



Marcadores moleculares

Desde la prehistoria, el hombre ha mejorado especies vegetales, animales y microbianas basándose en la selección de los mejores fenotipos (ver Cuaderno n° 5, 39). El mejoramiento tradicional de las especies, fue posible gracias a varios factores tales como, la variabilidad genética existente entre los organismos, la eficacia e intensidad de la selección aplicada, el tiempo necesario para realizar un ciclo de selección y la heredabilidad del carácter que se quería aislar, es decir qué porcentaje de las diferencias encontradas en un cierto carácter, entre los individuos de una determinada población, se debe a diferencias en sus genes.

Sin embargo, aún quedan muchas preguntas por responder: ¿cuántos genes están implicados en la expresión de un carácter?, ¿cuál es el efecto de estos genes?, ¿cuál es su localización y su función fisiológica? (ver Cuaderno n°, 40, 41)

Históricamente, la taxonomía (o clasificación de organismos) ha estudiado características fenotípicas, los cuales se evalúan mediante marcadores morfológicos. Estos marcadores tienen la desventaja de que son limitados en número (las características a medir no son infinitas), se deben medir en cierta etapa del crecimiento y pueden estar influenciados por el ambiente. Así, los criterios utilizados podrían carecer, en algunos casos, de definición y objetividad.

Con el advenimiento de la biología molecular (ver Cuaderno n° 65), el desarrollo de los marcadores moleculares está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva.

Los marcadores moleculares y los marcadores genéticos

Una serie de técnicas moleculares de gran desarrollo en los últimos treinta años permite conocer la información genética que poseen los organismos. Se las conoce con el nombre de **marcadores moleculares** y funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma. Los marcadores se usan para el mapeo genético, como el primer paso para encontrar la posición e identidad de un gen.

Son ampliamente utilizados en estudios de genética humana, vegetal, animal y microbiana. Los marcadores moleculares permiten evidenciar variaciones (**polimorfismos**) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen estas o no su fenotipo. Esto se debe a que los marcadores moleculares “señalan” tanto regiones codificantes como no-codificantes del genoma.

Un **marcador genético** es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Para que una

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



porción de ADN ligada al carácter de interés sea considerado un **marcador genético** debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de la población, y un modo de herencia predecible según las leyes de Mendel (Ver Cuadernos N° 40 y 41).

Esta variación puede ser considerada a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos, hasta la variación de un solo nucleótido en la secuencia de ADN (ver Cuadernos N° 3, 4, 20, 32).

Un marcador ideal debe ser:

- altamente polimórfico o variable dentro y entre especies,
- de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes),
- insensible a los efectos ambientales,
- de rápida identificación y simple análisis
- de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo.

Tipos de marcadores genéticos

En los análisis genómicos, se han utilizado varios tipos de marcadores: morfológicos, isoenzimas, proteínas y marcadores basados en ADN.

1. Marcadores morfológicos

Son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura. Muchos de ellos se convierten en importantes “descriptores”, a la hora de inscribir nuevas variedades. Por ejemplo, alrededor de 50 caracteres de plántula, tallo, hoja, espiga, espiguilla y cariopse se utilizan para inscribir e identificar variedades de trigo en la Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación (SAGPyA).

Como se describió anteriormente, los marcadores morfológicos presentan algunas limitaciones, no obstante permanecen como caracteres útiles en la identificación de materiales dado que representan un conjunto de caracteres que pueden ser evaluados con métodos sencillos y a bajo costo.

2. Isoenzimas

Se definen como diferentes formas moleculares de un tipo de enzima, que poseen una actividad catalítica común, es decir actúan sobre el mismo sustrato. Ciertos cambios en la secuencia de ADN (mutaciones) que codifica para estas enzimas pueden resultar en cambios en la composición de aminoácidos. Si estos cambios se producen, las proteínas podrían tener la misma actividad biológica, pero como su composición de aminoácidos varía, podrían tener diferente carga neta y por tanto diferentes velocidades de migración en un campo eléctrico. Estas diferencias determinan patrones característicos de migración electroforética de las formas iso-enzimáticas (ver Cuaderno n° 67, 34). Las enzimas que se utilizan en estos estudios se clasifican de acuerdo a su función y se representan con una sigla de tres letras. Por ejemplo:

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



- dehidrogenasas (alcohol dehidrogenasa ADH, glutamato dehidrogenasa GDH),
- oxidasas (peroxidasas PRX),
- hidrolasas (fosfatasa ácida ACP, esterasas EST),
- isomerasas (fosfoglucoisomerasa PGI)
- transferasas (fosfoglucomutasas PGM).

Las isoenzimas han tenido un rol prominente en estudios de poblaciones vegetales para determinar variabilidad y estructura genética, sistemática y biología evolutiva así como en descripción de germoplasma e identificación de variedades.

3. Proteínas de reserva

El endosperma de los cereales es el principal componente de la semilla ya que representa aproximadamente el 80-90% de su peso seco. Almidón y proteínas son las dos macromoléculas más importantes. El contenido de proteína varía según la especie, por ejemplo, los valores más altos se dan en trigo y avena (10-17%) y los más bajos en maíz y arroz (6%). La concentración de proteínas en los cereales es apreciablemente menor que en las leguminosas ya que en éstas los órganos de reserva o cotiledones son capaces de almacenar hasta un 40% de su peso seco en proteínas.

Las proteínas del endosperma fueron estudiadas ya a comienzos del siglo pasado por el químico Osborne (Metodología de Osborne & Mendel), quien dio las bases para las clasificaciones actuales. La misma se basa en la solubilidad relativa en diferentes solventes: albúminas solubles en agua, globulinas en solución salina, prolaminas en alcohol y glutelinas en ácidos o álcalis. El uso de proteínas de almacenamiento en estudios de diversidad genética sistemática, se basa en el hecho que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes. Debido a que las proteínas de reserva carecen de actividad enzimática, ellas son detectadas en el gel por medio de técnicas generales de tinte.

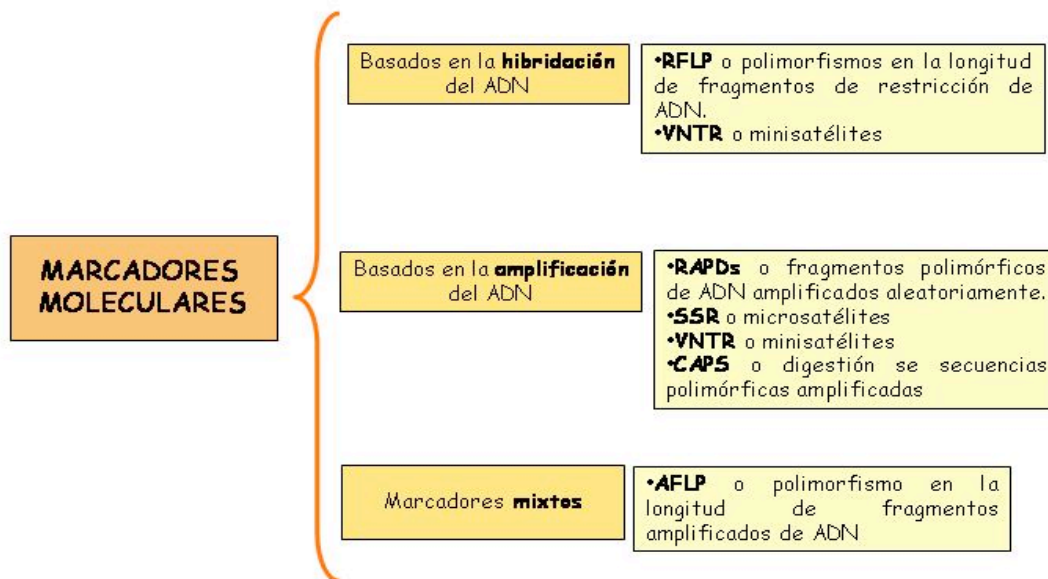
4. ADN y marcadores moleculares

Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen.

Existen diversas técnicas de biología molecular disponibles para detectar variabilidad en la secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas y las hibridaciones (Ver Cuadernos 34 y 67) son algunas de las técnicas que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares. y cubrir la totalidad del genoma de un organismo.

Los marcadores moleculares pueden ser clasificados en tres grupos:

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Grupo 1: Marcadores basados en la **hibridación** del ADN

Estos tipos de marcadores involucran la detección de un segmento específico (marcador) en el ADN de estudio por hibridación con un fragmento marcado radiactivamente de secuencia complementaria al marcador (sonda). Esto implica que el investigador que busca estudiar un gen de interés, debe conocer al menos una parte de su secuencia, para poder construir una porción complementaria (sonda) que permita “pescar” a ese gen de interés (Ver cuaderno 67). Dentro de este grupo de marcadores se encuentran los RFLP y los VNTR o minisatélites.

La técnica de **RFLP** (*Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción*)

fue desarrollada a finales de los ‘70, y se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular en diferentes organismos. La técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce cantidades equimolares de fragmentos para una molécula de ADN dada. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana es hibridada con una sonda radioactiva. El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autoradiografía de rayos-X, de acuerdo al peso molecular de la banda.

Las secuencias de ADN de **minisatélites** (VNTR) son secuencias repetidas que se presentan en eucariontes. Ellas se encuentran repetidas en *tandem* (una detrás de la otra) y dispersas a través del genoma. Cada VNTR tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de esta manera un tamaño distinto a cada alelo. Existen dos formas de detectar los VNTR ya sea por

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

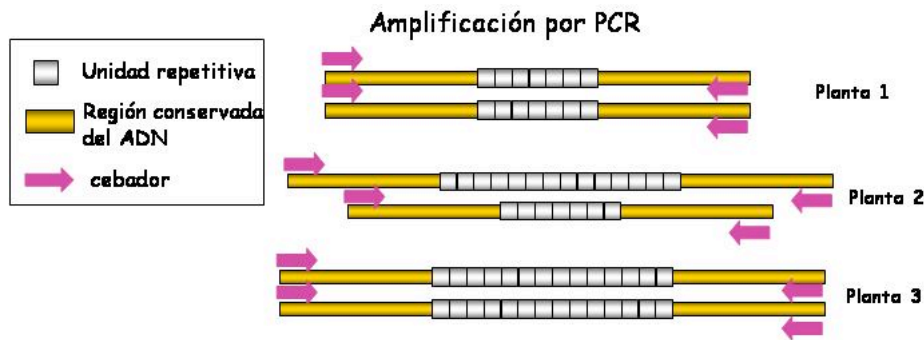
hibridación o por técnicas de PCR. (Para más detalles de estos marcadores moleculares, ver Cuaderno N° 69)

Grupo 2: Marcadores basados en la amplificación del ADN

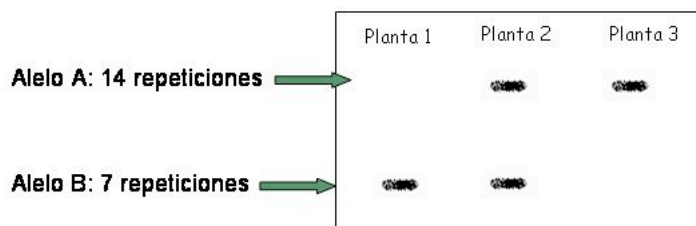
En este grupo se incluyen aquellos marcadores moleculares en los que se utiliza la reacción de PCR (polymerase chain reaction) o *reacción en cadena de la polimerasa* de ADN. Esta técnica se basa en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico de ADN (Ver cuaderno 67).

Son muchos los marcadores moleculares que están incluidos en este grupo, entre los que se encuentran los microsatélites o SSR, los RAPDs y CAPs.

Los **microsatélites** o **SSR** son los más ampliamente utilizados en estudios con marcadores moleculares, por ser una técnica relativamente sencilla y altamente reproducible. Se trata de regiones constituidas por repeticiones en *tandem* de unos pocos pares de bases (1 a 6). El polimorfismo de estas regiones está dado por los diferentes números de repeticiones, dando fragmentos amplificados por PCR de distinto tamaño. Aquellos alelos con mayor número de repeticiones, tendrán un tamaño mayor y correrán más retrasados en una corrida electroforética.



Visualización del polimorfismo



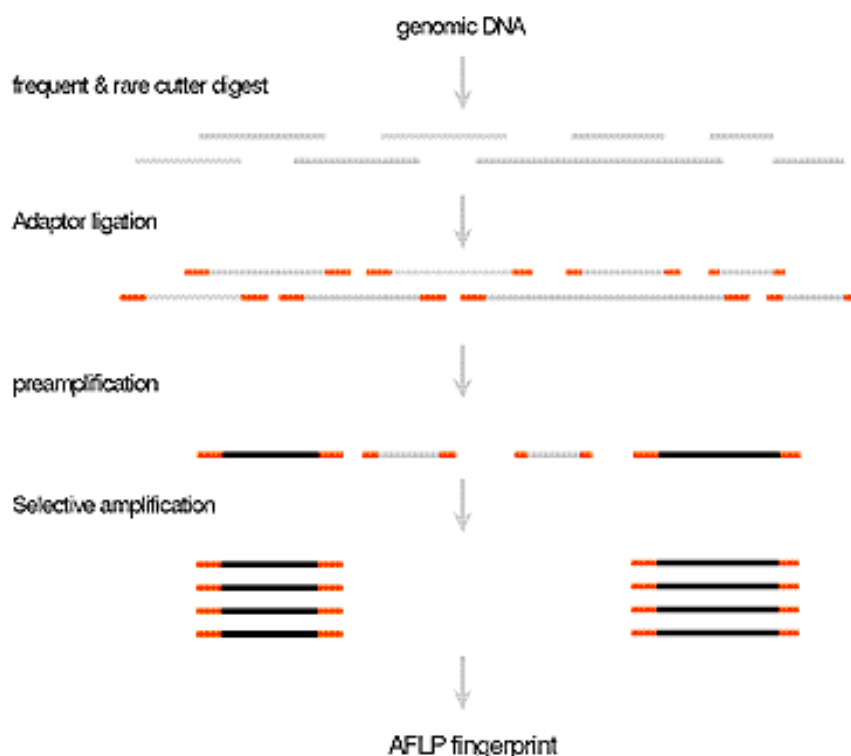
Marcador SSRR – Fuente: ArgenBio

Grupo 3: Marcadores mixtos

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

Son aquellos que resultan de la combinación de otros tipos de marcadores moleculares. Entre ellos se encuentran los AFLP, unos de los más utilizados en estos tipos de estudios.

AFLP consiste en amplificar en forma selectiva fragmentos de ADN cortados con enzimas de restricción. El ADN de las individuos a analizar se corta con dos enzimas de restricción distintas y luego se le ligan “adaptadores” a los extremos de los fragmentos de ADN resultantes de dicha digestión, que permite que se amplifiquen en forma selectiva algunos de esos fragmentos que tienen las bases suplementadas a los cebadores o *primers* utilizados. La separación de estos fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida genera entre 50 y 100 fragmentos. La ventaja de este método radica en que se puede analizar, en un solo ensayo, un gran número de regiones del genoma.



AFLP. Fuente:

<http://www.udel.edu/dnasequence/UDSGC/Images/figure1.gif>

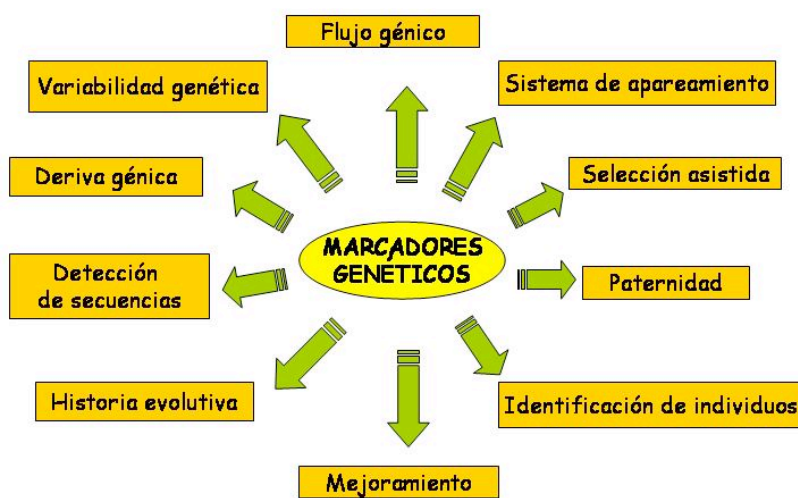
De la descripción realizada, se desprende que los marcadores varían ampliamente en el grado de complejidad del método, el nivel de polimorfismo y en los factores costo y tiempo, de gran importancia cuando los objetivos del estudio incluyen el análisis de un número elevado de individuos. Estos son algunos de los aspectos importantes a tener en cuenta a la hora de elegir el tipo de marcador a utilizar en una determinada investigación científica.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

Aplicaciones de los marcadores moleculares

Son múltiples las aplicaciones de los marcadores moleculares en el estudio de especies vegetales, animales, microbianas e incluso en el área de los alimentos. Algunas de ellas pueden observarse en la siguiente figura:

Utilización de los marcadores moleculares



Las herramientas descritas anteriormente se utilizan en numerosas áreas relacionadas con el mejoramiento vegetal y el análisis de la biodiversidad. A continuación se describen algunas de estas aplicaciones:

ü **Identificación de genotipos – Pureza varietal**

El control de la pureza varietal y la discriminación de variedades protegidas (es decir, registradas) requieren de una adecuada identificación de los materiales. Esta identificación se basa tradicionalmente en el uso de descriptores morfológicos y fisiológicos. Sin embargo, varios de los caracteres usados como descriptores presentan limitaciones en cuanto al número restringido de variantes, influencia ambiental y dependencia del estadio de desarrollo de planta. Como alternativa para resolver estos problemas, los polimorfismos moleculares de proteínas y ADN resultan de utilidad en la determinación de los criterios **DUS** (distinción, uniformidad y estabilidad). Se utilizan localmente como datos complementarios de los descriptores morfológicos y fisiológicos para el registro de los cultivares.

ü **Uso en bancos de germoplasma**

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Los marcadores moleculares permiten caracterizar las *accesiones* o muestras a ser incluidas en las colecciones, estudiar el proceso de domesticación, establecer relaciones filogenéticas y colaborar en la elección de las estrategias de conservación en los Bancos de germoplasma (ver cuaderno 89).

ü **Mapeo genético**

Un mapa genético de una especie muestra la distribución linear de un grupo de genes y marcadores en cada uno de los cromosomas que constituyen el genoma de un organismo. El objetivo es encontrar aquellos marcadores moleculares que estén “ligados” a un gen de interés (es decir, que estén lo suficientemente cerca como para que segreguen juntos en la meiosis). Así, si un marcador resulta estar genéticamente ligado a un gen que controla un carácter de interés agronómico, la selección de este marcador resulta en la selección indirecta del gen de interés. Este hecho constituye el fundamento del proceso denominado **selección asistida por marcadores moleculares (MAS)**, aplicado en el mejoramiento genético vegetal y animal. Cuanto más próximos estén el marcador y el gen en cuestión, más eficiente será la selección.

ü **Mapeo comparativo**

La comparación de mapas de ligamiento entre diferentes especies se denomina **mapeo comparativo**. Si un grupo de marcadores moleculares mantiene el orden y sus relaciones de ligamiento entre dos especies se dice que muestran **sintenia**. Diversos estudios en diferentes grupos taxonómicos mostraron una estrecha relación entre los genomas de las especies comprendidas dentro de cada grupo. Esto se ha observado, por ejemplo, entre especies pertenecientes a las *Solanáceas* (tomate, papa, pimiento), entre *Arabidopsis* y cultivos del género *Brassica*, y dentro de las gramíneas entre especies pertenecientes a la tribu *Triticeas* (trigo, cebada, centeno) así como entre especies pertenecientes a distintas subfamilias taxonómicas, tal el caso de arroz, maíz y sorgo.

ü **Distribución de la variabilidad genética en poblaciones naturales**

Las especies están constituidas por unidades más o menos aisladas denominadas *poblaciones*. Una especie vegetal raramente se extiende en forma continua e ininterrumpida. En general adopta una distribución en parches. El número de individuos en cada población, el modo reproductivo (autogamia-alogamia), las distancias entre poblaciones, el tipo de polinización (gravedad-anemófila-entomófila), la acción del hombre en la fragmentación del hábitat y el origen histórico (especies nativas-especies introducidas) determinan en conjunto una distribución de la variación genética propia de cada especie. Los proyectos destinados a la conservación de especies naturales, tienen como objetivo seleccionar poblaciones que formarán parte de las áreas protegidas, las cuales deberán contener la mayor diversidad genética posible de modo de asegurar el mayor potencial evolutivo (ver Cuaderno 89). Los marcadores moleculares permiten establecer la diversidad genética existente en estas poblaciones.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



ü Estimación del flujo génico

El flujo génico entre poblaciones vegetales ocurre mediante el movimiento de polen o de semillas. La morfología de semilla y polen, los mecanismos de dispersión, el tipo de polinización, etc., hacen que la contribución de estas dos vías al flujo total varíe de acuerdo a la especie. Los marcadores moleculares permiten cuantificar cada uno de estos procesos.

En resumen, en los últimos treinta años se produjeron grandes avances en biología molecular que permitieron el desarrollo de técnicas moleculares que admiten analizar en forma rápida y precisa el genoma de los seres vivos. A través de estas técnicas se obtuvieron gran cantidad de marcadores moleculares dispersos a lo largo de todo el genoma, se construyeron mapas genéticos de diversas especies, y se ubicaron genes de resistencia a enfermedades, plagas, etc. Los marcadores ligados a genes de interés agronómico se pueden utilizar para realizar selección genotípica temprana, en plántulas, y de esta manera se evita manejar cientos o miles de plantas en la selección fenotípica en invernáculo o a campo. La selección asistida por marcadores moleculares es una herramienta muy interesante para los planes de mejoramiento, ya que permite acelerar la selección y disminuir los costos en el manejo de grandes poblaciones de plantas.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

El tema que plantea este Cuaderno tiene un nivel de complejidad que requiere ciertos conocimientos de genética y biología molecular que se plantearon en Cuadernos anteriores, y se sugiere su lectura previa (entre ellos, los Cuadernos N° 3, 4, 32, 34, 40, 41, 67 y 89). A partir de esto, es posible la adaptación de los conceptos de este Cuaderno a la currícula escolar, desde dos puntos de vista. Por una parte, es posible estudiar las diferentes técnicas de marcadores moleculares, haciendo hincapié en la secuencia de ADN, sus variaciones, la posibilidad de amplificar el ADN, y las diferentes técnicas que se emplean para el aislamiento, separación e identificación de secuencias de ADN específicas. Este abordaje se adapta mejor en los años superiores, o en escuelas con especialización en ciencias.

Otro abordaje, que se puede encarar de forma más simple, y más aplicable al trabajo en el aula en la escuela secundaria, es enfocar el tema de marcadores moleculares tomando como eje su utilidad y aplicación (a partir del esquema que se muestra en el Cuaderno: **Utilización de los marcadores moleculares**). Por ejemplo, al estudiar en clase el tema de evolución, se puede reconocer el aporte de la genética y de las técnicas de marcadores moleculares en la identificación de especies ya extinguidas y su parentesco con especies actuales. Esto permite armar árboles genealógicos y reconocer las ramas que llevaron al desarrollo de determinada especie, a partir de otras antecesoras. Otra aplicación posible, es en la identificación de individuos, ya sea para análisis de filiación (paternidad) como para casos de identificación de parentesco de personas desaparecidas a partir del ADN de otros individuos. O, como se planteó en el Cuaderno N° 89, estas técnicas permiten conservar la biodiversidad, a partir de la recolección y cuidado de diferentes variantes en bancos de germoplasma.

En el Cuaderno se desarrollan algunas de las aplicaciones de estas técnicas, ligadas fundamentalmente a las especies vegetales, su identificación y mejoramiento. Se sugiere incursionar en las otras aplicaciones de estas técnicas mencionadas, mediante un trabajo de investigación en el cual los alumnos averigüen en qué consisten las otras aplicaciones de los marcadores moleculares. Por ejemplo, es posible buscar información acerca de casos de filiación, incluso es interesante la alternativa de entrevistar a algún especialista de instituciones u hospitales que cuentan con bases de datos genéticos, o que realizan este tipo de estudios. También se puede investigar la aplicación de estas técnicas para el estudio de la historia evolutiva de especies.

De este modo, sin abordar las técnicas en sus detalles más complejos es posible que los alumnos comprendan el alcance de estas técnicas en diferentes áreas de investigación.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



ACTIVIDADES

Actividad 1: Lectura y análisis de un artículo periodístico

Diario Clarín, 09/08/2008

La rural de Palermo: avances en tecnología ganadera

Ahora, los marcadores moleculares

En una jornada de Angus y el Instituto de la Carne, se detalló el potencial de esta tecnología para la producción cárnica.

La ganadería argentina está lejos de dejarse arrastrar por un marco institucional desfavorable y trabaja firmemente para producir carne de la mejor calidad. Prueba de esto son los avances en investigación genética que se han desarrollado durante los últimos años para seleccionar a los mejores reproductores.

A través del estudio de los genes, las Diferencias Esperadas entre Progenies (DEPs) y la observación fenotípica, se puede seleccionar a los mejores animales para lograr una mayor área de ojo de bife, menor cantidad de grasa dorsal o menor porcentaje de grasa intramuscular, entre otros aspectos. Pero la última característica de calidad carnicera que se sumó a las investigaciones es la ternera, un factor clave para la mayoría de los consumidores. La Asociación Argentina de Angus (AAA) y el Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA) presentaron en el marco de la Exposición Rural de Palermo un trabajo conjunto sobre los aspectos genéticos de la ternera y la presencia de este componente en la población de raza Angus, la primera en cantidad de animales en el país. La investigación consistió en analizar muestras de ADN de 303 toros Angus para determinar en ellos la frecuencia de marcadores moleculares de ternera.

El método tradicional para medir la ternera de la carne es el denominado "Warner-Bratzler", que consiste en cortar la carne con una guillotina al momento de la faena y medir la fuerza de corte en kilogramos. Esta no ha resultado una herramienta práctica para el mejoramiento del ganado, ya que implica matar al potencial toro padre haciendo reserva de semen o matar a los novillos y realizar una prueba de progenie de cuatro o cinco años. Gracias a los avances de la genética y la utilización de los marcadores moleculares, se evita la faena de ejemplares y se gana en tiempo y en costo.

Los marcadores moleculares de ternera son proteínas o ADN que se pueden identificar y caracterizar para definir un genotipo determinado. Para esta investigación se tomó como objeto a la Calpastatina 2959, la Calpaína 316, y la Calpaína 4751, tres enzimas que determinan el proceso de tiernización post mortem de la carne. El Dr. Horacio Guitou, responsable de la investigación, explicó que "hay muchos marcadores moleculares que son utilizados por las empresas, pero para este trabajo se eligió a estos tres porque fueron validados por al menos cinco universidades de los Estados Unidos."

La Calpaína degrada las proteínas de la fibra muscular una vez que muere el animal, y eso es lo que ablanda la carne. Hay animales con más enzimas de Calpaína que otros, y por eso hay diferencias en la ternera. La Calpastatina, por su parte, es la enzima encargada de regular la acción de la Calpaína.

Cada animal hereda de cada uno de sus progenitores una variante genética de cada marcador molecular que puede favorecer o no favorecer el proceso de tiernización. Es decir que cada animal puede ser homocigota para mayor ternera, homocigota para menor ternera o heterocigota en cada uno de los marcadores, y la combinación de los tres marcadores determina un genotipo de mayor o menor ternera. Eso es exactamente lo que busca registrar el estudio que llevan adelante el IPCVA y la AAA desde el año 2005.

Los primeros resultados de la investigación sirven como punto de partida para saber en dónde se encuentra la raza en materia de ternera. Entre los datos más destacables, el 8,7% de los toros analizados tiene las seis variantes genéticas (denominadas "alélicas") favorables a la ternera, y están transmitiendo a sus progenies el 100% de esas características. Además, hay un 21,8% de los toros padres con cinco alelos favorables, siendo éste el genotipo más común. Estos animales también transmitirán a su descendencia características genéticas favorables a la ternera.

Estos datos aportan elementos de juicio para mejorar las razas y optimizar la calidad del producto final a través de la selección de los mejores ejemplares.

Según Alfredo Gusmán, presidente de la AAA, "aunque la situación de la ganadería argentina no sea favorable, la única manera de avanzar es seguir apostando a lo que uno cree".

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Preguntas para analizar el artículo

1. ¿Cuáles son las características que se desean mejorar en el ganado vacuno destinado a consumo?
2. ¿Por qué es posible mejorar esta característica en el ganado?
3. ¿Cuál es el método tradicional para medir terneza? ¿qué aportan los marcadores moleculares en ésta área?
4. ¿Cuáles son los marcadores moleculares ligados a la cualidad de terneza de la carne? ¿Qué rol juegan estas enzimas en el proceso de tiernización de la carne?
5. ¿Qué beneficio trae el conocimiento de estos genes al mejoramiento de esta raza vacuna?

Respuestas:

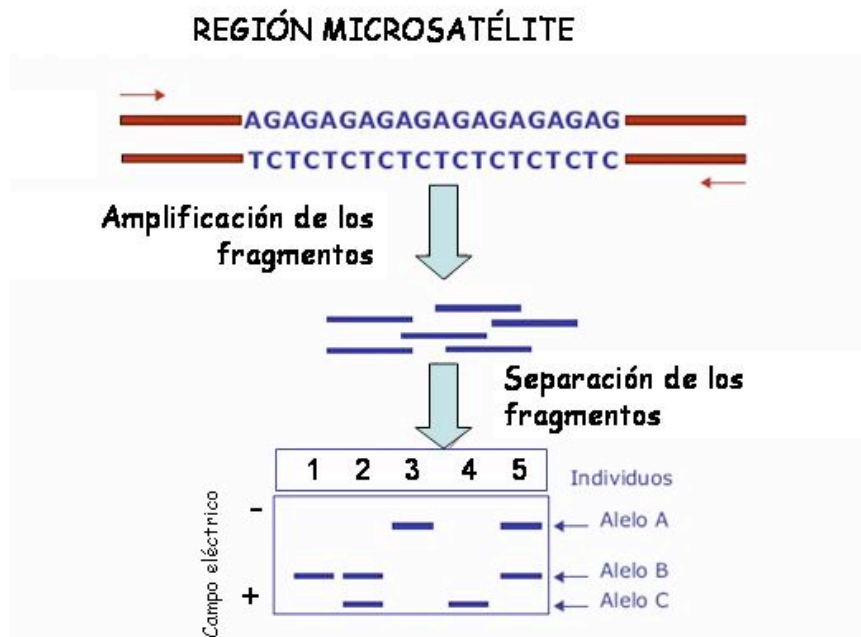
1. Según el artículo, los productores desean seleccionar a los mejores animales para lograr una mayor área de ojo de bife, menor cantidad de grasa dorsal o menor porcentaje de grasa intramuscular. A estas características de interés para los consumidores, se sumó la terneza de la carne. La terneza de la carne se define, como la dificultad o la facilidad con la que una carne se puede cortar o masticar.
2. El mejoramiento es posible porque esta característica se encuentra gobernada por ciertos genes, con lo cual la terneza es un carácter heredable, sensible al mejoramiento.
3. El método de "Warner-Bratzler" es el tradicional para medir la terneza de la carne y consiste en cortar la carne con una guillotina al momento de la faena y medir la fuerza de corte en kilogramos. Debido a que este método es poco práctico en estudios genéticos en donde se deben medir los caracteres en los progenitores y la progenie, la utilización de los marcadores moleculares, permite gana en tiempo y en costo y evita la faena de ejemplares.
4. Los marcadores moleculares existentes asociados a terneza son de tipo proteínas y ADN. Para esta investigación se estudió la Calpastatina 2959, la Calpaína 316, y la Calpaína 4751, tres enzimas que determinan el proceso de tiernización post mortem de la carne.
5. La Calpaína degrada las proteínas de la fibra muscular una vez que muere el animal, y eso es lo que ablanda la carne. Hay animales con más enzimas de Calpaína que otros, y por eso hay diferencias en la terneza. La Calpastatina, por su parte, es la enzima encargada de regular la acción de la Calpaína. Existe variante genética de cada marcador molecular que puede favorecer o no el proceso de tiernización. Como los marcadores se segregan de forma Mendeliana, cada animal puede ser homocigota para el alelo asociado a mayor terneza, homocigota para el relacionado a menor terneza o heterocigota en cada uno de los marcadores, y la combinación de los tres marcadores determina un genotipo de mayor o menor terneza.
6. Luego del estudio se sabe que el 8,7% de los toros analizados tiene las seis variantes genéticas favorables a la terneza, mientras que un 21,8% de los toros padres poseen cinco alelos favorables, siendo éste el genotipo más común. Estos

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

animales transmitirán a su descendencia características genéticas favorables a la ternura. Estos marcadores moleculares permitirán analizar las variantes alélicas asociadas a esta característica de interés, optimizando la calidad del producto final a través de la selección de los mejores ejemplares.

Actividad 2: Análisis de marcadores moleculares microsatélites

Se propone observar el siguiente esquema y responder las preguntas



Preguntas para analizar el esquema:

1. ¿Qué característica tiene el marcador molecular, que hace que sea considerado un microsatélite?
2. ¿Qué técnica permite amplificar la región microsatélite?
3. ¿Qué significan los segmentos lineales rojos y las flechas contiguas a la región microsatélite?
4. ¿Qué técnica permite discriminar o diferenciar los fragmentos amplificados que poseen distinto tamaño? ¿A qué se deben las diferencias en los tamaños de dichos fragmentos de ADN?
5. En el esquema del gel, ¿cuántas muestras de ADN de diferentes individuos se han incluido en el análisis?
6. ¿cuántos alelos hay en este conjunto de 5 individuos? ¿Cuál es el de mayor tamaño? ¿Y el de menor?
7. ¿Cuál es el número máximo de alelos que puede tener un individuo diploide?
8. Describir qué individuos son homocigotas o heterocigotas y qué alelos poseen.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Respuestas

1. Está constituido por secuencias repetitivas del dinucleótido AG (o CT en la cadena complementaria).
2. La región repetitiva se puede amplificar (o copiar) mediante la técnica de PCR
3. Las líneas rojas adyacentes a la región microsatélite, representa a la cadena de ADN que rodea al microsatélite. Esta secuencia de ADN debe conocerse para poder diseñar los cebadores (segmentos de ADN de simple cadena, señalados con flechas en el esquema) complementarios a dicha secuencia. Los cebadores a derecha e izquierda del microsatélite determinarán los extremos de la región del ADN del que se obtendrán millones de copias luego de realizar la PCR.
4. La diferencia en tamaño de los fragmentos de ADN está dada por el diferente número de repeticiones de las secuencias en tandem. A cada fragmento de diferente tamaño se lo llama alelo. Por ejemplo, en el esquema se muestra un alelo de 10 repeticiones. Se debe tener en cuenta que en individuos diploides ($2n$), en cada locus, se encuentran 2 regiones microsatélites (una en cada cromosoma homólogo). Si el individuo posee dos microsatélites del mismo tamaño, se lo considera homocigota para ese locus, si en cambio las regiones microsatélites en los dos cromosomas homólogos son diferentes, el individuo es heterocigoto para ese locus. Una manera de separar los fragmentos (alelos) de diferente tamaño, es por medio de electroforesis en geles (de agarosa o acrilamida). El ADN, que tiene carga neta negativa, migrará hacia el polo positivo del campo eléctrico creado a través del gel. Debido a la porosidad de dichos geles, las moléculas más grandes (alelos con mayor número de repeticiones) quedarán retrazadas en el gel y correrán menos (más cerca del polo negativo), mientras que las más pequeñas se desplazarán más.
5. Se incluyeron ADNs de 5 individuos, en los cuales se realizó previamente la PCR, para amplificar la región microsatélite.
6. Hay 3 alelos de diferentes tamaños (indicados como alelos A, B y C). El alelo de mayor tamaño es el A (corre menos en el gel), mientras que el de menor tamaño es el C.
7. Un individuo diploide posee 2 alelos. Si los dos alelos son del mismo tamaño (se ven como una única banda en el gel) se dice que es homocigota, mientras que si los dos alelos son diferentes, es heterocigota para ese locus.
8. Individuo 1: homocigota, posee 2 alelos iguales (B); indiv. 2: heterocigota con los alelos B y C; indiv. 3: homocigota, con el alelo A; indiv. 4: homocigota para el alelo C; indiv. 5: heterocigota, con los alelos A y B.

Actividad 3: Detectives moleculares de alimentos

(Extraído de Biotecnología en el sector alimentario. Genoma España http://www.gen-es.org/12_PUBL/docs/BIOTECN_SECT_ALIM.pdf)

Las aplicaciones de la técnica de PCR en el control de alimentos son numerosas. Se pueden utilizar para identificar especies cárnicas y especies de pescado de interés alimenticio, detectar la presencia de agentes patógenos en los alimentos (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7)

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

o detectar la presencia o ausencia de organismos genéticamente modificados (OGM) en los alimentos.

En la siguiente figura se muestra el resultado obtenido al amplificar por PCR un gen universal presente en todas las especies animales. En este ensayo, cada especie genera una banda de amplificación de un tamaño determinado. Así, las muestras problema (de 7 a 12) pueden compararse con las muestras control (1 a 6) correspondientes a cabra, pollo, vaca, oveja, cerdo y caballo. Las calles 7 a 12 corresponden a distintos alimentos, en los cuales se quiere determinar qué tipo de carne poseen. Las calles 7 y 8 son duplicados de la muestra A, las 9 y 10 pertenecen a la muestra B y las calles 11 y 12, corresponden a la muestra incógnita C.

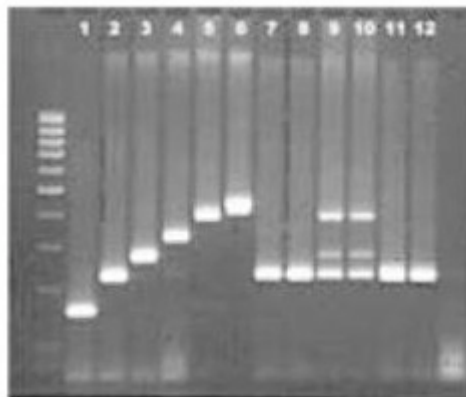


Figura 12. Amplificación por PCR de un gen universal de animales en muestras de alimentos. Las carreras 1 a 6 contienen controles de ADN de cabra, pollo, vaca, oveja, cerdo y caballo, respectivamente. Las carreras 7 y 8 contienen la muestra problema A, las 9 y 10 la B y las 11 y 12 la C.

Teniendo en cuenta el tamaño relativo de los genes amplificados en las muestras control, ¿podría decir qué producto animal poseen los alimentos A, B y C?

Respuestas

Al comparar los tamaños alélicos, se puede concluir que:

- la muestra A (calles 7 y 8) contiene pollo,
- la muestra B (calles 9 y 10) contiene en su composición carne de pollo, vaca y cerdo.
- la muestra C (calles 11 y 12), al igual que la muestra A, contiene sólo carne de pollo.

Material de Consulta

- ü Libro: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Editores: Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Ing.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Agr. Luis Mroginski. Capítulos 4 y 5

<http://www.argenbio.org/index.php?action=biblioteca&opt=8&view=1>

ü Masuelli, R.W. 1999. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. Avances en Horticultura. 4 (1): 61-75.

ü Biotecnología en el sector alimentario. Genoma España

http://www.gen-es.org/12_PUBL/docs/BIOTECN_SECT_ALIM.pdf

ü Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen

<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html>

ü Introducción al mejoramiento de plantas asistido por marcadores moleculares.

Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. <http://agr.unne.edu.ar/fao/Nica-ppt/Rojas.pdf>

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.