

PRINCIPALES HERRAMIENTAS MOLECULARES EMPLEADAS EN LA CIENCIA ANIMAL

MAIN MOLECULAR TOOLS EMPLOYED IN ANIMAL SCIENCE

ARANGUREN, YANI¹*MSc., MACHADO, ELWI² MSc., MONTES, V. DONICER³ MSc.

¹Universidad Estadual Paulista (UNESP), Facultad de Ciencias Agrícolas y Veterinarias, Laboratorio de Sistemática Vegetal– SP, Brasil.

²Universidad Estadual Paulista (UNESP) Facultad de Ciencias Agrícolas y Veterinarias, Laboratorio de Bioquímica de Microorganismos y de Plantas– SP, Brasil.

³Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia. Sincelejo, Colombia. Grupo de Investigación en Mejoramiento y Reproducción Animal, Estudiante de Doctorado en Genética y Mejoramiento Animal, Universidad Estadual Paulista (UNESP)SP, Brasil.

*Correspondencia: acaena1@gmail.com

Resumen

La domesticación animal y la ganadería son actividades desarrolladas por el hombre desde hace unos 10000 años, que ha permitido obtener una asombrosa cantidad de razas y atributos en especies animales, que han cubierto parte de las necesidades alimentarias, utilitarias y culturales del hombre. Con el desarrollo de la genética y la biología molecular durante el siglo XX, se han logrado optimizar muchas de esas prácticas milenarias. El progreso de técnicas como la PCR, la detección de marcadores moleculares, la secuenciación de DNA, RNA y proteínas, así como las herramientas bioinformáticas, han permitido conocer la constitución y organización del genoma de numerosas especies, su variación, la relación fenotipo-genotipo, la expresión genética y el metabolismo. Asimismo, con estos avances se han perfeccionado técnicas en las ciencias pecuarias, como el diagnóstico de enfermedades y zoonosis, la selección asistida, el mejoramiento genético, la reproducción, el estudio de diversidad genética y nutrición animal y el desarrollo de tecnologías de producción. Aun cuando muchas de los métodos de manejo y mejoramiento tradicionales no podrán ser reemplazadas, es necesaria la inclusión de nuevas técnicas moleculares, por lo tanto la presente revisión describe las principales tecnologías aplicadas en esta área, demostrando como el uso de herramientas moleculares es cada vez más necesario en términos técnicos y económicos.

Palabras Clave: diagnostico, DNA, PCR, variación genética.

Abstract

The animal domestication and livestock activities are developed by man since about 10,000 years ago, which has led to a staggering number of animal breeds and attributes, which have covered part of the need food, cultural and utility of man. With development of genetics and molecular biology in the XX century, has been made to optimized many of these ancient practices. The progress of techniques such as PCR, detection of molecular markers, sequencing of DNA, RNA and proteins, and bioinformatics tools, have allowed to know the constitution and organization of the genome of many species, its variation, genotype-phenotype relationship, gene expression and metabolism. In addition, these advances have perfected techniques in animal science, such as diagnosis of diseases and zoonoses, assisted selection, breeding, reproduction, the study of genetic diversity, animal nutrition and the development of production technologies. Although many of the methods of management and traditional breeding may not be replaced, it is necessary to include new molecular techniques, therefore the present review describes the main technologies applied in this area, demonstrating how the use of molecular tools is increasingly more necessary in technical and economic terms.

Keywords: diagnostics, DNA, Genetic Variation, PCR.

Introducción

Las sociedades humanas requieren para su sustentación desarrollar actividades como la ganadería y la agricultura, que han implicado tomar de los ecosistemas naturales especies que poseen alguna característica de interés, y domesticarlas. En este proceso se han desarrollado nuevas especies, razas y variedades, que poseen características fenotípicas provechosas para el hombre; siendo en especies animales principalmente características como el tamaño, los tiempos de desarrollo, los aportes nutricionales y los productos secundarios. Históricamente, la domesticación y el mejoramiento animal se han basado en hacer cruces controlados entre parentales con características de interés, seguido de la selección de individuos sobresalientes en las progenies, para hacer sucesivamente nuevos cruces. En estas prácticas tradicionales, la identificación, caracterización y selección de cada uno de los linajes, se basa en características morfológicas.

La variabilidad es una característica intrínseca de los organismos vivos, cada especie o linaje posee una constitución y organización genética común entre sus individuos, que los identifica y que además los diferencia de otras especies. Con el

progreso de la genética y la biología molecular, se desarrollaron técnicas que permiten detectar la presencia de secuencias polimórficas de proteínas o DNA entre individuos, llamadas marcadores moleculares; y que permiten determinar polimorfismos con mayor precisión, es decir, comparando la información genética propia de cada linaje o cada individuo (AZOFEIFA, 2006; YANG et al 2013). Más recientemente se han desarrollado tecnologías más avanzadas como los microarreglos, la secuenciación de DNA, de RNA y la proteómica, que han permitido, conocer mejor la constitución genética, la organización y función de los genes, y crear herramientas para el diagnóstico de enfermedades, para seleccionar materiales con mayor potencial genético y mejorar la producción y nutrición animal.

Organizaciones como la ONU y la FAO, así como diversos investigadores en el mundo, proyectan un significativo aumento en la demanda de alimentos debido al acelerado crecimiento de la población; así mismo la tendencia a la urbanización en los países en vías de desarrollo, está conduciendo a cambios en los hábitos de consumo de principalmente de alimentos de origen animal (THORNTON, 2010). Aun cuando las prácticas clásicas de manejo y mejoramiento animal no llegarán a ser remplazadas, este aumento en la demanda de producción y calidad, exige cada vez más el uso de las herramientas moleculares, que permiten obtener resultados más precisos, más rápidos y cada vez más económicos. Por tanto, en vista de la necesidad de implementación de estas prácticas, se presenta esta revisión donde se indican y explican cuáles son las principales herramientas moleculares y sus usos en la ciencia animal.

Herramientas moleculares empleadas en la ciencia animal

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Uno de los aportes más significativos en la biología moderna es el desarrollo de la técnica de PCR, realizado por Kary Mullis y sus colaboradores, quién por primera vez logró amplificar genes de copia simple en condiciones *in vitro*, empleando el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* (MULLIS et al, 1986). Una vez demostrada, esta técnica fue rápidamente perfeccionada con el descubrimiento de las polimerasas termo resistentes provenientes de microorganismos extremófilos, y con la automatización del proceso (SAMBROOK, 2001). Actualmente, la PCR es utilizada casi en todos los protocolos de biología molecular, incluso es fundamental en metodologías más complejas y avanzadas como la secuenciación genética; esto implica, que la PCR es la herramienta más poderosa empleada para resolución de problemas en muy diversas áreas de la biología, medicina, agronomía, zootecnia y veterinaria (LUQUE y HERRÁEZ, 2001; POLIDO et al 2012; YANG et al, 2013).

La técnica consiste en una reacción enzimática en ciclos sucesivos con variación de temperatura, donde a partir de una muestra de ADN del individuo de interés se construyen múltiples copias de una secuencia de DNA específica (DALE y VON SCHANTZ, 2002). Los componentes de la reacción son: una enzima DNA polimerasa, una mezcla de desoxiribonucleotidos trifosfato(dNTPs), una solución tampón y los iniciados (primers o cebadores) dirigidos a los extremos de la secuencia a amplificar, que puede ser una región conocida o aleatoria (SAMBROOK, 2001); estos componentes están disponibles en numerosas presentaciones comerciales que varían en eficiencia, costo, e incluso facilidad de uso. La extracción de DNA, puede ser realizada a partir de cualquier tipo de tejido, que va a depender del tipo de análisis y de la facilidad para tomar la muestra; y para realizar el procedimiento existen numerosos protocolos, así como kits comerciales que facilitan el procedimiento.

En definitiva, la reacción en cadena de la polimerasa es la herramienta molecular más útil a la ciencia animal, tanto en el área investigativa como en el área práctica, es una técnica fundamental para hacer análisis de polimorfismo, determinar el potencial genético, secuenciar y conocer genes, construir mapas de ligamiento, hacer selección asistida, diagnosticar enfermedades genéticas e infecciosas, determinar diversidad microbiana del rumen y obtener suplementos nutricionales de origen enzimático (pre y prebióticos), entre otros.

Variación genética y marcadores moleculares

Cada especie tiene una constitución y organización genética común con todos los individuos que los identifica, y que además los diferencia de otras especies o linajes. Igualmente, linajes diferentes pueden tener elementos genómicos en común, así mientras mayor es la relación filogenética más semejanzas genéticas existen entre ellas. Además, existe una variación entre los individuos de la misma especie (tanto en poblaciones que se reproducen sexualmente como en poblaciones clonales), comúnmente llamada polimorfismo o variabilidad genética, y que representa la capacidad genotípica de una población, para desarrollar diferentes fenotipos (BAUER, 1976).

Una condición necesaria para la diversidad y la evolución, es la variabilidad genética. La principal causa de variación es la mutación (que ocurre naturalmente con una frecuencia de entre 10^6 y 10^9 según la especie), que dependiendo dónde ocurra puede tener un efecto directo en el fenotipo. Otras causas de variación son la migración o flujo genético, la deriva génica, la selección natural y la selección artificial, en el caso de especies domesticadas y manejadas por el hombre (FRANKHAM et al, 2004).

La variabilidad genética puede ser valorada a través de la observación y análisis del fenotipo y el genotipo, dentro y entre poblaciones. Para especies

domesticadas, existen descriptores morfológicos que permiten de forma estandarizada evaluar las características fenotípicas de interés pecuario; no obstante, son características que pueden tener influencia ambiental. Por su lado, la medición del genotipo da una idea más exacta de la variabilidad, y para ello se emplean técnicas de biología molecular (marcadores moleculares) y bioinformática.

Los marcadores moleculares varían en función de la naturaleza de la biomolécula que se analiza, es decir, proteínas o ácidos nucleicos (Tabla 1). El método de proteínas (patrón isoenzimático) es el más antiguo, cada vez menos usado y aceptado por la comunidad científica. Los métodos de DNA son los más exactos y usados, y varían en función del conocimiento previo de secuencias del genoma de la especie problema, de las técnicas empleadas, del nivel de polimórfico, el tipo de dominancia, la reproducibilidad, transferibilidad y de los recursos requeridos para realizar la técnica (Tabla1). Por lo tanto, al momento de decidir qué marcador molecular emplear, hay que pensar en qué pregunta se espera responder, tomar en cuenta el nivel de parentesco que se va analizar y cuáles son los recursos disponibles. Un excelente marcador, que es bien aceptado por la comunidad científica son los microsatélites, ya que estos son muy informativos, codominantes, reproducibles, tienen alta transferibilidad entre especies relacionadas, y la metodología es rápida, fácil y económica (LITT y LUTY, 1989); sin embargo, la facilidad depende del conocimiento previo de regiones microsatélites en la especie estudiada o en otras relacionadas, ya que de lo contrario el trabajo se hace un poco más extenso y complicado (en animales domesticados existen ya muchos SSR caracterizados).

El uso de marcadores moleculares en la ciencia animal tiene grandes alcances, ya que permite realizar: genotipaje, mapeo genético y de QTLs, reconstrucciones de la historia evolutiva de linajes, análisis de diversidad y genética de poblaciones, identificación de parentescos, evaluación de endogamia, de individuos, genotipos, razas y especies, determinación de pureza de razas, selección asistida, caracterización y seguimiento de germoplasma, seguimiento epidemiológico y diagnóstico de patógenos y enfermedades genéticas, identificación de genes para transformación genética y evaluaciones para planeamiento de estrategias de conservación (DJARI et al. 2013; LIPMAN, 2013; XIAO, 2010; YANG et al., 2013).

Tabla 1. Características generales de los marcadores moleculares más conocidos y usados en la ciencia animal.

Tipo	Nombre del marcador	polimorfismo	Método empleado	Nivel polimórfico	Modo de acción	Referencia
Proteína	Patrón isoenzimático	Variantes de la misma enzima	Electroforesis de proteínas	Bajo	C	CARLEER et al. 1978
	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	Mutaciones y rearreglos genéticos	Digestión con enzimas de restricción Hibridización con sondas	Medio	C	BOTSTEIN et al. 1980
DNA	Polimorfismos de ADN amplificado al azar (RAPD)	Mutaciones y rearreglos genéticos	PCR con primers arbitrarios	Medio	D	WILLIAMS et al. 1990
	Polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	Mutaciones y rearreglos genéticos	Digestión enzimática Electroforesis en poliacrilamida	Medio	C	ZABEAU y VOS, 1994
	cDNA-AFLP	Mutaciones y rearreglos genéticos	RT-PCR, PCR, restricción y ligación enzimática	Alto	C	BREYNE et al. 2003
	Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)	Repetidos en tándem.	PCR	Alto	C	LITT y LUTY. 1989 TAUTZ et al. 1989
	Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)	Mutaciones puntuales, variación de un solo nucleótido	Secuenciación Hibridización en chip	Alto	C	NELSON et al. 2004
	Barcode	Variaciones en genes conservados (COI)	Secuenciación	Alto a nivel inter específico	D	HEBERT et al. 2003

D= Dominante, C= Codominante

En el proceso de domesticación se seleccionan fenotipos para preservar características de interés, los marcadores genéticos pueden aplicarse para identificar algún locus del genoma, que se encuentre cerca de un gen específico que codifique una característica en particular. Este tipo de selección utiliza la información molecular, obtenida a partir de los marcadores, en conjunto con

los datos de producción fenotípicos y de pedigrí para la selección de los animales. Los marcadores genéticos han permitido detectar algunos QTL en los cromosomas y la identificación de dichos marcadores, y su subsiguiente ubicación en los mapas de ligamiento han permitido identificar las regiones cromosómicas donde residen éstos.

Principalmente el enfoque de las técnicas moleculares, ha sido la identificación de genes candidatos y variantes moleculares, que influyen en la expresión de característica fenotípicas complejas (PEARSON et al., 2008). La gran ventaja de las técnicas moleculares es posibilitar la mejora en la selección de caracteres fenotípicos difíciles de ser seleccionados por los métodos tradicionales (DEKKERS, 2004).

Ensamble de genomas animales

Casi trece años después de la publicación del primer borrador del genoma humano por el equipo de Craig Venter (VENTER et al., 2001), la secuenciación y ensamblaje de genomas de mamíferos de interés comercial como *B. taurus* es casi una rutina, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación. El primer genoma de la vaca completamente montado (2.857.605.192 bp) fue publicado en el 2009 (ZIMIN et al., 2009), a partir de más de 37 millones de datos obtenidos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y unas 35 millones de lecturas obtenidas mediante la fragmentación aleatoria del DNA Shotgun) y secuenciando de manera individual (APARICIO et al., 2002). El otro enfoque que ha sido utilizado es el clonaje de grande fragmentos del genoma (100 a 150 Kb) en plásmidos artificiales de bacterias (BAC) (OSOEGAWA et al., 1998), aumentando así la cobertura total del genoma y disminuyendo el engorroso trabajo bioinformático.

Gracias a las técnicas de secuenciación de segunda generación se tiene un aumento significativo en la velocidad de generación de datos y en la posibilidad de encontrar desconocidos y más informativos Polimorfismos de nucleótido simple (SNP), asociados a genotipos y fenotipos específicos. Este nuevo abordaje precisa del uso de secuencias altamente confiables las cuales son generadas por secuenciadores como el GL-Flex 454 de Roche (Tecnología de Pirosecuenciación) o el Hi-seq *Genome Analyzer* de *Illumina* (Terminador reversible) (HYTEN et al., 2010; Di BELLA et al., 2013), generando 100 veces más datos (PAREEK et al., 2011) que los secuenciadores de primera generación basados en el método Sanger (SANGER et al., 1977).

De manera general las tecnologías de secuenciación de segunda generación se basan en la síntesis en paralelo e individual de decenas de millones de hebras complementarias de una molécula de DNA (METZKER, 2010), produciendo

millones de lecturas (reads) e datos (en el rango de Gigabytes de información) que son analizadas por separado (Tabla 2), precisando de una increíble cantidad de procesamiento computacional para ensamblar los resultados en una secuencia consenso, y el formato de datos generados varía de una plataforma a otra debido principalmente al tipo de algoritmo usado (PAREEK et al., 2011; METZKER, 2010). Las tecnologías de secuenciación de tercera generación prometen solventar los problemas de cantidad datos, análisis bioinformático y variación de formatos, unificando todo en un solo fichero con toda la información necesaria y a un costo mucho más bajo.

Tabla 2. Características generales de las principales plataformas de secuenciación empleadas en la actualidad.

Plataforma	Preparación de la muestra	Método de detección	Tiempo de preparación de la librería (Días)	Método de secuenciación	Precisión de la lectura	Longitud de la lectura
Roche GS FLX	Clonación por PCR en la superficie de una esfera magnética	Emisión de luz por liberación de pirofosfato	3-4	Pirosecuenciación	99,5%	400 pb
Illumina Hiseq 2000	Clonación por PCR en puente en superficie de vidrio	Emisión fluorescente por incorporación de nucleótido marcado	2	Terminación reversible marcada	>98,5%	36 pb
ABI Solid	Clonación por PCR en la superficie de una esfera magnética	Emisión fluorescente por ligación de nucleótido marcado	2-4,5	Secuenciación por ligación	99,94%	35 pb
SMRT	Detección de una sola molécula	Detección en tiempo real por fluorescencia por incorporación de nucleótidos marcados	1	Nucleótidos marcados en el grupo fosfato	>99%	>1000 pb
HeliScope	Detección de una sola molécula	Detección en tiempo real por fluorescencia por incorporación de nucleótidos marcados	N/A	Terminación reversible marcada	N/A	>1000 pb

pb=Pares de base

Hibridación con sondas

Gracias al desarrollo del genotipaje en paralelo de SNP (MATSUZAKI et al., 2004) y mediante la hibridación de DNA *in situ* o *microarray*, fue posible evaluar en una primera etapa cerca de 10.000 SNP de un individuo en un solo examen, esto ayudó a abaratar los costos de investigación, principalmente en el área de

mejoramiento genético animal, generando información indispensable para aumentar la producción. En la actualidad el chip *BovineHD DNA Analysis* de Illumina® permite analizar aproximadamente 749.000 SNP (Relacionados solo con la producción de leche y carne) de los 22.055.953 SNP mapeados y registrados en el NCBI (LIPMAN, 2013), con un 99,95% de confiabilidad, permitiendo el genotipaje de más de 50.000 SNPs a un costo que no sobrepasa los 100 dólares o de 700.000 SNP por aproximadamente 300 dólares (GEORGES, 2012; MATUKUMALLI et al., 2009). La técnica se basa en la capacidad de apareamiento entre hebras complementarias de DNA, para identificar pequeños cambios en la secuencia de los SNP. En este caso secuencias específicas de oligonucleótidos están fijadas a una lámina de vidrio y se unen por complementariedad de bases con el DNA problema y emitiendo fluorescencia si hay un cambio en un nucleótido (MASKOS Y SOUTHERN, 1992).

Herramientas moleculares en el diagnóstico animal

Los métodos tradicionales de diagnóstico, como la observación en frotis de sangre de hemoparásitos, constituyen la principal forma de análisis; sin embargo, estas técnicas presentan baja sensibilidad en fases subclínicas y crónicas de las enfermedades debido principalmente a las condiciones intracelulares del microorganismo (ANTONANGELO et al., 2012; DA SILVA et al., 2013) y a la capacidad de observación del personal de laboratorio. Por otro lado los ensayos inmunológicos como el Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Inmunoaglutinación (IAI), presentan una mejor sensibilidad y son usados para detectar antígenos o anticuerpos específicos del o contra el microorganismo presente en los animales portadores, aunque con especificidad dependiente del antígeno utilizado (FERREIRA et al., 2007), pero poseen baja sensibilidad para detectar pequeñas concentraciones de antígenos o anticuerpos en sangre en periodos de ventana inmunológica o seroconversión. Estos problemas fueron solventados con la invención de la PCR (SAIKI et al., 1988) y su uso en el área veterinaria, aumentando así, la capacidad y sensibilidad de diagnosticar infecciones en animales, incluyendo nuevos enfoques para el control de las enfermedades a través de una mejor comprensión del desarrollo y evolución de los microorganismos. Además, la introducción de nuevas técnicas moleculares de diagnóstico basadas en la PCR, como la Amplificación Isotérmica de Ácidos Nucleicos (NASBA), la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR), la Amplificación por Desplazamiento de Hebra (SDA) y a Amplificación de la Replicasa *Q_b* (MONIS et al., 2005), permiten detectar y diferenciar los microorganismos hasta el nivel de especie, genotipo y subtipo en base a su material genético (DNA o RNA); siendo este tipo de herramientas cada vez más usadas en estudios diagnósticos y epidemiológicos mejorando significativamente la comprensión y transmisión de las infecciones en animales (XIAO, 2010)

Estudios de Diversidad Microbiana.

El rumen es uno de los ecosistemas que está generando más información biotecnológica en la actualidad, no solo por las tendencias resientes en la producción ganadera mundial, sino por el potencial genético que alberga (FRANK y PACE, 2008). Este ambiente ha evolucionado para degradar diferentes materiales de origen vegetal poco asimilables, produciendo ácidos grasos de cadena corta y proteínas de origen microbiano (HOBSON y STEWART, 1997) que tienen un impacto directo sobre el animal y el medio ambiente (MCSWEENEY y MACKIE, 2012). Hasta hace poco tiempo los estudios microbiológicos del rumen se basaban en técnicas de cultivo clásicas, que logran aislar e identificar solo del 10 al 20% de la población total (DUAN et al., 2006), a medida que las técnicas moleculares han evolucionado el número de especies bacteriana identificadas en el rumen ha ido aumentando. Por ejemplo HUNGATE (1966) logro aislar 23 especies bacterianas del rumen usando técnicas de cultivo tradicionales, mientras que KIM, MORRISON y YU (2011) identificaron 5271 unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de bacterias y 950 OTUs de Arqueas teniendo como base el aislamiento, secuenciación y análisis del DNAr 16s; n este caso un OTU equivale a una especie bacteriana (KIM ET AL., 2011).

Herramientas bioinformáticas

El uso de herramientas moleculares, ha implicado paralelamente el desarrollo de la bioinformática, que empleando programas y bases de datos (muchos disponibles *on line*), permiten procesar, analizar y almacenar datos genómicos e proteómicos. La base de datos más conocida es la del NCBI que forma parte de la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) de los Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El NCBI posee una serie de bases de datos bibliográficos, genéticos y bioquímicos, así como herramientas para el análisis de secuencias, todas disponibles gratis *on line*. De estas, el GenBank es la más importante, debido a la amplitud de datos que ofrece, ya que deposita secuencias de DNA y genomas de cualquier origen, parciales o totales, y se actualizada diariamente en con datos publicados y disponibles en otras bases de datos como la del EMBL y la DDBJ que son las bases de datos más importantes en Europa y Japón respectivamente (BENSON et al.,2005). Es importante mencionar que la base de datos del EMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>) presta especial interés en los genomas de vertebrados, por lo cual la forma que organiza los datos y las herramientas que ofrece, hace que esta sea más amigable para el acceso y manipulación de datos genéticos de animales de corral. Asimismo, existen bases de datos *on line* más específicos, es decir, bases de datos genéticos para cada especie (*Bos taurus*, *Gallus gallus*, etc) o para un tipo de dato (secuencias de ADN, ETS, genomas, mapas de ligamiento, etc.). Además, existen bases de datos

más simples y específicas pero con mucha información útil de genomas y mapas genéticos de distintos tipos (QTLs, SSR, SNPs, entre otros), como la base de datos genéticos de animales del National Animal Genome Research Program (NAGRP) que en su *site* <http://www.animalgenome.org/>, presenta datos y herramientas muy útiles en el área de genética de animales domésticos.

Las bases de datos específicas dependen principalmente de los proyectos genoma de mapeo genético. Las universidades, institutos, laboratorios o consorcios que desarrolla dichos genomas crean estas bases de datos de dominio público y disponibiliza protocolos y herramientas informáticas para manipular esa información e incluir nuevos datos de anotación; por lo tanto puede existir más de una base de datos para la misma especie. En el caso de especies de interés pecuario existen bases de datos genéticos de las especies más importantes como vaca, cerdo, oveja, cabra, caballo, búfalo, gallina, pavo, codorniz, trucha, salmón, varias especies de tilapia y abeja.

Una de las especies que ha sido más estudiada es *B. tauros*; y sobresalen los trabajos realizados por ZIMIN e colaboradores (2009) que publica el primer genoma ensamblado de la vaca, y dos consorcios formados investigadores de todo el mundo que publicaron una anotación del genoma y el primer mapa de variaciones de SNP entre el genoma de diferentes razas (BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM, 2009; BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, 2009). Trabajos como este han generado numerosos datos genómicos, disponibles en diversas bases de datos *on line* como: The Bovine Genome Database www.bovinegenome.org, administrado por el Instituto Nacional y Alimentación y Agricultura (USDA) de los Estados Unidos y la Universidad de Missouri; y www.hgsc.bcm.edu/other-mammals/bovine-genome-project, del Centro de Secuenciación del Genoma Humano del Baylor College of Medicine en Houston.

En especies como el cerdo y el pollo están muy bien estudiadas, igualmente existen varios grupos que conformaron consorcios, que desde hace varios años trabajan en la secuenciación y anotación de genoma, como el International Swine Genome Sequencing Consortium (SCHOOL et al. 2005), el International Chicken Genome Sequencing Consortium (HILLIER et al. 2004). Por lo tanto existen varias bases de datos con bastante completas y fácil de usar para cerdo y pollo como el Pig Genomic Informatics System de la Academia China de Ciencias (PigGIS, <http://pig.genomics.org.cn/>) y el Chicken Genome Database del National Human Genome Research Institute (<http://www.genome.gov/11008054>).

Igualmente existen muchos esfuerzos internacionales para determinar, analizar y publicar datos genéticos en otras especies como: en oveja el International Sheep Genomics Consortium, en cabras el International Goat Genome Consortium, en caballos The Equine Genetics Diversity Consortium, en pavo el Turkey Genome

Sequencing Consortium, para la trucha y el salmón The Consortium for Genomics Research, en tilapia el Tilapia Genome Project del Broad Institute y el en abejas Honeybee Genome Sequencing Consortium. Y todos estos grupos poseen *sites* públicos con los genomas, mapas QTL, SNPs, librerías BAC, ESTs, mapas de microsatelites y otros marcadores moleculares, y primer cebadores caracterizados. En definitiva ya existe mucha información genética y bases de datos sobre animales domésticos, y herramientas bioinformáticas accesibles y fácil de manejar por personas que no trabajan directamente en el área de genómica, pero que emplean estas herramientas.

Conclusiones

Los numerosos avances en genética y biología molecular, han permitido desarrollar técnicas y aplicaciones importantes en las ciencias pecuarias. Durante los últimos años, estas técnicas moleculares se han incluido como práctica de rutina en muchos programas de mejoramiento animal de referencia, ofreciendo la posibilidad de aumentar su eficiencia, precisión y productividad. Sin embargo, estas herramientas aun no se han puesto en práctica en la mayoría de los sistemas de producción y mejoramiento animal, debido al desconocimiento y aceptación por parte de los profesionales de las ciencias pecuarias, a la falta de estructura tecnológica para desarrollar las técnicas y a la ausencia de planes de apoyo técnico y económico a nivel gubernamental.

La implementación de estas técnicas cada vez es más necesaria, debido a las crecientes exigencias de producción y calidad, a las problemáticas sanitarias y a los largos períodos requeridos en el mejoramiento y selección. Esto dependerá de cambios técnicos y de planificación, para aplicar correcta y eficientemente estas herramientas en el manejo y mejoramiento animal, con el objeto de obtener mayores ganancias genéticas y económicas en la producción de las principales especies animales.

Los numerosos avances en genética y biología molecular, han permitido en los últimos años desarrollar nuevas y ambiciosas técnicas, importantes en las ciencias pecuarias, siendo incluidas lentamente como prácticas de rutina en muchos programas de mejoramiento animal de referencia, ofreciendo la posibilidad de aumentar su eficiencia, precisión y productividad. Sin embargo, estas herramientas aun no se han puesto en práctica en la mayoría de los sistemas de producción y mejoramiento, debido al desconocimiento y aceptación por parte de los profesionales de las ciencias pecuarias, a la falta de estructura tecnológica para desarrollar las técnicas y a la ausencia de planes de apoyo técnico y económico a nivel gubernamental.

La implementación de estas técnicas cada vez es más necesaria, debido a las crecientes exigencias de producción y calidad, a las problemáticas sanitarias y a

los largos períodos requeridos en el mejoramiento y selección. Esto dependerá de cambios técnicos y de planificación en el manejo y mejoramiento animal, con el objeto de obtener mayores ganancias genéticas y económicas en la producción de las principales especies animales.

Referencias

ANTONANGELO, A.; COLOMBI, D.; CURI, R.; BRAZ, A.; OLIVEIRA, T. y MOTAL, M. 2012. Detection and quantification of Duffy antigen on bovine red blood cell membranes using a polyclonal antibody. *Pesq. Vet. Bras.* 32(9): 936–940.

APARICIO, S.; CHAPMAN, J.; STUPKA, E.; PUTNAM, N.; CHIA, J.; DEHAL, P.; CHRISTOFFELS, A. et al . Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297(5585): 1301–1310.

AZOFEIFA, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17: 221-242.

BAUER, O. 1976. *Fitogenética aplicada*. Editorial Limusa. México D.F.

BENSON, D.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.; OSTELL, J. y WHEELER, D. 2005. GenBank. *Nucleic acids research* 33: D34–D38.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M. y DAVIS, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.

BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324(5926):522-528.

BOVINE HAPMAP CONSORTIUM. 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* 324(5926):528-532.

BREYNE, P.; DREESEN, R.; CANNOOT, B.; ROMBAUT, D.; VANDEPOELE, K.; ROMBAUTS, S.; VANDERHAEGHEN, R.; INZÉ, D. y ZABEAU, M. 2003. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular genetics and genomics* 269: 173-179.

CARLEER, J.; PASTORET, P. y ANSAY, M. 1978. Isozyme characterization of cattle (*Bos taurus*) and American buffalo (*Bison bison*) cell cultures. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics* 9(3):175-179.

DA SILVA, J.; ANDRÉ, M.; DA FONSECA, A.; LOPES, C.; DA SILVA, D.; DE ANDRADE, S.; OLIVEIRA, C. y BARBOSA, J. 2013. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the north region of Brazil. *Veterinary parasitology* 197(3-4): 678-681.

DEKKERS, J.C.M. 2004. Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *Journal of Animal Science*, v.82, p.313-328

DALE, J. y VON SCHANTZ, M. 2002. *From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*. Editorial John Wiley y Sons, Ltd. Londres.

DJARI, A.; ESQUERRÉ, D., WEISS, B., MARTINS, F., MEERSSEMAN, C., BOUSSAHA, M., KLOPP, C. y ROCHA D. 2013. Gene-based single nucleotide polymorphism discovery in bovine muscle using next-generation transcriptomic sequencing. *BMC Genomics* 14:307.

DI BELLA, J.; BAO, Y.; GLOOR, G.; BURTON, J. y REID, G. 2013. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of microbiological methods* 5(3): 401-414.

DUAN, Z.; GUO, Y. y LIU, J. 2006. Application of modern molecular biology techniques to study micro-ecosystem in the rumen. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 46: 166-169.

FERREIRA, E.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.; PAES, D.; DA SILVA, E.; SCHALLIG, H. y GONTIJO, C. 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary parasitology* 146(3-4): 235-241.

FRANK, D. y PACE, N. 2008. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current opinion in gastroenterology* 24(1): 4-10.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. y BRISCOE, D. 2004. *Introduction to conservation genetics*. Editorial Cambridge University Press, Cambridge.

GEORGES, M. 2012. Impact of high-throughput genotyping and sequencing on the identification of genes and variants underlying phenotypic variation in domestic cattle. En: Womack, J. (eds). *Bovine Genomic*. Editorial John Wiley y Sons, Ltd, Oxford.

HEBERT, P.; CYWINSKA, A.; BALL, S. y DE WAARD, J. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313-321.

HILLIER, W.; MILLER, W.; BIRNEY, E.; WARREN, W.; HARDISON, R.; PONTING C.; et al . 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432(7018): 695-716.

HOBSON, P. y STEWART, C. (eds). 1997. *The Rumen Microbial Ecosystem* (2da edicion). Editorial Springer Netherlands, Dordrecht, Holanda.

HUNGATE, R. 1966. The rumen and its microbes. Editorial Academic Press, New York.

HYTEN, D.; SONG, Q.; FICKUS, E.; QUIGLEY, C.; LIM, J.; CHOI, I.; HWANG, E.; PASTOR-CORRALES, M. y CREGAN, P. 2010. High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC genomics* 11: 475-483.

INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432: 695-716.

KIM, M.; MORRISON, M. y YU, Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS microbiology ecology* 76(1): 49-63.

LIPMAN, D. National Center for Biotechnology information. [serial online] 2013 [Citado 30 Dic 2013]. Disponible en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=Bos taurus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=Bos+taurus).

LITT, M. y LUTY, J. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics* 44:397-401.

LUQUE, J. y HERRÁEZ, A. 2001. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Editorial Elsevier. Madrid.

MASKOS, U. y SOUTHERN, E. 1992. Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Research* 20(7): 1679-1684.

MATSUZAKI, H.; LOI, H.; DONG, S.; TSAI, Y.; FANG, J.; LAW, J.; DI, X.; et al., 2004. Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. *Genome research* 14(3): 414-25.

MATUKUMALLI, L.; LAWLEY, C.; SCHNABEL, R.; TAYLOR, J.; ALLAN, M.; HEATON, M.; O'CONNELL, J.; MOORE, S.; SMITH, T.; SONSTEGARD, T. y VAN TASSELL, C. 2009. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PloS one* 4(4): e5350

Mac SWEENEY, C. y MACKIE, R. 2012. Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. Commission On Genetic Resources for Food and Agriculture (Editores), Roma: disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/ap099e/ap099e.pdf>.

METZKER, M. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics* 11(1): 31-46.

MONIS, P.; GIGLIO, S.; KEEGAN, A. y THOMPSON, R. 2005. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 21:340-346.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G. y ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Old Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51(1):263-73.

NELSON, M.; MARNELLOS, G.; KAMMERER, S.; HOYAL, C.; SHI, M.; CANTOR, C. y BRAUN, A. 2004. Large-Scale Validation of Single Nucleotide Polymorphisms in Gene Regions. *Genome Research* 14(8): 1664-1668.

OSOEGAWA, K.; WOON, P.; ZHAO, B.; FRENGEN, E.; TATENO, M.; CATANESE, J. y DE JONG, P. 1998. An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics* 52(1): 1-8.

PAREEK, C.; SMOZYNSKI, R. y TRETYN, A. 2011. Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of applied genetics* 52(4): 413-435.

POLIDO, P.; FERREIRA, F.; ALBERTON, O. y HÜLSE, S. 2012. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* 15(2): 161-169.

SAIKI, R.; GELFAND, D.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K. y ERLICH, H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3ra edición) Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

SANGER, F.; AIR, G.; BARRELL, B.; BROWN, N.; COULSON, A.; FIDDES, J.; HUTCHISON, C.; SLOCOMBE, P. y SMITH, M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265(5596): 687-695.

SCHOOK, L.; BEEVER, J.; ROGERS, J.; HUMPHRAY, S.; ARCHIBALD, A.; CHARDON, P.; MILAN, D.; ROHRER, G. y EVERSOLE, K. 2005. Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. *Comparative and Functional Genomics* (4): 251-255.

TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463-6471.

THORNTON, P. 2010. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions B* 365: 2853-2867.

VENTER, J.; ADAMS, D.; MYERS, E.; et al., 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507): 1304-1351.

WILLIAMS.; J.; KUBEILIK.; A.; LIVAK.; K.; RAFALSKI.; J. y TINGEY.; S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.

XIAO.; L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental parasitology* 124(1): 80-9.

YANG.; W.; KANG.; X. ; YANG.; Q.; LIN.; Y. y FANG.; M. 2013. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4: 2-8.

ZABEAU.; M. y VOS.; P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. EP Patent. publication. No. 0534858:B2.

ZIMIN.; A.; DELCHER.; A.; FLOREA.; L.; KELLEY.; D.; SCHATZ.; M.; PUIU.; D.; HANRAHAN.; F.; PERTEA.; G.; VAN TASSELL.; C.; SONSTEGARD.; T.; MARÇAIS.; G.; ROBERTS.; M.; SUBRAMANIAN.; P.; YORKE.; J. y SALZBERG.; S. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow.; *Bos taurus*. *Genome biology* 10(4): R42.