

# Unidad II

Variabilidad del material hereditario  
- cambios evolutivos-

↓  
**Recombinación artificial**

Herramientas Biotecnológicas

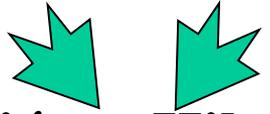
Análisis molecular del genoma

**Reacción en Cadena de la Polimerasa**  
(**Polymerase Chain Reaction**)

Marcadores moleculares

1° - Mutación

2° - Recombinación natural: génica y cromosómica



Variación - Hibridación

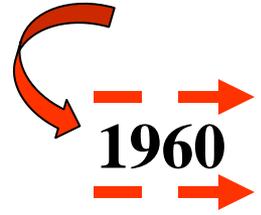


Diversidad

Selección



Mejoramiento genético



1960

MAS: (Marker Assisted Selection)



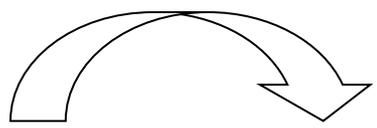
GAB (Genomic-Assisted Breeding)

- Enzimas de restricción
- Recombinación artificial

*Ingeniería genética:*  
(ADN recombinante)

-Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

-Amplificación selectiva de secuencias de nucleótidos "in vitro"

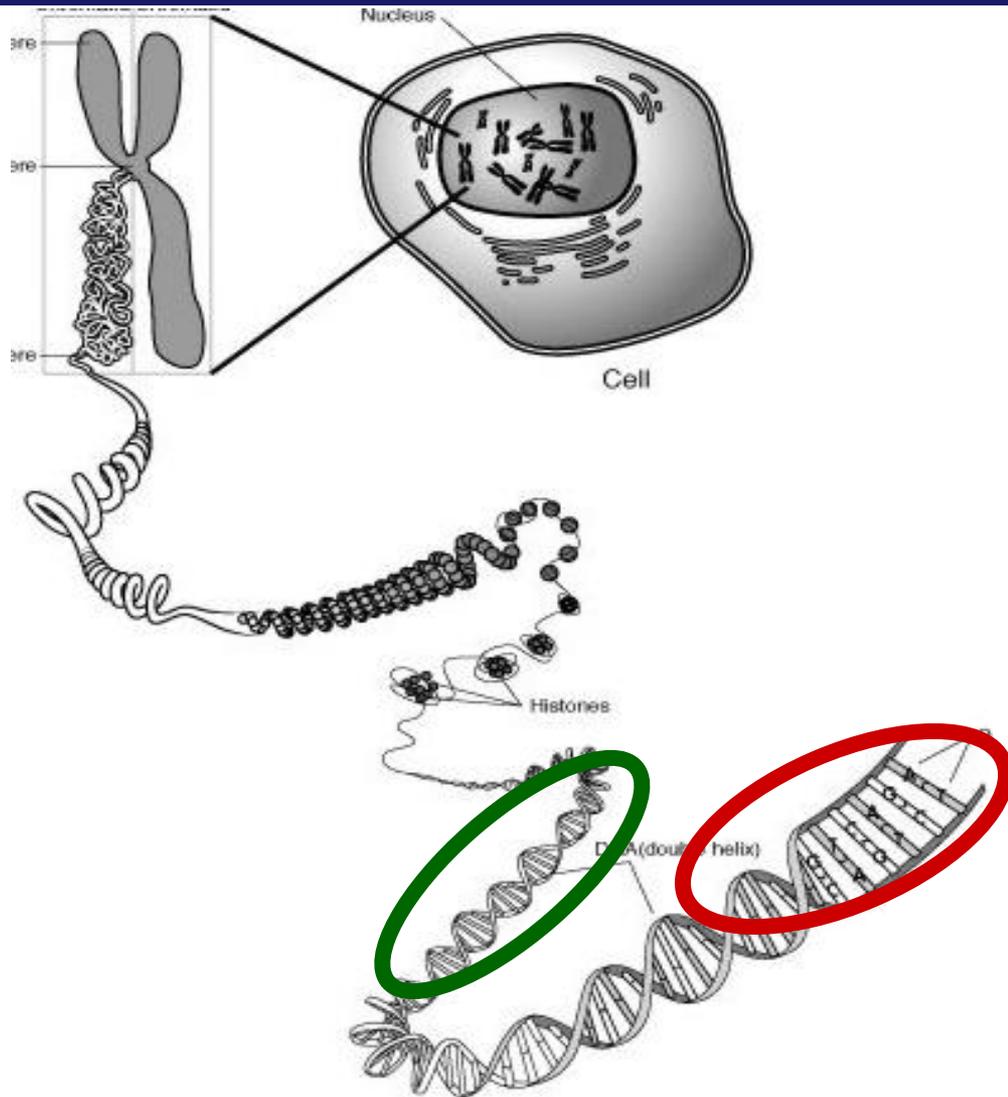


Marcadores

- Genéticos

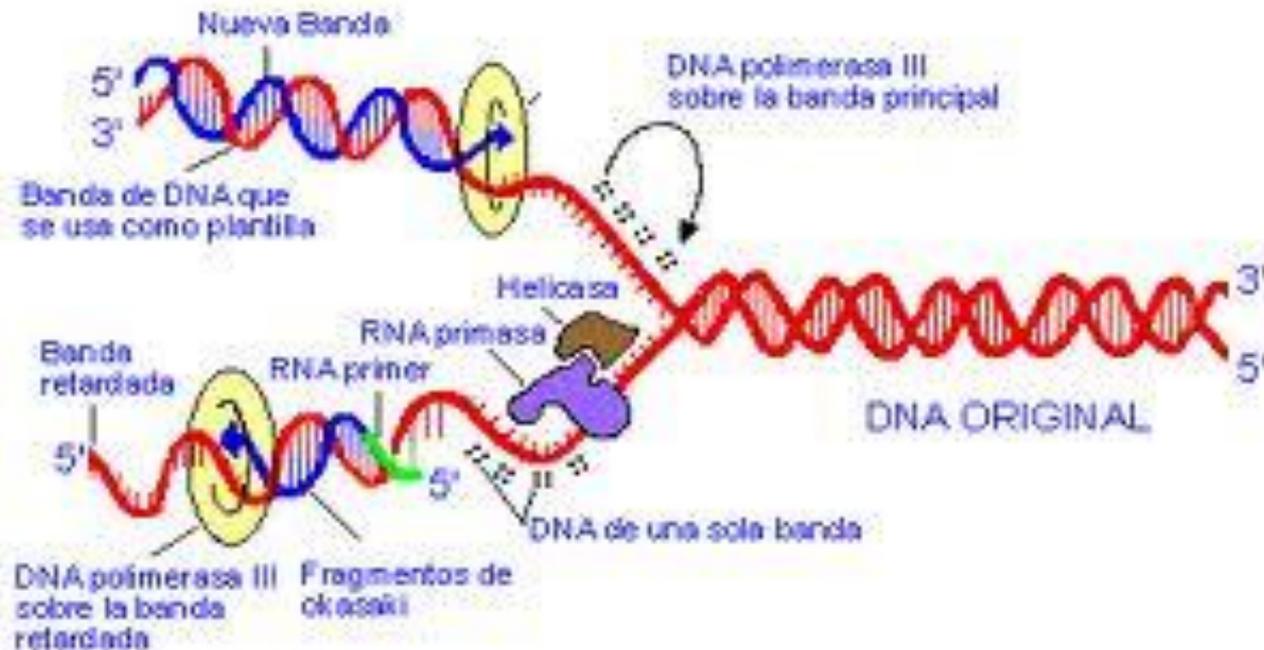
- Moleculares

# Análisis molecular del genoma: amplificación selectiva de secuencias de nucleótidos (PCR)



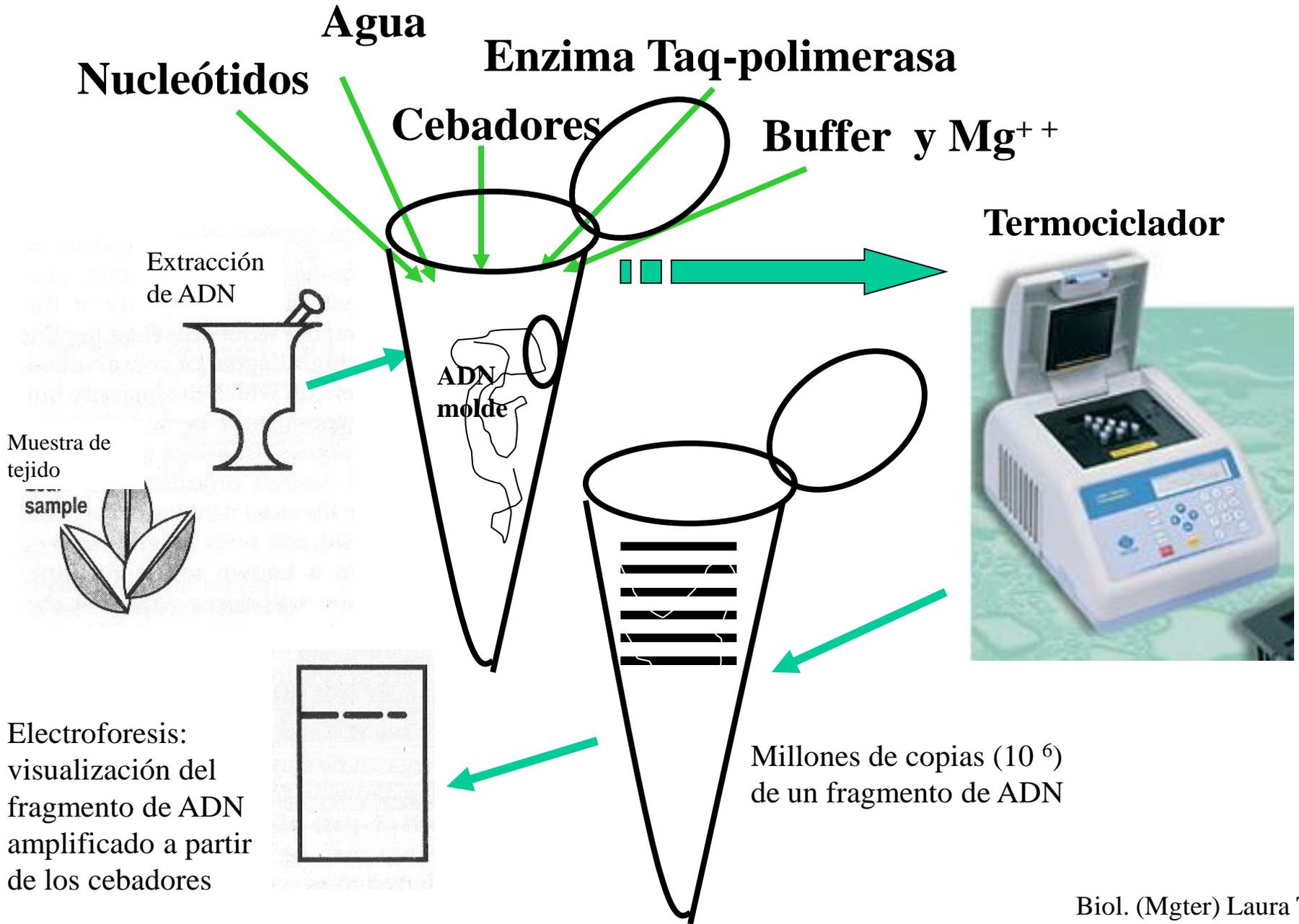
# Replicación “*in vivo*” del ADN

- \* Helicasa
- \* Proteínas de unión a cadena sencilla (SSBP)
- \* Topoisomerasa ADN girasa
- \* Iniciación de la síntesis
- \* ADN polimerasa III
- \* Primasa, ARN polimerasa
- \* ADN polimerasa III
- \* ADN ligasa.
- \* Corrección : polimerasas I y III



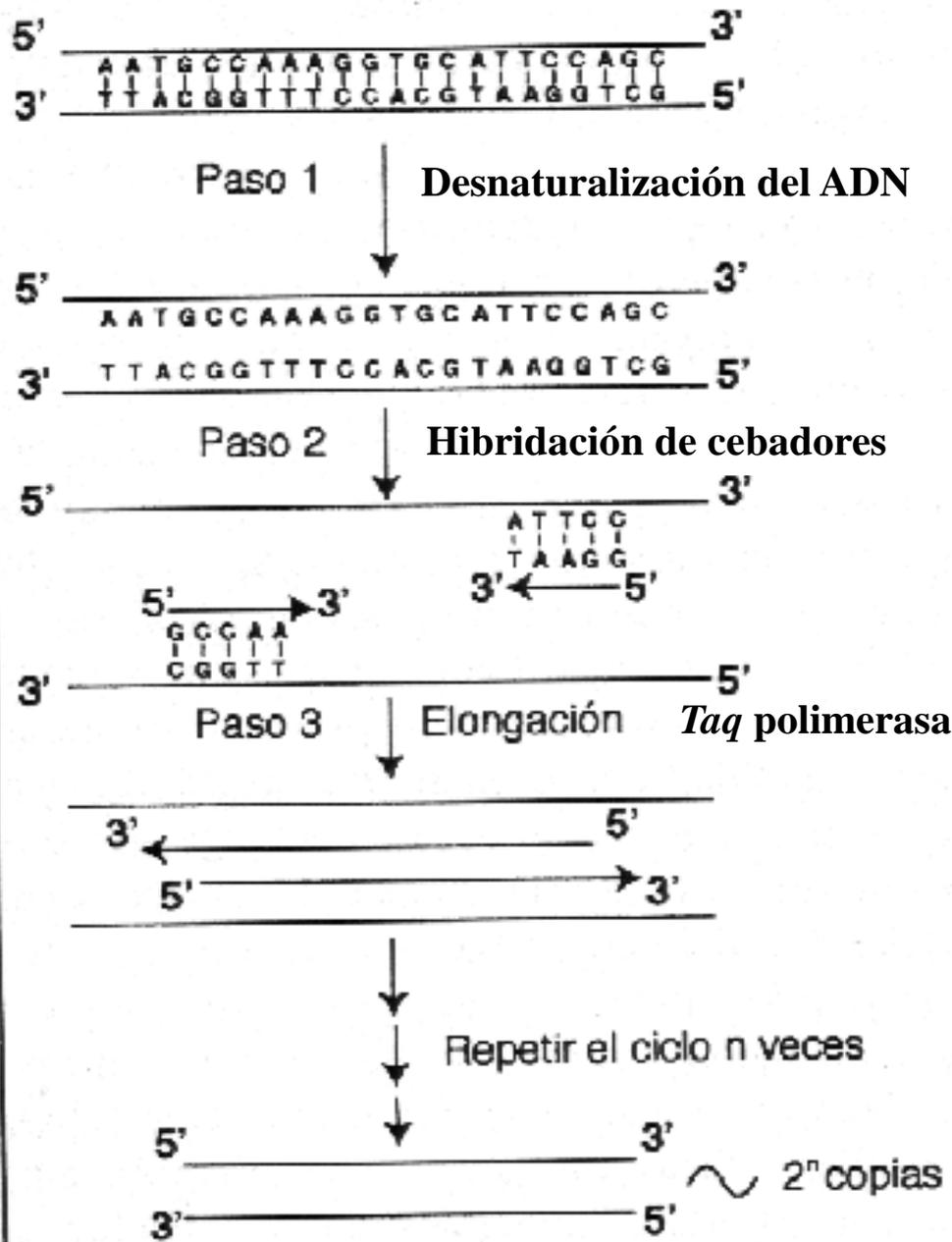


# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



# ¿Qué elementos intervienen en la reacción de PCR (replicación de ácidos nucleicos *in vitro*)?

- **ADN 'o ARN:** sirve de molde para la copia y amplificación del fragmento deseado
- **Primers o Cebadores.** Son cortas secuencias de nt. (longitud: 15-30nt) que se diseñan en base a secuencias conocidas ó arbitrarias. No deben hibridar entre ellos.  
Temperatura de hibridación al AND molde:  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C) \dots T_m - 5^\circ C$
- **dNTP's.** Son los 4 nucleótidos (ATP, CTP, GTP, TTP) necesarios para replicar el ADN
- **Tampón ó Buffer.** Condiciones adecuadas para la actividad de la enzima polimerasa  
pH, Mg<sup>++</sup>.
- **Taq Polimerasa.** Enzima *ADN polimerasa (Thermus aquaticus)* termoestable a 94 °C  
( desnaturalización del ADN)
- **Termociclador.** Equipo que de manera automática controla T°, tiempo, velocidad de cambios de T° , cantidad de ciclos y número de repeticiones.



Amplificación *in vitro* del ADN:

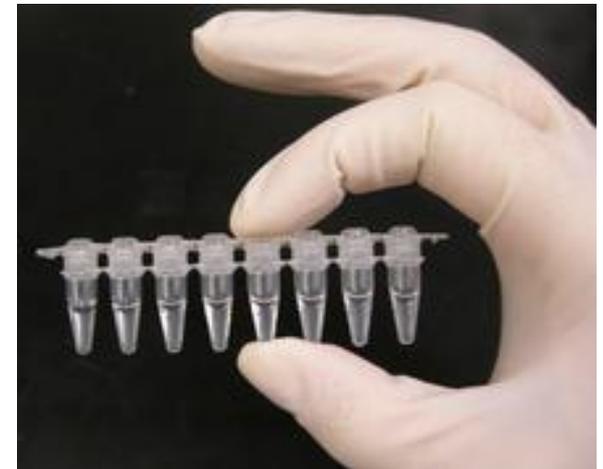
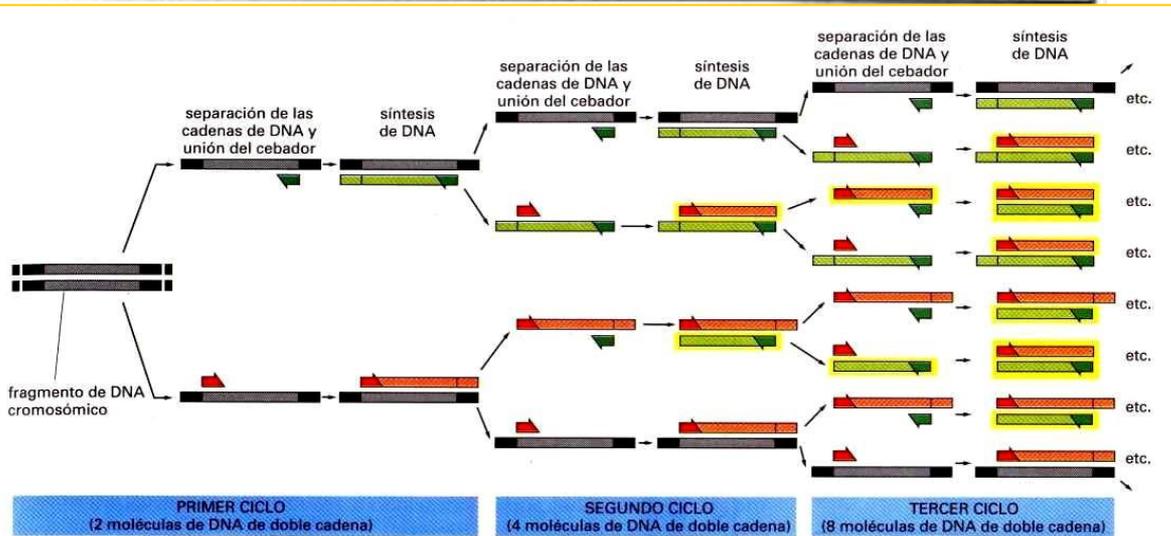
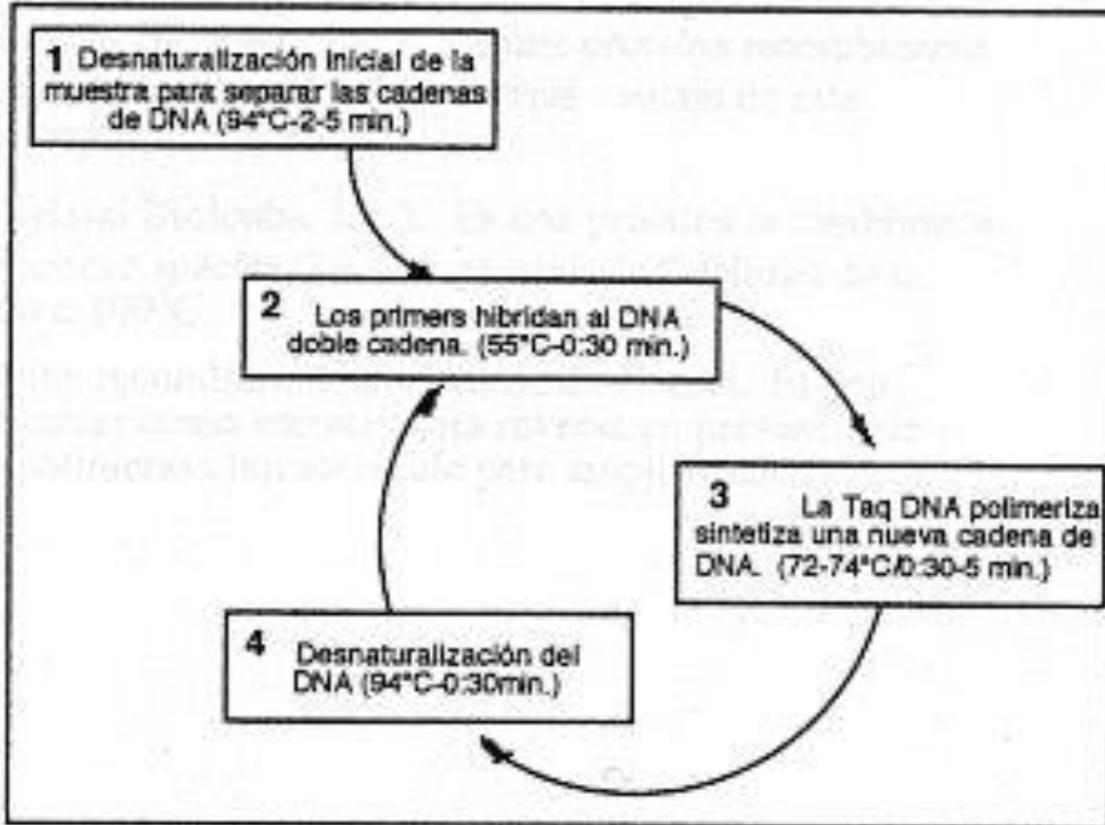
Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*)

Un ciclo = tres pasos:

- **Desnaturalización** (95°C)
- **Hibridación** (50 a 60 °C)
- **Elongación** (72°C)

# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los pasos 2 a 4 se repiten 30-35 veces e incrementan más de  $10^6$  veces el fragmento de DNA de interés



# ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS

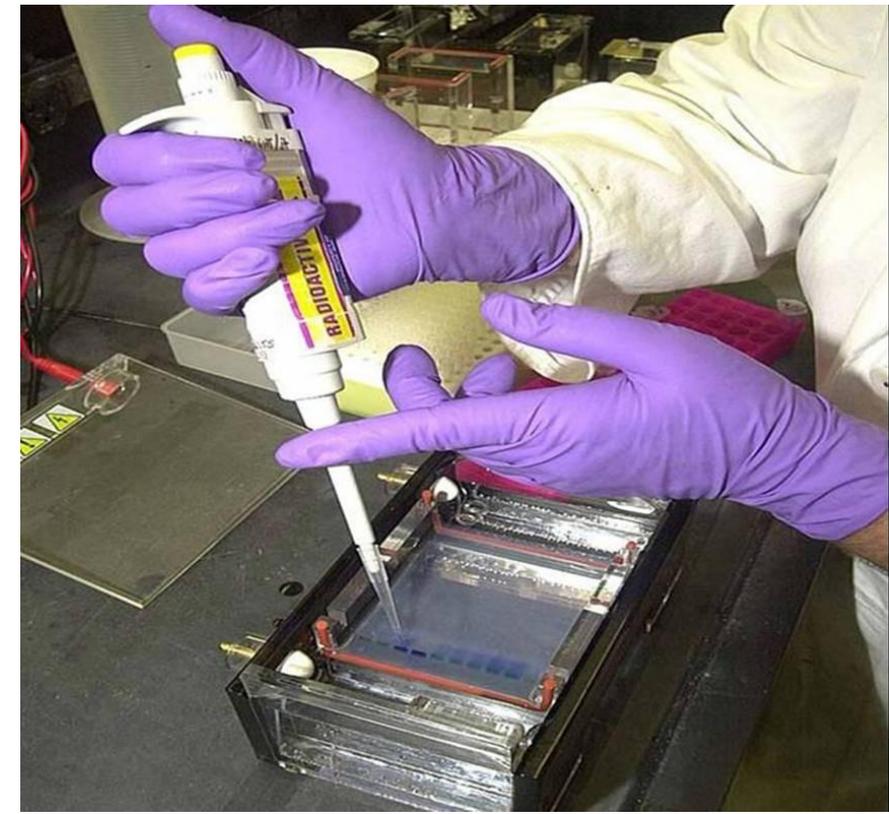
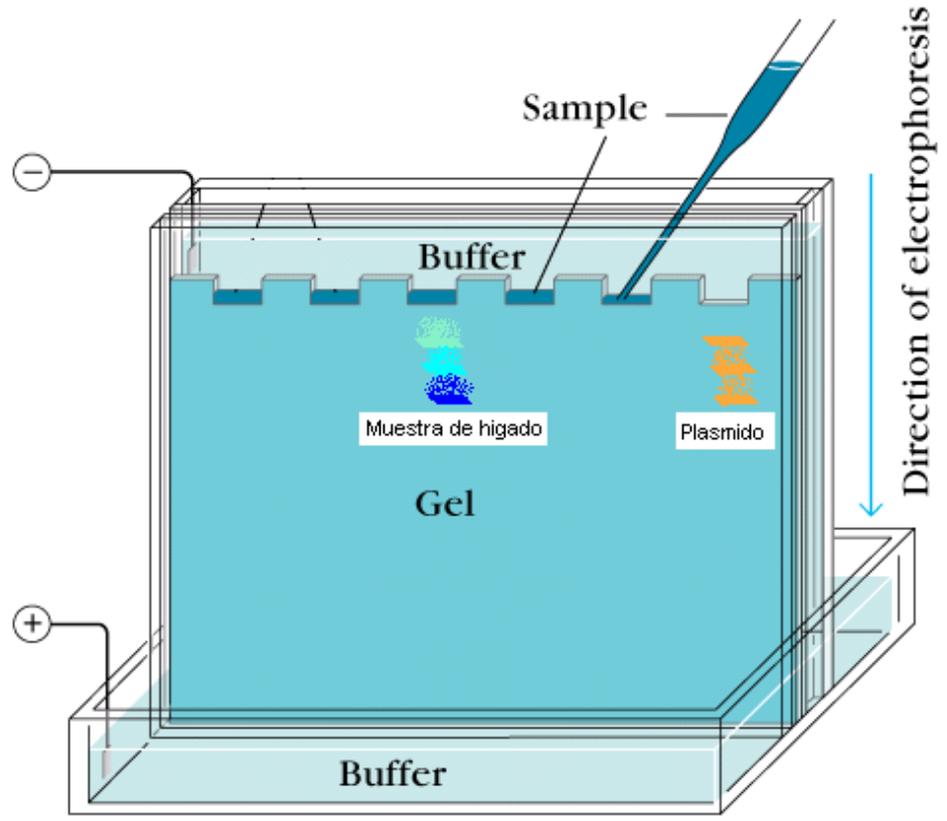
**Cátodo (-)**

Separación de AN por Electroforesis

**(+) Anodo**



**GEL (con porosidad)**



**Corriente eléctrica**

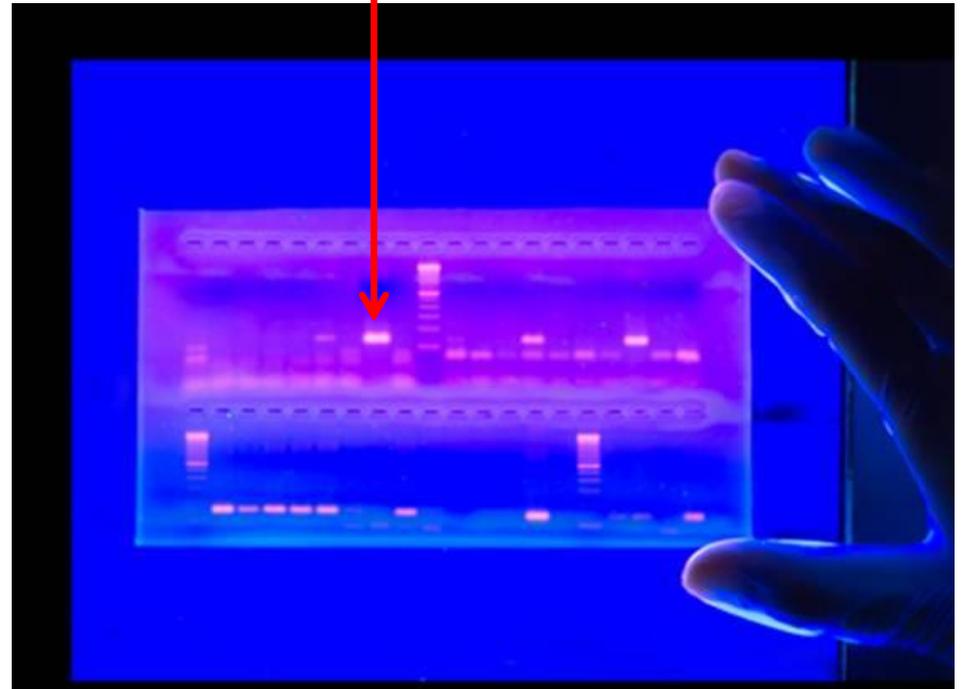
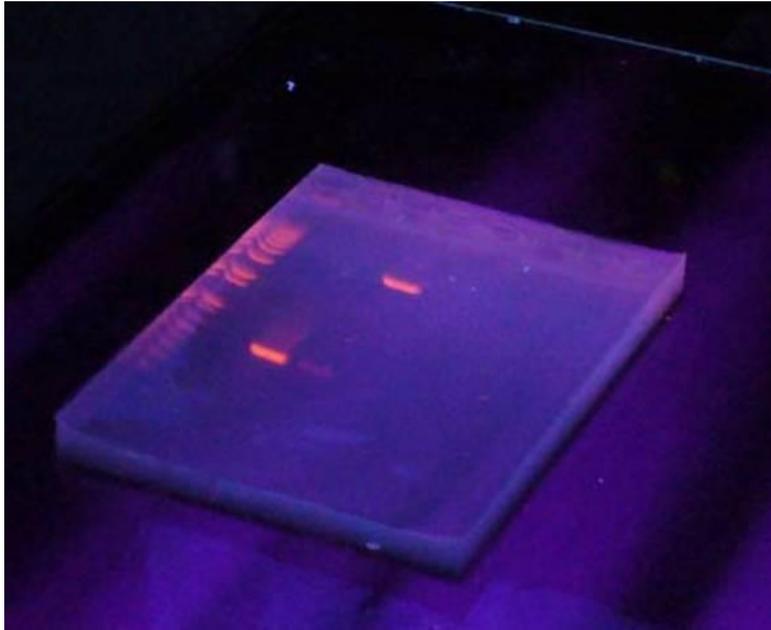
**Solución tampón ó buffer (conduce la corriente eléctrica)**

# ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS

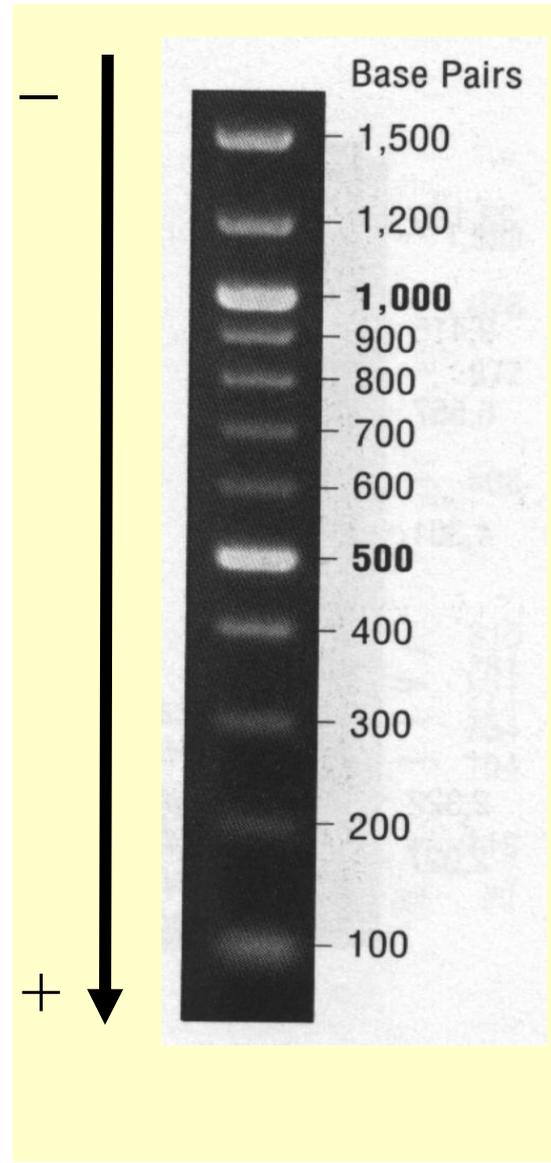
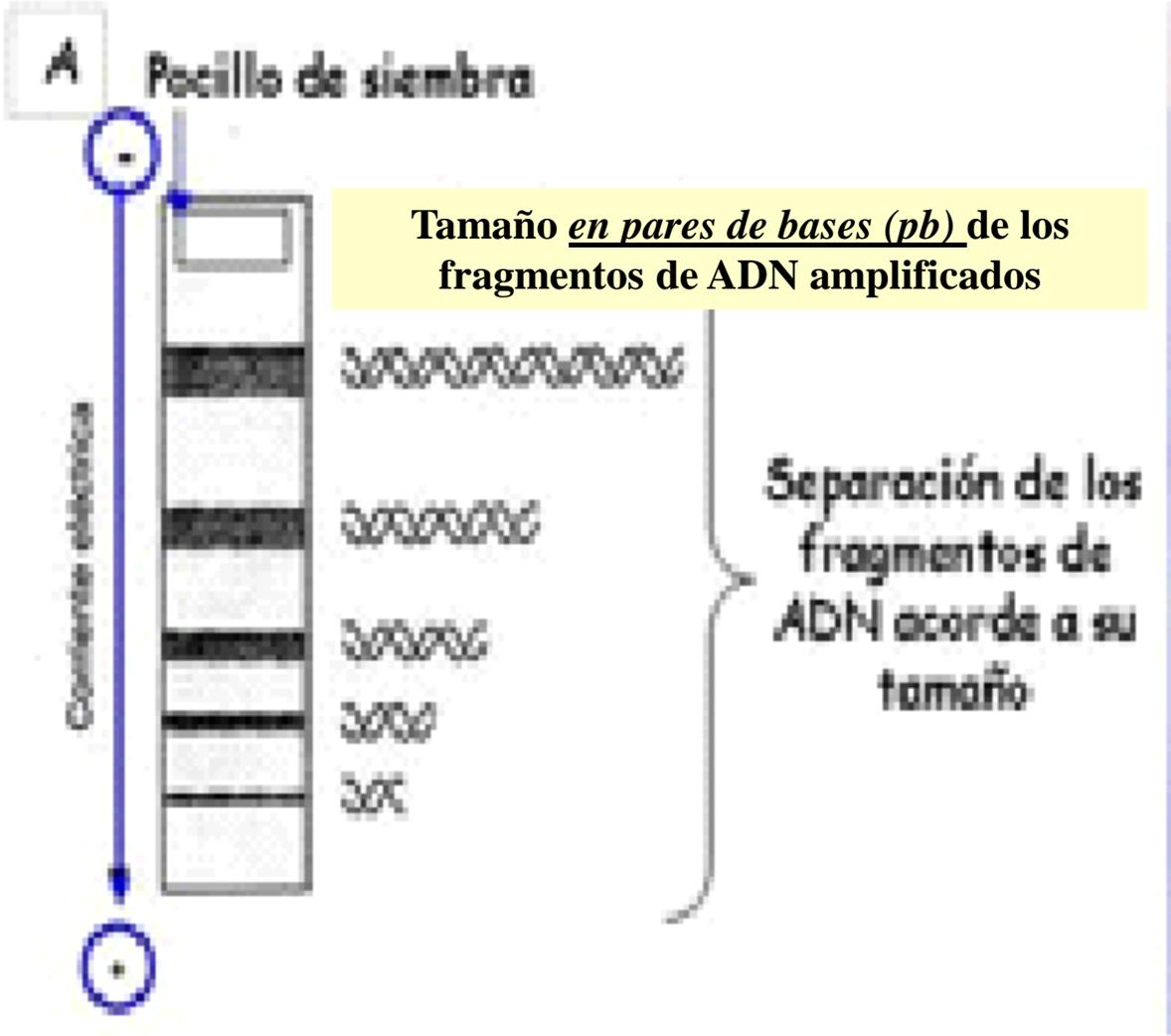


- Tinción: Bromuro de etidio.
- Visualización: por fluorescencia con luz ultravioleta (UV).

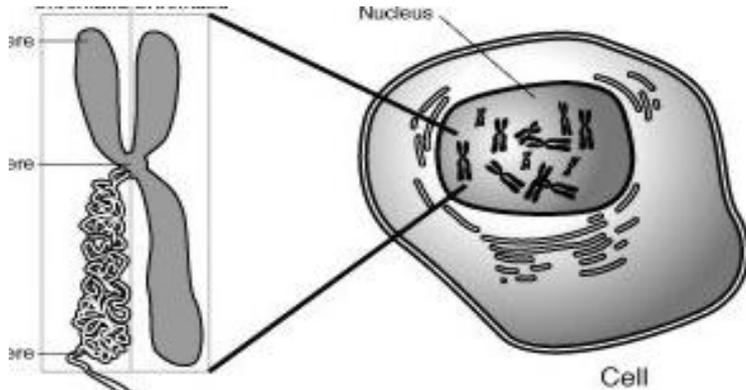
**Fenotipo molecular = patrón de bandas**



# ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS



# Utilidad : Análisis molecular del genoma mediante Marcadores basados en la PCR



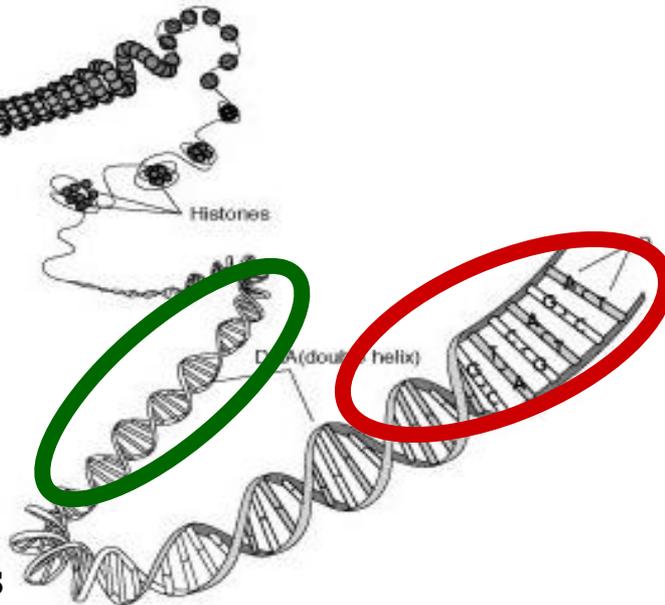
Marcador molecular:

**Fenotipo molecular:**  
representa diferentes  
porciones del  
genoma



Marcador genético:

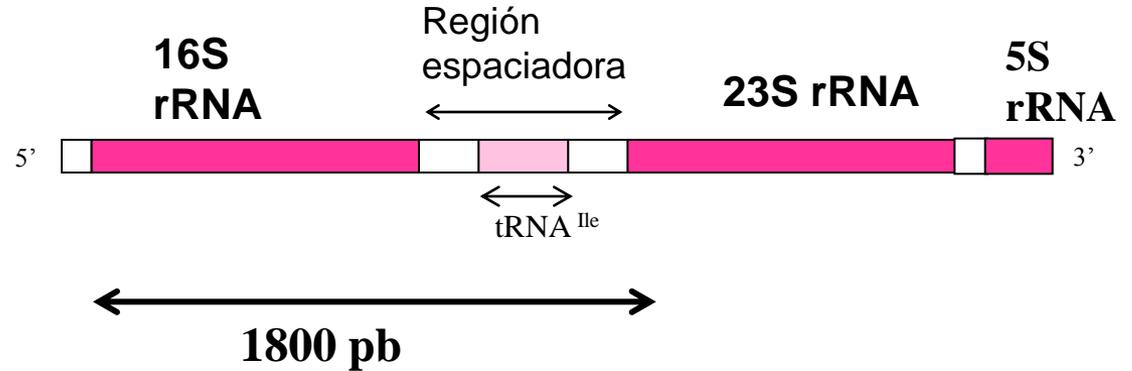
**Fenotipo molecular:**  
puede asociarse a  
caracteres biológicos  
de interés.



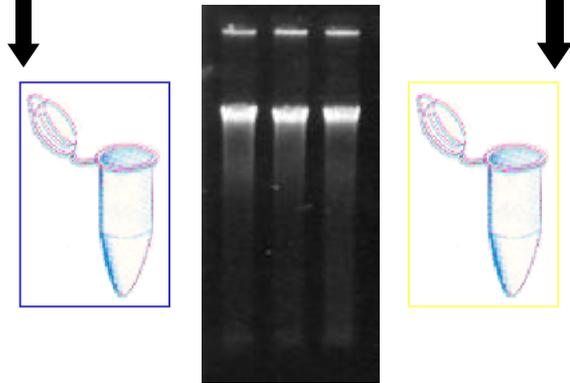
# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Utilidad: Control de sanidad

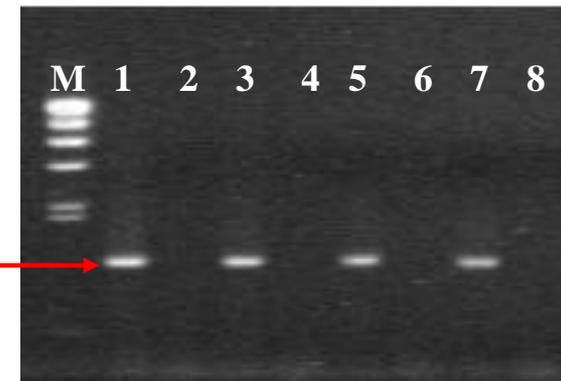
- Detección de fitopatógenos (cebadores con secuencia conocida)



Extracción del DNA total de planta



Reacción de PCR



1- control positivo; 3, 5, 7 muestras con síntomas.

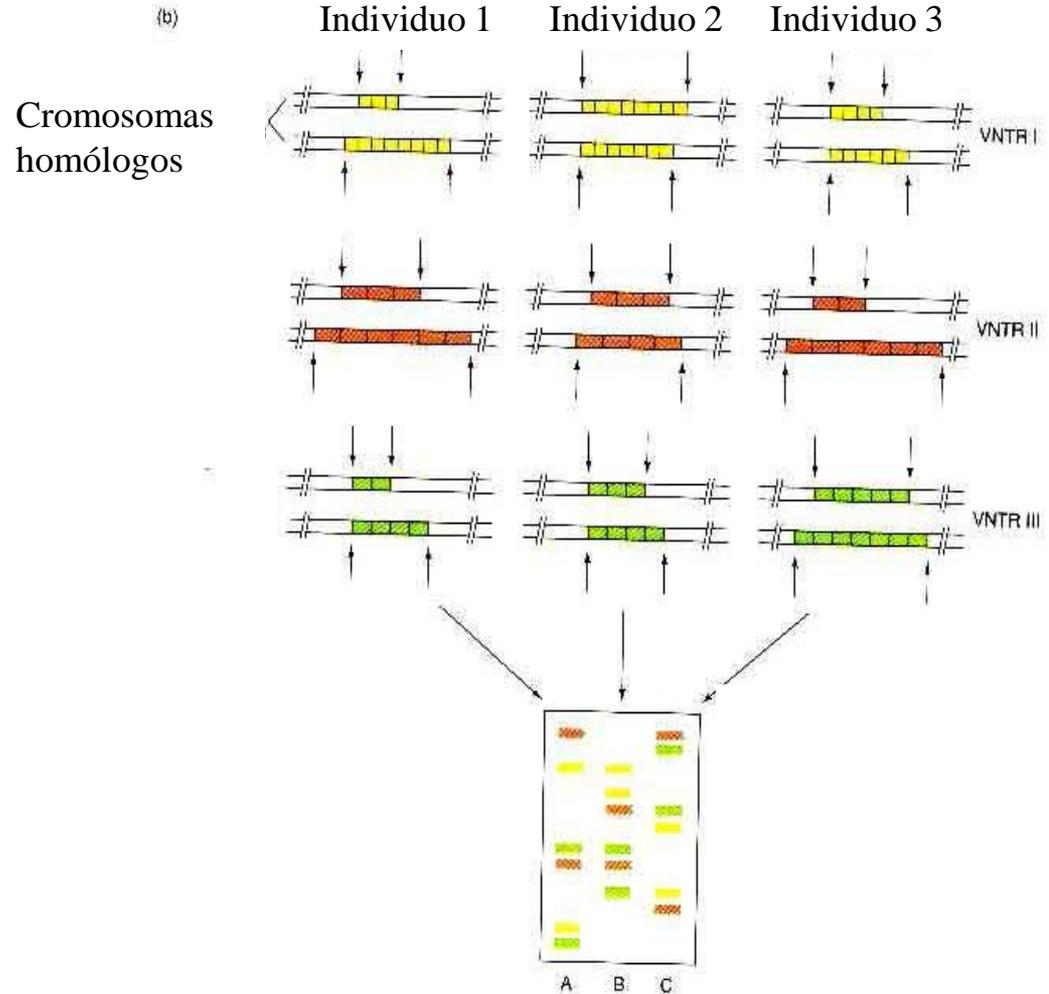
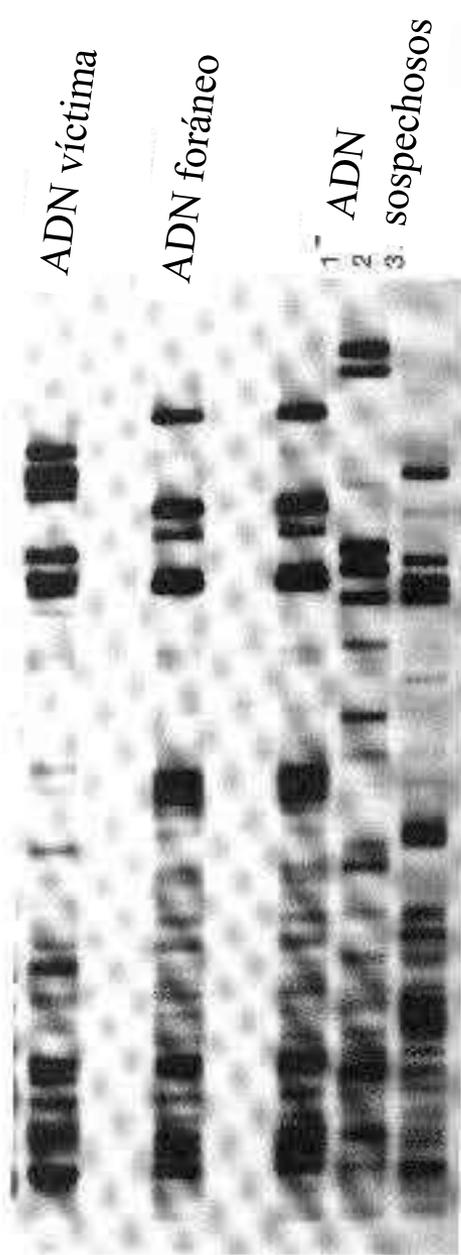
2, 4, 6, muestras asintomáticas

M- Marcador de peso molecular.

# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

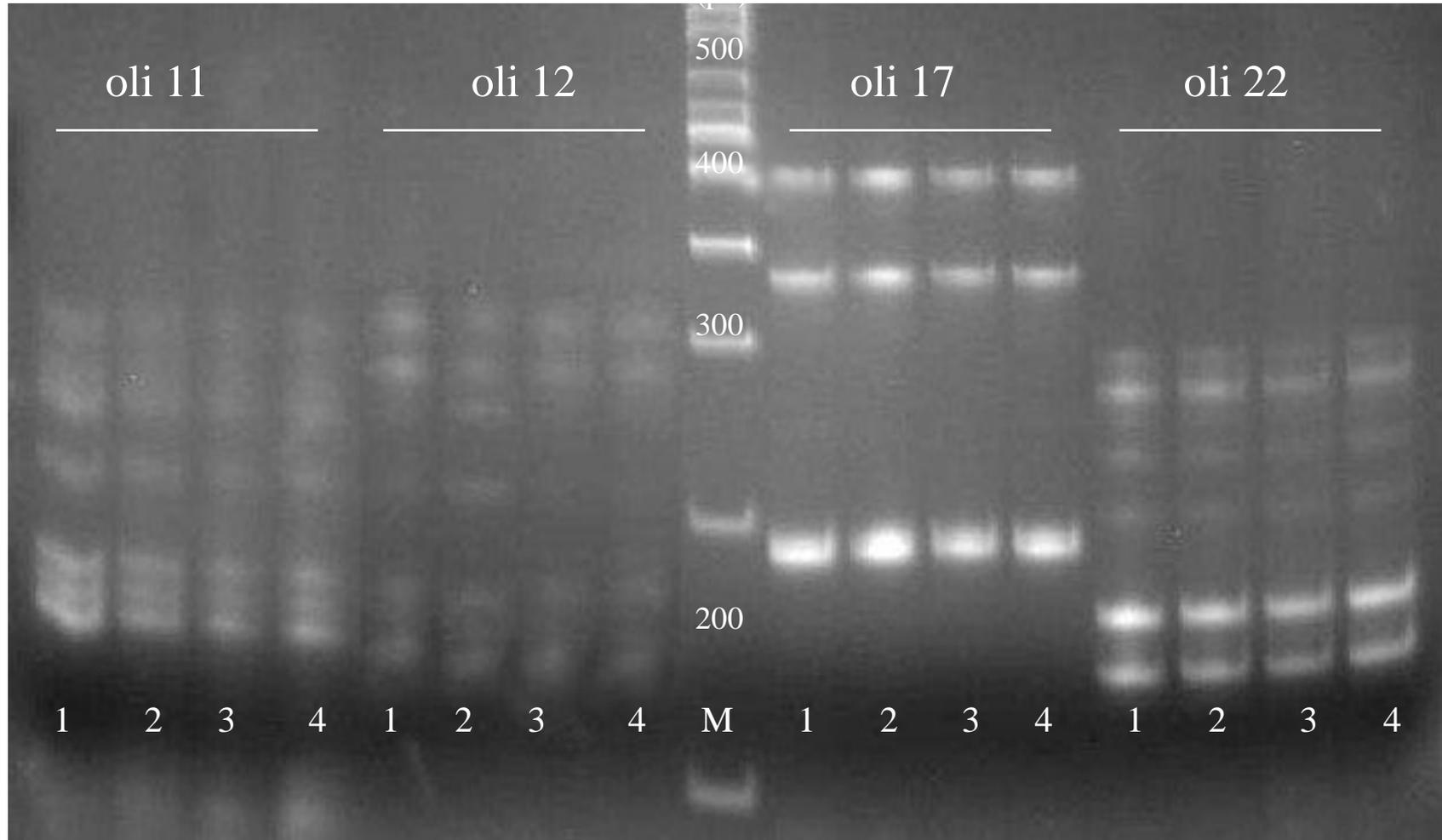
Utilidad: - Peritaje forense (cebadores con secuencia conocida)

- Huella genética (fingerprinting)



# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Utilidad: - Identidad clonal en *Olea europaea* L. (olivo)



Caracterización e identidad genética en Olivo

# Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Utilidad: - Diversidad en *Olea europaea* L. (olivo)

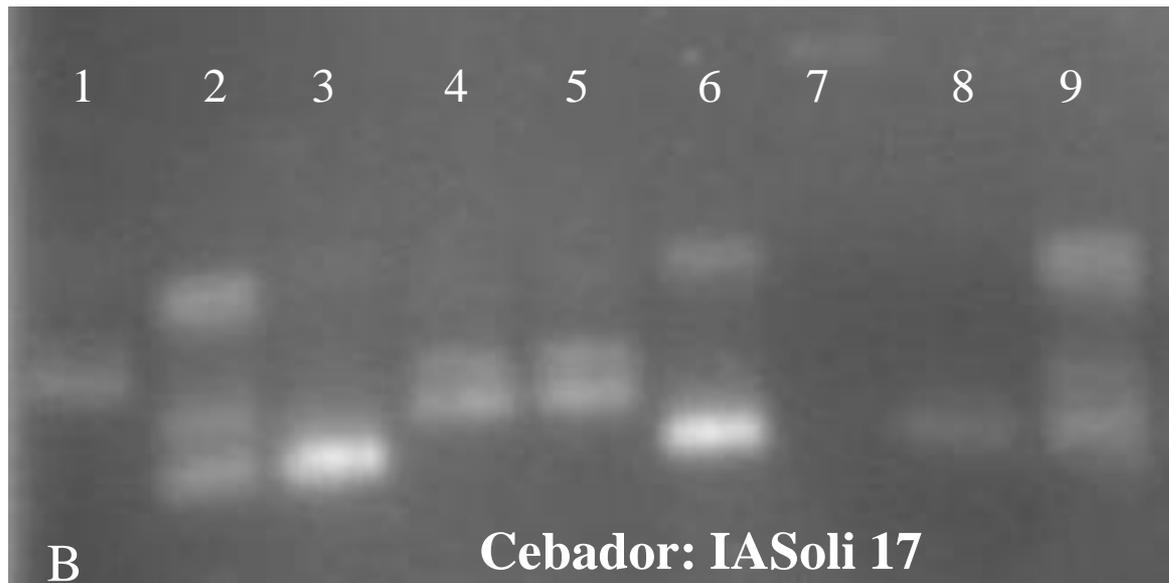


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa 3% de productos de PCR.

## Variedades de Olivo:

- 1- Empeltre de referencia;
  - 2- Empeltre LP;
  - 3- Manzanilla de referencia;
  - 4- Manzanilla EC;
  - 5- Manzanilla 4S;
  - 6- Manzanilla gigante 4S;
  - 7- Picual de referencia;
  - 8- Nevadillo EC;
  - 9- Nevadillo 4S;
- M:** 100 pb. DNA ladder (Sigma).