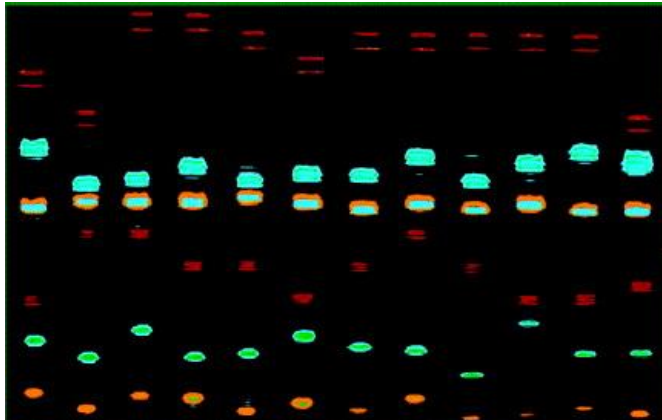


MARCADORES MOLECULARES: DO MELHORAMENTO A CONSERVAÇÃO

Aula 10

LGN232 – Genética Molecular



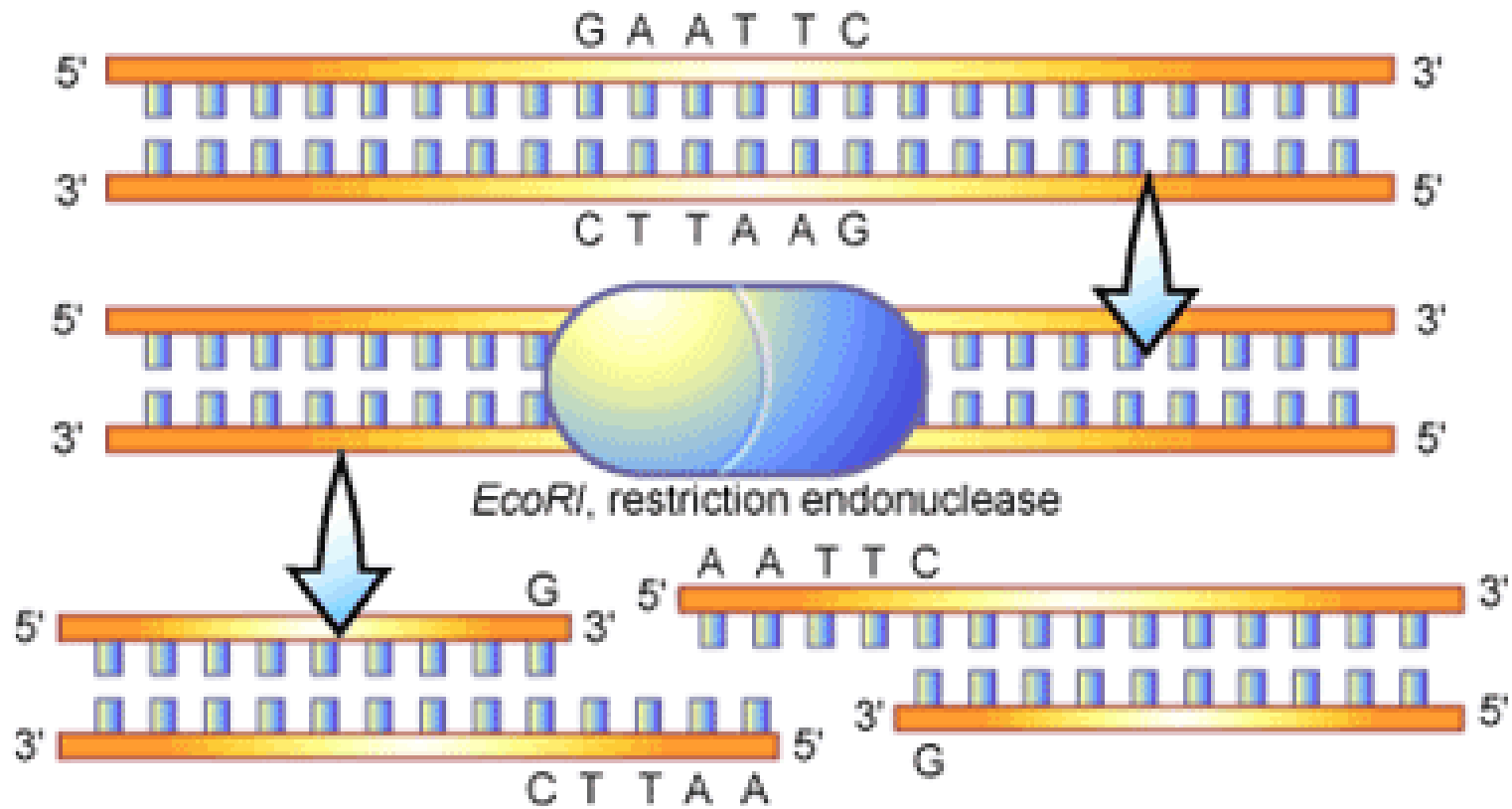
Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

RELEMBRANDO....

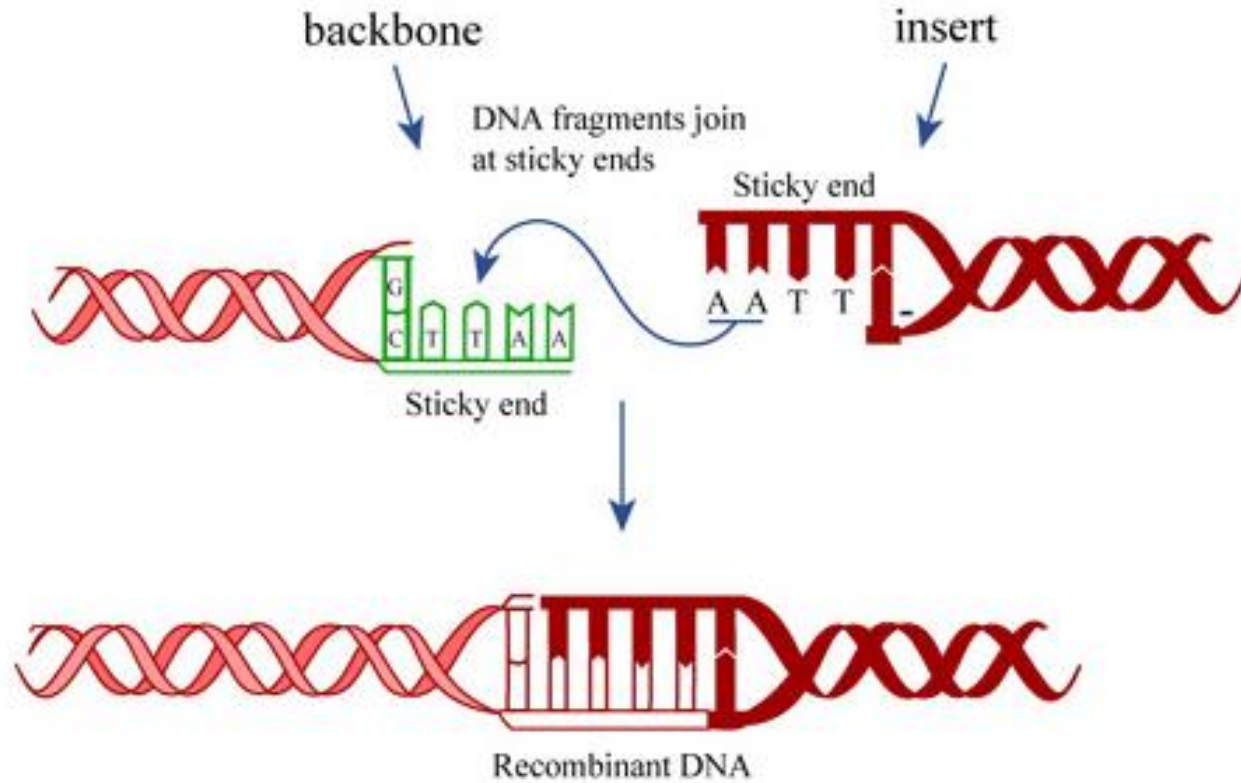


kit de genética molecular

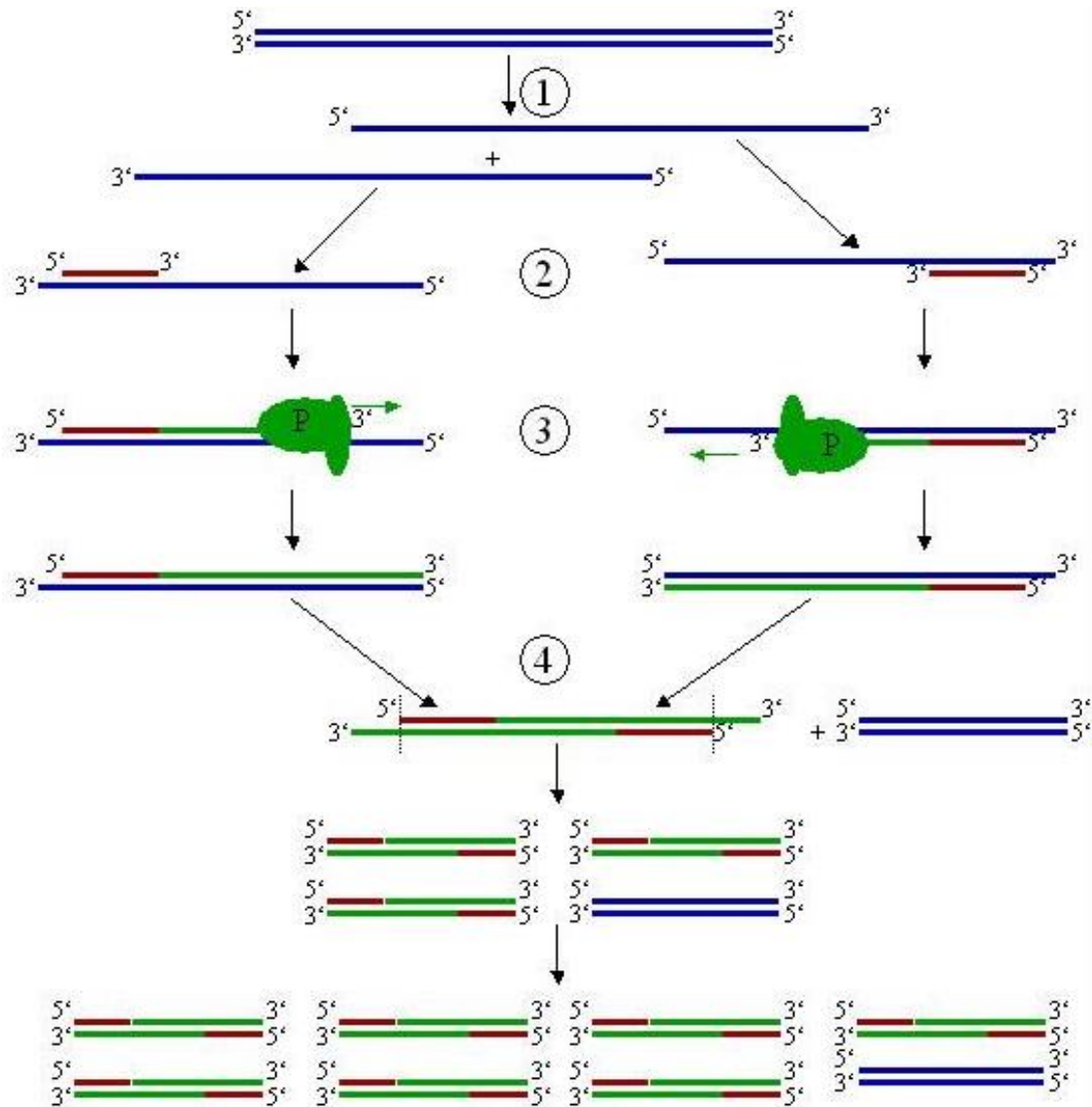
ENZIMAS DE RESTRIÇÃO



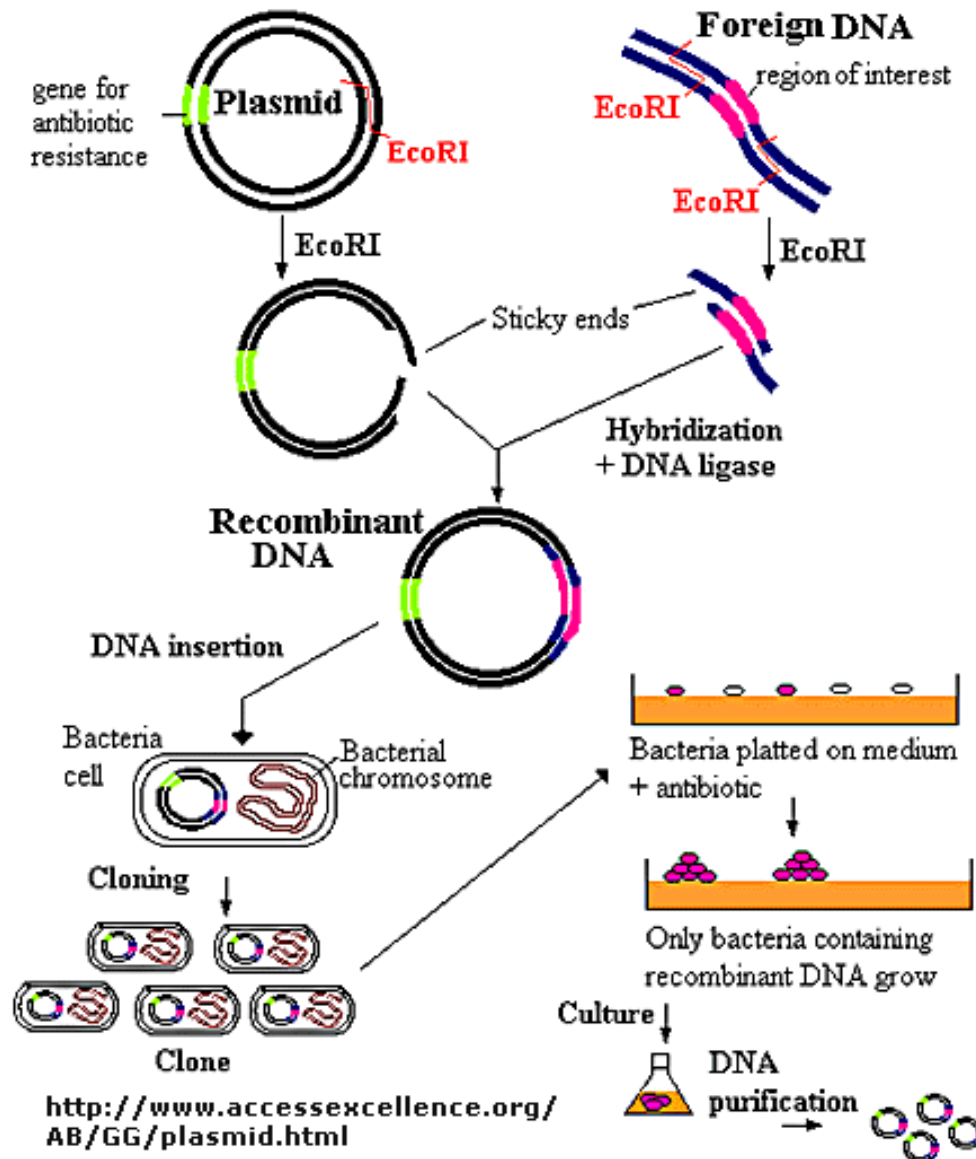
DNA LIGASES



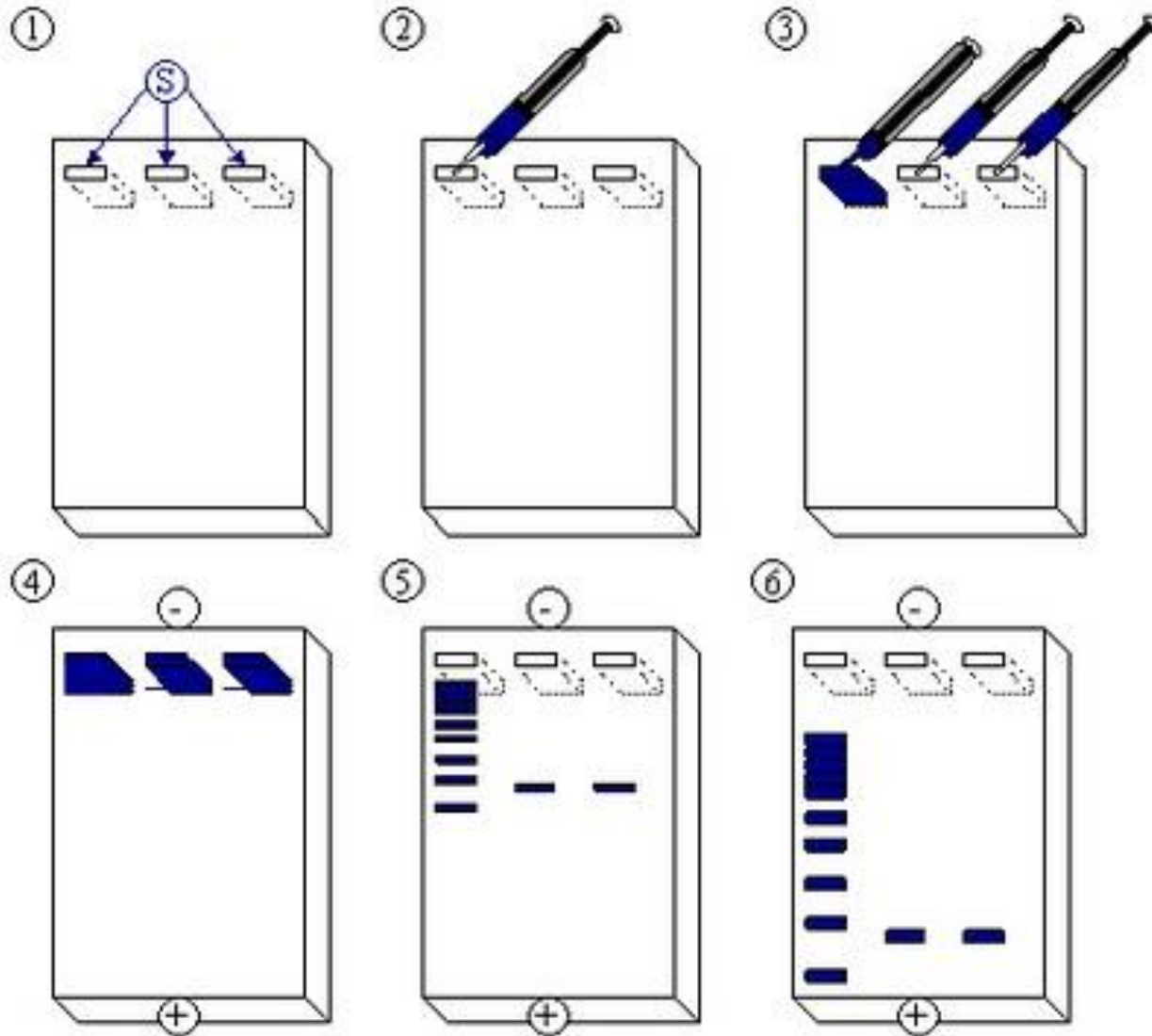
DNA POLIMERASES



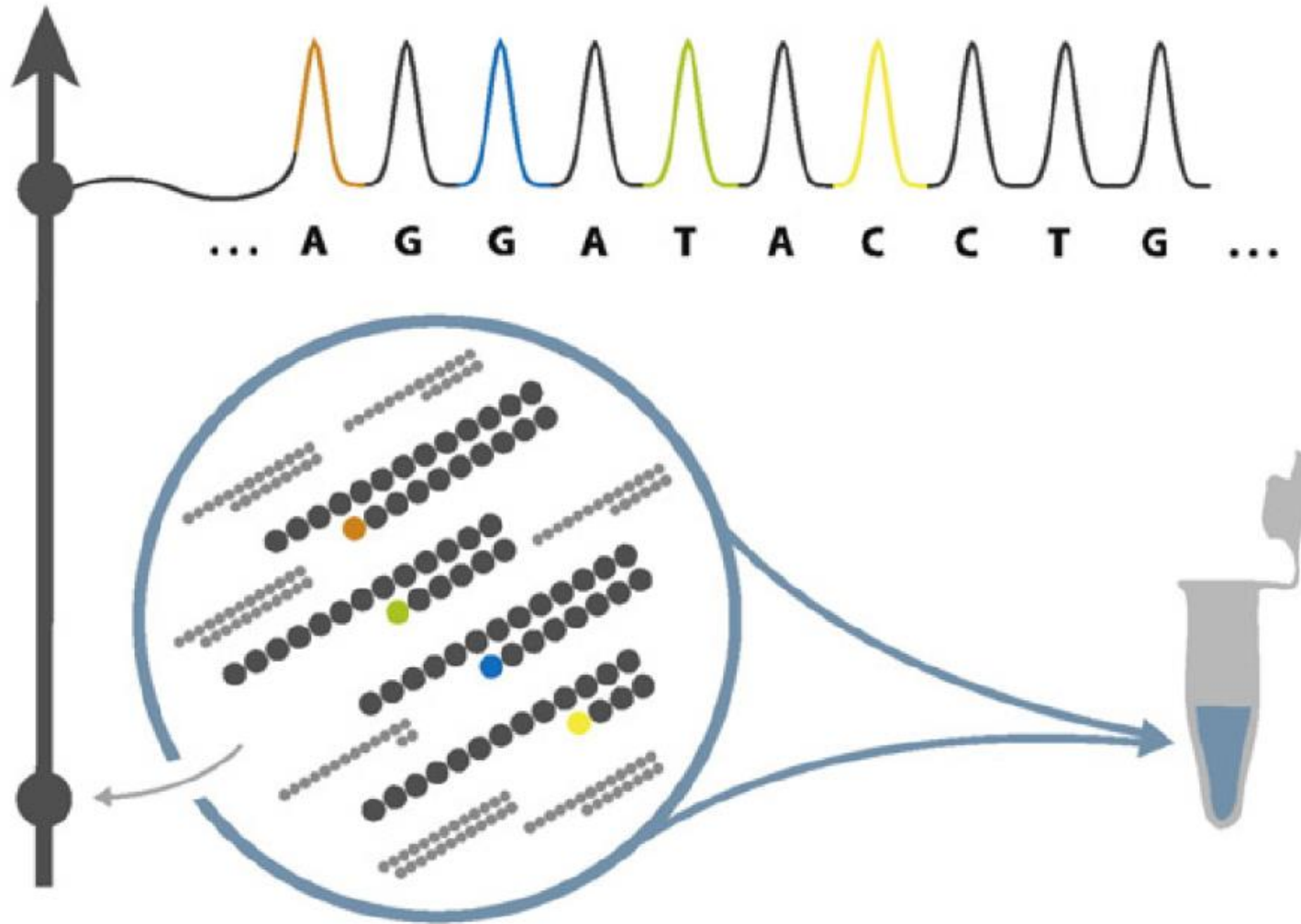
CLONAGEM MOLECULAR



ELETRÓFORESE EM GEL



SEQUENCIAMENTO DE DNA



Mas o que é um Marcador Genético

- Variação ou polimorfismo que, numa população segregante, se comportam de acordo com as leis mendelianas!
- Baseiam-se na existência de variabilidade e na possibilidade de sua detecção

Tipos:

- Morfológicos
- Bioquímicos (isoenzimas)
- Moleculares (AFLP, microssatélites, SNPs, etc.)

MARCADORES MORFOLÓGICOS

- Monomorfismo



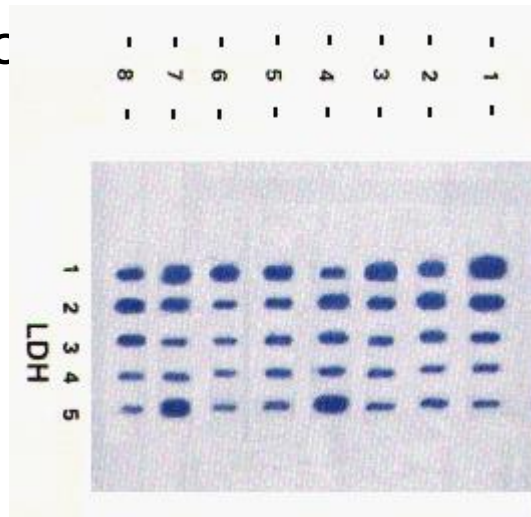
- Polimorfismo



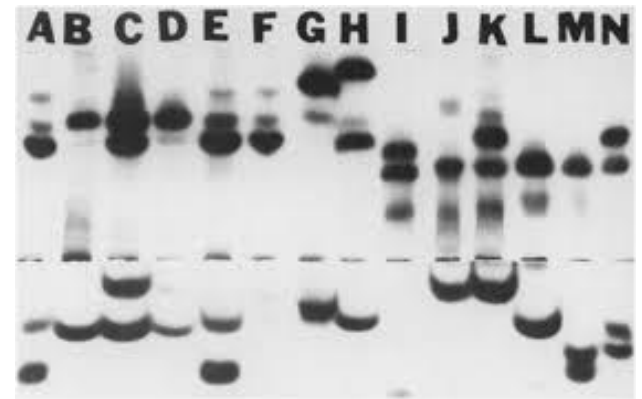
MARCADORES BIOQUÍMICOS

- Variabilidade observada como resultado da tradução de RNA em proteínas

- Monomorfismo

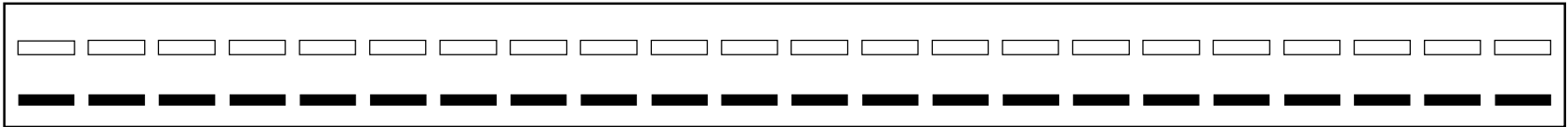


- Polimorfismo

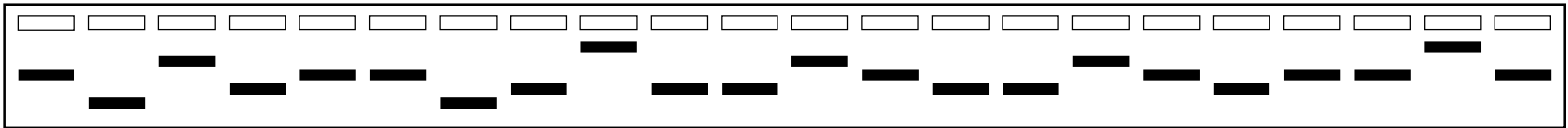


MARCADORES MOLECULARES

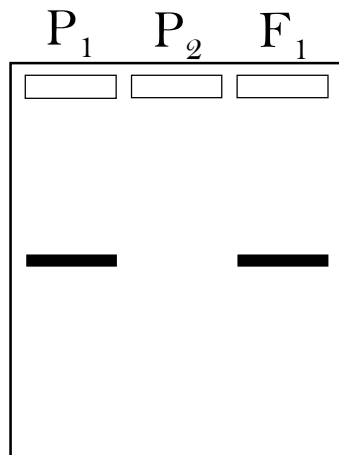
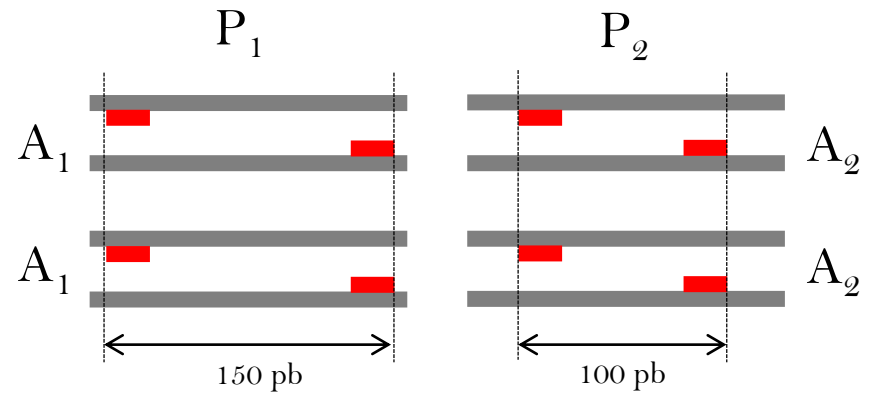
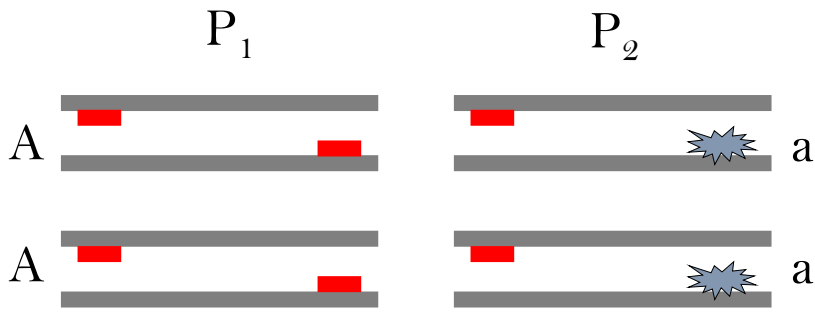
- Variabilidade surge por mutação, que é a base para identificação de marcadores
- Monomorfismo



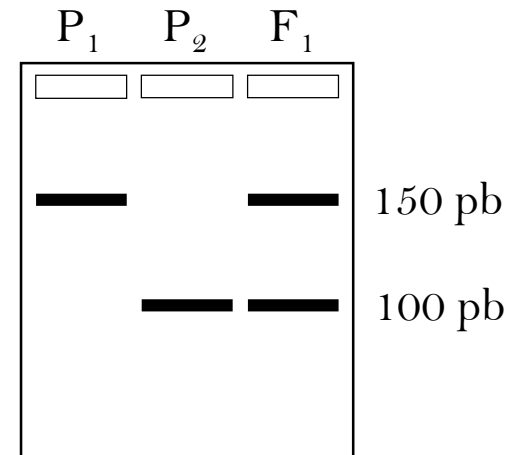
- Polimorfismo



MARCADORES DOMINANTES E CODOMINANTES?



Dominante



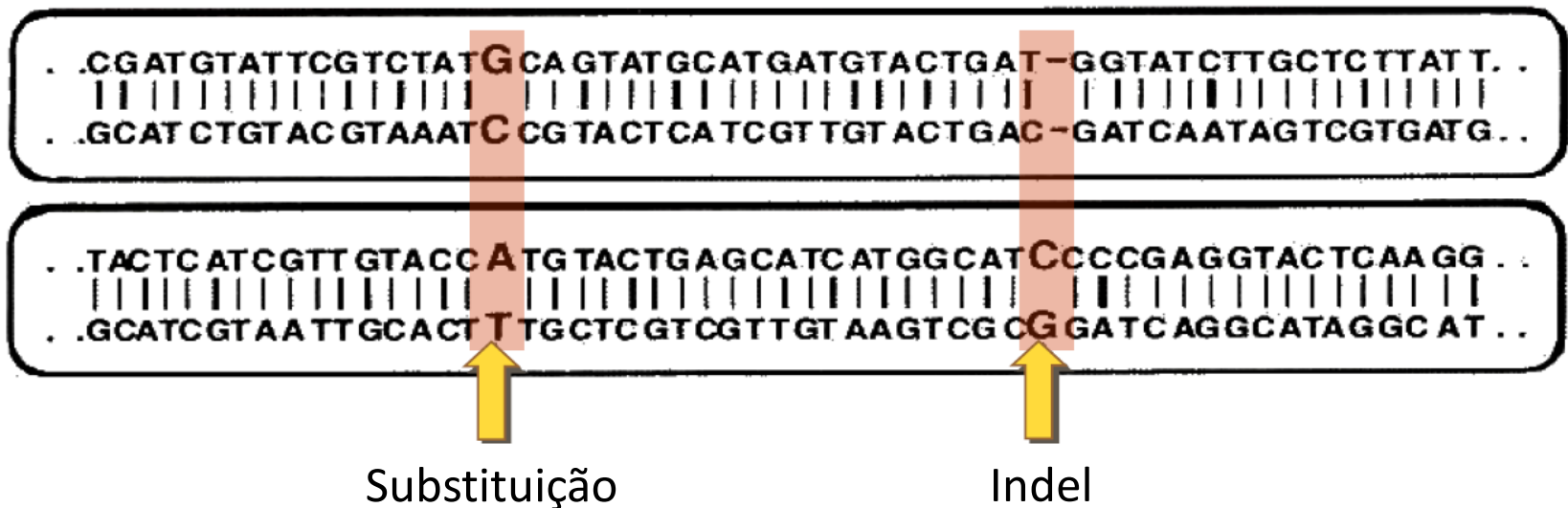
Codominante

MARCADORES MOLECULARES

Origem do polimorfismo

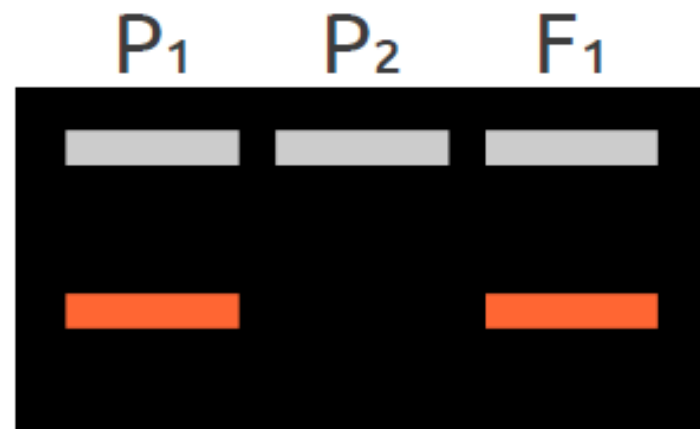
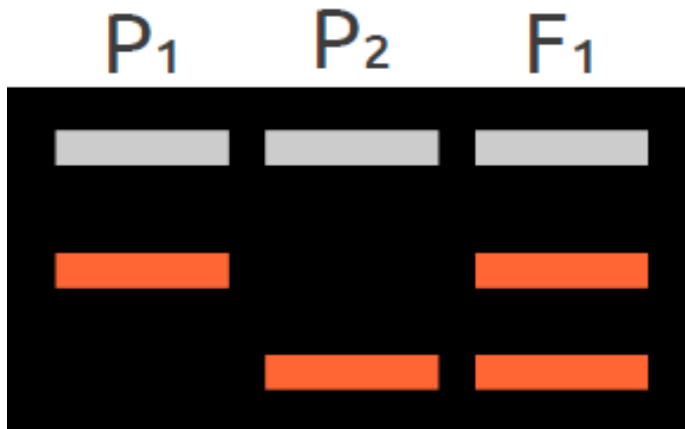
Polimorfismos de tamanho: originados por indels (inserções ou deleções)

Polimorfismos de base: causados por substituição de bases nitrogenadas



MARCADORES MOLECULARES

- Herança
 - Dominantes: não se identificam heterozigotos
 - Codominantes: identificam-se heterozigotos



ALGUNS EXEMPLOS DE MARCADORES MOLECULARES

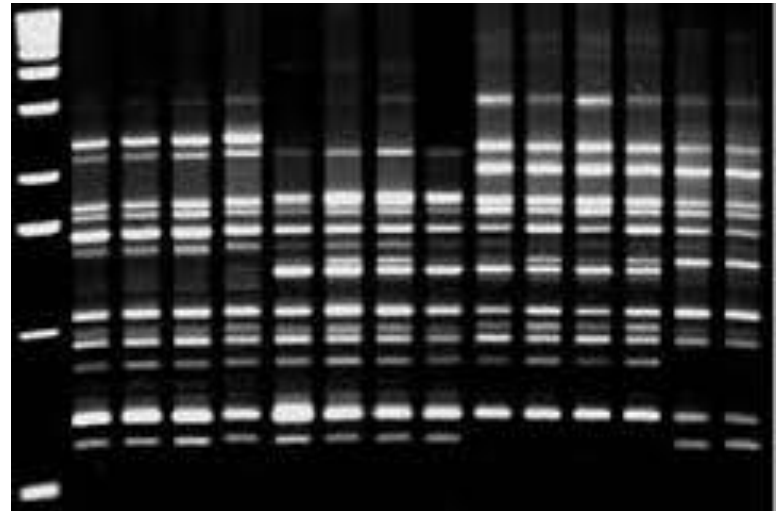
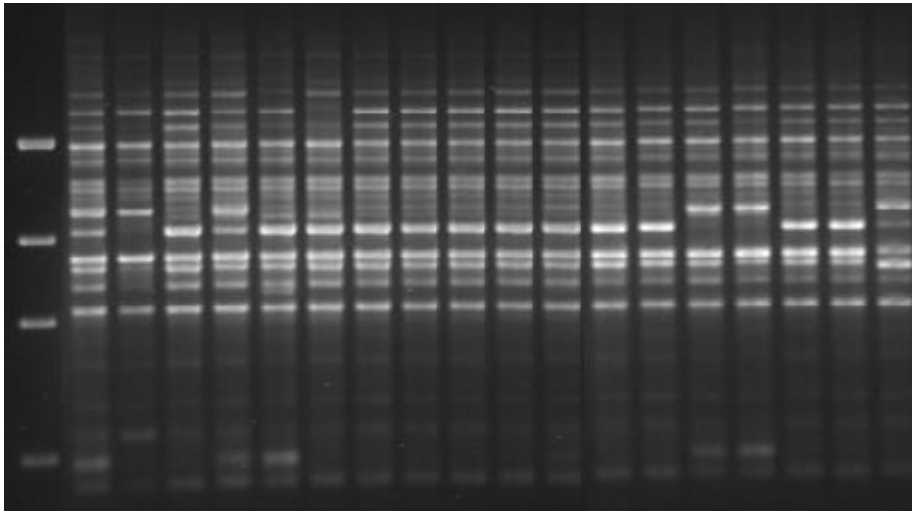
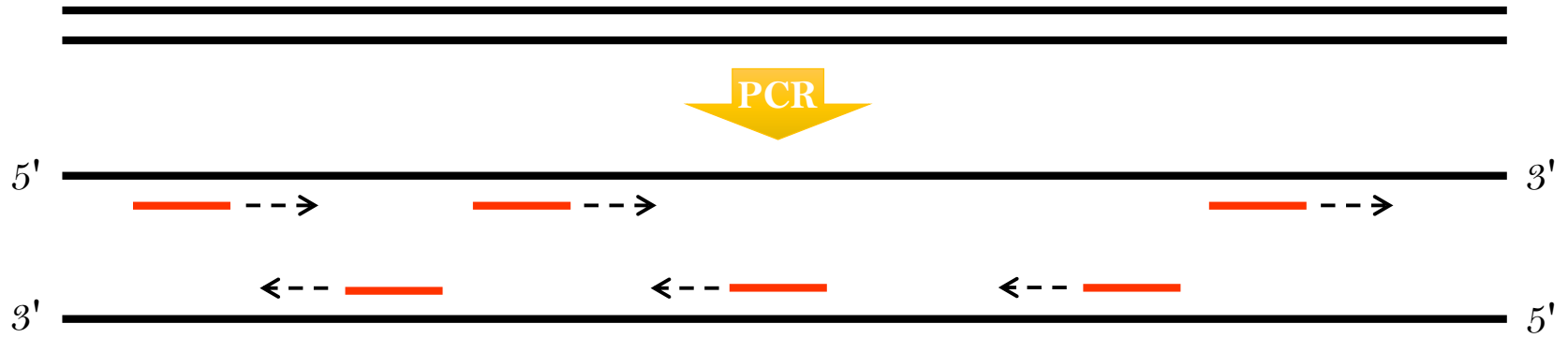
RAPD

Random Amplified Polymorphism DNA

Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

- Representa regiões codificadoras ou não do genoma; de distribuição aleatória
- Dominante:
 - Apenas presença ou ausência da banda (não identifica heterozigotos)
- Base genética:
 - Amplificação via PCR
 - Utiliza apenas um primer curto e aleatório
 - Primer se anela em diversas partes do genoma
 - Polimorfismo se origina da mutação no sítio de anelamento do primer

RAPD



RAPD

Vantagens:

- ❑ Prático e simples
- ❑ Barato, quando já se tem os primers
- ❑ Gera muita informação em pouco tempo

Desvantagens:

- ❑ Marcador dominante (informação limitada)
- ❑ Baixa reprodutibilidade
- ❑ Problemas na interpretação

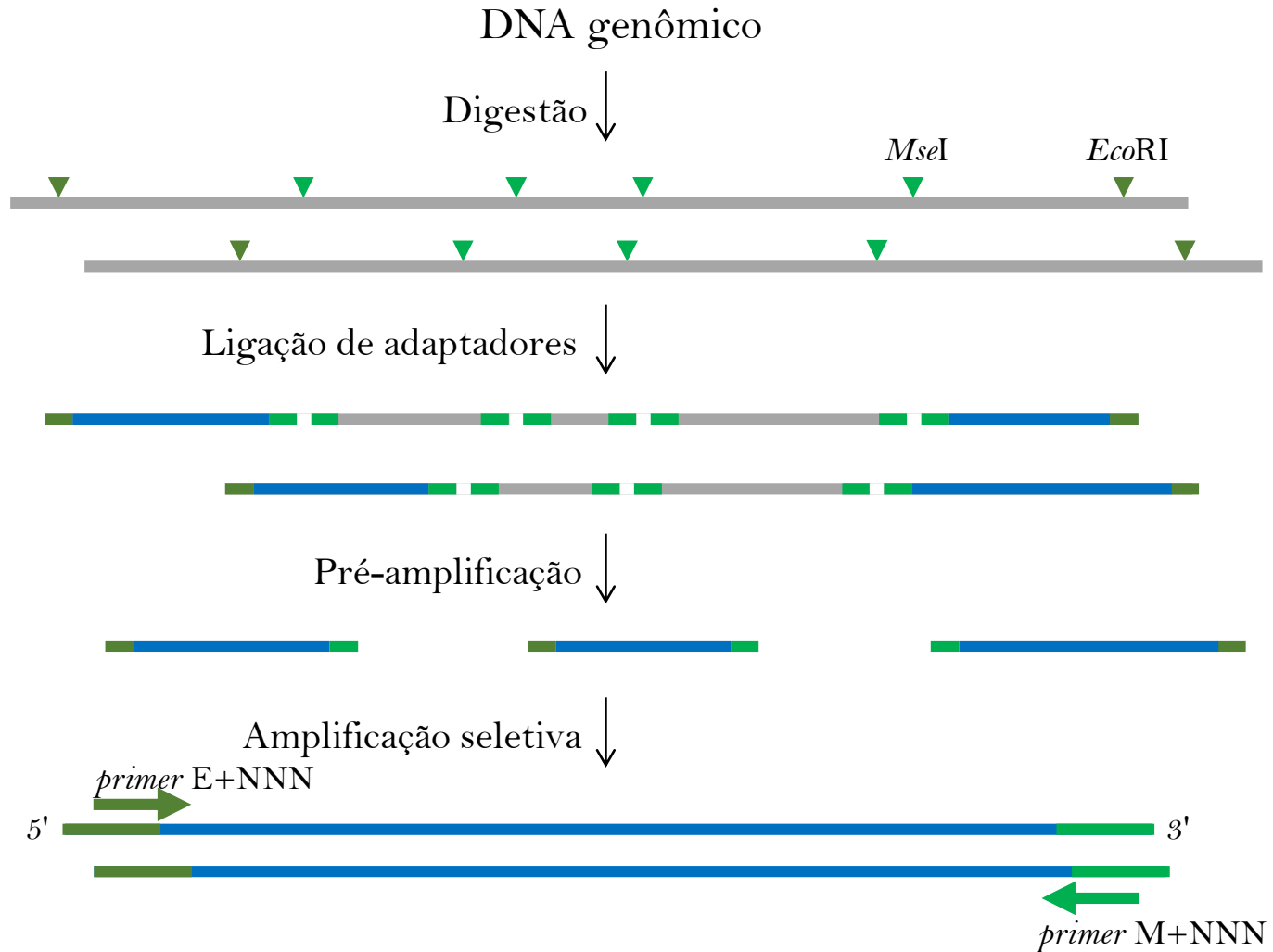
AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism

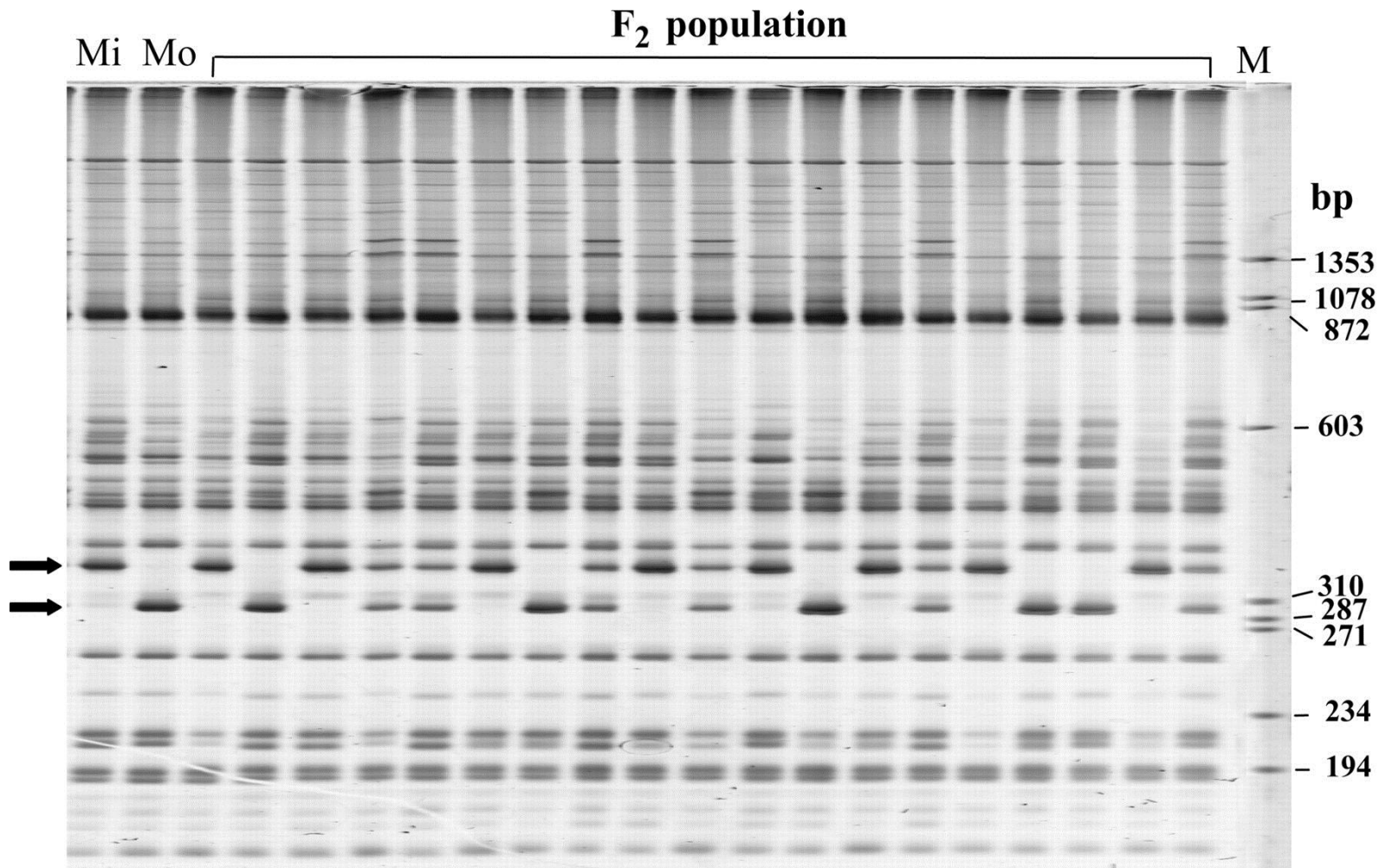
Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado

- Na maioria, representam regiões não expressas do genoma
- **Dominante:**
 - Apenas ausência e presença da banda (não identifica heterozigotos)
- **Base genética**
 - Clivagem do DNA por enzimas de restrição
 - Ligação de adaptadores
 - Amplificação seletiva dos fragmentos
 - Análise dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida

AFLP



AFLP



<http://dnaresearch.oxfordjournals.org/content/14/6/257.full.pdf>

AFLP

Vantagens

- ❑ Baseado em PCR
- ❑ Alta reprodutibilidade
- ❑ Altamente variável

Desvantagens

- ❑ Dominante
- ❑ Custo elevado
- ❑ Trabalhoso, por envolver muitas etapas

MICROSSATÉLITES ou SSR

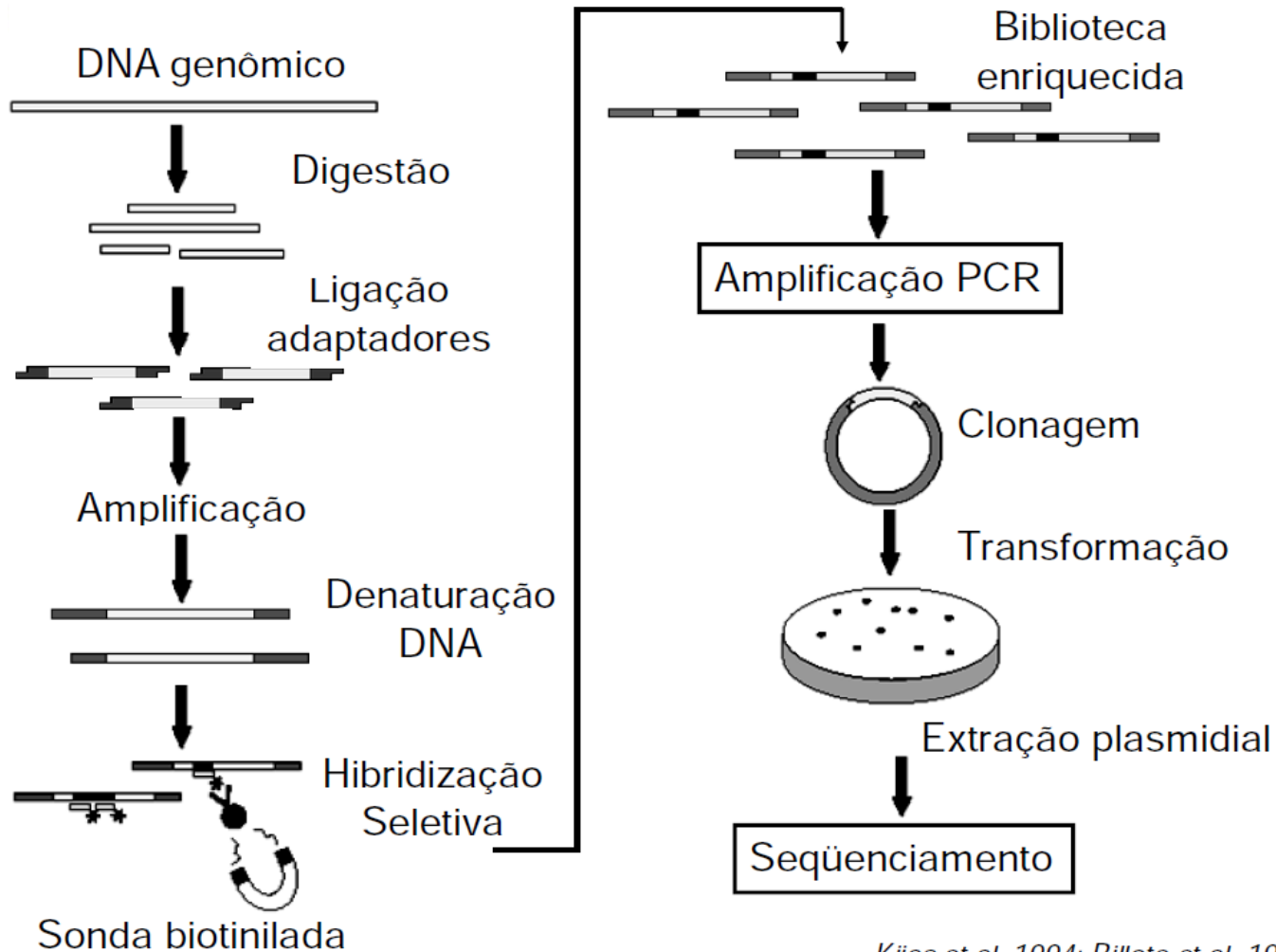
Simple Sequence Repeats

Sequências simples repetidas

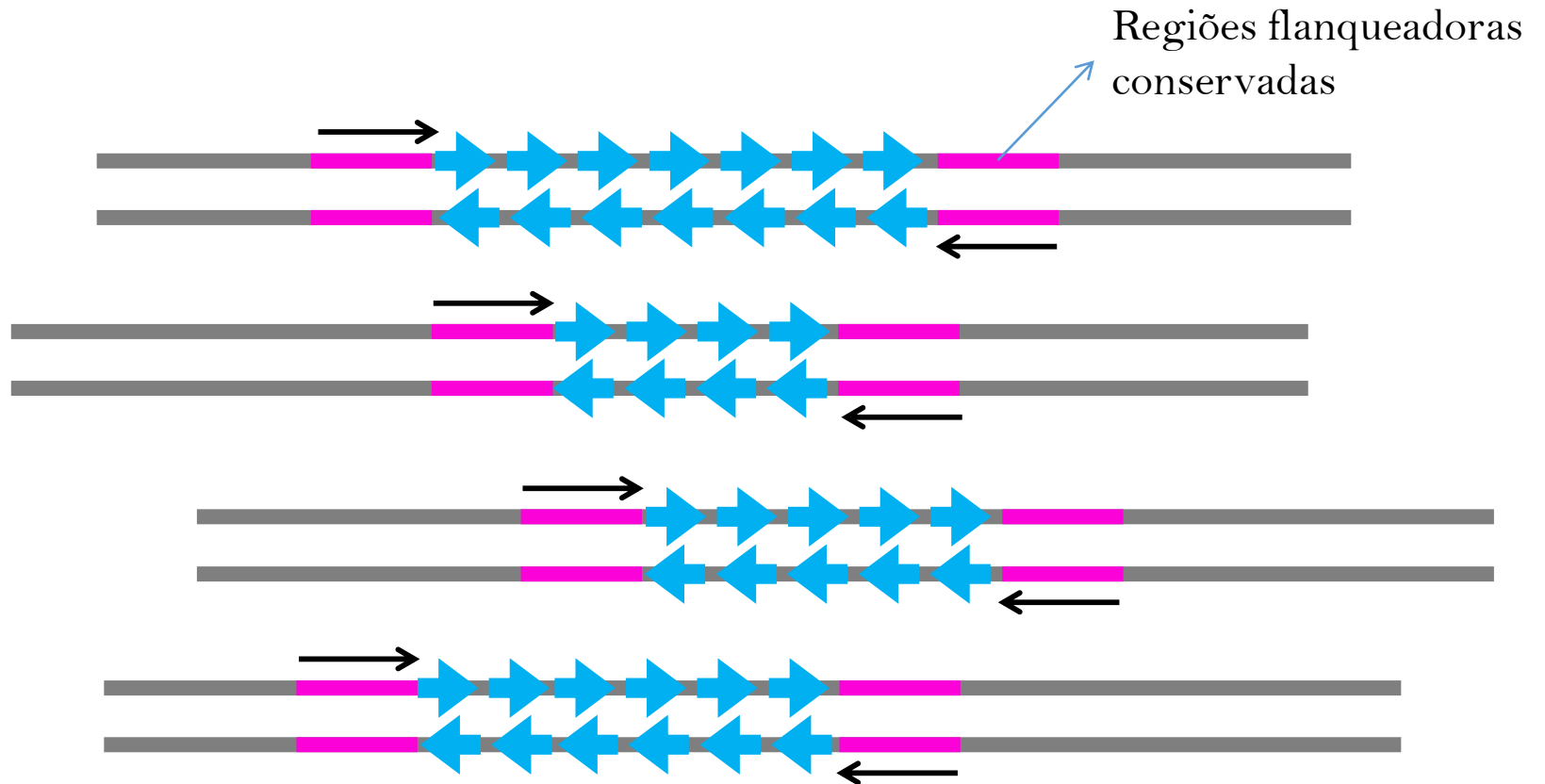
- Pequenas sequências de DNA (1 a 6 nucleotídeos) repetidos em tandem
- **Codominante**
 - Indivíduos heterozigotos são detectados
- Multialélicos e amplamente distribuído no genoma
- **Base genética:**
 - Amplificação de locos específicos de sequências repetitivas
 - Baseados em PCR com primers específicos

MICROSSATÉLITES

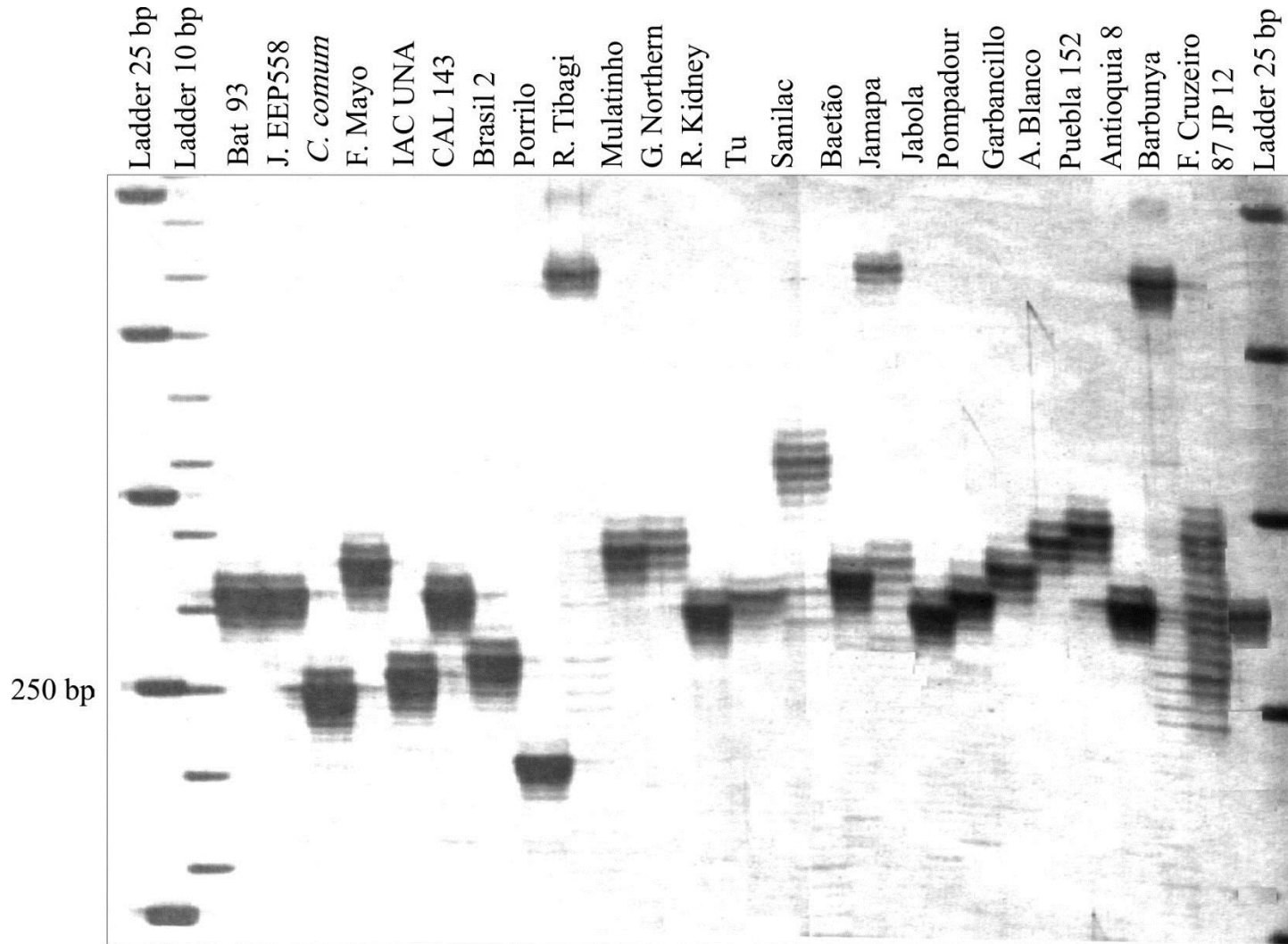
Biblioteca genômica enriquecida com microssatélites



MICROSSATÉLITES



MICROSSATÉLITES



http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g07-007#.UmRVy_msjZn

MICROSSATÉLITES

Vantagens

- ❑ Baseiam-se em PCR
- ❑ Altamente reprodutíveis
- ❑ Codominantes e multialélicos

Desvantagens

- ❑ Há necessidade de informações de sequências oriundas de bibliotecas genômicas ou de cDNA
- ❑ Elevado custo inicial

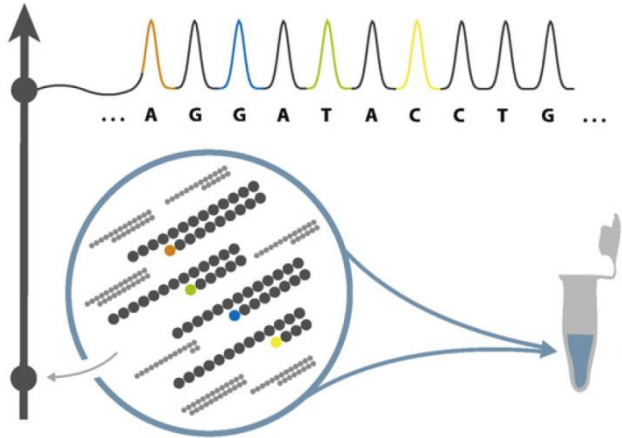
SNP

Single Nucleotide Polymorphism Polimorfismo de base única

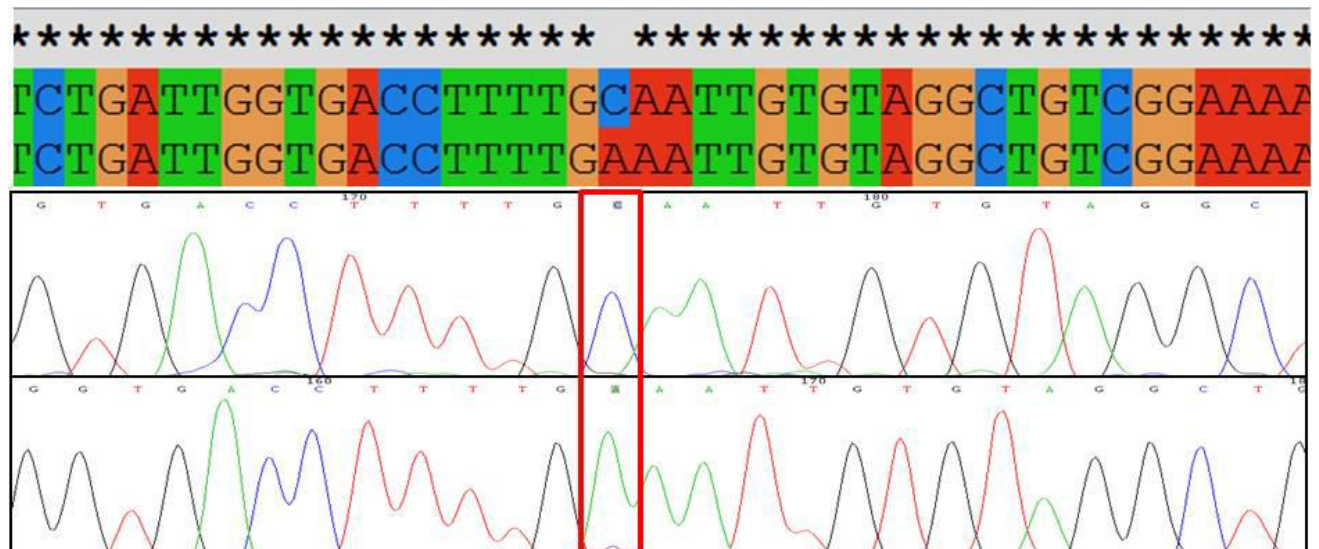
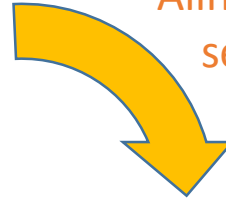
- Polimorfismo resultante da alteração de uma única base
- Abundantes no genoma
- **Codominante e bialélico**
- Há diversas maneiras de se avaliar a variação:
 - Alinhamento e comparação de sequências
 - Métodos baseados em géis
 - Métodos baseados em chips
 - Sequenciamento de 2ª geração, etc.

SNP

Sequenciamento



Alinhamento de
sequências



SNP

Vantagens:

- ❑ Abundante no genoma
- ❑ Cobertura em alta densidade do genoma
- ❑ Gera muita informação em pouco tempo
- ❑ Marcador codominante (bialélico)

Desvantagens:

- ❑ Elevado custo total (mas por dado, é barato)

COMPARAÇÃO DOS MARCADORES

	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Base genética	PCR com primers arbitrários	Digestão e PCR com primers seletivos	PCR com primers específicos	Sequenciamento
Tipo de herança	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
Número de locos	Vários	Vários	Único	Único
Número de alelos	Dois	Dois	Vários	Dois

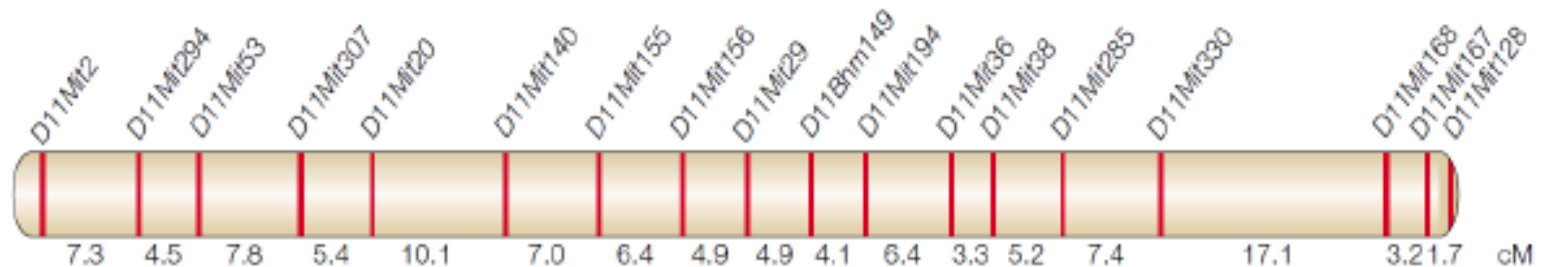
USO DOS MARCADORES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

Mapa genético: representação de ordem e distância entre marcadores genéticos

Ligação genética

- A herança conjunta de diferentes locos dá-se por conexão física

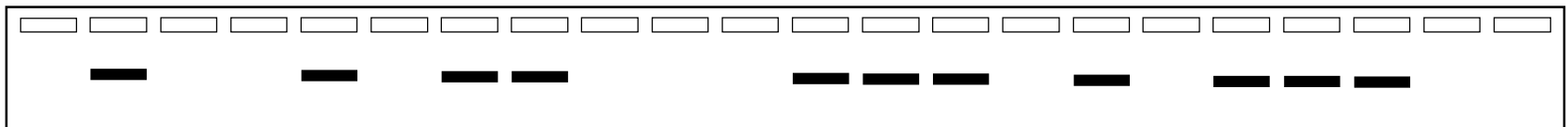
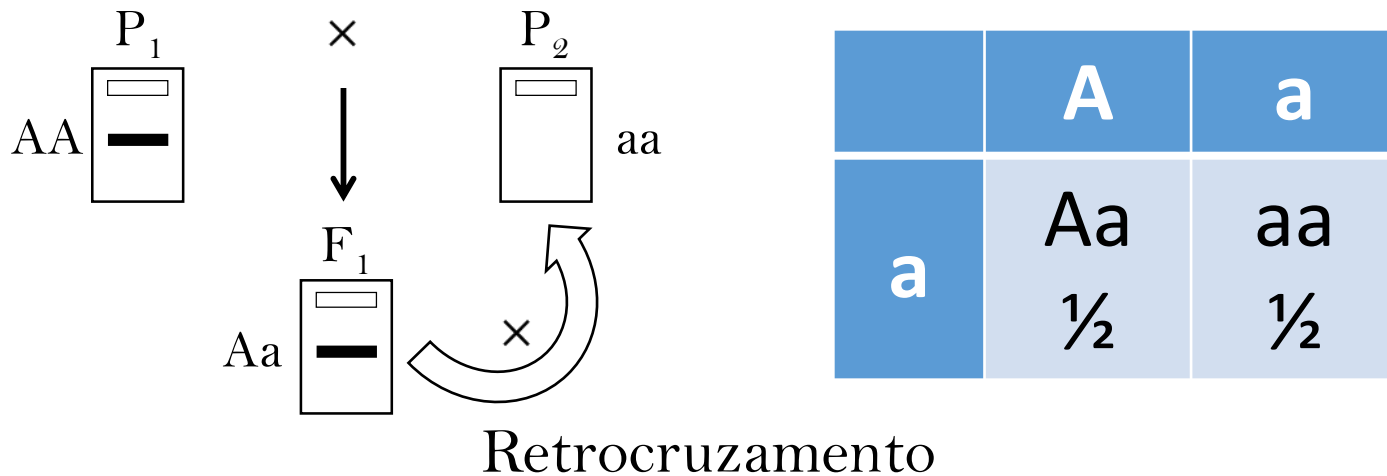


Mus musculus L.

Doerge (2002) *Nature Reviews* 3:43-52 adaptado de:
Butterfield et al. (1999) *The Journal of Immunology* 162:3096-3102

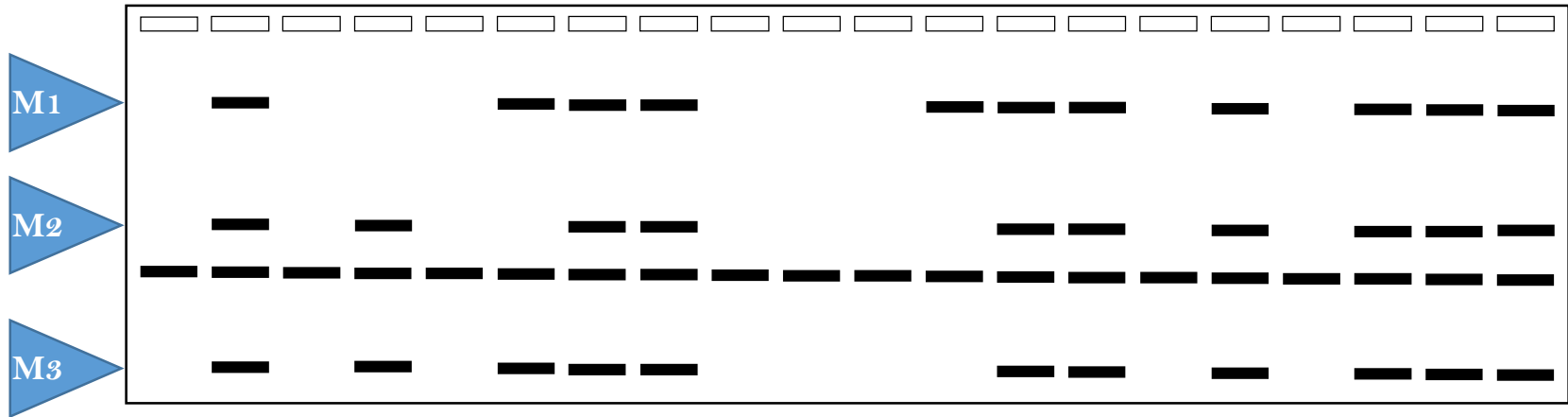
CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

Consiste na avaliação de uma população segregante (retrocruzamentos, F_2 , por exemplo) por meio de vários locos marcadores



CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

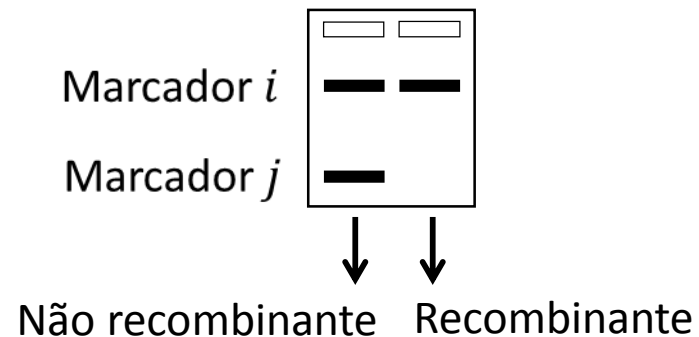
População de retrocruzamento genotipada com três locos AFLP



- Cálculo da fração de recombinação:

$$r_{ij} = \frac{n_{\text{recombinantes}}}{n}$$

Comparando dois locos polimórficos



CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

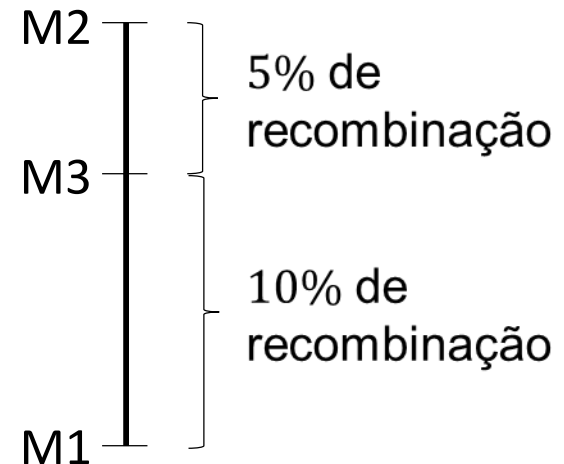
Leitura do gel

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
M2	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
M3	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1

$$r_{1,2} = \frac{3}{20} = 0,15$$

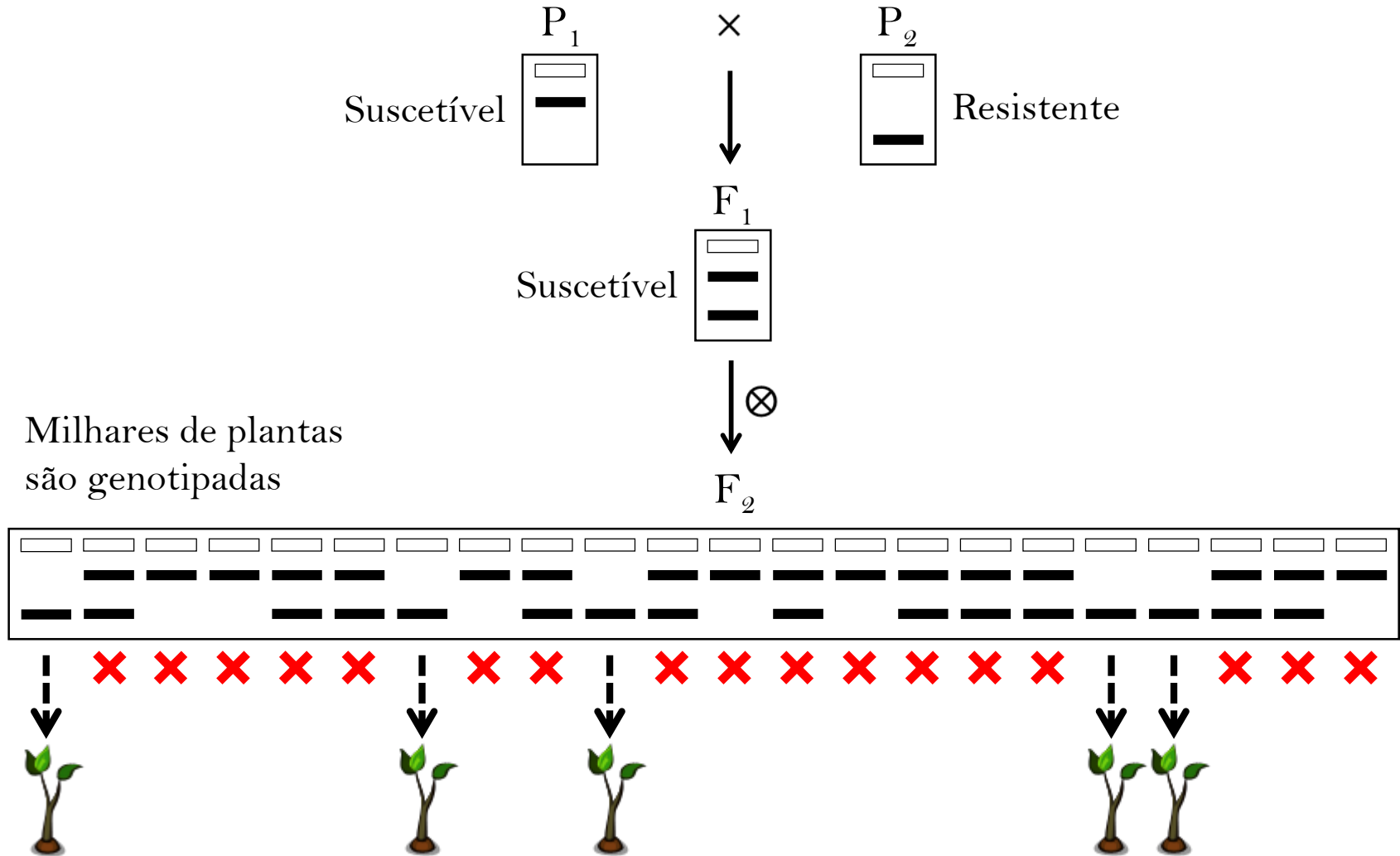
$$r_{1,3} = \frac{2}{20} = 0,10$$

$$r_{2,3} = \frac{1}{20} = 0,05$$



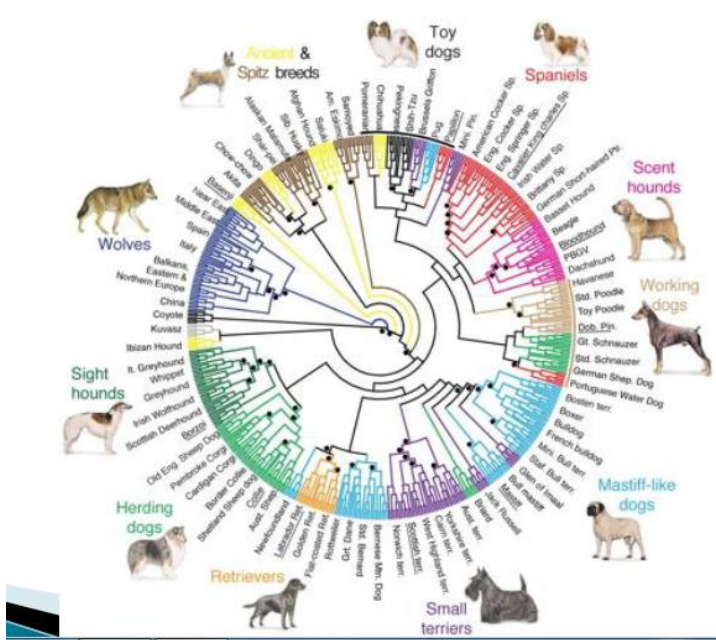
Mapa genético

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES

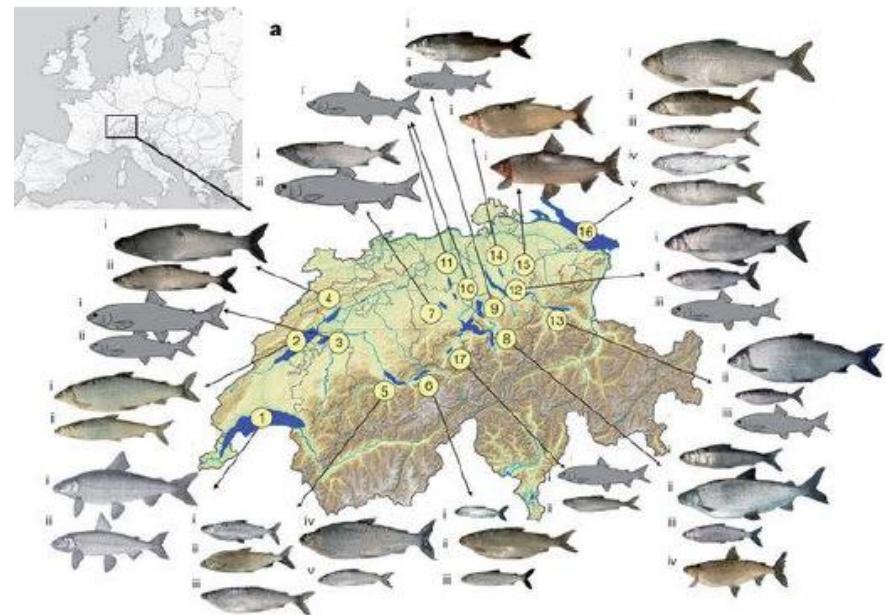


A seleção fenotípica é baseada em marcadores de DNA

USO DOS MARCADORES EM ESTUDOS DE DIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO



Filogênia



Distribuição geográfica

POR QUE USAR MARCADORES?

Fornece informações a respeito de:

- ❑ Diversidade genética
- ❑ Endogamia e sistemas de cruzamento
- ❑ Fluxo gênico
- ❑ Paternidade
- ❑ Sexagem

Auxilia na definição de estratégias de manejo e conservação

Ajuda a organizar coleções de germoplasma

POR QUE CONSERVAR?

A variabilidade é a base da evolução

Espécies com baixa variabilidade tem seu potencial evolutivo reduzido

- ❑ Ex: uma praga que mata um indivíduo, numa população com baixa variabilidade, mata todos!

Base para o desenvolvimento de novas cultivares

- ❑ Alimentos mais ricos em nutrientes
- ❑ Variedade mais produtivas

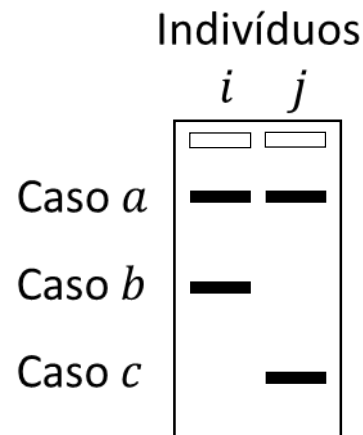
MARCADORES DOMINANTES

- Cálculo de similaridade genética: coeficiente de Jaccard

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

- $a = n^{\circ}$ de locos com alelos presentes nos indivíduos i e j
- $b = n^{\circ}$ de locos com alelos presentes em i e ausentes em j
- $c = n^{\circ}$ de locos com alelos ausentes em i e presentes em j



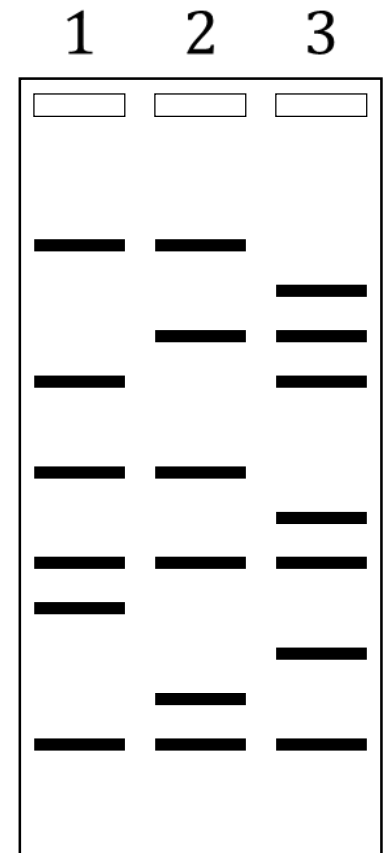
MARCADORES DOMINANTES

$$S_{12} = \frac{a}{a + b + c} \Rightarrow$$

$$S_{13} = \frac{a}{a + b + c} \Rightarrow$$

$$S_{23} = \frac{a}{a + b + c} \Rightarrow$$

- Conclusão: são mais similares os indivíduos e mais diferentes os indivíduos



ESTUDO DIRIGIDO

1. O que são marcadores moleculares?
2. Importância de enzimas (de restrição, ligases e polimerases), clonagem molecular e eletroforese na obtenção de marcadores.
3. Definir marcadores moleculares.
4. Que são marcadores dominantes e codominantes?
5. Quais os tipos de marcadores moleculares?
6. Qual a utilidade de marcadores moleculares no mapeamento genético?
7. Qual a utilidade de marcadores moleculares nos estudos de diversidade genética e conservação das espécies?

