también llamada PCR (en inglés, Polymerase Chain Reaction), es una técnica de amplificación de ADN *in Vitro*, que permite lograr en poco tiempo, una gran cantidad de copias de la cadena o secuencia de ADN original; esto se logra mediante la manipulación de ciclos de elevación y disminución de la temperatura de esta reacción *in Vitro*, en las que se desnaturaliza y sintetiza la cadena copia deseada; así como la adición de moléculas necesarias para el flanqueo del segmento requerido (Primers, cebadores u oligonucléotidos), la elongación de la cadena (*Taq* polimerasa y dNTP's), así como de cofactores y catalizadores, que brindan las condiciones óptimas para que se dé la reacción de amplificación ( $MgCl_2$ , Buffer) (Hillis, *et al.*, 1991; Valadez *et al.*, 2000; Bierne *et al.*, 2000; Mas *et al.*, 2001; Stryer *et al.*, 2003; Passarge, 2004; Butler, 2005).

Según Yunis & Yunis (2002); Fernández (2002); Stryer *et al.* (2003) y Butler (2005), en 1958, Arthur Kornberg y sus colaboradores aislaron enzimas conocidas como ADN polimerasas, que promueven la formación de los enlaces entre unidades del eje del ADN. Posteriormente, la técnica de la amplificación del ADN, fue desarrollada por Kary Mullis, quien recibió el premio Nobel de Química en 1993, y miembros del Grupo de Genética Humana de la Corporación CETUS (hoy conocida como Roche Molecular Systems) en 1983.

La técnica accede a obtener copias en forma exponencial de una región de la molécula de ADN, funcionando a manera de “fotocopiadora” de ácidos nucleicos, en donde al final del primer ciclo se tendrán  $2^n$  copias; en el segundo ciclo,  $2^{n+1}$  copias (4), en el tercer ciclo,  $2^{n+2}$  (8), en el cuarto ciclo 16 copias, luego 32, 64, 128, etc, como se observa en la **Figura 3.13.**, lográndose al cabo de 30 ciclos



aproximadamente un billón de copias de la región de ADN copiada (Williams *et al.*, 1995; Valadez & Kahl, 2000 y Yunis & Yunis, 2002).



Fuente: [www.anbg.gov.au](http://www.anbg.gov.au)

**Figura 3.13. Amplificación Exponencial de la doble cadena de ADN.- Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo son 4, al final del tercero 8, etc. Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de  $2^n$ , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.**

En un principio, las reacciones y etapas de ésta técnica se realizaban manualmente, cambiando los microtubos de una temperatura a otra, a través de distintos baños maría, resultando tedioso, impreciso y extendiendo los tiempos correctos de cada etapa, por lo que se desarrolló un equipo que automatiza ésta técnica denominado Termociclador, el cual posee una extensa variedad de ciclos térmicos, pudiendo variar el número de muestras manejadas al mismo tiempo, el tamaño del tubo de la muestra y el volumen de los reactivos utilizados, así como la velocidad de cambio de temperatura.

## 6.2. El Ciclo

El principio de la técnica de PCR se basa en el proceso biológico de la Autoduplicación de la molécula de ADN, denominada también como Replicación, en el cual el material genético realiza copias idénticas de cada hebra o eje de la molécula de ADN, las cuales son necesarias para la división celular denominada mitosis.

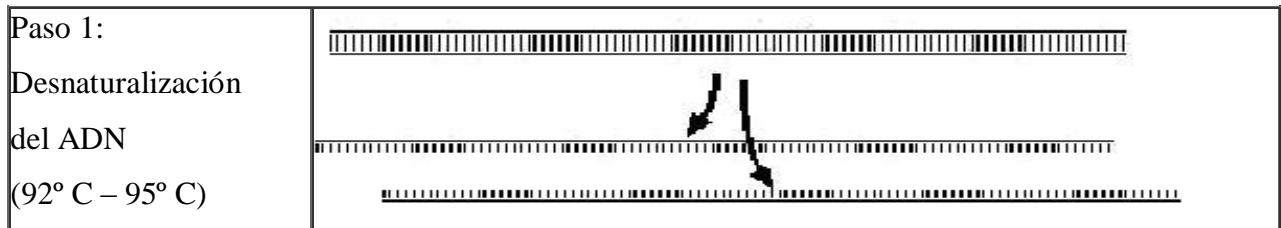
### 6.2.1. Desnaturalización

En esta etapa la doble hélice de ADN se desenrolla y sus ejes se separan; la enzima responsable dentro de la célula de este mecanismo es la ADN helicasa, la cual rompe los puentes hidrógeno (enlaces no covalentes), responsables de la unión entre los pares de bases nitrogenadas. Así mismo, las cadenas pueden separarse por acción de reactivos relativamente suaves como álcalis, formamida o urea, o por una brusca elevación de la temperatura; ésta última alternativa es la utilizada en el proceso de amplificación PCR, en el que se alcanza temperaturas de 90° C aproximadamente, alcanzando el punto de fusión de la molécula de ADN (en inglés, “meeting temperature”), temperatura en la cual se deshace la mitad de la estructura helicoidal, formándose dos cadenas, las cuales servirán como molde para la síntesis de nuevos fragmentos (Griffiths *et al.*, 1995; Valadez y Kahl, 2000; Passarge, 2004; Stryer *et al.*, 2003; Passarge, 2004).

Para Williams *et al.* (1993); Hillis *et al.* (1996); Valadez y Kahl (2000); Mas *et al.* (2001) y Glober & Hames (2002), el primer paso de un programa de ciclaje se denomina Pre Desnaturalización, en el que la doble cadena de ADN es desnaturalizada por un minuto a 94° C para producir cadenas sencillas. Según Butler (2005), la temperatura de incubación inicial usada por algunos protocolos de Foster City, CA y Promega Corporation, es de 95° C por 11 minutos, aunque recientes protocolos sugieren una temperatura de 92° C, recalcando que,

temperaturas muy bajas o fases de desnaturalización muy cortas, podrían dañar completamente la disociación molecular del ADN genómico.

Es importante mencionar que, aunque la actividad de la enzima polimerasa decrece rápidamente a partir de los 95° C, por lo que es aconsejable disminuir el tiempo de incubación.



Fuente: <http://www2.carthage.edu>

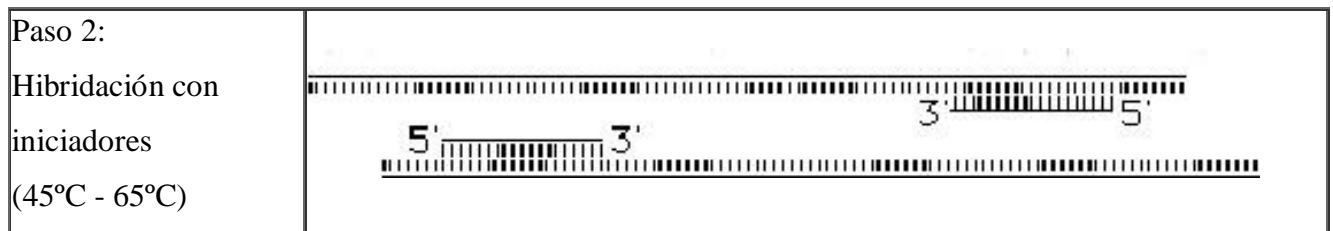
**Figura 3.14. Desnaturalización del ADN.**

Por medio de la aplicación de calor a 94°C, se produce la separación de las dos cadenas de la molécula de DNA que se quiere amplificar. Al romperse los enlaces de hidrógeno, cada cadena actúa como molde para fabricar su complementaria.

### 6.2.2. Hibridación

Durante esta fase, la temperatura es disminuida para que los cebadores puedan alinearse apropiadamente con la cadena molde (**Figura 3.14.**). Esta es la fase más crítica, ya que existen muchos factores que pueden interferir la perfecta alineación del primer con la secuencia blanco. Así pues, los iniciadores pueden alinearse inespecíficamente a la cadena líder a temperatura ambiente, mientras las reacciones de la PCR están siendo preparadas, dando productos inespecíficos; esto también es posible al utilizar bajas temperaturas durante la alineación de los primers, creando productos llamados dímeros (Butler, 2005).

Según Williams *et al.* (1993); Hillis *et al.* (1996); Glover y Hames (2002) y Butler (2005), la alineación de los primers con el segmento de la cadena molde, es un proceso al azar, que depende de la concentración de los primers, la disponibilidad de sitios de alineación, la temperatura de alineación, peso molecular de los cebadores (iniciadores de bajo peso molecular tienen más posibilidades de alinearse adecuadamente), así como el contenido de GC de los mismos. La presencia de todos estos factores, hace que la técnica sea muy sensible a presentar falsos positivos de segmentos no deseados, debido a que los oligonucleótidos pueden hibridar con secuencias de la cadena molde con algún grado de homología a la secuencia designada. Para evitar estos problemas, es muy útil disminuir la concentración de otros cofactores, tales como la temperatura y la concentración de Magnesio.



Fuente: <http://www2.carthage.edu>

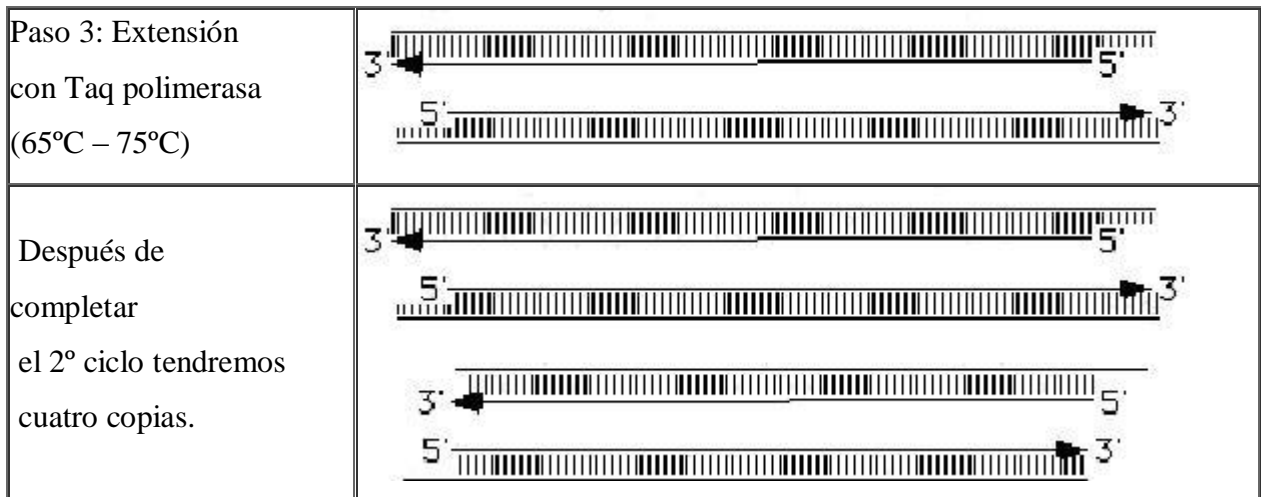
**Figura 3.15. Hibridación con cebadores**

La temperatura se disminuye rápidamente a 55° C, para lograr que los cebadores o primers “reconozcan” sus secuencias complementarias en las cadenas de DNA correspondientes y se unan con ellas. Los primers no deben ser complementarios entre sí y deben corresponder a los extremos del fragmento del DNA que se quiere amplificar.

En la práctica, la temperatura utilizada oscila entre 45 – 65° C, por un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde.

### 6.2.3. Replicación

Denominada también como fase de elongación, en la cual se sintetiza la nueva cadena, mediante la utilización de la enzima ADN polimerasa, la cual cataliza la adición de unidades de desoxinucleótidos fosfato (dNTPs) al molde de ADN preexistente (Primer), extendiendo y sintetizando el segmento objetivo de ADN. La polimerización de la cadena sencilla se realiza en dirección 5' – 3' (**Figura 3.16.**).

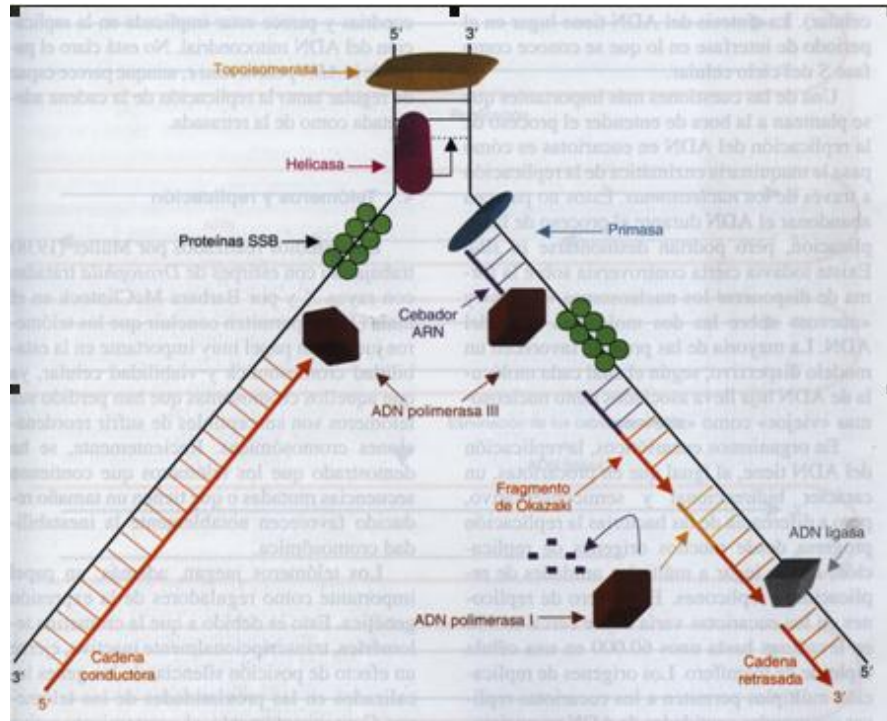


Fuente: <http://www2.carthage.edu>

**Figura 3.16. Extensión con Taq polimerasa**

Para esta etapa, la temperatura se eleva a 72° C, con lo que la Taq polimerasa agrega los diferentes nucleótidos complementarios siguiendo el orden de la cadena que sirve de molde.

En el núcleo celular, la replicación del ADN es bidireccional, y ya que las polimerasas son unidireccionales, la replicación de la doble cadena de ADN es distinta para cada eje: mientras el eje 5' – 3' se replica en forma continua (cadena líder), la hebra 3' – 5' lo hace en forma discontinua (cadena rezagada), utilizando bloques denominados Fragmentos de Okazaki, que son segmentos pequeños de 1,000 – 2,000 bases (Stryer *et al.*, 2003; Passarge, 2004).



Fuente: Piqueras *et al.*, 2002

**Figura 3.17. Proteínas implicadas en el mecanismo de replicación del ADN**

Según Hillis *et al.* (1996) y Valadez & Kahl (2000), la temperatura adecuada a la cual sintetiza la Taq polimerasa la nueva cadena sencilla, garantizando la completa extensión de todos los iniciadores en la mezcla de reacción, es de 72° C. De acuerdo con Butler (2005), las temperaturas y tiempos utilizados para la replicación por dos protocolos de amplificación de Applied Biosystems y Promega, es de 72° C por 1 minuto, y 70° C por 45 segundos, respectivamente.

La enzima ADN polimerasa más utilizada en ésta técnica ha sido la Taq polimerasa, la cual fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, la cual se desarrolla en aguas termales de elevada temperatura. Esta enzima se mantiene estable a temperaturas mayores a los 90° C por más de dos horas y es capaz de replicar ADN a 70 – 75° C (Hillis *et al.*, 1991; Satz & Kornblihtt, 1993; Puertas, 1999).

La idea de desarrollar ciclos sucesivos de temperatura que incrementen de manera exponencial moléculas de ADN, fue descrito en los 70's por Kleppe y un grupo de colaboradores; a pesar de ello no existía una polimerasa termoestable, por lo que la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban y había que agregar nuevas enzimas en cada ciclo (Mullis & Faloona, 1987). Actualmente, se emplean un sinnúmero de ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a estas temperaturas restrictivas.

**Cuadro 3.6. Enzimas ADN polimerasas comúnmente utilizadas para la reacción de polimerización en cadena (PCR).**

Enzima	Origen	Condición	T° óptima
ADN pol Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	Nativa	55 - 75
Ampli Taq™	<i>Thermus aquaticus</i>	Recombinante ( <i>E. coli</i> )	55 - 75
Fragmento Stoffel	<i>Thermus aquaticus</i>	Taq pol modificada (a.a. 289 perdido en el N - terminal)	55 - 75
ADN pol Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Nativa	72 - 78
ADN pol Vent	<i>Thermococcus litorales</i>	Nativa	75 - 80
ADN pol Pwo	<i>Pyrococcus woessii</i>	Nativa	-
ADN pol Tli	<i>Thermococcus litorales</i>	Nativa	75
ADN pol Tfi	<i>Thermus flavus</i>	Nativa	70 - 75
ADN pol Tma	<i>Thermotoga maritima</i>	Recombinante	70 - 75
ADN pol Tbr	<i>Thermus brockianus</i>	Nativa	70 - 75
ADN pol Tbr	<i>Thermus brockianus</i>	Recombinante	70 - 75

Fuente: Hillis *et al.*, 1991; Puertas, 1999

Cabe recalcar que, aunque la Taq polimerasa sea resistente a temperaturas de desnaturalización de 94° C, no es inmune a ésta, y un excesivo tiempo de desnaturalización reduciría su actividad enzimática.

Según Hillis *et al.* (1996) y Rodríguez *et al.*(2000), la enzima sufre el *efecto meseta*, es decir que después de un número determinado de ciclos de amplificación, llega a una fase estacionaria, así por ejemplo, después de 30 incubaciones a 94° C por 60 segundos cada una, la Taq pierde la mitad de su actividad normal.

### **6.3. Tipos de PCR**

#### **6.3.1. PCR anidada**

Esta es una técnica muy sensible y específica de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada (Butler *et al.*, 2001).

#### **6.3.2. PCR in situ**

PCR realizada sobre preparaciones fijas sobre un portaobjetos. El PCR *in situ* consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. Se realiza primero amplificación de ADN blanco y luego detección mediante hibridación *in situ* convencional con sondas ADN/ARN. De esta manera pueden detectarse cantidades pequeñísimas de genoma viral (Ramírez *et al.*, 2003).



### **6.3.3. PCR múltiplex**

Denominada también como PCR multiplexing, que amplifica más de una secuencia en una misma reacción, solamente adicionando más de un juego de primers (Edwards & Gibas, 1994). Para este tipo de reacción, es necesario que los pares de primers sean compatibles; en otras palabras, la temperatura de hibridación de los primers deberá ser similar y deberá evitarse regiones excesivamente complementarias para prevenir la formación de iniciadores dímeros que provocará que los primers se unan a otros primers y no a la cadena molde (Butler *et al.*, 2001).

### **6.3.4. RT-PCR**

Donde el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, como Tth, para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario).

### **6.3.5. PCR en tiempo real**

Esta técnica fue descrita por primera vez por Higuchi y colaboradores de la Corporación CETUS en 1990. Permite cuantificar, la cantidad de ADN o ARN amplificado en cada momento. Para la detección de la cantidad de ADN específico se emplea una *sonda* unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*); cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET) (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.* 1993).

## **7. CUANTIFICACION DE ADN**

### **7.1. Electroforesis**

La palabra electroforesis proviene del griego *electron* (carga) y del latín *phore* (soporte). La electroforesis consiste en el movimiento de moléculas cargadas en un campo eléctrico de corriente.

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas, que tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico como consecuencia de su relación carga/masa. Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura.

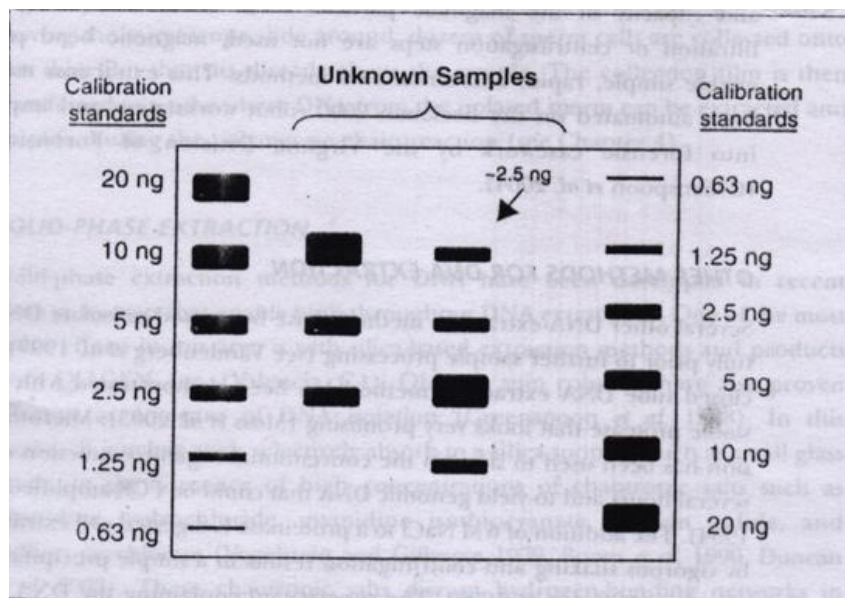
La naturaleza del enlace fosfodiéster de las cadenas polinucleotídicas condiciona la carga de un ácido nucleico, que es aproximadamente igual al número de grupos fosfato. Bajo la influencia de un campo eléctrico, las moléculas del ADN migrarán desde el electrodo negativo, conocido como cátodo, hacia el electrodo positivo, denominado ánodo; bajo un campo eléctrico de corriente continua de alto voltaje, creado por una fuente de poder, el ADN se moverá rápidamente (Puertas, 1999; Butler, 2005).

La técnica fue desarrollada inicialmente por Arne Tisellius en 1930 para la separación de proteínas sericas (Erazo, 2006). Para aminoácidos, las hojas de papel o capas finas de celulosa en polvo son las que se usan con mayor frecuencia como soportes inertes. Para polipéptidos grandes o proteínas, se usa gel de poliacrilamida con enlaces cruzados. Para oligómeros de nucleótidos se usan soportes de agarosa y poliacrilamida (Grune, 1958).

La técnica de electroforesis que utiliza geles de agarosa y poliacrilamida, carga la solución con ácidos nucleicos en pocillos en el gel, permitiéndoles migrar hacia el terminal positivo a través de los poros del gel, que actúan como cedazo de las moléculas, por lo que la migración de las moléculas depende de su tamaño o peso molecular, y ya que la mayoría de las moléculas de ADN emigrará a la misma velocidad en el sistema acuoso de electroforesis (gel y solución tampón), formando una banda la cual incrementa su anchura durante la electroforesis debido al efecto de difusión. Cuanto más pequeña sea la molécula más deprisa podrá migrar a través del gel (Puertas, 1999).

El número de pares de bases (pb) de ADN (tamaño), pueden ser determinadas mediante la corrida electroforética de ADN de tamaño conocido (comercial), paralelamente a las muestras de ADN problema; se realiza la comparación entre la posición del ADN estándar con las otras muestras, y se puede calcular el número de pb, ya que la movilidad de un fragmento de ADN es proporcional al logaritmo de su tamaño en pb (**Figura 3.18**) (Williams *et al.*, 1993).

Dos tipos de geles han sido utilizados para lograr la separación y cuantificación de ADN: geles de Agarosa, usados para separar y cuantificar moléculas y fragmentos de ADN de gran tamaño (600 bp – 23,000 bp), en análisis de RFLPs; y geles de Poliacrilamida, que permiten analizar fragmentos de bajo peso molecular de ADN (100 bp – 400 bp) y secuencias nucleotídicas simples, ya que se obtiene una mejor separación y resolución (Hillis *et al.*, 1996; Butler, 2005).



Fuente: Butler, 2005

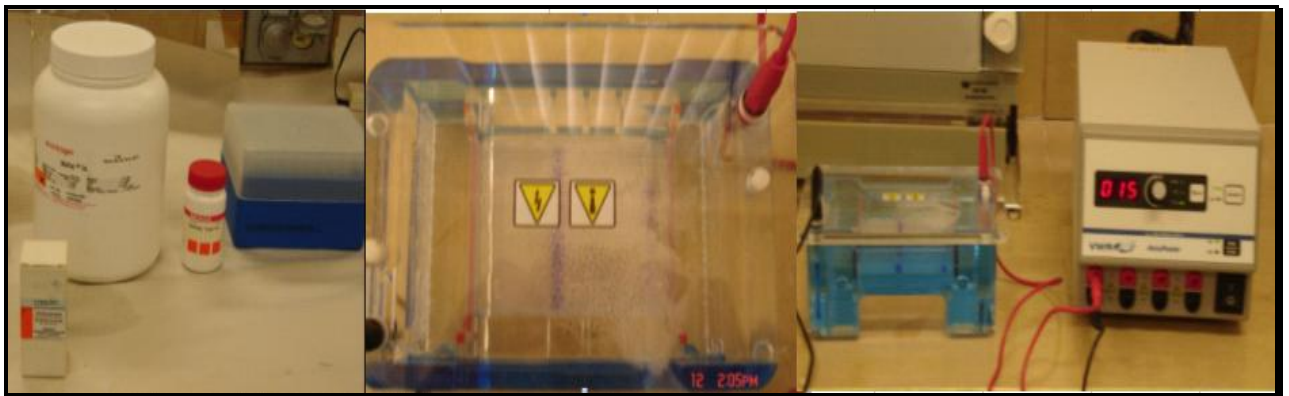
**Figura 3.18. Ilustración que muestra la cuantificación de ADN humano. Una dilución consecutiva de ADN humano, es corrida en una membrana para hacer comparaciones. La cantidad de cada una de las muestras es estimada por comparación visual con respecto a la muestra patrón estandarizado. Por ejemplo, la muestra señalada con la flecha, aparentemente tiene 2.5 ng de ADN.**

### 7.1.1. Geles de Agarosa (AGE)

La Agarosa es extraída de un alga marina, cuyos poros tienen un diámetro de 2,000 angstroms (200nm) (Butler, 2005), y su preparación, al igual que los geles de almidón es muy sencilla, ya que el ágar se disuelve agregando un adecuado buffer y elevando la temperatura de la disolución, por ejemplo en un microondas. El gel solidifica al bajar la temperatura, y el gel puede ser nuevamente diluido al elevar la temperatura (Hillis *et al.*, 1996). Cabe indicar que los geles de ágar tienen una gran concentración de grupos ácidos (carboxílicos y sulfatos), resultando en una gran electroendósmosis y ocasional adsorción de proteínas, lo que se puede superar con el uso de agarosa purificada (Harris & Hopkinson, 1976).

Según Erazo (2006), la agarosa se compone de D-galactosa y 3,6 anhidro L-galactosa, cuya polimerización debida al calor, forma una malla entrelazada. Las concentraciones de agarosa utilizadas para cuantificación y separación de fragmentos de ADN son de 0.6 – 2% p/v, usando como diluyentes buffers TAE (Tris-Acetato-EDTA) o TBE (Tris-Borato-EDTA), permitiendo distinguir fragmentos de 300 bp – 20 kb (Hillis *et al*, 1996).

Una vez que el gel es sumergido en la solución buffer, las muestras de ADN son mezcladas con un colorante o amortiguador de carga, que contiene azul de bromofenol, xileno, glicerol, EDTA y Tris (Hillis *et al.*, 1996; Valadez & Kahl, 2000), incrementando viscosidad a la muestra, hundiéndola en el pocillo, y durante la corrida, la visualización de la misma. El voltaje utilizado en geles de agarosa de 10 – 40 cm de longitud, es de 100-600 Volts (**Fotografía 3.6**) (Yáñez, 2002; Butler, 2005).

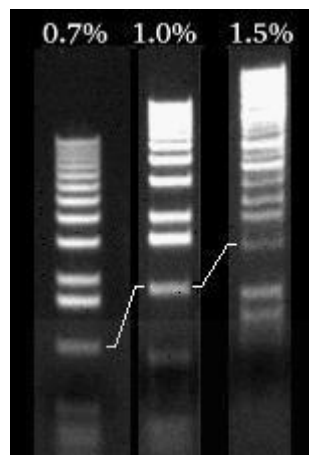


**Fotografía 3.6. Procedimiento para la utilización de geles de agarosa**

Al cuantificar ADN, el mismo aparece como una banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pocillos, mientras que el material parcialmente degradado, contaminante tales como compuestos fenólicos y polisacáridos, forman un barrido a lo largo del carril. Esto es visible mediante la inclusión de compuestos fluorescentes, como el Bromuro de Etidio (Valadez & Kahl, 2000).

Para la visualización de los fragmentos de ADN en agarosa, se puede incorporar nucleótidos radioactivos, aunque debido a su costo, esfuerzo, cantidad, han sido reemplazados por colorantes fluorescentes a la luz ultravioleta; sustancias altamente tóxicas, como el Bromuro de Etidio u otros compuestos comerciales, que se intercalan entre las bases de los ácidos nucleicos, permitiendo las bandas o fragmentos de ADN, y así conocer el tamaño de los mismos en pares de bases o su concentración (ng/ml), de acuerdo a la distancia emigrada o por la intensidad de la banda ((Dinesh *et al.*, 1995; Hillis *et al.*, 1996).

La visualización se realiza mediante el uso de luz ultravioleta, en equipos denominados Transiluminadores; el uso de cámaras digitales permiten registrar dichos análisis (**Figura 3.19.**).



Fuente: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

**Figura 3.19. Visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa de diferente concentración**

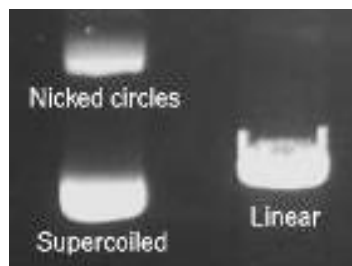
#### **7.1.1.1. Fluorescencia del Bromuro de Ethidio**

Este método es aplicable cuando las cantidades de ADN no son suficientes para ser medidas por otros métodos o cuando las muestras están altamente contaminadas con otras sustancias que son absorbidas por el espectro ultravioleta y esto puede impedir el certero análisis de las mismas.

La técnica se basa en la estimación de la cantidad de ADN en cada muestra mediante la fluorescencia emitida por el Bromuro de etidio que está intercalado en las moléculas del ácido nucleico. Esto se debe a que la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad total de masa de ADN; la cuantificación de ADN en la muestra puede ser estimada por comparación de la fluorescencia de la muestra con la de una serie de estándares. Por este método pueden ser detectadas cantidades de ADN como desde 1 o 5 ng (Sambrook & Russell, 1989)

El bromuro de etidio es un potente agente mutagénico y cancerígeno por lo que siempre se lo debe manipular con guantes y mascarilla, así como aislar todos aquellos materiales que hayan tenido contacto con esta solución (Valadez & Kahl, 2000).

Los fragmentos de ADN lineal migran a través del gel con una movilidad que es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, es decir que las moléculas de ADN de alto peso molecular migrarán poco a diferencia de ácidos nucleicos de bajo peso molecular, que migrarán mucho más rápido; mientras que las formas circulares de ADN migran más lento que las formas de ADNs lineales de similar masa (formas superenrolladas y cortes circulares) (Puertas, 1999).



Fuente: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

**Figura 3.20. Tres bandas de ADN plásmido (bandas de la izquierda – ADN circular; banda de la derecha – ADN lineal)**

### 7.1.2. Geles de Poliacrilamida (PAGE)

Los geles de poliacrilamida se utilizan principalmente para separar fragmentos de ADN de bajo peso molecular (50 – 1000 bp), a concentraciones de 3.5 – 12%, como son los productos de amplificaciones o digestiones con endonucleasas que requieren una mayor definición (Hillis *et al.*, 1996; Valadez & Kahl, 2000). A diferencia de los geles de agarosa, la poliacrilamida se corre en forma vertical únicamente, y puede ser transferido para hacer una hibridación (Church & Gilbert, 1984; Kreitman & Aguade, 1986).

Según Chrambach & Rodbard (1971); Sambrook *et al.* (1989); Butler (2005), la acrilamida en presencia de radicales libres suministrados por el persulfato de amonio y estabilizado por el TEMED, produce una reacción de polimerización de los monómeros en largas cadenas; la presencia de la bisacrilamida, permite el entrecruzamiento de los monómeros entre sí, creando poros con un diámetro de 100-200 Å.

El tamaño de los poros aumenta o disminuye de acuerdo a la concentración de poliacrilamida con respecto a la cantidad de agua agregada, y también por la relación entre acrilamida y bisacrilamida, como se puede ver en el **Cuadro 3.7**.

**Cuadro 3.7. Volumen de cada componente para polimerizar geles en varias concentraciones. En cualquiera de las concentraciones se agrega 35 µl de TEMED.**

COMPONENTES	3.5%	5%	6%	8%	12%	20%
Acrilamida 30% (Acril:Bisacr) (29:1)	11.6	16.6	20.0	26.6	40.0	66.6
Agua	67.7	62.7	59.3	52.7	39.3	12.7
TBE 5X	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Persulfato de Amonio 10%	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7

Fuente: Cedeño *et al.* (2005)



Los geles de poliacrilamida no denaturados o nativos se utilizan para la separación de fragmentos de ADN de doble cadena; pero si se requiere separar fragmentos de ADN de cadena simple o moléculas de ADN en donde la movilidad pudiera verse afectada por la composición de bases, se recurre a geles de poliacrilamida denaturados o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Myers *et al.*, 1986, 1989; Lessa, 1993; Hillis *et al.*, 1996; Valadez & Kahl, 2000).

Existe otro tipo de electroforesis denominado de “Campo Pulsado” PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), en el cual, un campo eléctrico alrededor del gel, es conectado y desconectado entre dos o más direcciones, permitiendo que moléculas de ADN de muchos millones de pares de bases sean separadas (Williams *et al.*, 1993).

A diferencia de los geles de agarosa, los de poliacrilamida requieren de mayor tiempo, materiales y costo. Una vez que las placas con dichos geles han polimerizado, los geles son cargados en forma vertical. Al igual que el gel de agarosa, las muestras de ADN requieren del mismo amortiguador de carga. Los geles de poliacrilamida requieren TBE como solución buffer para la electroforesis.

Para la visualización de los fragmentos de ADN en geles de poliacrilamida, se utiliza la técnica de tinción con sales de plata, en la que los iones de plata reaccionan con las macromoléculas a un pH mayor de 10 formando complejos. Durante la reacción, estas moléculas quedan reducidas y la plata se deposita en los sitios de reducción, facilitando la visualización de los ácidos nucleicos (Hillis *et al.*, 1996; Savelkoul *et al.*, 1999; Valadez & Kahl, 2000).

## 7.2. Análisis óptico por absorción de luz

Existen varias técnicas para la cuantificación de ADN como son la espectrofotometría y fluorescencia del Bromuro de Ethidio. Estos métodos son de análisis óptico, y la aplicación de cada uno depende del objetivo de la investigación.

### 7.2.1. Espectrofotometría

Es un método de análisis óptico que básicamente se refiere a la medida de cantidades relativas de luz absorbida por una muestra, en función de la longitud de onda. Cada componente de la solución tiene su patrón de absorción de luz característico. Comparando la longitud de onda y la intensidad del máximo de absorción de luz de una muestra versus soluciones estándar, es posible determinar la identidad y la concentración de componentes disueltos en la muestra (solución incógnita) (Skoog *et al.*, 2001).

La cuantificación de ADN se realiza en el rango espectral de radiación ultravioleta que comprende desde 15 nm hasta 400 nm. Específicamente para cuantificar ADN y ARN se lo hace en longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, respectivamente. La lectura a una longitud de onda de 260 nm permitirá el cálculo de la concentración del ácido nucleico en la muestra.

Una Densidad Óptica (DO) = 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de ADN de doble cadena, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla y 20 µg/ml de oligonucleótidos de cadena sencilla.

La pureza estimada de los ácidos nucleicos se calcula mediante la relación  $DO_{260/280nm}$ . Muestras puras de ADN y ARN darán como resultado valores que van desde 1.8 a 2.0 a  $DO_{260/280nm}$ , respectivamente. Si los valores citados son diferentes para las muestras, significa que existe contaminación con proteínas o fenol que no fueron removidos totalmente durante el proceso de extracción. (Sambrook & Russell, 1989).

También es necesario hacer otra medición a 230 nm ya que puede proporcionar información sobre la pureza de la muestra debido a que:

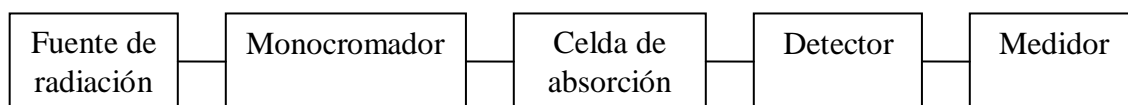
1. A 230 nm se localiza la absorbancia mínima de ácidos nucleicos y nucleótidos, se localiza la absorbancia máxima de enlaces peptídicos, además de que cualquier absorción a 230 nm es indicativo de contaminación por proteínas.
2. La absorbancia a 230 nm puede indicar la presencia de componentes orgánicos como solventes y antibióticos.
3. La absorbancia a 230 nm también puede indicar contaminación con amortiguadores, ya que el Tris y EDTA, así como otras sales, absorben esta longitud de onda.(Valadez & Kahl, 2000)

### **7.2.1.1. Espectrofotómetro**

Es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia (Wikipedia, 2001)

Los componentes básicos de un espectrofotómetro son:

- ⊕ Fuente estable de energía radiante
- ⊕ Monocromador para desdoblarse la radiación en las longitudes de onda que la forman celdas transparentes para receptor la muestra
- ⊕ Detector de la radiación con un sistema acoplado de lectura.



**Figura 3.21. Diagrama en bloques de un espectrofotómetro. (Pecsok & Donald, 1990)**

### 7.2.1.2. Protocolo de Cuantificación de ADN por Espectrofotometría

- ⊕ Agregar 20 µl de la muestra patrón de ADN a un tubo que contenga 1980 µl de amortiguador TE o agua bidestilada estéril, mezclar perfectamente y leer la absorbencia (DO) en el espectrofotómetro a 260 y 280nm.
- ⊕ Calcular la concentración de ADN en la solución de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\left[ \text{ADN} \right] \mu\text{g}/\mu\text{l} = \left[ \text{Do}_{260} * 100 \text{ (factor de dilución)} * 50 \mu\text{g}/\text{ml} \right] / 1000$$

**Figura 3.22. Fórmula de cuantificación de la concentración de ADN mediante espectrofotometría. Las unidades de concentración están dadas en microgramos por micro litro.  $\text{Do}_{260}$  es el valor obtenido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. 100 es el factor de dilución. 50 µg/ml es el valor equivalente a una absorbancia. 1000 es el valor por el que se divide para transformar mL en µl.**

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 1. UBICACION GEOGRAFICA

#### 1.1. Localización

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA, ubicados en la Hacienda “El Prado”, perteneciente a la Escuela Politécnica del Ejército ESPE, cuya ubicación geográfica se detalla:

**Cantón:** Rumiñahui  
**Parroquia:** San Fernando  
**Latitud:** 0° 23' 20" (S)  
**Longitud:** 78° 24' 44"  
**Altitud:** 2748 msnm  
(Según Pozo *et al.*, 2003)

#### 1.2. Características Agroclimáticas

**Temperatura media anual:** 13.5° C  
**Precipitación media anual:** 1200 mm

## **2. MATERIALES**

### **2.1. Cariotipo**

#### **2.1.1. Materiales**

- ⊕ Preñadillas
- ⊕ Truchas
- ⊕ Acuarios
- ⊕ Baldes de plástico
- ⊕ Cajas petri
- ⊕ Equipo de disección
- ⊕ Jeringuillas 1 - 3 ml
- ⊕ Mechero
- ⊕ Medidor morfométrico
- ⊕ Pipetas pasteur
- ⊕ Placas portaobjetos
- ⊕ Tubos de ensayo de vidrio

#### **2.1.2. Equipos**

- ⊕ Balanza
- ⊕ Centrífuga
- ⊕ Incubadora
- ⊕ Microscopio
- ⊕ Oxigenadores
- ⊕ Refrigeradora

#### **2.1.3. Reactivos**

- ⊕ Alcohol etílico absoluto (conservación de muestras)
- ⊕ Cloruro de Potasio 0.075 M (solución Hipotónica)
- ⊕ Colchicina 0.08% (estimulante de división mitótica)
- ⊕ Esencia de clavo de olor (Anestésico)
- ⊕ Fijador Carnoy (Metanol + Acido acético 3:1)
- ⊕ Metanol
- ⊕ Solución Giemsa (tinción de cromosomas)

## 2.2. Hemograma

### 2.2.1. Materiales

- ⊕ Preñadillas
- ⊕ Truchas
- ⊕ Acuarios
- ⊕ Baldes de plástico
- ⊕ Cámara de Neubauer
- ⊕ Jeringuillas de 1 - 3 ml
- ⊕ Lector de Hematocrito para tubos capilares
- ⊕ Medidor morfométrico
- ⊕ Pipetas hematocríticas
- ⊕ Tubos capilares

### 2.2.2. Equipos

- ⊕ Centrífuga
- ⊕ Microscopio
- ⊕ Oxigenadores

### 2.2.3. Reactivos

- ⊕ Agua destilada
- ⊕ Cloruro de Sodio 85%
- ⊕ Colorante Wright
- ⊕ EDTA (Anticoagulante)
- ⊕ Esencia de clavo de olor (Anestésico)
- ⊕ Heparina sódica (Anticoagulante)



**Fotografía 4.1. Materiales y reactivos utilizados en el Hemograma**

## **2.3. Recolección de Muestras para Extracción de ADN**

### **2.3.1. Materiales**

- ⊕ Tijeras
- ⊕ Balde
- ⊕ Red
- ⊕ Jeringuillas
- ⊕ Tubos eppendorf
- ⊕ Cooler

### **2.3.2. Reactivos**

- ⊕ Alcohol Etílico
- ⊕ Aceite de Clavo
- ⊕ EDTA anticogulante o Heparina sódica
- ⊕ TE (Tris – EDTA)
- ⊕  $\beta$  mercapto etanol

## **2.4. Extracción de ADN**

### **2.4.1. Materiales**

- ⊕ Tubos eppendorf 1.5 ml
- ⊕ Micropipetas
- ⊕ Puntas 1000  $\mu$ l y 200  $\mu$ l
- ⊕ Flotadores

### **2.4.2. Equipos**

- ⊕ Incubadora baño maría
- ⊕ Microcentrífuga
- ⊕ Vortex
- ⊕ Balanza Analítica



### 2.4.3. Reactivos

- ⊕ TRIS (Hidroximetil Amino Metano)
- ⊕ EDTA (Etilen Diamino Tetra Acético)
- ⊕ CTAB (Hexadecil Trimetil Bromuro de Amonio)
- ⊕ SDS (Sodio Dodecil Sulfato)
- ⊕ β mercapto etanol
- ⊕ Cloroformo
- ⊕ Alcohol Isoamílico
- ⊕ Alcohol Etílico Anhidro
- ⊕ Alcohol Isopropílico
- ⊕ Cloruro de Sodio
- ⊕ Hidróxido de Sodio
- ⊕ Acido Clorhídrico
- ⊕ Proteinasa K
- ⊕ Acetato de Amonio
- ⊕ Agua MiliQ
- ⊕ ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System

## 2.5. Visualización de ADN

### 2.5.1. Materiales

- ⊕ Matraces Erlenmeyer
- ⊕ Vasos de Precipitación
- ⊕ Probetas
- ⊕ Micropipetas
- ⊕ Puntas 10 µl

### 2.5.2. Reactivos

- ⊕ Agarosa Ultra Pura
- ⊕ TAE (Tris-Acetato-EDTA)
- ⊕ TBE (Tris-Borato-EDTA)
- ⊕ Low DNA Mass Ladder
- ⊕ Loading Dye 10X
- ⊕ Acrilamida
- ⊕ Bisacrilamida
- ⊕ Amonio persulfato
- ⊕ TEMED
- ⊕ Nitrato de plata
- ⊕ Hidróxido de sodio
- ⊕ Formaldehído
- ⊕ Acido Acético

### 2.5.3. Equipos

- ✦ Cámaras de Electroforesis (Horizontal y Vertical)
- ✦ Fuente de poder
- ✦ Transiluminador de rayos UV
- ✦ Fuente de luz blanca

## 2.6. Espectrofotometría

### 2.6.1. Materiales

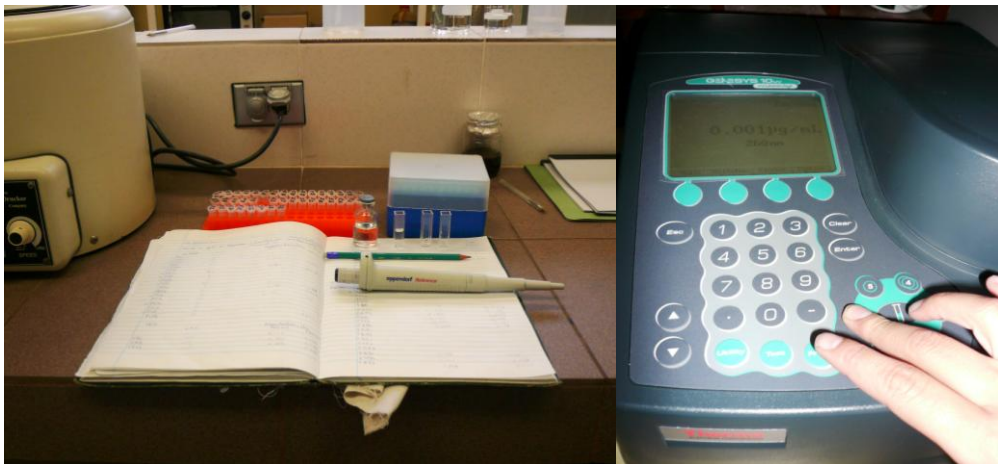
- ✦ Celdas de plástico o cuarzo 3 ml

### 2.6.2. Equipos

- ✦ Espectrofotómetro

### 2.6.3. Reactivos

- ✦ Muestras de ADN disueltas en TE
- ✦ TE 1X (medio de dilución de ADN y blanco)



**Fotografía. 4.2. Materiales, reactivos y equipo para cuantificación de ADN por espectrofotometría**

### **3. METODOS**

#### **3.1. Material Experimental**

Se muestreó 9 individuos de la especie *Oncorhynchus mykiss* en las instalaciones del Proyecto Acuícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, a los cuales se les extrajo pequeños pedazos (50 – 100 mg) de aleta dorsal, caudal por medio de tijeras de disección, y 3 ml de sangre aproximadamente.

El origen de estos individuos es el Centro de Investigaciones Acuícolas (CENIAC), los cuales son proveedores de alevines del IASA.

Este muestreo permite obtener:

- 3 cortes de aleta dorsal, 3 de aleta caudal y 3 extracciones sanguíneas para el Protocolo CTAB 5%;
- 3 cortes de aleta dorsal, 3 de aleta caudal y 3 extracciones sanguíneas para el Protocolo SDS 10%;
- 3 cortes de aleta dorsal, 3 cortes de aleta caudal y 3 extracciones sanguíneas para el Kit de Extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System.

Al mismo tiempo, fueron muestreados 9 individuos de la especie *Astroblepus ubidiai* en las instalaciones del Proyecto Acuícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, a los cuales se les extrajo pequeños pedazos (10 – 50 mg) de aleta dorsal, caudal por medio de tijeras de disección, y 0.1 ml de sangre en promedio.

El origen de estos individuos es la Cuenca Hidrográfica del lago San Pablo, provincia de Imbabura.

Este muestreo permitió obtener:

- 3 cortes de aleta dorsal, 3 de aleta caudal y 3 extracciones sanguíneas para el Protocolo CTAB 5%;
- 3 cortes de aleta dorsal, 3 de aleta caudal y 3 extracciones sanguíneas para el Protocolo SDS 10%;
- 3 cortes de aleta dorsal, 3 cortes de aleta caudal y 3 extracciones sanguíneas para el Kit de Extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System.

En la determinación del componente genético de trucha y preñadilla se utilizaron 8 individuos de cada especie, de los cuales se extrajeron órganos como: branquias, hígado, riñón y médula espinal.

Para el hemograma se obtuvieron muestras de sangre de 40 individuos de trucha y 12 individuos de preñadilla; obteniendo aproximadamente 2.5 ml y 0.5 ml de sangre, respectivamente.

## **3.2. Metodología Experimental**

### **3.2.1. Ubicación**

Este trabajo se efectuó en el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA, de la Escuela Politécnica del Ejército ESPE.

En la preparación del cariotipo, tanto en trucha como en preñadilla se utilizó el protocolo para la obtención de Células Mitóticas modificado por Martino Giuseppe y optimizado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA.

### **3.2.2. Protocolo para la obtención de Cariotipo**

1. Se anestesió a los animales con una solución de clavo de olor 20 ppm por 5 minutos.
2. Se inyectó con colchicina 0.08% el 1% del peso vivo del animal.
3. La colección de tejidos fue principalmente de zonas como: riñones, hígado, branquias, médula espinal, macerando o raspando los tejidos para obtener una muestra celular más pura.
4. La solución hipotónica que se utilizó fue KCl 0.075M, se puso gota a gota la solución hasta tener contacto con las células y luego hasta completar 10 ml. El tiempo de contacto de KCl y la solución celular fue 6 minutos y máximo 15 minutos.
5. Se colocó el fijador Carnoy, después de eliminar el KCl; se centrifugó y repitió este paso 3 veces, se dejó en refrigeración la muestra durante 12 horas.
6. Para preparar las placas se tomaron portaobjetos que previamente estuvieron sumergidos en alcohol y refrigerados, con pipeta pasteur se dejó gotear sobre los portaobjetos 3 gotas de la solución, se fijó en un mechero.
7. La tinción se hizo con una solución de colorante Giemsa y agua destilada en un volumen de 30 y 90 ml, respectivamente, durante 20 minutos.

#### ***3.2.2.1. Protocolo de preparación de cariotipos para trucha***

**Disminución de la excitación nerviosa:** Se empleó una solución sedante de esencia de clavo de olor de 20 ppm y agua. Para truchas se utilizaron 4 ml de la solución anestésica en 10 litros de agua, se sumergieron a los individuos durante 2 minutos en acuarios con oxigenadores.

**Inhibidor mitótico:** Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal e intramuscular con colchicina con una concentración del 0.08%. La cantidad a inyectarse está en función del peso corporal del individuo, se emplearon dosis de 1ml de colchicina por cada 100 gramos de peso vivo. Se devolvieron los peces a los estanques para su recuperación.

**Colección de tejidos:** Al transcurrir 2 horas para verificar el efecto del inhibidor mitótico se sumergieron nuevamente en la solución sedante a los animales. Después se procedió a extraer el epitelio branquial, riñón, médula ósea e hígado con pinzas de disección y colectarlos en una caja petri, trocear los tejidos en fragmentos más pequeños para separar las células y suspenderlas.

**Solución Hipotónica:** Se utilizó una solución de cloruro de potasio a una concentración del 0.4%. El tejido fue colectado en tubos de ensayo y gota a gota se colocó la solución hipotónica hasta 10 ml. Se dejó a temperatura ambiente por 6 minutos y como máximo 15 minutos. Se hicieron algunas pruebas previas de hipotonía alternando tiempo y temperatura en una incubadora, de las cuales se obtuvieron observaciones como que la trucha es más sensible al efecto del KCl por lo que necesita menor tiempo y temperatura ambiente.

**Adición del fijador Carnoy:** Después de la incubación, se retiró el sobrenadante con la solución hipotónica de cada muestra depositada en los tubos de ensayo y se adicionaron, en las soluciones de células suspendidas, 10 ml del fijador Carnoy que está compuesto por 3 partes de metanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial. Con agitaciones vigorosas para lavar las células. Este procedimiento se repitió 3 veces. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm. Después fueron refrigeradas las muestras durante 12 horas.

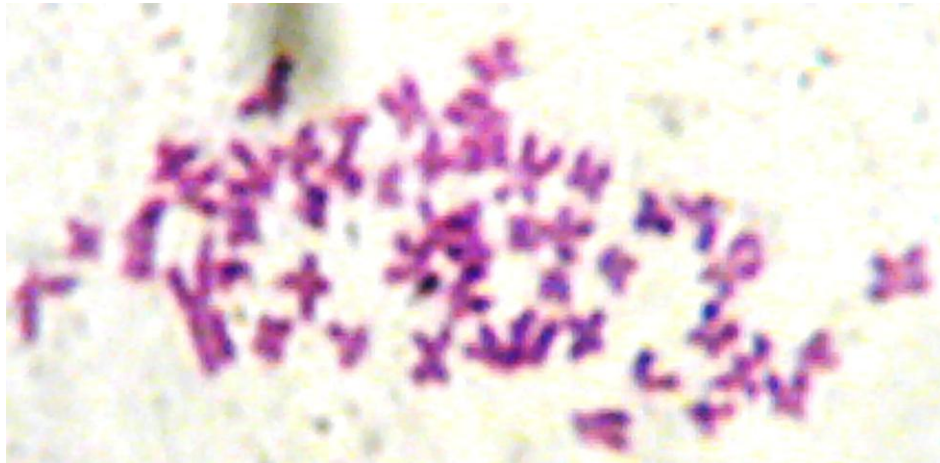
**Preparación de la placa:** Las placas portaobjetos estuvieron previamente refrigeradas y sumergidas en alcohol etílico. Se tomó con las pipetas alícuotas de las soluciones celulares y a una altura de 60 cm aproximadamente se goteó sobre la superficie de cada placa, para obtener un efecto de dispersión uniforme y ligero. Se etiquetaron y llevaron las placas al mechero para fijar cada muestra, luego se procedió a la tinción.

**Preparación del colorante Giemsa:** Fue preparada una solución madre: en un vaso de precipitación se mezclaron 33 ml de glicerina con 0.5 g de Giemsa y se dejó a baño maría a 55° C durante 24 horas. Luego se añadió 33 ml de alcohol metílico y se dejó reposar por 24 horas. Se filtró, se guardó en un frasco oscuro y en refrigeración.

**Tinción con Giemsa:** Se preparó una solución con 30 ml de Giemsa en 90 ml de agua destilada y se sumergieron las placas durante 20 minutos para su tinción. Al cabo de este tiempo se retiraron las placas, se lavaron ligeramente con agua y se dejaron secar.

**Observación en microscopio:** Se procedió a buscar en cada placa metafases celulares, en las que se observen claramente los cromosomas separados y bien definidos para ser fotografiados.

**Armadura de los cariotipos:** Una vez que han sido fotografiadas y seleccionadas las metafases bien definidas se procedió a imprimir y recortar los cromosomas. Al obtener los juegos cromosómicos, se ordenaron de acuerdo a su tamaño y forma, luego se formaron los pares cromosómicos finalmente se contaron el número de pares de cada especie para determinar el número cromosómico y determinar el sexo del individuo que se tomó como muestra.



**Fotografía 4. 3. Cromosomas de Trucha. Vista en el microscopio**

### ***3.2.2.2. Protocolo de preparación de cariotipo de preñadilla***

**Disminución de la excitación nerviosa:** Se empleó una solución sedante de esencia de clavo de olor de 20 ppm y agua. En el caso de preñadillas se utilizaron 4 ml de la solución anestésica en 2 litros de agua, los animales permanecieron durante 7 minutos en acuarios con oxigenadores hasta que disminuya su actividad nerviosa.

**Inhibidor mitótico:** Los animales fueron inyectados por vía intramuscular con colchicina con una concentración del 0.08%. La cantidad a inyectarse está en función del peso corporal del individuo, se emplearon dosis de 1 ml de colchicina por cada 100 gramos de peso vivo. Se devolvieron los peces a los estanques para su recuperación.

**Colección de tejidos:** Al transcurrir 2 horas para verificar el efecto del inhibidor mitótico se sumergieron nuevamente en la solución sedante a los animales. Después se procedió a extraer el epitelio branquial con pinzas de disección y colectarlos en una solución hipotónica en tubos de ensayo de vidrio de 15 ml. El tejido fue troceado en fragmentos más pequeños para separar las células y suspenderlas.



**Solución Hipotónica:** Se utilizó una solución de cloruro de potasio a una concentración del 0.4%. El tejido fue colectado en tubos de ensayo con alícuotas de 10 ml de la solución hipotónica. Se agitó constantemente con pipetas de transferencia de vidrio durante 2 minutos cada muestra. El tiempo de contacto debe ser mínimo 6 minutos y máximo 15 minutos y a temperatura ambiente, esto según las pruebas previas.

**Adición del fijador Carnoy:** Después de eliminar la solución hipotónica se retiró el sobrenadante con la solución hipotónica de cada muestra depositada en los tubos de ensayo y se adicionaron, en las soluciones de células suspendidas, 10 ml del fijador Carnoy que está compuesto por 3 partes de metanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial. Con agitaciones vigorosas para lavar las células este procedimiento se repitió 3 veces. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm. Después se refrigeraron las muestras durante 12 horas.

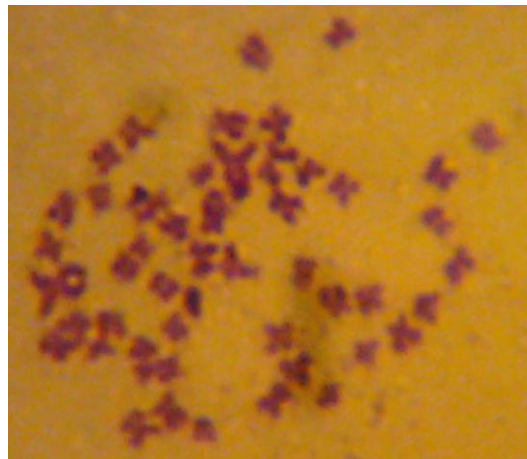
**Preparación de la placa:** Las placas portaobjetos estuvieron previamente refrigeradas y sumergidas en alcohol etílico. Se tomó con las pipetas alícuotas de las soluciones celulares y a una altura de 60 cm aproximadamente se goteó sobre la superficie de cada placa, para obtener un efecto de dispersión uniforme y ligero. Se etiquetaron y llevaron las placas al mechero para fijar cada muestra, luego se procedió a la tinción.

**Preparación del colorante Giemsa:** Fue preparada una solución madre: en un vaso de precipitación se mezclaron 33 ml de glicerina con 0.5 g de Giemsa y se dejó a baño maría a 55° C durante 24 horas. Luego se añadió 33 ml de alcohol metílico y se dejó reposar por 24 horas. Se filtró, se guardó en un frasco oscuro y en refrigeración.

**Tinción con Giemsa:** Se preparó una solución con 30 ml de Giemsa en 90 ml de agua destilada y se sumergieron las placas durante 20 minutos para su tinción. Al cabo de este tiempo se retiraron las placas, se lavaron ligeramente con agua y se dejaron secar.

**Observación en microscopio:** Se procedió a buscar en cada placa metafases celulares, en las que se observen claramente los cromosomas separados y bien definidos para ser fotografiados.

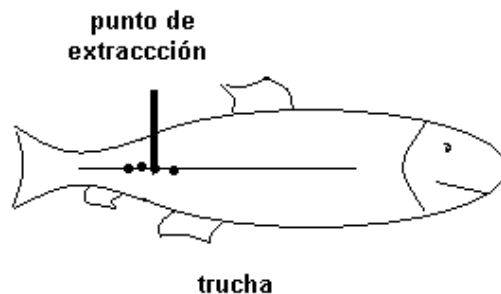
**Armadura de los cariotipos:** Una vez que han sido fotografiadas y seleccionadas las metafases bien definidas se procedió a imprimir y recortar los cromosomas. Al obtener los juegos cromosómicos, se ordenaron de acuerdo a su tamaño y forma, luego se formaron los pares cromosómicos finalmente se contaron el número de pares de cada especie para determinar el número cromosómico y determinar el sexo del individuo que se tomó como muestra.



**Fotografía 4.4. Cromosomas de Preñadilla.  
Vista en microscopio**

### 3.2.3. Metodología para Hemograma de Trucha

1. Como primer paso los individuos fueron sedados. Se empleó una solución sedante de esencia de clavo de olor de 20 ppm y agua. Para truchas se utilizaron 4 ml de la solución anestésica en 10 litros de agua, se sumergieron a los individuos durante 5 minutos, los animales permanecieron en acuarios con oxigenadores durante 11 minutos hasta que disminuya su actividad nerviosa.
2. Se obtuvo de cada individuo sus medidas morfométricas de peso y longitud.
3. Se obtuvieron muestras de sangre de 10 individuos de esta especie. Las punciones se realizaron en la región caudal, a nivel de la línea media, en trucha



**Figura 4.1. Puntos de extracción de sangre en Trucha**

4. Después de extraer la sangre se tomaron muestras en tubos capilares, respectivamente rotulados y se centrifugaron por 5 minutos a 7000 rpm, de esta forma se realizó el hematocrito, que consiste en la comparación y medición del producto centrifugado (división del plasma y elementos figurados de la sangre) con una tabla hemotocrítica de resultados que determina en porcentaje el contenido de elementos figurados en esa muestra.

5. Para el conteo de glóbulos rojos se tomó una muestra de sangre en la pipeta hematológica y se aforó con cloruro de sodio al 0.85%, se agitó y eliminando las primeras 5 gotas se colocó en la cámara de Neubauer para llevar la placa al microscopio y contar los eritrocitos. Se cuentan 5 campos de la cámara para glóbulos rojos y 4 campos para glóbulos blancos. En el caso de eritrocitos el número de glóbulos rojos contados se multiplica por 10 000.

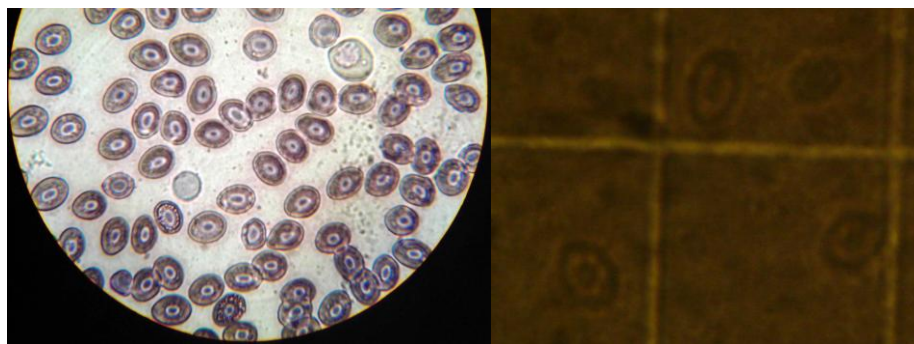
Para calcular el número de eritrocitos/mm<sup>3</sup> de sangre total, se utiliza la siguiente fórmula, donde N representa el número de eritrocitos/mm<sup>3</sup>.

$$N = \frac{4000}{80} \times 200$$

Esta fórmula se fundamenta en las consideraciones que a continuación se detallan:

Dilución de la sangre	= 1:200
Profundidad de la cámara cuenta-glóbulos	= 0.1 mm
Cada cuadro pequeño	= 1/400 mm <sup>2</sup>
Número de cuadros pequeños contados	= 80

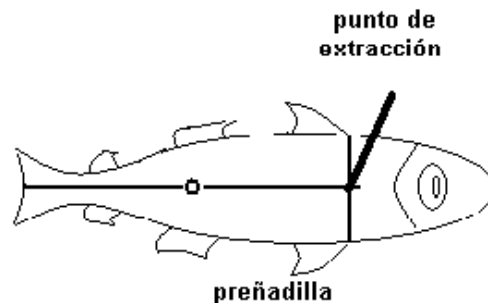
En la práctica rutinaria, es suficiente multiplicar × 10 000 el número total de eritrocitos en los cinco (5) grupos de pequeños cuadros. (FAO. 1987).



**Fotografía 4.5. Eritrocitos nucleados, glóbulos blancos de trucha (izq).  
Conteo de eritrocitos en la cámara de Neubauer (der.)**

### 3.2.4. Metodología para Hemograma de Preñadilla

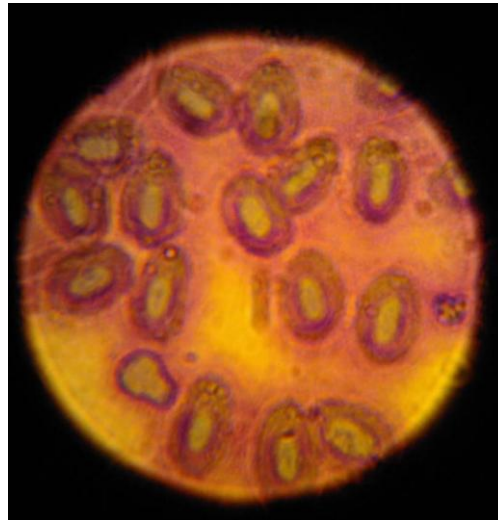
1. Inicialmente los individuos fueron sedados. Se empleó una solución sedante de esencia de clavo de olor de 20 ppm y agua. En el caso de preñadillas se utilizaron 4 ml de la solución anestésica en 2 litros de agua, los animales permanecieron durante 7 minutos en acuarios oxigenados hasta que disminuya su actividad nerviosa.
2. Se obtuvo de cada individuo sus medidas morfométricas de peso y longitud.
3. Se obtuvieron muestras de sangre de 10 individuos de esta especie. Las punciones se realizaron en la parte superior central, a la altura del corazón, en las preñadillas.



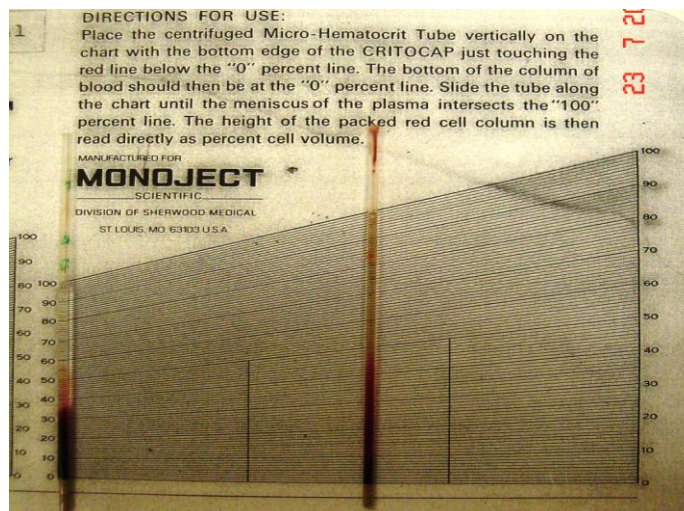
**Figura 4.2. Punto de extracción de sangre en preñadilla**

4. Después de extraer la sangre se tomaron muestras en tubos capilares, respectivamente rotulados y se centrifugaron por 5 minutos a 7000 rpm, de esta forma se realizó el hematocrito, que consiste en la comparación del producto centrifugado (división del plasma y elementos figurados de la sangre) con una tabla de resultados que determina en porcentaje el contenido de elementos figurados en esa muestra.

5. Para el conteo de glóbulos rojos se tomó una muestra de sangre en la pipeta hematológica y se aforó con cloruro de sodio al 0.85%, se agitó y eliminando las primeras 5 gotas se colocó en la cámara de Neubauer para llevar la placa al microscopio y contar los eritrocitos. Se cuentan 5 campos de la cámara para glóbulos rojos y 4 campos para glóbulos blancos. En el caso de eritrocitos se obtiene el promedio de los valores obtenidos y se multiplica por 10 000. (FAO, 1987). Se debe seguir la metodología indicada para truchas.



**Fotografía 4. 6. Eritrocitos nucleados y teñidos de preñadilla.**



**Fotografía 4.7. Capilar con sangre centrifugada de preñadilla (izq.) y capilar con sangre centrifugada de trucha (der.) sobre una tabla hematocrítica**

### 3.2.5. Recolección de Muestras para extracción

Para la recolección de las muestras en fresco, se procedió a preparar una solución de agua, alcohol etílico y esencia de aceite de clavo de olor en un balde en la siguiente proporción (20 l : 0.4 ml : 0.4 ml) para obtener una concentración de 20 ppm. Esta solución debe tener una provisión de oxígeno, para lo cual se mantiene un oxigenador en el líquido. Se sumergen los peces en la disolución por alrededor de 2 minutos o hasta cuando los peces demuestren estar anestesiados.

El pez es tomado con una toalla, se seca el exceso de agua, y se procede a cortar una porción de la aleta caudal y de la aleta dorsal. Luego, se extrae 3 ml de sangre de la trucha arco iris con una jeringuilla de 5 ml, clavando la aguja en la línea media longitudinal del pez o 100µl de sangre de la preñadilla con una jeringuilla de insulina, clavando la aguja en la parte ventral a la altura del corazón; previamente las jeringuillas fueron preparadas con EDTA anticoagulante o Heparina sódica.

Las muestras de aleta se conservan en tubos eppendorf de 1.5 ml que contengan 500 µl de TE 1X + 10 µl β mercapto etanol (Arctander, 1988). Los tubos deben ser marcados con marcador permanente, indicando especie, zona corporal y número (iniciales) (Remsen, 1977; Herman, 1980). Las muestras de sangre son conservadas en las jeringuillas. Las muestras deberán transportarse por medio de un cooler, al lugar de extracción, o serán refrigeradas a una temperatura de 4° C, para ser utilizadas antes de 3 semanas (Nakanishi *et al.*, 1969).

### **3.2.6. Extracción de ADN**

Se emplearon tres protocolos de extracción para el presente estudio: CTAB 5%, SDS 10% y ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System, los cuales fueron modificados.

#### ***3.2.6.1. Protocolo de Extracción CTAB 5% (Doyle & Doyle, 1987) modificado***

1. En un tubo eppendorf dispensar: 5 µl proteinasa K, 500 µl CTAB 5%, 10 µl βmercapto etanol a una temperatura de 60° C.
2. Colocar la muestra de aleta o sangre; macerar con pistilos plásticos las muestras de aleta o vortexear las muestras con sangre hasta homogenizar las muestras.
3. Incubar a baño maría por 1 hora a 70° C, revolviendo las muestras c/ 10 minutos.
4. Centrifugar las muestras a 14 000 RPM por 10 minutos.
5. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
6. Agregar 800 µl de CIA (Cloroformo (24) : Isoamil(1)).
7. Agitar y centrifugar a 14 000 RPM por 5 minutos.
8. Repetir desde el paso 5 hasta lograr un sobrenadante transparente (2).
9. Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo.
10. Añadir 500 µl de isopropil congelado (- 20° C).
11. Agitar suavemente hasta obtener un pellet.
12. Centrifugar a 7 000 RPM por 3 minutos para precipitar el pellet.
13. Eliminar el isopropil con cuidado de no eliminar el pellet.
14. Añadir 1.5 ml de etanol 75%.
15. Agitar suavemente y centrifugar a 7 000 RPM por 3 minutos.
16. Eliminar el etanol y dejar secar el pellet a temperatura ambiente por 3 horas.
17. Resuspender el pellet con 100 µl TE 1X e incubar a 37° C por 30 minutos.



**3.2.6.2. Protocolo de Extracción SDS 10% (Shagui – Morooof, 1994) modificado**

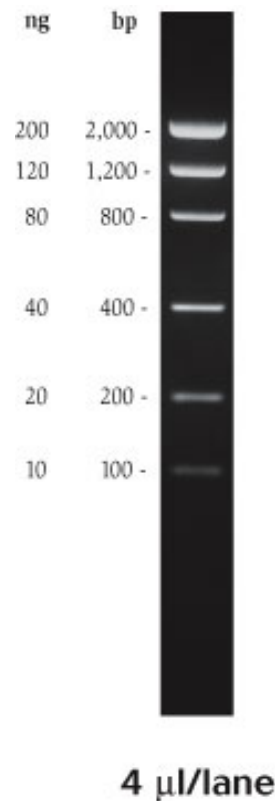
1. En un tubo eppendorf dispensar: 5 µl proteinasa K, 500 µl SDS 10%, 10 µl β mercapto etanol a una temperatura de 60° C.
2. Colocar la muestra de aleta o sangre; macerar con pistilos plásticos las muestras de aleta o vortexear las muestras con sangre hasta homogenizar las muestras.
3. Incubar por 1 hora a 70° C, revolviendo las muestras cada 10 minutos.
4. Centrifugar las muestras a 14 000 RPM por 10 minutos.
5. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
6. Agregar 800 µl de CIA (Cloroformo (24): Isoamil(1)).
7. Agitar y centrifugar a 14 000 RPM por 5 minutos.
8. Repetir desde el paso 5 hasta lograr un sobrenadante transparente (2 veces aprox.).
9. Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo.
10. Añadir 500 µl de isopropil congelado (- 20° C).
11. Agitar suavemente hasta obtener un pellet.
12. Centrifugar a 7 000 RPM por 3 minutos para precipitar el pellet.
13. Eliminar el isopropil con cuidado de no eliminar el pellet.
14. Añadir 1.5 ml de etanol 75%.
15. Agitar suavemente y centrifugar a 7 000 RPM por 3 minutos.
16. Eliminar el etanol y lavar el pellet con 250 µl NH<sub>4</sub>Ac 0.2 M.
17. Centrifugar a 7 000 RPM por 3 minutos.
18. Eliminar el NH<sub>4</sub>Ac y lavar con 1.5 ml etanol 75%.
19. Centrifugar a 7 000 RPM por 3 minutos.
20. Eliminar el etanol y dejar secar el pellet a temperatura ambiente por 3 horas.
21. Resuspender el pellet con 100 µl TE 1X e incubar a 37° C por 30 minutos.

### **3.2.6.3. Protocolo de Extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modificado**

1. Precalentar dos equipos de baño maría: uno a 70° C, y el segundo a 100° C.
2. Transferir 1 ml de Agua Libre de Nucleasa, 10 µl β mercapto etanol y 5 µl de proteinasa K a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
3. Agregar 1 – 400 µl de sangre o 10 – 50 mg de aleta en cada tubo y vortexear.
4. Incubar las muestras de sangre a temperatura ambiente por 10 minutos, vortexeando las muestras cada 2 minutos.
5. Incubar las muestras de aleta a 70° C por 10-15 minutos y macerar con pistilos plásticos hasta homogenizar la muestra.
6. Centrifugar las muestras a 15 000 RPM por 2 minutos.
7. Descartar el sobrenadante y conservar el pellet.
8. Agitar vigorosa y continuamente la Resina resuspendida con un agitador magnético y dispensar 200 µl en cada tubo.
9. Vortexear la muestra hasta resuspender el pellet.
10. Incubar la muestra por 20 minutos a 56° C.
11. Vortexear por 5 – 10 segundos.
12. Incubar por 8 minutos a 100° C.
13. Vortexear por 5 – 10 segundos.
14. Centrifugar la muestra a 15 000 RPM por 2 minutos.
15. El ADN de simple cadena aislado se encuentra en el sobrenadante. La muestra debe almacenarse a 4° C.
16. Al usar las muestras de ADN, repetir la centrifugación del paso 14 antes de usar.

### 3.2.7. Cuantificación

La técnica empleada fue el análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio (10 mg/ml) en geles de agarosa 2%, y en geles de poliacrilamida 5% y visualizados con tinción de plata. Se utilizó la solución patrón (Low DNA Mass Ladder). La **Fotografía. 4.8.** muestra el bandeo de esta solución patrón (4 µl/ pocillo ) con su respectivas equivalencias en ng y bp.



Fuente: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

**Fotografía 4.8.** Corrida electroforética de la solución patron Low DNA Mass Ladder para estimar la masa desconocida de muestras de AND por tinción con bromuro de etidio en gel de agarosa 2%, y en presencia de luz ultravioleta. Esta solución patrón es preparada a partir de ADN plásmido. La escala consiste de una mezcla equimolar de 6 fragmentos de 100 a 2 000 bp.

**Cuadro 4.1. Se detalla las cantidades (masa) de ADN en nanogramos (ng) y en pares de bases (bp), en base a la cantidad de solución patrón utilizado.**

<i>Volumen de Low DNA Mass Ladder</i>			
<b>Tamaño de Fragmento</b>	<b>2 µl</b>	<b>4 µl</b>	<b>8 µl</b>
2,000 bp	100 ng	200 ng	400 ng
1,200 bp	60 ng	120 ng	240 ng
800 bp	40 ng	80 ng	160 ng
400 bp	20 ng	40 ng	80 ng
200 bp	10 ng	20 ng	40 ng
100 bp	5 ng	10 ng	20 ng

Fuente: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

### **3.2.8. Cuantificación con geles de agarosa 2%**

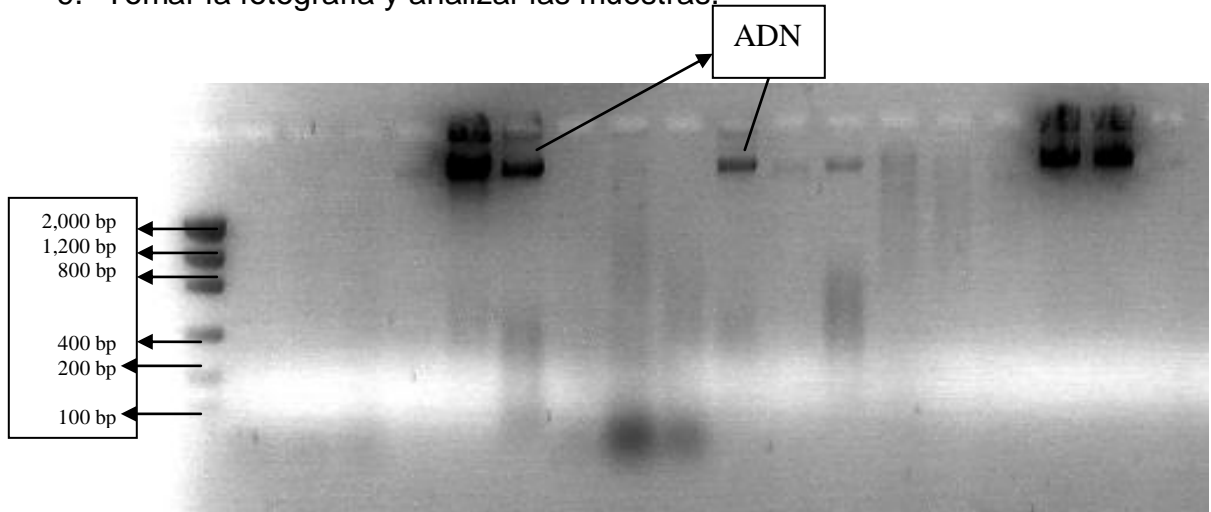
#### ***3.2.8.1. Preparación del Gel de Agarosa 2%***

1. Pesar 1.4 g de agarosa y diluir en 70 ml de TAE 1X.
2. Llevar al microondas y disolver la solución.
3. Agregar 30 µl de Bromuro de Etidio a la solución.
4. Verter el contenido en el molde acrílico de la cámara electroforética.
5. Colocar la peineta y dejar enfriar.
6. Retirar la peineta y llenar la cámara con buffer TAE 1X.

#### ***3.2.8.2. Carga de muestras y corrida del gel***

1. En papel encerado dispensar pequeñas gotas de 2 µl de Loading dye.
2. Agitar las muestras de ADN diluidas y dispensar 3 µl de solución.
3. Mezclar con las gotas de loading dye y cargar en los pocillos del gel.
4. Cargar el Low DNA Mass Ladder (2 µl) en el primer pocillo.
5. Cerrar la cámara y conectar los cables a la fuente de poder.

6. Correr las muestras a 75 V por 1 hora.
7. Desconectar la fuente de poder y dejar enfriar.
8. Visualizar el gel en el transiluminador.
9. Tomar la fotografía y analizar las muestras.



**Fotografía 4.9. Cuantificación Visual Comparativa de muestras de ADN y solución patrón Low DNA Mass Ladder (primer pocillo de la izquierda) (a continuación 6 extracciones CTAB 5%, 6 extracciones con Kit y 6 extracciones SDS 10%) en gel de agarosa 2% y visualizado con bromuro de etidio (10 mg/ml).**

### **3.2.9. Cuantificación con geles de poliacrilamida 5%**

#### **3.2.9.1. Geles de Poliacrilamida 5%**

##### **MONTAJE DE PLACAS**

1. Limpiar placas con etanol y papel toalla.
2. Aplicar 500  $\mu$ l solución antiadherente y esparcir
3. Aplicar 120  $\mu$ l solución pegante en los bordes de la placa y esparcir.
4. Colocar espaciadores en filos verticales y colocar la tapa.
5. Asegurar con pinzas los bordes. Asegurar los bordes con cinta adherente.

### **LLENADO DE PLACAS**

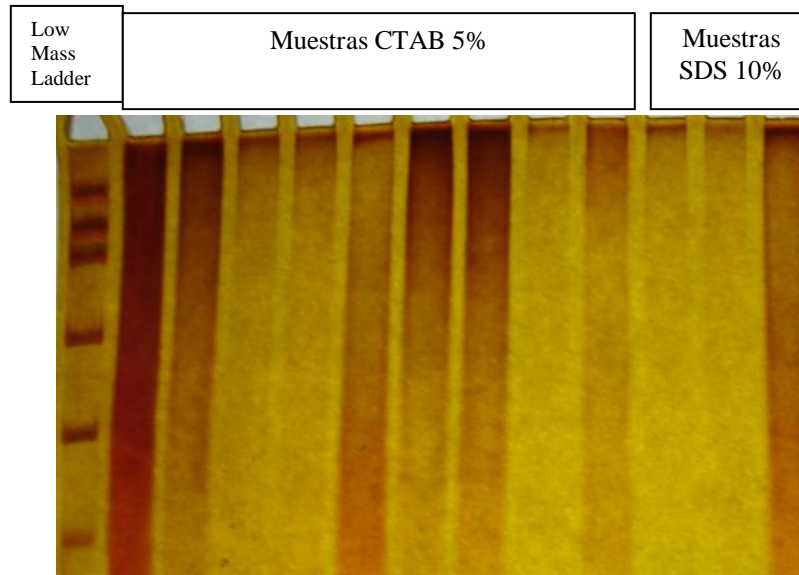
- 16.6 ml de PAA 30%
- 62.7 ml Agua Destilada
- 20 ml TBE 5X
- Agitar por 15 minutos a 30° C.
- 50 µl TEMED
- 350 µl APS 10%
- Verter solución en la parte superior de la placa en forma oblicua, evitando formar burbujas.
- Una vez llena la placa, incorporar el peine.
- Esperar 2 horas para que se complete la polimerización.
- Retirar el peine con agua desionizada o TBE 1X. Retirar los bordes de gel.
- Colocar las placas en la cámara electroforética vertical.
- Correr el gel a 50 V por 15 minutos.

### **CARGA DE MUESTRAS Y CORRIDA DEL GEL**

- En papel encerado dispensar pequeñas gotas de 2 µl de Loading dye.
- Agitar las muestras de ADN diluidas y dispensar 3 µl de solución.
- Mezclar con las gotas de loading dye y cargar en los pocillos del gel
- Cargar con Low DNA Mass Ladder (2 µl) en el primer pocillo izquierdo.
- Cerrar la cámara y conectar los cables a la fuente de poder.
- Correr las muestras a 50 V por 2 horas.
- Desconectar la fuente de poder y dejar enfriar.

### **TINCION DE PLATA**

- Despegar las placas y dejar el gel adherido a la placa orejuda.
- Sumergir la placa en la solución de fijación por 20 minutos; en la solución de impregnación por 20 minutos; en la solución de lavado (agua destilada) por 1 minuto; y, en la solución de revelado por 10 – 15 minutos.
- Llevar a una fuente de luz blanca. Visualizar y tomar fotografía.



**Fotografía 4.10. Cuantificación de ADN en gel de poliacrilamida 5%, mediante análisis comparativo con Low DNA Mass Ladder. A la izquierda se observa el bandeo de la solución patrón. Arriba en los pocillos se observa el ADN.**

### **3.2.10. Metodología para cuantificación de ADN por Espectrofotometría**

- 1.- Se tomaron 10  $\mu$ l de las muestras de ADN, éstas fueron disueltas con 990  $\mu$ l de TE, agitadas y llevadas al espectrofotómetro para su lectura.
  
- 2.- El espectrofotómetro debe estar calibrado para medir una longitud de onda de espectro ultravioleta, se midió la absorbencia de cada muestra para el posterior cálculo de la concentración mediante una fórmula matemática.

## V. RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS DEL COMPONENTE CROMOSÓMICO

En el estudio del componente cromosómico de las especies *Oncorhynchus mykiss* y *Astroblepus ubidiai* se determinó el número cromosómico diploide y clasificación de los cromosomas en grupos según su morfología y tamaño.

#### 1.1. Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

El cariotipo, número diploide y haploide de esta especie de salmónido ya ha sido determinada, sin embargo, hay que tomar en cuenta las especies utilizadas para los cruces, origen, las hibridaciones, poliploidías o la manipulación genética u hormonal que pudieron sufrir las truchas para posteriormente determinar su cariotipo ya que es afectado por los factores anteriormente descritos (Phillips *et al* , 2004).

Para la determinación del sexo de la trucha arco iris se utiliza el sistema de determinación de sexo XX/XY (Morán *et al*, 1995).

Obtenidas las fotografías de las metafases, su clasificación según tamaño y forma de los cromosomas se encontraron en la trucha arco iris 4 grupos de cromosomas más el par sexual, distribuidos de la siguiente manera:

- Grupo A: 7 pares de cromosomas metacéntricos grandes
- Grupo B: 7 pares de cromosomas submetacéntricos grandes
- Grupo C: 8 pares de cromosomas metacéntricos medianos
- Grupo D: 7 pares de cromosomas telocéntricos
- Par sexual: Genotipo de macho con cromosomas X Y
- Total de cromosomas:  $2n = 60$



Cariotipo de Trucha Arco Iris  
 $2n= 60$  cromosomas  
 Macho

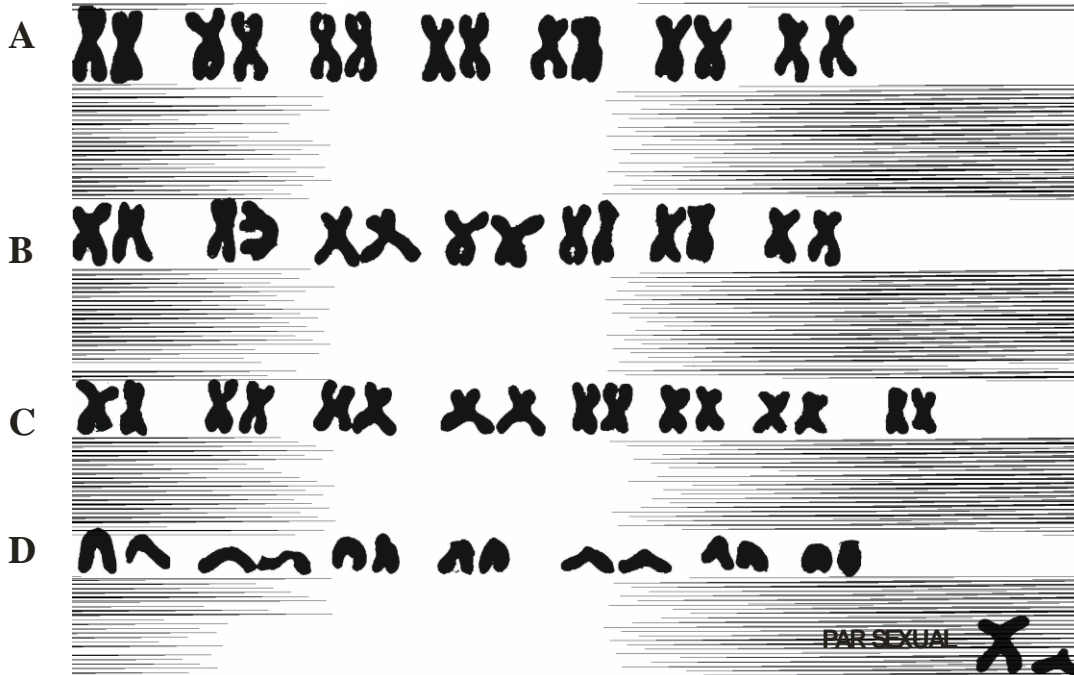


Figura 5.1. Cariotipo de trucha arcoiris

### 1.2. Preñadilla (*Astroblepus ubidiai*)

Hasta el momento no existen o no han sido publicados estudios citogenéticos acerca de la preñadilla, lo que dificulta la discusión, sin embargo se pueden comparar y relacionar rasgos característicos del orden, en este caso siluriformes y las familias más cercanas a Astroblepidae como Loricariidae y Ariidae<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> Barriga, R. 2007. *Astroblepus ubidiai* (entrevista). Quito. Escuela Politécnica Nacional

La preñadilla presenta en su cariotipo 52 cromosomas que fueron ubicados en 6 grupos más el par sexual XX para macho o XY para hembra. Los resultados muestran la siguiente distribución y ordenación cromosómica: 1 par de cromosomas submetacéntricos grandes, 7 pares submetacéntricos medianos, 3 metacéntricos grandes, 3 pares de telocéntricos grandes, 8 pares metacéntricos medianos, 3 telocéntricos pequeños y dos cromosomas metacéntricos sexuales, definiendo al individuo en estudio como hembra con los cromosomas sexuales XX.

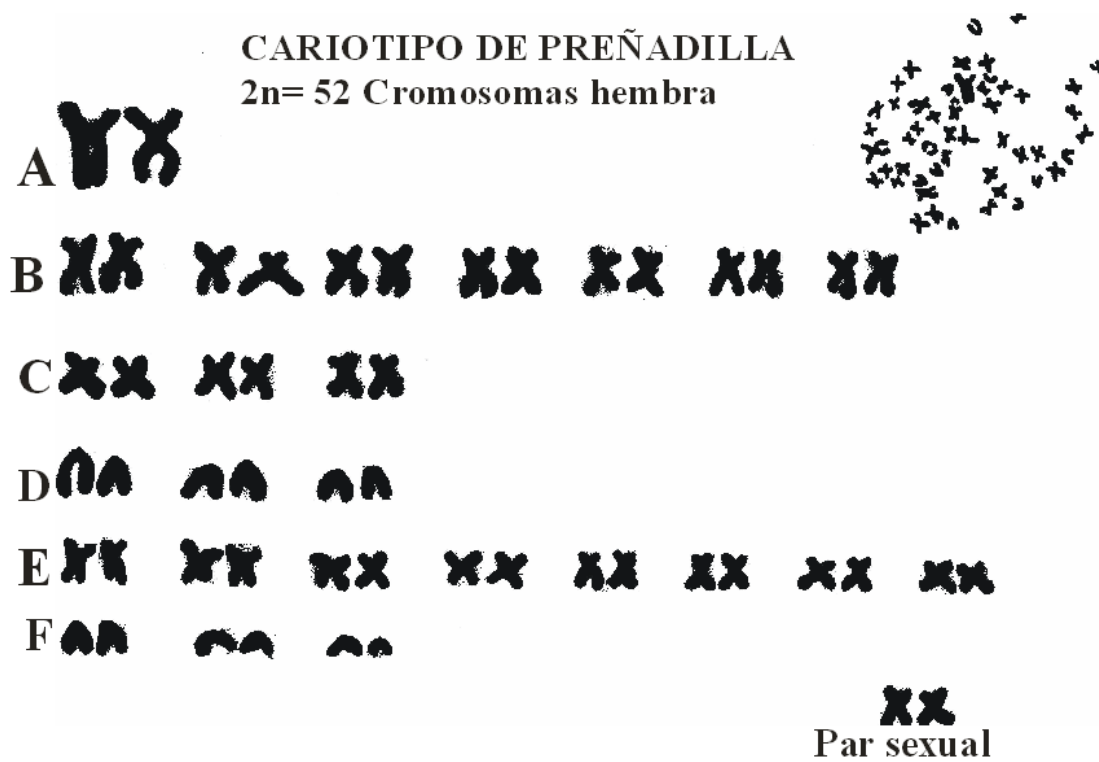


Figura 5.2. Cariotipo de preñadilla

## 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 2.1. Tamaño de Muestras

Las muestras de tejido (aletas y sangre) una vez recolectadas, fueron pesadas y medidas.

Tanto en trucha arco iris como en preñadilla se extrajo ADN con tres protocolos: CTAB 5%, SDS 10% y ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System. A continuación se presentan los pesos y volúmenes de las muestras.

**Cuadro 5.1. Pesos de aletas (dorsal y caudal) y volúmenes de sangre utilizados como muestras para la extracción de ADN en trucha y preñadilla.**

TAMAÑO DE LA MUESTRA ( mg – µl)			
<b>TRUCHA</b>			
<i>Zona de extracción</i>	PROTOCOLO		
	<b>CTAB 5%</b>	<b>SDS 10%</b>	<b>R.A. KIT</b>
<b>dorsal</b>	60 mg	60 mg	60 mg
<b>caudal</b>	70 mg	70 mg	70 mg
<b>sangre</b>	500 µl	500 µl	500 µl
<b>PREÑADILLA</b>			
<i>Zona de extracción</i>	PROTOCOLO		
	<b>CTAB 5%</b>	<b>SDS 10%</b>	<b>R.A. KIT</b>
<b>dorsal</b>	10 mg	10 mg	10 mg
<b>caudal</b>	15 mg	15 mg	15 mg
<b>sangre</b>	5 µl	5 µl	5 µl

## 2.2. Concentración Media de ADN

En el **Cuadro 5.2.**, se resumen las concentraciones medias de ADN obtenidas para cada tejido extraído o zona de extracción (aleta caudal, dorsal y sangre), para cada protocolo utilizado (CTAB 5%, SDS 10% y R.A. Kit) en las especies trucha arco iris y preñadilla, cuantificadas mediante las técnicas de espectrofotometría y análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de bromuro de etidio (10 mg/ml) en gel de agarosa (2%) y con tinción de plata en gel de poliacrilamida (5%).

**Cuadro 5.2. Concentración media de ADN cuantificado por espectrofotometría y análisis comparativo en geles de agarosa y poliacrilamida, para cada protocolo de extracción (CTAB 5%, SDS 10% y Kit) en las tres zonas corporales de extracción (aletas dorsal, caudal y sangre) en trucha arco iris y preñadilla.**

CUANTIFICACIÓN DE ADN									
TRUCHA									
zonas de extracción	ESPECTROFOTOMETRO µg/µl			GEL AGAROSA ng/µl			GEL POLIACRILAMIDA ng/µl		
	CTAB 5%	SDS 10%	R.A. KIT	CTAB 5%	SDS 10%	R.A. KIT	CTAB 5%	SDS 10%	R.A. KIT
<i>dorsal</i>	1.36	0.74	2.03	166,7	6,7	5,0	46,7	1,7	40,0
<i>caudal</i>	1.48	1.13	0.90	23,3	100,0	3,3	41,7	8,3	53,3
<i>sangre</i>	0.76	0,02	0.75	33,3	5,0	1,7	16,7	3,3	13,3
PREÑADILLA									
zonas de extracción	ESPECTROFOTOMETRO µg/µl			GEL AGAROSA ng/µl			GEL POLIACRILAMIDA ng/µl		
	CTAB 5%	SDS 10%	R.A. KIT	CTAB 5%	SDS 10%	R.A. KIT	CTAB 5%	SDS 10%	R.A. KIT
<i>dorsal</i>	0.37	1.85	0.45	65,0	5,0	3,3	23,3	6,7	5,0
<i>caudal</i>	0.69	0.20	1.11	10,0	5,0	3,3	5,0	6,7	1,7
<i>sangre</i>	0.30	0.06	0.9	68,3	8,3	3,3	26,7	10,0	13,3

Previa a la realización de la prueba F del análisis de varianza usual, se procedió a comprobar con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los errores que fundamentan dicho análisis; comprobándose que estos no cumplían con lo supuestos de normalidad, por lo que se consideró necesario utilizar la prueba de Kruskal – Wallis, método no paramétrico en el análisis de varianza que no depende de esta suposición; para el efecto se utilizó el programa InfoStat/Profesional versión 2007.

Se compararon los valores medios de: concentración de ADN según protocolos de extracción CTAB 5%, SDS 10% y ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modificados y zonas corporales como aleta dorsal, aleta caudal y sangre en las especies *Oncorhynchus mykiss* y *Astroblepus ubidiai*, cuantificado por espectrofotometría y con análisis comparativo de muestras coloreadas en agarosa y poliacrilamida.

### **2.3. Cuantificación de concentración de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) por Espectrofotometria**

#### **2.3.1. Cuantificación de concentración de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (aletas caudal, dorsal) en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

En el **Cuadro 5.3.**, se presenta la prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica por espectrofotometría, para dos protocolos de extracción de ADN (CTAB 5%, SDS 10%), con 12 muestras para cada protocolo (6 muestras de aleta dorsal y 6 de aleta caudal).

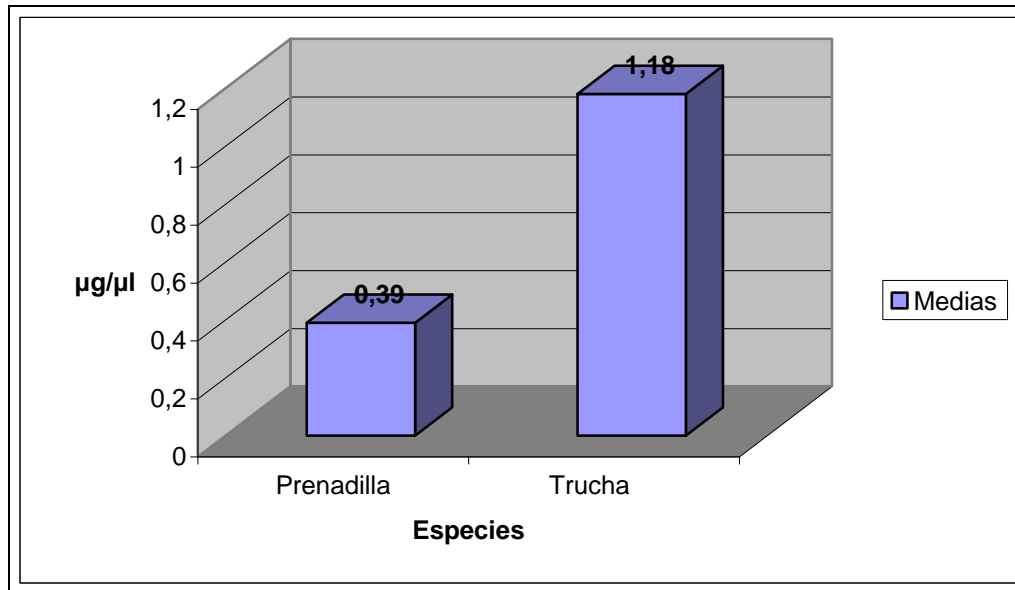
**Cuadro 5.3. Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (aletas dorsal y caudal), en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

Prueba de Kruskal Wallis						
Criterio de Selección: Especie						
Variable	Especie	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Prenadilla</i>	12	0,39	0,3	7,05	<b>0,0079</b>
ADN	<i>Trucha</i>	12	1,18	0,92		
Criterio de selección: Lugar de extracción						
Variable	Lugar	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Caudal</i>	12	0,87	0,5	0,33	0,5634
ADN	<i>Dorsal</i>	12	0,7	0,46		
Criterio de selección: Protocolo de extracción						
Variable	Protocolo	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	CTAB 5%	12	0,98	0,5	0,12	0,7288
ADN	SDS 10%	12	0,6	0,46		

Para el criterio de selección especie, se determinó que los tratamientos presentaron diferencias altamente significativas ( $p = 0.0079$ ) entre las especies trucha arco iris y preñadilla, teniendo concentraciones medias de 1.18 y 0.39  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , respectivamente.

Para los criterios de selección: protocolos y lugares de extracción, se estableció que las técnicas no presentaron diferencias estadísticas al 5% ( $p = 0.7288$  y  $p = 0.5634$ , respectivamente).

En el **Gráfico 5.1.**, se aprecia como la concentración media de ADN para el criterio de selección: especie, presentan diferencias significativas entre sí, presentando los valores correspondientes para trucha arco iris y preñadilla.



**Gráfico 5.1. Cuantificación de ADN (µg/µl) por espectrofotometría, de dos protocolos de extracción (CTAB 5% y SDS 10%) de muestras de aletas dorsal y caudal en las especies (trucha arco iris y preñadilla) (Criterio de selección = Especie).**

### **2.3.2. Cuantificación de concentración de ADN (µg/µl) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

En el **Cuadro 5.4.**, se presenta la prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica por espectrofotometría, para dos protocolos de extracción de ADN (CTAB 5%, SDS 10%), con 6 muestras para cada protocolo (3 muestras de preñadilla y 3 de trucha).

**Cuadro 5.4. Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

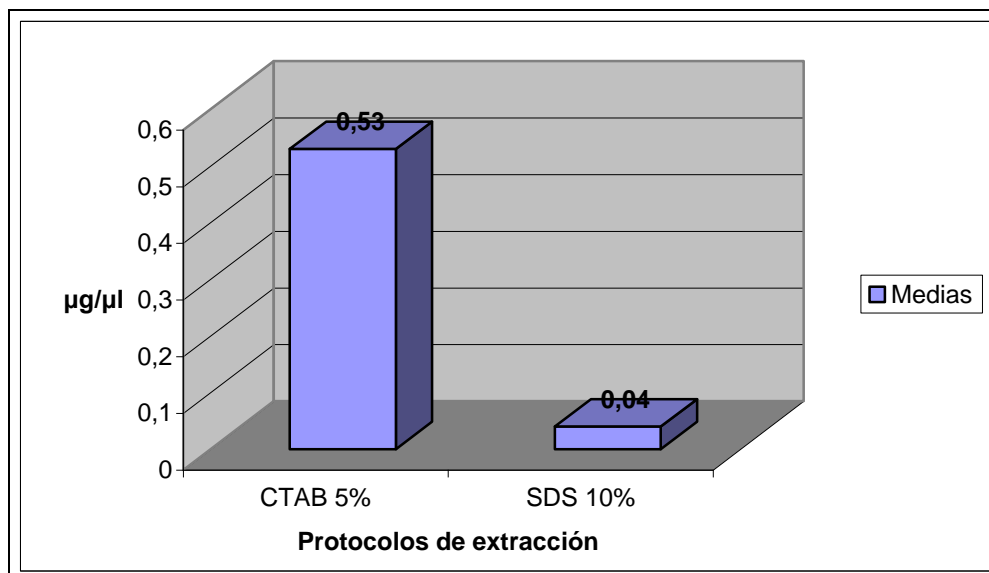
Prueba de Kruskal Wallis						
Criterio de selección: Especie						
Variable	Especie	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Prenadilla</i>	6	0,18	0,09	0,23	0,697
ADN	<i>Trucha</i>	6	0,39	0,06		
Criterio de selección: Protocolos de extracción						
Variable	Protocolo	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	CTAB 5%	6	0,53	0,45	0,23	<b>0,0346</b>
ADN	SDS 10%	6	0,04	0		

Para el criterio de selección especie, se determinó que los tratamientos no exhibieron diferencias estadísticas ( $p = 0.697$ ) entre las especies trucha arco iris y preñadilla.

Para los criterios de selección: protocolos, se determinó que las técnicas manifestaron diferencias altamente significativas ( $p = 0.0346$ ) entre las extracciones CTAB 5% y SDS 10%, con valores de concentración media de 0.53 y 0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , respectivamente.

Objetivamente las diferencias de concentración media entre los protocolos CTAB 5% y SDS 10% son presentadas en el **Gráfico 5.2**.





**Gráfico 5.2. Cuantificación de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) por espectrofotometría con respecto a los protocolos de extracción (CTAB 5% y SDS 10%) en las especies trucha arco iris y preñadilla para muestras de sangre (criterio de selección = protocolos).**

### **2.3.3. Cuantificación de concentración de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) del protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System de tejido sanguíneo en las especies trucha arco iris y preñadilla**

En el **Cuadro 5.5.**, se presenta la prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica de espectrofotometría para el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA, con 3 muestras de sangre para cada especie (3 muestras de preñadilla y 3 de trucha).

**Cuadro 5.5. Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras sanguíneas con el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

Prueba de Kruskal Wallis						
Criterio de selección: Especie						
Variable	Especie	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Prenadilla</i>	3	0,9	0,18	0,43	0,7
ADN	<i>Trucha</i>	3	0,75	0,77		

Para el criterio de selección especie, se determinó que los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas ( $p = 0.7$ ) entre las especies trucha arco iris y preñadilla.

#### **2.4. Cuantificación de concentración de ADN (ng/ $\mu$ l) con análisis comparativo de muestras coloreadas en geles.**

La cuantificación de ADN con Análisis Comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio (10 mg/ml) en gel de agarosa (2%) y con tinción de plata en gel de poliacrilamida (5%) mediante la utilización de los tres protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10% y Kit), mostró valores que fueron obtenidos por comparación visual con respecto a la corrida de la solución patrón Low Mass DNA Ladder cuyos valores en nanogramos (ng) son: 200, 120, 80, 40, 20 y 10, y en pares de bases (bp) son: 2000, 1200, 800, 400, 200 y 100, respectivamente.

**2.4.1. Cuantificación de concentración de ADN (ng/μl) con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio (10 mg/ml) en geles de agarosa (2%).**

**2.4.1.1. Cuantificación de concentración de ADN (ng/μl) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (Aletas caudal, dorsal) en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

La prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en gel de agarosa, para dos protocolos de extracción de ADN (CTAB 5%, SDS 10%), con 12 muestras para cada protocolo (6 muestras de aleta dorsal y 6 de aleta caudal) se presentan en el **Cuadro 5.6.**

**Cuadro 5.6. Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (aletas dorsal y caudal), en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

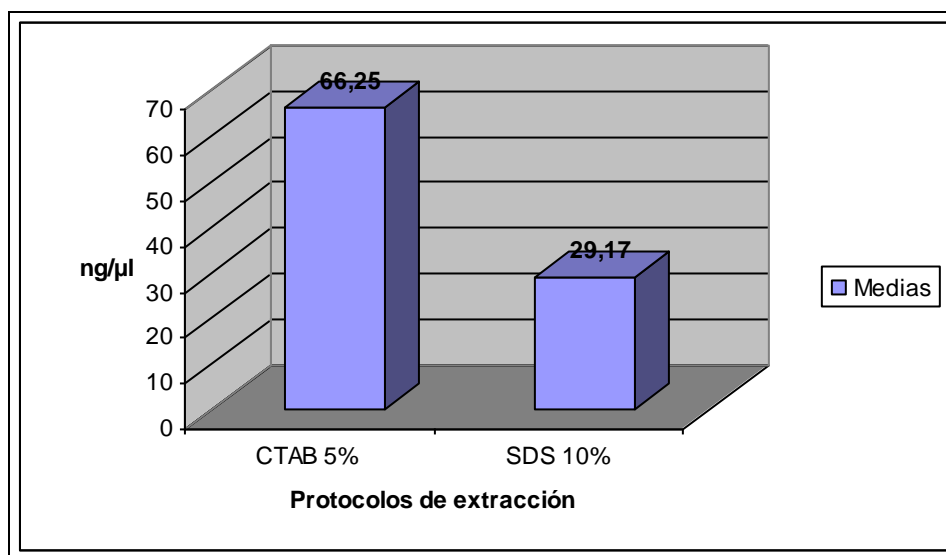
<b>Prueba de Kruskal Wallis</b>						
Criterio de selección: Especie						
<b>Variable</b>	<b>Especie</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>Medianas</b>	<b>H</b>	<b>p</b>
<i>ADN</i>	<i>Prenadilla</i>	12	21,25	5	5,33	<b>0,017</b>
<i>ADN</i>	<i>Trucha</i>	12	74,17	70		
Criterio de selección: Protocolos de extracción						
<b>Variable</b>	<b>Protocolo</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>Medianas</b>	<b>H</b>	<b>p</b>
<i>ADN</i>	<i>CTAB 5%</i>	12	66,25	30	5,07	<b>0,02</b>
<i>ADN</i>	<i>SDS 10%</i>	12	29,17	5		
Criterio de selección: Lugares de extracción						
<b>Variable</b>	<b>Lugar</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>Medianas</b>	<b>H</b>	<b>p</b>
<i>ADN</i>	<i>Caudal</i>	12	34,58	12,5	0,04	0,8346
<i>ADN</i>	<i>Dorsal</i>	12	60,83	12,5		

Para el criterio de selección especie, se determinó que los tratamientos presentan diferencias altamente significativas ( $p = 0.017$ ) entre las especies trucha arco iris y preñadilla, teniendo concentraciones medias de 74.17 y 21.25 ng/ $\mu$ l, respectivamente.

Para el criterio de selección protocolos de extracción, se estableció que las técnicas exhiben diferencias altamente significativas ( $p = 0.02$ ) entre los métodos CTAB 5% y SDS 10%, teniendo concentraciones medias de 66.25 y 29.17 ng/ $\mu$ l, respectivamente.

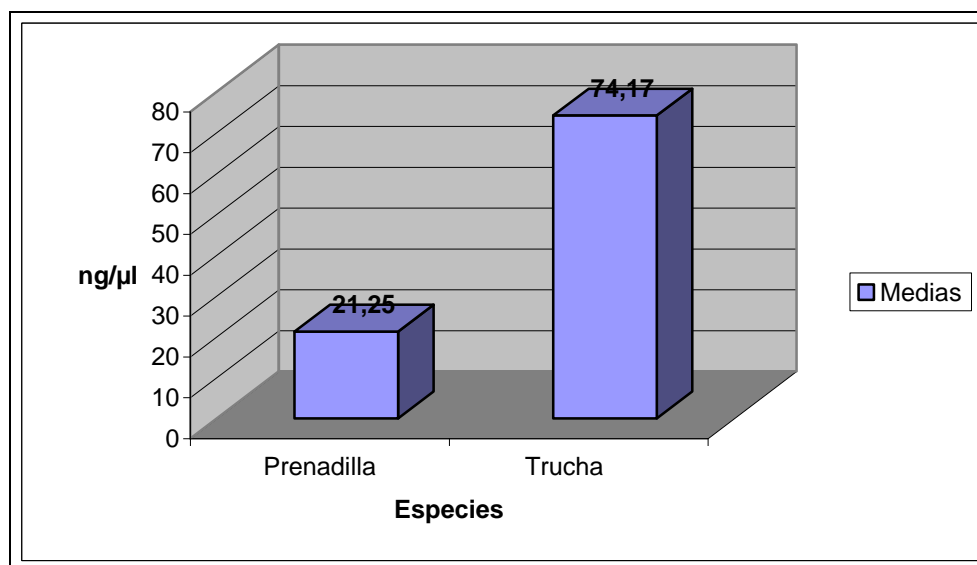
Para el criterio de selección: lugares de extracción, se determinó que los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas ( $p = 0.8346$ ); cabe indicar que las medias para aleta dorsal y caudal mostraron diferencias apreciables. Esto se debe a que entre repeticiones para cada factor en estudio, existió mucha variabilidad.

En el **Gráfico 5.3.**, se aprecia como los protocolos de extracción, CTAB 5% y SDS 10%, presentan diferencias significativas entre sí.



**Gráfico 5.3. Cuantificación de ADN (ng/ $\mu$ l) con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio (10 mg/ml) en gel de agarosa (2%) con dos protocolos de extracción para muestras de aleta dorsal y caudal en trucha y preñadilla (criterio de selección = protocolos).**

En el **Gráfico 5.4.**, se aprecia como las especies, trucha arco iris y preñadilla, presentan diferencias significativas entre sí.



**Grafico 5.4. Cuantificación de ADN (ng/μl) con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio (10 mg/ml) en gel de agarosa (2%) con dos protocolos de extracción para muestras de aleta dorsal y caudal en trucha y preñadilla (criterio de selección = especies).**

#### ***2.4.1.2. Cuantificación de concentración de ADN (ng/μl) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en muestras sanguíneas en las especies trucha arco iris y preñadilla***

En el **Cuadro 5.7.**, se presenta la prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en gel de agarosa en muestras sanguíneas en las especies trucha arco iris y preñadilla con 6 muestras para cada protocolo (3 muestras de trucha y 3 de preñadilla).

**Cuadro 5.7. Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

Prueba de Kruskal Wallis						
Criterio de selección: Especie						
Variable	Especie	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Prenadilla</i>	6	38,33	10	1,26	0,3074
ADN	<i>Trucha</i>	6	19,17	5		
Criterio de selección: Protocolos de extracción						
Variable	Protocolo	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>CTAB 5%</i>	6	50,83	50	1,26	0,1948
ADN	<i>SDS 10%</i>	6	6,67	5		

Para los criterios de selección: especie y protocolos de extracción se comprobó que los tratamientos no presentan diferencias significativas ( $p = 0.3074$ ) y ( $p = 0.1948$ ), respectivamente.

**2.4.1.3. Cuantificación de concentración de ADN (ng/μl) del protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System de tejido sanguíneo en las especies trucha arco iris y preñadilla**

En el **Cuadro 5.8.**, se presenta la prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica de espectrofotometría para el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA, con 3 muestras de sangre para cada especie (3 muestras de preñadilla y 3 de trucha).

**Cuadro 5.8. Prueba de Kruskal – Wallis con el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System en las especies trucha arco iris y preñadilla**

Prueba de Kruskal Wallis						
Criterio de selección: Especie						
Variable	Especie	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Prenadilla</i>	3	3,33	5	0,43	>0,9999
ADN	<i>Trucha</i>	3	1,67	0		

Para el criterio de selección: especie se corroboró que entre trucha y preñadilla, los tratamientos no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.999$ ); la variabilidad que presentan las concentraciones medias de cada especie es debido a la heterogeneidad entre las repeticiones.

**2.4.2. Cuantificación de concentración de ADN (ng/μl) con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en geles de poliacrilamida (5%).**

***2.4.2.1. Cuantificación de concentración de ADN (ng/μl) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (Aletas caudal, dorsal) en las especies trucha arco iris y preñadilla.***

En el **Cuadro 5.9.**, se observa la prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida, para dos protocolos de extracción de ADN (CTAB 5%, SDS 10%), con 12 muestras para cada protocolo (6 muestras de aleta dorsal y 6 de aleta caudal).

**Cuadro 5.9. Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) en dos zonas corporales (aletas dorsal y caudal), en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

Prueba de Kruskal Wallis						
Criterio de selección: Especie						
Variable	Especie	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Prenadilla</i>	12	10,42	5	0,01	0,9279
ADN	<i>Trucha</i>	12	24,58	7,5		
Criterio de selección: Lugar de extracción						
Variable	Lugar	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Caudal</i>	12	15,42	5	8,30E-04	0,9759
ADN	<i>Dorsal</i>	12	19,58	7,5		
Criterio de selección: Protocolos de extracción						
Variable	Protocolo	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>CTAB 5%</i>	12	29,17	15	3,2	0,0616
ADN	<i>SDS 10%</i>	12	5,83	5		

Para los criterios de selección: especie, protocolos y zonas de extracción se determinó que los tratamientos no presentaron diferencias significativas ( $p = 0.9279$ ), ( $p = 0.0616$ ) y ( $p = 0.9759$ ), respectivamente. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas a nivel del 10% para el criterio protocolos de extracción.

**2.4.2.2. Cuantificación de concentración de ADN (ng/μl) de dos protocolos (CTAB 5%, SDS 10%) en muestras sanguíneas en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

En el **Cuadro 5.10.**, se presenta la prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida de muestras sanguíneas en las especies trucha arco iris y preñadilla con 6 muestras para cada protocolo (3 muestras de trucha y 3 de preñadilla).



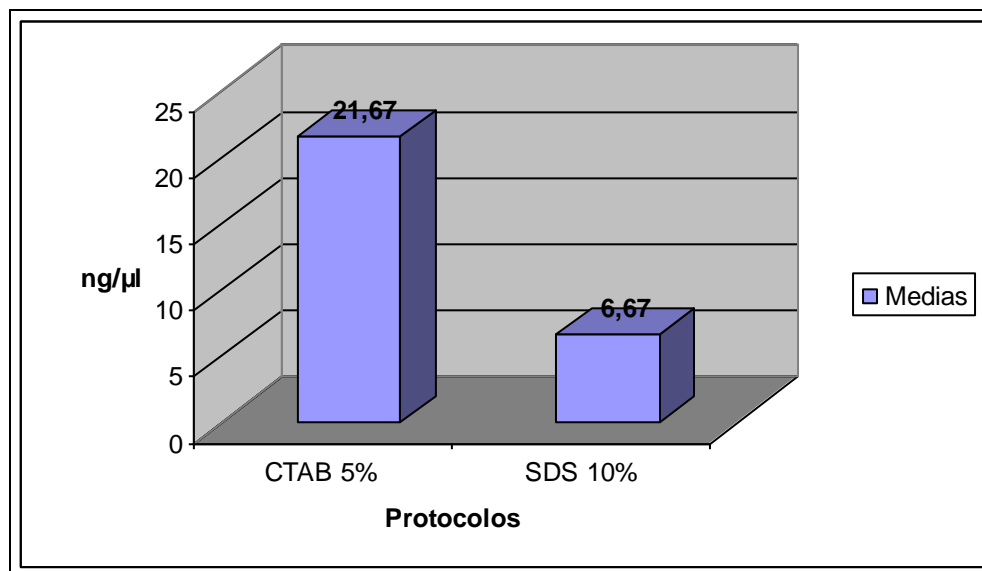
**Cuadro 5.10. Prueba de Kruskal – Wallis de dos protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10%) de muestras de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

Prueba de Kruskal Wallis						
Criterio de selección: Especie						
Variable	Especie	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Prenadilla</i>	6	18,33	15	1,26	0,3398
ADN	<i>Trucha</i>	6	10	10		
Criterio de selección: Protocolos de extracción						
Variable	Protocolo	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>CTAB 5%</i>	6	21,67	20	1,26	<b>0,0108</b>
ADN	<i>SDS 10%</i>	6	6,67	10		

Para el criterio de selección especie no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.3398$ ).

Existieron diferencias altamente significativas entre protocolos de extracción, con un valor  $p = 0.0108$ , con concentraciones medias de 21.67 ng/μl para la técnica CTAB 5% y 6.67 ng/μl para SDS 10%.

En el **Gráfico 5.5.**, se aprecian las diferencias de concentración media de ADN entre los dos protocolos de extracción: CTAB 5% y SDS 10%.



**Grafico 5.5.** Cuantificación de ADN (ng/μl) con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida (5%) con dos protocolos de extracción de muestra de sangre en las especies trucha arco iris y preñadilla (criterio de selección = protocolos).

**2.4.2.3. Cuantificación de concentración de ADN (ng/μl) del protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System de tejido sanguíneo en las especies trucha arco iris y preñadilla**

La prueba de Kruskal – Wallis para la cuantificación de la concentración de ADN mediante la utilización de la técnica con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida de muestras sanguíneas en las especies trucha arco iris y preñadilla con 3 muestras para cada especie se detallan a continuación en el **Cuadro 5.11**.

**Cuadro 5.11. Prueba de Kruskal – Wallis con el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System en las especies trucha arco iris y preñadilla.**

Prueba de Kruskal Wallis						
Criterio de selección: Especie						
Variable	Especie	N	Medias	Medianas	H	p
ADN	<i>Prenadilla</i>	3	13,33	20	0,05	>0,9999
ADN	<i>Trucha</i>	3	13,33	0		

Según el criterio de selección especie, no existieron diferencias significativas entre trucha arco iris y preñadilla, con un valor  $p > 0.999$ .

### **3. Análisis Económico**

Para el análisis económico, es necesario determinar los costos individuales de cada uno de los reactivos, materiales y equipos que son necesarios para el desarrollo de los tres protocolos de extracción de ADN, así como la cuantificación de las muestras en geles de agarosa y poliácridamida. Se detalla a continuación las unidades, concepto y valor (US\$), de acuerdo a su función (equipos, reactivos y materiales) y metodología:

**Cuadro 5.12. Reactivos utilizados en el protocolo de extracción CTAB 5% y su cuantificación en geles de agarosa 2% y poliacrilamida 5%. Algunos reactivos son usados en los tres protocolos, y otros son exclusivos de un protocolo.**

Extracción de ADN			
Protocolo de Extracción CTAB 5%			
Unidad	Cantidad	Reactivos	Precio (\$)
ml	300	Aceite de Clavo de olor	10,00
ml	4540	Alcohol Etilico 96%	11,20
g	1000	Tris Ultra Pure	112,00
g	500	EDTA Ultra Pure	131,00
g	1000	CTAB	425,60
g	1000	Cloruro de Sodio	17,92
ml	500	Agua Ultra Pura	22,40
µl	1000	Proteinasa K	13,44
µl	50000	B mercapto etanol	56,00
ml	250	Cloroformo	6,72
ml	1000	Alcohol Isoamilico	37,98
ml	1000	Alcohol Isopropilico	29,65
ml	1000	Hidróxido de sodio (solución 5 M)	16,68
ml	1000	Acido Clorhídrico 37%	22,37
<b>SUBTOTAL</b>			<b>912,96</b>

**Cuadro 5.13. Reactivos utilizados en el protocolo de extracción SDS 10% y su cuantificación en geles de agarosa 2% y poliacrilamida 5%. Algunos reactivos son usados en los tres protocolos, y otros son exclusivos de un protocolo.**

<b>Extracción de ADN</b>			
<b>Protocolo de Extracción SDS 10 %</b>			
<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Precio (\$)</b>
ml	300	Aceite de Clavo de olor	10,00
ml	4540	Alcohol Etilico 96%	11,20
g	1000	Tris Ultra Pure	112,00
g	500	EDTA Ultra Pure	131,00
g	1000	Cloruro de Sodio	17,92
ml	500	Agua Ultra Pura	22,40
µl	1000	Proteinasa K	13,44
µl	50000	B mercapto etanol	56,00
ml	250	Cloroformo	6,72
ml	1000	Alcohol Isoamilico	37,98
ml	1000	Alcohol Isopropilico	29,65
g	500	SDS Ultra Puro	207,20
ml	1000	Hidróxido de sodio (solución 5 M)	16,68
ml	1000	Acido Clorhídrico 37%	22,37
g	500	Acetato de Amonio	23,41
<b>SUBTOTAL</b>			<b>717,97</b>

**Cuadro 5.14. Reactivos utilizados en el protocolo de extracción DNA Ready Amp™) y su cuantificación en geles de agarosa 2% y poliacrilamida 5%. Algunos reactivos son usados en los tres protocolos, y otros son exclusivos de un protocolo.**

<b>Extracción de ADN</b>			
<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Precio (\$)</b>
ml	300	Aceite de Clavo de olor	10,00
ml	4540	Alcohol Etilico 96%	11,20
µl	1000	Proteinasa K	13,44
µl	50000	B mercapto etanol	56,00
Unidad	200	Kit de Extracción ADN sangre	156,80
<b>SUBTOTAL</b>			<b>247,44</b>

**Cuadro 5.15. Reactivos utilizados para la Cuantificación de ADN en geles de Agarosa 2%.**

<b>Cuantificación en Gel de Agarosa</b>			
<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Precio</b>
g	500	Agarosa Ultra Pura	470,40
g	1000	Tris Ultra Pure	112,00
g	500	EDTA Ultra Pure	131,00
ml	1000	Acido Glacial Acético	25,50
µl	10000	Bromuro de Ethidio	78,40
µl	3000	10X Blue Juice Loading Buffer	44,80
µl	1000	Low DNA Mass Ladder	95,20
<b>SUBTOTAL</b>			<b>957,30</b>

**Cuadro 5.16. Reactivos utilizados para la Cuantificación de ADN en geles de Poliacrilamida 5%.**

<b>Cuantificación en Gel de Poliacrilamida</b>			
<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Precio</b>
g	500	Acrilamida Ultra Pura	224,00
g	100	Bisacrilamida	140,00
g	1000	Tris Ultra Pure	112,00
g	500	EDTA Ultra Pure	131,00
g	500	Acido Bórico	78,40
g	25	Amonio Persulfato	39,20
µl	30000	TEMED	50,40
g	500	Urea Ultra Pura	59,36
ml	1000	Solución Glass Bond	5,00
ml	4540	Alcohol Etílico 96%	11,20
ml	1000	Acido Glacial Acético	25,50
g	100	Nitrato de Plata	280,00
g	1000	Hidóxido de Sodio	44,80
ml	1000	Formaldehído 37%	24,97
µl	3000	10X Blue Juice Loading Buffer	44,80
µl	1000	Low DNA Mass Ladder	95,20
		<b>SUBTOTAL</b>	<b>1365,83</b>

**Cuadro 5.17. Detalle de costo de equipos necesarios para desarrollar las técnicas de extracción de ADN (Protocolos CTAB 5%, SDS 10%, ADN Ready Amp™) y su cuantificación en geles de Agarosa 2% y poliacrilamida 5%.**

<b>Unidad</b>	<b>Equipos</b>	<b>Precio</b>
1	Pipeta de Volumen 100 - 1000 µl Autoclavables	285,04
1	Pipeta de Volumen 20 - 200 µl Autoclavables	285,04
1	Pipeta de Volumen 0,5 - 10 µl Autoclavables	324,24
1	Baño de Agua con Display Digital capacidad 10 L	1668,80
1	Fisher Vortex Genie con 2 plataformas	632,80
1	Microcentrifuga 14,000 RPM Refrigeración 4° C	4386,74
1	Congelador	1100,00
1	Balanza Analítica Denver Instrument 200 g - 0,1 mg	1862,00
1	Autoclave Capacidad 11 L 5 Programas	3294,00
1	Equipo de destilación 4 l/hora	1115,00
1	Equipo de Agitación Magnética y Calentador	280,00
2	Tubera Plástica con Tapa 96 x 1.5 ml	89,60
1	Benchtop Cooler 20 microtubos 1.5 ml	134,40
1	Set Magnetos octogonales y 4 microbarras	125,44
1	Espectrofotómetro	3796,47
1	Microondas	155,00
1	Cámara de Electroforesis Horizontal	630,00
1	Cámara de Electroforesis Vertical	1028,00
1	Fuente de Poder Alto Voltaje Capacidad 4 cámaras	2626,40
1	Transiluminador de intensidad variable de luz UV	3925,60
1	Cámara Fotográfica con conos diferentes tamaños	1086,40
1	Negatoscopio	80,00
4	Bandejas de plástico 2 litros	20,00
	<b>TOTAL</b>	<b>28930,97</b>



**Cuadro 5.18. Costo de Materiales requeridos para desarrollar las Extracciones de ADN (Protocolos CTAB 5%, SDS 10%, ADN Ready Amp™) y su Cuantificación con geles de Agarosa 2% y Poliacrilamida 5%.**

<b>Materiales</b>			
<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Materiales</b>	<b>Precio</b>
Unidad	1000	Microtubos 1.5 ml	26,88
Unidad	1000	Puntas Azules 1000 µl	15,68
Unidad	1000	Puntas Amarillas 200 µl	13,44
Unidad	50	Guantes de Látex	8,40
Unidad	960	Puntas con Filtro 10 µl	89,6
Unidad	50	Guantes de Nitrilo	22,40
Unidad	30	Cinta Adherente	5,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>181,40</b>

Contando con los precios referenciales (precios sujetos a cambio), es necesario determinar el valor en dólares de cada una de las soluciones Stock, necesarias para la realización de cada uno de los Protocolos de Extracción, así como la Cuantificación del ADN extraído, en geles de Agarosa 2% y Poliacrilamida 5%.

Una vez determinado el precio de las soluciones stock, se determinó el número de muestras mínimo en cada uno de los protocolos de extracción de ADN, así como su posterior cuantificación. El valor asignado fue de 100, puesto que, es la mínima cantidad de muestras que deberán ser analizadas para optimizar la utilización de los reactivos, en especial de los utilizados durante la cuantificación de ADN en geles, debido a que tanto las placas con gel de poliacrilamida, como los moldes con gel de agarosa, poseen en la mayoría de los casos un determinado número de pocillos, en los cuales serán depositadas las muestras de ADN, que serán corridas y analizadas. Por ello se decidió analizar cámaras electroforéticas (vertical y horizontal) que permitían disponer de un número similar de pocillos.

Cabe mencionar que, en laboratorios especializados en el desarrollo de estas técnicas moleculares, el número de muestras analizadas es, en la mayoría de los casos 5 o 10 veces mayor al mínimo asignado en este estudio. Pero el análisis del mismo no cambia significativamente, ya que los valores propuestos solamente deberán ser multiplicados de acuerdo al número de muestras analizadas o en base al número de geles utilizados para su cuantificación, respectivamente.

El valor por los equipos involucrados en el desarrollo de estas técnicas, fue depreciado a 10 años. Posteriormente, el valor de esta depreciación fue calculado en horas (valor/hora). Se determinó el costo del uso de todos los equipos inmiscuidos en estos procesos por hora de trabajo (\$ 0.66). Se asignó un precio referencial por el uso de Servicios Básicos (energía eléctrica y agua potable), así como por el arrendamiento del laboratorio. Este valor fue de \$ 0.31 / hora. En total el precio por hora del uso del laboratorio, equipos, servicios es de noventa y siete centavos de dólar (\$ 0.97).

Con estos valores (número de muestras mínimo, costo / hora), así como los precios individuales de cada uno de los materiales usados y el costo de las cantidades requeridas de las soluciones stock para las 100 muestras determinadas, se determinó el costo de producción, para la extracción de ADN y su posterior cuantificación, para cada uno de los protocolos de extracción (CTAB 5%, SDS 10% y ADN Ready Amp™) y para cada uno de los protocolos de cuantificación en gel de agarosa 2% y en gel de poliacrilamida 5%.

Los costos se detallan a continuación:

**Cuadro 5.19. Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo CTAB 5% y su Cuantificación con Gel de Agarosa 2%**

<b>COSTO EXTRACCION ADN CTAB 5% Y CUANTIFICACION (AGAROSA)</b>				
	<b>Concepto</b>	<b>Costo (\$)</b>	<b>Horas</b>	<b>Costo (\$)/Hora</b>
1	Conservación de Muestra	4,71		
2	Extracción de ADN	80,58		
3	Cuantificación Agarosa	51,15		
4	Servicios	0,28	7	0,04
5	Arriendo	6,51	7	0,93
	<b>TOTAL</b>	<b>143,23</b>		
	<b>Costo / muestra</b>	<b>1,43</b>		

**Cuadro 5.20. Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo CTAB 5% y su Cuantificación con Gel de Poliacrilamida 5%.**

<b>COSTO EXTRACCION ADN CTAB 5% Y CUANTIFICACION (PAA 5%)</b>				
	<b>Concepto</b>	<b>Costo (\$)</b>	<b>Horas</b>	<b>Costo (\$)/Hora</b>
1	Conservación de Muestra	4,71		
2	Extracción de ADN	80,58		
3	Cuantificación PAA 5%	52,88		
4	Servicios	0,32	8	0,04
5	Arriendo	7,44	8	0,93
	<b>TOTAL</b>	<b>145,93</b>		
	<b>Costo / muestra</b>	<b>1,46</b>		

**Cuadro 5.21. Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo SDS 10% y su Cuantificación con Gel de Agarosa 2%.**

<b>COSTO EXTRACCION ADN SDS 10% Y CUANTIFICACION (AGAROSA)</b>				
	<b>Concepto</b>	<b>Costo (\$)</b>	<b>Horas</b>	<b>Costo (\$)/Hora</b>
1	Conservación de Muestra	4,71		
2	Extracción de ADN	83,62		
3	Cuantificación (Agarosa)	51,15		
4	Servicios	0,28	7	0,04
5	Arriendo	6,51	7	0,93
	<b>TOTAL</b>	<b>146,27</b>		
	<b>Costo / muestra</b>	<b>1,46</b>		

**Cuadro 5.22. Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo SDS 10% y su Cuantificación con Gel de Poliacrilamida 5%.**

<b>COSTOS EXTRACCION ADN SDS 10% Y CUANTIFICACION (PAA 5%)</b>				
	<b>Concepto</b>	<b>Costo (\$)</b>	<b>Horas</b>	<b>Costo (\$)/Hora</b>
1	Conservación de Muestra	4,71		
2	Extracción de ADN	83,62		
3	Cuantificación PAA 5%	52,88		
4	Servicios	0,32	8	0,04
5	Arriendo	7,44	8	0,93
	<b>TOTAL</b>	<b>148,97</b>		
	<b>Costo / muestra</b>	<b>1,49</b>		

**Cuadro 5.23. Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo ADN Ready Amp™ y su Cuantificación con Gel de Agarosa 2%.**

<b>COSTOS EXTRACCION ADN Ready Amp™ Y CUANTIFICACION (AGAROSA)</b>				
	<b>Concepto</b>	<b>Costo (\$)</b>	<b>Horas</b>	<b>Costo (\$)/Hora</b>
1	Conservación de Muestra	4,71		
2	Extracción de ADN	129,20		
3	Cuantificación (Agarosa)	51,15		
4	Servicios	0,28	7	0,04
5	Arriendo	6,51	7	0,93
	<b>TOTAL</b>	<b>191,85</b>		
	<b>Costo / muestra</b>	<b>1,92</b>		

**Cuadro 5.24. Costo de Extracción de ADN de 100 muestras con Protocolo ADN Ready Amp™ y su Cuantificación con Gel de Poliacrilamida 5%.**

<b>COSTOS EXTRACCION ADN Ready Amp™ Y CUANTIFICACION (AGAROSA)</b>				
	<b>Concepto</b>	<b>Costo (\$)</b>	<b>Horas</b>	<b>Costo (\$)/Hora</b>
1	Conservación de Muestra	4,71		
2	Extracción de ADN	129,20		
3	Cuantificación (PAA 5%)	52,88		
4	Servicios	0,32	8	0,04
5	Arriendo	7,44	8	0,93
	<b>TOTAL</b>	<b>194,55</b>		
	<b>Costo / muestra</b>	<b>1,95</b>		

Como se puede observar, los costos de producción entre los Protocolos CTAB 5% y SDS 10%, son ligeramente diferentes, con una diferencia de \$ 3.04 al cuantificar con gel de agarosa 2% o con gel de poliacrilamida al 5% por cada 100 muestras extraídas; por lo que el valor económico no sería el principal factor de decisión al momento de elegir el protocolo CTAB 5% o el protocolo SDS 10%.

Mientras que, al comparar los dos primeros protocolos con el protocolo de extracción DNA Ready Amp™, se puede observar una gran diferencia de precio (\$48,62 con CTAB 5% y \$ 45,58 con SDS 10%, ambas cuantificando con gel de agarosa o poliacrilamida).

El análisis comparativo de costos por unidad, de los tres tipos de extracción de ADN (CTAB 5%, SDS 10% y DNA Ready Amp™) cuantificados con análisis comparativo de muestras coloreadas, con bromuro de etidio (10 mg/ml) en gel de agarosa, y con tinción de plata en gel de poliacrilamida, se muestra en el **Cuadro 5.25**.

**Cuadro 5.25. Análisis Comparativo de costos de los tres protocolos de extracción y cuantificados en geles de agarosa (2%) y poliacrilamida (5%).**

	<b>Protocolo</b>	<b>Cuantificación</b>	<b>Costo/Unidad</b>
<b>1</b>	CTAB 5%	Agarosa (2%)	\$ 1,43
<b>2</b>	CTAB 5%	Poliacrilamida (5%)	\$ 1,46
<b>3</b>	SDS 10%	Agarosa (2%)	\$ 1,46
<b>4</b>	SDS 10%	Poliacrilamida (5%)	\$ 1,49
<b>5</b>	DNA Ready Amp	Agarosa (2%)	\$ 1,92
<b>6</b>	DNA Ready Amp	Poliacrilamida (5%)	\$ 1,95

## VI. DISCUSION

Se desarrollaron dos estudios citogenéticos en las especies analizadas, preñadilla y trucha arco iris. Se pudo determinar que trucha arco iris poseía un número cromosómico de  $2n = 60$ ; el resultado presentado en esta tesis es corroborado por el trabajo presentado por Pineda *et al.*, (2007), en el cual se estableció que *Oncorhynchus mykiss* tenía un número diploide de  $2n= 58-63$  cromosomas (37, 12), lo que significa que para esta especie un organismo haploide tendría un número  $n= 29-32$ . Así mismo, Thorgaard (1977) y Colihueque *et al.*, (2001), presenta igual número cromosómico en organismos diploides de trucha arco iris.

Sin embargo, hay que tomar en cuenta los antecedentes de los individuos como cruces, origen, las hibridaciones, poliploidías o la manipulación genética u hormonal que pudieron sufrir éstos para posteriormente determinar su cariotipo ya que es afectado por los factores anteriormente descritos (Phillips *et al.*, 2004).

Para la determinación del sexo de la trucha arco iris se utiliza el sistema de determinación de sexo XX/XY (Morán *et al.*, 1995)

El número cromosómico somático de la trucha arco iris obtenido en este estudio concuerda con el estudio realizado por Phillips *et al.*, 2004, en el que muestra el cariotipo realizado de tres líneas clonales de truchas de tres orígenes diferentes, mediante la técnica de fluorescencia *in situ* (FISH) de las cuales 2 líneas Swanson y Clearwater originarias de Alaska y Idaho, respectivamente, presentan  $2n=58$  y OSU originaria de California presenta  $2n= 60$ . Lo que sugiere que las truchas que tienen el mismo número cromosómico somático tienen también un origen común. En este estudio se utilizaron truchas que presentan el mismo número cromosómico que las truchas de la línea clonal OSU, originarias de California.

El número cromosómico somático de las muestras analizadas en *Astroblepus* fue de  $2n = 52$  cromosomas.

Según las muestras analizadas en *Astroblepus* el número cromosómico somático es  $2n = 52$  cromosomas, esto concuerda con los estudios hechos por LeGrande *et al.* citados por García & Uribe (1988) en el cual aseveran que todas las familias pertenecientes al orden Siluriformes con especies estudiadas citogenéticamente presentan números diploides promedios entre 40 y 60. Así podemos citar a *Harttia carvalhoi* de la familia Loricariidae que presenta  $2n = 52$  (Centofante *et al.*, 2006), a *Arius felis* de la familia Ariidae con  $2n = 54$  (García & Uribe, 1988) y con un número diploide de 56 – 58 cromosomas para *Ictalurus punctatus*, según resultados de estudios hechos por Catasonob & Gomelski, citados por Ortiz *et al.*, 2006.

La preñadilla presenta en su cariotipo 52 cromosomas que fueron ubicados en 6 grupos más el par sexual XX para macho o XY para hembra. Los resultados muestran la siguiente distribución y ordenación cromosómica: 1 par de cromosomas submetacéntricos grandes, 7 pares submetacéntricos medianos, 3 metacéntricos grandes, 3 pares de telocéntricos grandes, 8 pares metacéntricos medianos, 3 telocéntricos pequeños y dos cromosomas metacéntricos sexuales, definiendo al individuo en estudio como hembra con los cromosomas sexuales XX.

El cariotipo de *Harttia carvalhoi* está compuesto por: 9 pares de cromosomas metacéntricos, 9 pares de cromosomas submetacéntricos, 4 pares de cromosomas subteloicéntricos, 4 pares de cromosomas acrocéntricos, incluyendo el par de cromosomas sexuales pero el número cromosómico para los machos cambia,  $2n = 53$  porque presenta un cromosoma metacéntrico grande extra que determina el tipo de sistema de sexaje en esta especie que es  $XX/XY_1Y_2$  siendo X el cromosoma extra y  $Y_1$  y  $Y_2$  dos cromosomas acrocéntricos medianos, el cariotipo del macho se compone de 1 cromosoma metacéntrico grande, 8 pares de cromosomas metacéntricos, 9 pares de cromosomas submetacéntricos, 4 pares de cromosomas



subtelocéntricos, 4 pares de cromosomas acrocéntricos y 1 par de cromosomas acrocéntricos medianos (Centofante *et al.*, 2006).

Estos resultados difieren con la composición cariotípica de *Astroblepus ubidiai*, mas no el número cromosómico somático, además cabe resaltar que no han sido observados cromosomas acrocéntricos en la preñadilla. Por otra parte, *Arius felis* presenta la siguiente fórmula cariotípica: 8 pares de cromosomas metacéntricos, 6 pares de cromosomas submetacéntricos, 10 pares de cromosomas subtelocéntricos y 3 pares de cromosomas telocéntricos (García & Uribe, 1988).

Estos resultados son similares en morfología cromosómica a la de *Astroblepus*, pero es diferente el número y la distribución cromosómica.

El estudio principal realizado para la presente tesis, presentó tres protocolos de extracción de ADN, que fueron optimizados e implementados bajo las condiciones de la Hda. El Prado, en las especies *Oncorhynchus mykiss* y *Astroblepus ubidiai*.

Las técnicas de estos protocolos se fundamentan en dos tipos de procesos metodológicos; por un lado los protocolos CTAB 5% y SDS 10%, cuyo principio es la precipitación y purificación de ácidos nucleicos a través del método del fenol-cloroformo, que consiste en repetidas incorporaciones de solventes orgánicos (fenol, cloroformo y alcohol), cuyo producto final son pellets de ADN de doble cadena (Sambrook *et al.*, 1989; Hillis *et al.*, 1989; Shahjahan *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1996; Butler, 2005).

Por otra parte, el Kit DNA Reay Amp™ Genomic, el cual es una resina comercial, cuya metodología es muy similar a la usada por protocolos que utilizan la resina Chelex, en la que repetidas centrifugaciones y remoción del sobrenadante, son la base metodológica del mismo, obteniéndose al final un sobrenadante en el que se encuentran ácidos nucleicos de cadena simple, y que es usado para tests con PCR (Harms, 1975; Walsh *et al.*, 1991; McGregor *et al.*, 1996; Butler, 2005).

Cabe indicar que los tres protocolos fueron modificados, con la adición de proteinasa K, para la lisis de proteínas, y  $\beta$  mercapto etanol, como antioxidante (Doyle & Doyle, 1987; Gill *et al.*, 1994; Shagui – Morooof, 1994; Shahjahan *et al.*, 1995; Butler, 2005).

Las muestras de tejido de las especies trucha arco iris y preñadilla, fueron extirpadas de las aletas dorsales y caudales, y la extracción sanguínea de las mismas. Se utilizó la metodología de conservación de muestras de tejido animal presentado por Winnepenninckx *et al.* (1993) a partir de tejido fresco y/o conservado en etanol de 95°. Dicha metodología para nuestro propósito no fue adecuada; ocurrió una inadecuada corrida electroforética de las muestras, por lo que se implementó la metodología desarrollada por Arctander, 1988, que consiste en la conservación del tejido en 500  $\mu$ l de TE 1X; se añadió 10  $\mu$ l de  $\beta$  mercapto etanol a dicha solución para mejorar la conservación de la misma. Todas las muestras fueron conservadas en congelación (- 25° C).

Las muestras sanguíneas fueron conservadas de acuerdo a la metodología esgrimida por Sotelo *et al.*, 2002. Dichas muestras fueron conservadas en las jeringuillas usadas para su extracción conteniendo 0.1 ml de E.D.T.A. al 5%. Al contrario de las muestras de tejido, la sangre fue refrigerada a 4° C y utilizadas máximo en 36 horas.

Las muestras de tejido procedente de las aletas dorsal y caudal en la trucha arco iris, tuvo un peso medio de 60 mg para la aleta dorsal y 70 mg para la aleta caudal; esta metodología es muy similar a la observada en los estudios realizados por Pérez *et al.*, 2004, para la extracción de músculo de especímenes de *Diplodus*, con una porción aproximada de 1 gramo; y en el estudio realizado por Quinteiro *et al.* (2003), en individuos de besugo, *Pagellus bogarave*, a los cuales se les extrajo una cantidad de tejido de alrededor de 0,5 cm<sup>2</sup>, procedente del tegumento existente entre la 3ª y 4ª espina de la aleta dorsal.

El manual del Kit AmpFSTR recomienda muestras de sangre de 3  $\mu\text{l}$  o manchas de sangre en tejido de aprox. 3 mm x 3 mm (Applied Biosystems, 1998).

Posterior a la utilización de los tres protocolos de extracción de ADN, se procedió a la cuantificación de las muestras de ADN procedentes de cada una de las partes corporales de las especies trucha arco iris y preñadilla, a través de dos técnicas de cuantificación: espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida.

El análisis de Kruskal – Wallis permitió determinar la variabilidad presentada en los resultados de la cuantificación de las muestras de ADN, debido a que los datos no se ajustaban a una distribución normal. Según este análisis de la concentración de ADN por espectrofotometría, se encontraron diferencias estadísticas entre los dos protocolos de extracción (CTAB 5% y SDS 10%) para las muestras de aleta dorsal y caudal. Las concentraciones de ADN para trucha arco iris fue de 1.18  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y para preñadilla de 0.39  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Estos datos pueden ser comparados con los obtenidos por Erazo (2002), en su estudio de mapeo genético en camarón blanco, en el que obtuvo una concentración de ADN de 40 ng/ $\mu\text{l}$  (0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) determinado por espectrofotometría con un equipo Gene Quant, PHARMACIA®, utilizando una dilución de 1/20 para la lectura; los estudios de cuantificación con espectrofluorímetro con la adición a la solución de ADN de 9-anthracenecarboxylic acid (ACA) y cetyl trimethyl-ammonium bromide (CTAB), cuyos resultados presentaron una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de muestras de esperma y el timo de peces (Liu *et al.*, 2006);

Según Fraga *et al.* (2004), para las extracciones de ADN aisladas de patas de Triatomíneos mediante el método de fenol cloroformo y CTAB, se obtuvo concentraciones de 0.1305  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 0.1650  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  siendo su protocolo de calentamiento el que más concentración de ADN demostró obtener (0.5785  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Por otro lado se hallaron diferencias significativas en este mismo tipo de cuantificación para las extracciones hechas para estos dos mismos protocolos, pero en muestras sanguíneas de las dos especies en estudio, presentando diferencias a nivel del factor protocolos, con valores medios de 0.53  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para CTAB 5%, y 0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para SDS 10%. Estos resultados presentan un rendimiento comparable a los publicados por Butler (2005), quien menciona que, muestras procedentes de sangre pueden obtenerse de 20 000 – 40 000 ng/ml (0.02 – 0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ADN).

Así mismo, los resultados presentados pueden ser cotejados frente a los datos presentados por Zhu *et al.* (2004), usando un espectrofluorómetro para medir la intensidad de luz esparcida (RLS), con concentraciones de 0.2 - 6.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , de muestras de timo de terneros.

Las citas presentadas pueden ser comparadas con las concentraciones medias de ADN cuantificadas en espectrofotómetro de extracciones de sangre de estas dos especies, realizadas con el protocolo de extracción ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System, cuyas medias fueron de 0.9 y 0.75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , para trucha y preñadilla, respectivamente.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de las muestras de ADN con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en gel de agarosa (2%), presentó valores de concentración media de ADN de 66.25 ng/ $\mu\text{l}$  para el protocolo CTAB 5%, 29.17 ng/ $\mu\text{l}$  para SDS 10%, en muestras de aleta dorsal y caudal; y para análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida se mostró valores de concentración de 29.17 ng/ $\mu\text{l}$  para el protocolo CTAB 5% y 5.83 ng/ $\mu\text{l}$  para SDS 10%; con estos mismos métodos, pero con muestras sanguíneas, los valores fueron de 50.83 ng/ $\mu\text{l}$  para CTAB 5% y 6.67 ng/ $\mu\text{l}$  para SDS 10% en geles de agarosa; y de 21.67 ng/ $\mu\text{l}$  para CTAB 5%, y 6.67 ng/ $\mu\text{l}$  para SDS 10%, para cuantificación con poliacrilamida.

La visualización y cuantificación de ADN a través de la utilización de muestras coloreadas con bromuro de etidio, permite cuantificar cantidades de ADN tan pequeñas como 5-10 ng de ADN (Williams *et al.*, 1993).

Se denota claramente las diferencias que existen entre estos dos protocolos, en las dos formas de cuantificar por análisis comparativo (agarosa o poliacrilamida); la tendencia es la misma, aunque los resultados sean diferentes. Cabe resaltar que, la visualización de las bandas en gel de poliacrilamida sin la utilización de oligonucleótidos y PCR, dificulta la precisión de los resultados.

De acuerdo a las cantidades comunes presentadas por Lee & Ladd citados por Butler (2005), estos resultados se ajustan a los estándares de extracción mediante similares técnicas recopiladas en su obra. De acuerdo a estos autores, muestras procedentes de sangre entera, pueden obtenerse de 20 000 a 40 000 ng/ml (20 - 40 ng/ $\mu$ l – 0.02  $\mu$ g/ $\mu$ l), manchas de sangre, de 250 – 500 ng/cm<sup>3</sup> y en tejidos, rangos entre 50 – 500 ng/mg (0.05 – 0.5  $\mu$ g/mg).

De acuerdo a nuestro estudio, el protocolo Ready Amp™ demostró una menor concentración de ADN con respecto al protocolo CTAB 5% al cuantificar con análisis comparativo en geles, aunque al cuantificar por espectrofotometría, presentó una mayor concentración. Cabe indicar que dicho protocolo comercial se presenta como ideal para extracciones rápidas de muestras sanguíneas procedentes de individuos humanos. Este protocolo fue modificado para extraer ADN de muestras sanguíneas de peces.

Las extracciones de ADN procedentes de muestras sanguíneas en los dos protocolos (CTAB 5% - 50.83 ng/ $\mu$ l y SDS 10% - 6.67 ng/  $\mu$ l), cuantificadas por análisis comparativo en gel de agarosa, mostraron una menor concentración de ADN, que las extracciones de muestras de aletas.

Según Hillis *et al.* (1996), 10  $\mu$ l de sangre (aprox. una gota), contiene de 70000 – 80000 glóbulos blancos y 500 ng de ADN genómico; esta cantidad puede variar de acuerdo al número de leucocitos en la muestra y la eficiencia del proceso de extracción de ADN. La concentración y pureza del ADN extraído está directamente relacionado con la técnica de extracción, la cual es escogida de acuerdo al objetivo del análisis molecular; así por ejemplo, la adición de un exceso de sangre, en el caso de la extracción con Chelex, puede inhibir la reacción de PCR.

La determinación de la cantidad de ADN en una muestra es esencial para ensayos para PCR. Por ejemplo, los kits, Applied Biosystems Profiler Plus™ y COfiler™ multiplex STR, especifican la adición de entre 1 - 2.5 ng de ADN molde para óptimos resultados (Applied Biosystems, 1998). El kit de Promega STR trabaja con un rango similar (Krenke *et al.*, 2002).

Últimamente, el uso de Chelex® Resin 100 ha sido discutida, debido probablemente que se considera un precursor cancerígeno. Por ello su adquisición no pudo ser realizada para dicha investigación. A pesar de ello, trabajos presentados por Walsh *et al.* (1991); Wiklund *et al.* (2000); Yue *et al.* (2001) y Borrel *et al.* (2002), demuestran lo rápido, fácil y económico de el uso de esta resina. Según Zilberman *et al.* (2006), es posible extraer 200 ng de ADN de muestras de aletas de tilapia o peces cebras con Chelex 100 al 5%.

La extracción de ADN mediante el protocolo SDS 10% presentó resultados que lo ajustaban por debajo de la concentración obtenida por el protocolo CTAB 5%. Así por ejemplo, para la cuantificación en gel de agarosa, se observa una media de 21.67 ng/ $\mu$ l, y para la cuantificación en gel de poliacrilamida una media de 11.39 ng/ $\mu$ l.

Comparando el protocolo propuesto en esta investigación, versus el desarrollado por Winnepenninckx *et al.* (1993) en moluscos, y el propuesto por wang y Xia (2002) en sangre extraída de peces, en los que la concentración de SDS es del 0.5%, es posible que la eficiencia se pueda deber a esta variable, ya que la solución final con ADN de muestras extraídas con SDS 10%, presentaba una presencia residual de burbujas. Esto a pesar que se siguió con la propuesta desarrollada por Winnepenninckx, quién citó el trabajo de Sambrook *et al.* (1989), para la purificación de la muestra mediante la técnica fenol cloroformo, y el uso de acetato de potasio para la limpieza del pellet (Shagui – Morooof, 1994).

Según Hillis *et al.* (1996), el método de extracción básico, mediante el uso de SDS 10%, proteinasa K y sucesivas limpiezas con fenol-cloroformo, requiere aprox. 100 mg de tejido pulverizado, de preferencia con nitrógeno líquido.

Según el protocolo de extracción CTAB descrito por Lo *et al.* (1996), una adecuada concentración de ADN, para una posterior amplificación con AFLPs, sería de un valor de 100 ng/μl; cabe considerar que, la técnica de AFLPs requiere de una gran cantidad de ADN y de excelente calidad, mientras que al utilizar la técnica RAPDs para cuantificar ácidos nucleicos, las cantidades de ADN son pequeñas y no es necesario su extrema pureza (Valadez & Kahl, 2000).

Cabe indicar que se presentaron dificultades al momento de cuantificar ADN mediante análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida (5%), ya que las bandas de ADN no corrían una adecuada distancia de medición, debido al parecer porque dicho gel es mucho más concentrado que el de agarosa, y requería de un mayor tiempo para extenderse adecuadamente.

Es valioso mencionar que la cuantificación en gel de poliacrilamida fue planteada debido a que, el protocolo comercial Ready Amp™ perfilaba la necesidad de analizar las extracciones realizadas con este método, mediante geles de poliacrilamida y el uso de marcadores moleculares. Por lo tanto, al no presentar este proyecto cuantificación con la ayuda de marcadores moleculares, se procedió a hacerlo únicamente con las muestras de ADN y las soluciones de comparación (Low DNA Mass Ladder). Debido a esta razón, todos los protocolos debían ser analizados mediante los dos métodos de electroforesis con gel de agarosa y poliacrilamida.

La mayoría de trabajos plantean el uso de marcadores para la cuantificación de ADN, en especial en gel de agarosa (1-2%) y el uso de RAPDs (Rego *et al.*, 2004; Fraga *et al.*, 2004; Erazo, 2006), debido a su rapidez y bajo costo.



## VII. CONCLUSIONES

- El estudio citogenético de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) presentó para esta especie un número diploide de 60 cromosomas incluyendo el par sexual XY, que diferencia a los machos de las hembras (XX).
- En el estudio citogenético de preñadilla (*Astroblepus ubidiai*) se registró un número diploide de 52 cromosomas incluyendo el par sexual XX, que diferencia a las hembras de los machos (XY).
- El tiempo óptimo de hipotonía celular en solución de cloruro de potasio, fue de 5 minutos a temperatura ambiente en muestras de trucha arco iris.
- Para el protocolo de extracción de ADN, CTAB 5% modificado, se halló una mayor concentración media de ADN en muestras de aletas dorsal, caudal y sangre, cuantificadas por espectrofotometría; seguido del protocolo ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modificado para muestras sanguíneas.
- La menor concentración de ADN cuantificado por espectrofotometría en muestras de aletas y sangre en trucha y preñadilla fue la del protocolo de SDS 10% modificado,
- La cuantificación de ADN con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en gel de agarosa, demostró que la mayor concentración se obtiene con el protocolo CTAB 5% modificado, en muestras de aletas (dorsal y caudal) y sangre.

- La segunda mejor técnica de extracción cuantificada con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en gel de agarosa, fue SDS 10% modificado, en muestras de aletas y sangre.
- El protocolo de extracción cuantificado con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida que presentó la mayor concentración de ADN, fue CTAB 5% modificado, para muestras de aletas y sangre, seguido del protocolo ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modificado para muestras sanguíneas.
- El protocolo con menor concentración media de ADN cuantificado con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida fue SDS 10% modificado para muestras de aletas y sangre.
- Las extracciones de ADN de muestras de aletas dorsal y caudal, provenientes de individuos de trucha arco iris, demostraron una mayor concentración de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), versus las muestras de aletas de preñadilla, cuantificadas mediante las tres técnicas de cuantificación.
- Los resultados de los protocolos que usaron sangre de preñadilla para extraer ADN, demostraron concentraciones medias superiores a las encontradas en trucha arco iris; no obstante, no hubo diferencias estadísticas entre los dos tipos, por lo que son iguales estadísticamente.
- Las muestras provenientes de aletas, demostraron tener una mayor concentración de ADN que las muestras sanguíneas, al ser cuantificadas con análisis comparativo en geles de agarosa y poliacrilamida.

- La cuantificación por espectrofotometría exhibió que existía una mayor concentración de ADN de muestras de aleta caudal que de muestras de aleta dorsal, aunque las concentraciones de ambos tipos de aletas son estadísticamente iguales y no presentaron diferencias estadísticas significativas.
- Las muestras de sangre extraídas con el protocolo ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System modificado y cuantificadas por espectrofotometría, ostentaron una mayor concentración de ADN.
- El protocolo de extracción CTAB 5% es la técnica de aislamiento de ADN más económica (\$ 1.43/ unidad), seguido del protocolo SDS 10% (\$1.46/unidad).
- La técnica de extracción de ADN más costosa en este estudio (\$1.92/unidad) fue el protocolo ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System.
- Las muestras de ADN cuantificadas con análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en geles de agarosa (2%), presentaron menor costo económico que aquellas muestras cuantificadas con análisis comparativo de muestras coloreadas con tinción de plata en gel de poliacrilamida (5%) en cada uno de los protocolos de extracción realizados (CTAB 5%, SDS 10% y ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System), ya para esta última técnica se requiere mayor cantidad de reactivos y equipos.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar células somáticas extraídas de las branquias de los peces para realizar el cariotipo, tanto de trucha como preñadilla.
- Utilizar como máximo tiempo de exposición de las células en solución hipotónica 15 minutos, para impedir una explosión celular y diseminación de los cromosomas.
- Para cuantificaciones de extracciones de ADN, utilizar geles de agarosa, ya que es una técnica más económica, rápida y los resultados son muy confiables.
- Se sugiere para cuantificar ADN en geles de poliacrilamida, la utilización de primers probados, que permitan mediante su amplificación, desarrollar una mejor corrida electroforética.
- Desarrollar estudios de cuantificación de muestras de ADN con análisis óptico por absorbancia de luz por medio de la técnica de fluorimetría, que es exclusiva para análisis de ácidos nucleicos, para evitar lecturas erróneas debido a contaminantes como ARN, proteínas y restos de detergente, que se presentan en análisis por espectrofotometría y geles.
- Realizar proyectos de investigación complementaria en estas especies mediante el uso de Técnicas MAS tales como microsatélites, minisatélites, AFLPs y otros.
- Ejecutar líneas de investigación enfocadas al uso de Técnicas MAS (Selección Asistida por Marcadores) en especies de interés comercial, desarrollados totalmente en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

## IX. BIBLIOGRAFIA

Acosta, A y Ortiz, J. 2006. Optimización de protocolos de extracción y análisis sanguíneo para Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Sangolquí Ecuador. ESPE.

Alvarado, T. 2004. Determinación de potenciales localidades para el cultivo en sistemas dulce acuícolas de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en la V región de Valparaíso. Valparaíso, Chile. Consultado 1 junio 2007. Se lo encuentra en: [http://www.aqua.cl/zona\\_u/uploads/110930201843cd5ef71777f.pdf](http://www.aqua.cl/zona_u/uploads/110930201843cd5ef71777f.pdf)

Applied Biosystems. 1998. *AmpFISTR®Profiler Plus™ PCR Amplification Kit User's Manula*. Foster City, California: Perkin Elmer Corporation.

Arrignon, J. 1984. Ecología y Piscicultura de Aguas Dulces. 2° edición. Madrid, Espana. Ediciones Mundi- Prensa. 390 p.

Arctander, P. 1988. Comparative studies of avian DNA by restriction fragment length polymorphism analysis: Convenient procedures based on blood samples from live birds. *J. Ornithologie* 129:205-216

Barriga, R. 1991. Peces de agua dulce del Ecuador. Revista de Información técnico científica (Politécnica). Quito, Ecuador. Escuela Politécnica del Ecuador.

Bastardo, H. 1994. Reproducción y talla media de madurez de la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae) en los Andes Venezolanos. *Rev. Biol. Trop.* 42: 263 –270

\_\_\_\_\_ & Sofía, S. Crecimiento de truchas todas hembras y de ambos sexos en un criadero venezolano. *Zootecnia Trop.* [online]. jan. 2003, vol.21, no.1 Consultado 4 junio 2007. p.17-26. Disponible en: <[http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692003000100002&lng=pt&nrm=iso](http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692003000100002&lng=pt&nrm=iso)>. ISSN 0798-7269.

Beckmann, J. S. y M. Soller. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35: 111-124.

Benecke, M. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophageous insects (diptera, coleoptera) incriminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Science International* 98:157-168.

Blanco, C. 1995. La Trucha. Cría Industrial. 2ª edición. Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa. 503 p.

Borrel, Y.; Álvarez, J.; Vázquez, E.; Sánchez Prado, J.A.; Fernández-Pato, C.; Martínez -Tapia, C. y Blanco, G. 2002. Aplicación de marcadores microsatélites a los programas de cultivo del rodaballo *Scophthalmus maximus*. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4): 203-209. Disponible en: [http://www.ieo.es/publicaciones/boletin/pdfs/bol18/18\(1-4\)203-209.pdf](http://www.ieo.es/publicaciones/boletin/pdfs/bol18/18(1-4)203-209.pdf) . Consultado: 23 abril del 2006.

Botstein, D.; L. White; M. Skolnick y W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.

Briard, M.; Clerc, V.; Grzebelus, D.; Senalik, D. y Simon, P. 2000. Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver stain or radioisotopes. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 235-241.

Butler, J. 2005. Forensic DNA Typing. 2ª edición. Burlington, MA., USA. Elsevier's Science & Technology Rights. 660 p.

Claros, M.G. 2002. ¿Qué son los marcadores moleculares y cómo se utilizan?. Málaga, España. Consultado 10 marzo 2006. Se lo encuentra en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html>

Cejas, G. 2000. Identificación por ADN. 2ª edición. Mendoza, Argentina. Ediciones Jurídicas Cuyo. 340 p.

Centofante, L.; Bertollo, L. y Moreira, O. 2006. Cytogenetic Characterization and Description of an XX/XY1Y2 Sex Chromosome System in Catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). Cytogenet Genome. 112 (4): 320 - 324

Colihueque, N.; Iturra, P.; Estay, F. y Diaz, N.F. Diploid chromosome number variation and sex chromosome polymorphism in five cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 2001; 198:63-77.

Coll, J. 1991. Acuicultura Marina Animal. 3ª edición. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. 385 p.

Davis, G. y Hetzel, D. 2000. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. Aquaculture Research 31: 3-10.

Design Publications. 2007. Balance 2006: Los envíos de salmón se triplican en 9 años. Panorama Acuícola Magazine Online. Consultado 23 feb 2007. Disponible en: [http://www.panoramaacuicola.com/noticia.php?art\\_clave=3363](http://www.panoramaacuicola.com/noticia.php?art_clave=3363)

Dinesh, K.; Chan, W.; Lim, T. y Phang, V. 1995. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 3(2):112-118.

DOE Human Genome Program. 1992. *The Primer on Molecular Genetics*. U.S. Department of Energy, Washington, D.C., EE.UU.

Epplen, J.; Lubjuhn, T. 1999. *DNA Profiling and DNA Fingerprinting*. Berlín, Alemania. Birkäuser Verlag. 252 p.

Erazo, E. 2002. Mapeo genético en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis M. Sc. Guayaquil, Ecuador. Escuela Politécnica del Litoral ESPOL. 68 p.

Erazo, N. 2006. Evaluación de 214 líneas de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) para resistencia a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), mediante selección asistida por marcadores moleculares con fines de mejoramiento genético. Tesis Ingeniero Agropecuario. Sangolquí, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército ESPE. 110 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1987. Manual de métodos de diagnóstico en ictiopatología con especial referencia a los salmonidos: Exámenes Hematológicos. (en línea). Consultado 4 de oct. 2006. disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB469S/AB469S06.htm>. serie: Project reports - No.4

Felip A.; Fujiwara A.; Young W.; Wheeler P.; Noakes M.; Phillips R. y Thorgaard G. 2004. Polymorphism and differentiation of rainbow trout Y chromosomes. (en línea). Consultado 15 mayo 2007. Disponible en: <http://www.pubmed.com>



Fernández, J.; Fernández, A.M.; Santos, J. y González, J. 2002. Genética. Barcelona, España. Editorial Ariel S.A. 474 p.

Ferreira, M. & Grattapaglia, D. 1998. introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, Brasil. Consultado 12 Enero 2007. Se lo encuentra en: <http://www.sap.uchile.cl/docencia/Fisiogenetica%20vegetal/Marcadores%20Moleculares.pdf>.

Fraga J, Rodriguez, J, Fuentes, O. *et al.* Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Rev Cubana Med Trop.* [online]. sep.-dic. 2004, vol.56, no.3 [citado 18 Mayo 2007], p.203-207. Disponible en la World Wide Web:<[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602004000300010&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602004000300010&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0375-0760.

García Molina, F. y M. Uribe Alcocer. 1988. Análisis cromosómico del bagre marino *Arius Felis* (Ariidae: Siluriformes) de la región de la laguna de Términos, Camp.(en línea). Instituto de Ciencias del Mar y limnología, UNAM. Consultado 31 mayo 2007. Disponible en: <http://lyncis.dgsca.unam.mx:8080/examples/servlet/ciencias.FichasCiencias2?xml=archivo327.xml>

Garside, E. T. 1966. Developmental Rate and Vertebral Number in Salmones. *J. Fish. Res. Bd. Canadá*, 23 (10).

Gill, P.; Ivanov, P.L.; Kimpton, C.; Piercy, R.; Benson, N.; Tully, G.; Evett, I.; Hagelberg, E. y Sullivan, K. 1994. *Nature Genetics*, 6, 130-135.

Glover, D.M. y Hames, B.D. 2002. DNA Cloning 3. Oxford, U.K. Oxford University Press. 225 p.

Grodzicker, T.; J. Williams, P.; Sharp, P. y J. Sambrook. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology 39: 439-446.

Haldane, J.B.S. 1919. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. Journal of Genetic 8: 299-309.

Harms, U. 1975. The levels of heavy metals (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg) in fish from onshore and offshore waters of the German bight. NCBI. 11;157(3):125-32. Consultado: 10 febrero 2006. Disponible en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list\\_uids=1237201&query\\_hl=3&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1237201&query_hl=3&itool=pubmed_docsum).

Harris, H. y Hopkinson, D.A. 1976 et seq. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland, Amsterdam.

Howell, S.H. 1973. The Isolation and Análisis of DNA from Eukaryotic Cells. In: Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology. Chrispeels, M. Ed. Wiley-Interscience Publication. N.Y. pp 127-130

Huet, M. 1998. Tratado de piscicultura. 3° edición. Trad. Martínez, B. Barcelona, España. Ediciones Mundi-Prensa.

Huss H. 1988. El pescado fresco: Su calidad y cambios de calidad. Colección FAO Pesca, No 29. 132 pp.

INSTRUCT (Red Interamericana de Estudios y Capacitación para el Manejo de Recursos Naturales y la Transformación Comunitaria, Mx)/PUCE (Pontificia Universidad Católica del Ecuador)/CEPCU (Centro de Estudios Pluriculturales, Ec)/CODELSPA (Corporación para la defensa del Lago San Pablo). Imbakucha : Estudios para la Sustentabilidad. Quito, Ecuador. p 13-23

Kosambi, D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-75.

Li, Y.F., Shu, W.Q., Feng, P., Huang, C.Z. y Li, M. 2001. Determination of DNA with cetyltrimethylammonium bromide by the measurement of Resonance Light Scattering. Institute of Environmental Chemistry, Southwest Normal University, Chongqing 400715, P. R. China. *Anal Sci.* 2001 Jun;17(6):693-6.

Liu, B. 1998. *Statistical Genomics. Linkage, mapping and QTL Analysis.* Boca Raton, FL, EUA. CRC Press LLC. 165 p.

Liu, J.; Wang, X. y Wang, L.. 2006. A novel spectrofluorimetric method for the determination of DNA. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2006 Jan;63(1):32-5. Consultado

López, M.; Mallorquín, P. y Vega, M. 2003. *Genómica de especies piscícolas. Informe de vigilancia tecnológica.* Madrid, España. Consultado 21 Abril 2006. Se lo encuentra en: [http://www.gen-es.org/02\\_CONO/docs/GENOMA-PECES.pdf](http://www.gen-es.org/02_CONO/docs/GENOMA-PECES.pdf).

Manchado, M.; Ponce, M.; Asensio, E.; Infante, C.; de la Herrán, R.; Robles, F.; Garrido, M.; Ruíz Rejón, M. y Cárdenas, S. 2004. PAGURTA, híbrido interespecífico de pargo, *Pagrus pagrus*, (♀) x hurta, *Pagrus auriga*, (♂): caracterización fenotípica y molecular. X Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España. Consultado 31 mayo 2007. Disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS35/rna35.html>

Mano, Y.; Kawasaki, S.; Takaiwa, F. y Komatsuda, T. 2001. Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgares*) cross "asumamugi" x "canto nakate gold" using a simple and efficient amplified fragment length polymorphism system. *Genome* 44: 284-292.

Martino, G. 2004. Avances en la obtención de cariotipos en las especies Morocoto *Piaractus brachypomus*, del híbrido F1 de *Colossoma macropomum* (hembra) por *Piaractus brachypomus* (macho) y el híbrido F2 retrocruzado de híbrido F1 hembra por macho de sus especies parentales. (en línea). In III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. p 352 -357. Consultado 10 de oct. 2006. Disponible en: <http://www.civa2004.org>

McGregor, D.; Galvin, P.; Sadusky, T. y Cross T. 1996. PCR amplification of a polymorphic minisatellite VNTR locus in whiting (*Merlangius merlangus* L.). Anim Genet. 1996 Feb;27(1):49-51. Consultado 10 marzo 2006. Disponible en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list\\_uids=8624036&query\\_hl=3&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=8624036&query_hl=3&itool=pubmed_docsum)

Melcher, U. 2003. (Molecular Genetics). (Correo Electrónico). Oklahoma, E.U.A. Consultado en: 26 febrero 2006. Disponible en: <http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MG01.html>

Miesfeld, R. 1999. Applied molecular genetics. Ed. Wiley-liss. U.S.A. Montaldo, H. y C. Meza-Herrera. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Electronic Journal of Biotechnology 1(2): 0717- 3458.

Montaldo, H. y Meza-Herrera, C. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458, Vol 1, N.2.

Moreano, M. y del Pino, E. 2005. Morfología del Aparato Reproductor masculino de preñadilla (*Astroblepus ubidiai*, Astroblepidae). Quito, Ecuador. PUCE (Pontificia Universidad Católica del Ecuador).

Moreno, G. J. 2002. Marcadores moleculares en la mejora genética de plantas. Centro de investigaciones agrarias de Mabegondo. Consultado 10 marzo 2006. se lo encuentra en: <http://www.seg.umh.es/docencia/lecciones/moremol.html>.

Nussbaum, R.; McInnes, R. y Williard, H. 2004. Genética en medicina. 5ª edición. Trad. Salvador, Joaquín. MASSON S.A. Barcelona, España. 470 p.

Ortiz, J.; Rueda, D.; Acosta, A.; Garcés, J.; Dávila, A. y Solís, T. 2006. Estudio Morfológico y Citogenético de Preñadilla (*Astroblepus ubidia*). Sangolquí, Ecuador. ESPE. Ciencia. 9 (2).173 – 182.

Passarge, E. 2004. Genética. Texto y Atlas. 2ª edición. Trad. Bumaschny, V. Buenos Aires, Argentina. Edit. Médico Panamericana. 457 p.

Pecsok, R. y Donald, L. 1990. Métodos Modernos de Análisis Químico. México. Editorial Limusa. p 171-172

Pennel, W y Barton, B. 1996. Principles of salmonid culture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Amsterdam, Holanda. Elsevier's Science & Technology Rights. Vol. 29. p. 39-45, 48-51, 183-188.

Pérez, L. 1982. Piscicultura. Ecología, explotación, higiene. México D.F. Edit. El Manual Moderno. 154 p.

Pérez, I.; Infante, C. y Manchado, M. 2004. Región de control mitocondrial de *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758), *Diplodus vulgaris* (Saint-Hilaire, 1817), *Diplodus bellottii* (Steindachner, 1882) y *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758): Elementos reguladores y heteroplasma. X Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España. Consultado 31 mayo 2007. Disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS35/rna35.html>

Phillips R.; Nichols K.; DeKoning J.; Morash M.; Keatley K.; Rexroad C.; Gahr S.; Danzmann R.; Drew R. y Thorgaard G. 2006. Assignment of rainbow trout linkage groups to specific chromosomes. (en línea). Consultado 15 mayo 2007. Disponible en: <http://www.pubmed.com>

Pineda, H.; Olivera, M.; Urcuquí, S.; Trujillo, E. y Builes, J. 2006. Evaluación del polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* (Characidae, Serrasalminae) provenientes del río Meta, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Vol. 19:1. Disponible en: <http://kogi.udea.edu.co/revista/19/19-1-8.pdf>

Pozo R., W.E. y Olmedo, I. 2003. Estudio mastofaunístico preliminar en “El Prado”, instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la ESPE, Sangolquí – Ecuador. En: Resúmenes de las XXVII Jornadas Ecuatoriana de Biología. 154 p.

Puertas, M. 1999. Genética. Fundamentos y Perspectivas. 2ª edición. Madrid, España. Interamericana Mc Graw Hill. 863 p.

Quinteiro, J.; Burgos, R.; Arán, J.; Sendón, M. y Rey - Méndez, M. 2004. Estimación del parentesco en el cultivo del besugo, *Pagellus bogaraveo*, Brünnich 1768, mediante el análisis de secuencias microsatélites. X Congreso Nacional de Acuicultura. Consultado 31 de mayo 2007. Disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS35/rna35.html>

Reina, M. 2003. Técnicas de Estudio de Líneas Celulares: Técnicas de Contaje Celular. (en línea). Barcelona. Consultado 14 de dic. 2005. disponible en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm#arriba>

Roca, W. y Ramírez, H. 1999. Introducción a la biotecnología vegetal. Curso de mejoramiento molecular de plantas. CIAT. Octubre 4-29.

Rogers, S. y Bendich, A. 1988. Extracción de ADN de plantas: Manual de Biología Molecular. Bélgica. En: Erazo, N. 2006. Evaluación de 214 Líneas de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris*) para resistencia a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), mediante selección asistida

Russel, P. 1992. Genetics. 3° edición. New Cork, EUA. Harper Collins Publishers. 758 p.

Sambrook, J. y Russell, D. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol 2. E.5

Sánchez, J.A.; Borrel, Y.; Alvarez, J.; Fernández Pato, C.; Martínez Tapia, C.; Vásquez, E. y Blanco, G. 2004. Trazabilidad alimentaria: eficacia de marcadores genéticos en la certificación y autenticación de productos procedentes de la acuicultura. X Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España. Consultado 31 mayo 2007. Disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS35/rna35.html>

Savelkoul, P.; Aarts, H.; Hass, J.; Dijkshoorn, L.; Duim, B.; Otsen, M.; Rademaker, W.; Schouls, L. y Lenstra, J. 1999. Amplified Fragments Length Polymorphism Análisis: The state of an art. Journal of Clinical Microbiology. Oct: 3083:3091.

Scott, D.; Walker, M.; Clarck, C.; Prakash, C. y Deahl, K. 1998. Rapid assessment of primer combination and recovery of AFLP products using ethidium bromide staining. Plant Molecular Biology Reporter. 16:41-47.

Senior, M.; Murphy, J.; Goodman, M. y Stuber, W. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. Crop Science 38: 1088-1098.

Shahjahan, R.; Roger, K.; Leopold, R. y Devault, J. 1995. Lower incubation-temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *Biotechniques* 19: 332-334.

Skoog, D. ; Holler, F. y Nieman, T. 2001. *Principios de Análisis Instrumental*. s.l. 5ta. Edición. Mc Graw Hill. p 415

Solomon, E.; Berg, L.; Martin, D. y Villee, C. 1998. *Biología: de Ville*. México. Cuarta edición. Mc Graw Hill. pp 215

Stewart, N. y Via, L. 1993. A Rapid CTAB DNA Isolation Technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR aplicaciones. *BioTechniques* 14 (5):748-749.

Sudbery, P. 2004. *Genética Molecular Humana*. 2<sup>a</sup> edición. Trad. Paternáin, J. Madrid, España. Pearson Prentice Hall. 381 p.

Ubidia, J. 1953 El Lago San Pablo y la piscicultura. Quito, Ecuador. Casa de la Cultura Ecuatoriana. Separata del Boletín de Informaciones Científicas Nacionales. VI, n. 58.

Valadez, E. y Kahl, G. 2000. *Huellas de ADN en genomas de plantas*. México D.F. Mundi-Prensa. 147 p.

Vélez A. y Rueda A. Índice de Calidad de Hábitat para la Conservación del Pez Andino Preñadilla (*Astroblepus ubidiai*) en las Tierras Altas de Imbabura. *In* Mercure, S. Wilson, W. Whillans, T. 2004. *Gestión Integral de Cuencas y Asentamientos Humanos: Primer Encuentro Intercultural Imbakucha 2002*. Quito. Abya Yala. Cap. 38. p 441-454.



\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_. 2002. Ecología y Biología de Conservación del Pez Andino Ecuatoriano "Peñadilla". In INSTRUCT (Red Interamericana de Estudios y Capacitación para el Manejo de Recursos Naturales y la Transformación Comunitaria, Mx)/PUCE (Pontificia Universidad Católica del Ecuador)/CEPCU (Centro de Estudios Pluriculturales, Ec)/CODELSPA (Corporación para la defensa del Lago San Pablo). Imbakucha : Estudios para la Sustentabilidad. Quito, Ecuador. p 125-132. *también en:* Mercure, S. Wilson, W. Whillans, T. 2004. Gestión Integral de Cuencas y Asentamientos Humanos: Primer Encuentro Intercultural Imbakucha 2002. Quito. Abya Yala. Cap. 42. p 473-488

Vélez - Espino, L. 2004. Population viability and perturbation análisis in remnant populations of the Andean catfish *Astroblepus ubidai*. Ecology of Freshwatwe Fish. 14(2).

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Pelema, J.; Kuiper, M. y Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23(21):4407-4414.

Walsh, P.; Metzger, D. & Higuchi, R. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing form forensic material. *Biotechnics* 10: 506-510

Weber, J. y May, P. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetic 44:388-396.

Williams, J.; Ceccarelli, A. y Spurr, N. 1995. Genetic Engineering. Oxford, UK. BIOS Scientific Publishers Limited. 132 p.

Winnepeninckx, B.; Backeljau, T. y De Wachtert, R. 1996. Investigation of molluscan phylogeny on the basis of 18S rRNA sequences. Society for Molecular Biology and Evolution. Molecular Biology and Evolution, Vol 13, 1306-1317

Yue G. y Orban L. 2001. Rapid Isolation of DNA from Fresh and Preserved Fish Scales for Polymerase Chain Reaction. Marine Biotechnology. 3(3): 199- 204

Yunis, E. J. y Yunis, J.J. 2002. El ADN en la identificación humana. Bogotá, Colombia. Editorial Temis S.A. 219 p. <http://www.cgn.wageningen-nr.nl/pgr/research/molgen/overview.htm>

Zhu, C.; Zhuo, S.; Li, Y.; Wang, L.; Zhao, D.; Chen, J. y Wu, Y. 2004. Determination of nucleic acids with tetra-(N-hexadecylpyridiniumyl) porphyrin sensitized by cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB) using a Rayleigh light-scattering technique. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2004 Mar;60(4):959-64. Consultado 10 mayo 2006. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?artid=333472>

Zilberman, N.; Reikhav, S.; Hulata, G. y Ron, M. 2006. Protocolo Genómico para la Extracción de ADN de alto rendimiento del procesamiento de tejido fino de aleta de tilapia. Acuicultura. 255 (4): 597- 599

Curso Técnicas Moleculares en Acuicultura. (2005, San Pedro de Manglaralto, Ecuador). 2005. Amplificación en geles de poliacrilamida: Memoria. Eds. Cedeño, R., Betancourt, I. y Vivanco, Y. Guayaquil, Ecuador. ESPOL. 183 p.

IX Congreso Nacional de Zoología. (1987, Tabasco). 1990. Estudio Citogenético del ocyurus Jordania y Evermann (Piscis de Centropristes: Serranide). Mexico. Universidad Nacional Autónoma de México.

Taller Internacional sobre el Cromosoma Humano. (1996, New York). 1995.  
Acoplamiento del cromosoma del sexo del rDNA 5S en la trucha de arco iris (mykiss  
de *Oncorhynchus*). Vol. 75. Disponible en:  
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2553862>

## X. ANEXOS

### ANEXO 1. Denominaciones taxonómicas actual de las truchas de la vertiente del Pacífico de América del Norte

<b>Denominación Taxonómica actual</b>	<b>Denominación taxonómica anterior</b>	<b>Denominación común de las truchas</b>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Salmo gairdneri</i>	Arco iris
<i>Oncorhynchus clarki</i>	<i>Salmo clarki</i>	Garganta cortada
<i>Oncorhynchus aguabonita</i>	<i>Salmo aguabonita</i>	Aguabonita
<i>Oncorhynchus apache</i>	<i>Salmo apache</i>	Apache
<i>Oncorhynchus gilae</i>	<i>Salmo gilae</i>	Gila
<i>Oncorhynchus chrysogaster</i>	<i>Salmo chrysogaster</i>	Mexican goleen trout

**ANEXO 2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LA TRUCHA ARCO IRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*) EN SUS DIFERENTES ETAPAS**

Factores	FASES				
	Reproducción	Fecund./Incub.	Alevinaje	Preengorde	Engorde
Agua	6-10-12 °C O <sub>2</sub> : >5.5 ppm	8-12 °C O <sub>2</sub> : a saturación 0,5 l/min. × 10 <sup>3</sup> indiv.	12 °C O <sub>2</sub> : a saturación	15-18 °C O <sub>2</sub> : 8 ppm	12-18 °C O <sub>2</sub> : 8 ppm
Estanques	pilas de reproductores alargadas	pilas o cajas de incubación, bandejas verticales; en penumbra	pilas de alevinaje 2.5 × 0.4 m Iluminación poco intensa	estanques de cultivo al aire libre, circulares o alargados	rectangulares y alargados; de 100-500 m <sup>2</sup>
Carga	1 ♂ : 2-3 ♀	400-600 huevos/dm <sup>2</sup>	1-2 l/min. 30.000 indiv./m <sup>2</sup>	Inicio: 10.000 ind/m <sup>3</sup> 1 mes (3 cm): 3.000 ind/m <sup>3</sup> 4 meses (7 cm) 1.500 ind/m <sup>3</sup>	15-30 kg/m <sup>3</sup> 20-25 kg/m <sup>3</sup> en truchas de 200 g a 10 °C
Duración	♂ 2-4 años ♀ 3-6	300-400 ° día	3-4 semanas	1 a 12 meses	16 a 24 meses o tamaño ración
Manipulación/Control fotoperíodo		Desinfecciones. Eliminación no aptos. Huevos embrionados más resistentes para el conteo y transporte	Trías al llegar a 4-5 cm	Trías cada 2 meses hasta 10-12 cm	Trías cada 2 meses hasta talla comercial
Alimentación	2-3 días ayuno previos a la puesta		6-4 veces/día; 5-3 % peso	3 veces/día; 3% peso	2 veces/día 2% peso

### **ANEXO 3. SOLUCIONES STOCK**

#### **Soluciones de Buffer de Extracción CTAB 5%**

- ⊕ CTAB 5%: 5 g CTAB en 100 ml de agua miliQ
- ⊕ NaCl 5 M: 14.6 g NaCl en 50 ml agua miliQ
- ⊕ EDTA 0.5 M pH 8: 9.3 g EDTA en 50 ml agua miliQ y ajustar pH con NaOH
- ⊕ TRIS 1 M pH 8: 6.05 g TRIS en 50 ml agua miliQ
- ⊕ Almacenar a – 20° C.

#### **Buffer de Extracción CTAB 5% (50 ml)**

- ⊕ 20 ml CTAB 5%
- ⊕ 14 ml NaCl 5 M
- ⊕ 2 ml EDTA 0.5 M pH 8
- ⊕ 5 ml TRIS 1 M pH 8
- ⊕ 9 ml agua miliQ
- ⊕ Almacenar a 4° C.

#### **Contenido de solución de extracción**

- ⊕ SDS 10%: 5 g en 50 ml agua miliQ
- ⊕ STE: 1 M NaCl; 0.1 M TRIS HCl pH 7.5; 0.05 M EDTA

#### **Solución de Extracción SDS 10%**

- ⊕ 50 ml STE + 7.5 ml SDS 10%

#### **0.5 M EDTA, pH 8**

- ⊕ 168.1 g EDTA
- ⊕ Aforar con agua miliQ a 1 litro.
- ⊕ Disolver y elevar el pH con hidróxido de sodio

#### **TAE 50X**

- ⊕ 242 g Tris Base
- ⊕ 57.1 ml Acido Glacial Acético
- ⊕ 100 ml 0.5 M EDTA, pH 8

### **TE 10X**

- ⊕ M Tris HCl, pH 7.5
- ⊕ M EDTA. Autoclavar.

### **ACRILAMIDA 30%**

- ⊕ 50 ml agua destilada
- ⊕ 29 g Acrilamida
- ⊕ 1 g Bisacrilamida
- ⊕ Aforar a 100 ml con agua destilada

### **TBE 5X**

- ⊕ 100 ml agua destilada
- ⊕ g Acido Bórico
- ⊕ 10.8 g Tris Base
- ⊕ 0.744 g EDTA
- ⊕ Aforar a 200 ml con agua destilada (pH 8)

### **AMONIO PERSULFATO 10% (APS 10%)**

- ⊕ 5 g Amonio Persulfato
- ⊕ 30 ml agua destilada
- ⊕ Aforar a 50 ml

### **SOLUCION DE FIJACION**

- ⊕ 150 ml Etanol 10%
- ⊕ ml Acido Acético 0.5%
- ⊕ Aforar con agua destilada a 1.5 lt.

### **SOLUCION DE IMPREGNACION**

- ⊕ 2.8 g Nitrato de Plata
- ⊕ Aforar con agua destilada a 1.5 lt.

### **SOLUCION DE REVELADO**

- ⊕ 45 g Hidróxido de Sodio
- ⊕ 10.5 ml Formaldehído
- ⊕ Aforar con agua destilada a 1.5 lt.

## **PREPARACIÓN DE COLORANTE GIEMSA**

- ⊕ Mezclar 33 ml de glicerina con 0,5 g de giemsa
- ⊕ Incubar a 55° C por 24 horas.
- ⊕ Añadir 33 ml de alcohol metílico
- ⊕ Dejar en reposo por 24 horas, filtrar y guardar en un frasco oscuro.

## **TINCIÓN DE PLACAS**

- ⊕ Mezclar 90 ml de agua destilada con 30 ml de solución giemsa.
- ⊕ Se deja teñir las placas por lo menos 30 minutos.



**ANEXO 4. RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN ENTRE 5 MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE TRIATOMÍNEOS: SU UTILIZACIÓN EN LA TÉCNICA DE ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)**

En la tabla se observa la media de la cantidad de material de partida (mg) para cada uno de los métodos analizados, no se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,9988$ ) al comparar las medias del material de partida utilizado para la extracción de ADN por cada uno de los métodos.

Comparación del tiempo de procesamiento, concentración, rendimiento y pureza entre las muestras de ADN extraídas por los diferentes métodos

<b>METODO DE EXTRACCION</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Material de partida (mg)<sup>a</sup></b>	<b>Concentración de ADN (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)<sup>b</sup></b>	<b>Rendimiento (<math>\mu\text{g ADN}/\text{mg de material de partida}</math>)<sup>c</sup></b>	<b>Pureza<sup>d</sup></b>
<i>Método calentamiento</i>	30 min	1,88 (0,34)	0,5785 (0,111)	15,81 (4,15)	0,79
<i>Método fenol-cloroformo</i>	19 h	1,89 (0,36)	0,1305 (0,039)	3,49 (0,92)	1,96
<i>Método del acetato de potasio</i>	4 h	1,85 (0,20)	0,1414 (0,027)	3,81 (0,77)	1,93
<i>Método acetato de potasio modificado</i>	4 h	1,86 (0,32)	0,2675 (0,028)	7,38 (1,52)	1,94
<i>Método CTAB</i>	4 h	1,85 (0,38)	0,1650 (0,025)	4,67 (1,48)	1,9

a: valor medio del material de partida para la extracción de ADN por lo diferentes métodos, con la desviación estándar entre paréntesis ( $n= 10$ ); b: valor medio de la concentración de ADN obtenida con la desviación estándar entre paréntesis ( $n= 10$ ); c: valor medio del rendimiento con la desviación estándar entre paréntesis ( $n= 10$ ); d: valor medio de la razón DO 260 nm/ DO 280 nm ( $n= 10$ ).

## ***ANEXO 5. Glosario de Términos***

**Acido desoxirribonucleico (ADN).**- Polímero nucleotídico que lleva la información genética en todos los organismos vivos. Puede ser de cadena sencilla (ADNs) como en algunos genomas de virus, o de doble cadena (ADNd) como en organelos y organismos superiores. En el ADNd las cadenas complementarias están enrolladas una alrededor de la otra en orientación opuesta antiparalela 5' – 3' con respecto a 3' – 5' para formar una doble hélice. Las dos cadenas se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre las bases complementarias (A-T; C-G).

**Acrocéntrico.**- Cromosoma que presenta un brazo muy corto y el otro largo.

**ADN altamente repetitivo.**- Secuencias simples repetidas hasta  $10^6$  veces en un genoma.

**ADN de secuencia única.**- Secuencia de ADN que no está repetida en el genoma.

**ADN medianamente repetitivo.**- Secuencias repetidas entre 100 y  $10^5$  veces por genoma.

**ADN metilado.**- ADN al que se le han añadido grupos metilo a la citosina formando 5' – metilcitosina en dinucleótidos CpG.

**ADN polimerasa.**- Enzima proveniente de algunas especies de bacterias, que polimerizan desoxirribonucleótidos, muy termoestables (70 – 75°C) y que permiten la amplificación selectiva en la PCR de cualquier ADN clonado con alta actividad y fidelidad de alrededor de 10 millones de veces.

**ADN satélite.**- Tipo específico de repeticiones seriadas de secuencias simples abundantes en el ADN genómico de eucariontes. La función de este tipo de ADN es

desconocida y podría calificarse como “ADN no funcional”, pero podría ser necesario para mantener la estabilidad de la secuencia.

**AFLP.-** En inglés (Amplified Fragment Length Polymorphism) o Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados técnica que combina el uso de enzimas de restricción e iniciadores (oligonucleótidos) para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad. El ADN es cortado con dos enzimas de restricción, una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente. A los fragmentos se les ligan oligonucleótidos de extremos compatibles con las enzimas usadas y se amplifican los fragmentos resultantes por PCR.

**Agarosa.-** Polisacárido de galactán sulfatado lineal y neutral con B-D-galactopiranososa y 3,6-anhidro-B-Lgalactopiranososa ligado por enlaces glicosídicos (1,3-1,4) en forma alterna. Componente principal de las algas marinas (ágar). Es soluble en solución acuosa caliente y solidifica cuando enfría.

**AGE.-** Electroforesis en Gel de Agarosa.

**Alelo.-** Una de las formas alternativas de un gen o de una secuencia de ADN.

**Amortiguador de carga (Loading buffer).-** Mezcla de colorantes en una solución viscosa de glicerol, sacarosa, usada para incrementar la densidad de las muestras de ADN, ARN o proteínas antes de colocarlas en los pocillos; sirve también para ubicar el desplazamiento de fragmentos de ADN de cierto peso molecular durante la electroforesis.

**Análisis Genómico.-** Estudio de genomas o la identificación particular de defectos genéticos, usando diferentes técnicas para el análisis y detección de ADN, por ejemplo huellas genómicas, RFLPs, AFLPs, mapeo, secuenciación, etc.

**Anodo.-** Electrodo positivo en un campo eléctrico.

**Base.-** Molécula que contiene nitrógeno heterocíclico constituyente del ADN o del ARN. Son cinco las bases más comunes: adenina y guanina (bases púricas) y citosina, timina y uracilo (bases pirimidínicas).

**Bromuro de etidio (3,8-diamino-6-ethyl-5-phenylphenanthridium bromide).-**

Colorante cancerígeno fluorescente que se intercala entre los pares de bases de ADN y ARN. El complejo ácido nucleico-bromuro de etidio fluoresce cuando se expone a la luz UV (ultravioleta) de longitudes de onda de 300 nm o menos. Se utiliza para visualizar moléculas de ácido nucleico de doble cadena en geles de agarosa o poliacrilamida por emisión de fluorescencia a 590 nm.

**Cariotipo.-** Lo constituye el número, tamaño y forma de los cromosomas de una célula somática.

**Cátodo.-** Electrodo negativo en un campo eléctrico.

**Cebadores.-** Oligonucleótidos que hibridan al molde de ADN para cebar la síntesis mediada por la ADN polimerasa. También se denominan Iniciadores, Primers, Oligonucleótidos.

**Centrómero.-** Región constreñida especializada de una cromátide. En las células en profase y metafase, las cromátides hermanas se unen en sus centrómeros.

**CIA.-** Mezcla de 24 partes de cloroformo con 1 parte de alcohol isoamil.

**Citogenética.-** Característica del cariotipo que se revela por el examen de los cromosomas metafásicos.

**cM.-** Unidad de mapeo genético equivalente a la distancia entre pares de genes que han tenido 1% eventos de recombinación. Llamada centiMorgan en honor a su descubridor Thomas Morgan.

**Colchicina.-** Alcaloide que evita la separación de las cromátides durante la mitosis, su efecto citológico en mitosis es la división celular sin la formación del huso mitótico.

**Cromatina.-** El complejo de ADN, proteína y ARN que constituye los cromosomas eucarióticos.

**Cromosomas.-** Estructuras presentes en el núcleo celular formadas por cromatina y que contienen los genes.

**CTAB.-** En inglés (Cetyl-Trimethyl-Ammonium Bromide), detergente catiónico altamente caotrópico, cuyas miscelas cargadas positivamente se pegan a polianiones (ADN). A bajas concentraciones de sal (<0.6 M NaCl) el CTAB puede formar complejos con el ADN, mientras que las proteínas y los polisacáridos neutrales se mantienen en solución. Además, el CTAB se usa para eliminar proteínas y precipitar al ADN. Después de su precipitación, el ADN puede intercambiarse del complejo ADN-CTAB con altas concentraciones de sal (1M NaCl).

**Delección.-** Cualquier mutación generada por la remoción de uno o más pares de bases de un genoma particular.

**Desnaturalización.-** Pérdida de la configuración original de una macromolécula (ADN, ARN, Proteína) inducida por temperaturas elevadas, cambios extremos de pH, sustancias químicas. En las proteínas, la desnaturalización es acompañada de una pérdida en su actividad biológica.

**dNTPs dinucleotic triphosphate.-** Abreviatura que se refiere a cualquiera de los 2'-desoxinucleósido-5'-trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

**DO.-** Densidad Óptica

**EDTA (ethylen diamine tetraacetic acid).-** Acido etilen diamino tetracético en español. Compuesto que quela cationes divalentes como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . Se usa para remover cationes divalentes de soluciones de ADN y así prevenir la actividad de la ADNasa.

**Electroforesis.-** Método para separar moléculas cargadas en un campo eléctrico, el cual manifiesta diferencias en la carga eléctrica neta y en la forma y tamaño de la molécula.

**Endonucleasas de restricción.-** Cualquier enzima bacteriana que reconoce secuencias nucleotídicas blanco específicas (sitio de reconocimiento) en ADn de doble cadena, cataliza el rompimiento de enlaces internos entre nucleótidos específicos en esos sitios o a una distancia alejada produciendo rompimientos en la doble cadena; los extremos de los fragmentos que se generan pueden ser cohesivos o romos dependiendo de la enzima.

**Exón.-** Parte de un gen que se transcribe y permanece en el mRNA después del recorte y empalme. Principalmente consiste en regiones codificantes de proteínas, pero también incluye regiones no traducidas en 5' y 3' del mRNA.

**Fijador Carnoy.-** Mezcla de Metanol y Ac. Acético en proporción 3:1

**Fragmento de Restricción.-** Cualquier oligo o polinucleótido que se libera a partir de rompimientos no aleatorios de una molécula grandes de ADN mediante una endonucleasa de restricción.

**Frecuencia Alélica.-** La frecuencia de cada alelo en un locus polimórfico en una población.

**Gen.-** Secuencia de ADN que contiene información en su secuencia que contribuye al fenotipo de la célula. Normalmente, se refiere a una secuencia que codifica para proteínas junto a las secuencias necesarias para su expresión. Otros genes codifican para moléculas de ARN funcionales que no necesitan ser traducidas.

**Genoma.-** Conjunto del material genético de una célula o un organismo.

**Giemsa.-** Solución de Eosinatos de Azul y Azules de metileno en Metanol-Glicerina, preparadas a base de colorantes de acentuado poder policromatófilo y metacromático. Colorante específico para la identificación de cromosomas.

**Hematocrito.-** Es el volumen ocupado por los elementos celulares en 100 ml de sangre total.

**Hemoglobinometría.-** cuantificación del contenido de hemoglobina presente en la sangre de un individuo.

**Heparina Sódica.-** Anticoagulante utilizado en la extracción de sangre.

**Heredabilidad.-** Proporción de la variabilidad de una población que puede ser atribuida a la variabilidad genética.

**Heterocigoto.-** Cuando los dos alelos de un locus específico son diferentes.

**Hibridación.-** Formación de una molécula híbrida de ADN mediante la complementariedad de bases en cadenas de origen distinto.

**Histonas.-** Proteínas pequeñas con carga positiva (básicas) presentes en el núcleo y que se unen al ADN con carga negativa.

**Homocigoto.-** Presencia de dos alelos idénticos en un determinado locus.

**Homólogos.-** Genes similares por descendencia de un ancestro común.

**Huella genética.-** Proceso que identifica de manera inequívoca un individuo de acuerdo a ciertos componentes de su genoma.

**Interacción aditiva.-** Cuando el efecto de múltiples alelos en el fenotipo es la suma de sus efectos individuales.

**Intrón.-** Parte del gen que se transcribe, pero que se elimina en el recorte y empalme de los transcritos.

**kb.-** Kilobase, 1000 pares de bases en un ADN.

**Ligamiento.-** Tendencia de dos marcadores genéticos a ser heredados conjuntamente en la meiosis. Esto es indicativo de que los marcadores se localizan juntos en el mismo cromosoma.

**Locus de rasgo cuantitativo (QTL).-** Locus que contribuye a un fenotipo cuantitativo.

**Locus.-** Región cromosómica única que corresponde a un gen o a una secuencia de ADN.

**Mapa Físico.-** Mapa genómico basado en la localización de las secuencias de ADN.

**Mapa Genético.-** Mapa genómico basado en el orden y las distancias entre genes y marcadores genéticos mediadas por frecuencia de recombinación.



**Marcador.-** Cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía; marcador molecular estándar, escalera de fragmentos de diferente peso molecular.

**Metacéntrico.-** Cromosoma cuyo centrómero se localiza en la mitad y los dos brazos presentan igual longitud.

**Microsatélites.-** Repeticiones en tándem de secuencias muy pequeñas, de 2-4 nucleótidos y que se encuentran en diferentes localizaciones del genoma.

**Minisatélites.-** Tipo de ADN altamente repetitivo consistente en secuencias de entre 10 y 100 pb de longitud repetidas en tándem y que varía en tamaño entre 0.5 y 40 kb. Suelen localizarse cerca de los telómeros aunque puede estar en cualquier sitio. También se les conoce como repeticiones en número variable (VNTRs).

**Morfométrico.-** Parámetros que cuantifican las dimensiones de un individuo, relacionándolas entre sí.

**PAGE.-** Electroforesis en gel de poliacrilamida.

**Polimórfico.-** Locus heterocigoto en una frecuencia significativa en una población.

**Polimorfismo.-** Cambio localizado en una secuencia específica de ADN dentro de un genoma que ocurre generalmente por deleciones, inversiones, inserciones o rearrreglos. Estas mutaciones permiten la existencia de diferentes alelos para un locus específico.

**Proteinasa K.-** Enzima obtenida del hongo *Tritirachium album* que cataliza el rompimiento de enlaces peptídicos en proteínas con una débil preferencia para

aminoácidos alifáticos, aromáticos u otros hidrofóbicos. La autólisis de esta enzima es mínima y puede prevenirse por la adición de  $\text{Ca}^{+2}$ .

**Rpm.-** Revoluciones por minuto

**SDS (sodium dodecil sulfate).**- Dodecil sulfato de sodio. Detergente aniónico cuya fórmula de  $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{11} \text{OSO}_3 \text{Na}$  que se utiliza para la solubilización y electroforesis de proteínas. El SDS se pega en relación de 1.4 g de SDS/gr de proteína, lo que confiere una carga negativa neta; sin embargo, su separación electroforética después de la unión con el detergente, depende en gran medida de su tamaño.

**Segregación.-** transmisión de alelos a través de un árbol genealógico familiar de manera que siguen los principios mendelianos de la herencia.

**Selección.-** Proceso que lleva a incrementar la frecuencia de un alelo favorable y disminuye la de los alelos deletéreos.

**SNP (Single Nucleotide Polimorphism).**- Polimorfismo de un solo nucleótido.

**STE.-** Solución buffer de cloruro de sodio 0.1 M, Tris HCl 0.05 M, pH 7.5 y EDTA 0.001 M.

**STR (Short Tandem Repeats).**- Pequeñas repeticiones en tándem.

**Submetacéntrico.-** Cromosoma en el que la longitud de un brazo es algo mayor que la del otro.

**TAE.-** Solución buffer de Tris, Acido Glacial Acético y EDTA.

**TBE.-** Solución buffer de Tris, Acido Bórico y EDTA.

**TE.-** Solución buffer de Tris 10mM y EDTA 0.1 mM.

**Telocéntrico.-** Cromosoma en el que se aprecia un brazo al estar el centrómero en el extremo.

**TEMED.-** N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine.

**TRIS.-** Tris (hidroximetil) aminometano

**VNTR (Variable Number Tandem Repeats).-** Repeticiones en tandem en Número Variable.

**Wright.-** Colorante que permite identificar específicamente glóbulos rojos.

**$\beta$ - Mercaptoetanol.-** Antioxidante utilizado en la extracción de ADN. Su función es escindir los enlaces disulfuro de forma reversible.

## **ANEXO 6. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

<b>ADN</b>	Acido Desoxirribonucleico
<b>AFLP</b>	En inglés (Amplified Fragment Length Polymorphism) o Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados
<b>AGE</b>	Electroforesis en Gel de Agarosa.
<b>ARN</b>	Acido Ribonucleico
<b>CIA</b>	Mezcla de 24 partes de cloroformo con 1 parte de alcohol isoamil.
<b>cM</b>	Centi Morgan
<b>CTAB</b>	En inglés (Cetyl-Trimetyl-Ammonium Bromide)
<b>dNTPs</b>	Dinucleotic triphosphate o trifosfato dinucleótido
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>EDTA</b>	Ethylen diamine tetraacetic acid o Acido etilen diamino tetracético
<b>DGGE</b>	(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, en inglés) Electroforesis en Gel de Gradiente Denaturada
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	Mililitro

<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
<b>PFGE</b>	(Pulsed Field Gel Electrophoresis, en inglés), Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.
<b>QTL</b>	Locus de rasgo cuantitativo
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Sodium dodecil sulfate o Dodecil sulfato de sodio.
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polimorphism o Polimorfismo de un solo nucleótido.
<b>STE</b>	Solución buffer de cloruro de sodio 0.1 M, Tris HCl 0.05 M, pH 7.5 y EDTA 0.001 M.
<b>STR</b>	Short Tandem Repeats o Pequeñas repeticiones en tándem.
<b>TAE</b>	Solución buffer de Tris, Acido Glacial Acético y EDTA.
<b>TBE</b>	Solución buffer de Tris, Acido Bórico y EDTA.
<b>TE</b>	Solución buffer de Tris 10mM y EDTA 0.1 mM.
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine.
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil) aminometano

<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VNTR</b>	Variable Number Tandem Repeats o Repeticiones en tandem en número Variable.
<b>V</b>	Voltios
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro