

ESTUDIO ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS MUSCULARES DE ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO RAJA (RAJIFORMES, RAJIDAE) (1)

par

T. Munilla y J. Matallanas

Dpto. de Zoología de la Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España.

Résumé

Les auteurs ont réalisé une étude électrophorétique des protéines musculaires de six espèces du genre *Raja*. Chaque espèce présente un électrophorégramme et une courbe densimétrique caractéristiques et distinctes les unes des autres. Cette technique a permis de différencier avec clarté trois espèces (*R. polystigma*, *R. montagui*, *R. brachyura*), douteuses et souvent confuses dans la littérature.

Introduction

La mayor parte de los autores que se han ocupado del estudio de la Familia Rajidae, han dejado constancia de la dificultad que entraña la determinación de algunas de sus especies. Por lo que se refiere a las especies mediterráneas del género *Raja*, las más problemáticas, desde nuestro punto de vista, son *R. polystigma* Regan, *R. montagui* Fowler y *R. brachyura* Lafont, por haber sido frecuentemente confundidas en la literatura con otras especies del género o, incluso, entre ellas mismas. Las diagnósis, de las diferentes especies del género, se basan a menudo en caracteres morfológicos, biométricos y de coloración que, la mayoría de las veces, varían con la edad y con el sexo de los individuos (Quignart, 1965).

El objeto inicial de nuestro trabajo era la aplicación de técnicas electroforéticas a ejemplares pertenecientes a las tres especies, ya mencionadas, consideradas como de más difícil identificación utilizando los métodos taxonómicos clásicos (Bini, 1967; Clark, 1926; Dieuzeide, Novella y Rolland, 1950; Lafont, 1873; Lozano y Rey, 1928; Regan, 1923,...). Posteriormente hicimos extensivas dichas técnicas al estudio de otras especies. Se pretende, en definitiva, el establecimiento de un patrón electroforético que permita distinguir claramente las especies estudiadas.

(1) Trabajo realizado en el Instituto de Investigaciones Pesqueras de Blanes (Gerona).

Materiales y métodos

a - *Especies estudiadas.*

Se han estudiado seis especies: *R. polystigma* Regan, *R. montagui* Fowler, *R. brachyura* Lafont, *R. naevus* Müller y Henle, *R. clavata* Linné y *R. radula* Delaroche. Las tres últimas pueden ser fácilmente determinadas utilizando cualquiera de las claves al uso. Todas ellas pertenecen al grupo de las rayas de rostro corto y fueron capturadas en la plataforma continental de Blanes (Mar Catalana).

b - *Elección de la técnica electroforética.*

Se utilizó la técnica de electroforesis de disco (Ornstein, 1964; Davis, 1964) cuyo soporte es un copolimero que consta de Acrilamida y Biscrilamida (Arias, 1970).

c - *Aparatos y disoluciones.*

Los recipientes en los que se efectuó la separación proteica, y que llevan el soporte, eran tubos de vidrio abiertos por ambos lados, de 8 cm de longitud por 0.5 cm de diámetro interno y con un aforamiento a 5 cm de un extremo del tubo, con el fin de enrasar a ese nivel el líquido a polimerizar. El aparato en el que se realizó la electroforesis es el de Davis (1964). Tanto la preparación del gel como las disoluciones utilizadas en el proceso electroforético son, básicamente, las empleadas por Arias (1970, 1973).

La decoloración se consigue mediante una segunda electroforesis en cubetas de plástico, con electrodos colocados en los extremos, y utilizando como electrolito ácido acético al 7 p. 100.

La lectura de los geles o electroforegramas fué realizada en un Densitómetro Vitatron perteneciente al Instituto de Investigaciones Pesqueras de Barcelona.

d - *Preparación de la muestra.*

Inicialmente se hicieron dos pruebas para ver que concentración de muestra era la ideal. En la primera se tomaron 5 gramos de músculo blanco del lomo del pez, al que previamente se había quitado la piel, y se trituraron con 50 ml de agua destilada. Las bandas resultantes de esta primera prueba eran claras pero escasas en número y con poca concentración. En la segunda prueba se tomaron 4 gramos de músculo y se trituraron con 4 ml de agua destilada. El resultado fué que las bandas salieron muy teñidas debido a la gran concentración proteínica que poseían, llegando incluso a juntarse unas con otras, si bien el número de las mismas había aumentado. En vista de todo ello, resolvimos tomar 7 gramos de músculo y triturarlos con 50 ml de agua destilada, con lo que conseguimos mayor número de bandas que las veces anteriores y con la concentración adecuada para su lectura densitométrica.

El triturado se introdujo en un congelador a -16°C durante 20 horas con el objeto de eliminar la grasa y los residuos de músculo. Pasado este tiempo, se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 m (Arias, 1973). El sobrenadante, limpio de grasa, se mezcló, volumen a volumen, con sacarosa al 30 p. 100. Dicha mezcla constituyó la muestra a estudiar.

e - *Electroforesis propiamente dicha. Técnica seguida.*

Una vez efectuada la polimerización, se sacan los tubos de la estufa se les deja enfriar a temperatura ambiente y se vierte la muestra en los mismos; la cantidad de muestra elegida ha sido de 100 microlitros por tubo. Realizado esto, se acaban de llenar los tubos con el mismo electrolito empleado en las cubetas electroforéticas (Tris-Glicina), y se les añade unas gotas de azul de bromofenol al 0,001 p. 100 como indicador del frente de migración. No es necesario añadir a cada tubo el colorante mencionado, sino a uno solo en cada experiencia de la misma muestra, ya que en la cubeta superior se puede trabajar hasta con 12 tubos a la vez. Cuando se observa que el Azul de Bromofenol llega hasta el final del tubo (que lo lleva como indicador) se interrumpe la corriente. Es aconsejable no tener en cuenta dicho tubo indicador, o al menos su última banda, porque la franja de colorante podría confundirse con la prealbúmina; en consecuencia, como mínimo, las muestras tienen que ser duplicadas. Acto seguido se conectan los electrodos a la fuente de alimentación, con una intensidad de 5 m.a./tubo. El tiempo de corrida electroforética oscila entre 90 y 100 minutos.

Al término de la electroforesis se procede a la extracción del polímero gelificado con ayuda de una varilla muy fina, que se utiliza para separar el gel de la pared del tubo de vidrio. Para finalizar la extracción se insufla aire, por un extremo, con una pera de goma.

La siguiente operación es la tinción del polímero durante una hora con Amido-Schwartz 10B al 1 p. 100, diluido en ácido acético al 7 p. 100.

La decoloración se efectúa cubriendo los geles con ácido acético al 7 p. 100, dentro de una cubeta de plástico, e iniciando una segunda electroforesis con un miniamperaje de 120 m.a. (hasta la completa transparencia del gel), pero con la precaución de que haya un flujo de acético para que el pH no varíe como consecuencia del calentamiento del electrolito. Es aconsejable orientar los geles perpendicularmente a la dirección de emigración electroforética para evitar la difusión de las bandas proteínicas.

Para conservar el polímero, acabarlo de decolorar (si fuera preciso) y efectuar la lectura de « visu » de las bandas proteínicas cómodamente, se colocan los geles en los tubos apropiados conteniendo acético al 7 p. 100. La lectura visual es conveniente realizarla encima de un transiluminador. La lectura densitométrica se efectuó en un Vitratrón, cedido amablemente por el Instituto de Investigaciones Pesqueras de Barcelona.

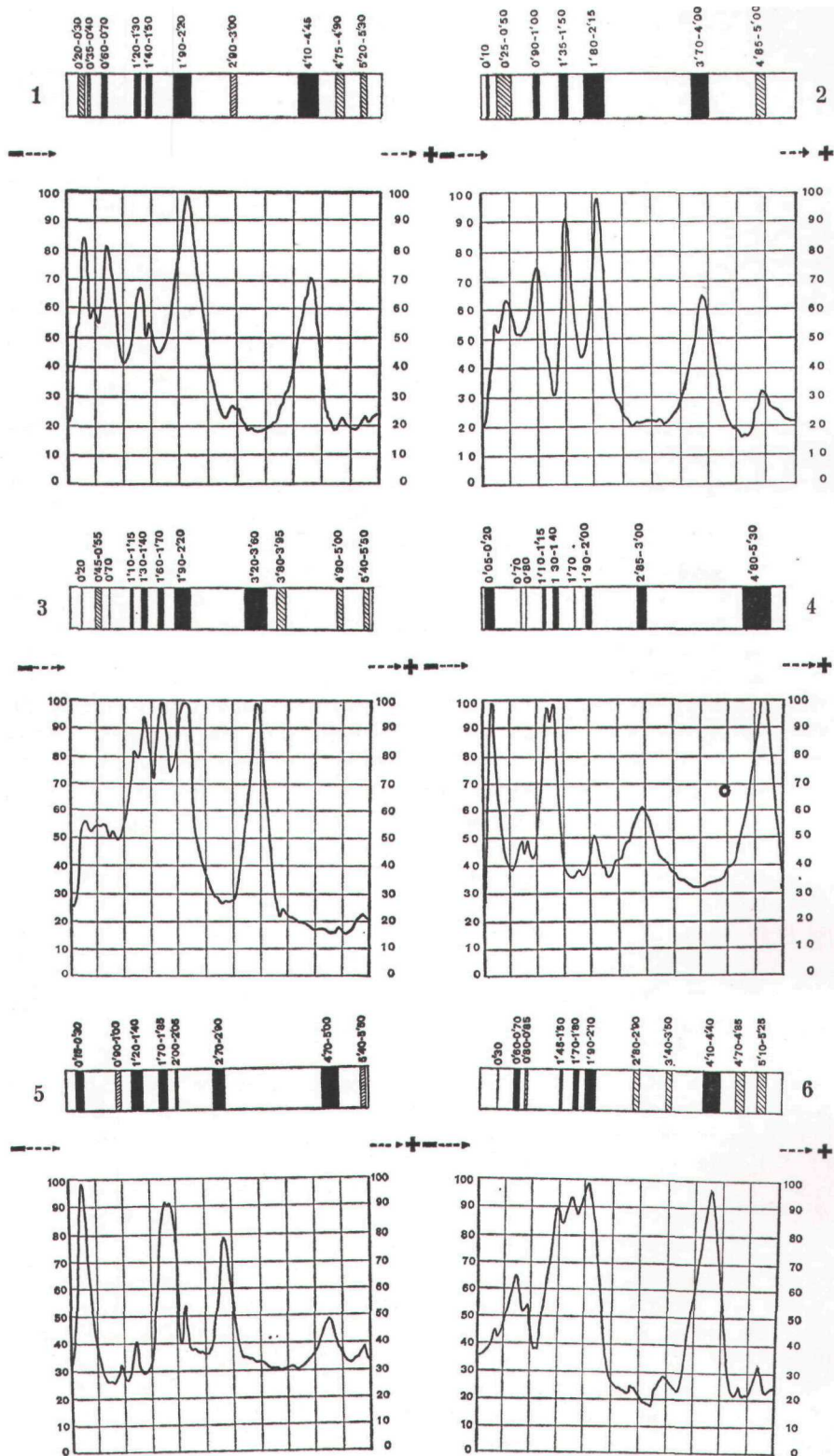


FIG. I

Resultados

Se han obtenido electroforegramas y curvas densitométricas característicos de las distintas especies estudiadas, y cuyos esquemas adjuntamos (Fig. I, II).

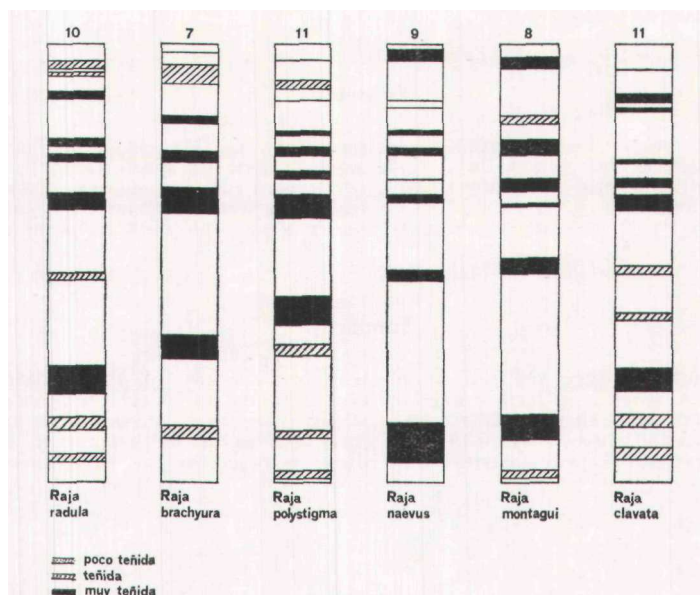


FIG. II

Electroforegramas comparados de las seis especies estudiadas. El número de cada columna corresponde al de bandas.

Conclusiones

a - El método utilizado en este trabajo tiene aplicación práctica para la diferenciación e identificación de especies.

b - Cada una de las especies estudiadas posee un electroforegrama y una curva densitométrica característicos y diferentes de los de las demás especies.

c - Las dificultades existentes para la determinación correcta de *R. polystigma* Regan, *R. montagui* Fowler y *R. brachyura* Lafont, basándose en caracteres morfológicos, quedan solventadas al obtenerse electroforegramas particulares en cada una de ellas.

FIG. I

- 1 - Curva densitométrica y electroforegrama de *Raja radula* Delaroche.
- 2 - Curva densitométrica y electroforegrama de *Raja brachyura* Lafont.
- 3 - Curva densitométrica y electroforegrama de *Raja polystigma* Regan.
- 4 - Curva densitométrica y electroforegrama de *Raja naevus* Müller y Henle.
- 5 - Curva densitométrica y electroforegrama de *Raja montagui* Fowler.
- 6 - Curva densitométrica y electroforegrama de *Raja clavata* Linné.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Rubió, Director del Acuario de Blanes (Gerona), el habernos cedido sus laboratorios durante el desarrollo de este trabajo; al Dr. Arias, Investigador del Instituto de Investigaciones Pesqueras de Barcelona, el permitirnos efectuar las lecturas densitométricas. Expresamos nuestra gratitud a los pescadores Srs. Anselmo y Carpin, de Blanes, que nos proporcionaron los ejemplares estudiados.

Resumen

Se ha realizado un estudio electroforético de las proteínas musculares de seis especies del género *Raja*. Cada especie tiene un electroforegrama y una curva densitométrica característicos y diferentes de las demás. Esta técnica nos ha permitido diferenciar, con claridad, a tres especies (*R. polystigma*, *R. montagui* y *R. brachyura*) problemáticas y a menudo confundidas en la literatura.

Summary

The authors have realized an electrophoretic study of the muscular proteins in six species of *Raja*. Each species presents an electrophoregram and a densimetric curve characteristic and distinct from each other. This technique has allowed the clear differentiation of three species (*R. polystigma*, *R. montagui* and *R. brachyura*) problematical and often confused in the literature.

BIBLIOGRAFIA

- ABUS, E., 1970. — Método de electroforesis para la identificación de especies de peces y su aplicación a la diferenciación de *Diplodus vulgaris*, *D. sargus* y *D. annularis*. *Inv. Pesq.* 34 (2), pp. 203-213.
- ARIAS, E., 1973. — La electroforesis de disco en la identificación de peces y de pescado de grado fresco. *Publ. Tec. Patr. J. Cierva*, 2.
- BINI, G., 1967. — Atlante dei pesci delle coste italiane. I : Leptocardi, Ciclostomi, Selaci. *Mondo Sommerso*. Milano.
- BOYDEN, A., 1973. — Perspectives in Zoology. Pergamon Press.
- CLARK, R.S., 1926. — Rays and Skates, a revision of the european species. *Fish. Scotland Scient. Invest.* 1, pp. 1-66.
- DAVIS, J.B., 1964. — Disc electrophoresis. I: Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, pp. 321-349.
- DIEUZEIDE, R., NOVELLA, M. et ROLLAND, J., 1950. — Catalogue des poissons des côtes algériennes. I : Squales, Raies, Chimères. *Bull. Trav. Stat. Aquic. Pêche Castiglione*, n.s. 4, pp. 9-135.
- CORDON, A.H., 1972. — Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. T.S. Work. North Holland.
- LAFONT, A., 1873. — Description d'une nouvelle espèce de Raie. *Raja brachyura* Lafont. *Act. Soc. Linn. Bordeaux*, 28 (3), pp. 503-504.
- LOZANO Y REY, L., 1928. — Fauna Ibérica. Peces (Generalidades, Ciclóstomos y Elasmobranquios). *Mus. Nac. Cien. Nat. Madrid*, 1, pp. 1-692.
- NEREMBERG, M.D., 1968. — Electroforesis. Manual práctico de laboratorio. Jims. Barcelona.
- ORNSTEIN, L., 1914. — Disc electrophoresis. II : method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, pp. 404-427.
- QUIGNART, J.P., 1965. — Les raies du Golfe du Lion. Nouvelle méthode de diagnose et d'étude biogéographique. *Rapp. Comm. Int. Mer Méditerranée*. XVIII (2), pp. 211-212.
- REGAN, T., 1923. — A new ray from the Mediterranean. *Ann. Mag. Nat. Hist.* XI (IX ser.), pp. 529-530.