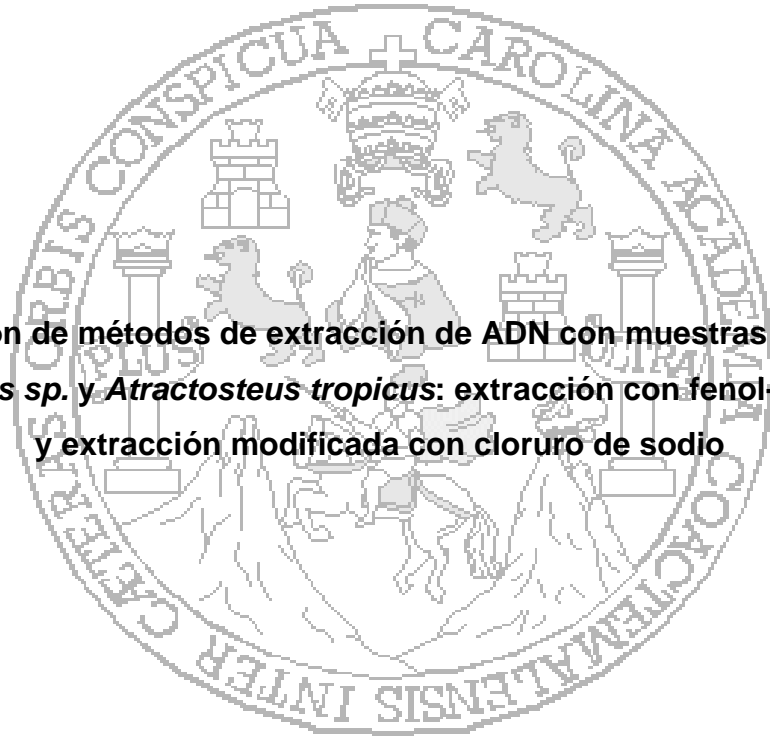


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Comparación de métodos de extracción de ADN con muestras de aleta de *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*: extracción con fenol-cloroformo y extracción modificada con cloruro de sodio



Presentado por:

T.A. VALERO RAMIREZ TALBOTT

Para otorgarle el título de:

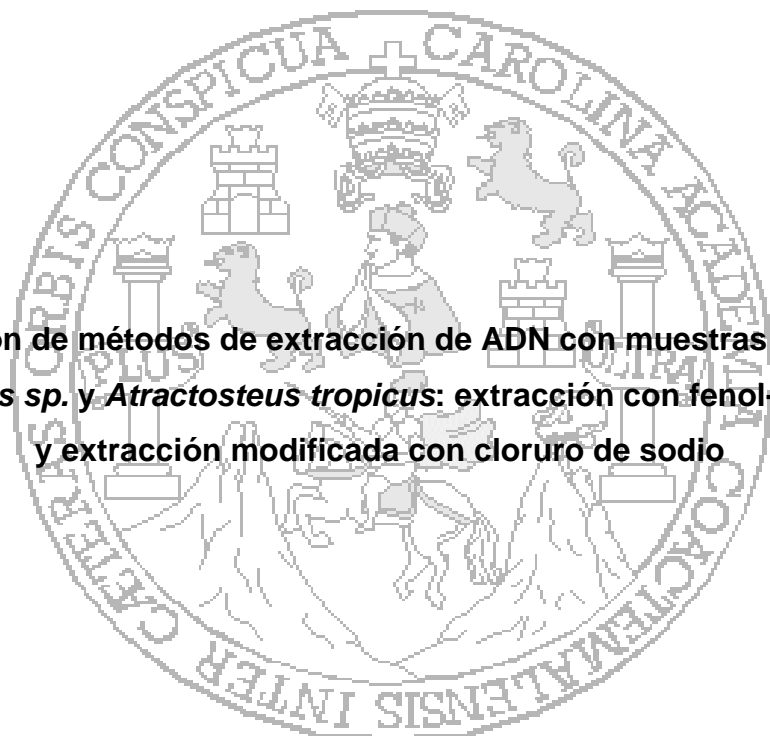
LICENCIADO EN ACUICULTURA

Guatemala, enero de 2010

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Comparación de métodos de extracción de ADN con muestras de aleta de *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*: extracción con fenol-cloroformo y extracción modificada con cloruro de sodio



Presentado por:

T.A. VALERO RAMIREZ TALBOTT

ASESORES: M.V. SALOMON MEDINA

LICDA. CAROLINA MARROQUIN

Guatemala, enero de 2010

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA**

CONSEJO DIRECTIVO

Presidente	M.Sc. Pedro Julio García Chacón
Coordinador Académico	M.Sc. Carlos Salvador Gordillo García
Secretaria y	M.Sc. Norma Edith Gil Rodas de Castillo
Representante Docente	Ing. Gustavo Adolfo Elías Ogaldez
Representante del Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas	M.Sc. Estrella de Lourdes Marroquín Guerra
Representante Estudiantil	Br. Jesús Alfredo Guzmán Cáceres
Representante Estudiantil	Br. Sofía del Carmen Morales Navarro

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala –USAC–.

Al Centro de Estudios del Mar y Acuicultura –CEMA–.

A mis catedráticos: Por su enseñanza y amistad.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Sanidad Acuícola.

Al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al M.V. Salomón Medina y a la Licda. Carolina Marroquín: por brindarme su apoyo, conocimientos, consejos y amistad.

DEDICATORIA

A Dios: Infinitas gracias por las bendiciones en esta vida logrando concluir esta etapa en mi carrera profesional.

A mis padres: Jorge Ramírez y Sandra de Ramírez por su gran apoyo, su cariño, sus sabios consejos y el amor incondicional.

A mi familia: Abuelitas, primos y tíos, por su apoyo y cariño incondicional.

A mis amigos: Por su valiosa amistad y apoyo en todo momento.

A mis compañeros de clase: Por todos los buenos momentos que pasamos en nuestra formación como profesionales.

RESUMEN

El uso de apropiados métodos de muestreo, tipo de tejido y la utilización de protocolos viables de extracción del ADN son aspectos críticos en estudios basados en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los protocolos de extracción de ADN deben ser simples, reproducibles, económicos y no contaminantes. Este trabajo tuvo por objetivo comparar un protocolo modificado de extracción con sal común (NaCl) y un protocolo modificado de extracción con fenol-cloroformo, para la obtención de ADN genómico en alta cantidad y calidad desde muestras de aleta de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y machorra (*Atractosteus tropicus*) en menor tiempo a un menor costo. Las extracciones de ambas especies de peces usando el protocolo de sal común permitió obtener concentraciones mayores a 200 µg/ml de ADN, pero de baja calidad (relación de pureza ADN:ARN de 1.3). Esto demostró casi la misma efectividad de la extracción de ADN con sal común a un menor costo en menos tiempo de trabajo en comparación con el protocolo modificado de extracción con fenol-cloroformo. Aunque con el protocolo de fenol-cloroformo se obtuvieron concentraciones un poco menores pero de mejor calidad. Siendo el protocolo de sal común un procedimiento de extracción de ADN constituye una alternativa para los métodos de extracción para mejorar los estudios moleculares en peces.

ABSTRACT

The use of appropriate sampling methods, the type of tissue or sample and the use of viable DNA extraction protocols are critical issues in studies based on PCR (Polymerase Chain Reaction). The DNA extraction should be a simple, reproducible, inexpensive and non-toxic method. The purpose of this research is to compare a modified salt extraction protocol with a modified phenol-chloroform extraction protocol. To obtain high quality and quantity genomic DNA in less time from fish fin samples of *Oreochromis niloticus* y *Atractosteus tropicus*. Using salt extraction protocol yielded a high quantity of DNA; however it was low quality (DNA/RNA relationship of 1.3). Demonstrating almost the same effectiveness than the of modified phenol-chloroform extraction protocol. Getting with the phenol-chloroform extraction protocol less DNA quantity but better quality. This DNA extraction procedure constitutes an alternative to DNA extraction methods for fish molecular studies.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
III. MARCO TEORICO	4
3.1. ADN (ácido desoxirribonucleico)	4
3.2. Extracción de ADN	4
3.3. Cuantificación de ADN	7
3.4. Electroforesis	9
IV. OBJETIVOS	11
4.1. Objetivo general	11
4.2. Objetivos específicos	11
V. METODOLOGIA	12
5.1. Descripción del área	12
5.2. Variables	12
5.3. Descripción de la muestra	12
5.4. Diseño estadístico	13
5.5. Tratamientos	13
5.6. Determinación de ácidos nucleicos	15
5.7. Evaluación de la integridad del ADN	15
5.8. Evaluación Económica	16
5.9 Evaluación de tiempo de trabajo	16
VI. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	17
6.1. Cantidad de ADN	17
6.1.1. Comparacion del Protocolo de fenol-cloroformo con el protocolo de sal común	18
6.1.2. Comparacion de los tejidos de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> y machorra <i>Atractosteus tropicus</i>	18

6.2. Calidad del ADN	19
6.2.1. Comparacion de la pureza del ADN extraído con el Protocolo de fenol-cloroformo con el ADN extraído con el protocolo de sal común	20
6.2.2. Comparación de la pureza del ADN extraído de los tejidos de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> y machorra <i>Atractosteus tropicus</i>	20
6.3. Integridad del ADN obtenido	21
6.4. Evaluación de tiempo de trabajo	24
6.5. Análisis de costos	26
VII. CONCLUSIONES	27
VIII. RECOMENDACIONES	29
IX. BIBLIOGRAFIA	30

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura No. 1. Colecta de muestras de aletas en la Estación de Monterrico.	13
Figura No. 2. Cuantificador de ADN.	15
Figura No. 3. Cámara de electroforesis horizontal.	16
Figura No. 4. Concentraciones de ADN.	17
Figura No. 5. Pureza de ADN.	19
Figura No. 6. Comparación de la integridad, fenol-cloroformo vs. Sal común de ADN obtenido de tilapia.	22
Figura No. 7. Comparación de la integridad, fenol-cloroformo vs. Sal común de ADN obtenido de machorra.	23

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro No. 1. Tiempo estimado para la extracción de ADN utilizando el protocolo de sal común.	24
Cuadro No. 2. Tiempo estimado para la extracción de ADN utilizando el protocolo de fenol-cloroformo.	25
Cuadro No. 3. Costos estimados de insumos variantes en protocolos.	26

I. INTRODUCCIÓN

En Guatemala, los principales problemas de la producción de semilla de tilapia *Oreochromis sp.* para acuicultura, son las enfermedades causadas por consanguinidad, ello, debido a los cruces entre organismos con un alto grado de parentesco, reduciendo el rendimiento de la semilla en cultivo y en algunos casos provoca deformidades.

Para evitar este problema se pueden realizar estudios de los lotes de reproductores con la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). En los cuales se determina el parentesco entre lotes. Como también realizar estudios entre poblaciones y variaciones genéticas existentes entre ellas, como el caso del pejelagarto o machorra *Atractosteus tropicus*.

El uso de apropiados métodos de muestreo, tipo de tejido y la utilización de protocolos viables de extracción del ADN son aspectos críticos en estudios basados en PCR. Los métodos de extracción de ADN deben ser simples, reproducibles, económicos y no contaminantes.

El uso de marcadores moleculares, por ejemplo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y microsatélites, permiten que el análisis del potencial genético de un pez, de una comunidad o una población sea determinada con mayor precisión, antes de la expresión de su fenotipo (Liu; Cordes, 2004). De este modo se puede estimar la diversidad genética, necesaria para estudiar prácticas de manejo y conservación de peces, inclusive para aquellas especies en riesgo de extinción (Lopera-Barrero; *et al.*, 2006). Sin embargo, la viabilidad de estos estudios es frecuentemente limitada por la dificultad de aislar ADN, en cantidad y calidad suficiente, desde pequeñas muestras de tejidos (Yue; Orban, 2001; Wasko; *et al.*, 2003).

Para la extracción de ADN en peces, la utilización de aletas (Nam; *et al.*, 2003; Wasko; *et al.*, 2003; Lopera-Barrero; *et al.*, 2006), y músculo (Weber; *et al.*, 2003; Chakraborty; *et al.*, 2006) han sido los más comunes, por medio de varios protocolos, donde la utilización, silica, micro-wave, nitrógeno líquido, fenol-cloroformo y sal común han sido utilizados.

El uso del protocolo de extracción con fenol-cloroformo ha sido el método más usado para obtener ADN genómico de peces. Estos protocolos tienen buenos resultados para muestras de diversos orígenes. Sin embargo, es un método lento, laborioso y contaminante (Yue; Orban, 2001). La extracción de ADN usando el protocolo con sal común (NaCl) es una alternativa simple, fácil, rápida y no contaminante que permite obtener ADN de buena calidad, en cantidades suficientes, desde muestras de tejido de peces (Yue; Orban, 2001).

El estudio se realizó con la finalidad de probar un método simple, reproducible, económico y no contaminante para la obtención de ADN destinados a estudios con marcadores moleculares RAPD y microsatélites en peces. Se comparó un protocolo modificado de extracción con sal común (NaCl) con un protocolo modificado de extracción con fenol-cloroformo en muestras de aleta de *Oreochromis niloticus* y *Atractosteus tropicus*. Se evaluó la calidad, cantidad e integridad del ADN obtenido. Y también se realizó una evaluación de costos y tiempo de trabajo.

II. ANTECEDENTES

En Guatemala no se han realizado investigaciones de extracción de ADN en peces, ni tampoco estudios genéticos con técnicas moleculares de PCR. Esto se debe a que esta tecnología es relativamente nueva en Guatemala. En la mayoría de estudios genéticos, los métodos de extracción se realizan con kits comerciales.

En el año 2008, en Brasil, se realizó un investigación de la comparación del protocolo modificado con sal común con las especies de *Brycon orbignyanus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Leporinus elongatus* y *Prochilodus lineatus*. En los cuales se obtuvieron altas cantidades de ADN de buena calidad (Lopera-Barrero; *et al.*, 2008).

III. MARCO TEORICO

3.1. ADN (ácido desoxirribonucleico)

La presentación del modelo estructural del ácido desoxirribonucleico (ADN) por Francis Harry Compton Crick y James Dewey Watson en 1953, fue el verdadero inicio de la biología molecular. La importancia de este hecho se debe, por un lado a que es la molécula que transmite la información hereditaria de generación en generación, y por otro a que la propia estructura muestra cómo lo logra. El ADN es una molécula de doble hélice, compuesta por dos hebras complementarias unidas entre sí por enlaces entre las bases: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). La A de una hebra se aparea siempre con la T de la hebra complementaria, y del mismo modo, la G con la C. Durante la replicación o duplicación, las dos hebras simples se separan y cada una de ellas forma una nueva hebra complementaria, incorporando bases, la A se unirá a la T de la hebra molde, la G lo hará con la C y así sucesivamente. De esta manera se obtiene otra molécula de ADN, idéntica a la original y por tanto, el material genético se ha duplicado. Este material incluye toda la información necesaria para el control de las funciones vitales de las células y del organismo. Durante la división celular, las dos células hijas reciben igual dotación genética; de este mismo modo se reparte el material hereditario a la descendencia, cuando se reproduce un organismo (Enciclopedia Microsoft® Encarta®, 2009)

3.2. Extracción de ADN

Muchas de las técnicas de biología molecular incluyen algún tipo de manipulación del material genético. Estos procedimientos han logrado adelantar hasta tal grado el conocimiento del código genético, que ya es posible clonar organismos enteros. Los procedimientos iniciales eran largos y tediosos y podían pasar varios días antes de saber con certeza que se había logrado obtener ADN en calidad y cantidad suficiente para poder manipularlo. Además algunos de los reactivos usados para estos procesos son tóxicos y

mutagénicos. Hoy día se puede obtener suficiente ADN de buena calidad en unas horas (Universidad de Puerto Rico, 2009).

El proceso de extracción del ADN geonómico sigue ciertas pautas para su correcta purificación que son muy diferentes a los empleados en la purificación de proteínas, lo que refleja las diferencias básicas en la estructura de estos dos tipos de macromoléculas. El primer paso en la purificación del ADN por lo general consiste en homogeneizar las células y aislar los núcleos de los cuales se extrae el ADN. El medio de extracción ordinario contiene un detergente (SDS); a continuación se le agrega solución buffer TE para resuspender el ADN, luego los ácidos nucleicos se precipitan añadiendo etanol. Para concluir el análisis de la extracción del ADN hay que resaltar que en este proceso ocurre una lisis celular lo cual significa que el ADN queda libre por consiguiente hay que protegerlo de las enzimas porque estas podrían degradarlo (Universidad de Puerto Rico, 2009).

Para la extracción de ADN en peces, la utilización de aletas (Nam; *et al.*, 2003; Wasko; *et al.*, 2003; Lopera-Barrero; *et al.*, 2006), y músculo (Weber; *et al.*, 2003; Chakraborty; *et al.*, 2006) han sido los mas comunes, por medio de varios protocolos, donde la utilización, silica, micro-wave, nitrógeno líquido, fenol-cloroformo y sal común han sido utilizados.

El uso del protocolo de extracción con fenol-cloroformo ha sido el método más usado para obtener ADN genómico de peces. Estos protocolos tienen buenos resultados para muestras de diversos orígenes. Sin embargo, es un método lento, laborioso y contaminante (Yue; Orban, 2001). La extracción de ADN usando el protocolo con sal común (NaCl) es una alternativa simple, fácil, rápida y no contaminante que permite obtener ADN de buena calidad, en cantidades suficientes, desde muestras de tejido de peces (Yue; Orban, 2001).

Protocolo extracción con fenol-cloroformo

Cuando se desea tratar un ácido nucleico con una enzima (polimerasa, para PCR) es necesario proceder a la purificación para eliminar las enzimas y proteínas antes de pasar a la siguiente etapa.

El proceso clásico de extracción de ADN (purificación) consiste en tratar las soluciones acuosas de las muestras con fenol, que desnaturaliza las proteínas y enzimas. Se emplea, habitualmente, la mezcla más eficaz fenol-cloroformo. Después de la separación de las fases mediante la centrifugación, la fase acuosa flotante que contiene el ácido nucleico es recogida. Las trazas de fenol (que podrían inhibir las enzimas de la siguiente etapa, PCR) deben ser eliminadas mediante un nuevo tratamiento con cloroformo (Étienne, 2001).

Cuando el ácido nucleico procede de extractos celulares, las proteínas son previamente hidrolizadas mediante enzimas proteolíticas como la proteínas K (Étienne, 2001).

Fenol

El fenol se utiliza para la preparación de resinas sintéticas, colorantes, medicamentos, plaguicidas, curtientes sintéticos, sustancias aromáticas, aceites lubricantes y solventes (Centre for Ecological Sciences, 2009).

El fenol se presenta en la naturaleza en la madera y en las agujas de pino, en la orina de los herbívoros (fenolsulfato) y en el alquitrán de hulla. De los fenoles monohídricos se obtienen numerosas esencias (aromáticas) naturales, como por ejemplo: vainillina, timol, carvacrol, "zingiverón" (en jengibre), aldehído salicílico (Centre for Ecological Sciences, 2009).

Cloroformo

La mayor parte de la producción de cloroformo se utiliza para fabricar monoclorodifluorometano que se aplica como frigorígeno. También encuentra

aplicación en la fabricación de colorantes, productos farmacéuticos y pesticidas. Su uso como solvente y como anestésico está disminuyendo rápidamente, debido al consumo como narcótico recreacional (Centre for Ecological Sciences, 2009).

Protocolo modificado de extracción con sal común

Cuando se desea tratar un ácido nucleico con una enzima (polimerasa, para PCR) es necesario proceder a la purificación para eliminar las enzimas y proteínas antes de pasar a la siguiente etapa.

En este proceso de extracción de ADN (purificación) consiste en tratar las soluciones acuosas de las muestras con una solución de NaCl 5M, que por medio de la densidad separa proteínas y enzimas ya que el ADN presente en soluciones con alta concentración de sales cloruro de sodio (NaCl) puede precipitarse mediante la adición de alcohol etílico. Después de la separación de las fases mediante la centrifugación, la fase acuosa flotante que contiene el ácido nucleico es recogida. Las trazas de NaCl no reportan alguna interferencia en la técnica de PCR. Por lo que este protocolo se considera menos contaminante (Londoño, 2009).

Sal común

El cloruro de sodio se le denomina como sal, su fórmula es NaCl. Es un compuesto formado por varios minerales. Es incolora o blanca cuando se presenta en forma pura y presenta color cuando aparece acompañada de otras impurezas. Esta formada por pequeños cubos. Constituye uno de los elementos más abundantes de la Tierra (Botanical-online SL, 2009).

3.3. Cuantificación de ADN

Para la cuantificación del ADN, existen dos métodos indirectos que permiten estimar la concentración del ADN en las muestras, por visualización y mediante espectrofotómetro (Universidad Autónoma de Baja California, 2007).

Estimación de la concentración de ADN por visualización

El método indirecto más recomendable para la determinación de la concentración de ADN en una muestra es mediante la visualización de un gel de electroforesis en el cual se colocan muestras con concentraciones conocidas (Universidad Autónoma de Baja California, 2007).

El procedimiento requiere la preparación de una cámara de electroforesis (se recomienda la cámara mediana para 22 o 40 muestras), colocando cada una de las muestras que se desea evaluar en pozos individuales y dejando al menos 10 pozos libres. Posteriormente se inicia la electroforesis con 6 v/cm y diez minutos antes de que concluya la corrida, se detiene la fuente de poder, se destapa la cámara de electroforesis, sembrando las muestras de concentraciones conocidas. Finalmente se cierra la cámara de electroforesis, se enciende nuevamente la fuente de poder, dejando que corra durante 10 minutos, se visualiza el producto con U.V. y se toma una fotografía (Universidad Autónoma de Baja California, 2007).

En este método la estimación se realiza contrastando intensidades de luz entre las muestras, lo cual se realiza visualmente o con el auxilio de algún programa computacional que contraste intensidades de color (Universidad Autónoma de Baja California, 2007).

Estimación de pureza mediante espectrofotómetro

En este método se utiliza un espectrofotómetro que mida la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una absorbancia de 1 OD (A) es equivalente a, aproximadamente: 50µg/ml dsDNA (ADN de doble hebra). La pureza de ADN, se calcula por la interferencia de contaminantes por medio de la calculación del ratio. La relación A_{260}/A_{280} es usado para estimar la pureza del ácido nucleico, debido a que las proteínas absorben a 280nm. El ADN puro debe tener un ratio de aproximadamente 1.8 (Universidad Autónoma de Baja California, 2007).

3.4. Electroforesis

La electroforesis de ácidos nucleicos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN y ARN. En los tampones habitualmente utilizados, los ácidos nucleicos están cargados negativamente y migran hacia el ánodo. Cada molécula aporta una carga negativa (procedente del grupo fosfato), por lo que la relación carga/tamaño es prácticamente constante e idéntica para todas las moléculas, independientemente de su tamaño (un nucleótido tendrá la misma movilidad que un fragmento de doble cadena de 800pb o uno de 5kb) (Universidad de la República, 2009).

La electroforesis de ADN se lleva a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida. Ambos soportes son restrictivos para los ácidos nucleicos, de modo que los diferentes fragmentos (al tener la misma relación carga/tamaño), migran en función de su tamaño y/o conformación (Universidad de la República, 2009).

Los geles de poliacrilamida (en cubetas verticales) se emplean para fragmentos pequeños de ADN (5-500pb), así como para la mayoría de los ARN. Los geles de agarosa (en cubetas horizontales) se utilizan para fragmentos grandes de ADN (500pb-10Mb); utilizando agarosas de distintas concentraciones (distinto grado de reticulación) pueden separarse fragmentos de hasta 50kb aplicando un campo eléctrico constante; para separar fragmentos de tamaño superiores a 50kb se utiliza la electroforesis de campo pulsante en la que la dirección del campo eléctrico cambia periódicamente (Universidad de la República, 2009).

Electroforesis en geles de agarosa

Se trata del método más común para el análisis, purificación y obtención de ADN. Las agarosas disponibles comercialmente presentan una amplia gama de grados de pureza y especificaciones. La presencia de polisacáridos sulfatados, contaminantes en algunas agarosas, puede ser perjudicial, ya que son inhibidores de las enzimas con las que va a tratarse el ADN purificado en la

electroforesis (polimerasas, ligasas, endonucleasas de restricción, etc.) (Universidad de la República, 2009).

Un aspecto importante de las agarosas es su estado físico. La agarosa estándar gelifica a 35°C y funde a 80-90°C, aunque las hay modificadas por adición de grupos hidroxietilo, que gelifican a menos de 30°C y funden a 65°C. Estos datos son importantes, ya que finalizada la electroforesis, el gel se puede licuar a temperatura superior a la de fusión y así separar el ADN en disolución (Universidad de la República, 2009).

También es importante tener en cuenta la fragilidad del gel. Su resistencia mecánica se expresa en g/cm^2 , que representa el peso que puede soportar 1 cm^2 de un gel de agarosa al 1%. La agarosa estándar tiene una resistencia de 1000-2000 g/cm^2 , las de bajo punto de fusión alrededor de 200 g/cm^2 y las de alta resistencia llegan hasta 6000 g/cm^2 (Universidad de la República, 2009).

Hay agarosas de gran reticulado para fragmentos de pequeño tamaño molecular; utilizadas a concentraciones de 2.0-4.5% (y mantenidas a 4°C) separan eficazmente fragmentos de ADN de 700-3000pb. Además, algunas son transparentes lo que facilita enormemente el proceso de detección (Universidad de la República, 2009).

Al obtener varias bandas indica que el ADN genómico se desintegró y la falta del barrido a lo largo del gel indica la ausencia de ARN.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Comparar el protocolo de extracción modificado con sal común con el protocolo de fenol-cloroformo en términos económicos, tiempo de trabajo, cantidad de ADN, calidad (pureza e integridad) del ADN, en aletas de *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*.

Objetivos Específicos:

- Determinar la cantidad y calidad (pureza e integridad) del ADN, en aletas de *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*, obtenidos con el protocolo de sal común.
- Determinar la cantidad y calidad (pureza e integridad) del ADN, en aletas de *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*, obtenidos con el protocolo de fenol-cloroformo.
- Comparar los protocolos en términos económicos, tiempo de trabajo y contaminación.
- Comparar la cantidad y calidad (pureza e integridad) del ADN, entre *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*.

V. METODOLOGÍA

5.1. Descripción del área:

Las aletas se colectaron al azar de los lotes de reproductores de tilapia *Oreochromis sp.* y pejelagarto *Atractosteus tropicus*, de la Estación de Monterrico del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura (CEMA) de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC). La extracción de ADN y análisis de resultados se realizaron en el Laboratorio de Sanidad Acuícola en el área de Biología Molecular de CEMA.

5.2. Variables:

Variables independientes:

- Protocolo modificado de fenol-cloroformo
- Protocolo modificado de sal común

Variables dependientes:

Cantidad:

- Concentración de ADN

Calidad:

- Pureza
- Integridad

5.3. Descripción de la muestra:

Las muestras (aproximadamente 0.5 cm²) de aletas caudales se obtuvieron de diez individuos de *Oreochromis niloticus* y diez de *Atractosteus tropicus* (Figura No. 1). Todas se obtuvieron del mismo tamaño. Estas fueron colocadas en micro-tubos de reacción con etanol absoluto y conservadas en congelador a -20°C.



Figura No. 1. Colecta de muestras de aletas en la estación de Monterrico
(Trabajo de campo, 2009)

5.4 Diseño estadístico:

La selección de los organismos se realizó de acuerdo con un diseño completamente al azar.

Los valores de concentración y la relación de pureza de ADN que se obtuvieron en cada protocolo de extracción y la comparación entre tejidos, se analizaron estadísticamente por el método de T de Student.

Para ambas pruebas T de Student se considera un método sustituible si el valor es mayor a $\alpha = 0.01$.

5.5 Tratamientos:

Protocolo modificado de extracción con sal común (Aljanabi; Martinez, 1997).

Las muestras de aletas de peces en micro-tubos Eppendorf se trataron con:

1. 550 μL de solución tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl) más 1% de SDS y 7 μL de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ML}^{-1}$ de proteinasa K.
2. Inmediatamente se incubó en un baño termoregulado a 50°C por 12 h.
3. Luego, se adicionó 600 μL de NaCl 5M.
4. Centrifugar por 10 min a 12000 rpm.
5. El sobrenadante se transfirió a micro-tubos nuevos, donde se precipitó el ADN con 700 μL de etanol absoluto frío.

6. Posteriormente se incubó a -20°C por 2 h.
7. Las muestras de ADN fueron centrifugadas, lavadas con 700 μL de etanol 70%.
8. Resuspendidas en tampón TE (10 mM de Tris pH 8.0 y 1 mM de EDTA) (80 μL para aletas).
9. El ADN obtenido se conservó a -20°C .

Protocolo modificado de extracción con fenol-cloroformo (Bardakci; Skibinski, 1994).

Las muestras de aletas de peces colocadas en micro-tubos, se trataron con:

1. 550 μL de solución tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl) más 1% de SDS y 7 μL de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteinasa K.
2. Se incubaron en baño termoregulado a 50°C por 12 h.
3. Luego, el ADN fué purificado con dos extracciones separadas de fenol (250 μL) y tres extracciones separadas de cloroformo (250 μL).
4. El ADN obtenido se precipitó con 750 μL de etanol absoluto frío y con 300 μL de acetato de sodio.
5. En seguida se incubó en un congelador a -20°C por 2 h.
6. Posteriormente, las muestras de ADN se centrifugaron con 700 μL de etanol al 70%.
7. Luego se resuspendieron en tampón TE (10 mM de Tris pH 8.0 y 1 mM de EDTA) (80 μL para aletas).
8. El ADN obtenido se incubó en baño termoregulado a 37°C por 40 min.
9. Finalmente se conservó a -20°C .

Integridad y cuantificación del ADN

La integridad del ADN se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa 1% con 2 μl ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 70 V por 60 min, en buffer TBE (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico y 83 mM de EDTA). Se capturó la imagen con una cámara de fotos. La cantidad y calidad del ADN obtenido se determinó

con un espectrofotómetro marca JENWAY GENOVA, modelo LIFE SCIENTIFIC ANALYSER, a una absorbancia de 260/280 nm (Figura No. 2).



Figura No. 2. Cuantificador de ADN (Trabajo de campo, 2009)

5.6. Determinación de ácidos nucleicos

El ADN se midió en soluciones diluidas con buffer TE. La concentración se determinó por la medición a 260nm contra un blanco y después evaluada contra un factor, una absorbancia de 1 OD (A) es equivalente a, aproximadamente: 50µg/ml dsDNA (ADN de doble hebra). La pureza de ADN, se calculó por la interferencia de contaminantes por medio de la relación ADN/proteínas. La relación a 260/280 es usado para estimar la pureza del ácido nucleico, debido a que las proteínas absorben a 280nm.

5.7. Evaluación de la integridad del ADN

La integridad del ADN se evaluó por medio de una electroforesis horizontal (Figura No. 3), la evaluación se realizó de forma subjetiva, buscando una banda bien marcada en la parte superior del gel que representa el ADN genómico. También se observó la cantidad de ARN que es representado en una forma de un barrido a lo largo del Gel.

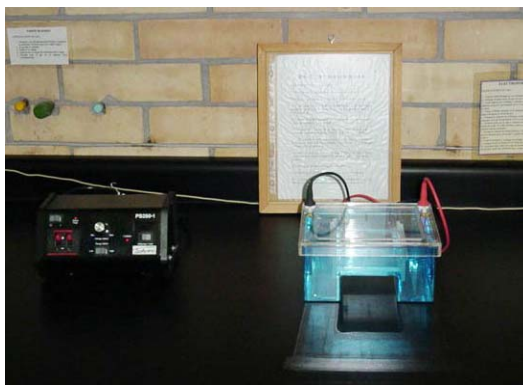


Figura No. 3. Cámara de electroforesis horizontal.
(Trabajo de campo, 2009)

5.8. Evaluación Económica

Para esta evaluación se estimaron los costos por muestra de los insumos que varían de cada protocolo (fenol, cloroformo y NaCl), en base a los costos de los reactivos necesarios para cada uno de los mismos. Estimando el costo de cada reactivo por extracción, para obtener el costo total adicional que requiere cada protocolo por extracción.

5.9 Evaluación de tiempo de trabajo.

Se evaluó el tiempo de trabajo para determinar si existe diferencia en la duración del proceso de extracción de ADN entre el protocolo de sal común y el protocolo de fenol-cloroformo.

VII. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como resultados de esta investigación se presentan datos sobre: cantidad de ADN, calidad del ADN obtenido, integridad del ADN, evaluación de tiempo de trabajo y análisis de costos de cada protocolo. La extracción con sal común presenta una alternativa fácil, económica y de menor tiempo de trabajo, que logra altas concentraciones de ADN genómico integro de baja calidad (pureza). Las extracciones de tejidos de *Oreochromis niloticus* y *Atractosteus tropicus* no presentan diferencia de calidad de ADN obtenido (pureza). Sin embargo del tejido de *Atractosteus tropicus* se obtubieron mayores concentraciones de ADN, debido a que los tejidos de la aleta caudal son más gruesos.

6.1. Cantidad de ADN

Comparación de las concentraciones de ADN obtenidas con el protocolo fenol-cloroformo vs. el protocolo de sal común de las concentraciones obtenidas de tilapia y machorra (Figura No. 4).

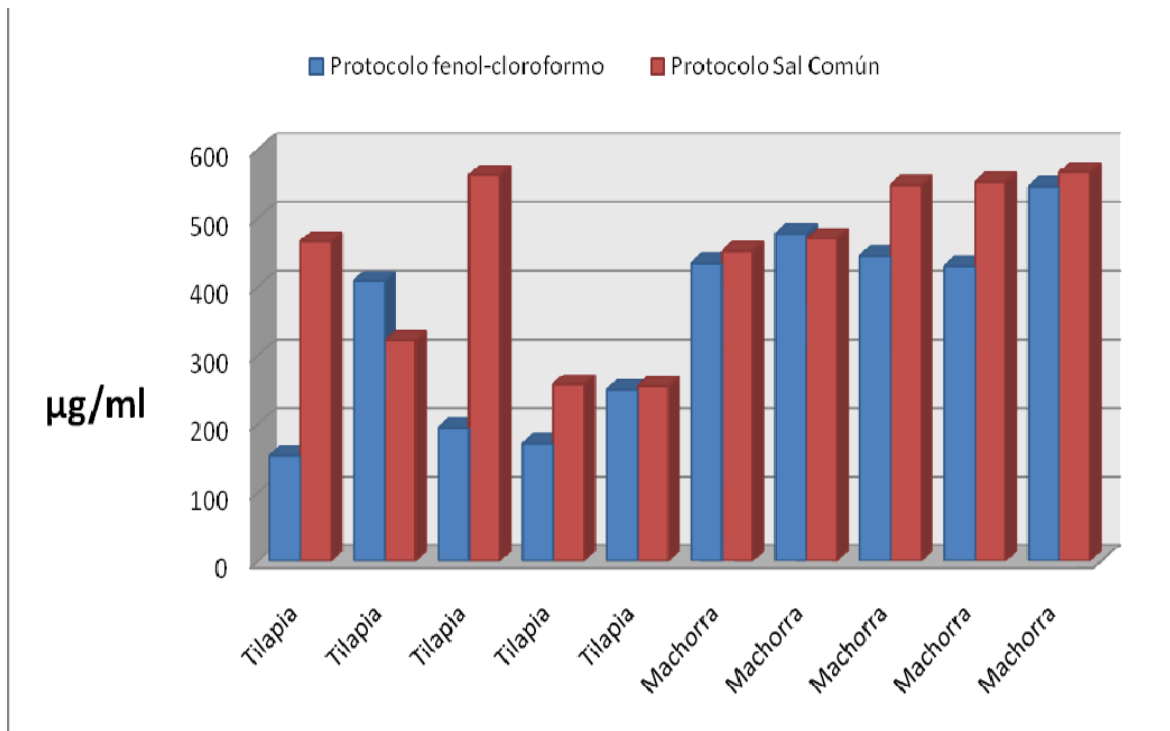


Figura No. 4. Concentraciones de ADN (Trabajo de campo, 2009)

6.1.1. Comparación del Protocolo de fenol-cloroformo con el protocolo de sal común

Las concentraciones de ADN extraídas con el protocolo de fenol-cloroformo tienen un promedio de $350.77 \pm 143.49 \mu\text{g/ml}$.

Las concentraciones de ADN extraídas con el protocolo de sal común tienen un promedio de $444.73 \pm 123.92 \mu\text{g/ml}$.

Ambos protocolos demuestran altas concentraciones de ADN extraído, para ser utilizadas en la técnica de PCR. El protocolo de fenol-cloroformo presenta menores concentraciones debido a los repetidos lavados de fenol y cloroformo, ya que se obtiene un volumen menor del sobrenadante después de cada lavado.

El valor de $P = 0.13 > \alpha$, lo cual indica que no existe una diferencia significativa entre el protocolo de sal común y el protocolo de fenol-cloroformo para obtener buenas concentraciones de ADN de tilapia y machorra.

6.1.2. Comparación de los tejidos de tilapia y machorra

Las concentraciones de ADN extraídas de tejidos de tilapia tienen un promedio de $303.64 \pm 134.83 \mu\text{g/ml}$.

Las concentraciones de ADN extraídas de tejidos de machorra tienen un promedio de $491.86 \pm 54.68 \mu\text{g/ml}$.

Ambos tejidos demuestran altas concentraciones de ADN extraído, para ser utilizadas en la técnica de PCR. El tejidos de tilapia presenta menores concentraciones y mayor variación debido que los tejidos de las aletas caudales de la tilapia son mas irregulares y más delgados que los tejidos de las aletas caudales de la machorra.

El valor de $P = 0.0015 < \alpha$, indica que existe una diferencia significativa de las concentraciones de ADN obtenido entre los tejidos de aleta de tilapia y machorra.

6.2. Calidad del ADN

Comparación de la pureza (relación de absorbancia a 260/280 nm) del ADN obtenida con el protocolo fenol-cloroformo vs. el protocolo de sal común a partir del ADN obtenido de tilapia y machorra (Figura No. 5).

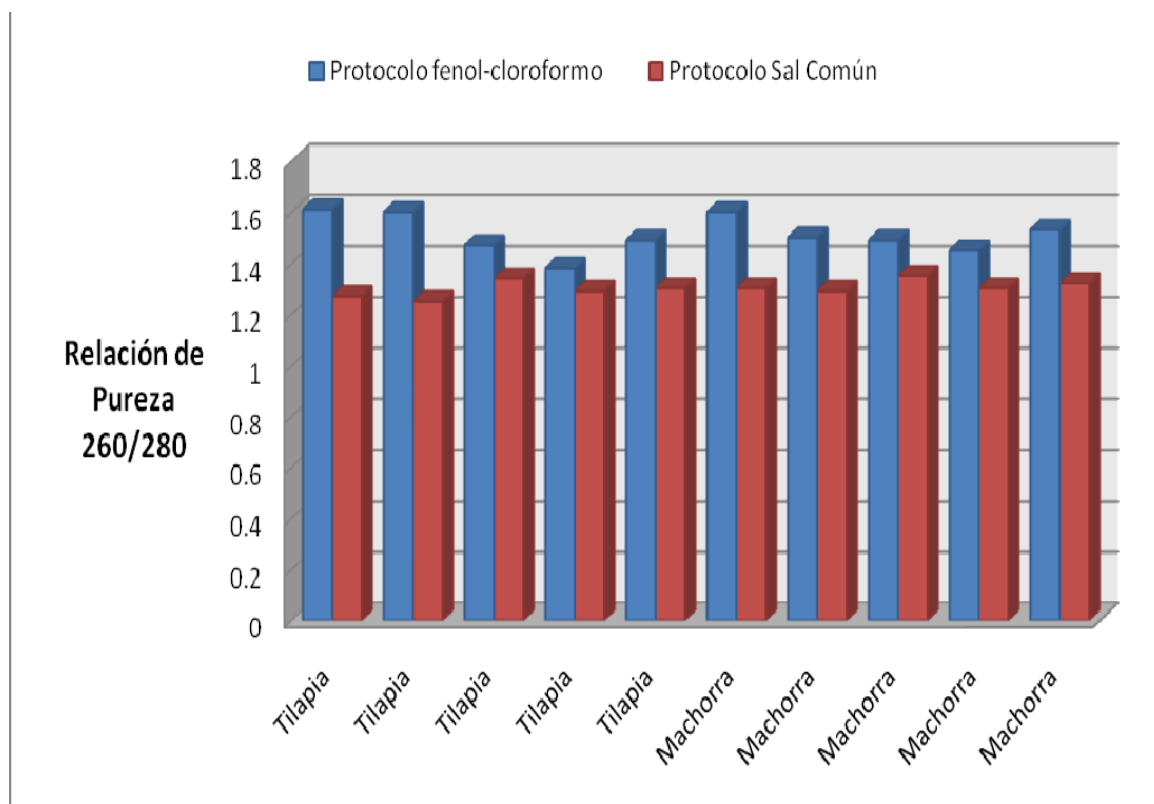


Figura No. 5. Pureza de ADN. (Trabajo de campo, 2009)

6.2.1. Comparación de la pureza del ADN extraído con el Protocolo de fenol-cloroformo con el ADN extraído con el protocolo de sal común

La pureza (relación de absorbancia a 260/280 nm) del ADN extraído con el protocolo de fenol-cloroformo tienen un promedio de 1.51 ± 0.074 . La pureza (relación de absorbancia a 260/280 nm) de ADN extraído con el protocolo de sal común tienen un promedio de 1.30 ± 0.029 .

Ambos protocolos demuestran que el ADN extraído tiene una baja pureza, y podrían tener interferentes en la técnica de PCR. El protocolo de fenol-cloroformo presenta mejor calidad debido a los repetidos lavados de fenol y cloroformo, que eliminan mejor las proteínas y enzimas durante la purificación. En el protocolo de sal, el cloruro de sodio 5M no es suficiente para precipitar todas las proteínas y enzimas durante la purificación.

El valor de $P = 0.0000026 < \alpha$, indica que existe una diferencia significativa de la pureza del ADN entre el protocolo de sal común y el protocolo de fenol-cloroformo para obtener ADN de buena pureza de tilapia y machorra.

6.2.2. Comparación de la pureza del ADN extraído de los tejidos de tilapia y machorra

La pureza (relación de absorbancia a 260/280 nm) de ADN extraído de tejidos de tilapia tienen un promedio de 1.40 ± 0.13 .

La pureza (relación de absorbancia a 260/280 nm) de ADN extraído de machorra tienen un promedio de 1.41 ± 0.11 .

Ambos tejidos demuestran ADN extraído con baja pureza, y podrían tener interferentes en la técnica de PCR. El tejido de tilapia presenta la misma pureza que el tejido de machorra, debido que los tejidos son homologos en sus estructuras epiteliales de las aletas caudales.

El valor de $P = 0.82 > \alpha$, indica que no existe una diferencia significativa de la pureza de ADN obtenido entre los tejidos de aleta de tilapia y machorra.

6.3. Integridad del ADN.

Comparación de la integridad del ADN extraído con fenol-cloroformo vs. el ADN extraído con sal común de tilapia.

El ADN extraído del tejido de tilapia usando ambos protocolos se encuentra bastante íntegro (Figura No. 6). La banda de correspondiente al ADN genómico se logra observar bastante marcado. La integridad es adecuada para ser utilizado como ADN molde en la técnica de PCR. También se logra observar altas cantidades de ARN de la extracción.

En el protocolo de fenol-cloroformo se puede observar las bandas de ARN bien marcadas, lo que indica que en el protocolo de sal común el ADN extraído se encuentra más contaminado por las proteínas residuales de la extracción. Debido a que las proteínas residuales se rompen dejando fragmentos de todos tamaños, se observa como resultado un barrido constante en el gel.

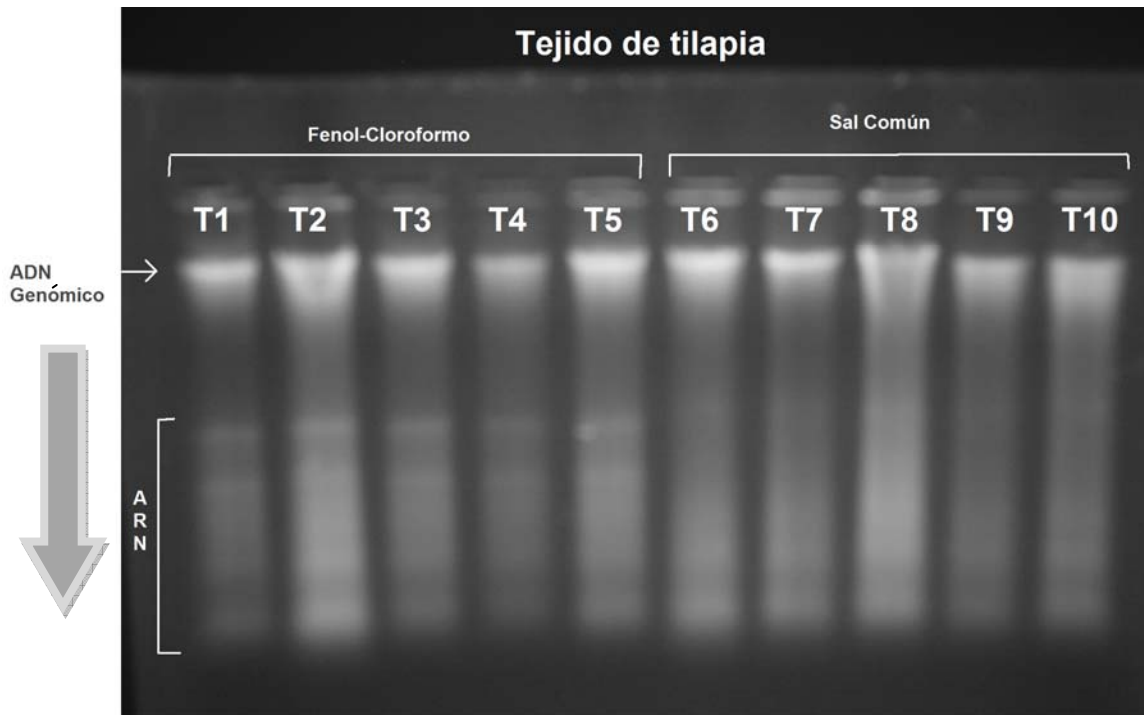


Figura No. 6. Comparación de la integridad, fenol-cloroformo vs. Sal común de ADN obtenido de tilapia (Trabajo de campo, 2009)

Comparación de la integridad del ADN extraído con fenol-cloroformo vs. el ADN extraído con sal común de machorra.

El ADN extraído del tejido de machorra para ambos protocolos se encuentra bastante integro (Figura No. 7). El ADN genómico se logra observar bastante marcado. La integridad es adecuada para ser utilizado como ADN molde en la técnica de PCR. Sin embargo, también se logra encontrar gran cantidad de ARN de la extracción.

En el ADN extraído de machorra con fenol-cloroformo se pueden observar las bandas de ARN mejor marcadas (Figura No. 7), lo que indica que en el protocolo de sal común se encuentra más contaminado por las proteínas residuales de la extracción. Debido a que las proteínas residuales se rompen dejando fragmentos de todos tamaños, se observa como resultado un barrido constante en el gel.

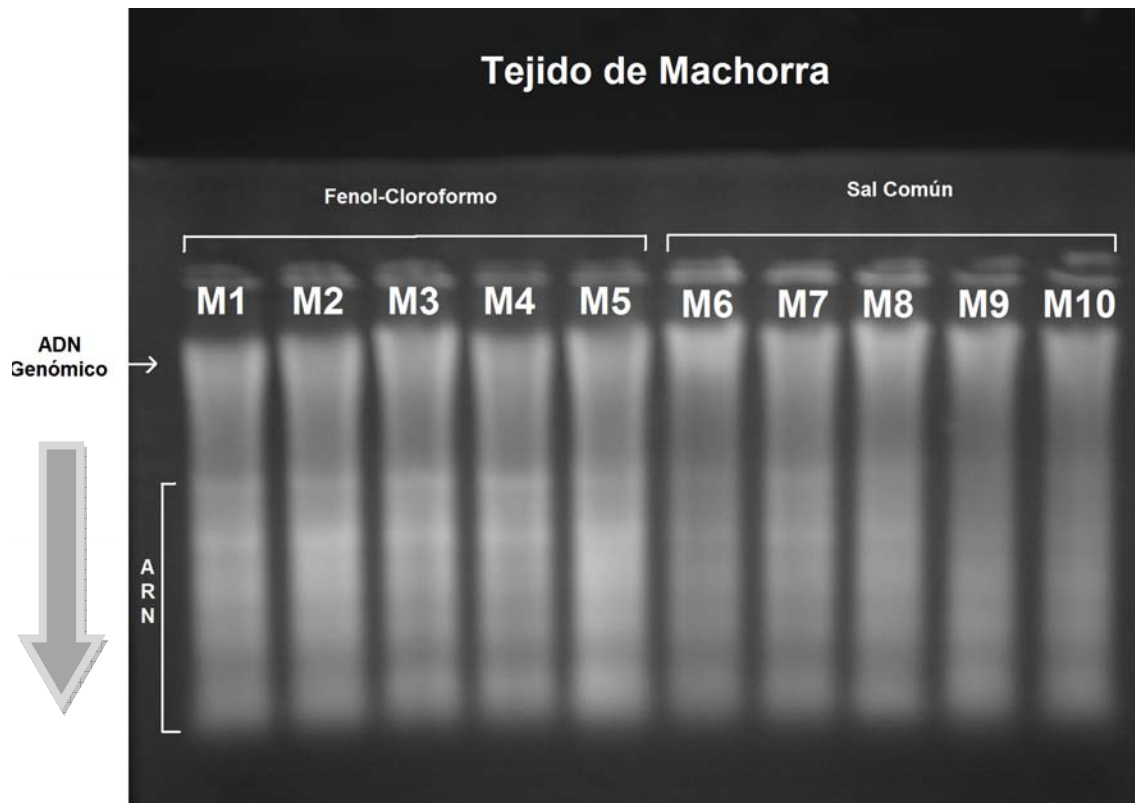


Figura No. 7. Comparación de la integridad, fenol-cloroformo vs. Sal común de ADN obtenido de machorra (Trabajo de campo, 2009)

La banda del ADN genómico se logra ver un poco arrastrada y el barrido del ARN bien marcado, lo que se debe a que la cantidad de ADN y ARN extraído que se logra de tejido de machorra es mayor a la que se obtiene del tejido de tilapia.

La integridad del ADN extraído entre de tilapia y machorra no tiene ninguna diferencia significativa, en ambos tejidos se logra la misma integridad.

6.4. Evaluación de tiempo de trabajo.

El tiempo de extracción de ADN se calculó para 10 muestras de tejido para cada protocolo. Siendo el protocolo de sal común el de menor duración.

Tiempo estimado para la extracción de ADN del protocolo de sal común (Cuadro No. 1).

Cuadro No. 1. Tiempo estimado para protocolo de sal común.

Paso	Actividad	Tiempo
Paso 1	Preparación de muestras de aletas de peces.	30 min
Paso 2	Adición de solución tampón de lisis, SDS y	20 min
Paso 3	proteínasa K.	12 horas
Paso 4	Incubación en un baño termoregulado a 50°C por 12 h.	40 min
Paso 5	Lavado de NaCl 5M a cada muestra antes de centrifugar por 10 min a 12000 rpm.	15 min
Paso 6	Transferencia a micro-tubos nuevos, donde se	2 horas
Paso 7	precipitó el ADN con etanol absoluto frío.	45 min
Paso 8	Incubación a -20°C por 2 h. Centrifugación, lavado con de etanol 70% Resuspensión en Buffer TE	15 min
	Total	16 horas 45 min.

Fuente: Trabajo de campo, 2009

El total del tiempo para realizar la extracción con el protocolo de sal común es de 16 horas con 45 minutos para 10 muestras de aletas de peces.

Tiempo estimado para la extracción de ADN del protocolo de fenol-cloroformo (Cuadro No. 2).

Cuadro No. 2. Tiempo estimado para protocolo de fenol-cloroformo.

Paso	Actividad	Tiempo
Paso 1	Preparación de muestras de aletas de peces.	30 min
Paso 2	Adición de solución tampón de lisis, SDS y	20 min
Paso 3	proteínasa K.	12 horas
Paso 4	Incubación en un baño termoregulado a 50°C por 12 h.	2 horas
Paso 5	Purificación con dos lavados separados de fenol (250 µL) y tres lavados separados de cloroformo	20 min
Paso 6	(250 µL).	2 horas
Paso 7	Transferencia a micro-tubos nuevos, donde se	45 min
Paso 8	precipitó el ADN con etanol absoluto frío y acetato de sodio. Incubación a -20°C por 2 h. Centrifugación, lavado con de etanol 70% Resuspensión en Buffer TE	15 min
	Total	19 horas 10 min.

Fuente: Trabajo de campo, 2009

El total del tiempo para realizar la extracción con el protocolo de fenol-cloroformo es de 19 horas con 10 minutos para 10 muestras de aletas de peces.

Como se puede observar el protocolo de sal común se realiza en un total de 16 horas 45 minutos y el de fenol-cloroformo en 19 horas 10 minutos. Dando una diferencia de 2 horas 20 minutos, por lo que es más rápido el protocolo de sal común.

6.7. Análisis de costos

Los protocolos de fenol-cloroformo y el de sal común, utilizan los mismos insumos y reactivos, únicamente varían en el fenol, cloroformo y NaCl (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Costos estimados de insumos variantes en protocolos.

Insumos	Cant.	Fenol-cloroformo		Cant.	Sal común	
		Costo total	Costo por muestra		Costo total	Costo por muestra
Fenol	1 kg	Q2,000.00	Q2.00			
Cloroformo	4 L	Q2,700.00	Q0.68			
NaCl				500 g	Q170.00	Q0.17
		Total	Q2.68		Total	Q0.17

Fuente: Trabajo de campo, 2009

El costo actual (junio, 2009) de un frasco de 1 kg de fenol grado molecular es de Q2,000.00, el cual alcanza para 1000 extracciones. Dando esto un costo de Q 2.00 por extracción.

El costo actual (junio, 2009) de un frasco de 4 litros de cloroformo grado molecular es de Q2,700.00, el cual alcanza para 4,000 extracciones. Dando esto un costo de Q 0.68 por extracción.

El costo total del fenol y el cloroformo es de Q2.68, por extracción.

El costo actual (junio, 2009) de un frasco de 500 gramos de NaCl grado laboratorio es de alrededor de Q170.00, el cual alcanza para 1000 extracciones. Dando esto un costo de Q0.17 por extracción.

El costo total del NaCl es de Q0.17, por extracción.

La diferencia del costo de protocolo de fenol-cloroformo y el de NaCl es de Q2.51 por extracción. Siendo el protocolo de sal común el más económico.

VIII. CONCLUSIONES

- En cuanto a cantidad el protocolo de sal común puede ser sustituido por el protocolo de fenol-cloroformo, para obtener altas concentraciones de ADN en muestras de aletas de peces.
- En cuanto a calidad el protocolo de sal común no puede ser sustituido por el protocolo de fenol-cloroformo, para obtener ADN de buena calidad en muestras de aletas de peces. Las extracciones con el protocolo de sal común muestran proteínas residuales que no son eliminadas por completo, por lo que se considera sucio, aunque se logren buenas cantidades de ADN.
- El protocolo de sal común puede ser sustituido por el protocolo de fenol-cloroformo dependiendo de la naturaleza del estudio que se desea realizar, según las características de pureza y concentración del ADN deseado.
- Existe una diferencia significativa entre las cantidades de ADN obtenido de las aletas de *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*. Logrando mayores concentraciones y menor variación en las aletas de *Atractosteus tropicus*, debido que los tejidos de las aletas caudales de la tialpia son mas irregulares y más delgados que los tejidos de las aletas caudales de la machorra.
- La integridad del ADN genómico para ambos protocolos y ambas especies es adecuado para ser utilizado como ADN molde en la técnica de PCR.

- La calidad (pureza) de ADN lograda con ambos protocolos es baja. Siendo el protocolo de fenol-cloroformo el que presenta mejor calidad debido a los repetidos lavados de fenol y cloroformo que eliminan mejor las proteínas y enzimas durante la purificación.
- No existe una diferencia significativa entre la pureza de ADN obtenido de las aletas de *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*. Ambos tejidos demuestran ADN extraído con baja pureza, y podrían tener interferentes en la técnica de PCR. El tejidos de *Oreochromis niloticus* presenta la misma pureza que el tejido de *Atractosteus tropicus*, debido que los tejidos son homólogos en sus estructuras epiteliales de las aletas caudales.
- Para realizar la extracción de ADN de 10 muestras de aletas de peces, el protocolo de fenol-cloroformo requiere de 2 horas más de trabajo y es Q2.51 más costoso que el protocolo de sal común. Pero es más eficiente, debido a que se obtiene ADN mas limpio, sin interferentes para la técnica de PCR.

IX. RECOMENDACIONES

- Para observar mejor la integridad del ADN genómico es necesario tratar las extracciones con una ARNasa, para lograr ver en el gel únicamente el ADN genómico.
- En el protocolo de fenol-cloroformo se debe realizar un lavado más de fenol y otro de cloroformo, para lograr una relación de absorbancia 260/280 nm de pureza óptimo de 1.8.
- El protocolo de sal común puede ser utilizado como una práctica para los estudiantes del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura –CEMA–, debido a que es más económico y requiere de menos tiempo.
- Continuar con la investigación del diseño de marcadores moleculares y micro satélites de estas especies, para realizar estudios filogenéticos.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Aljanabi, SM; Martinez, I. 1997 Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
2. Aranishi, F. 2006. Single fish egg DNA extraction for PCR amplification. *Conservation Genetics* 3:7153-156.
3. Bardakci, F; Skibinski, DOF. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73:117-123.
4. Botanical-online SL, ES. 2009. El mundo de las plantas: El sodio (en línea). España, Botanical. Consultado 3 nov. 2009. Disponible en <http://www.botanical-online.com/medicinalssodio.htm>
5. Centre for Ecological Sciences, IN. 2009. Cloroformo (en línea). Bangalore, IN. Consultado 15 may. 2009. Disponible en <http://ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol315.htm>
6. Chakraborty, A; Sakai, M; Iwatsuki, Y. 2006. Museum fish specimens and molecular taxonomy: a comparative study on DNA extraction protocols and preservation techniques. *Journal of Applied Ichthyology* 22:160-166.
7. Enciclopedia Microsoft® Encarta®, US. 2009. Biología molecular (en línea). Estados Unidos, Microsoft Corporation. Consultado 25 oct. 2009. Disponible en:

http://es.encarta.msn.com/text_961519624___8/Biolog%C3%ADa_molecular.html

8. Étienne, J. 2001. Bioquímica genética, biología molecular. Ácidos nucleicos, Algunas técnicas generales de biología molecular 1: 3, 356-357
9. Liu, ZJ; Cordes, JF. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238:1-37
10. Londoño, IE. 2009. Como extraer ADN (en línea). España, El Portal de la Salud. Consultado 3 nov. 2009. Disponible en http://www.elportaldelasalud.com/index.php?option=com_content&task=view&id=127&Itemid=147
11. Lopera-Barrero, NM; Ribeiro, RP; Sirol, RN; Povh, JA; Gomes, PC; Vargas, L; Streit, DR. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. *Journal Animal Science* 84: 170.
12. Lopera-Barrero¹, NM; Povh, JA; Ribeiro, RP; Gomes, PC; Jacometo, CB; Silva Lopes, Tda. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. Brazil, Universidade Estadual de Maringá. 1:10.
13. Nam, YK; Park, JE; Kim, KK; Kim, DS. 2003. A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Research* 12: 523-525

14. Universidad Autónoma de Baja California, MX. 2007. Cuantificación de ADN (en línea). Tijuana, MX. Consultado 15 may. 2009. Disponible en <http://alpha.rec.uabc.mx/dgaa/matdidac2/biologia/molecular/practicas/cuantificacion.htm>
15. Universidad de la República, UY; Instituto de Ingeniería Eléctrica, UY. 2009. Electroforesis de moléculas de ADN (en línea). Montevideo, UY. Consultado 15 may. 2009. Disponible en <http://iie.fing.edu.uy/investigacion/grupos/gti/timag/trabajos/2006/electroforesis/>
16. Universidad de Puerto Rico. 2009. Laboratorio # 10, Extracción de ADN (en línea). Mayagüez, PR. Consultado 15 may. 2009. Disponible en <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/extracciondna.htm>
17. Wasko, AR; Martins, C; Oliveira, C; Foresti, F. 2003. Nondestructive genetic sampling in fish: an improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138:161-165.
18. Weber, LR; Higgins, PS; Carlson, LI; Janz, DM. 2003. Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indices of condition in juvenile fishes. *Journal of Fish Biology* 63:637-658.
19. Yue, GH; Orban, L. 2001. Rapid Isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. *Marine Biotechnology* 3:199-204.

