



MANUAL DE PROBLEMAS Y
PRÁCTICAS DE LABORATORIO
DE GENÉTICA

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

MANUAL DE PROBLEMAS Y PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE GENÉTICA

Este manual para la asignatura Genética es parte de los manuales de "Problemas y Casos Prácticos de Genética" (ISBN: 978-84-15261-50-6) y "Manual de Prácticas de Genética" (ISBN: 978-84-15261-49-0) elaborados por profesores del Departamento de Genética de la Universidad de Granada, en el marco de un Proyecto de Innovación Docente titulado "Nuevos recursos docentes para las prácticas del Departamento de Genética en el marco del EEES" (curso académico 2010/2011) financiado por el Vicerrectorado de Garantía de la Calidad de la Universidad de Granada.

En el curso académico 2017/2018, este manual ha sido revisado en el marco de los Proyectos de Innovación Docente titulados "Actualización de material didáctico para la docencia práctica de la asignatura *Genética II: de la secuencia a la función* del Grado en Biología" y "Desarrollo de medios audiovisuales y virtualización de contenidos en asignaturas del área de Genética" concedidos por el Vicerrectorado de Garantía de la Calidad de la Universidad de Granada para el periodo 2016/2018.

ÍNDICE

Problemas	7
1. Mendelismo.....	9
2. Extensiones del Mendelismo	39
3. Genética Molecular	69
Prácticas de laboratorio	87
1. Aplicación de la PCR al diagnóstico genético: detección de parásitos que infectan a moluscos	89
2. Clonación de un producto de PCR	95
3. Expresión de genes implicados en el desarrollo testicular de mamíferos.....	101

PROBLEMAS

1.- MENDELISMO

1.1. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Cruzamientos monohíbridos

En esta relación de problemas estudiaremos los principios de la segregación y de la transmisión independiente de Mendel, aprenderemos a realizar predicciones de los resultados de los cruzamientos genéticos y a comprender la utilidad de la probabilidad como herramienta en el análisis genético. Comenzaremos con los cruzamientos monohíbridos. Los **cruces monohíbridos** son aquellos cruzamientos en los que ambos progenitores difieren en una única característica. El cruzamiento monohíbrido entre dos líneas puras tiene como resultado una descendencia F1 en la que todos los individuos presentan el fenotipo de uno de los parentales (fenotipo dominante) mientras que en la F2, 3/4 de los descendientes presentan dicho fenotipo y 1/4 presentan el fenotipo del segundo parental (fenotipo recesivo). Para un caso hipotético en el que el carácter está controlado por un gen con dos alelos, uno de los cuáles determina fenotipo dominante (color de flor rojo, por ejemplo) y el otro determina el fenotipo recesivo (blanco), tendremos:

Rojo (A) > Blanco (a)

P: Rojo (AA) x Blanco (aa)
F1: 100% Rojo (Aa)
F2: 1/4 Rojo (AA): 1/2 Rojo (Aa): 1/4 Blanco (aa)

La forma que tenemos de discriminar entre individuos de flor roja homocigóticos y heterocigóticos es mediante un cruzamiento prueba entre estos individuos de color de flor rojo y un parental de prueba homocigótico recesivo (aa), dado que el resultado será diferente en cada caso:

a) Rojo x Blanco: 100% Rojo. En este caso, el individuo de fenotipo rojo era homocigótico AA y la descendencia del cruzamiento prueba será Aa.

b) Rojo x Blanco: 50% Rojo, 50% Blanco. En esta caso, el individuo de fenotipo rojo era heterocigótico Aa y la descendencia será 1/2 AA (rojo) y 1/2 aa (blanco).

Probabilidad

La **probabilidad** expresa la posibilidad de que ocurra un determinado suceso. Se calcula como el número de veces que ocurre un evento particular dividido por el número total de resultados posibles.

Para predecir las proporciones de la descendencia producida por cruzamientos genéticos se utilizan dos reglas probabilísticas:

- **Regla de la multiplicación:** esta regla establece que la probabilidad de que dos o más eventos independientes ocurran simultáneamente. Se calcula multiplicando sus probabilidades independientes.

- **Regla de la adición:** esta regla establece que la probabilidad de ocurrencia de uno solo de dos o más eventos mutuamente excluyentes. Se calcula sumando las probabilidades de cada uno de ellos.

Para determinar la **probabilidad de una combinación particular de eventos** es útil usar la siguiente fórmula:

$$P = \frac{n!}{s!t!} p^s q^t$$

Donde *P* equivale a la probabilidad total de un suceso *X* con la probabilidad *p* de ocurrir *s* veces y de un evento *Y* con probabilidad *q* de ocurrir *t* veces. Donde: $s+t = n$; $p+q = 1$.

Cruzamientos dihíbridos y polihíbridos

Cuando analizamos la herencia simultánea de dos o más caracteres (cruces di-, tri-, polihíbridos) hay que considerar, para cada gen, los mismos principios que en un cruce monohíbrido, es decir: pueden presentar diferentes alternativas alélicas, existen relaciones de dominancia entre ellos y segregan durante la meiosis.

El principio de segregación establece que dos alelos de un locus se separan al formarse los gametos; el principio de transmisión independiente establece que, cuando esos dos alelos se separan, su separación es independiente de la separación de los alelos ubicados en otros loci.

Este principio mendeliano sólo se cumple en el caso de genes situados en cromosomas diferentes (o también, como veremos más adelante, en genes situados en el mismo cromosoma pero lo suficientemente alejados como para que ocurra entrecruzamiento en cada meiosis)

Hay que tener en cuenta las siguientes observaciones:

a) Cuando los alelos de dos loci se separan de forma independiente, los cruzamientos dihíbridos pueden analizarse como dos cruzamientos monohíbridos independientes y luego combinar las proporciones.

b) Puesto que son dos sucesos independientes, estas combinaciones se calculan mediante la regla de la multiplicación.

c) En el caso de un cruzamiento entre dos dihíbridos, las proporciones esperadas son 9:3:3:1.

d) Tipos de gametos producidos en el caso de dos genes:

<u>Individuos (Genotipo)</u>	<u>Gametos</u>	<u>Proporción</u>			
AABB	AB	1			
AABb	AB, Ab	1/2	1/2		
AAbb	Ab	1			
AaBB	AB, aB	1/2	1/2		
AaBb	AB, Ab, aB, ab	1/4	1/4	1/4	1/4
Aabb	Ab, ab	1/2	1/2		
aaBB	aB	1			
aaBb	aB, ab	1/2	1/2		
aabb	ab	1			

Se procede de la misma manera en el caso de tres o más genes, teniendo en cuenta la siguiente **regla**: según el principio de la segregación mendeliana, un gameto recibe sólo un alelo de cada gen.

e) Para obtener el resultado del cruzamiento entre individuos que difieren en dos o más caracteres, se puede realizar un cuadro de Punnet o bien un diagrama ramificado (método de bifurcación):

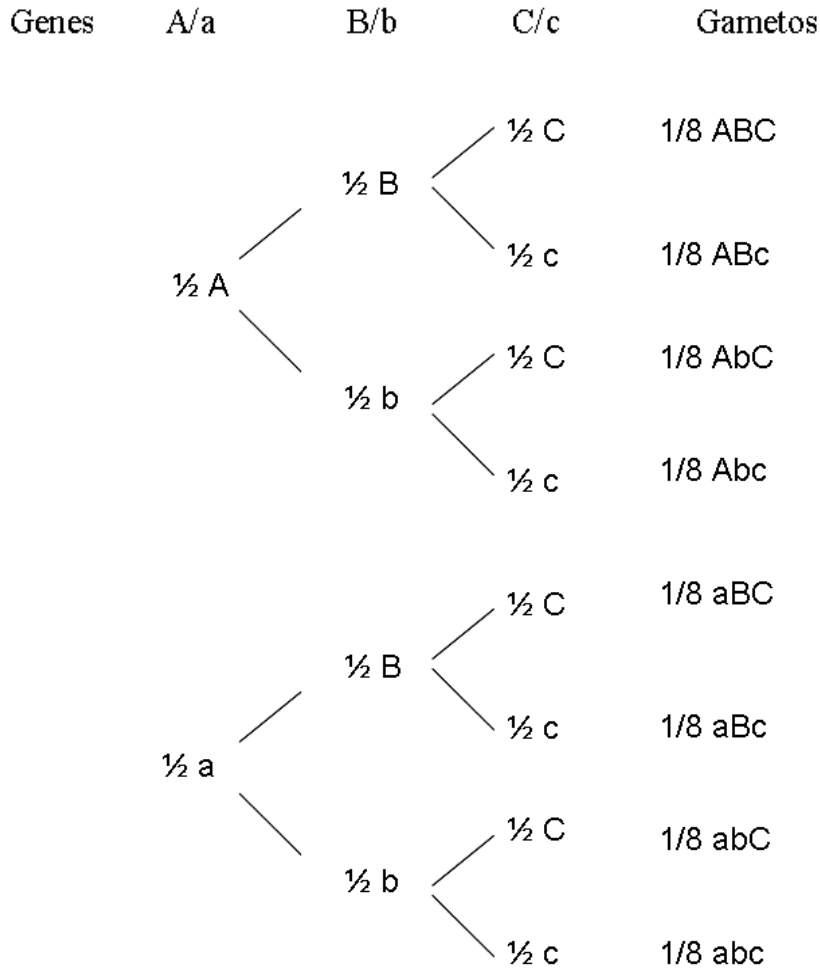
El cuadro de Punnet nos permite analizar las proporciones genotípicas y fenotípicas de la descendencia. Por ejemplo, en un cruce de prueba dihíbrido:

Parentales: AaBb x aabb

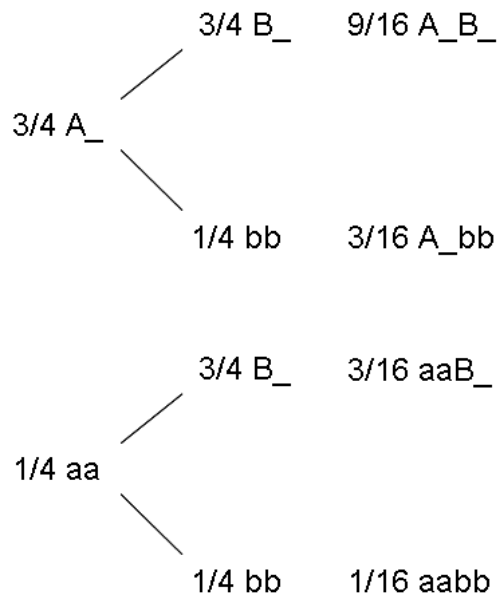
Gametos/Proporción	AB ($\frac{1}{4}$)	Ab ($\frac{1}{4}$)	aB ($\frac{1}{4}$)	ab ($\frac{1}{4}$)
ab (1)	AaBb ($\frac{1}{4}$)	Aabb ($\frac{1}{4}$)	aaBb ($\frac{1}{4}$)	aabb ($\frac{1}{4}$)

Se puede observar que el cruzamiento de prueba en el caso de dos genes, da como resultado las proporciones 1:1:1:1. Para tres genes es 1:1:1:1:1:1:1, etc.

El diagrama ramificado (método de bifurcación) permite analizar de forma rápida, las frecuencias de gametos o las frecuencias fenotípicas de la descendencia. Es útil en el caso de más de dos genes. Ejemplo: la proporción y tipos de gametos que produce un individuo trihíbrido será la siguiente:



De la misma forma se puede aplicar para determinar las frecuencias de las clases fenotípicas esperadas en la F₂ de un cruzamiento polihíbrido. En el caso de un cruzamiento dihíbrido (AaBb x AaBb):



f) Cálculo de probabilidades en polihíbridos

Se calculan aplicando el término general de un polinomio. Por ejemplo, en el caso de cruces entre heterocigotos:

- Cálculo de las frecuencias genotípicas: las probabilidades de obtener un descendiente homocigoto dominante, heterocigoto u homocigoto recesivo en el cruce de un monohíbrido son 1/4, 1/2 y 1/4, respectivamente. Generalizando este caso, para n loci, la probabilidad de obtener un individuo cuyo genotipo sea dominante para d loci, heterocigoto para h loci y recesivo para de r loci será:

$$\frac{n!}{d!h!r!} (1/4)^d (1/2)^h (1/4)^r$$

Donde: $d+h+r = n$

- Cálculo de las frecuencias fenotípicas: las probabilidades de obtener un descendiente de fenotipo dominante o de fenotipo recesivo de un cruce monohíbrido son 3/4 y 1/4, respectivamente. Generalizando este caso, para n loci, la probabilidad de obtener un individuo cuyo fenotipo sea dominante para d loci, y recesivo para de r loci será:

$$\frac{n!}{d!r!} (3/4)^d (1/4)^r$$

Donde: $d+ r = n$

Prueba de la bondad del ajuste de chi-cuadrado

La **prueba de la bondad del ajuste de chi-cuadrado** es una prueba estadística que nos indica cuán correctamente se ajustan los valores observados a los valores esperados en un experimento. Esta prueba no sirve para conocer si un cruzamiento genético se ha realizado de forma correcta, si los resultados son correctos o si hemos elegido la explicación que más se ajusta a nuestros datos. En cambio, sí indica la probabilidad de que la diferencia entre los valores observados y los esperados se deba al azar. Se calcula mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\chi^2_{\text{exp}} = \sum \frac{(\text{Observados} - \text{Esperados})^2}{\text{Esperados}}$$

Donde los valores observados y esperados se consideran en valores absolutos.

A continuación se compara el valor calculado de χ^2 con los valores teóricos que poseen los mismos grados de libertad en una tabla de χ^2 . Los grados de libertad representan el número de formas en las cuales las clases esperadas son libres para variar. En la prueba de χ^2 los grados de libertad equivalen a $n-1$, donde n es el número de clases fenotípicas existentes.

En la tabla, los grados de libertad están indicados en la columna de la izquierda, mientras que la columna superior indica probabilidad. Normalmente se utiliza un nivel de probabilidad de 0.05, que indica que si la probabilidad de que el azar sea el responsable de la desviación observada es igual o mayor de 0.05, las diferencias observadas se deben al azar. Cuando esta probabilidad es menor de 0.05, el azar no es responsable de la desviación y existe una diferencia significativa entre los valores observados y los esperados. Así, si el valor experimental de χ^2 es menor que el valor teórico para un nivel de significación de 0.05 y un número de grados de libertad de n-1, no rechazamos la hipótesis que habíamos establecido *a priori* para explicarlos y asumimos que los valores observados se ajustan a los esperados. En caso contrario, rechazaríamos dicha hipótesis.

DISTRIBUCION DE χ^2

Grados de libertad	Probabilidad											
	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001	
1	0,004	0,02	0,06	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83	
2	0,10	0,21	0,45	0,71	1,39	2,41	3,22	4,60	5,99	9,21	13,82	
3	0,35	0,58	1,01	1,42	2,37	3,66	4,64	6,25	7,82	11,34	16,27	
4	0,71	1,06	1,65	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47	
5	1,14	1,61	2,34	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52	
6	1,63	2,20	3,07	3,83	5,35	7,23	8,56	10,64	12,59	16,81	22,46	
7	2,17	2,83	3,82	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32	
8	2,73	3,49	4,59	5,53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,12	
9	3,32	4,17	5,38	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88	
10	3,94	4,86	6,18	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59	
	No significativo								Significativo			

Un **pedigrí** es una representación gráfica de la historia familiar que muestra la herencia de una o más características o enfermedades (fenotipos en general). El propósito es facilitar el análisis genético de un fenotipo concreto examinando su patrón de herencia en una familia en particular.

Los símbolos que se pueden encontrar comúnmente son:

Hembra: ○

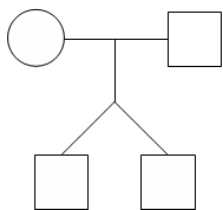
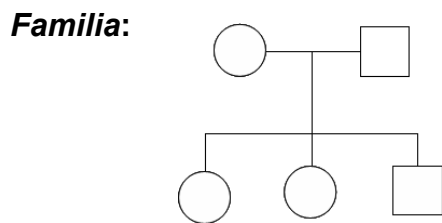
Macho: □

Sexo desconocido o no especificado: ◇

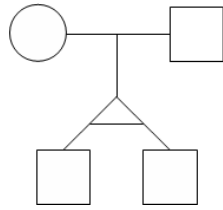
Presencia del rasgo: ● ■

Ausencia del rasgo: ○ □

Representación de dos caracteres: □□ ■□ □■ ■■



Gemelos dicigóticos



Gemelos monocigóticos

Las generaciones se suelen identificar con números romanos (I, II, III, IV, V,...) y dentro de cada generación se identifican los individuos con números arábigos (1, 2, 3, 4, 5,...).

1.2. PROBLEMAS RESUELTOS

Problema 1. Se cruzaron dos plantas de raza pura, una de tallo largo con otra de tallo corto. En la F2 se obtuvieron los siguientes fenotipos: 3/4 tallo largo y 1/4 tallo corto. El carácter tallo largo es dominante sobre el corto. ¿Cómo será el genotipo de los parentales, de los individuos de la F1 y los de la F2?

Respuesta

Denominemos T al alelo dominante que produce tallo largo y t al alelo recesivo.

Tallo largo > tallo corto

T > t (indica que T es dominante sobre t)

Los parentales son dos plantas de raza pura, una de tallo largo y otra de tallo corto. Por tanto, el genotipo de los individuos de este cruce será:

P tallo largo x tallo corto

TT x tt

F1 Todos los descendientes serán de fenotipo tallo largo y heterocigóticos (Tt).

Mediante autofecundación se obtiene la F2.

F2 Tt x Tt

TT Tt tt

3/4 tallo largo 1/4 tallo corto

Como dice el enunciado del problema, en la F2 se obtienen los siguientes fenotipos: 3/4 tallo largo y 1/4 tallo corto, que corresponden a los genotipos TT y Tt (tallo largo) y tt (tallo corto).

Problema 2. En la planta de guisante la posición axial de las flores es dominante sobre la posición terminal, representando por "A" el alelo para la posición axial y "a" para la terminal. Se obtienen 400 individuos del cruce de dos plantas heterocigóticas, ¿cuántas tendrán posición axial y cuántas tendrán posición terminal?

Respuesta

Posición axial > posición terminal

A>a

El cruce de dos plantas heterocigóticas será: Aa x Aa

Clases genotípicas y proporción en la descendencia: AA (1/4); Aa (1/2); aa (1/4)

Clases fenotípicas y proporción en la descendencia: 3/4 posición axial (AA + Aa); 1/4 posición terminal (aa)

Del total de 400 individuos: 300 tendrán flores en posición axial y 100 tendrán flores en posición terminal.

Problema 3. Se cruzaron plantas de pimiento picante con plantas de pimiento dulce. La F1 fue de frutos picantes y en la F2 se obtuvieron 32 plantas de pimientos picantes y 10 de pimientos dulces.

- a) ¿Cuántas de las plantas picantes se espera que sean homocigóticas y cuantas heterocigóticas?
b) ¿Cómo averiguar cuáles de las 32 plantas picantes son heterocigóticas?

Respuesta

P picante x dulce
F1 picantes (autofecundación para producir la F2)
F2 32 picantes, 10 dulces

El carácter picante es dominante sobre el dulce, ya que del cruce de los parentales (P) se obtiene una descendencia de fenotipo 100% picante:

Picante > dulce
A > a

Además, los parentales tienen que ser líneas puras:

P picante x dulce
AA x aa el 100% de la F1 serán plantas heterocigóticas, de fenotipo picante:

F1 picantes
Aa la autofecundación de la F1 produce plantas picantes y dulces en proporción 3:1,

F2 AA (1/4) Aa (1/2) aa (1/4)

3/4 picantes (AA + Aa) y 1/4 dulces (aa)

El número de plantas que se obtiene en la F2 son 32 picantes y 10 dulces, valores que se ajustan a las proporciones 3:1 esperadas.

Entre las plantas picantes, 1/3 son homocigóticas y 2/3 heterocigóticas. De esta forma, las 32 plantas de fenotipo picante pueden ser de genotipo AA (homocigóticas) o Aa (heterocigóticas), mientras que las de fenotipo dulce son aa.

- a) Hay dos posibilidades genotípicas para las plantas picantes: homocigóticas AA (1/3) y heterocigóticas Aa (2/3). Como se obtenían 32 plantas picantes en la F2: aproximadamente 11 plantas serán AA y 21 plantas serán Aa.
b) Para saber qué plantas picantes de la F2 son heterocigóticas, realizamos un cruzamiento prueba con plantas dulces (aa). En la descendencia obtendremos sólo plantas de pimiento picantes si el parental utilizado era homocigótico AA, mientras que si era heterocigótico Aa, 1/2 de los descendientes serán picantes y 1/2 serán dulces:

Picante x dulce
AA x aa
↓

Todas las plantas de la F1 serían picantes

Picante x dulce
Aa x aa
↓

1/2 picantes (Aa), 1/2 dulces (aa)

Problema 4. El albinismo (falta de pigmentación en la piel) en el hombre se debe a un alelo autosómico recesivo (a) mientras que la pigmentación normal es la consecuencia de un alelo dominante (A).

Dos progenitores normales tienen un hijo albino. Determinar la probabilidad de que:

- a) El siguiente hijo sea albino.
- b) Los dos hijos inmediatos sean albinos.
- c) Si los padres tienen dos hijos, que uno sea albino y el otro normal.

Respuesta

Pigmentación normal > falta de pigmentación o albinismo
(A>a)

Si dos progenitores con pigmentación normal tienen un hijo albino, es porque ambos padres tienen que ser heterocigóticos: Aa x Aa

Las proporciones genotípicas y fenotípicas de este cruce (Aa x Aa) serían:

Clases genotípicas y proporción en la descendencia: AA (1/4), Aa (2/4) y aa (1/4).

Clases fenotípicas y proporción en la descendencia: 3/4 pigmentación normal (AA +Aa) y 1/4 albinos (aa).

a) La respuesta al primer apartado sería 1/4, ya que “la probabilidad de que el siguiente hijo sea albino” es un suceso independiente, no influye que ya hayan tenido un hijo albino anteriormente.

b) En este caso los dos hijos inmediatos son albinos, por lo que hay que tener en cuenta la probabilidad de que uno sea albino “y” que el siguiente sea albino también (ambos sucesos son independientes).

Probabilidad de tener un hijo albino (1/4) “y” probabilidad de que el siguiente sea albino (1/4). Recordar la regla de la multiplicación (la probabilidad de que dos o más eventos independientes ocurran simultáneamente se calcula multiplicando sus probabilidades individuales).

Así que el resultado final será: $1/4 \times 1/4 = 1/16$.

c) Ahora tenemos que calcular la probabilidad de dos hijos, uno normal “y” otro albino. Probabilidad de tener un hijo normal (3/4) x probabilidad de uno albino (1/4)

Pero en este caso hay que tener en cuenta otra alternativa: que el primer hijo sea albino y el segundo normal [probabilidad de tener un hijo albino (1/4) x probabilidad de uno normal (3/4)].

Es decir, como el problema no establece el orden de nacimiento de los hijos, hay que tener en cuenta todas las posibilidades:

normal y albino “o” albino y normal

Aplicamos en este ejercicio la regla de la adición (la probabilidad de de que ocurra uno solo de dos o más eventos mutuamente excluyentes se calcula sumando las probabilidades de cada uno de ellos). Por tanto, el resultado final sería:

$$(3/4) \times (1/4) + (1/4) \times (3/4) = 6/16 = 3/8$$

Problema 5. La polidactilia en la especie humana se debe a un alelo autosómico dominante. Dos primos hermanos polidactílicos y cuyos abuelos comunes eran normales, desean tener siete hijos. Se desea saber las probabilidades siguientes:

- Que ningún hijo sea polidactílico.
- Que los dos mayores sean polidactílicos y los cinco siguientes sean normales.
- Que tres sean polidactílicos y cuatro no.
- Si los tres primeros fuesen normales, ¿cuál es la probabilidad de que el cuarto también lo sea? ¿y de que el quinto sea polidactílico?

Respuesta

Al ser la polidactilia un rasgo dominante y ambos miembros de la pareja ser polidactílicos pero sus abuelos comunes normales, ambos deben ser heterocigóticos Aa. Así el cruce es Aa x Aa y la probabilidad de tener un descendiente polidactílico (A_) será de 3/4 mientras que de ser normal será 1/4 (aa).

a) La probabilidad de que un hijo sea norma es 1/4. La probabilidad de que los siete sean normales será el producto de sus probabilidades individuales: $(1/4)^7 = 6,1 \times 10^{-5}$

b) $(3/4) \times (3/4) \times (1/4) \times (1/4) \times (1/4) \times (1/4) \times (1/4) = 5,5 \times 10^{-4}$

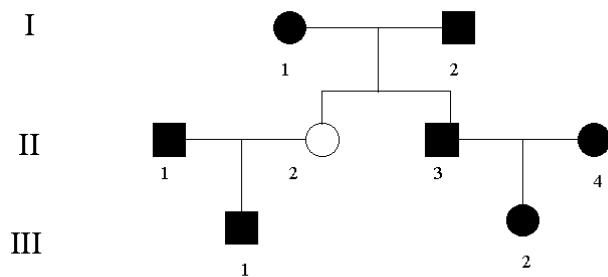
c) En este caso, al contrario de lo que ocurre en el apartado b en el que el orden de los descendientes estaba establecido, ahora existen diferentes posibilidades, tantas como combinaciones posibles de casos cumplan la condición de que tres de los descendientes sean polidactílicos y cuatro sean normales. Así:

$$P = \frac{n!}{s!t!} p^s q^t = \frac{7!}{3!4!} (3/4)^3 (1/4)^4 = 1,65 \times 10^{-3}$$

Donde P equivale a la probabilidad total de un suceso X (nacer con polidactilia) con la probabilidad p (3/4) de ocurrir s veces (3 descendientes polidactílicos) y de un evento Y (normal) con probabilidad q (1/4) de ocurrir t veces (4 descendientes normales).

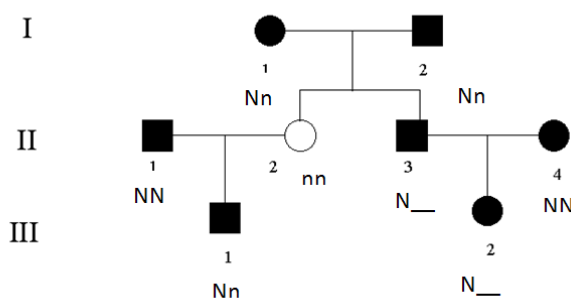
d) Son sucesos independientes uno de otro. Por tanto la probabilidad de que una pareja de heterocigotos tenga un hijo polidactílico es 3/4 y la de que tenga un hijo normal es 1/4, independientemente de la descendencia que haya tenido previamente.

Problema 6. El pelo negro de los cobayas está determinado por un alelo dominante N y el blanco por su alelo recesivo n. En el siguiente pedigrí, a menos que haya evidencias de lo contrario, asumir que los individuos II-1 y II-4 no llevan el alelo recesivo y calcular las probabilidades de que un descendiente III-1 x III-2 tenga pelo blanco (los símbolos sólidos representan pelo negro).



Respuesta

Los genotipos de cada individuo del pedigrí serán:



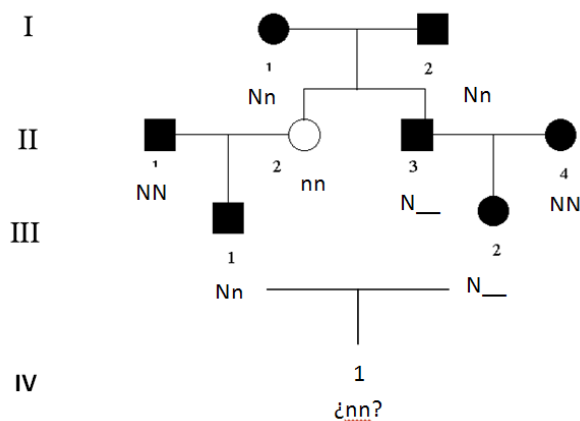
Los individuos I-1 y I-2 tienen que ser los dos heterocigotos porque tienen un descendiente (el individuo II-2) de pelo blanco.

Los individuos II-1 y II-4 son homocigotos dominantes para el carácter tal y como dice el enunciado del problema porque no hay evidencias de lo contrario.

El genotipo del individuo II-3 puede ser NN o Nn, en ambos casos su fenotipo es de pelo negro, pero tendríamos dos alternativas para el genotipo.

Lo mismo ocurre con el individuo III-2 dado que su genotipo puede ser NN o Nn, algo que dependerá del genotipo de su parental II-3 (que éste sea homocigótico dominante o heterocigoto).

El problema nos pide que calculemos las probabilidades de que un descendiente del cruce III-1 x III-2 tenga pelo blanco:



Para que el individuo IV-1 tenga el pelo blanco, el parental III-2 tiene que ser heterocigótico (así ambos parentales transmitirían al descendiente IV-1 el alelo "n").

Pero para que el individuo III-2 sea heterocigótico, el individuo II-3 también tiene que ser heterocigótico.

Vamos a calcular las probabilidades de que los ambos individuos (III-2 y II-3) tengan esos genotipos.

Cruce I-1 x I-2:

$$\begin{array}{c} \text{Nn} \times \text{Nn} \\ \downarrow \\ \text{NN} \quad \text{Nn} \quad \text{nn} \\ \underbrace{\hspace{2cm}} \\ \text{Pelo negro} \end{array}$$

Entre los descendientes de pelo negro, tendremos 1/3 de homocigóticos (AA) y 2/3 de heterocigóticos (Aa). Estos valores se corresponden con la relación 1:2 (1/4:2/4) entre homocigóticos y heterocigóticos del total de 3/4 de descendientes de pelo negro resultantes de un cruzamiento entre dos heterocigotos.

Así, la probabilidad de que el individuo II-3 sea heterocigótico será de 2/3.

Cruce II-3 x II-4:

$$\begin{array}{c} \text{Nn} \times \text{NN} \\ \downarrow \\ \text{NN} \quad \text{Nn} \\ \underbrace{\hspace{2cm}} \\ \text{Pelo negro} \end{array}$$

1/2 1/2

De este cruce obtendríamos el 100% de los descendientes con el pelo negro, pero la mitad serían homocigóticos dominantes y la otra mitad heterocigóticos. Así, la probabilidad de que el individuo III-2 sea heterocigótico es de 1/2.

Cruce III-1 x III-2:

$$\begin{array}{c} \text{Nn} \times \text{Nn} \\ \downarrow \\ \text{NN} \quad \text{Nn} \quad \text{nn} \\ \underbrace{\hspace{2cm}} \quad \underbrace{\hspace{2cm}} \\ \text{3/4 Pelo negro} \quad \text{1/4 pelo blanco} \end{array}$$

La probabilidad de obtener descendientes de pelo blanco de este cruce es de 1/4.

Así, la probabilidad total será: $2/3 \times 1/2 \times 1/4 = 2/24 = 1/12$

Problema 7. Un caballo negro de antepasados desconocidos fue apareado con cierto número de yeguas de color rojo de raza pura. Estos apareamientos dieron 20 descendientes de color rojo y 25 descendientes negros.

- ¿Cuál de dichos caracteres fenotípicos es más probable que esté causado por un homocigoto recesivo?
- Según su hipótesis, ¿cuántos individuos de cada clase habría esperado?
- Probar la hipótesis por el método de la χ^2 e indicar si, basándose en dicha prueba, se aceptaría o se rechazaría la hipótesis.

Respuesta

- Las hembras son de raza pura, así que serán homocigóticas para este carácter. Si fueran homocigóticas dominantes, toda la descendencia debería ser de color rojo. Así que asumimos que el color en los caballos está determinado por un locus con los alelos A (Negro) > a (Rojo) y que el carácter rojo se debe seguramente a la presencia en homocigosis del alelo recesivo a.
- Los genotipos de los progenitores y de la F1 deben ser los siguientes:

$$\begin{array}{c} \text{P: Caballo Negro Aa x Yegua Roja aa} \\ \downarrow \\ \text{F1: } \quad 1/2 \text{ Negros Aa} \quad \quad 1/2 \text{ Rojos aa} \end{array}$$

- El número de individuos observados es:

Negros Aa: 25
 Rojos aa: 20
 Total: 45

El número de individuos esperados según nuestra hipótesis es:

Negros Aa: 22,5 (1/2 de 45)
 Rojos aa: 22,5 (1/2 de 45)
 Total: 45

Realizamos la prueba de χ^2 para ver si los datos observados se ajustan a los esperados:

$$\chi^2_{\text{exp}} = \sum \frac{(\text{Observados} - \text{Esperados})^2}{\text{Esperados}} = (20-22,5)^2/22,5 + (25-22,5)^2/22,5 = 0,545$$

El valor de la χ^2 teórica para 1 grado de libertad (número de clases fenotípicas menos uno) y un nivel de significación de 0.05 es de 3.841. Dado que la χ^2 experimental es menor que la χ^2 teórica, no rechazamos la hipótesis propuesta y asumimos que los valores observados se ajustan a los esperados ($0.3 < p < 0.5$).

Problema 8. En el guisante de jardín (*Pisum sativum*) el color de las semillas se debe a dos alelos de un gen: el alelo A determina el color amarillo y es dominante sobre a que determina el color verde. Por otro lado, el alelo L es responsable de la formación de semillas lisas y domina sobre l que determina las semillas rugosas. Al cruzar una planta de semillas verdes y lisas con otra de semillas amarillas y lisas se ha obtenido una descendencia formada por unas plantas con semillas amarillas y lisas y otras con semillas amarillas y rugosas. Determinar los genotipos de los progenitores.

Respuesta

- Parental 1. Fenotipo: semillas verdes y lisas. Genotipo: al ser el color verde recesivo, la planta debe ser aa. Sin embargo, el carácter liso es dominante, por lo que debe tener al menos un alelo L_. Como su descendencia es tanto lisa (L_), como rugosa (ll), este parental debe ser heterocigoto (Ll). Por tanto, su genotipo será: aaLl

- Parental 2. Fenotipo: semillas amarillas y lisas. Genotipo: al presentar los dos caracteres dominantes, debe tener al menos un alelo dominante de cada gen: A_L_, pero podemos saber su genotipo si nos fijamos en la F1: todos los descendientes tienen semillas amarillas y puesto que el otro progenitor era de semillas verdes (aa), éste tiene que ser AA. En cuanto al otro carácter, puesto que en la F1 encontramos tanto individuos con semillas lisas como rugosas, el progenitor debe ser heterocigoto (Ll). Por tanto, su genotipo será: AALl

Problema 9. En los cobayas el pelaje negro (B) es dominante sobre albino (b), y la piel rugosa (R) es dominante sobre la piel lisa (r). Un cobaya negro y rugoso se cruza con otro albino y rugoso y produce la siguiente progenie: 13 negros rugosos, 16 albinos rugosos, 6 negros lisos y 5 albinos lisos. Identificar los genotipos de los padres, usando el método de χ^2 para probar la hipótesis.

Respuesta

El cruzamiento: negro-rugoso (B_R_) x albino-rugoso (bbR_). El hecho de que en la progenie haya individuos albinos-lisos (bbrr) nos indica que el genotipo de los padres debe ser: BbRr y bbRr.

Si nuestra hipótesis es correcta, en la descendencia del cruce BbRr x bbRr, esperaríamos:

Gametos/Proporción	bR (1/2)	br (1/2)
BR (1/4)	BbRR (1/8)	BbRr (1/8)
Br (1/4)	BbRr (1/8)	Bbrr (1/8)
bR (1/4)	bbRR (1/8)	bbRr (1/8)
br (1/4)	bbRr (1/8)	bbrr (1/8)

Es decir:

Negro-rugoso (B_R_): 3/8

Negro-liso (B_rr): 1/8

Albino-rugoso (bbR_): 3/8

Albino-liso (bbrr): 1/8

Aplicamos el test de χ^2 para probar nuestra hipótesis:

Los resultados observados son:

Los resultados esperados son:

Negros-rugosos: 13

$40 \times 3/8 = 15$

Negros-lisos: 6

$40 \times 1/8 = 5$

Albinos-rugosos: 16

$40 \times 3/8 = 15$

Albinos-lisos: 5

$40 \times 1/8 = 5$

Total: 40

Puesto que hay cuatro clases fenotípicas, el número de grados de libertad es: $4-1=3$.

$$\chi^2_{\text{exp}} = \sum \frac{(\text{Observados} - \text{Esperados})^2}{\text{Esperados}} = 0.53; (0.9 < p < 0.95)$$

$$\chi^2_{\text{teórica}} (3; 0,05) = 7,815$$

No se rechaza la hipótesis, por lo que podemos concluir que el genotipo de los padres es: BbRr x bbRr

Problema 10. Dos condiciones anormales en el hombre, las cataratas y la fragilidad de huesos, son debidas a alelos dominantes de dos genes diferentes. Una pareja formada por un hombre con cataratas y huesos normales (cuyo padre tenía ojos normales) y una mujer sin cataratas pero con huesos frágiles (cuyo padre tenía huesos normales), desean tener hijos. Indicar la probabilidad de que tengan:

- Un descendiente normal
- Un descendiente con cataratas y huesos normales
- Un descendiente con ojos normales y huesos frágiles
- Un descendiente que padezca ambas enfermedades

Respuesta

Si denominamos C/c y H/h a los alelos de los genes implicados, siendo C/c los alelos dominante y recesivo del gen implicado en el desarrollo de cataratas y H/h los del gen implicado en la fragilidad de los huesos, el genotipo del hombre es Cchh. Al tener su padre los ojos normales, lo que quiere decir que es homocigoto para este carácter, el hombre tiene que ser portador de un alelo recesivo para este carácter. El genotipo de la mujer es ccHh. Al igual que en el hombre, su padre era homocigoto recesivo para el carácter de huesos y, por tanto, debe portar un alelo recesivo.

Los gametos que produce cada uno de ellos son:

Hombre: Ch y ch

Mujer: cH y ch

El resultado del cruzamiento entre ambos sería:

Gametos/Proporción	cH (1/2)	ch (1/2)
Ch (1/2)	CcHh (1/4)	Cchh (1/4)
ch (1/2)	ccHh (1/4)	cchh (1/4)

Así:

a) La probabilidad de que tengan un descendiente normal, es decir que sea doble homocigoto recesivo (cchh), es de 1/4.

b) En este caso se nos pide la probabilidad de un descendiente con cataratas y huesos normales, por tanto el genotipo es Cc o CC para las cataratas y hh para huesos normales.

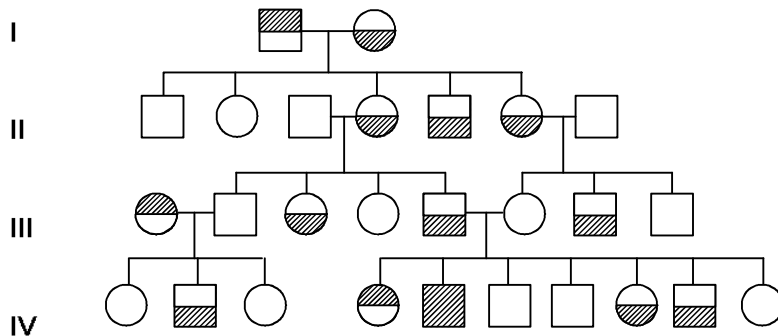
Como se puede ver en la cuadro de Punnet, sólo uno de los cuatro posibles descendientes (Cchh) cumple las condiciones, por lo que la frecuencia es 1/4.

c) Un descendiente con ojos normales y huesos frágiles tiene como genotipos posibles ccHh o ccHH. Si observamos la tabla, vemos que, en este cruce, sólo se obtiene el genotipo ccHh, con una probabilidad de 1/4.

d) Por último, se nos pide la probabilidad de que nazca un individuo con ambas enfermedades. Esto quiere decir que el individuo puede tener como genotipos posibles CCHH, CCHh, CcHH o CcHh. Sólo uno de estos genotipos (CcHh) puede producirse en este cruzamiento. La probabilidad de obtenerlo es de 1/4.

Problema 11. En el siguiente pedigrí se presenta la transmisión de dos caracteres en una sola familia. El carácter 1 se indica sombreando la mitad superior del símbolo y el carácter 2 se indica sombreando la mitad inferior. Utilizando símbolos alfabéticos para los genes implicados (por ejemplo A/a para el carácter 1 y B/b para el carácter 2) responder a las siguientes preguntas:

- a) ¿Qué tipo de herencia se halla implicado en cada uno de los caracteres?
- b) Determinar hasta donde sea posible los genotipos de todos los individuos de la genealogía
- c) ¿Qué genotipos y fenotipos y qué proporciones se esperarían en el apareamiento entre los individuos IV-3 y IV-5?



Respuesta

a) Carácter 1: Dos individuos que no presentan el rasgo en sombreado (III-5 y III-6) tienen una hija (IV-4) y un hijo (IV-5) que lo presentan, por lo que debe ser recesivo.

Carácter 2: Dos individuos sin el rasgo en sombreado (III-1 x III-2) tienen un hijo que sí lo manifiesta (IV-2). Igualmente, debe ser recesivo.

En ambos casos, sólo hay dos fenotipos y la genealogía puede interpretarse considerando que en la herencia de ambos caracteres los rasgos (fenotipos) que aparecen en sombreado están determinados por alelos recesivos de sendos genes autosómicos A/a y B/b.

b) Los genotipos de los individuos serán:

I-1, aaBb	I-2, A_bb	
II-1, AaBb	II-2, AaBb	II-3, A_Bb
II-4, Aabb	II-5, Aabb	II-6, Aabb
II-7, A_Bb		
III-1, aaBb	III-2, A_Bb	III-3, A_bb
III-4, A_Bb	III-5, Aabb	III-6, AaBb
III-7, A_bb	III-8, A_Bb	
IV-1, AaB_	IV-2, Aabb	IV-3, AaB_
IV-4, aaBb	IV-5, aabb	IV-6, A_Bb
IV-7, A_Bb	IV-8, A_bb	IV-9, A_bb
IV-10, A_Bb		

c) IV-3 es de genotipo AaBB ó AaBb. La probabilidad de cada una de estas combinaciones dependerá de la constitución genotípica de sus padres:

$$\begin{array}{ccc}
 \text{III-1} & \times & \text{III-2} \\
 \text{aaBb} & & \text{A_Bb} \\
 \downarrow & & \\
 \text{IV-3 AaB_} & &
 \end{array}$$

Como sabemos que IV-3 es de fenotipo dominante, será AaBB con probabilidad 1/3 y AaBb con probabilidad 2/3. No importa cómo sean sus padres para el locus A,a, ni que no se sepa con exactitud cuál es el genotipo de su madre para este locus, ya que sabemos que IV-3 es Aa con probabilidad 1.

Por tanto, y dado que IV-5 es aabb, los dos cruces posibles serán:

(1/3) AaBB x aabb		(2/3) AaBb x aabb
	↓	
1/2 AaBb		1/4 AaBb
1/2 aaBb		1/4 aaBb
		1/4 Aabb
		1/4 aabb

El primer cruce tiene una probabilidad de 1/3 y el segundo de 2/3, Combinándolos, obtendremos la solución a la pregunta:

Genotipos	Proporciones	Fenotipos
AaBb	$1/2 \times 1/3 + 1/4 \times 2/3 = 1/3$	Dominante para A y B (AB)
aaBb	$1/2 \times 1/3 + 1/4 \times 2/3 = 1/3$	Dominante para B (aB)
Aabb	$1/4 \times 2/3 = 1/6$	Dominante para A (Ab)
aabb	$1/4 \times 2/3 = 1/6$	Recesivo para A y B (ab)

Problema 12. En los gallos y gallinas, el rasgo patas plumosas (F) es dominante sobre el rasgo patas limpias (f) y la cresta en guisante (P) sobre la cresta sencilla (p). Dos gallos A y B se cruzan con dos gallinas C y D. Las cuatro aves tienen patas plumosas y la cresta en guisante. El gallo A tiene con ambas gallinas descendencia toda plumosa y con cresta en guisante. El gallo B con la gallina C tiene descendientes con las patas plumosas o limpias,

pero todos con la cresta en guisante. El gallo B con la gallina D tiene todos los descendientes plumosos, pero parte con la cresta en guisante y parte con la cresta sencilla. ¿Cuáles son los genotipos de las cuatro aves progenitoras y de los descendientes de cada cruce?

Respuesta

Los individuos progenitores, A, B, C y D, por tener patas plumosas y cresta en guisante, serán F_P_. Habrá que averiguar cómo son los otros dos alelos estudiando cada cruce:

Cruces A x C y A x D (F_P_ x F_P_)

Toda la descendencia es plumosa con la cresta en guisante: F_P_. El que no aparezcan individuos con patas limpias (ff) nos indica que es altamente improbable que ambos progenitores porten el alelo f (sin embargo, sí podría llevarlo uno de ellos en cada cruce). Por la misma razón, al no aparecer individuos con cresta sencilla (pp) debemos pensar que el alelo p será portado por un progenitor como máximo en cada cruce.

Por el momento no pueden extraerse más conclusiones de estos cruces.

Cruce B x C (F_P_ x F_P_)

Los descendientes son de dos tipos: de patas plumosas y cresta en guisante (F_P_) y de patas limpias y cresta en guisante (ffP_).

Ello nos lleva a afirmar que B y C son heterocigotos para el gen F (Ff), ya que en su descendencia se encuentra la combinación ff. Respecto al segundo locus, como en los cruces anteriores, resultará muy improbable que ambos progenitores lleven el alelo recesivo, aunque uno de ellos podría ser portador del mismo.

Cruce B x D (FfP_ x F_P_)

Los descendientes son: plumosos con cresta en guisante (F_P_) o plumosos con cresta sencilla (F_pp).

Se deduce, por un razonamiento similar al anterior, que B y D son portadores del alelo p, y que sólo uno de ellos llevará el alelo f, en este caso, B. Por tanto, el genotipo de B es, sin género de dudas, FfPp y el de la hembra D es FFPP.

Revisando el cruce B x C, ahora que sabemos el genotipo de B podemos afirmar que el de la hembra C es FfPP.

Volviendo ahora a los cruces A x C y A x D, dado que C porta el alelo f, A no lo llevará probablemente, ni tampoco el p, ya que lo lleva D. Así, el genotipo de A será, por tanto, FFPP.

De este modo, los cruzamientos habrán sido:

A x C: FFPP x FfPP
 ↓
 FFPP Todos plumosos con
 FfPP cresta en guisante

A x D: FFPP x FFPP
 ↓
 FFPP Todos plumosos con
 FFPP cresta en guisante

B x C: FfPp x FfPP
 ↓
 FFPP Plumosos con cresta
 FFPP en guisante
 FfPP
 FfPp
 ffPP De patas limpias y
 ffPp cresta en guisante

B x D: FfPp x FFPP
 ↓
 FFPP Plumosos con cresta
 FfPP en guisante
 FFPP
 FfPp
 Ffpp Plumosos con cresta
 Ffpp sencilla

Problema 13. Si se autofecunda un individuo heterocigótico para cinco loci independientes (AaBbCcDdEe):

- ¿Cuántos gametos genéticamente distintos puede producir?
- ¿Qué número de genotipos diferentes aparecerán en la descendencia?
- ¿Cuál es la frecuencia esperada de individuos heterocigóticos para tres loci y homocigóticos dominantes para los dos restantes?
- ¿Cuál es la frecuencia esperada de descendientes AaBbCcDDEE?

Respuesta

a) El individuo es un pentaheterocigoto, es decir, heterocigoto para cinco loci. Como los genes son independientes, la segregación de cada uno de ellos es un suceso independiente de los demás. Hagamos el siguiente razonamiento: Si tenemos en cuenta, por ejemplo, solamente el gen A,a, podemos concluir que un individuo heterocigoto producirá dos tipos diferentes de gametos, uno con el alelo A y otro con el alelo a. El mismo resultado obtendremos si lo hacemos con el resto de los genes ya que el individuo es heterocigoto para los 5 genes. El resultado, puesto que son sucesos independientes, será: $2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2$, es decir, $2^5 = 32$.

b) La descendencia de un cruce pentahíbrido, se ajusta, para cada gen, a las proporciones genotípicas mendelianas: 1/4: 1/2: 1/4. Por ejemplo, para el gen A,a, son 1/4 AA, 1/2 Aa, 1/4 aa, vemos que hay 3 clases genotípicas. Lo mismo ocurre para el resto de los genes y como los cinco genes son independientes, el número de genotipos diferentes es: $3 \times 3 \times 3 \times 3 \times 3 = 3^5 = 243$

c) Puesto que la pregunta no concreta qué genes deben ser los heterocigotos y cuales los homocigotos, podemos calcular las frecuencias genotípicas utilizando la función de probabilidad de la distribución binomial:

$$\text{Probabilidad} \begin{pmatrix} d \text{ loci homocigóticos XX} \\ h \text{ loci heterocigóticos Xx} \\ r \text{ loci homocigóticos xx} \end{pmatrix} = \frac{n!}{d!h!r!} (1/4)^d (1/2)^h (1/4)^r$$

donde n = número de loci

Que, en el caso de la pregunta formulada en el enunciado, resulta ser:

$$\text{Probabilidad} \begin{pmatrix} 2 \text{ loci homocigóticos XX} \\ 3 \text{ loci heterocigóticos Xx} \\ 0 \text{ loci homocigóticos xx} \end{pmatrix} = \frac{5!}{2!3!0!} (1/4)^2 (1/2)^3 (1/4)^0 = \frac{10}{128} = \frac{5}{64}$$

d) En este caso, la pregunta incluye la descripción detallada del genotipo de cada uno

de los cinco genes, así que para el cálculo de frecuencias multiplicaremos las probabilidades de los genotipos en cada locus:

$$P(AaBbCcDDEE) = P(Aa) \cdot P(Bb) \cdot P(Cc) \cdot P(DD) \cdot P(EE) = \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} = \frac{1}{128}$$

1.3. PROBLEMAS PARA RESOLVER

Problema 1. Mendel descubrió que en los guisantes la posición axial de las flores es dominante sobre la posición terminal. Representamos por "A" el alelo para la posición axial y por "a" para la terminal. Determinar las clases de progenie producida por cada uno de los siguientes cruzamientos:

- a) AA x aa;
- b) AA x Aa;
- c) Aa x aa;
- d) Aa x Aa.

Problema 2. La braquidactilia es un carácter humano raro dominante que causa el acortamiento de los dedos. Varios estudios han puesto de manifiesto que aproximadamente la mitad de la progenie de matrimonios braquidactílicos x normal son braquidactílicos. ¿Que proporción de descendientes braquidactílicos cabría esperar entre dos individuos heterocigóticos?

Problema 3. El pelo rizado en perros domina sobre el liso. Del cruce de una pareja de perros de pelo rizado se tuvo un cachorro de pelo rizado. ¿Qué tipo de cruce se podría hacer para comprobar si el cachorro es heterocigoto para este carácter?

Problema 4. En un experimento A, una cobaya de pelo blanco se cruza con otra de pelo negro y toda la descendencia obtenida es de pelo blanco. En un experimento B, una cobaya también de pelo blanco se cruza también con una de pelo negro, pero esta vez la descendencia está compuesta por 5 cobayas de pelo negro y otras 5 de pelo blanco. ¿Cómo serán los genotipos de los parentales y la descendencia en los distintos experimentos?

Problema 5. En los gatos, el pelaje negro es dominante sobre el gris. Se aparea una hembra de pelo negro cuya madre es gris, con un macho gris. Si la camada obtenida está compuesta de seis cachorros, ¿cuál es la probabilidad de que tres sean negros y tres grises?

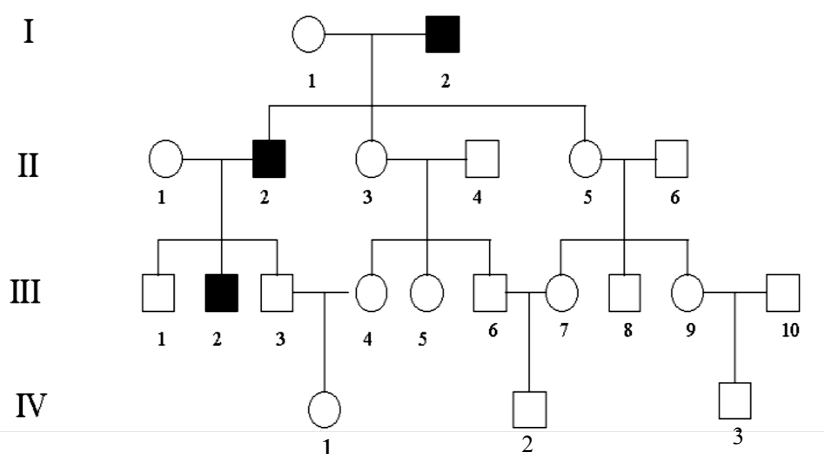
Problema 6. La ausencia de molares en la especie humana se debe a un alelo autosómico dominante. Del matrimonio de dos primos hermanos sin molares y cuyos abuelos comunes eran normales, nacen cinco hijos. Se desea saber las probabilidades siguientes:

- a) Todos los hijos sin molares.
- b) Los dos mayores sin molares y los tres pequeños con ellos.
- c) Tres con molares y dos sin ellos.
- d) Si los cuatro primeros son normales, ¿cuál es la probabilidad de que el quinto también lo sea? ¿y de que ese quinto no tuviera molares?.

Problema 7. El alelo recesivo r de un gen es la causa principal del color rojo del cabello en la especie humana. El cabello oscuro se debe al alelo dominante R. En el pedigrí mostrado a continuación asuma, a menos de que haya evidencia de lo contrario, que los individuos que se casan con los miembros de esta familia no son portadores del alelo r. Calcule la probabilidad de que un hijo de estos matrimonios tenga el pelo rojo:

- a) III-3 x III-9.
- b) III-4 x III-10.
- c) IV-1 x IV-2.
- d) IV-1 x IV-3.

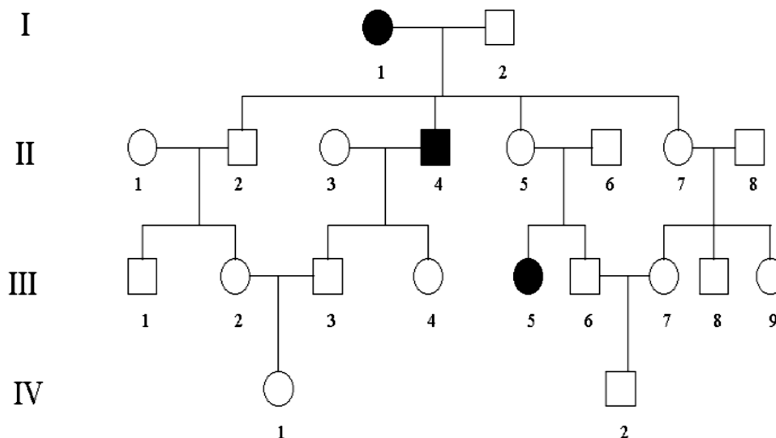
Los símbolos negros representan cabello rojo; los símbolos blancos, cabello oscuro.



Problema 8. El alelo que determina el pelaje moteado en los conejos (S) es dominante respecto al alelo para el color sólido (s). En el siguiente pedigrí considere que aquellos individuos que se han unido con los miembros de esta familia no son portadores del alelo del color sólido (s), a menos que esté demostrado lo contrario. Calcule las probabilidades de que nazcan conejos de color sólido en los siguientes apareamientos:

- a) III-1 x III-9.
- b) III-1 x III-5.
- c) III-3 x III-5.
- d) III-4 x III-6.
- e) III-6 x III-9.
- f) IV-1 x IV-2.
- g) III-9 x IV-2.
- h) III-5 x IV-2.
- i) III-6 x IV-1.

Los símbolos negros representan a los animales de color sólido; los símbolos blancos a animales moteados.



Problema 9. El pelaje negro en los cocker spaniels está gobernado por el alelo dominante B de un locus y el color rojo por su alelo recesivo b. El patrón uniforme del color está gobernado por el alelo dominante de un locus S, que se transmite independientemente, y el patrón moteado por su alelo recesivo s. Un macho de pelo color negro y uniforme se aparea con una hembra de color rojo y piel moteada, y producen una camada de seis cachorros: dos de color negro uniforme, dos rojo moteado, uno negro moteado y uno rojo uniforme. Determinar los genotipos de los progenitores.

Problema 10. Una planta leguminosa de tallo alto, legumbre amarilla y semilla redonda se cruza con otra enana, verde y redonda, dando lugar a 3/8 de plantas altas, verdes y redondas, 3/8 de enanas, verdes y redondas, 1/8 de altas, verdes y rugosas y 1/8 de enanas, verdes y rugosas. Determinar los genotipos de los padres.

Problema 11. En la F2 de dos variedades de maíz, obtenidas por el cruce de razas que diferían en dos genes, se obtuvieron las siguientes segregaciones fenotípicas:

	AB	Ab	aB	ab
Variedad a	117	26	18	7
Variedad b	82	12	33	8

¿Es significativa la desviación respecto de la segregación 9:3:3:1 en cada caso?

Problema 12. El cabello oscuro (R) en *Homo sapiens*, es dominante sobre cabello rojo (r). El color marrón de los ojos (M) domina sobre el azul (m). Una pareja formada por un hombre de ojos marrones y cabello oscuro y una mujer también de cabello oscuro, pero de ojos azules, tuvieron dos hijos, uno de ojos marrones y pelo rojo y otro de ojos azules y pelo oscuro. Determinar los genotipos de los padres y los de los hijos razonando la respuesta.

Problema 13. El cruzamiento de dos individuos de *Drosophila* de tipo salvaje dio una descendencia F1 enteramente de tipo salvaje. Cada mosca de la F1 fue posteriormente cruzada con moscas de ala reducida (mut. vestigial -vg-) y cuerpo negro (mut. ebony -e-). Se obtuvieron los resultados siguientes:

1/4 de los cruces dio: salvajes, vestigial, ebony, vestigial-ebony en la proporción 1:1:1:1.

1/4 de los cruces dio: una descendencia en la que todos eran salvajes.

1/4 de los cruces dio: salvajes, vestigial, en la proporción 1:1.

1/4 de los cruces dio: salvajes, ebony, en la proporción 1:1.

¿Cuáles son los genotipos de los dos individuos de la generación parental?

Problema 14. Teniendo en cuenta que en el tomate, el color rojo es dominante sobre el amarillo y el tamaño normal es dominante sobre el enano, si se cruzan tomates rojos híbridos y de tamaño normal homocigóticos, con una variedad amarilla enana. ¿Qué proporción de los tomates rojos de la F2 serán enanos?

Problema 15. Si dos pares de alelos se transmiten independientemente, siendo A dominante sobre a y B sobre b, ¿cuál es la probabilidad de obtener: a) un gameto Ab a partir de un individuo AaBb, b) un cigoto AABB a partir de un cruzamiento AaBB x AaBb, c) un gameto Ab a partir de un individuo AABb, d) un cigoto AABB a partir de un cruzamiento aabb x AABB, e) un fenotipo AB a partir de un cruzamiento AaBb x AaBb, f) un fenotipo AB a partir de un cruzamiento AaBb x AABB, y g) un fenotipo aB a partir de un cruzamiento AaBb x AaBB?

Problema 16. El carácter normal de pata hendida en los cerdos es producido por el alelo recesivo m, mientras que el alelo dominante M produce una condición de pata de mula. El color blanco del pelo está determinado por un alelo dominante de otro locus B y el negro por su alelo recesivo b. Un cerdo blanco con pata de mula se cruza con una hembra del mismo fenotipo. Entre la descendencia se encontraron seis cerdos blancos con pezuña normal; siete negros con pata de mula; quince blancos con pata de mula y tres negros con pezuña normal. Si se realiza un retrocruzamiento entre uno de los parentales y los individuos de la F1 con color negro con pata hendida ¿Qué frecuencia fenotípica podría esperarse entre la descendencia?

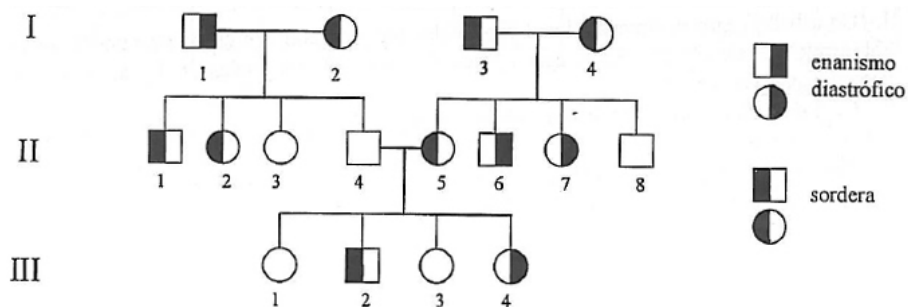
Problema 17. Una planta heterocigótica para 4 genes independientes (Aa Bb Cc Dd) se autofecunda. Determinar la frecuencia esperada de los siguientes genotipos en la progenie de esta planta: 1) aa bb cc dd; 2) aa bb Cc Dd; 3) Aa Bb Cc Dd.

Problema 18. Se ha obtenido una planta que es heterocigótica para 6 loci independientes (AaBbCcDdEeFf) cada uno de ellos con dos alelos y con dominancia completa. Suponiendo que se autofecunda dicha planta, se desea saber:

- ¿Cuál es la probabilidad de que un descendiente sea triple heterocigoto?
- ¿Cuál es la probabilidad de que un descendiente sea heterocigoto para cuatro loci y homocigoto recesivo para los otros dos
- ¿Cuál es la probabilidad de que un descendiente sea homocigoto AA y heterocigoto para los restantes loci?
- ¿Cuántos genotipos distintos pueden formarse que sean heterocigotos para dos loci?

Problema 19. Una pareja heterocigótica para 5 genes independientes, tiene un hijo. Si denominamos A,B,C,D,E, a los alelos dominantes y a,b,c,d,e, a los alelos recesivos de estos loci ¿Cuál es la probabilidad de que el hijo tenga fenotipo dominante para 3 de estos caracteres? ¿Y fenotipo ABcde?

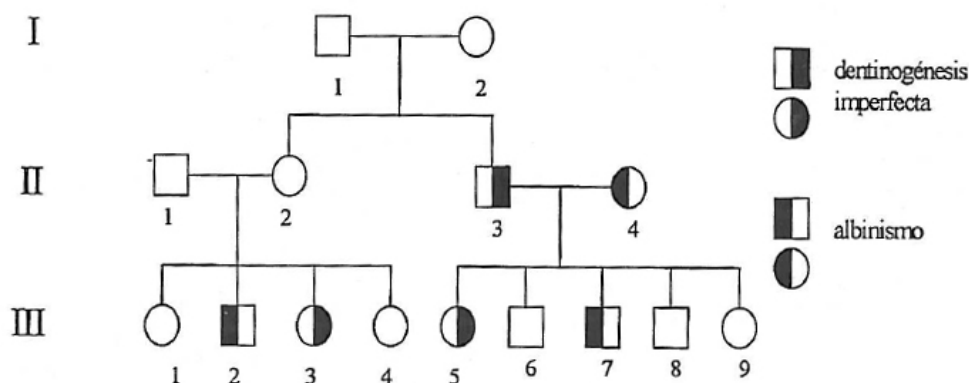
Problema 20. La siguiente genealogía muestra a una familia afectada por dos enfermedades que aparecen con baja frecuencia en la especie humana y que se sabe son debidas a genes situados en diferentes cromosomas.



- a) ¿Cuál es el tipo de herencia de cada una de estas enfermedades (determinar los genotipos de todos los individuos de la genealogía)?
- b) Calcular la probabilidad de que el primer descendiente de II-1 y III-4 sea:
- 1) sano/a
 - 2) con sordera
 - 3) afectado/a de enanismo
 - 4) afectado/a sólo por cualquiera de las dos enfermedades.
- c) Si II-1 y III-4 tienen dos descendientes, ¿cuál es la probabilidad de que cada uno esté afectado por una enfermedad diferente?
- d) Si tienen 3 hijos, ¿cuál es la probabilidad de que dos estén afectados de sordera y el otro de enanismo diastrófico?

Problema 21. La siguiente genealogía muestra una familia afectada por dos enfermedades que aparecen con baja frecuencia en la especie humana,

dentinogénesis imperfecta y albinismo, y que se deben a genes situados en diferentes cromosomas.



- a) ¿Cuál es el tipo de herencia de cada una de estas enfermedades?
- b) Determinar los genotipos de todos los individuos de la genealogía
- c) Calcular la probabilidad de que el primer descendiente de III-3 y III-7 sea:
- 1) sano,
 - 2) afectado por las dos enfermedades
- d) Si III-3 y III-7 tienen cuatro descendientes, ¿cuál será la probabilidad de que
- 1) dos estén afectados por dentinogénesis?
 - 2) sólo el tercero sea albino?

Problema 22. Se sabe que el color del pelaje en los ratones está determinado por varios genes. La presencia de una banda amarilla de pigmento cerca de la punta del pelo se llama patrón "agutí" y es producida por el alelo dominante A. La condición recesiva de este locus (aa) no tiene esta banda subapical y se conoce como no agutí. El alelo dominante de otro locus B produce color negro y el genotipo recesivo bb produce café. El genotipo homocigótico cc restringe la producción de pigmento a las extremidades del cuerpo en un patrón denominado Himalaya, mientras que el alelo dominante C permite que el pigmento se distribuya sobre todo el cuerpo. Al cruzar ratones de raza pura agutís, color café y patrón Himalaya con ratones, también de raza pura, no agutís, negros, no Himalayas, a) ¿cuáles son las proporciones fenotípicas esperadas en la F1 y en la F2? b) ¿Qué porcentaje de la F2 totalmente coloreada, negra y agutí se espera que sea de genotipo AaBBcc? c) ¿Qué porcentaje de todos los ratones Himalaya de la F2 podrían mostrar el pigmento café? d) ¿Qué porcentaje de todos los agutís en la F2 podría esperarse que muestren pigmento negro?

1.4. SOLUCIONES A LOS PROBLEMAS

Problema 1

- a) 100% Aa (fenotipo posición axial)
- b) 50% AA (fenotipo posición axial); 50% Aa (fenotipo posición axial)
- c) 50% Aa (fenotipo posición axial); 50% aa (fenotipo posición terminal)
- d) 25% AA (fenotipo posición axial); 50% Aa (fenotipo posición axial); 25% aa (fenotipo posición terminal)

Problema 2

75% Braquidactílicos (BB y Bb)

Problema 3

Un cruce de prueba con una hembra de pelo liso.

Problema 4

Experimento A: BB (blanco) x bb (negro): 100% Bb (blanco)
Experimento B: Bb (blanco) x bb (negro): 50% Bb (blanco), 50% bb (negro)

Problema 5. 5/16

Problema 6

- a) $243/1024=23.7\%$
- b) $9/1024 = 0.8\%$
- c) $90/1024 = 8.8\%$
- d) normal $1/4$; sin molares $3/4$

Problema 7

Genotipos:

I-1: Rr I-2: rr

II-1: Rr II-2: rr II-3: Rr II-4: RR II-5: Rr II-6: RR

III-1: Rr III-2: rr III-3: Rr III-4: R_ III-5: R_ III-6: R_ III-7: R_ III-8: R_ III-9: R_ III-10: RR

IV-1: R_ IV-2: R_ IV-3: R_

a) $1/8$

b) 0

c) $1/4 \times 7/12 \times 5/12 = 0.061$

d) $1/4 \times 7/12 \times 1/4 = 0.036$

Problema 8

Genotipos:

I-1: ss I-2: Ss

II-1: SS II-2: Ss II-3: SS II-4: ss II-5: Ss II-6: Ss II-7: Ss II-8: SS

III-1: S_ III-2: S_ III-3: Ss III-4: Ss III-5: ss III-6: S_ III-7: S_ III-8: S_ III-9: S_

IV-1: S_ IV-2: S_

- a) 1/16.
- b) 1/4.
- c) 1/2.
- d) 1/6.
- e) 1/12.
- f) 0.069.
- g) 0.059.
- h) 0.236.
- i) 0.097.

Problema 9. BbSs x bbss

Problema 10. Con los datos aportados no se puede conocer cuál de los dos fenotipos que afectan a la altura del tallo (alto o enano) es dominante.

V = legumbre verde; v = legumbre amarilla

R =semilla redonda; r = semilla rugosa.

Así, una posibilidad sería:

Tallo alto, legumbre amarilla y semilla redonda: AavvRr

Tallo enano, legumbre verde y semilla redonda: aaVVRr

Alternativamente:

Tallo alto, legumbre amarilla y semilla redonda: aavvRr

Tallo enano, legumbre verde y semilla redonda: AaVVRr

Problema 11. La desviación de la variedad **a** sí es significativa respecto a la proporción 9:3:3:1;

$\chi^2_{3g.l.}$ experimental= 13,27. (P<0,005). La $\chi^2_{3g.l.}$ teórica = 7,81, P <0.01

La desviación de la variedad **b** también es significativa respecto a la proporción 9:3:3:1;

$\chi^2_{3g.l.}$ experimental= 9,84. (P:0,02-0,01). La $\chi^2_{3g.l.}$ teórica = 7,81.

Problema 12. Hombre: MmRr. Mujer: mmRr. Hijos: Mmrr, mmR_

Problema 13. vg⁺vg⁺e⁺e⁺, vg⁺vg e⁺e

Problema 14.

Parentales: RrNN (Rojos Normales) x rrnn (Amarillos Enanos)

F1: Rr Nn (Rojos normales), rrNn (amarillos normales)

F2: La proporción de tomates rojos que son enanos es 1/4.

Problema 15. a) 1/4; b) 1/8; c) 1/2; d) 0; e) 9/16; f) 1; g) 1/4

Problema 16. 1/4 blanco-normal:1/4 blanco-mula:1/4 negro-normal:1/4 negro-mula.

Problema 17.

- 1) $(1/4)^4 = 0.0039$
- 2) $(1/2)^2(1/4)^2 = 0.0156$
- 3) $(1/2)^4 = 0.0625$

Problema 18.

- a) $20/64=0.3125$ b) $15/256=0.0586$ c) $1/128=0.0078$ d) 240

Problema 19.

- a) $P = 0,26$
- b) $P = 0,009$

Problema 20.

- 1) Sordera: autosómico dominante; Enanismo: autosómico recesivo.

S (sordera) > s y E > e (enanismo)

I-1: eess; I-2: E_Ss; I-3: EeSs; I-4: EeSs

II-1: EeSs; II-2: EeSs; II-3: Eess; II-4: Eess; II-5: EeSs; II-6: eess; II-7: eess; II-8: E_ss

III-1: E_ss; III-2: E_Ss; III-3: E_ss; III-4: eess

- 2) a) 1/4 b) 1/2 c) 1/2 d) 1/2
- 3) 1/8
- 4) 3/64

Problema 21.

- a) Albinismo y dentinogénesis son autosómicas recesivas.
- b) $D>d$ (dentinogénesis imperfecta) y $A>a$ (albinismo)

I-1: DdA_; I-2: DdA_

II-1: DdAa; II-2: DdAa; II-3: ddAa; II-4: Ddaa

III-1: D_A_; III-2: D_aa; III-3: ddA_; III-4: D_A_; III-5: ddAa; III-6: DdAa; III-7: Ddaa; III-8: DdAa; III-9: DdAa

- c) 1) 1/3; 2) 1/6
- d) 1) $3/8=0,375$; 2) $8/81=0,0987$

Problema 22.

- a) Genotipo de los parentales: AAbbcc x aaBBCC; F1: todos AaBbCc (agutí-negro-no Himalaya); F2: las proporciones de un trihíbrido: 27:9:9:9:3:3:3:1
- b) $2/3 \times 1/3 \times 2/3 = 4/27$ (14,8%)
- c) 25%
- d) 75%

2.- EXTENSIONES DEL MENDELISMO

2.1. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Genes ligados al sexo

Estos genes están situados en el segmento diferencial del cromosoma X y muestran diferentes proporciones fenotípicas en cruces recíprocos. El padre los transmite a sus hijas y la madre a sus hijos e hijas.

¿Cómo distinguir si un carácter es debido a una mutación recesiva ligada al sexo?

- Los machos presentan el carácter más frecuentemente que las hembras.
- La mitad de los hijos de mujeres portadoras presentan el carácter y ninguna de sus hijas (si el padre no presenta el carácter).
- Si la madre es homocigota normal, los hijos de machos con el carácter no presentan el carácter y las hijas son portadoras.

¿Cómo distinguir si la mutación es dominante ligada al sexo?

1. Todas las hijas de un varón afectado poseen el carácter
2. La mitad de las hijas y de los hijos de una mujer heterocigota tendrán el carácter

Genes holándricos

Estos genes están situados en el segmento diferencial del cromosoma Y; son exclusivos de los machos de las especies con determinismo del sexo XX/XY. En las especies con determinismo del sexo ZZ/ZW, los genes del segmento diferencial del cromosoma W son equivalentes a los holándricos y, en este caso, se denominan hologinos.

Genes influidos por el sexo

Son genes autosómicos pero las relaciones de dominancia entre los alelos es diferente en machos y hembras. Los homocigotos tanto hembras como machos tienen el mismo fenotipo, pero los heterocigotos poseerán un fenotipo u otro dependiendo del sexo. En estos casos, aunque son autosómicos, no hay que olvidar el sexo de los individuos al establecer su fenotipo.

Genes limitados a un sexo

Suelen ser genes autosómicos, que se transmiten a través de ambos sexos, pero que se expresan sólo en un sexo, es decir, lo presentan sólo los machos, o bien sólo las hembras. Un ejemplo de este tipo de caracteres es la presencia de plumaje vistoso en el caso de los pájaros machos, mientras que las hembras poseen coloraciones miméticas.

Dominancia incompleta y codominancia

A diferencia de la dominancia completa, cuando hay dominancia incompleta, las proporciones fenotípicas coinciden con las genotípicas. En los cruces monohíbridos estas proporciones son: 1/4, 1/2, 1/4. En el caso de dominancia intermedia, el fenotipo del heterocigoto (proporción 1/2) es intermedio al de los homocigotos, mientras que en el caso de codominancia, el heterocigoto presenta ambos fenotipos.

Alelismo múltiple

Los genes con más de dos alelos también tienen segregación mendeliana. Cada individuo diploide sólo presenta dos alelos aunque en la población haya muchos alelos diferentes de ese gen. Se pueden distinguir porque en la población se observan más de dos fenotipos diferentes para ese carácter. La prueba de alelismo o de complementación es la que nos permite saber si dos fenotipos mutantes son debidos a alelos del mismo gen, o bien si las mutaciones están en genes diferentes.

Letales

Los alelos letales son alelos que provocan la muerte del organismo que los porta. En sentido evolutivo, alelos letales son alelos que conllevan la “muerte genética”, es decir la incapacidad de reproducirse de los individuos que los poseen. En esos términos, un alelo mutante letal, que por ejemplo impida el desarrollo del cigoto, y otro alelo mutante letal que conlleve esterilidad son en términos genéticos iguales ya que ambos hacen, que los individuos que los portan no contribuyan a la generación siguiente.

Hay que distinguir entre recesivos letales y letales dominantes con efecto letal recesivo. Por ejemplo en la fenilcetonuria, el alelo mutante responsable de una actividad enzimática defectuosa es recesivo. Los individuos con ambas copias del gen mutadas tienen fenotipo fenilcetonúrico y en la práctica no se reproducen. El alelo es recesivo para el fenotipo “fenilcetonúrico” y recesivo para el carácter “letalidad” (aunque los individuos sean viables en la práctica se entienden que no dejan descendencia). Los hijos afectados de parejas de portadores serán 1 de cada 4.

Si el alelo es dominante para el carácter “letalidad”, una sola copia conlleva la incapacidad de reproducirse (o la muerte) en cuyo caso el alelo se pierde en esa generación y no pasa a la siguiente.

El alelo para el color amarillo de la cola de los ratones es dominante sobre el agutí que es recesivo. Pero en dosis doble el alelo para el color amarillo de la cola provoca letalidad, con lo cual el gen que controla el carácter “color de la cola” en ratones es un gen con efectos pleiotrópicos ya que influye sobre el carácter “color de la cola” y sobre el carácter “viabilidad del individuo” o “letalidad”. Para el carácter “color de la cola” es dominante y para el carácter “letalidad” es recesivo, con lo cual el alelo es **dominante con efecto letal recesivo**.

Al cruzar los ratones de fenotipo dominante, con cola amarilla, estos alelos dominantes con efecto letal recesivo distorsionan las proporciones fenotípicas mendelianas de 3/4 de la descendencia con fenotipo dominante y 1/4 con fenotipo recesivo y se obtienen proporciones de 2/3 : 1/3 amarillos:agutí.

Otra consecuencia de este fenómeno es que por definición los ratones con cola amarilla son heterocigotos y por tanto no se pueden obtener líneas puras de individuos con cola amarilla. La consecuencia es que al cruzar individuos de cola amarilla entre sí, siempre aparecerán individuos de fenotipo recesivo (agutís) en la descendencia, y en proporciones predecibles de 1 de cada 2.

Interacción génica y Epistasis

Cuando dos genes están implicados en la determinación de un mismo carácter se dice que hay un fenómeno de interacción génica. Lo primero que hay que distinguir es si los dos genes que controlan el carácter lo hacen de manera independiente (genes que actúan en rutas metabólicas separadas) en cuyo caso la **INTERACCIÓN GÉNICA ES NO EPISTÁTICA**. En este tipo de interacción si son dos genes los implicados y cada uno de ellos tiene dos alelos con dominancia completa del uno sobre el otro, entonces surgen cuatro fenotipos posibles (dos por cada gen).

Si los genes actúan en la misma ruta y el producto de un gen es el sustrato del siguiente (a través de los enzimas codificados por los genes logicamente) entonces la **INTERACCIÓN GÉNICA ES EPISTÁTICA**.

Si el alelo dominante de uno de los dos genes implicados determina el fenotipo, se dice que la epistasis es **simple dominante**.

Si el alelo recesivo (en dosis doble) de uno de los genes implicados determina el fenotipo la epistasis es **simple recesiva**

Si los alelos recesivos de los dos genes (en dosis doble ambos, aa__ ó __bb) dan el mismo fenotipo entonces la epistasis es **doble recesiva**.

Si cada uno de los dos alelos dominantes de cada uno de los dos genes (A_ ó B_) dan el mismo fenotipo entonces la epistasis es **doble dominante**.

Si el alelo dominante de uno de los genes y el recesivo del otro (A_ y __bb) dan el mismo fenotipo, entonces la epistasis es doble dominante y recesiva.

AL CRUZAR DOS DIHETEROCIGOTOS (y solo si se cruzan dos diheterocigotos) aparece una proporción 9:3:3:1 que en el caso de las epistasis se modifica de la siguiente manera:

Una epistasis es **simple dominante** si al cruzar dos diheterocigotos en vez de 9:3:3:1 la proporción que se obtiene es 12:3:1. (tres fenotipos)

La epistasis es **simple recesiva** si al cruzar dos diheterocigotos las proporciones fenotípicas que se observan son 9:3:4. (tres fenotipos)

En la epistasis es **doble recesiva**, al cruzar dos diheterocigotos en vez de 9:3:3:1 aparecen unas proporciones 9:7 (dos fenotipos)

En la epistasis **doble dominante** al cruzar dos diheterocigotos en vez de 9:3:3:1 aparecen unas proporciones de 15:1 (dos fenotipos)

En la epistasis **doble dominante y recesiva** al cruzar dos diheterocigotos, en vez de 9:3:3:1 aparecen unas proporciones de 13:3 (dos fenotipos).

Es importante identificar la interacción génica que mantienen dos genes **por cómo determinan estos los fenotipos y no aprendiendo las proporciones que aparecen al cruzar dos diheterocigotos**. Las relaciones epistáticas que mantienen dos genes son las mismas si se cruzan dos diheterocigotos que si se cruzan otros dos cualesquiera genotipos y las proporciones mencionadas se dan solo cuando se cruzan dos diheterocigotos.

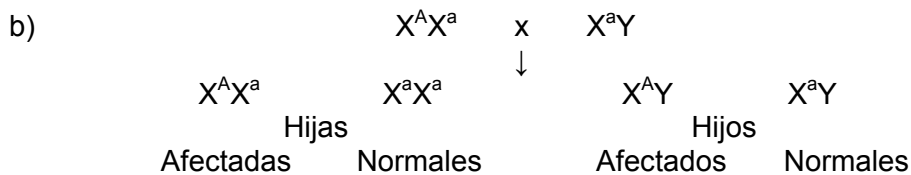
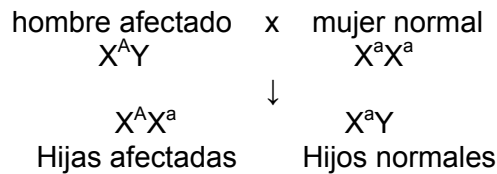
2.2. PROBLEMAS RESUELTOS

Problema 1. La hipofosfatemia provoca un tipo de raquitismo en el que los pacientes no responden a dosis normales de vitamina D. Este desorden es causado por un alelo dominante ligado al sexo. ¿Qué fenotipos se esperarán entre los hijos e hijas de los siguientes matrimonios?

- a) hombre afectado y mujer normal
 b) mujer afectada hija del matrimonio anterior y hombre normal.

Respuesta

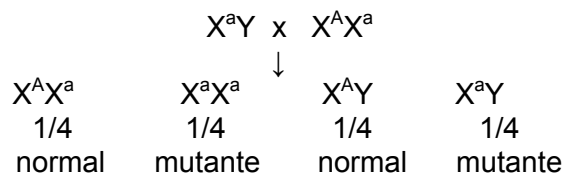
- a) Si llamamos "A" al alelo productor del raquitismo y "a" al alelo normal,



Problema 2. Se cruzan un macho hemicigótico para una mutación recesiva ligada al sexo y una hembra heterocigótica.

- a) ¿cuál es la probabilidad de que tengan un hijo con fenotipo mutante?
 Si esta pareja tiene 10 hijos,
 b) ¿cuál es la probabilidad de que una de sus hijas escogida al azar tenga el fenotipo mutante?
 c) ¿cuál es la probabilidad de que 7 sean machos mutantes y los otros 3 sean hembras normales?

Respuesta

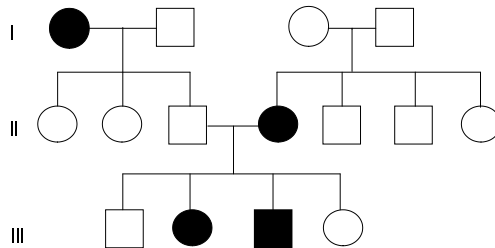


- a) 1/4.
 b) 1/2, ya que sabemos que es hembra, es decir, la mitad de las hembras.
 c) Puesto que la probabilidad de que nazca un macho mutante es 1/4, y de una hembra normal también es 1/4, la probabilidad total, será:

$$P = \frac{10!}{7! 3!} (1/4)^7 (1/4)^3$$

Problema 3. En el siguiente pedigrí se muestra la herencia de una pequeña mancha dorsal en cierta variedad de perdiz silvestre. Sabiendo que el alelo que la provoca es ligado al sexo y recesivo, determinar:

- a) la probabilidad de que un macho descendiente del cruce entre III-1 y III-2 lleve la mancha;
 b) la probabilidad de que el cruce entre II-4 y II-5 nazcan tres descendientes sin mancha y dos con ella.



Respuesta

Al tratarse de un ave, el sexo heterogamético es el femenino, y el homogamético el masculino:

hembra ZW/ macho ZZ

Así, los genotipos posibles serán:

- Hembra con mancha: Z^aW
 Hembra sin mancha: Z^AW
 Macho con mancha: Z^aZ^a
 Macho sin mancha: Z^AZ^A o Z^AZ^a

En la genealogía:

- | | |
|-----------------|----------------|
| I-1, Z^aW | I-2, Z^AZ^- |
| I-3, Z^AW | I-4, Z^AZ^a |
| II-1, Z^AW | II-2, Z^AW |
| II-3, Z^AZ^a | II-4, Z^aW |
| II-5, Z^AZ^- | II-6, Z^AZ^- |
| II-7, Z^AW | |
| III-1, Z^AZ^a | III-2, Z^aW |
| III-3, Z^aZ^a | III-4, Z^AW |

a) El cruce será:

III-1	x	III-2	
Z^AZ^a		Z^aW	
	↓		
Z^AZ^a	Z^aZ^a	Z^AW	Z^aW
1/4	1/4	1/4	1/4
macho	macho	hembra	hembra
sin mancha	con mancha	sin mancha	con mancha

La probabilidad de que un macho lleve la mancha será 1/2 (la mitad de los machos).

b) Como II-5 puede ser Z^AZ^A ($P = 1/2$) o Z^AZ^a ($P = 1/2$), habrá dos cruces posibles:

$$\begin{array}{ccc}
 1) & (1/2) \text{ II-5} & \times & \text{II-4} \\
 & Z^AZ^A & & Z^aW \\
 & \downarrow & & \\
 & Z^AZ^a & & Z^AW \\
 & 1/2 & & 1/2 \\
 & \text{macho} & & \text{hembra} \\
 & \text{sin mancha} & & \text{sin mancha}
 \end{array}$$

Como este cruce no produce descendientes con macha, no se puede considerar (recordemos que nos pregunta la probabilidad de que nazcan 3 descendientes sin mancha y dos con ella)

$$\begin{array}{cccc}
 2) & (1/2) \text{ II-5} & \times & \text{II-4} \\
 & Z^AZ^a & & Z^aW \\
 & \downarrow & & \\
 Z^AZ^a & Z^aZ^a & Z^AW & Z^aW \\
 1/4 & 1/4 & 1/4 & 1/4 \\
 \text{macho} & \text{macho} & \text{hembra} & \text{hembra} \\
 \text{sin mancha} & \text{con mancha} & \text{sin mancha} & \text{con mancha}
 \end{array}$$

La probabilidad de un descendiente con mancha será:

$$P = 1/2$$

Y la probabilidad de un descendiente sin mancha:

$$P = 1/2$$

Por tanto, la probabilidad que nos piden será:

$$P_T = \frac{5!}{3! 2!} (1/2)^3 (1/2)^2 = 10 (1/2)^3 (1/2)^2$$

Problema 4. El siguiente pedigrí ilustra la herencia del carácter "oreja aplastada" en úrsidos, mostrándose en negro los individuos afectados.

a) Determinar el tipo de herencia, considerando las siguientes posibilidades: gen holándrico, gen ligado al sexo (alelo para el rasgo dominante o recesivo).

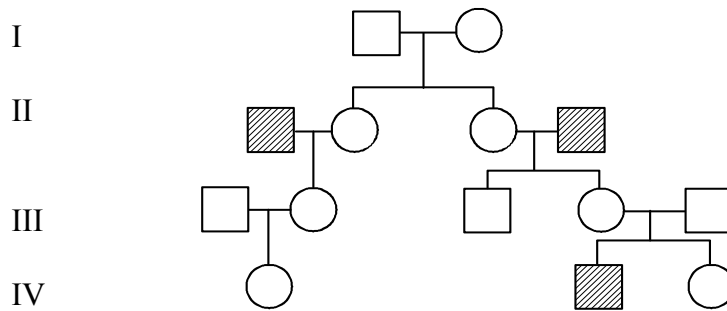
b) ¿Cuál es la probabilidad de que IV-1 y IV-2 tengan un descendiente (de cualquiera de los dos sexos) afectado?

c) ¿Cuál es la probabilidad de que una de sus hijas sea normal?

d) ¿Cuál es la probabilidad de que tengan una hija normal?

e) Si tienen seis hijos, ¿cuál es la probabilidad de que dos de ellos sean machos afectados, uno hembra normal, dos machos normales y uno hembra afectada?

f) ¿Cuál es la probabilidad de que los dos primeros sean machos afectados, el tercero hembra normal, los dos siguientes machos normales y el último, una hembra afectada?



Respuesta

a) Gen holándrico: No es posible, ya que tendría que pasar indefectiblemente de padres (machos) a hijos (también machos). II-1, por ejemplo, manifiesta el rasgo, pero no lo manifiesta su padre, y II-4 posee el carácter pero no su hijo.

Alelo dominante de un gen ligado al sexo: Tampoco es posible, ya que las hijas de los machos afectados (que reciben de ellos el X) y las madres de dichos machos (que les han pasado su X) deberían manifestar el rasgo. II-1, por ejemplo, que presenta el rasgo, tiene una hija que no lo manifiesta.

Alelo recesivo de un gen ligado al sexo: Puede ser, ya que los machos afectados reciben el X de su madre y lo transmiten a sus hijas, pero en ninguna de estas hembras se manifiesta el rasgo, por ser heterocigóticas. De acuerdo con esto, si designamos como X^A al alelo para el aspecto normal y como X^a al alelo para el rasgo (individuos afectados), siendo $X^A > X^a$, los genotipos de los diferentes individuos de la genealogía serán:

I-1, $X^A Y$	I-2, $X^A X^-$
II-1, $X^a Y$	II-2, $X^A X^-$
II-3, $X^A X^-$	II-4, $X^a Y$
III-1, $X^A Y$	III-2, $X^A X^a$
III-3, $X^A Y$	III-4, $X^A X^a$
III-5, $X^A Y$	
IV-1, $X^A X^-$	IV-2, $X^a Y$
IV-3, $X^A X^-$	

b) El cruce propuesto es:

$$\begin{array}{cc} \text{IV-1} & \times & \text{IV-2} \\ X^A X^- & & X^a Y \end{array}$$

Para saber cómo puede ser realmente IV-1 y con qué probabilidades observamos el cruce de sus padres:

$$\begin{array}{ccc} \text{III-1} & \times & \text{III-2} \\ X^A Y & & X^A X^a \\ \downarrow & & \\ X^A X^A & & X^A X^a \quad X^A Y \quad X^a Y \\ 1/2 & & 1/2 \text{ (sabemos que es hembra)} \end{array}$$

Habrán dos cruces posibles:

$(1/2) \text{ IV-1}$ $X^A X^A$ \downarrow $X^A X^a$ $1/2$ todos normales	x	IV-2 $X^a Y$ \downarrow $X^A Y$ $1/2$ normales		$(1/2) \text{ IV-1}$ $X^A X^a$ \downarrow $X^A X^a$ $1/4$ normales	x	IV-2 $X^a Y$ \downarrow $X^a X^a$ $1/4$ afectados	x	IV-2 $X^a Y$ \downarrow $X^A Y$ $1/4$ normales	$X^a Y$ $1/4$ afectados
---	---	--	--	---	---	---	---	--	-------------------------------

Por tanto, la probabilidad que nos piden será:

$$\begin{aligned}
 P &= P(\text{IV-1} \times \text{IV-2} \rightarrow \text{afectado}) = \\
 &= P(\text{IV-1 } X^A X^A) \times P(\text{IV-2 } X^a Y) \times P(X^A X^A \times X^a Y \rightarrow \text{afectado}) + \\
 &+ P(\text{IV-1 } X^A X^a) \times P(\text{IV-2 } X^a Y) \times P(X^A X^a \times X^a Y \rightarrow \text{afectado}) = \\
 &= 1/2 \times 1 \times 0 + 1/2 \times 1 \times 1/2 = 1/4
 \end{aligned}$$

c) Si IV-1 es $X^A X^A$, todas sus hijas serán normales. Si es $X^A X^a$, la mitad de sus hijas lo serán:

$$P = 1/2 \times 1 + 1/2 \times 1/2 = 1/2 + 1/4 = 3/4$$

d) En el primer caso, la mitad de los descendientes serán hijas normales, y en el segundo lo serán una cuarta parte de los descendientes:

$$P = 1/2 \times 1/2 + 1/2 \times 1/4 = 1/4 + 1/8 = 3/8$$

$$e) P_T = \frac{6!}{2! 1! 2! 1!} \times (P_1)^2 \times (P_2)^1 \times (P_3)^2 \times (P_4)^1$$

Siendo: P_1 = Prob. tener un macho afectado
 P_2 = Prob. tener una hembra normal
 P_3 = Prob. tener un macho normal
 P_4 = Prob. tener una hembra afectada

$$\begin{aligned}
 P_1 &= 1/2 \times 0 + 1/2 \times 1/4 = 1/8 \\
 P_2 &= 1/2 \times 1/2 + 1/2 \times 1/4 = 1/4 + 1/8 = 3/8 \\
 P_3 &= 1/2 \times 1/2 + 1/2 \times 1/4 = 1/4 + 1/8 = 3/8 \\
 P_4 &= 1/2 \times 0 + 1/2 \times 1/4 = 1/8
 \end{aligned}$$

$$P_T = \frac{6!}{2! 1! 2! 1!} \times (1/8)^2 \times (3/8)^1 \times (3/8)^2 \times (1/8)^1 = 180 \times 27 \times (1/8)^6 = 4.860 \times (1/8)^6 = 0.02$$

$$f) P = (1/8)^2 \times (3/8)^1 \times (3/8)^2 \times (1/8)^1 = 27 \times (1/8)^6 = 0.0001$$

Problema 5. Las cabras de orejas largas que se aparean con cabras de orejas cortas producen crías con un tamaño mediano de orejas en la generación F_1 ; en la F_2 tendrán 1/4 orejas largas, 1/2 medianas y 1/4 cortas, tanto en machos como en hembras. Las cabras machos imberbes apareadas con cabras hembras barbadas producen progenie masculina

barbada y hembras imberbes. Los machos F_2 tienen una proporción $3/4$ barbados y $1/4$ imberbes, en tanto que las hembras F_2 tienen una proporción $3/4$ imberbes y $1/4$ barbadas.

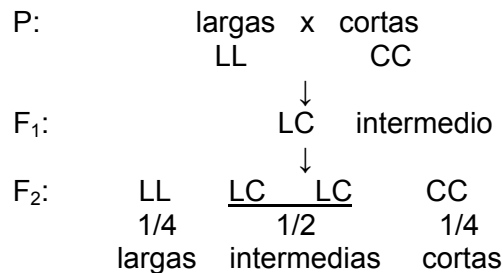
¿Cuál es el modo de herencia de estos dos caracteres?

Respuesta

a) El carácter tamaño de las orejas está determinado por un gen autosómico con dos alelos que presentan herencia intermedia. Esto se deduce, en primer lugar, al observar que las proporciones coinciden en machos y hembras y, en segundo lugar, porque en la F_1 aparece un fenotipo intermedio, que es la clase más frecuente en la F_2 , y que correspondería a los heterocigotos. Asignando símbolos arbitrarios podemos identificar cada fenotipo con su correspondiente genotipo:

LL = larga
CC = corta
LC = intermedia

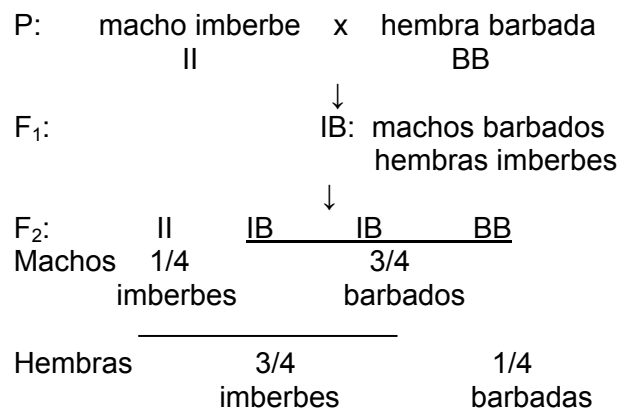
El cruce habrá sido:



La presencia o ausencia de barba parece ser, por su parte, un carácter mendeliano autosómico influido por el sexo. La condición barbada sería dominante en machos y recesiva en hembras, mientras que la manifestación imberbe sería dominante en hembras y recesiva en machos. Ello se desprende de la observación de la F_2 , en que las proporciones se invierten de machos a hembras. Asignando símbolos alfabéticos:

B = barbado
I = imberbe
B > I en machos
B < I en hembras

El cruce del ejemplo habrá sido, por tanto:



Problema 6. Una mujer de fenotipo AMRh+ tiene una hija AMRh-.

- a) ¿Qué genotipos te permitirían descartar como posible padre a un individuo?
 b) ¿Qué fenotipos?

Respuesta

El sistema que determina el grupo sanguíneo MN tiene dos alelos principales, L^M y L^N , codominantes entre sí. Por su parte, el grupo AB0 está determinado por la serie alélica $I^A = I^B > i$, y el grupo Rh más comúnmente caracterizado se debe a la acción de un gen autosómico con dos alelos: D, que produce el fenotipo Rh+, y d, que da lugar al fenotipo Rh-, siendo D dominante sobre d.

La mujer de este problema es AM+ y su hija AM-. Sus genotipos, por tanto, serán:

Madre: $I^A_L^M L^M Dd$ Hija: $I^A_L^M L^M dd$

En consecuencia, descartaríamos como posible padre a cualquier individuo que tuviera los posibles genotipos/fenotipos:

Grupo AB0: Genotipo $I^B I^B$, porque le hubiera pasado a la hija el alelo I^B , y ella hubiera debido manifestarlo. No podríamos descartar en principio a ningún individuo de genotipo $I^A I^A$, $I^A i$, $I^A I^B$, $I^B i$, o ii . En cuanto a los fenotipos, no podríamos descartar ninguno de ellos, porque entre los genotipos posibles se encuentran combinaciones correspondientes a cada uno de los cuatro fenotipos posibles (A, B, AB y 0).

Grupo MN: Genotipo $L^N L^N$ (fenotipo N), porque el verdadero padre debiera poder pasarle un alelo L^M . No podrían descartarse los individuos de genotipo $L^M L^M$ (grupo M) o $L^M L^N$ (grupo MN).

Grupo Rh: **DD**, porque su padre le tuvo que pasar un alelo **d**. Como no podrían descartarse los individuos de genotipo **Dd** (grupo Rh+) o **dd** (Rh-), no podríamos en principio descartar ningún fenotipo.

Problema 7. En humanos, los grupos sanguíneos MN están controlados por un gen con dos alelos codominantes, M y N, de forma que el genotipo MM da lugar al grupo M, el genotipo MN al grupo MN y la combinación NN al grupo N. Un hombre, cuyos padres eran uno de grupo M y el otro de grupo N, se casa con una mujer de fenotipo desconocido y tienen un hijo de grupo M.

- a) ¿Qué se puede afirmar sobre el genotipo de la madre?
 b) Si además se sabe que el abuelo materno era de grupo N, ¿cuál es la probabilidad de que el siguiente hijo de esta pareja sea de diferente grupo que su hermano?
 c) Sabiendo que los dos miembros de la pareja son heterocigóticos para un gen que en homocigosis recesiva provoca determinada enfermedad de la piel, ¿cuál es la probabilidad de que, si tienen 3 hijos, uno de ellos sea de grupo MN y manifieste la enfermedad y los otros dos sean de un grupo diferente al MN y no manifiesten la enfermedad?

Respuesta

a) El niño, al ser de grupo M, tiene un genotipo MM. Su padre es heterocigótico MN, y de su madre no puede saberse más que tiene un alelo M que le ha transmitido.

b) Si el abuelo materno era de grupo N, su genotipo era NN y, por tanto, la mujer deberá ser MN. La probabilidad de que la pareja de heterocigotos tenga un hijo que no sea M (que sea MN o N) será 3/4:

$$\begin{array}{c} \text{MN} \quad \times \quad \text{MN} \\ \downarrow \\ \frac{\text{MM}}{1/4} \quad \frac{\text{MN} \quad \text{MN}}{1/2} \quad \frac{\text{NN}}{1/4} \end{array}$$

c) El cruce será del tipo MNAa x MNAa, y la probabilidad que nos piden:

$$P = \frac{3!}{1! 2!} (P_1)^1 (P_2)^2$$

$$P_1 = P(\text{grupo MN y enfermo}) = 1/2 \times 1/4 = 1/8$$

$$P_2 = P(\text{grupo MN y no enfermo}) = 1/2 \times 3/4 = 3/8$$

$$\text{Sustituyendo, } P = (3/8)^3$$

Problema 8. Indicar si dos personas de fenotipo AB, Rh+ podrían tener los siguientes descendientes, consignando los posibles genotipos, en su caso:

- a) A Rh+
- b) A Rh-
- c) 0 Rh+
- d) 0 Rh-

Respuesta

El cruce propuesto será del tipo:

$$\begin{array}{c} \text{AB Rh+} \quad \times \quad \text{AB Rh+} \\ \text{I}^{\text{A}}\text{I}^{\text{B}}\text{D}_- \quad \quad \text{I}^{\text{A}}\text{I}^{\text{B}}\text{D}_- \end{array}$$

a) Sí, genotipo I^AI^AD₋

b) Sí, genotipo I^AI^Add

c) y d) Es imposible, ya que para pertenecer al grupo 0 el descendiente tendría que ser ii.

Problema 9. En las cobayas se pueden encontrar distintos tipos de coloración del pelaje, como son el negro, albino, crema y sepia. Determinar los genotipos más probables de los padres en los siguientes cruzamientos.

	Cruce	negro	sepia	crema	albino
1	negro x negro	227			
2	negro x albino	10	9		
3	crema x crema			34	11
4	sepia x crema		24	11	12
5	negro x albino	13		12	
6	negro x crema	19	20		
7	negro x sepia	18	20		
8	sepia x sepia		26	9	
9	crema x albino			15	7

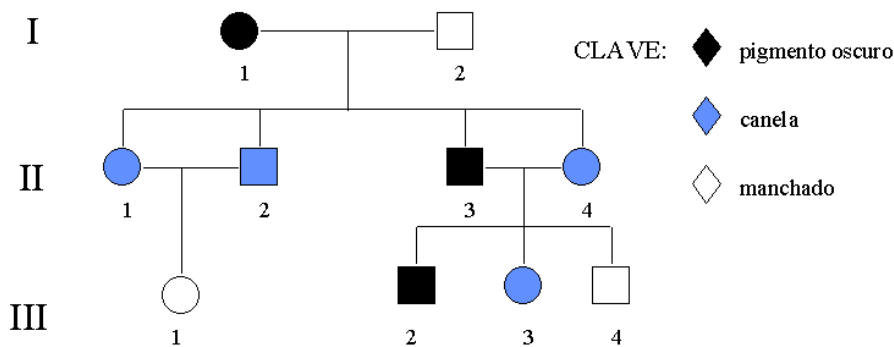
Respuesta

El hecho de que aparezcan diferentes fenotipos para el mismo carácter, puede llevar a creer que pudiera haber más de un locus implicado en la determinación del carácter. Para resolver esta cuestión debemos tener en cuenta que de todos los cruces realizados ninguno presenta más de tres tipos de descendientes diferentes, lo que sí sucedería con alguno de ellos si hubiese dos genes implicados. La prueba de complementación o de alelismo, resolvería esta cuestión.

Como se puede ver, hay cuatro fenotipos posibles que posiblemente se deben a cuatro alelos diferentes. De esta manera, de acuerdo con los resultados de los cruzamientos que se nos dan podemos decir que el negro (C) domina sobre todos, el sepia (c^s) sobre el crema y el albino y el crema (c^c) sobre el albino (c) (negro > sepia > crema > albino). De acuerdo con esto, los genotipos son:

- 1.- CC x Cc
- 2.- Cc^s x cc
- 3.- c^cc x c^cc
- 4.- c^sc x c^cc
- 5.- Cc^c x cc
- 6.- Cc^s x c^cc^c o c^cc
- 7.- Cc^s x c^sc^s, c^sc^c o c^sc
- 8.- c^sc^c x c^sc^c
- 9.- c^cc x cc

Problema 10. Una serie de alelos múltiples determina en los perros la distribución de los pigmentos del pelaje. El alelo A^s produce una distribución uniforme del pigmento oscuro sobre el cuerpo; el alelo a^y reduce la intensidad de la pigmentación y da lugar a los perros color canela; el alelo a^t produce pelajes manchados como canela y blanco, canela y café, etc. La jerarquía de dominancia es $A^s > a^y > a^t$. Dado el siguiente pedigrí:



- a) Determinar los genotipos de todos los individuos hasta donde sea posible.
- b) Calcule las probabilidades de que se produzcan descendientes manchados del apareamiento de III-1 y III-2.
- c) De los descendientes de pigmento oscuro, procedentes del cruce entre I-1 y II-3, ¿qué proporción serán heterocigotos?

Respuesta

a)

I-1: $A^s a^y$ I-2: $a^t a^t$

II-1: $a^y a^t$ II-2: $a^y a^t$ II-3: $A^s a^t$ II-4: $a^y a^t$

III-1: $a^t a^t$ III-2: $A^s _$ III-3: $a^y a^t$ III-4: $a^t a^t$

b) El individuo III-2 puede ser $A^s a^t$ o $A^s a^y$ con una probabilidad de 1/2 en cada caso. Solo se pueden producir descendientes manchados de ese cruce, si III-2 fuese $A^s a^t$
Por tanto, el cruce será:

$$\begin{array}{c} (1/2) A^s a^t \times a^t a^t \\ \downarrow \\ 1/2 A^s a^t, 1/2 a^t a^t \end{array}$$

$P = 1/2 \times 1/2 = 1/4$

c) El cruce es:

$$\begin{array}{c} A^s a^y \times A^s a^t \\ \downarrow \\ A^s A^s \quad A^s a^y \quad A^s a^t \quad a^t a^t \\ \hline \text{Pigmento oscuro} \end{array}$$

2/3 son heterocigóticos del 75% con pigmento oscuro

Problema 11. En una cepa de ratones surgió un mutante de cola corta. Al cruzar éste mutante de cola corta con ratones normales de cola larga, la F1 estuvo compuesta por 6 ratones de cola corta y 5 de cola larga. Se seleccionaron dos de los ratones de cola corta de la F1 y se cruzaron obteniéndose una F2 compuesta por 8 ratones de cola corta y 4 de cola larga.

a) ¿Qué hipótesis propondrías para explicar ese tipo de herencia?

b) ¿Qué proporciones fenotípicas esperarías al cruzar los ratones de cola corta y larga de la última descendencia?

Respuesta

a) Este tipo de herencia se explica si la mutación cola corta es dominante para la longitud de la cola y recesiva para la letalidad con lo cual nunca habrá homocigotos viables para la cola corta y todos los individuos de cola corta serán heterocigotos. Llamamos $C_$ al alelo de cola corta y cc al genotipo para la cola larga ya que al cruzar ratones de cola corta y cola larga aparecen ratones de cola corta y cola larga en proporciones de 2:1.

b) Los genotipos de los individuos de la F2 son : Cc (cola corta) y cc (cola larga) y por tanto la descendencia de ese cruce será 1/2 Cc (cola corta) y 1/2 cc (cola larga)

Problema 12. En el zorro los dos alelos de un gen, P y p , dan lugar a pelaje de color platino y plateado respectivamente. Al cruzar entre sí zorros de color platino siempre se obtienen

zorros de color platinos y plateados por lo que no se han conseguido líneas puras de color platino.

- a) ¿Cómo explicarías esos resultados?
- b) ¿Qué proporciones fenotípicas esperarías de un cruce entre individuos de color platino y color plateados?
- c) ¿Qué proporciones fenotípicas esperarías del cruce entre individuos de color platino?

Respuesta

a) Ya que en la descendencia del cruce entre zorros de color platino siempre aparecen zorros de color plateado, y por tanto no se obtienen líneas puras de color platino (no aparecen individuos PP) la interpretación que mejor explica esos resultados es que el alelo para el color platino del pelo ($P_{_}$) es dominante sobre el color plateado (pp) y para el carácter letalidad, dicho alelo P es recesivo.

b) El cruce es entre genotipos Pp (platinos) y pp (plateados) y por tanto la descendencia tendrá la mitad de los individuos Pp (platinos) y la mitad plateados (pp)

c) El cruce es entre individuos de genotipo Pp y portanto los genotipos de la descendencia serán: $1/4 PP$, $2/4 Pp$ y $1/4 pp$ pero como los PP no son viables la descendencia tendrá una composición fenotípica de $2/3$ platinos y $1/3$ plateados

Problema 13. Cuatro formas de cresta en las gallinas están determinadas por la interacción entre 2 genes: R,r y P,p , de forma que:

R_pp produce cresta en forma de ROSETA
 $rrP_$ produce cresta en forma de GUISANTE
 $R_P_$ produce cresta en forma de NUEZ
 $rrpp$ produce cresta en forma SENCILLA

Apareamientos entres aves de cresta en "nuez" y de cresta en "roseta" produjeron en la F1: 4 de cresta sencilla, 5 en "guisante", 13 en "roseta" y 12 en "nuez".

¿Cuáles son los genotipos más probables de los progenitores?

Respuesta

Al aparecer 4 fenotipos, la interacción génica que mantienen esos dos genes es no epistática. Al aparecer en la descendencia individuos con cresta sencilla, los individuos con cresta en nuez tienen necesariamente que ser diheterocigotos ($RrPp$), y al aparecer individuos con cresta en roseta y guisante los individuos con cresta en roseta tienen que ser heterocigotos para el primer gen ($Rrpp$)

Problema 14. En *Drosophila* el ojo silvestre es de color rojo y éste se debe a la presencia de dos pigmentos: drosopterina y xantomatina, sintetizados en rutas metabólicas separadas. Cuando se cruzan mutantes autosómicos recesivos *brown* (sin drosopterina y con xantomatina) y *scarlet* (sin xantomatina y con drosopterina) la F1 tiene los ojos rojos y la F2 presenta las siguientes proporciones fenotípicas:

9 rojos: 3 escarlata: 3 *brown*: 1 blanco

- a) ¿Qué tipo de interacción génica mantienen esos dos genes?
- b) Cuales son los genotipos de los individuos que se utilizado en ese cruce?

Respuesta

a) Al sintetizarse los dos pigmentos en rutas metabólicas separadas, caben 4 fenotipos posibles como dice el problema, que el individuo tenga los dos pigmentos (xantomatina y drosóptera, color rojo), que tenga solo drosóptera (*scarlet*, rojo brillante) que tenga solo xantomatina (*brown*, marrón)) o que no tenga ninguno (ojos blancos). Por tanto son dos genes con dos alelos con dominancia completa de un alelo sobre el otro en cada uno de los dos genes y los dos intervienen en el carácter color del ojo. Al intervenir en rutas metabólicas separadas el tipo de interacción génica es no epistática.

b) Generación parental: $bw bw st^+ st^+$ (*brown*) x $bw^+ bw^+ st st$ (*scarlet*)
F1: $bw^+ bw st^+ st$ (ojos rojos)
F2: 9 rojos: 3 escarlata: 3 marrón: 1 blanco

Problema 15. Brewbaker encontró que las plantas consanguíneas de la F1 que procedían de cruzamientos entre dos cepas de tréboles de flores blancas (*Trifolium repens*) daban lugar a una F2 formada por 5 rojas:75 blancas. No se indicó letalidad alguna.

- a) Utilizando la explicación más sencilla, ¿cuántos genes se hallan implicados en dichos cruzamientos?
- b) Empleando símbolos, definir los alelos implicados y dar el genotipo de las plantas rojas de la F2.

Respuesta

Generación parental: $AA bb$ x $aa BB$
F1: $Aa Bb$
F2: **9** $A_B_$ (blancas) **3** A_bb (blancas) **3** $aaB_$ (blancas) **1** $aabb$ (rojas)
15 blancas: 1 roja

75 blancas/5 rojas es una relación de 15:1 que es la proporción fenotípica que se observa cuando los genes mantienen una relación de epistasis doble dominante y se cruzan dos diheterocigotos (los alelos dominantes de cada uno de los dos genes dan el mismo fenotipo).

Problema 16. El apareamiento entre ratas de genotipo idéntico produjo la siguiente descendencia: 14 color crema: 47 color negro: 19 albinas.

- a) ¿A qué proporción se aproxima la descendencia?
- b) ¿A qué tipo de epistasis se debe?
- c) ¿Cuáles son los genotipos de los progenitores y de los descendientes?

Respuesta

- a) Si se parte de una hipótesis de que son dos genes con dos alelos, se calcula sobre un total de 16 y nos da: 9.4, 3.8 y 2.8 es decir se aproxima a una proporción de 9:4:3
- b) Los genes mantienen una relación de epistasis simple recesiva ya que la proporción 9:3:4 es la que se obtiene al cruzar dos diheterocigotos y los genes mantienen ese tipo de epistasis.
- c) Las ratas de genotipo idéntico son diheterocigotas (AaBb) y la descendencia es
9 A_B_ (negras) 3 A_bb (crema) 3 aaB_ (albinas) 1 aabb (albinas)

Problema 17. El alelo dominante (B) de un gen determina el color blanco del fruto de la calabaza y el alelo recesivo (b) el fruto con color. El fruto amarillo está regido por el alelo dominante (V) de un gen hipostático de distribución independiente y el fruto verde por su alelo recesivo (v). Cuando se cruzan plantas dihíbridas la descendencia aparece en una proporción de 12 blancas : 3 amarillas : 1 verde.

- a) ¿Qué tipo de epistasis mantienen esos dos genes?
- b) Qué proporción de color de fruto se espera en los cruces:
 b1) Bbv v x Bbv v?
 b2) Bbv v x bbVv?
- c) Si dos plantas son cruzadas produciendo 1/2 de la descendencia amarilla y el otro 1/2 de la descendencia verde, ¿cuáles son los genotipos y fenotipos de los progenitores?

Respuesta

a) Si está presente el alelo B los frutos son blancos y si no está presente tienen color, luego se trata de una epistasis simple dominante.

b1) Bbv v x Bbv v: 1/4 BBvv (blancos), 2/4 Bbv v (blancos) y 1/4 bbvv (verde) luego aparecen 3/4 blancos y 1/4 verdes.

b2) El individuo Bbv v forma dos tipos de gametos: Bv y bv y el individuo bbVv forma también dos tipos de gametos: bV y bv. Luego:

	1/2 Bv	1/2 bv
1/2 bV	1/4 BbVv	1/4 bbVv
1/2 bv	1/4 Bbv v	1/4 bbvv

Por tanto 2/4 de la descendencia son de fruto blanco, 1/4 de fruto amarillo y 1/4 de fruto verde

c) Ya que para tener color hace falta el genotipo bb y nos dice que la descendencia es toda con color (mitad amarilla, mitad verde) los individuos que se cruzan tienen que ser bb y como rinden verdes y amarillos en igual proporción en el segundo gen serán Vv y vv. Por tanto los genotipos que dan esas proporciones fenotípicas son bbVv y bbvv

Problema 18. Dos plantas de guisantes con flores blancas se cruzaron entre sí dando una F1 de flores púrpura. Un cruzamiento al azar entre dos plantas de la F1 produjo una descendencia de 96 plantas, de las cuales 53 eran púrpura y 43 blancas.

- a) ¿Qué razón fenotípica se espera aproximadamente en la F2?
- b) ¿Cuáles fueron los genotipos probables de los padres?

Respuesta

- a) Se espera una proporción de 9 púrpura: 7 blancas que es a la proporción a la que se aproximan las frecuencias que se observan (53:47). Se trata de una epistasis doble recesiva
- b) Las plantas blancas son AA_{bb} y aaBB, la F1 es diheterocigota: AaBb que es púrpura y la F2 será **9 A_B_ (púrpuras) 3 A_bb (blancas) 3 aaB_ (blancas) 1 aabb (blancas)**

Problema 19. El color rojo del trigo se debe al genotipo R_B_ y el blanco al recesivo rrbb. Los genotipos rrB_ y R_bb producen color pardo. Se cruza una variedad roja homocigota con otra blanca.

- a) ¿Qué composición fenotípica se esperan en la F1? ¿y en la F2?
- b) Si la F2 parda se cruza artificialmente al azar ¿qué proporciones fenotípicas se esperan en la descendencia?

Respuesta

- a) Ya que dice que son homocigotas, el cruce es RRBB x rrbb y por tanto la F1 será de genotípicamente diheterocigota (RrBb) y de fenotipo rojo.

La F2, obtenida por el cruce de individuos de la F1 (RrBb x RrBb) tendrá los siguientes fenotipos y las siguientes frecuencias:

9 rojos (R_B_) 6 pardos (3 R_bb 3 rrB_) 1 blanco (rrbb)

- b) Los individuos pardos de la F2 tienen los siguientes genotipos y las siguientes frecuencias:

1 RR bb, 2 Rrbb, 1 rrBB y 2 rrBb. El "pool" de gametos que formarán esos individuos será el siguiente:

1 RRbb dará 1 Rb
2 Rrbb darán 1 Rb y 1 rb
1 rrBB dará 1 rB

2 rrBb dará 1 rB y 1rb

Por tanto, sumamos:

Gametos Rb: 1+1 (sobre un total de "6 gametos")= 2/6 = 1/3 Rb
Gametos rB: 1+1 (sobre un total de "6 gametos")= 2/6 = 1/3 rB
Gametos rb: 1+1 (sobre un total de "6 gametos")= 2/6 = 1/3 rb

Entonces, el cruce será:

	1/3 Rb	1/3 rB	1/3 rb
1/3 Rb	1/9 RRbb (pardos)	1/9 RrBb (Rojos)	1/9 Rrbb (pardos)
1/3 rB	1/9 RrBb (rojos)	1/9 rrBB(pardos)	1/9 rrBb (pardos)
1/3 rb	1/9 Rrbb (pardos)	1/9 rrBb (pardos)	1/9 rrbb (blancos)

6/9 Pardos; 2/9 rojos y 1/9 blancos

2.3. PROBLEMAS PARA RESOLVER

Problema 1. Una pareja, cuyos dos miembros tienen visión normal, tienen un hijo daltónico.

- ¿Cuáles son los genotipos de los padres?
- ¿Cuál es el sexo y el genotipo del niño?

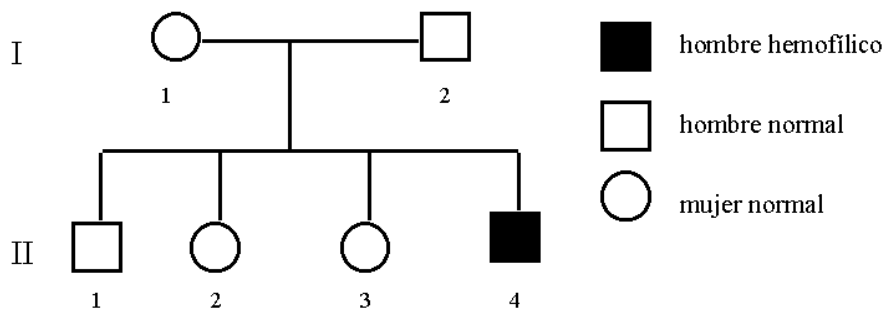
Problema 2. Una mujer de visión normal cuyo padre es daltónico se casa con un hombre cuya madre era daltónica ¿Que genotipos tendrá la descendencia de esta pareja si,

- son varones
- son mujeres

Problema 3. Supongamos un carácter ligado al sexo en aves exóticas tal que su alelo recesivo *a* determina plumas de la cola blancas y *A* plumas coloreadas. Si se cruza un macho heterocigótico con una hembra de plumas blancas y se obtienen ocho descendientes, ¿cuál es la probabilidad de que seis de ellos tengan las plumas de la cola coloreadas?

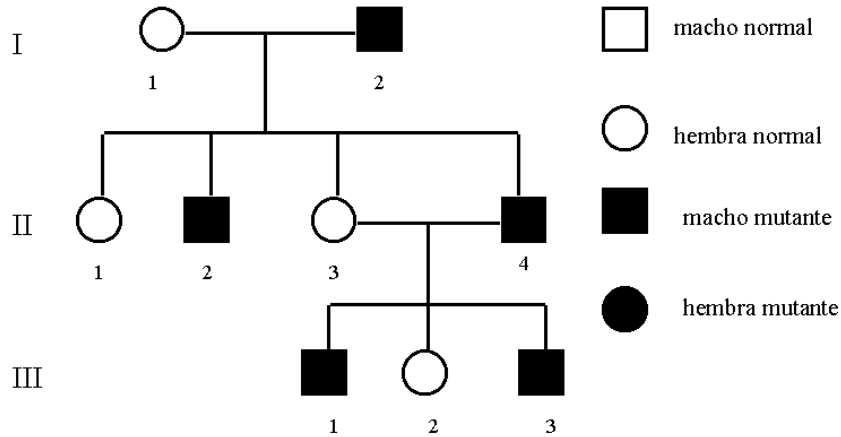
Problema 4. El siguiente pedigrí muestra un caso de hemofilia A, enfermedad debida al alelo recesivo de un gen ligado al sexo.

- Si II-2 se casa con un hombre normal, ¿cuál es la probabilidad de que su primer hijo sea un varón hemofílico?
- Suponiendo que su primer hijo es hemofílico, ¿cuál es la posibilidad de que su segundo hijo sea un varón hemofílico?
- Si II-3 se casa con un hombre hemofílico, ¿cuál es la probabilidad que su primer descendiente sea normal?
- Si la madre de I-1 era fenotípicamente normal, ¿qué genotipo tenía su padre?
- Si la madre de I-1 era hemofílica, ¿cuál era el fenotipo del padre de I-1?



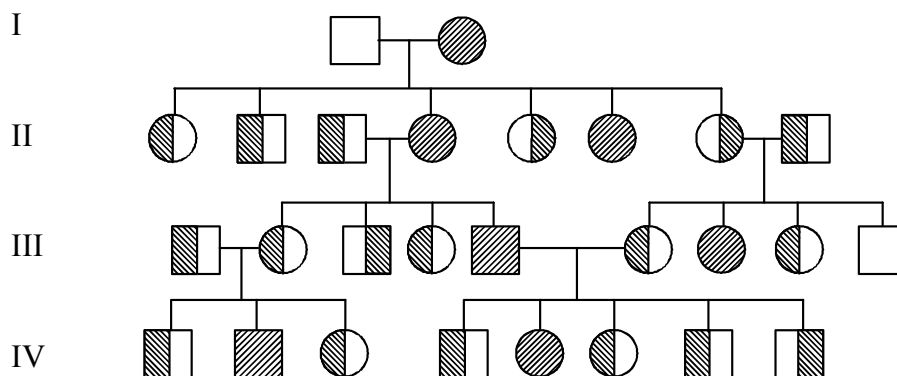
Problema 5. Observar el siguiente pedigrí,

- ¿Es compatible con la presencia de un gen holándrico?
- ¿Y con la de un alelo recesivo ligado al sexo?
- Si el apareamiento entre III2 y III3 produce una hembra mutante, ¿cuál de las dos hipótesis anteriores es aplicable? Usando símbolos apropiados asigne genotipo a cada uno de los individuos del pedigrí.



Problema 6. En el siguiente pedigrí se muestra la transmisión de dos caracteres humanos en una familia. Los individuos sombreados en la parte izquierda presentan asimetría nasal, y aquellos sombreados en el lado derecho muestran deformación del pabellón auditivo.

- ¿Qué tipo de herencia se halla implicado en cada uno de los caracteres?
- Determinar hasta donde sea posible los genotipos de todos los individuos de la genealogía.
- ¿Cuál es la probabilidad de que del cruzamiento IV-1 x IV-6 nazca una hija con asimetría nasal y pabellón auditivo normal?



Problema 7. Una pareja está formada por una mujer no calva (cuya madre sí lo era), y un hombre calvo pero cuyo padre no lo era. a) ¿Cuál será el genotipo de todos estos individuos?; b) ¿qué proporción de individuos calvos y no calvos esperaríamos en los descendientes de esta pareja?

Problema 8.- En el ganado, el color blanco está determinado por un alelo C^c dominante en los machos y recesivo en las hembras. El alelo para el color rojo C^R actúa como dominante en las hembras y recesivo en los machos. Del cruce de un macho rojo y una hembra blanca homocigótica,

- ¿Qué proporciones fenotípicas y genotípicas esperarías en la F_1 y la F_2 ?
- Si una vaca blanca homocigótica tiene un becerro rojo, ¿qué sexo tendrá el becerro?
- ¿Cuál es el genotipo que no es posible del progenitor masculino del apartado b)?

Problema 9. Las flores de ciertas plantas pueden ser rojas, rosas o blancas. Las flores rojas cruzadas con las blancas sólo producen rosas. Cuando plantas con flores rosas fueron cruzadas, produjeron 113 rojas, 129 blancas y 242 rosas. La hipótesis es que estos colores son producidos por un locus génico único con alelos que presentan herencia intermedia. Probar esta hipótesis mediante la prueba de χ^2 .

Problema 10. Un alelo dominante (L) determina el pelo corto en el conejillo de Indias, y el recesivo (l) el pelo largo. Alelos con herencia intermedia en un locus independiente determinan el color, siendo: $c^y c^y$ = amarillo; $c^y c^w$ = crema; $c^w c^w$ = blanco. Del cruzamiento de dos conejillos dihíbridos de pelo corto y color crema, predecir la frecuencia fenotípica esperada en la descendencia.

Problema 11. Los rábanos pueden ser: largos, redondos u ovalados en cuanto a su forma. El color puede ser rojo, azul y púrpura. Una variedad larga y azul es cruzada con otra variedad redonda y roja, produciendo una F_1 oval y púrpura. La F_2 obtenida fue: 9 larga, roja; 15 larga, púrpura, 19 oval, roja; 32 oval, púrpura; 8 larga, azul; 16 redonda, púrpura; 8 redonda, azul; 16 oval, azul; 9 redonda, roja.

- ¿Cuántas parejas alélicas están involucradas en la determinación de la forma y del color?
- ¿Qué fenotipos esperarían en cruzamientos entre la F_1 y cada uno de sus parentales?
- Si los rábanos oval-púrpura fueran preferidos comercialmente, ¿qué líneas de rábanos deberían ser mantenidas para producir mayor cantidad de esos rábanos y por qué?

Problema 12. Un hombre con grupo sanguíneo A tiene un hijo de grupo sanguíneo O con una mujer de grupo sanguíneo B. a) ¿Cuáles son los genotipos de estas tres personas? b) ¿Qué otros genotipos, y con qué frecuencias, se pueden esperar en los hijos de esta pareja?

Problema 13. Un hombre AB- y una mujer O+ tienen un hijo B+.

- Determinar los genotipos posibles de cada uno de los individuos.
- Explique si alguno de los padres podría donarle sangre al hijo.

Problema 14. Las siguientes cinco madres, desde a) hasta e), con los fenotipos dados, tuvieron cada una un hijo del que se describe el fenotipo. Seleccionar los posibles padres de cada uno de esos niños de entre los cinco hombres de los que se dan los genotipos.

Madre	Fenotipo materno	Fenotipo del hijo	Genotipo de cada hombre
a	A M Rh+	O M Rh+	1. $I^A i L^M L^N rr$
b	B N rh-	B N rh-	2. $I^B i L^M L^N RR$
c	O M rh-	A MN Rh+	3. $ii L^N L^N rr$
d	A N Rh+	AB MN Rh+	4. $ii L^M L^M rr$
e	AB MN rh-	AB M rh-	5. $I^A I^A L^M L^N RR$

Problema 15. En un caso de paternidad discutida, el fenotipo del grupo sanguíneo de la madre es A MN rh- y el fenotipo del hijo es B N Rh+. Anótense todos los posibles fenotipos del grupo sanguíneo que puede presentar el padre.

Problema 16. Una mujer se casa con un hombre y tiene cuatro hijos legítimos con los siguientes genotipos: $ii RR L^M L^N$; $I^A i Rr L^N L^N$; $ii RR L^N L^N$; $I^B i rr L^M L^M$. ¿Cuáles son los genotipos de los progenitores?

Problema 17. La herencia del color de la piel en las reses está determinada por una serie de alelos múltiples con la jerarquía de dominancia siguiente: $S > s^h > s^c > s$. El alelo "S" pone una banda de color blanco alrededor de la mitad del animal que se denomina cinturón holandés; el alelo " s^h " produce las manchas tipo Hereford; el color sólido es el resultado del alelo " s^c ", y las manchas de tipo Holstein se deben al alelo "s". Los machos con cinturón holandés homocigóticos son cruzados con hembras con manchas tipo Holstein. Las hembras F_1 son cruzadas con machos manchados tipo Hereford con genotipo $s^h s^c$. Predecir las frecuencias genotípicas en la descendencia.

Problema 18. Se cruzan entre sí ratones amarillos de cola curvada. Los descendientes dan una proporción de 6 amarillos con colas curvadas: 2 amarillos con colas normales: 3 agutí con colas curvadas: 1 agutí con cola normal.

- ¿Cuál de los dos caracteres está asociado con un alelo letal?
- ¿Está determinada la cola curvada por un gen dominante o recesivo?
- ¿Cuál es el genotipo de los ratones amarillos con la cola curvada?
- ¿Cuáles son los genotipos de las cuatro clases fenotípicas?

Problema 19. Un carácter mutante ligado al sexo y denominado "muesca" (M) es letal en *Drosophila* cuando se presenta en los machos hemicingóticos (no puede haber hembras homocigóticas MM ya que tendrían que heredar el dominante del padre). Las hembras heterocigóticas (Mm) tienen pequeñas muescas en las puntas de sus alas. Las hembras homocigóticas recesivas (mm) y los machos hemicingóticos (m) tienen alas normales (tipo común).

- Calcular las proporciones fenotípicas viables esperadas en F_1 y F_2 sin considerar el sexo, cuando se cruzan machos de tipo común con hembras con muescas.
- ¿Cuál es la proporción de machos viables / hembras viables en F_1 y F_2 ?
- ¿Cuál es la proporción de animales viables con muescas / tipo común en F_1 y F_2 ?

Problema 20. Al cruzar perros calvos mejicanos entre sí, se obtiene una descendencia formada por perros calvos y perros normales en proporción 2:1. Al cruzar perros calvos mejicanos y perros normales, la descendencia presenta una razón fenotípica de 1:1 de “calvos mejicanos” y “normales”.

- a) ¿Crees que sería posible obtener una raza pura de perros calvos? ¿Por qué?
- b) ¿Qué proporciones fenotípicas se esperan de un cruce entre los individuos “calvos mejicanos” y “normales” obtenidos en proporción 2:1 del enunciado del problema?

Problema 21. En la “serpiente del maíz” la coloración de la piel está controlada por dos genes con dos alelos cada uno de ellos con dominancia completa (A,a y B,b). Cada gen a través de los enzimas codificados por él, controla la síntesis de un pigmento distinto en rutas metabólicas separadas. Uno de esos dos genes produce un pigmento naranja ($A_$ presencia de pigmento naranja y aa ausencia del mismo) y el otro gen produce un pigmento negro ($B_$ presencia de pigmento y bb ausencia de pigmento negro). Esos dos genes se transmiten independientemente.

- a) ¿Qué tipo interacción mantienen esos dos genes?
- b) Una serpiente de tipo silvestre (con los dos pigmentos) se cruza con una albina (sin pigmentos) y la F1 es toda de color silvestre. ¿Qué composición fenotípica tendrá la F2?
- c) Si se cruzan al azar los individuos naranjas con los negros de la F2 ¿qué composición fenotípica tendrá la descendencia resultante de dicho cruce?

Problema 22. En la campanilla, el color silvestre de las flores es azul. Todos los intermediarios de la ruta que llega al pigmento antocianina (azul) son incoloros. Se dispone de dos cepas mutantes blancas, al cruzar plantas con flores blancas de esas dos cepas, las flores de la F1 son todas de color azul. Al cruzar estas plantas de la F1 entre sí, la F2 está compuesta por plantas con flores azules y plantas con flores blancas en proporción 9 azules: 7 blancas.

- a) ¿Qué tipo de herencia explicaría esos resultados?
- b) ¿Qué genotipos tienen las plantas de flores blancas utilizadas en el cruzamiento?
- c) ¿Qué genotipos tienen las plantas de la F1?
- d) ¿Qué genotipos tendrían que tener dos plantas de la F2 para que al cruzarlas se obtengan plantas con flores azules y blancas en proporción 1 azul: 3 blancas?

Problema 23. En una ruta metabólica que conduce a la síntesis de un pigmento azul, se parte de un precursor incoloro que por la acción de un primer gen se transforma en un intermediario de color magenta ($A_$ transforma y aa no transforma). Este intermediario por la acción de un segundo gen se transforma en un pigmento azul ($B_$ transforma y bb no transforma).

- a) Identificar el tipo de interacción génica que mantienen esos dos genes.
- b) Al cruzar un individuo con flores de color magenta con un individuo de flores blancas (incoloro), la descendencia tiene flores de color magenta y al cruzar éstas entre sí, $\frac{3}{4}$ de la descendencia es de color magenta y $\frac{1}{4}$ incoloras. Determinar los genotipos de esas plantas.
- c) ¿Qué genotipos tendrían que tener dos plantas azules para que la descendencia obtenida al cruzarlas sea $\frac{3}{4}$ azules y $\frac{1}{4}$ magenta?

Problema 24. En el perro Labrador, el color del pelo está controlado por la acción de dos genes con dos alelos cada uno de ellos (B,b y E,e). Los individuos con genotipos $B_$

presentan color negro mientras los individuos *bb* tienen color marrón. El segundo gen (*E,e*) hace que el pigmento negro o marrón producido por el primer gen se deposite en el pelo, de manera que en los individuos *E_* el pigmento se deposita en el pelo mientras que en los individuos *ee* el pigmento no se deposita en el pelo y éstos presentan entonces color dorado .

- Identificar el tipo de interacción génica que mantienen esos dos genes.
- Individuos de color negro se cruzaron con razas puras de color dorado y la descendencia presentó una composición fenotípica 1 negro: 1 marrón: 2 dorados. ¿Qué genotipos tenían los parentales?
- ¿Qué composición fenotípica se espera al cruzar los individuos negros de la F1 anterior?

Problema 25. La síntesis de un determinado pigmento en una ruta metabólica es un proceso en dos pasos controlado por dos genes con dos alelos cada uno (*A,a* y *B,b*). La enzima codificada por el primer gen necesita dosis doble (*aa*) para poder transformar un precursor incoloro en una sustancia intermedia también incolora. Sobre esta sustancia intermedia actúa el enzima codificado por el segundo gen que también se necesita en dosis doble (*bb*) para poder transformar la sustancia intermedia en un pigmento de color rojo.

- ¿Qué tipo de interacción mantienen esos dos genes?
- ¿Qué proporciones fenotípicas se esperan de un cruce entre una planta diheterocigota para esos dos genes y una planta con flores rojas?
- ¿Qué proporciones fenotípicas se esperan de un cruce entre dos plantas diheterocigotas?

Problema 26. Un gen con dos alelos codifica un enzima que transforma un precursor incoloro en una sustancia intermedia que es también incolora. Se necesita al menos un alelo funcional (*A_*) de ese primer gen para que se pueda llevar a cabo la reacción. Un segundo gen, transforma la sustancia intermedia en pigmento. Este segundo gen tiene dos alelos: *B* (pigmento rojo) y *b* (pigmento amarillo).

- ¿Qué tipo de interacción génica mantienen esos dos genes?
- Al cruzar dos líneas, una de flores rojas y la otra de flores blancas se obtiene una F1 compuesta por flores rojas, amarillas y blancas en proporción 1:1:2. ¿Qué genotipos tienen las dos líneas parentales?

Problema 27. Un gen con dos alelos codifica un enzima que transforma un precursor incoloro en una sustancia intermedia que es también incolora. Se necesitan los dos alelos funcionales de ese primer gen para que se pueda llevar a cabo la reacción (*A_* no transforma y *aa* transforma). Un segundo gen transforma la sustancia intermedia en pigmento verde. Este segundo gen tiene también dos alelos: *B_* que no transforma la sustancia intermedia en pigmento y *bb* que transforma la sustancia intermedia en pigmento verde)

- ¿Qué tipo de interacción génica mantienen esos dos genes? ¿Por qué?
- Al cruzar una líneas de flores blancas con una de flores verdes se obtiene una F1 con flores blancas y verdes en proporción 3/4 blancas y 1/4 verdes. ¿Qué genotipos tienen esas dos líneas?

Problema 28. En *Drosophila*, el color morado de los ojos se debe al alelo recesivo de un gen (*pd*). El alelo recesivo (*s*) de otro gen no ligado, suprime el fenotipo mutante "ojos de color morado" (*pdpd*). De esta forma un individuo de genotipo *pdpds* tiene ojos rojos (fenotipo silvestre en *Drosophila* en cuanto al color de ojos se refiere).

- a) ¿Qué interacción génica mantienen esos dos genes?
- b) Si se cruza una mosca de ojos morados y no portadora del alelo supresor con una mosca homocigótica de ojos rojos y homocigótica para el supresor, ¿qué composición fenotípica tendrá la descendencia?
- c) ¿Qué genotipos tendrán dos moscas cuya descendencia es 3/4 rojos, 1/4 morados?
- d) ¿Qué genotipos tendrán dos moscas cuya descendencia es 13 rojos:3 morados.

Problema 29. Las hojas de las piñas pueden presentar tres fenotipos: “espinosas”, “de punta espinosa” y “sin espinas”. Al cruzar líneas puras de individuos con “punta espinosa” con individuos “espinosas” toda la F1 presentó “punta espinosa” y la F2 una razón fenotípica de 3 “punta espinosa”:1 “espinosa”. Al cruzar líneas puras de individuos “sin espinas” con individuos de “punta espinosa”, la F1 era toda “sin espinas” y la F2 “sin espinas”/“punta espinosa” en relación 3:1. Por último se cruzaron líneas puras de individuos sin espinas con individuos espinosas, la F1 fue sin espinas y la F2 12 “sin espinas”: 3 “punta espinosa” y 1 “espinosa”.

- a) ¿Cuántos genes están implicados en el carácter “forma de las hojas de la piña”?
- b) Asignar símbolos a esos genes
- c) ¿Mantienen algún tipo de interacción esos genes?
- d) Determinar las proporciones fenotípicas que se esperan al cruzar entre sí los individuos “sin espinas” del último cruce del enunciado

2.4. SOLUCIONES A LOS PROBLEMAS

Problema 1.

- a) madre $X^+ X^d$; padre $X^+ Y$;
 b) hijo: niño $X^d Y$

Problema 2.

- a) varones: 50% daltónicos, 50% visión normal
 b) mujeres: 50% daltónicas, 50% visión normal (pero portadoras)

Problema 3.

$$P = \frac{8!}{6!2!} (1/2)^6 (1/2)^2 = 28 (1/2)^8$$

Problema 4.

- a) 1/8
 b) 1/4
 c) 3/4
 d) puede ser normal o hemofílico
 e) normal

Problema 5

- a) Sí
 b) Sí
 c) La segunda hipótesis

Problema 6.

- a) Carácter Asimetría: ligado al sexo dominante
 Carácter Deformación del pabellón: autosómico recesivo

b)

I-1, $X^a Y D d$ I-2, $X^A X^a d d$

II-1, $X^A X^a D d$

II-2, $X^A Y D d$

II-3, $X^A Y D d$

II-4, $X^A X^a d d$

II-5, $X^a X^a d d$

II-6, $X^A X^a d d$

II-7, $X^a X^a d d$

II-8, $X^A Y D d$

III-1, $X^A Y D d$

III-2, $X^A X^c D d$

III-3, $X^a Y d d$

III-4, $X^A X^c D d$

III-5, $X^A Y d d$

III-6, $X^A X^a D d$

III-7, $X^A X^a d d$

III-8, $X^A X^a D d$

III-9, $X^a Y D d$

IV-1, $X^A Y D _$

IV-2, $X^A Y d d$

IV-3, $X^A X^c D _$

IV-4, $X^A Y D d$

IV-5, $X^A X^c d d$

IV-6, $X^A X^c D d$

IV-7, $X^A Y D d$

IV-8, $X^a Y d d$

c) 5/12

Problema 7.

- a) Mujer no calva ($C_1 C_2$), la madre calva ($C_1 C_1$), el hombre calvo ($C_1 C_2$), su padre no calvo ($C_2 C_2$)
 b) 3/4 de los varones serán calvos y 1/4 de las hijas serán calvas.

Problema 8.

- a) F1: hembras rojas, machos blancos
 F2: Hembras: 25% blancas, 75% rojas
 Machos: 25% rojos, 75% blancos
 b) Hembra
 c) No podría ser $C^c C^c$

Problema 9.

$\chi^2_{\text{experimental}} = 1.057 < \chi^2_{\text{teórica}}$ Herencia intermedia

Problema 10.

- Pelo corto amarillo: 3/16
 Pelo corto crema: 6/16
 Pelo corto blanco: 3/16
 Pelo largo amarillo: 1/16
 Pelo largo crema: 2/16
 Pelo largo blanco: 1/16

Problema 11.

- a) 2 parejas alélicas FL/FR CB/CR
 b) FLFR CBCR x FLFL CBCB
 1/4 larga azul; 1/4 larga púrpura; 1/4 oval azul; 1/4 oval púrpura
 FLFR CBCR x FRFR CRCR
 1/4 redonda roja; 1/4 oval púrpura; 1/4 oval roja; 1/4 redonda púrpura

c) Se mantendrán las líneas homocigotos parentales, ya que toda su descendencia será de la variedad preferida comercialmente.

Problema 12.

- a) Hombre: $I^A i$. Mujer: $I^B i$. Hijo: ii
 b) Genotipo $I^A I^B$ $I^A i$ $I^B i$ ii
 Fenotipo AB A B 0
 Frecuencia 1/4 1/4 1/4 1/4

Problema 13.

- a) Padre AB-: $I^A I^B dd$
 Madre 0+: $ii DD$ o $ii Dd$
 Hijo B+: $I^B i Dd$
 b) El padre no, la madre, sí.

Problema 14.

- a) padres 1, 2 y 4
- b) padres 1 y 3
- c) padre 5
- d) padre 2
- e) padre 1

Problema 15.

Hay 12 posibles padres: $I^B_L^N_R_$

Problema 16.

$I^A i L^M L^N Rr \times I^B i L^M L^N Rr$

Problema 17.

50% Cinturón holandes: $Ss^h Ss^c$
25% Hereford $s^h s$
25% color sólido $s^c s$

Problema 18.

- a) El color del pelo amarillo es dominante para el carácter "color del pelo" y recesivo para el carácter "letalidad".
- b) La cola curvada es dominante
- c) $AaCc$
- d) AA letal; Aa amarillo; aa agutí. $C_$ cola curvada; cc cola normal

Problema 19.

- a) F1: 2/3 normales, 1/3 muescas; F2: 6/7 normales, 1/7 con muescas
- b) F1: 2 hembras:1 macho; F2: 3 machos: 4 hembras
- c) F1: 1:2; F2: 1:6;

Problema 20.

- a) No sería posible porque el alelo dominante "calvo" es recesivo para la letalidad. Los "calvos" son heterocigotos
- b) 1 normal: 1 calvo

Problema 21.

- a) Interacción génica no epistática
- b) 9 silvestres: 3 naranjas : 3 negros :1 albino
- c) 4/9 silvestres, 2/9 naranjas, 2/9 negros, 1/9 albinos

Problema 22.

- a) Epistasis doble recesiva
- b) $AAbb$ y $aaBB$
- c) $AaBb$
- d) $AaBb$ y $aabb$ o también $Aabb$ y $aa Bb$

Problema 23.

- a) Epistasis simple recesiva
- b) AAbb y aabb
- c) AABb y AaBb

Problema 24.

- a) Epistasis simple recesiva
- b) BbEe y bbee
- c) 9 negros: 4 dorados: 3 marrones

Problema 25.

- a) Epistasis doble dominante
- b) 3/4 blancas y 1/4 rojas
- c) 15/16 blancas, 1/16 rojas

Problema 26.

- a) Epistasis simple recesiva
- b) AaBb y aabb

Problema 27.

- a) Epistasis doble dominante
- b) AaBb y aabb

Problema 28.

- a) Epistasis doble dominante y recesiva
- b) Todos de ojos rojos
- c) PdpdSs y pdpdss (ambas de ojos rojos)
- d) PdpdSs y PdpdSs

Problema 29.

- a) Dos genes con dos alelos con dominancia completa de un alelo sobre el otro
- b) A_ sin espinas, B_ punta espinosa y bb espinosa.
- c) El gen A epistático sobre el B. Al estar el alelo A ya el fenotipo será "sin espinas" independientemente del genotipo del segundo gen, luego la interacción génica que mantienen esos dos genes es epistasis simple dominante.
- d) 32/36 "sin espinas", 3/36 "punta espinosa" y 1/36 "espinosa"

3.- GENÉTICA MOLECULAR

3.1. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Mapas de restricción

Un mapa de restricción representa una secuencia lineal de los sitios en los que diferentes enzimas de restricción poseen dianas en una molécula de ADN particular. Consiste en la ordenación de una serie de dianas para enzimas de restricción en una molécula de ADN concreta. En el mapa se representan las distancias entre dichas dianas, distancias que se miden en pares de bases (o en kilobases).

Cuando una molécula de ADN es cortada con una enzima de restricción y los fragmentos generados se separan por electroforesis en un gel de agarosa, se puede determinar el número de sitios de restricción y la distancia entre ellos a partir del número y la posición de las bandas en el gel. Cabe distinguir entre moléculas de ADN lineal y ADN circular:

ADN lineal: hay que tener en cuenta que el número de fragmentos que se generan tras una digestión, es el número de dianas presentes en su secuencia para esa enzima más uno. La suma del tamaño de los fragmentos debe de coincidir con el tamaño total del ADN digerido. Pero hay que tener en cuenta que el número de fragmentos no es siempre coincidente con el número de bandas que aparecen en un gel de agarosa, ya que puede haber fragmentos de igual tamaño que migran juntos.

ADN circular: el número de fragmentos que se generan tras una digestión, es el mismo que el número de dianas presentes en su secuencia para esa enzima. Cuando una enzima corta una vez sólo, nos revela el tamaño del ADN circular. La suma del tamaño de los fragmentos debe de coincidir con el tamaño total del ADN digerido. Como antes, hay que tener en cuenta que el número de fragmentos no es siempre coincidente con el número de bandas que aparecen en un gel de agarosa, ya que puede haber fragmentos de igual tamaño que migran juntos.

En cualquier caso, la información obtenida mediante electroforesis no nos revela el orden ni la localización de las dianas de restricción. Para poder realizar un mapa, se ha de cortar una muestra del ADN a mapear con una enzima de restricción, una segunda muestra del mismo ADN con otra enzima diferente y una tercera muestra de dicho ADN con las dos enzimas simultáneamente (digestión doble). Esta tercera digestión nos da la clave para determinar el orden de las dianas para ambas enzimas de restricción.

Marcadores moleculares

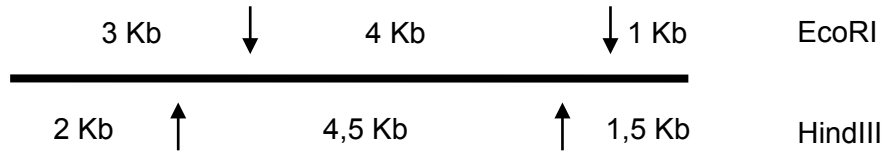
Es importante asignar los genotipos a los individuos del pedigrí para intentar ver la coincidencia entre sus alelos y los patrones de bandas.

Hay que tener en cuenta la distancia entre dianas, que nos dará el tamaño de las bandas observables pero, además, hay que prestar especial atención a la región con la que hibrida la sonda, pues aquellos fragmentos con los que no hibride, no podrán ser detectados tras el revelado.

En el caso de los microsatélites, los diferentes tamaños amplificados para un locus, pueden considerarse como alelos. Los microsatélites presentan herencia mendeliana simple y son codominantes. Para un locus microsatélite, cada uno de los alelos presentes en el genotipo de un individuo (tamaño de amplificado) procede uno del padre y otro de la madre.

3.2. PROBLEMAS RESUELTOS

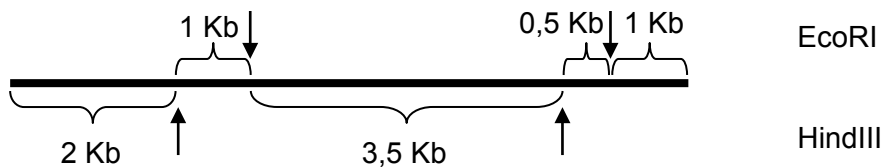
Problema 1. Un gen clonado muestra el siguiente mapa de restricción para las enzimas EcoRI y HindIII (↓ sitio de corte):



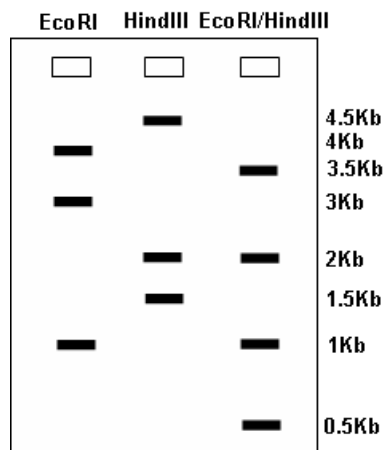
- Dibujar los patrones de los fragmentos de ADN esperados con cada enzima al separar los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa. Hacer lo mismo para el caso de la digestión doble.
- Dibujar el patrón esperado para una copia mutante del gen que ha perdido el primero de los cortes de EcoRI
- Dibujar el patrón esperado para una copia mutante del gen en la que ha aparecido una nueva diana para HindIII en el centro del fragmento de 2Kb.

Respuesta

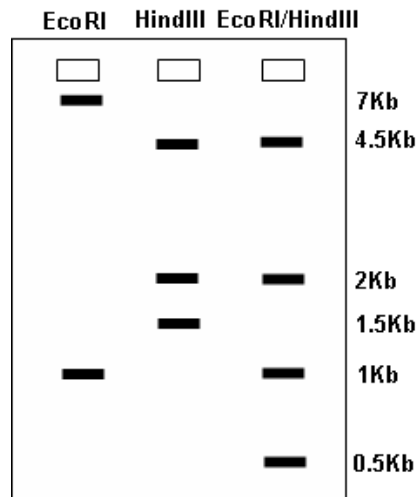
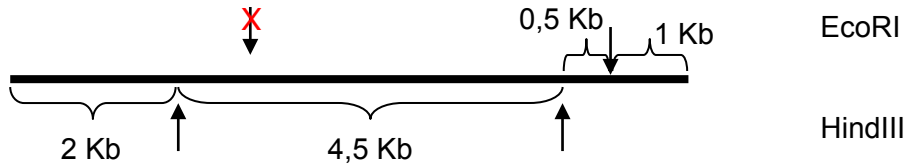
a) Para EcoRI el gen tiene dos dianas, por lo que será cortado en tres fragmentos de tamaños 4Kb+3Kb+1Kb. Para HindIII también tiene dos dianas, pero en diferentes posiciones, por lo que generará tres fragmentos pero de tamaños 4.5Kb+2Kb+1.5Kb. Cuando utilizamos las dos enzimas para digerir el gen, obtendremos 5 fragmentos diferentes (existen 4 puntos de corte, generando fragmentos de diana a diana de ambas enzimas), aunque dos de ellos presentan el mismo tamaño (1Kb), por lo que los observaremos como una única banda en el gel de agarosa. Los tamaños serán, por tanto, de 3.5Kb+2Kb+1(x2)Kb+0.5Kb (ver figura).



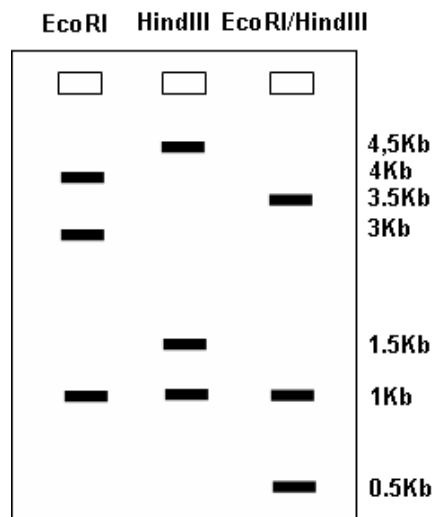
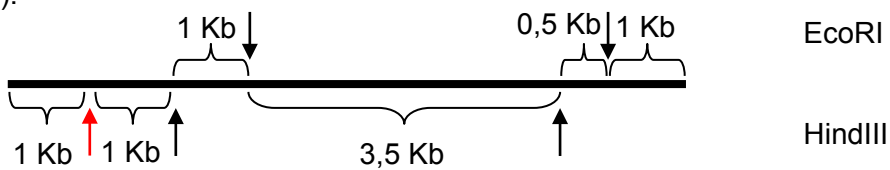
Así, en un gel de agarosa, observaremos los siguientes patrones de bandas:



b) Si la copia mutante del gen pierde una diana para EcoRI, al cortar con esta enzima, obtendremos solo dos fragmentos, siendo uno de ellos, la suma de los dos entre los cuales se encontraba la diana perdida para EcoRI, 7Kb+1Kb. Para el corte con HindIII el patrón de bandas no se vería afectado, pero sí nuevamente para la digestión doble, ya que hay un corte menos, 4,5Kb+2Kb+1Kb+0,5Kb (ver figura).



c) En este caso, cuando cortamos el gen con HindIII, al tener una diana más (tres puntos de corte) obtendríamos un fragmento más. Sin embargo, en el gel, no aparecerían 4 bandas, ya que se han generado dos fragmentos de igual tamaño (1Kb), por lo que correrán de igual forma. Los fragmentos para HindIII serían 4,5Kb+1,5Kb+1Kb(x2). Para EcoRI el patrón no se ve afectado y para la digestión doble los fragmentos generados serían 3,5Kb+1Kb(x4)+0,5Kb (ver figura).



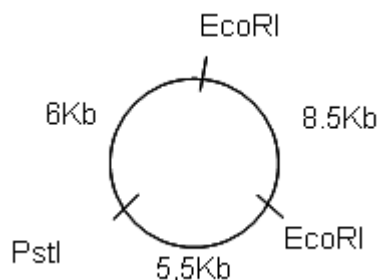
Problema 2. Se ha cortado con PstI un plásmido bacteriano circular que contiene un gen de resistencia a la ampicilina. Tras la electroforesis se observa una banda de 20 Kb. ¿Qué deducirías de los resultados que se plantean a continuación?

- a) Con EcoRI, el plásmido se corta en dos fragmentos: uno de 11.5Kb y otro de 8.5Kb
- b) La digestión PstI+EcoRI genera tres fragmentos de: 6Kb, 5.5Kb y 8.5Kb
- c) El ADN del plásmido cortado con PstI se ha mezclado y ligado con fragmentos de ADN cortados con PstI. Todos los clones recombinantes son resistentes a la ampicilina.
- d) Tras cortar uno de los clones recombinantes con PstI se obtienen dos fragmentos: 20 Kb y 6 Kb.
- e) El clon anterior se corta con EcoRI y se obtienen 10 Kb, 8.5 Kb y 7.5 Kb.

Respuesta

a) Al sumar los fragmentos 11.5 Kb + 8.5 Kb nos da un valor de 20 Kb. Este valor es coincidente con el fragmento generado con PstI, lo que significa que el plásmido tiene un tamaño de 20 Kb y que, por tanto, PstI lo corta una sola vez mientras que EcoRI tiene dos dianas dentro de la molécula circular.

b) Con la digestión doble podemos, ahora, obtener un mapa de restricción de esta molécula circular. Podemos deducir que el fragmento de 11.5 Kb generado por EcoRI, es cortado en dos fragmentos menores de 6Kb y 5.5Kb por la enzima PstI:

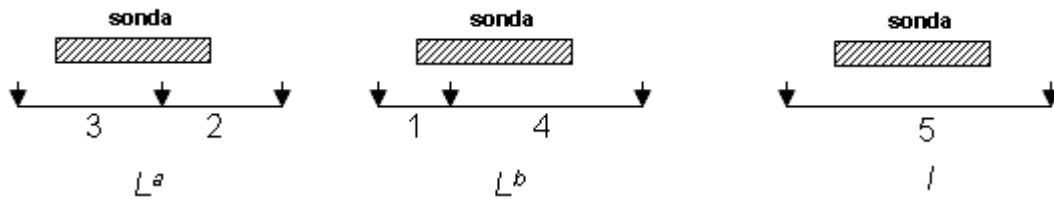


c) Al cortar con PstI, el plásmido se queda en forma lineal con extremos cohesivos para esa enzima. Al poner en contacto fragmentos de ADN cortados también con PstI junto con una enzima ligasa, los fragmentos, que tienen extremos complementarios, se ligan al plásmido y la molécula recirculariza con un inserto dentro de ella, obteniendo un plásmido recombinante. Si la diana para PstI estuviera dentro del gen de la ampicilina, el inserto “rompería” este gen, por lo que quedaría inactivo y las bacterias serían sensibles a la ampicilina. Por eso, podemos deducir que la diana para PstI no se encuentra dentro del gen de resistencia a la ampicilina.

d) Al cortar de nuevo con la enzima PstI, lo que estamos haciendo es separar nuevamente el plásmido del inserto, por lo que obtenemos un fragmento de 20 Kb correspondiente al plásmido y otro de 6 Kb que sería el tamaño del fragmento clonado.

e) Al aparecer un nuevo fragmento cuando cortamos con EcoRI el plásmido recombinante, que no aparecía en el plásmido bacteriano inicial, significa que existe una nueva diana para esta enzima. La diferencia entre el plásmido bacteriano inicial y el plásmido recombinante, es la presencia del inserto de 6 Kb. Por eso, deducimos que el fragmento clonado tiene una diana para EcoRI y que se encuentra situada entre las dos dianas EcoRI separadas por 11,5Kb.

Problema 3. Se conoce un gen autosómico con tres alelos L^a , L^b y I que se diferencian en una diana para la enzima de restricción PstI (↓ sitio de corte):



Diseñar un experimento para diferenciar los genotipos de los diferentes individuos que pudieren existir en una población si utilizamos como sonda el fragmento homólogo de ADN señalado en el esquema.

Respuesta

La diferencia entre los distintos alelos del gen corresponde a diferencias en secuencia nucleotídica. En este caso, estas diferencias de nucleótidos afectan a secuencias dianas para la enzima PstI. Esta información la vamos a utilizar para realizar un experimento que detecte un marcador RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción).

Para ello, debemos seguir los siguientes pasos:

- Digerir todo el ADN genómico con la enzima PstI, ya que inicialmente, no podemos aislar nuestro gen del resto del genoma.
- Para separar los fragmentos generados, según su tamaño, debemos ahora realizar una electroforesis en gel de agarosa.
- Los fragmentos de ADN, tal como se encuentran ordenados en el gel de agarosa, deben de transferirse a una membrana de nylon mediante la técnica de Southern-blot.
- Mediante una hibridación tipo Southern-blot, utilizando la sonda señalada en el esquema, podremos localizar específicamente la región correspondiente al gen estudiado, ya que es complementaria a esta región.
- El revelado de la hibridación pondrá de manifiesto los fragmentos de ADN genómico con los que la sonda ha hibridado

Así, tenemos diferentes genotipos posibles, que coincidirán con patrones de bandas:

L^aL^a : bandas de 3Kb y 2Kb

L^aL^b : bandas de 3Kb y 2Kb para el primer alelo y de 1Kb y 4Kb para el segundo alelo

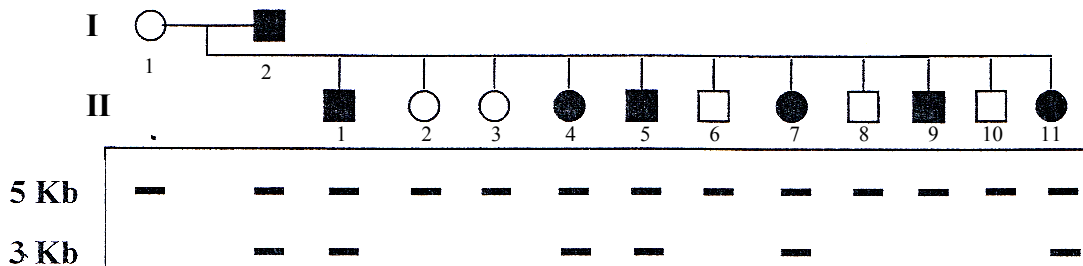
L^aI : bandas de 3Kb y 2Kb para el primer alelo y de 5Kb para el segundo

L^bL^b : bandas de 1Kb y 4Kb

L^bI : bandas de 1Kb y 4Kb para el primer alelo y de 5Kb para el segundo

II : banda de 5Kb

Problema 4. El siguiente pedigrí representa a una familia con alguno de sus miembros afectado por una enfermedad autosómica dominante. El ADN de todos los individuos fue digerido con la enzima PstI y sometido a electroforesis en gel de agarosa. Se analiza este ADN mediante hibridación tipo Southern con una sonda que corresponde a un fragmento de ADN humano clonado en un plásmido bacteriano. Los resultados del revelado de la hibridación se muestran junto al pedigrí.

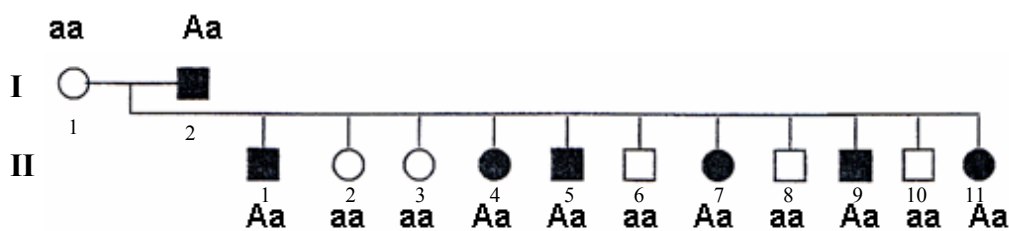


- Explica el protocolo seguido y los resultados obtenidos en los distintos individuos
- ¿Podemos usar la sonda con fines diagnósticos para esta enfermedad?

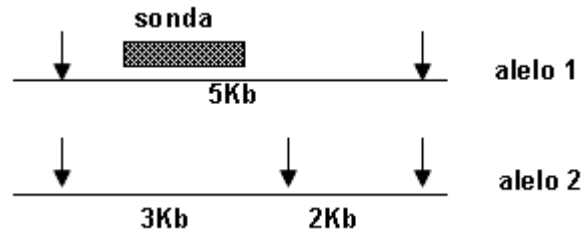
Respuesta

a) El marcador molecular utilizado en este análisis corresponde con un RFLP. El ADN genómico se ha digerido con la enzima PstI y los fragmentos generados se han separado mediante electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se realiza una transferencia de esos fragmentos (tal y como han migrado en el gel) a una membrana de nylon, a la cual, se fijan. Sobre esta membrana se realiza una hibridación (hibridación tipo Southern) con un fragmento de ADN marcado (sonda). Al revelar esta hibridación, nos aparecen bandas de diferentes pesos moleculares, indicando tamaños de fragmentos de ADN genómico que son homólogos a la sonda.

El primer paso consiste en asignar los genotipos a los individuos del pedigrí, teniendo en cuenta que la enfermedad es autosómica dominante:

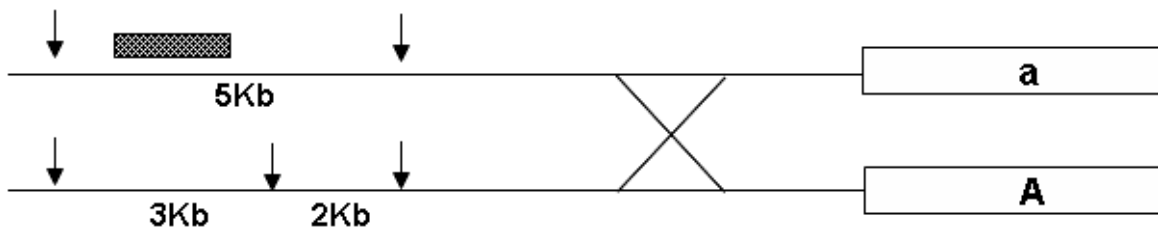


Al comparar los resultados del marcador molecular con los fenotipos (afectados/no afectados por la enfermedad) podemos ver cómo existe coincidencia entre el número y los tamaños de bandas del RFLP y el desarrollo o no de la enfermedad. Así, a excepción de un individuo (II-9), todos los afectados presentan dos bandas de 5Kb y 3Kb y los no afectados una única banda de 5Kb. Teniendo en cuenta que, en especies diploides, existen parejas de regiones homólogas (cromosomas homólogos), debemos de "identificar" dos alelos. Así, la diferencia en secuencia entre estos alelos podría ser detectada si afectara a una diana para la enzima PstI, tal como se muestra en el esquema:



Si la sonda hibrida en la región indicada, y teniendo en cuenta que la banda de 3Kb es exclusiva para los afectados, podemos deducir, que el *alelo 1* del esquema anterior corresponde al alelo *a* del pedigrí, mientras que el *alelo 2*, corresponde con el alelo *A*, que es el causante de la enfermedad. Entonces, los individuos heterocigotos (*Aa*) presentan dos bandas, 5Kb del alelo *a* y 3Kb del alelo *A* (ya que el fragmento de 2Kb de este alelo *A* no es detectado por la sonda). Los individuos homocigotos sanos (*aa*) presentan una única banda de 5Kb. Los hipotéticos individuos homocigotos (*AA*) presentarían una única banda de 3Kb.

b) Al establecer la relación entre los genotipos y el patrón de bandas, observamos que el individuo II-9 no presenta esta correspondencia. Esto se podría explicar porque las diferencias observables en el patrón de bandas no son debidas a cambios en la secuencia del propio gen causante de la enfermedad, sino a regiones cercanas a él. Es decir, el RFLP que detectamos no se corresponde con diferencias en la secuencia de los alelos del gen, sino que se encuentra en regiones ligadas al mismo, tal como muestra el siguiente esquema:



Este esquema ilustra el caso del padre (individuo I-2; genotipo *Aa*) que se encuentra afectado. Si durante la formación de los gametos de este individuo existiera un entrecruzamiento entre el RFLP y el gen causante de la enfermedad (como se indica en la figura), se generaría un gameto con genotipo *A* pero con marcador RFLP de 5Kb. Esto es lo que le ocurre al individuo II-9, que tiene un alelo *a* (5Kb) heredado de la madre y un alelo *A* (recombinante de 5Kb) heredado del padre.

Por tanto, la sonda se podría usar como diagnóstico, pero debemos tener en cuenta que existe un porcentaje de error debido a la posibilidad de recombinación entre el marcador RFLP y el gen causante de la enfermedad.

Problema 5. En un análisis con 4 marcadores de microsatélites se obtuvieron los siguientes resultados para 5 individuos (los números indican tamaños de fragmentos amplificados en pb):

	Individuo 1		Individuo 2		Individuo 3		Individuo 4		Individuo 5	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Locus 1	130	134	134	134	136	138	128	134	128	136
Locus 2	250	256	256	260	258	260	252	260	250	258
Locus 3	140	140	140	144	146	148	138	144	140	150
Locus 4	187	193	185	187	183	189	185	191	181	189

- a) ¿Qué diferencia existe entre los diferentes alelos de un mismo locus de microsatélite?
- b) ¿Cuántos alelos tienen los diferentes loci de microsatélites analizados en este estudio?
- c) ¿Se puede saber el número de repeticiones para cada uno de ellos? ¿Y el motivo de repetición?
- d) Si el individuo 1 es la madre del individuo 2, ¿cuáles de los otros tres individuos pueden descartarse como posibles padres?

Respuesta

a) Entre los diferentes alelos de un mismo microsatélite las diferencias existentes corresponden a un número variable de repeticiones de un motivo (generalmente dinucleótido, trinucleótido o tetranucleótido).

b) Con esta muestra no podemos saber el número de alelos totales existentes en la población, ya que pueden existir más alelos que no están representados en estos individuos. En los individuos analizados tenemos en el locus 1, 5 alelos; en el locus 2, 5 alelos; en el locus 3, 6 alelos y en el locus 4, 7 alelos.

c) A la hora de amplificar las repeticiones de los microsatélites se utilizan las regiones flanqueantes para diseñar los primers. La distancia en pares de bases entre el motivo repetido y las regiones donde se diseñan los primers son variables para cada microsatélite, por lo que el fragmento amplificado incluye el motivo repetido y parte de las regiones flanqueantes cuyo tamaño, en este caso, no conocemos. Por eso, no podemos saber el número de repeticiones en cada alelo. Tampoco sabemos el motivo de repetición, pues no tenemos información de la secuencia. Lo que sí sabemos, es que en los cuatro microsatélites, este motivo corresponde a dos nucleótidos, ya que los alelos tienen variaciones de dos pares de bases entre ellos.

d) Podemos descartar a los individuos 3 y 5, pues el individuo 2, debe de tener para cada microsatélite un alelo procedente de la madre y otro del padre.

3.3. PROBLEMAS PARA RESOLVER

Problema 1. Un fragmento de ADN se corta con PstI y HindIII por separado. Posteriormente, se utiliza una mezcla de ambas enzimas obteniéndose los fragmentos indicados a continuación:

PstI: 3Kb y 4Kb

HindIII: 2Kb y 5Kb

PstI+HindIII: 1Kb, 2Kb y 4Kb

Dibujar el mapa de restricción de este segmento de ADN

Problema 2. Se digiere un fragmento de ADN clonado con las enzimas de restricción HindIII y SmaI y con una mezcla de ambas. Se obtiene:

HindIII: 2,5Kb y 5Kb

SmaI: 2Kb y 5,5Kb

HindIII+SmaI: 2Kb, 2,5Kb y 3Kb.

a) Dibujar el mapa de restricción

b) Cuando la mezcla de fragmentos producida por la actuación de las dos enzimas a la vez se corta además con la enzima EcoRI, se observa la pérdida del fragmento de 3Kb y la aparición de una banda de 1,5Kb en el gel de agarosa. Indicar sobre el mapa anterior el punto de corte de EcoRI

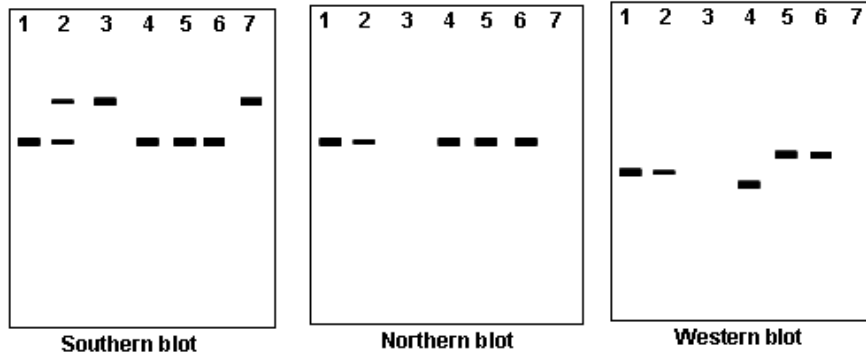
Problema 3. Un fragmento lineal de ADN de 11Kb se corta por separado con las enzimas de restricción EcoRI y HaeIII y con una mezcla de ambas obteniéndose los fragmentos indicados a continuación. EcoRI: 6Kb, 3Kb y 2Kb; HaeIII: 7Kb y 4Kb; EcoRI+HaeIII: 5Kb, 3Kb, 2Kb y 1Kb. Dibujar el mapa de restricción de este segmento de ADN.

Problema 4. El plásmido pAI21 se cortó con diferentes enzimas de restricción y se observaron las siguientes bandas en un gel de agarosa: BamHI (3,7 Kb, 3,5Kb), PvuII (7,2Kb), HindIII (7,2Kb), BamHI+PvuII (3,5Kb, 2,4Kb, 1,3Kb), PvuII+HindIII (3,6Kb). Dibuja el mapa de restricción del plásmido.

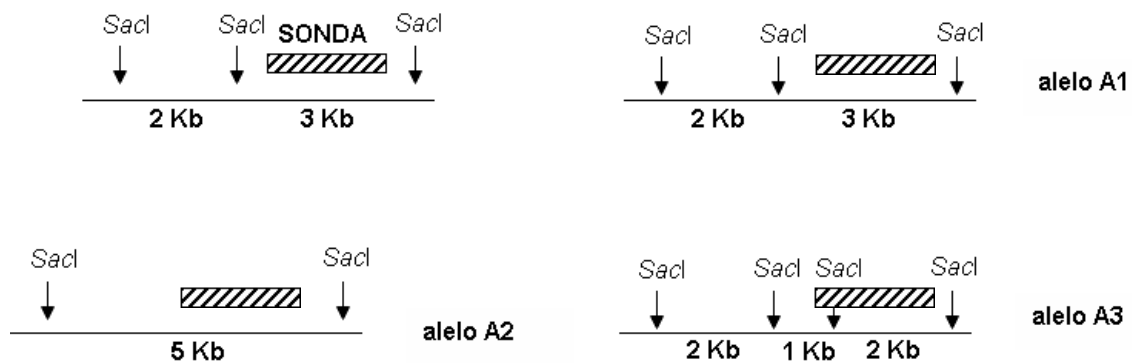
Problema 5. Una proteína está codificada por un gen que no tiene intrones. El fragmento de restricción SacI que contiene el gen completo puede ser identificado por hibridación tipo Southern-blot con el ADNc del gen marcado radiactivamente. Para determinar la causa de una enfermedad desconocida, se obtuvo sangre de pacientes y de personas sanas como controles. Se extrajo su ADN, se cortó con la enzima SacI, se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con el ADNc marcado como sonda. Igualmente, se extrajo ARN, se sometió a electroforesis, se transfirió a una membrana (Northern-blot) y se hibridó con el ADNc. Además se realizó la técnica de Western-blot y se probó la proteína codificada por el gen mediante el uso de un anticuerpo específico frente a ella.

Los resultados se muestran a continuación (las personas 1 y 2 son controles sanos y las personas 3, 4, 5, 6 y 7 son enfermos).

¿Cuál puede ser la causa de la enfermedad en cada uno de los individuos enfermos?

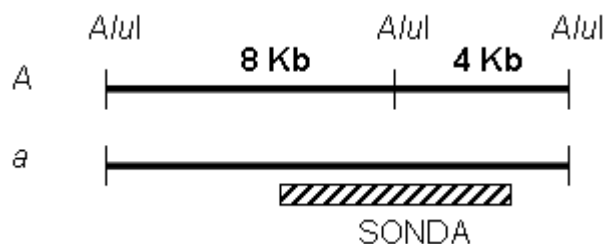


Problema 6. Tras una búsqueda de marcadores moleculares para una especie, se diseña una sonda complementaria al ADN genómico de esta especie en la región indicada en el esquema, y que permite diferenciar tres alelos distintos (A1, A2 y A3). El ADN extraído de diferentes individuos se corta con *SacI*, se realiza una electroforesis y se transfiere el ADN posteriormente a una membrana de nylon. Esta membrana se hibrida con la sonda (marcada radiactivamente) y se realiza una autorradiografía.



Dibujar esquemáticamente el resultado esperado para: Un homocigoto para A1, un heterocigoto A1A2, un homocigoto A2 y un heterocigoto A1A3.

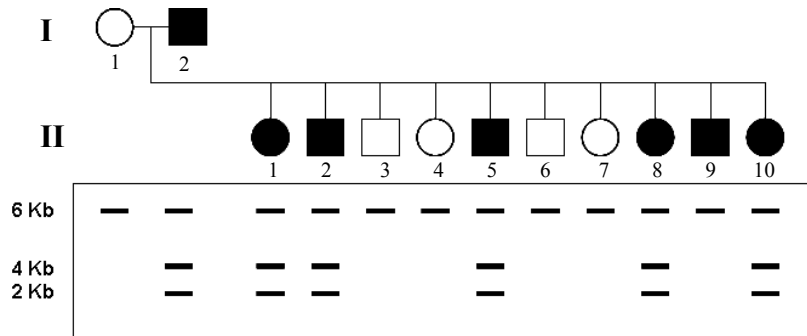
Problema 7. Un gen autosómico con dos alelos A y a se diferencian para la enzima de restricción *AluI* según indica la figura. Diseña un experimento para diferenciar los distintos genotipos de una población. Dibuja los posibles resultados.



Problema 8. Se prueban distintas sondas de ADN hibridando con el ADN genómico de los individuos de una familia numerosa en la que algunos miembros están afectados por una enfermedad autosómica dominante de manifestación tardía (aproximadamente a los 40 años). Sobre el Southern-blot obtenido con TaqI, una de las sondas detecta un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Los patrones del RFLP de cada individuo del pedigrí se muestran en la figura.

a) Explicar los resultados.

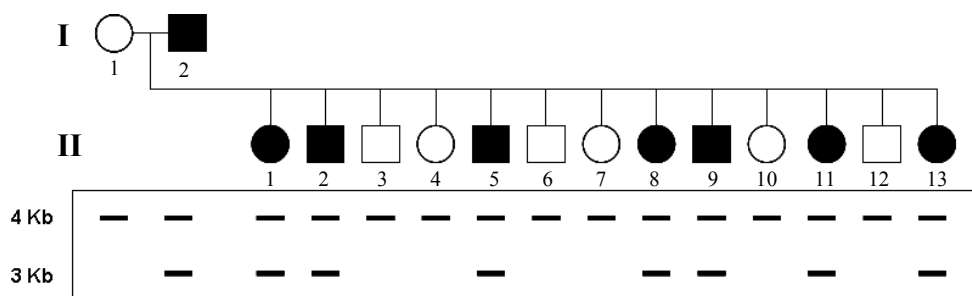
b) Analizar si existe ligamiento entre el RFLP y el gen causante de la enfermedad.



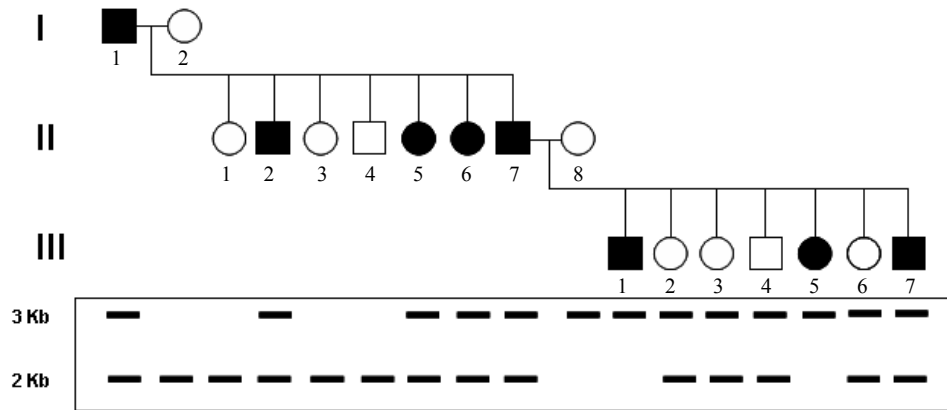
Problema 9. Se probaron distintas sondas de ADN hibridando con el ADN genómico de los individuos de una familia numerosa en la que algunos miembros están afectados por una enfermedad autosómica dominante leve. Sobre el Southern-blot obtenido con EcoRI, una de las sondas detecta un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Los patrones del RFLP de cada individuo del pedigrí se muestran en la figura.

a) Explicar los resultados.

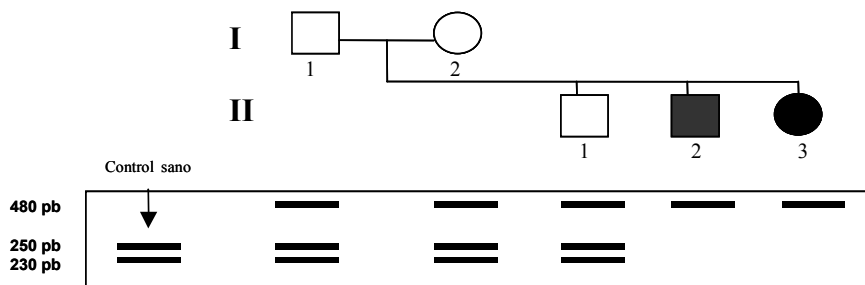
b) Analizar si existe ligamiento entre el RFLP y el gen causante de la enfermedad.



Problema 10. Se extrae ADN genómico de los miembros de una familia en la que existen afectados para una enfermedad autosómica dominante. Se digiere con PvuII y los fragmentos se separan en gel. Tras hibridación tipo Southern-blot con una sonda que detecta un RFLP se obtienen los resultados de la figura. ¿Está ligado el RFLP al gen causante de la enfermedad?



Problema 11. Una enfermedad está asociada a la ausencia de actividad de una enzima determinada. En cada miembro de la familia que se muestra a continuación, se amplificó el exón 2 del gen que codifica dicha enzima y se digirió con la enzima de restricción EcoRI, obteniéndose los siguientes resultados:

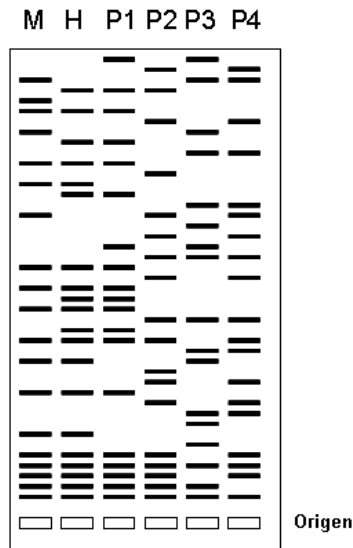


¿Se puede utilizar este marcador como método de diagnóstico? ¿Qué tipo de enfermedad se describe en el pedigrí? Explica, mediante un esquema, los resultados obtenidos a nivel molecular.

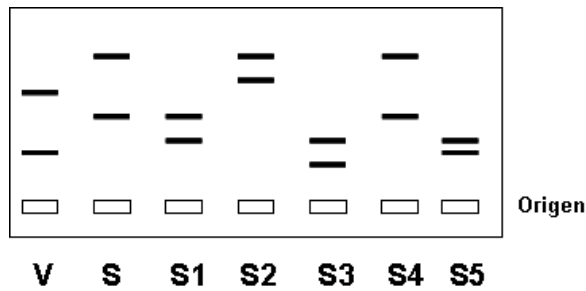
Problema 12. Una sonda detecta un RFLP con dos alelos alternativos de 1,7Kb y 3,8 Kb a partir de ADN de ratón digerido con HindIII. Un ratón, heterocigoto para un alelo dominante que determina cola curvada y con alelos para el RFLP de 1,7Kb y 3,8Kb, se cruza con un ratón silvestre que muestra sólo el fragmento de 3,8Kb. La mitad de los descendientes presenta cola curvada. Al analizar estos ratones con cola curvada para el RFLP, encontramos que un 20% de ellos son homocigotos para el alelo de 3,8Kb y el 80% son heterocigotos para los alelos 3,8Kb y 1,7Kb. a) ¿Está ligado el locus que determina la cola curvada al RFLP?; b) ¿Si lo está, a qué distancia se encuentran?; c) Explica estos resultados mediante un esquema.

Problema 13. Cuatro hombres se disputan la paternidad de un niño. Los forenses deciden utilizar el método de la huella genética para resolver el caso, analizando el ADN de la madre (M), del hijo (H) y de los cuatro posibles padres (P1 a P4). Los resultados obtenidos se muestran en la figura.

- a) ¿Quién es más probable que sea el padre?
 b) Atribuir el mayor número posible de bandas al padre y a la madre.



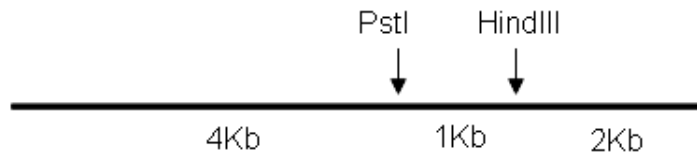
Problema 14. Se extrae el ADN de la sangre de una víctima de violación (V), del semen extraído de su cuerpo (S) y de muestras tomadas de 5 sospechosos (S1, S2, S3, S4 Y S5). Se lleva a cabo un estudio de microsatélites empleando una pareja de cebadores específicos de un locus. Una vez realizada la amplificación con la pareja de cebadores, se obtienen los siguientes resultados:



- a) Explicar los patrones de amplificación obtenidos.
 b) ¿Existe algún sospechoso que parezca culpable?

3.4. SOLUCIONES A LOS PROBLEMAS

Problema 1.

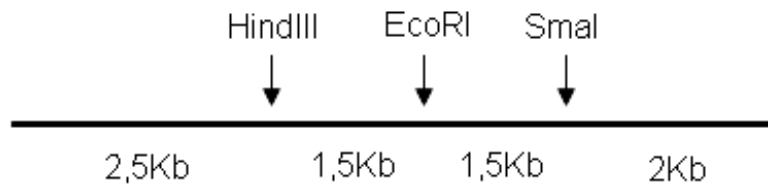


Problema 2

a)



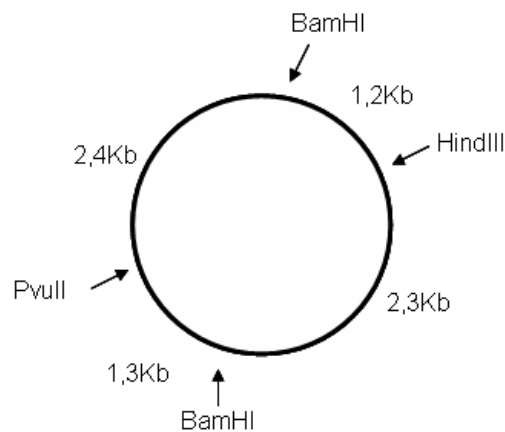
b)



Problema 3.



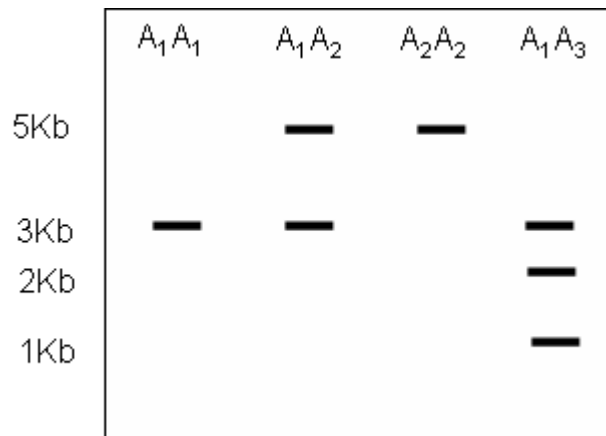
Problema 4.



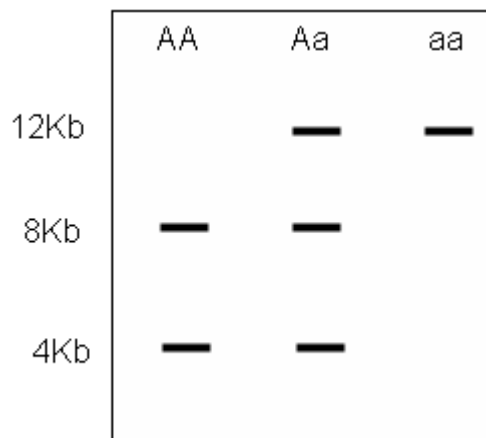
Problema 5.

No se transcribe el gen (individuos 3 y 7) o las proteínas producidas son defectuosas (individuos 4, 5 y 6). El individuo 1 es homocigótico para alelo normal y el 2 es heterocigótico portador de alelo que no se transcribe y produce la mitad de ARNm y de proteína que el 1. Los individuos 3 y 7 son homocigóticos para este último alelo y no producen proteína. Los individuos 4, 5 y 6, son homocigóticos para alelo que se transcribe y produce ARNm de igual longitud que alelo normal pero han sufrido algún cambio que cambia la secuencia de la proteína.

Problema 6.

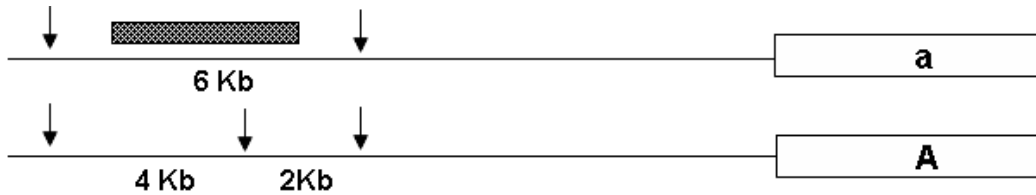


Problema 7. Se digiere el ADN genómico de los individuos con la enzima AluI, se somete el ADN cortado a una electroforesis y mediante la técnica de Southern-blot se transfieren los fragmentos a una membrana de nylon. Se realiza una hibridación utilizando la sonda para detectar las regiones homólogas a ellas. Los resultados posibles son:



Problema 8.

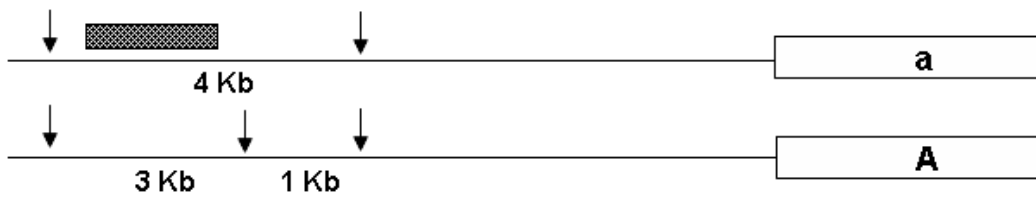
Están ligados, y una posible interpretación de los resultados se muestra en el siguiente esquema:



Afectados, Aa (6Kb/4Kb/2Kb); Sanos, aa (6Kb). El genotipo del individuo II-9 es resultado de un entrecruzamiento entre la región que contiene al RFLP y el gen causante de la enfermedad en una de las meiosis del padre.

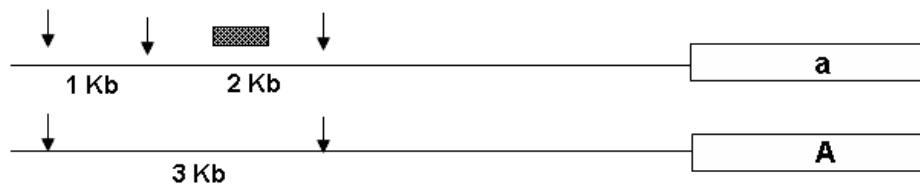
Problema 9.

Están ligados, y una posible interpretación de los resultados se muestra en el siguiente esquema:



Problema 10.

Se encuentran ligados. La interpretación podría ser:

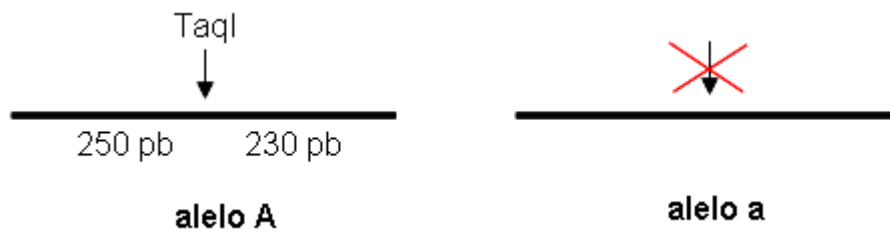


Afectados, Aa (3Kb/2Kb); Sanos aa (2Kb). Esto sería para las generaciones I y II. El individuo II-8 es un individuo procedente de otra familia, en el que, ahora, el alelo *a* está asociado a la banda 3Kb. Esto hace que el patrón de bandas cambie en la generación III. Así, los afectados Aa (A del padre y *a* de la madre) sean homocigóticos (3Kb/3Kb) y los sanos aa (*a* del padre y *a* de la madre) sean heterocigóticos (3Kb/2Kb).

El individuo III-7, es el resultado de un entrecruzamiento entre el RFLP y el gen causante de la enfermedad en el padre heterocigoto (II-7)

Problema 11.

Sí. Una enfermedad autosómica recesiva.

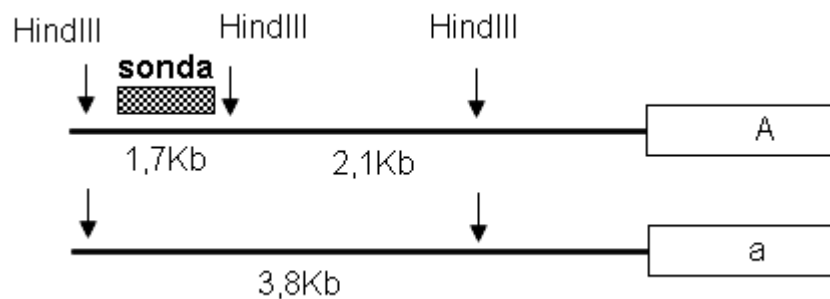


Problema 12.

a) Sí, se encuentran ligados.

b) 20 u.m.

c)



Problema 13.

a) El individuo P1.

b) La mitad deben de estar presentes en la madre y la otra mitad en el padre.

Problema 14.

a) Son debidos a la diferencia en el número de repeticiones en tándem

b) El S4

PRÁCTICAS DE LABORATORIO

1. APLICACIÓN DE LA PCR AL DIAGNÓSTICO GENÉTICO: DETECCIÓN DE PARÁSITOS QUE INFECTAN A MOLUSCOS

1.1. OBJETIVO

En esta práctica se pretende comprobar la eficacia de la PCR en el diagnóstico genético de enfermedades e infecciones parasitarias en moluscos bivalvos. Se utiliza la especificidad de los *primers* para amplificar una región concreta del genoma del parásito cuando se encuentra presente en una muestra.

1.2. FUNDAMENTO TEÓRICO

La PCR es una técnica que permite la amplificación (multiplicación) específica de ADN *in vitro*. Para llevarla a cabo se necesita un ADN molde, un par de cebadores o *primers* que marcan los puntos del inicio de síntesis de la cadena 3' y 5' del ADN a amplificar, una cantidad suficiente de desoxiribonucleótidos tri-fosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), una ADN polimerasa, su tampón, y las condiciones para una eficiente reacción. La reacción es cíclica y, tras una etapa inicial de desnaturalización del ADN molde (de 2 a 5 minutos), consta generalmente de unos 25 a 35 ciclos. Cada uno de los ciclos está compuesto por una etapa de **desnaturalización** (unos 30-60 segundos), una de **alineamiento** de los cebadores al ADN molde (unos 30-60 segundos), y una de **extensión** (o polimerización, cuyo tiempo depende del tamaño del ADN a amplificar y de la polimerasa usada, y, por lo general, una aproximación es un minuto por kilobase de ADN a amplificar). Tras los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, la reacción termina con una etapa de extensión final que suele ser de cinco minutos.

Aunque la PCR puede detectar desde una única molécula de ADN, para su buen funcionamiento el ADN molde debe ser de buena calidad (no degradado) y libre de inhibidores de actividad enzimática. Por su parte, la región de ADN a amplificar (amplicón) debe tener un tamaño no superior a las 3 ó 4 kilobases y, preferiblemente, sin estructuras secundarias (éstas bloquean la progresión de la ADN polimerasa durante la síntesis). Por su parte, los cebadores son la cadena inversa y complementaria a la secuencia de inicio de síntesis de cada una de las dos hebras del ADN a amplificar. Deben ser específicos, de forma que se alineen exclusivamente con la región complementaria en el fragmento de ADN que se desea amplificar y no se unan a ninguna otra secuencia de ADN cercana. Suelen ser de un tamaño entre 15 y 35 nucleótidos (cuantos más nucleótidos, más especificidad). Los cebadores deben tener una composición equilibrada de CGs (bases Citosina y Guanina) y ATs (bases Adenina y Timina) y, sobre todo, no deben tener estructuras secundarias ni complementariedad interna o con el otro cebador (de lo contrario se plegarían sobre sí o se alinearían entre sí formando dímeros).

La desnaturalización del ADN se consigue mediante su incubación a 94°C. Posteriormente, el alineamiento de los cebadores se consigue bajando la temperatura hasta un nivel ($T_m = \text{Temperature of melting}$) que permite a éstos unirse específicamente a su secuencia inversa y complementaria. Dicha temperatura (T_m) debe ser aproximadamente similar para los dos cebadores (no más de 5°C de diferencia) y depende tanto de la composición como del tamaño del cebador. Hay una variedad de algoritmos que permiten calcular la T_m ; una

formula básica para estimarla es: $4 \times GC + 2 \times AT$, donde GC es el número de Gs y Cs en el cebador y AT el de As y Ts. Dichos algoritmos también permiten chequear el potencial de formación de estructuras secundarias o de complementariedad tanto interna como entre cebadores.

En principio cualquier ADN polimerasa puede servir para sintetizar ADN *in vitro*. Sin embargo, la PCR requiere altas temperaturas para la desnaturalización del ADN molde (94°C) y para el alineamiento de los cebadores ($40\text{-}65^{\circ}\text{C}$ o más dependiendo de los cebadores). Por eso, la PCR requiere ADN polimerasas termoestables, las cuales se consiguen a partir de microorganismos que viven en lugares con altas temperaturas y cuyas polimerasas están adaptadas a esta situación. La ADN polimerasa comúnmente utilizada para PCR es la polimerasa Taq, obtenida a partir de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, la cual tiene una temperatura óptima de polimerización del ADN de 72°C , temperatura similar a la de donde vive este microorganismo. La fase de extensión con la Taq polimerasa se hace, por tanto, a 72°C (otras ADN polimerasas tendrán otras temperaturas óptimas de síntesis de ADN).

Como cualquier reacción bioquímica, la PCR necesita una solución tampón que es una mezcla de sales y reactivos (entre los cuales destaca el cloruro de magnesio). Las repeticiones cíclicas de diferentes temperaturas a lo largo de la reacción de PCR se consiguen mediante el uso de **termocicladores**. Estos son aparatos capaces de conseguir temperaturas precisas, mantenerlas durante un tiempo determinado y cambiar entre temperaturas de forma homogénea y rápida.

Así, la PCR consiste en la desnaturalización que abre la doble cadena del ADN molde, el alineamiento que permite el anclaje de los cebadores a sus correspondientes secuencias inversas y complementarias, y la extensión que permite la síntesis de ADN partiendo desde el último nucleótido 3' del cebador anclado a su correspondiente hebra de ADN molde. Un ciclo resulta en la duplicación del número de moléculas correspondientes al ADN a amplificar, tras el segundo ciclo habrá cuatro veces ese número, tras el tercer ciclo habrá ocho veces ese número de moléculas, etc. Al final habrá una cantidad teórica de $2^n \times C$ moléculas de ADN amplificado donde n es el número de ciclos de PCR y C la cantidad de moléculas molde inicial. Se recomienda no superar los 35 ciclos de PCR ya que, por un lado, la ADN polimerasa tiene una tasa de error de síntesis (cerca de uno por cada millón de nucleótidos incorporados) y, por otro lado, el agotamiento diferencial de productos en la reacción puede resultar en más errores (por ejemplo si se agotan los dATPs, puede que la Taq inserte un dTTP en una posición correspondiente a un dATP).

Una vez finalizada la reacción de PCR se visualizan los productos de la reacción mediante la técnica de electroforesis en gel agarosa. Al cargar el producto de la PCR en el gel agarosa y someter este último en un campo eléctrico directo, se aprovecha la carga eléctrica negativa del ADN para hacerlo migrar diferencialmente desde el polo negativo al polo positivo del campo eléctrico directo (de polos positivo y negativo estables). La porosidad del gel de agarosa hará que, a medida que migren desde el polo negativo hacia el polo positivo, las moléculas de ADN se separen en base a su tamaño de forma que las moléculas más cortas migren más rápido (y por consiguiente avancen más en el gel). Para tener una referencia, se separan también las moléculas de ADN de una mezcla de fragmentos de tamaños conocidos y cantidades relativas (marcadores de peso molecular). La separación simultánea, pero por separado (en diferentes pocillos), de los productos de la PCR y del marcador de peso molecular en el mismo gel permite al investigador determinar los tamaños moleculares de los productos de la PCR que deben coincidir con los esperados.

La presencia de *Perkinsus spp.* es conocida prácticamente en todas las aguas cálidas del mundo y ha sido históricamente asociada a mortalidades masivas de moluscos bivalvos. La presencia de *Perkinsus olseni* en las almejas del litoral europeo se conoce desde 1987. Este parásito se ha detectado por ejemplo en la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), en la almeja

japonesa (*R. philippinarum*), en la madreameja (*Venerupis pullastra*), en el pirulo (*V. aurea*) y en la almeja rubia (*V. rhomboides*). *Perkinsus olseni* puede considerarse en la actualidad el principal problema patológico para el desarrollo del cultivo de almejas en el litoral europeo. Hasta ahora, su diagnóstico precisaba de técnicas que requerían de tres a cinco días, y cuyo desarrollo y eficacia oscilaba entre el 60-90%. La puesta en marcha de nuevas técnicas más sensibles y rápidas constituye un avance muy importante en el control, ordenación y protección de las poblaciones y cultivos de moluscos bivalvos. Desde su implantación, la aplicación de la técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado el diagnóstico de enfermedades infecciosas en Acuicultura. La sensibilidad y la rapidez son las cualidades más notables de estas técnicas.

En esta práctica se pretende determinar la presencia de parásitos en distintas muestras de moluscos bivalvos mediante la amplificación por PCR de un fragmento de ADN cuya secuencia es específica del parásito. Se trata de un fragmento del espaciador intergénico de los genes ribosómicos (Figura 1). Los genes que codifican para tres de los cuatro ARNs que forman parte del ribosoma (ARN ribosómicos 18S, 5.8S y 28S) se disponen formando una unidad de transcripción compuesta por la secuencia ETS (espaciador externo que se transcribe por delante del gen 18S), el gen 18S, ITS-1 (espaciador interno entre el gen 18S y el 5.8S), el gen 5.8S, ITS-2 (espaciador interno entre el gen 5.8S y el 28S), 28S y otro ETS (espaciador externo que se transcribe por detrás del gen 28S). En un locus ribosómico, varios cientos de estas unidades de transcripción se repiten en tándem separados por una secuencia NTS (espaciador no transcrito). Juntos, el NTS y los ETSs constituyen el llamado IGS (espaciador intergénico). Los genes ribosómicos se caracterizan por su elevado grado de conservación. No es el caso de los espaciadores entre estos genes, que al no codificar ningún producto génico, no están sujetos a presión selectiva, y por tanto, su secuencia es muy variable entre especies. Esto hace que el fragmento de ADN que nosotros vamos a amplificar (un fragmento de 760 pb del NTS de *P. olseni*) tenga una secuencia específica del parásito.

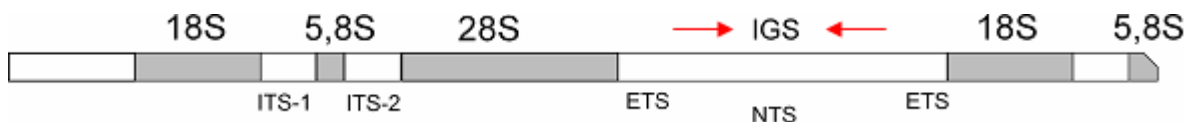


Figura 1. Organización de los genes ribosómicos en los genomas eucarióticos. Las flechas indican el lugar de anclaje de los cebadores específicos.

1.3. METODOLOGÍA

Reacción de Amplificación (PCR)

En un microtubo de 200µl añadir, siguiendo el orden indicado, los siguientes reactivos para un volumen final de 25µl:

- Agua estéril 16 µl
- 10% Tampón de PCR (10x) 2,5 µl
- 2mM de cada dNTPs (10 mM) 1 µl
- Primer PkI (0,2 µM) 2 µl
- Primer PkII (0,2 µM) 2 µl
- ADN de almeja 1 µl
- Taq polimerasa (2U) 0,5 µl

A continuación se colocan los microtubos en el termociclador y se programa para 35 ciclos según el programa:

Desnaturalización:	94°C	30 seg.
Alineamiento:	58°C	30 seg.
Extensión:	72°C	30 seg.

Se analizarán muestras de ADN procedentes de distintas almejas para determinar si están infectadas o no por el parásito. Una vez terminada la PCR, se someterán las muestras a una electroforesis en gel de agarosa y se procederá al diagnóstico de los individuos.

Preparación del gel de agarosa

En un matraz de 250 ml de capacidad, añadir 40 ml de tampón TBE (0,04 M Tris-acetato; 0,04 ácido bórico; 0,01 M EDTA) y 0,4 g de agarosa (1% de agarosa).

Calentar utilizando el microondas hasta que se funda la agarosa.

Dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C y añadir 4 µl de solución de colorante para ADN SYBR® Safe (10.000x).

Mientras se enfría la agarosa, colocar en el adaptador el molde en el que se preparará el gel. Dejar el molde en el adaptador en una superficie horizontal y situar el peine que labrará los pocillos a unos centímetros del borde.

Una vez se ha enfriado la agarosa, se añade la solución al molde con cuidado de retirar las burbujas que se formen. Dejar gelificar la agarosa hasta que adquiera una apariencia translúcida.

Retirar el peine y el molde del adaptador. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis y cubrirlo con tampón de electroforesis (TBE).

Electroforesis

Con cuidado de no romper los pocillos, cargar en el gel las diferentes muestras correspondientes a cada una de las reacciones de amplificación. Para ello, añadir 5 μ l de tampón de carga a los tubos en los que se desarrolló la PCR y, una vez mezclado con el ADN, con la ayuda de una micropipeta, cargar la mezcla en un pocillo del gel (una muestra por pocillo). Cargar en otro pocillo 4 μ l de la mezcla ya preparada de marcador de peso molecular, que nos servirá de referencia para determinar el tamaño de los fragmentos que queremos caracterizar.

Conectar la fuente de alimentación al gel durante 30 minutos a 50 volts/cm.

Analizar los resultados mediante la observación en un transiluminador.

Diagnóstico de los individuos

En aquellos individuos donde observemos una amplificación correspondiente a 760 pb estará presente el parásito, y por tanto, los podremos diagnosticar como positivos para esta enfermedad.

Se espera un resultado como el de la figura:

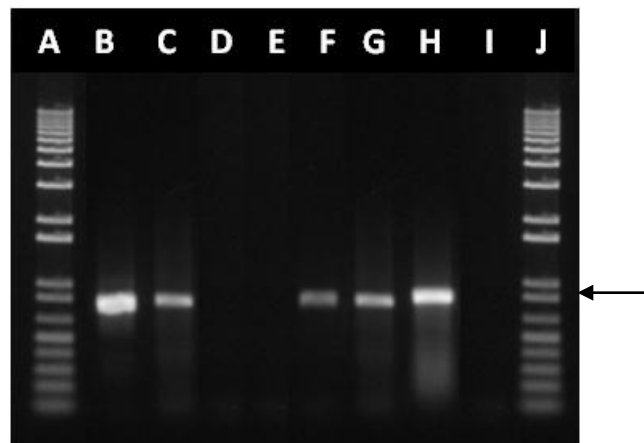


Figura 2. Se muestra el resultado del test de diagnóstico para *Perkinsus*. En un gel de electroforesis se cargaron diferentes muestras con el contenido de la reacción de amplificación: A y J, marcadores de ADN para determinación del tamaño del fragmento amplificado. B, amplificación de producto a partir de una muestra utilizada como control positivo (ADN de *Perkinsus*). C, amplificación de producto a partir de una muestra utilizada como control positivo (ADN de animal infectado). D y E, ausencia de amplificación del producto en muestras de tejidos de almejas procedentes de cultivos no infectados. F-H, amplificación del producto en muestras de tejidos de almejas procedentes de cultivos infectados. I, ausencia de amplificación del producto en muestras carentes de material biológico (control negativo, sin ADN en la reacción de amplificación). En esta Figura, la flecha señala los fragmentos amplificados de ADN (760 pb). Se demuestra la eficacia del método de diagnóstico para *Perkinsus olseni* en cultivos de almejas con los primers PkI y PkII, que detectan la presencia del parásito en almejas infectadas y no ocasiona problemas de falsos positivos puesto que cultivos no infectados no mostraron amplificación. Además, se demuestra la gran sensibilidad del método, puesto que detecta la presencia del parásito en cultivos aun cuando el nivel de infección es mínimo.

1.4. RECURSOS WEB

A través de los siguientes links de YouTube se puede acceder al video-tutorial de la práctica y a otros relacionados con ella.

Aplicación de la PCR al diagnóstico Genético: detección de parásitos que infectan a moluscos:

<https://www.youtube.com/watch?v=tZ-01LGrLlg&t=0s&index=6&list=PLBa9sJUx0zXWnO2Wu4H6qmJrEOIFNCzal>

Preparación de un gel de agarosa:

<https://www.youtube.com/watch?v=7G5eu4ICNnM&t=0s&index=5&list=PLBa9sJUx0zXWnO2Wu4H6qmJrEOIFNCzal>

1.5. CUESTIONES

1. ¿Qué criterios se deben seguir a la hora de diseñar cebadores para este tipo de análisis?
2. ¿Qué es un control negativo y un control positivo en la técnica de PCR?
3. ¿Qué harías si observa amplificación en muestras que claramente sabemos que no están infectadas?
4. ¿Qué es lo que hace de la PCR una técnica idónea para diagnóstico?
5. ¿Podríamos descartar completamente una infección si para una muestra observamos ausencia de amplificación tras la PCR?
6. ¿Podría detectarse mediante PCR, en un experimento similar al realizado en esta práctica, la presencia de varios parásitos al mismo tiempo?

2. CLONACIÓN DE UN PRODUCTO DE PCR

2.1. OBJETIVO

Esta práctica tiene como objetivo conocer el procedimiento para clonar un fragmento de ADN. Para ello, construiremos una molécula de ADN recombinante que, en nuestro caso, estará formada por un vector de clonación y un fragmento de ADN del parásito *Perkinsus olseni*. Utilizaremos como vector de clonación un plásmido que presenta una serie de características especialmente favorables: 1) se facilita la inserción de un fragmento de ADN, 2) se replica de forma autónoma en células procariotas (*E. coli*) y 3) permite distinguir entre las colonias que han incorporado plásmidos recombinantes y las que incorporaron plásmidos sin inserto. De esta forma, se pretende dar a conocer una técnica de gran utilidad y de uso rutinario en los laboratorios de Genética Molecular.

2.2. FUNDAMENTO TEÓRICO

En Biología Molecular, el término clonación hace referencia a una técnica mediante la cual se logra introducir un fragmento de ADN de interés en un vector, siendo esta "construcción genética" introducida posteriormente en células bacterianas, de forma que logre mantenerse y multiplicarse (replicarse) dentro de las mismas.

Por lo tanto, los componentes principales de un experimento de clonación son: a) el fragmento de ADN a clonar, que se denomina inserto una vez integrado en el vector, b) el vector de clonación, donde el inserto es introducido permitiendo así su incorporación dentro de la célula, y c) las bacterias donde es introducida la construcción formada por inserto más vector (plásmido recombinante), permitiendo obtener muchas copias del mismo. Este tipo de experimentos se engloban dentro de lo que se conoce hoy día como tecnología del ADN recombinante, dado que se construyen moléculas de ADN compuestas por fragmentos de diferentes orígenes.

El inserto puede ser cualquier fragmento de ADN, sea cual fuere su origen. No obstante, el tamaño máximo a insertar está limitado por la capacidad del vector usado. En el caso de los plásmidos más comunes el tamaño del inserto no suele superar las 10 kilobases (Kb), y un inserto de mayor tamaño suele generar una construcción recombinante cuyo tamaño obstaculiza su eficiente penetración en las células bacterianas. Cuando necesitemos clonar fragmentos de ADN de mayor tamaño se puede recurrir a otros vectores, como el fago lambda, en el que podemos clonar fragmentos de unos 15 Kb, los cósmidos, que pueden aceptar hasta 40 Kb, los BACs (Bacterial Artificial Chromosome), que pueden aceptar hasta 200 Kb, los YACs (Yeast Artificial Chromosome), que pueden aceptar hasta 2 Mb y los MACs (Mammalian Artificial Chromosome), que permiten clonar fragmentos de varias Mb.

Para obtener el inserto de interés hay que recurrir a una fuente de ADN que lo incluya, por ejemplo, el genoma de un animal o de una planta. Después hay que seleccionar una técnica que nos permita aislar el fragmento de interés, como, por ejemplo, mediante digestión del ADN genómico con enzimas de restricción (véase el protocolo más abajo), o bien mediante amplificación del inserto mediante PCR (véase el guión y práctica correspondientes a esta técnica). En ambos casos obtendremos un fragmento de ADN de tamaño conocido, por lo que realizaremos una electroforesis en gel de agarosa, identificaremos el fragmento adecuado y el ADN será recuperado mediante una técnica de purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

En esta práctica usaremos un plásmido como vector de clonación. Un plásmido es una molécula de ADN bacteriano circular que, no siendo imprescindible para la supervivencia y multiplicación de la bacteria, puede coexistir y replicarse en el protoplasma celular como molécula extra-cromosómica y transmitirse a las células hijas. Por lo tanto, para que un plásmido pueda ser usado como vector de clonación, tiene que ser capaz de mantenerse y replicarse dentro de la célula. Esto es posible porque el plásmido contiene una secuencia denominada *origen de replicación*, específica de cada especie bacteriana, donde se une la ADN polimerasa y comienza la replicación del plásmido. En cuanto al número de copias existentes en el interior de una bacteria, los plásmidos se pueden clasificar en dos categorías: 1) *relajados*, si existen múltiples copias, y 2) *restringidos*, si hay una única o muy pocas copias por célula. Los plásmidos relajados suelen ser más ventajosos ya que permite una multiplicación eficiente del plásmido y, por consiguiente, del inserto.

Para facilitar la integración del inserto, los plásmidos poseen una región que contiene varias secuencias diana específicas de diversas enzimas de restricción (sitio de clonación múltiple o *polylinker*). En esta región se pueden insertar fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción cuyas dianas se encuentran en este sitio de clonación múltiple. Para clonar insertos amplificados mediante PCR, se suelen usar vectores abiertos (no circulares) cuyos extremos 3' terminan con un nucleótido de timina protuberante (que no tiene nucleótido complementario en la otra hebra). Estos plásmidos aprovechan el hecho de que la *Taq* polimerasa (la enzima que permite la amplificación de ADN mediante PCR) añade un nucleótido de adenina a cada extremo 3' del ADN amplificado. Las adeninas en los extremos del fragmento amplificado se pueden emparejar con las timinas de los extremos del plásmido, hecho que facilita la inserción del amplicón (se denomina así al producto de la PCR) en el plásmido.

Durante la introducción de los plásmidos en el interior de las bacterias (proceso conocido como transformación) sólo una proporción de las mismas incorporarán el plásmido (la eficiencia de transformación nunca es del 100%). Los plásmidos comúnmente usados para este fin, contienen además uno o varios genes de resistencia a antibióticos, lo que permite seleccionar las células transformadas (que han incorporado el plásmido). Para ello, tras el proceso de transformación, se cultivan todas las bacterias en un medio que contiene el antibiótico ante el cual el plásmido confiere resistencia y, como consecuencia, sólo aquellas que hayan incorporado el plásmido sobrevivirán. Además, el plásmido puede contener algún sistema que le permita discriminar entre las células que llevan el vector con el inserto y las que llevan el vector recircularizado (sin inserto). Un sistema muy usado es el que utiliza la secuencia del gen de la β -galactosidasa (gen *lacZ*, del operón *lac* de *E. coli*) interrumpido por la región de clonación múltiple (*polylinker*). Para que tenga lugar la expresión del gen de la β -galactosidasa, es necesaria la presencia de *IPTG*, molécula que actúa como un inductor continuo del gen. La proteína β -galactosidasa, en presencia de uno de sus sustratos, *X-gal* (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-galactósido), produce un precipitado de color azul: el *X-gal* es hidrolizado por la enzima, dando lugar a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, que es oxidado originando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Así, si cultivamos en medio sólido bacterias transformadas con un plásmido que contenga el sistema de la β -galactosidasa en presencia de *IPTG* y *X-gal*, las bacterias que hayan incorporado plásmidos recombinantes (con inserto en el sitio de clonación múltiple) tendrán inactivo el gen de la β -galactosidasa, y no se formará el precipitado azul (darán lugar a colonias blancas), mientras aquellas que se hayan transformado con plásmidos sin inserto podrán producir el enzima, por poseer intacto su gen, y originarán colonias de color azul (Figura 1).

Existen otras estrategias similares que se pueden usar con el mismo propósito. Por ejemplo, usar plásmidos que contienen la secuencia de un gen letal interrumpida por el sitio de clonación múltiple. En este caso, la inclusión del inserto en el sitio de clonación múltiple interrumpirá al gen letal, siendo las bacterias transformadas con plásmidos con inserto las únicas que sobrevivan.

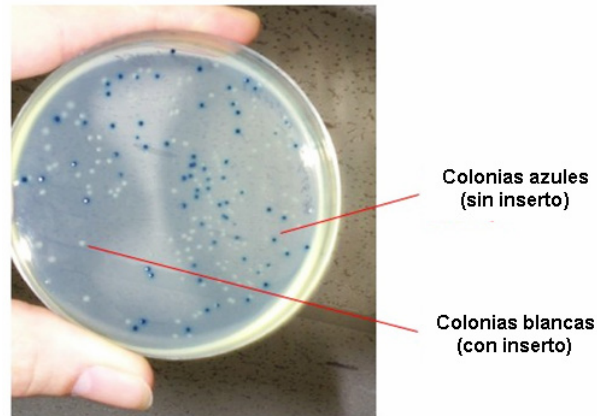


Figura 1: Resultado de un experimento de clonación

Hoy día, para usos convencionales, el investigador no tiene la necesidad de construir sus propios vectores, ya que existe una amplia variedad de vectores diseñados y producidos por empresas de Biotecnología para todo tipo de usos en clonación (por ejemplo los vectores pGEM-T (utiliza el gen de la β -galactosidasa como marcador de selección) y el vector TOPO (utiliza un gen letal).

La especie y cepa bacteriana usada durante el proceso de clonación también debe tener una serie de características especiales. No debe ser patógena (obviamente para evitar riesgos al personal investigador y a la población en general) y debe ser fácil de cultivar (se utilizan cepas no patógenas de *Escherichia coli*). Es preferible que tenga una reproducción (multiplicación) eficiente y que esté modificada de forma que se evite la recombinación entre el plásmido (vector) y su propio cromosoma (de lo contrario, se corre el riesgo de perder el inserto). De forma natural, una bacteria puede adquirir un estado fisiológico que la capacita ("permeabiliza") para sufrir un proceso de transformación. En esta situación se dice que la bacteria es "competente". Sin embargo, esta competencia natural ocurre con una frecuencia muy baja y no es útil con fines de clonación. Por ello, en el laboratorio se recurre a inducir artificialmente este estado con diversos métodos, proceso que se denomina "competencia artificial". Dicha permeabilización se puede inducir por métodos químicos. Para ello, las células se enfrían en presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} (en forma de CaCl_2), lo que prepara las membranas celulares para ser permeables al ADN plasmídico. Después, las células son incubadas en hielo con el ADN y luego se someten brevemente un choque térmico (por ejemplo, 42°C por 30-120 segundos), lo que facilita que el ADN entre en la célula. La permeabilización también puede conseguirse usando elementos físicos, como la corriente eléctrica. En este caso, las células bacterianas se someten a una corriente eléctrica de alto voltaje (alrededor de 2000V para el caso de las bacterias) y corta duración (varios μs). Como en el caso de los vectores, existe una gran variedad de cepas de bacterias "competentes" proporcionadas por empresas biotecnológicas para todo tipo de usos en clonación (por ejemplo las cepas de *E. coli* DH5 α y JM109).

Entre los múltiples usos de la clonación, podemos citar la multiplicación de las copias de un fragmento, ya que, al replicarse el plásmido recombinante dentro de la célula y al multiplicarse esta última, se consiguen muchas moléculas de ADN. La clonación también permite la discriminación entre diferentes secuencias o variantes de un ADN amplificado. Por lo general, cada bacteria transformada adquiere un sólo plásmido recombinante. Al ser cultivadas en medio sólido, cada bacteria originará una colonia de bacterias idénticas a la original y, por lo tanto, con el mismo inserto. La secuenciación de los insertos procedentes de diferentes colonias nos permitirá tener una idea sobre la variabilidad de las secuencias de ADN originales. Otra utilidad de la clonación es la generación de una genoteca o librería genómica, que consiste en un conjunto de clones bacterianos cada uno de los cuales porta un fragmento de ADN del genoma de la especie objeto de estudio. Cada fragmento está

incluido en un clon, y entre todos los clones, componen el genoma entero. Las genotecas también pueden contener fragmentos de ADNc (ADN complementario o copia), obtenidos por retro-transcripción de ARNm. En este caso el número de clones es menor ya que sólo estarán representados los genes que se expresaban en el tejido que se usó para extraer el ARNm. Igualmente los insertos serán, en general, de menor tamaño ya que los genes clonados no contendrán intrones.

La clonación también puede permitir que un gen se exprese dentro de una célula bacteriana. Para ello es necesario clonar el fragmento en fase con la pauta de lectura abierta del gen (normalmente el ADNc obtenido a partir del ARN mensajero) en un vector de expresión. El vector de expresión tiene un promotor especial que permite la inducción controlada de la transcripción de la secuencia insertada. Como resultado, las bacterias pueden sintetizar la proteína codificada por el inserto, permitiendo la producción de enzimas y otras proteínas de interés científico, farmacológico o comercial.

En esta práctica, vamos a clonar fragmentos de ADN que previamente hemos amplificado por PCR. Dichos fragmentos contienen una región del ADN espaciador IGS del ADN ribosómico (ADNr) del parásito *Perkinsus olseni*. Como vector de clonación vamos a utilizar el plásmido pGEM-T, un vector que presenta las características descritas anteriormente.

2.3. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo la clonación, vamos a seguir los siguientes pasos:

Obtención del fragmento a clonar y del vector de clonación

El ADN a clonar será el producto obtenido en la práctica de PCR (véase el guión y práctica correspondientes a esta técnica). El vector de clonación corresponde al plásmido comercial pGEM-T (*Promega*). En una reacción de PCR, la Taq-polimerasa tiene una actividad transferasa-terminal, no dependiente del ADN molde, que añade un nucleótido de adenina en los extremos 3' de los productos amplificados. El vector pGEM-T se encuentra en forma lineal y presenta en sus extremos 3' un nucleótido de timina. Esto permite una eficiencia mucho mayor de la unión entre el fragmento amplificado y el vector (Figura 2).

Ligado

Se trata, en este caso, de ligar los fragmentos de ADN obtenidos por PCR con el vector pGEM-T. En este proceso interviene una enzima llamada ligasa, que establece un enlace fosfodiéster entre la última base del producto amplificado por PCR (A) y la primera base de los extremos del vector T sin incorporar un nuevo nucleótido. Esto tiene como consecuencia que se produzca la unión entre las cadenas de ADN correspondientes al vector y al inserto por complementariedad entre las bases (Figura 2). Para llevar a cabo esta reacción, se realizan los siguientes pasos:

3. En un microtubo Eppendorf añadir:
 - 7 µl del producto de PCR (100-200 ng)
 - 1 µl de tampón de clonación (10x)
 - 1 µl del vector pGEM-T
 - 1 µl de la enzima ligasa
4. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

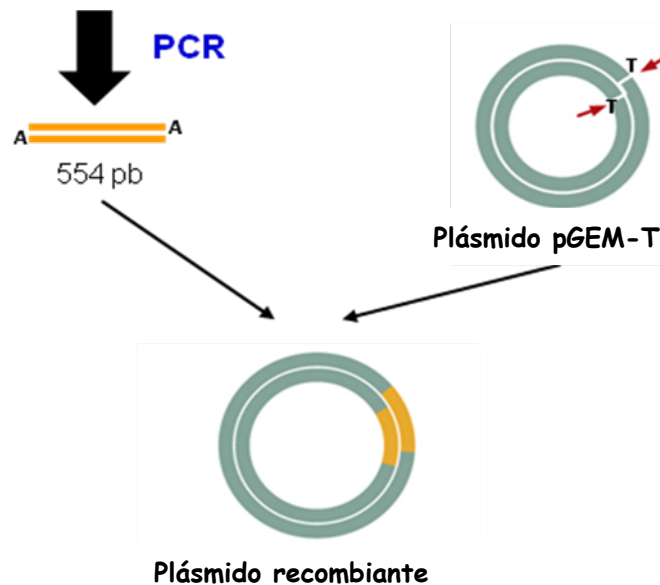


Figura 2: Ligado de un amplificado de PCR al vector de clonación pGEM-4Z

Transformación

Como se indicó en la introducción, transformación es el proceso mediante el cual los plásmidos se introducen en células bacterianas. Para ello utilizaremos bacterias competentes de la cepa JM109 de *E. coli*. Se procederá de la siguiente forma:

- Depositar en hielo un tubo Eppendorf durante unos minutos conteniendo 50µl de bacterias competentes.
- Añadir 10µl de la solución de ligación.
- Dejar 20 minutos en hielo.
- Choque térmico introduciendo el tubo Eppendorf con la mezcla en un baño a 42°C durante 45 segundos.
- Inmediatamente, pasar el microtubo a hielo, durante 2 minutos.
- Añadir 1000 µl de medio de cultivo LB líquido.
- Incubar durante 30-40 minutos a 37°C con agitación.
- Sembrar 50 µl del cultivo líquido en placas de medio LB sólido con Ampicilina, X-gal e IPTG.
- Incubar las placas en posición invertida durante toda la noche en una estufa a 37°C.

Observación de los resultados

Tras un periodo de incubación de entre 16 y 24 horas, observaremos la placa resultante en la cual podremos encontrar colonias de color blanco (con el plásmido recombinante).

2.4. RECURSOS WEB

A través del siguiente link de YouTube se puede acceder al video-tutorial de la práctica.

Clonación de un producto de PCR:

<https://www.youtube.com/watch?v=dIMLqs9w1IA&t=0s&index=12&list=PLBa9sJUx0zXWnO2Wu4H6qmJrEOIFNCzal>

2.5. CUESTIONES

1. ¿Qué son células competentes? ¿Qué características tienen?
2. En el proceso de clonación, ¿en qué paso se introduce el plásmido recombinante en la bacteria?
3. ¿Serviría el vector pGEM-T para clonar un fragmento de ADN cortado por enzimas de restricción? ¿Y uno amplificado por una ADN polimerasa de alta fidelidad?
4. ¿En qué se parece/diferencia la técnica de PCR a la de clonación?
5. ¿Cuál de las dos técnicas se parece más a lo que ocurre en la fase S del ciclo celular?
6. ¿Qué marcadores seleccionables hay en el vector p-GEM-T que son de utilidad para discriminar entre colonias portadoras de plásmidos recombinantes de las portadoras de plásmidos no recombinantes? ¿Se te ocurren otros posibles marcadores?
7. Tras una eficiente transformación ¿por qué se encuentran en la célula más colonias azules que blancas?

3. EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO TESTICULAR DE MAMÍFEROS

7.1. OBJETIVO

Que el alumno aprenda un método, basado en el diagnóstico molecular, que es usado habitualmente para el sexado de embriones de mamíferos así como a identificar órganos embrionarios en los que se expresa el gen SOX9.

7.2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Determinación genética del sexo en mamíferos

En mamíferos, la presencia de un cromosoma Y determina el sexo masculino, mientras que su ausencia implica un desarrollo femenino. Al inicio del desarrollo embrionario, la gónada es indiferenciada y bipotencial, lo que significa que puede seguir dos rutas de desarrollo alternativas y, en condiciones normales, mutuamente excluyentes: testículo u ovario. En la gónada embrionaria XY, el gen *SRY* (localizado en el cromosoma Y; * ver nota sobre la tipografía correcta de los genes de mamíferos al final de este guión) inicia una cascada de activación génica que induce a una sub-población de células somáticas a diferenciarse como células de Sertoli, encargadas de orquestar el desarrollo testicular. Estas células de Sertoli se organizan formando cordones sexuales (precursores de los túbulos seminíferos del testículo adulto) en el interior de los cuales se localizan las células germinales que dejan de proliferar (arresto mitótico). Las células de Sertoli controlan también la diferenciación de células de Leydig, células secretoras de testosterona y dihidrotestosterona que masculinizarán el soma del individuo. En la ruta masculina de desarrollo gonadal de ratón, la proteína *SRY* se une, junto con el factor esteroideogénico *SF1*, a una secuencia intensificador del gen *Sox9* y lo activa. Las mutaciones en que el gen *Sox9* se activa en una gónada XX, hacen que ésta siga la ruta testicular, mientras que si este gen permanece inactivo en una gónada XY, ésta seguirá la ruta ovárica. Por tanto, *Sox9*, al igual que *Sry*, son necesarios y suficientes para activar la organogénesis testicular. *SOX9* activa el gen *Fgf9* que a su vez estabiliza la expresión de *Sox9*, estableciéndose un bucle de automantenimiento de la expresión de éste último en la gónada masculina. *SOX9* activa también la expresión de otros genes como *Amh* (hormona antimülleriana), *Vnn1* (Vanin-1), y *Pgds* (prostaglandina sintetasa) que se sabe están implicados en la diferenciación testicular. Sobre la base de lo expuesto, se puede decir que *SOX9* es el gen alrededor del cual pivota el desarrollo testicular, y lo hace no sólo en mamíferos sino en todos los vertebrados.

En la gónada XX la ausencia de cromosoma Y, y por tanto del gen *SRY*, implica la inactividad de *SOX9* y la activación de *RSPO1* y *WNT4*, que inician la cascada de activación génica que conduce al desarrollo ovárico. Al no expresarse el gen *Sox9*, las células somáticas bipotenciales de la gónada embrionaria se diferencian como células pre-foliculares (no como células pre-Sertoli), mientras que las células de la línea esteroideogénica se diferenciarán como células de la teca (en vez de cómo células de Leydig) y las células germinales inician la meiosis, que se detiene poco después en la profase I (arresto meiótico). En resumen, en ausencia de *Sry*, la organogénesis gonadal sigue la ruta ovárica y el fenotipo somático del individuo será femenino.

La visión clásica acuñada por Jost (1953) de que la ruta ovárica es la ruta constitutiva, cambió sobre la base de nuevos datos en los que se describió la reversión sexual parcial o

total de individuos XX de ratón, que presentaron mutaciones de pérdida de función en genes como *Wnt4* y *Rspo1*. Los individuos XX *Wnt4*^{-/-} (homocigotos para el alelo mutado) mostraron gónadas parcialmente masculinizadas y expresión de los genes *Sox9* y *Fgf9*, diferenciación de células de Leydig, migración celular desde el mesonefros adyacente hacia el interior de la gónada (evento morfológico específico de la gónada XY) y desarrollo de un patrón vascular específico de testículo. La mutación de pérdida de función en el gen *RSPO1* provoca una reversión sexual completa de hembra a macho, es decir machos XX. Este fue el primer caso descrito de una única mutación en un gen que provoca reversión sexual completa de hembra a macho y esta mutación sitúa a *RSPO1* como el probable determinante ovárico en mamíferos. *RSPO1* activaría los genes implicados en el desarrollo ovárico e inhibiría directa o indirectamente los genes implicados en la ruta testicular de desarrollo gonadal. Otro gen que interviene en la ruta ovárica es *FOXL2*, necesario para el desarrollo y mantenimiento de la estructura ovárica. La ausencia de células de la granulosa funcionales conlleva la iniciación prematura de la foliculogénesis y un fallo ovárico prematuro. Sin embargo, la ausencia de reversión sexual de hembra a macho de ratones mutantes *Foxl2*^{-/-} indica que no es un determinante ovárico. En esta práctica vamos a amplificar un fragmento del gen *Sry*, y comprobaremos que está presente en células masculinas (XY), mientras que las células femeninas (XX) carecen de dicho gen.

SOX9: Un gen pleiotrópico

El gen *SOX9* fue inicialmente identificado como el gen responsable del síndrome displasia campomélica (DSCM), una malformación del esqueleto asociado con reversión sexual XY. *SOX9* es un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas SOX (Sry-like HMG box). En humanos se encuentra localizado en la región cromosómica 17q24.3-q25.1 y está compuesto por tres exones y dos intrones. *SOX9* se expresa en un gran número de tejidos embrionarios entre los que se incluye condrocitos, células de Sertoli, células de la placoda ótica, células pancreáticas, células del epitelio intestinal, células de la cresta neural, células del epitelio pulmonar, células de la notocorda y varios tejidos más. Esto sugiere que *SOX9* tiene múltiples funciones durante el desarrollo embrionario de mamíferos, y para poner de manifiesto el papel que *Sox9* tiene en el desarrollo de los diferentes órganos en que se expresa se han generado ratones mutantes para este gen. En el ratón, este gen está localizado en el cromosoma 11. El primer ratón mutante para *Sox9* fue descrito en 2001. Estos ratones mutantes heterocigóticos para *Sox9* reproducían la mayor parte de las malformaciones del esqueleto mostradas por los pacientes con DSCM, aunque otras anomalías, como la reversión sexual no se ponían de manifiesto. Los ratones mutantes heterocigóticos para *Sox9* morían alrededor del nacimiento, por lo que no era posible generar ratones mutantes homocigóticos. Debido a esto último, se generaron ratones mutantes condicionales para los diversos tejidos donde *Sox9* se expresa, es decir, animales que sólo carecen de la función del gen en tejidos u órganos concretos. Así, *Sox9* ha sido inactivado condicionalmente en homocigosis en condrocitos, lo que provocó la ausencia completa de cartílago y huesos. Los embriones con *Sox9* inactivado en condrocitos exhibían una condrodisplasia generalizada. *Sox9* también ha sido inactivado condicionalmente durante el desarrollo testicular de ratón. En estos ratones se observó que los individuos XY se desarrollaban fenotípicamente como hembras que tenían ovarios en lugar de testículos. A pesar de ello, el gen determinante de testículo, *Sry*, continuaba expresándose indicando que *Sox9* actúa posteriormente en la cascada génica que regula el desarrollo testicular. La inactivación condicional homocigótica de *Sox9* en ratón ha mostrado que también es necesario para la diferenciación de las células gliales de la espina dorsal, la formación de la válvulas y el tabique cardíaco, el desarrollo de la notocorda, el mantenimiento de las células madre pancreáticas, la invaginación de la placoda ótica, el desarrollo de la próstata, la supervivencia de las células de la cresta neural y el mantenimiento de la espermatogénesis. La segunda parte de esta práctica va a consistir en la observación de cortes histológicos a los que se ha realizado una inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-SOX9.

7.3. METODOLOGÍA

7.3.1. Detección del gen *Sry* mediante PCR

Para la detección del gen *Sry* haremos uso de la técnica PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Para ello, hemos diseñado cebadores específicos, por un lado del gen *Sry*, que se encuentra en el cromosoma Y, por lo que es específico de machos, y por otro lado del gen de la Miogenina, gen autosómico que nos va a servir como control positivo. Haremos una “PCR duplex”, es decir, una PCR en la que en una única reacción los cebadores de ambos genes están presentes, y por lo tanto podemos amplificar simultáneamente los fragmentos correspondientes a los dos genes. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

*-Oligonucleótidos para la amplificación del gen *Sry* de ratón:*

Sry-F 5'- GCA AAC AGC TTT GTG GTC AA 3'
Sry-R 5'- GGAAA GGG GAT GAA ATG GT 3'

-Oligonucleótidos para la amplificación del gen de la Miogenina de ratón:

Mio-F 5'- TTA CGT CCA TCG TGG ACA GCA T 3'
Mio-R 5' TGG GCT GGG TGT TAG CCT TAT G 3'

Reacción de Amplificación (PCR)

En un microtubo de 200µl añadir, siguiendo el orden indicado, los siguientes reactivos para un volumen final de 25µl:

- Agua estéril 16,5 µl
- 10% Tampón de PCR (10x) 2,5 µl
- MgCl₂ (25mM) 1,5 µl
- DMSO 1,2 µl
- Primer *Sry*-F (500 ng/µl) 0,5 µl
- Primer *Sry*-R (500 ng/µl) 0,5 µl
- Primer Mio-F (500 ng/µl) 0,5 µl
- Primer Mio-R (500 ng/µl) 0,5 µl
- dNTPs (25 mM) 0,2 µl
- Taq polimerasa (2U) 0,1 µl
- ADN (100 ng/µl) 1 µl

A continuación se colocan los microtubos en el termociclador y se programa para 35 ciclos según el programa:

Desnaturalización:	91°C	45 seg.
Alineamiento:	60°C	60 seg.
Extensión:	72°C	45 seg.

Una vez terminada la PCR, se someterán las muestras a una electroforesis en gel de agarosa y se procederá al sexado de los individuos.

Tras la reacción de PCR, se amplificará, en el caso del gen *Sry*, un fragmento de 179 pb, y en el caso del gen de la Miogenina un fragmento de 246 pb. Ambos amplicones se pueden separar perfectamente mediante una electroforesis en gel de agarosa, que se realizará a continuación. En el caso de un macho se distinguirán ambas bandas, mientras que en el caso de una hembra sólo se apreciará la banda de 246 pb. Si no se observara ninguna banda indicaría que la PCR no ha funcionado (Figura 1).

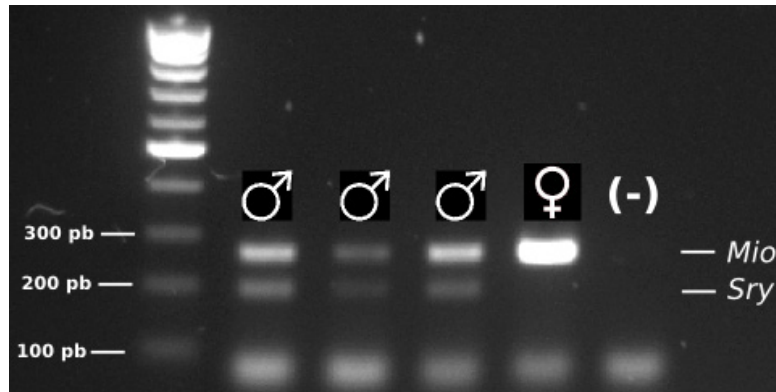


Figura 1: Electroforesis de los productos de una PCR realizada para el sexado de embriones de ratón. La presencia en el gel de una banda correspondiente al gen *Sry* denota la presencia de un macho, mientras que su ausencia indica que ese embrión es hembra. La banda de la miogenina sirve como control de calidad (control positivo) de la reacción de PCR. (-) es el control negativo (reacción sin molde), que indica la ausencia de contaminación de ADN en la mezcla de reacción de la PCR.

7.3.2. Observación de preparaciones de inmunohistoquímica para SOX9

Actualmente existen varias técnicas para detectar la expresión de genes en tejidos. Una de estas técnicas es la inmunohistoquímica, que nos permite identificar el tipo celular donde se localiza una proteína de interés, situación que en la mayoría de los casos implica que el gen que codifica para dicha proteína se está expresando en ese tipo celular. En una técnica inmunohistoquímica, la localización de la proteína de interés se pone de manifiesto mediante una reacción enzimática, siendo la catalizada por la peroxidasa de rábano una de las más usadas en la actualidad. Una de las formas de realizar una inmunohistoquímica mediante el método de la peroxidasa consiste en fijar el tejido de interés, deshidratarlo, incluirlo en parafina, y realizar cortes histológicos. Tras desparafinar e hidratar los cortes histológicos, se incuban con una solución que contiene el anticuerpo primario, específico de nuestra proteína de interés. En esta situación, en aquellas células donde la proteína de interés esté presente, se producirá la unión entre la proteína de interés y el anticuerpo primario. Dado que la proteína de interés está fijada en el interior de la célula, el complejo también permanecerá en el interior celular. Posteriormente se lavan intensamente las preparaciones para eliminar el anticuerpo primario que no se ha unido a la proteína de interés, y se vuelve a incubar con una solución que contiene un anticuerpo secundario, que es un anticuerpo específico contra la inmunoglobulina G de la especie donde se generó el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está conjugado con la peroxidasa de rábano (anti-Ig-Peroxidasa). Esto hace que se forme un complejo entre la proteína de interés, el anticuerpo-primario y el anticuerpo secundario conjugado, que permanece en el interior de las células donde esté presente la proteína de interés. Después, se vuelven a lavar las preparaciones para eliminar el anticuerpo secundario libre y se incuban con una solución que contiene H_2O_2 y di-amino bencidina (DAB). La peroxidasa cataliza la reacción $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Esto hace que se libere O_2 en el interior de aquellas células donde está retenido el complejo que oxida a la DAB, dando lugar a un precipitado marrón (Figura 2).

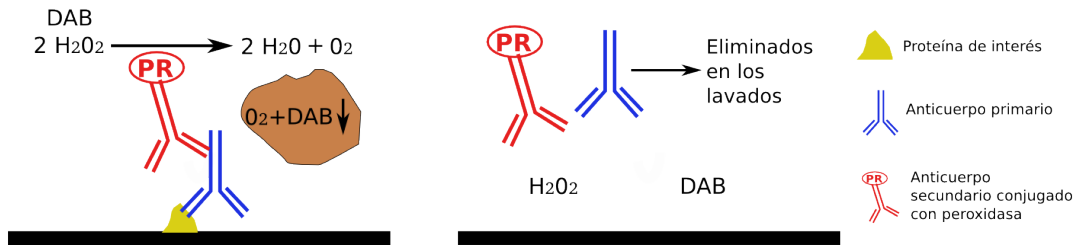


Figura 2: Fundamento de la técnica de inmunohistoquímica. La presencia en la muestra de la proteína de interés (esquema de la izquierda) permite el anclaje a la preparación del complejo compuesto por el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario y la peroxidasa, permitiendo la reacción coloreada con DAB. Su ausencia (esquema de la derecha) permite el lavado de todos los componentes, no habiendo reacción alguna.

Finalmente se hace una contra-tinción de las preparaciones con hematoxilina, se deshidratan y se montan con DePeX para su observación al microscopio óptico. Tras este proceso, observaremos las células positivas para la proteína de interés de color marrón, mientras que el núcleo de las células negativas se ve de color azul (hematoxilina; Figura 3)

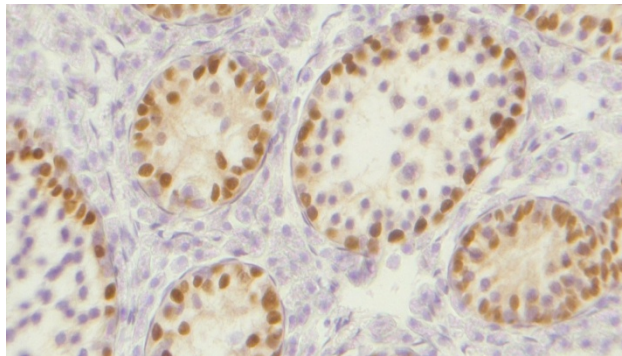


Figura 3: Marcaje inmunohistoquímico de tejido testicular de ratón, usando un anticuerpo primario anti-Sox9. Sólo las células de Sertoli aparecen marcadas con el color marrón. El resto de las células se muestran azul claro por la contra-tinción realizada con hematoxilina.

En esta práctica se suministrarán a los alumnos preparaciones inmunohistoquímicas, realizadas mediante el método de la peroxidasa, para la proteína SOX9 en embriones en el estadio embrionario 12.5 de ratón (E12.5). Dado que Sox9 es un gen pleiotrópico, su expresión se detectará en diferentes tejidos y órganos embrionarios. El objetivo de esta práctica consistirá en identificar la presencia o ausencia de expresión de este gen en los diferentes órganos y tejidos observados en los cortes de embriones examinados.

7.4. RECURSOS WEB

A través de los siguientes links de YouTube se puede acceder al video-tutorial de la práctica y a otros relacionados con ella.

Genes implicados en el desarrollo testicular de mamíferos:

<https://www.youtube.com/watch?v=Nn6wSwXfdck&t=0s&index=7&list=PLBa9sJUx0zXWnO2Wu4H6qmJrEOIFNCzaI>

Preparación de un gel de agarosa:

<https://www.youtube.com/watch?v=7G5eu4ICNnM&t=0s&index=5&list=PLBa9sJUx0zXWnO2Wu4H6qmJrEOIFNCzaI>

Manejo y mantenimiento del microscopio:

<https://www.youtube.com/watch?v=ENqLLqswYXA&t=0s&index=2&list=PLBa9sJUx0zXWnO2Wu4H6qmJrEOIFNCzaI>

7.5. CUESTIONES

1. ¿Qué otras técnicas inmunológicas existen en la actualidad para detectar la presencia de una proteína de interés en un tejido?
2. ¿Qué ocurre en mamíferos cuando el gen *SRY* está mutado? ¿Y si está translocado al cromosoma X?
3. ¿Un gen pleiotrópico tiene la misma función en todos los tejidos donde se expresa? Pon un ejemplo que incluya a *SOX9*.

*NOTA: La nomenclatura correcta de los genes de mamíferos es la siguiente:

Los nombre de los genes se escriben en cursiva con letras mayúsculas (p. ej. *SOX9*), para todas las especies, excepto para el ratón y la rata, en cuyo caso se escriben en cursiva con la primera letra en mayúscula y las demás en minúscula (p. ej. *Sox9*). Los nombres de las correspondientes proteínas siempre se escriben sin cursiva y con mayúsculas (p. ej. *SOX9*).