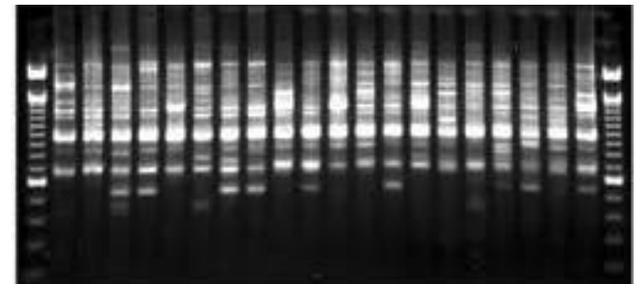
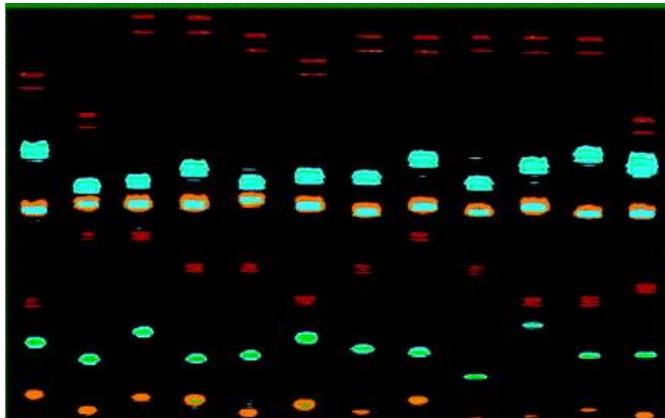

MARCADORES MOLECULARES

Base genética dos marcadores e usos no melhoramento de plantas e em estudos de diversidade genética e conservação



Departamento de Genética

ESALQ/USP

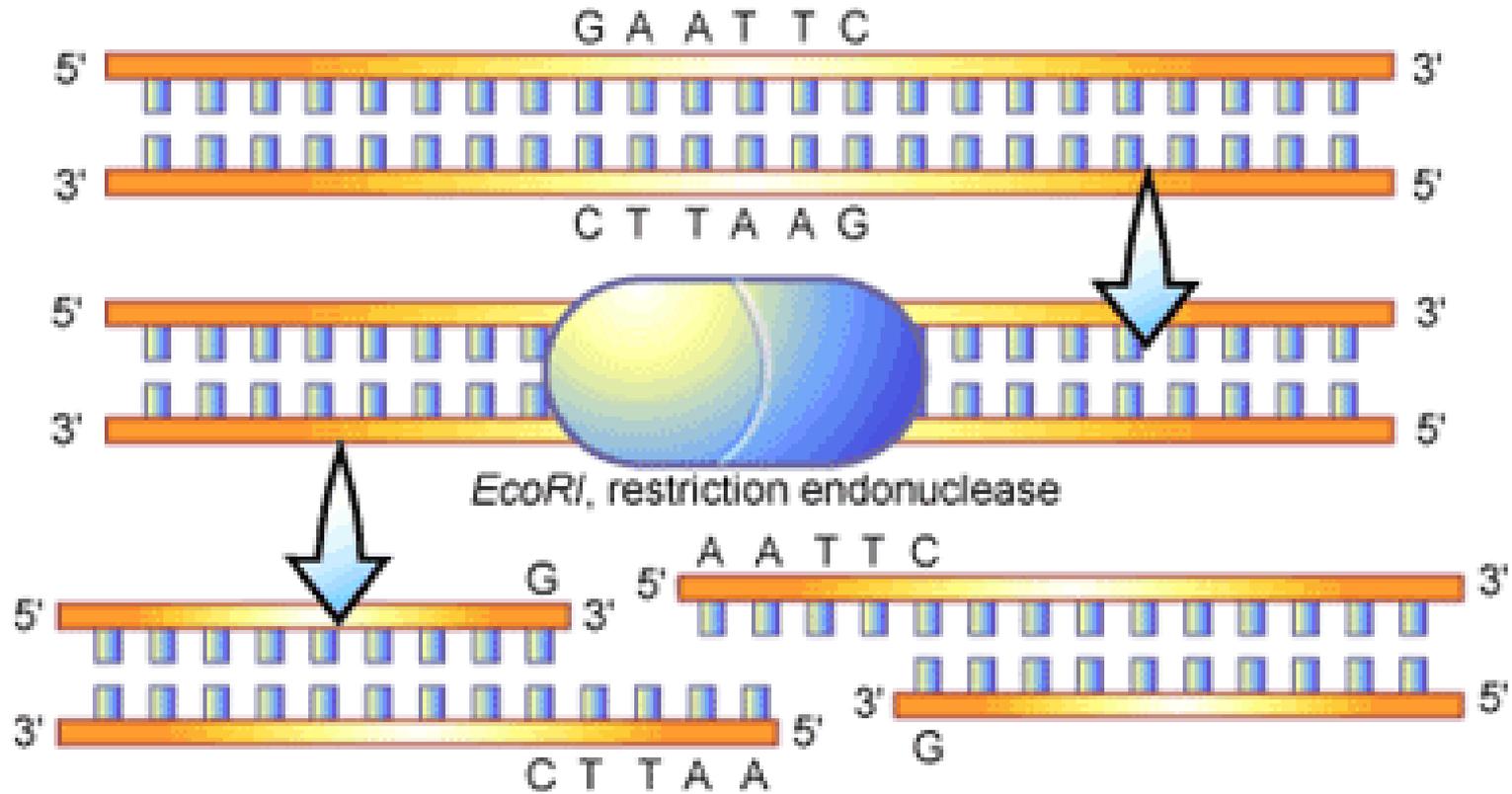
ESTUDO DIRIGIDO

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. E nos estudos de diversidade genética e conservação das espécies?

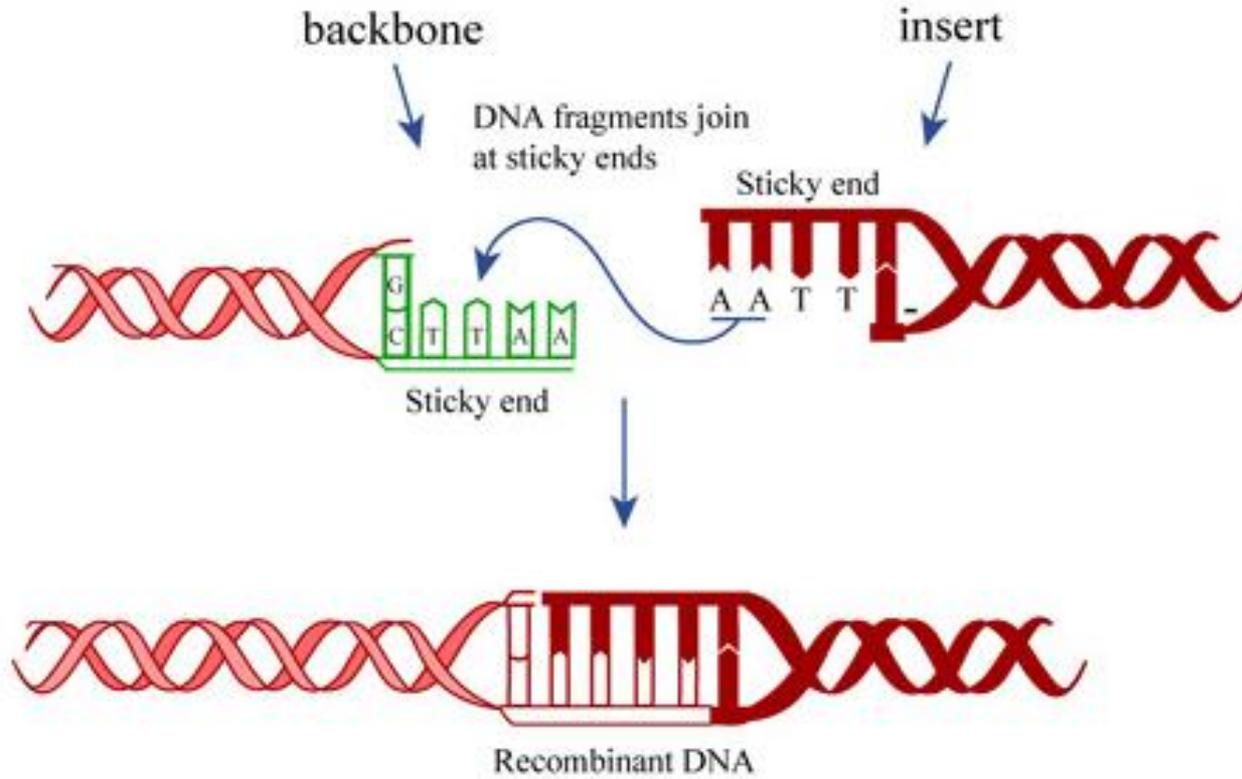


KIT DE FERRAMENTAS MOLECULARES

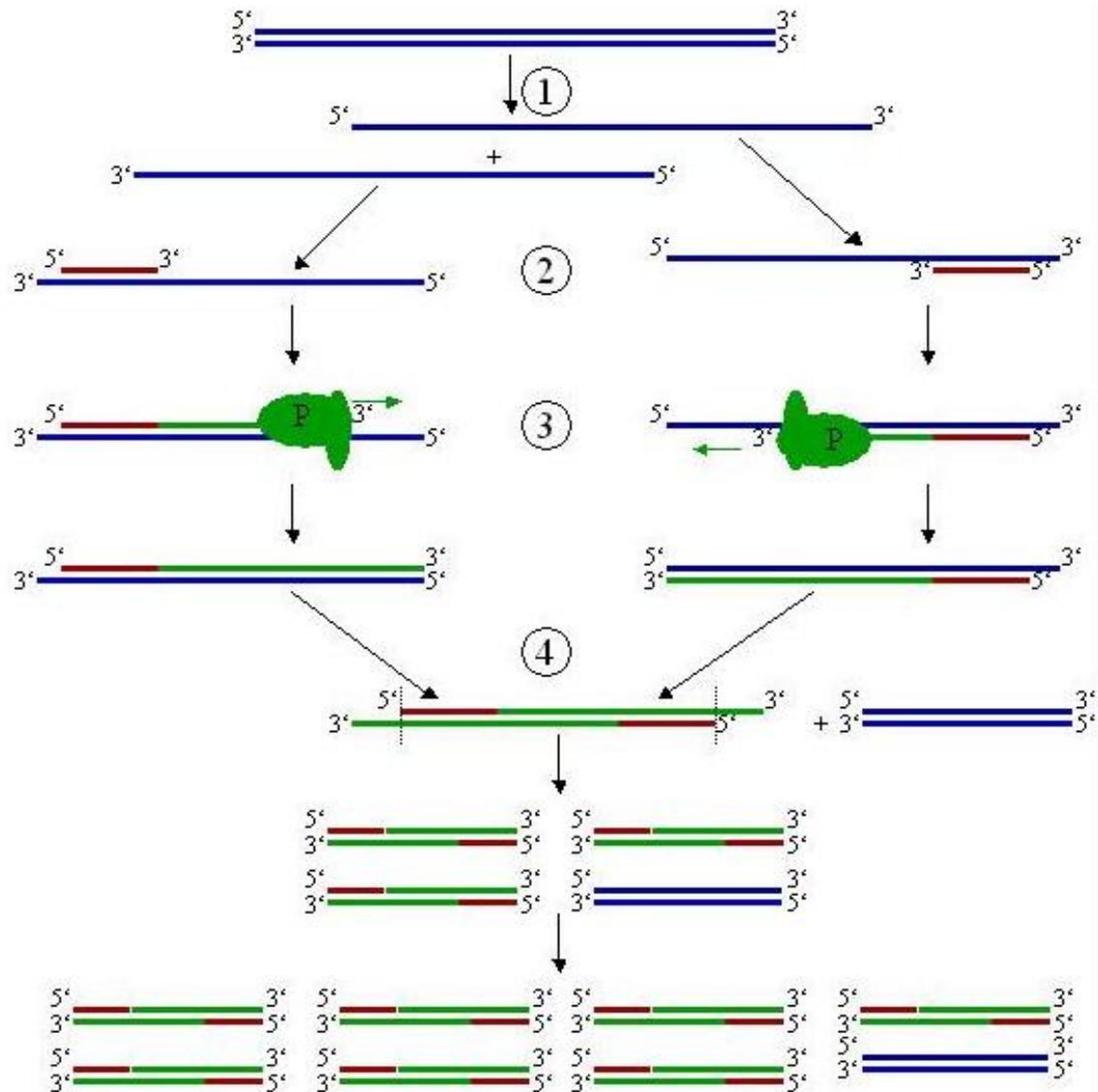
ENZIMAS DE RESTRIÇÃO



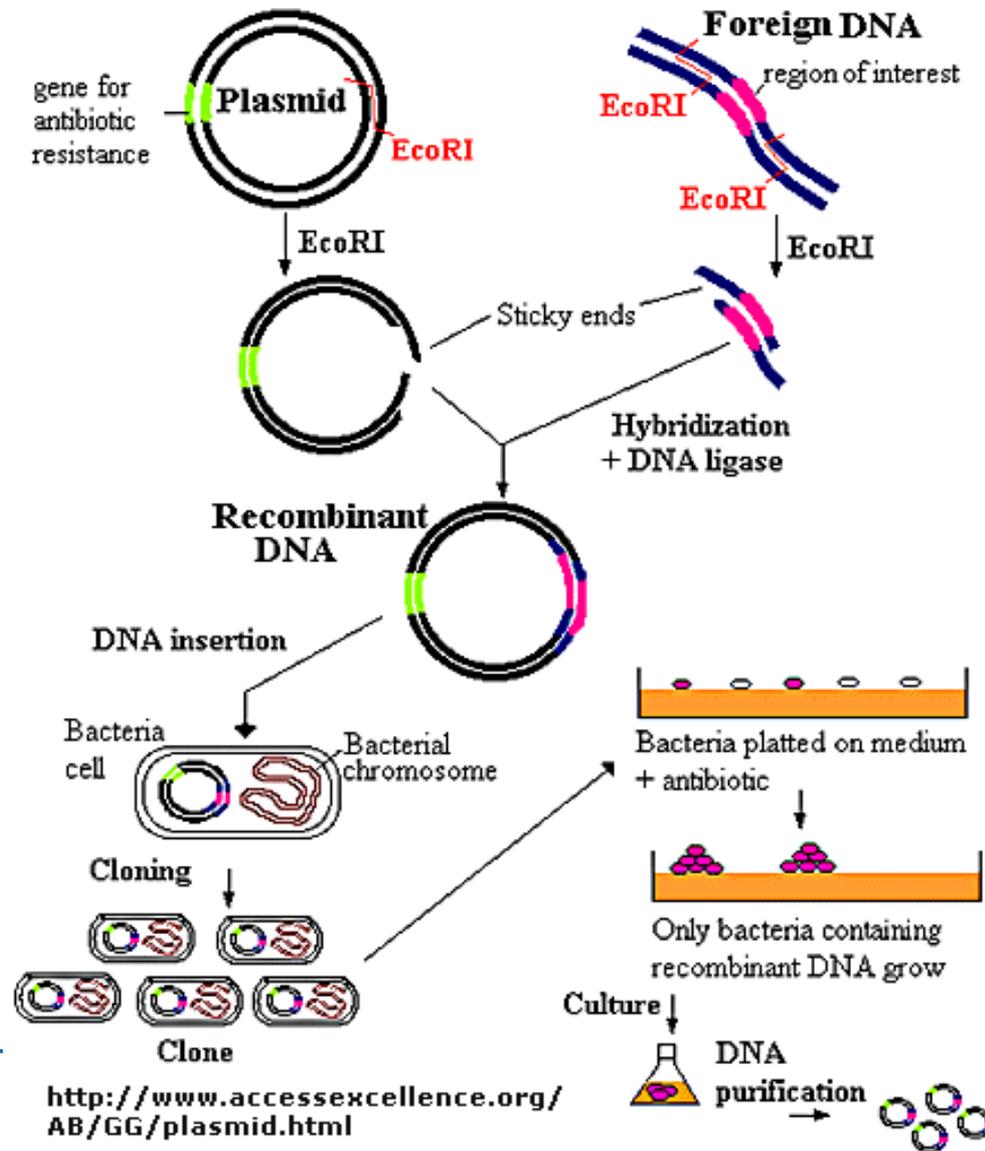
DNA LIGASES



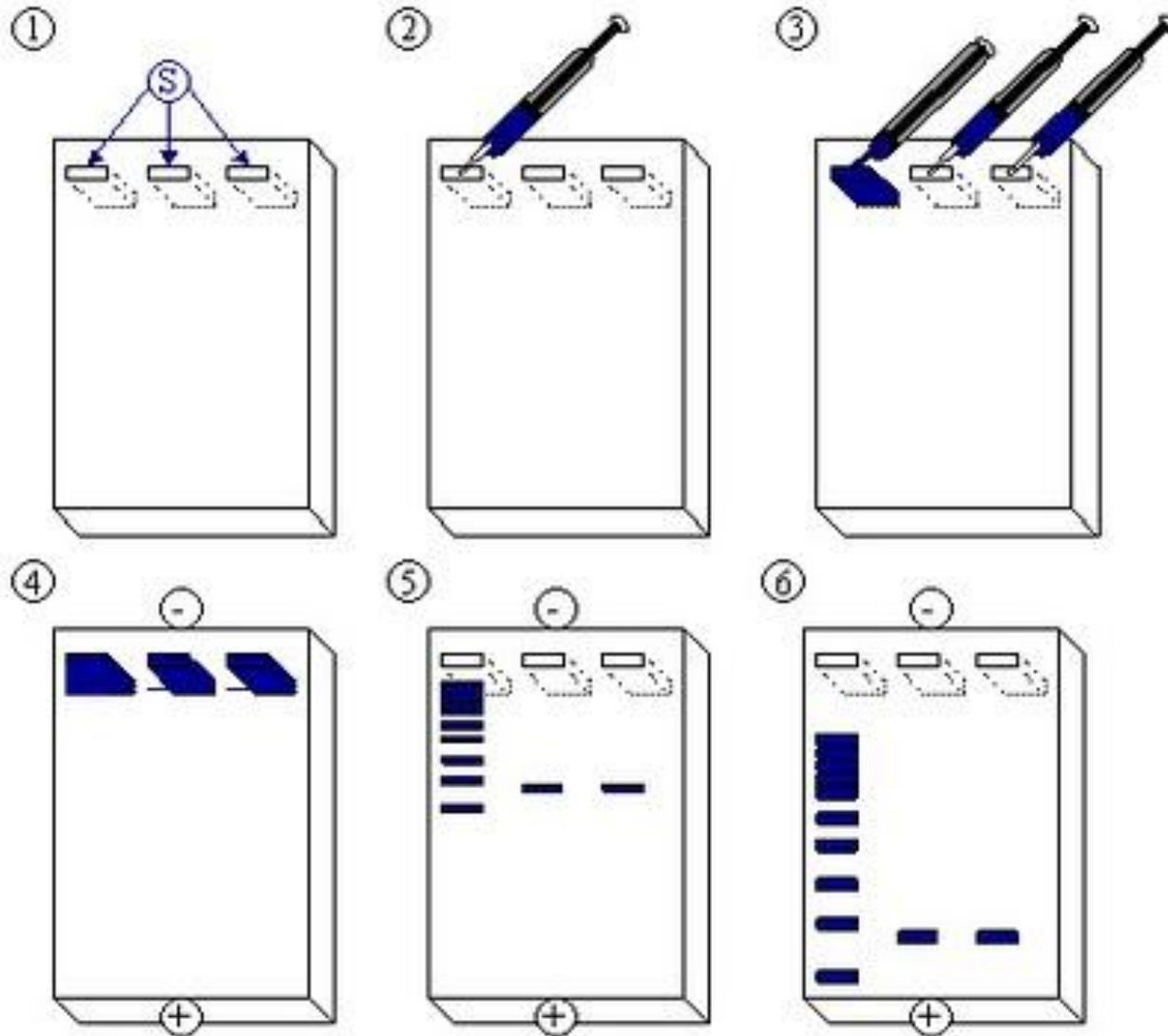
DNA polymerase - PCR



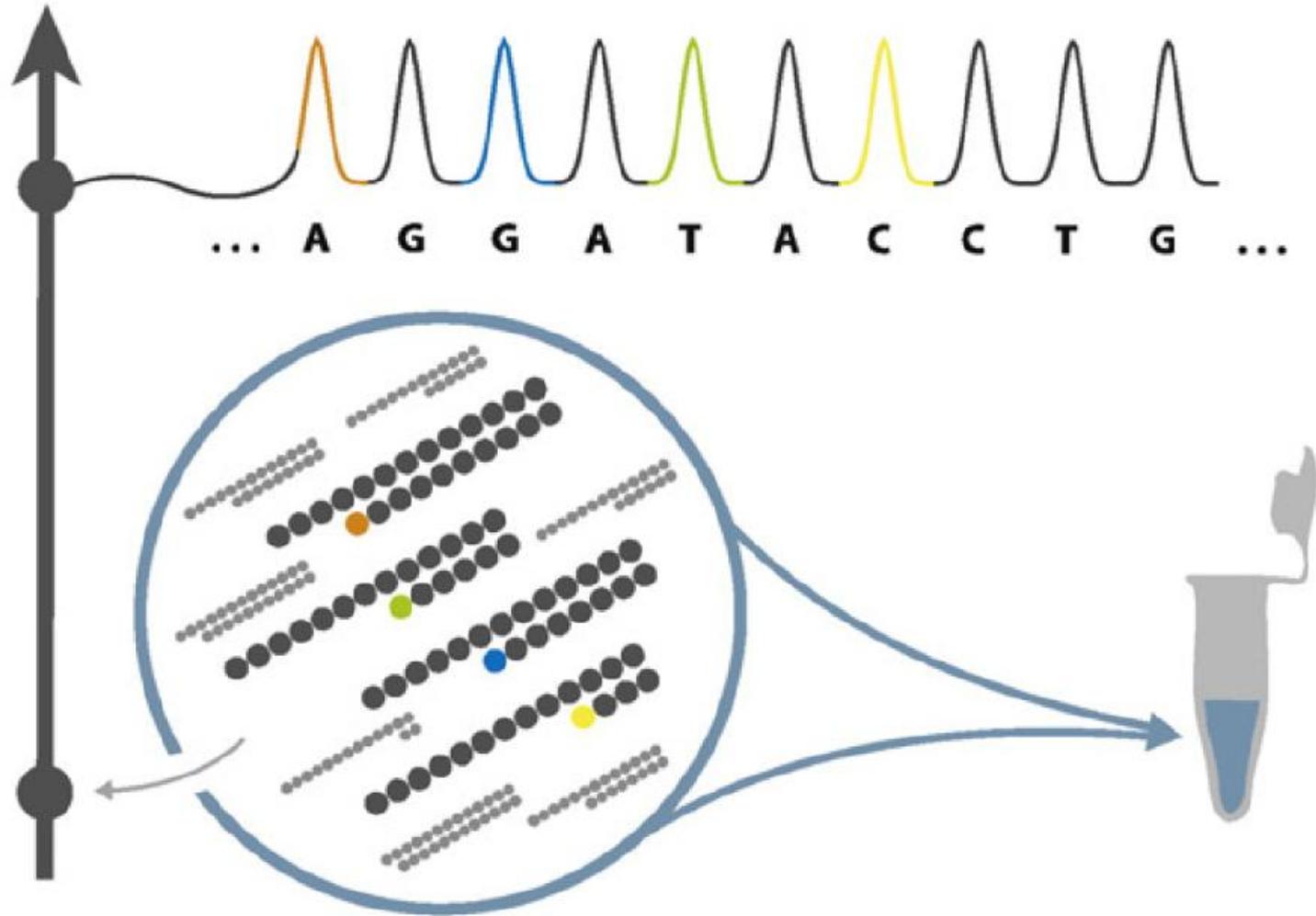
CLONAGEM MOLECULAR



ELETOFORESE EM GEL



SEQUENCIAMENTO DE DNA



CONCEITO: Marcador Genético

- Variação ou polimorfismo que, numa população segregante, se comportam de acordo com as leis mendelianas
- Baseia-se na existência de variabilidade e na possibilidade de sua detecção
- Tipos:
 - Morfológicos
 - Bioquímicos (isoenzimas)
 - Moleculares (AFLP, microssatélites, SNPs, etc.)

MARCADORES MORFOLÓGICOS

- ✓ Monomorfismo
- ✓ Polimorfismo

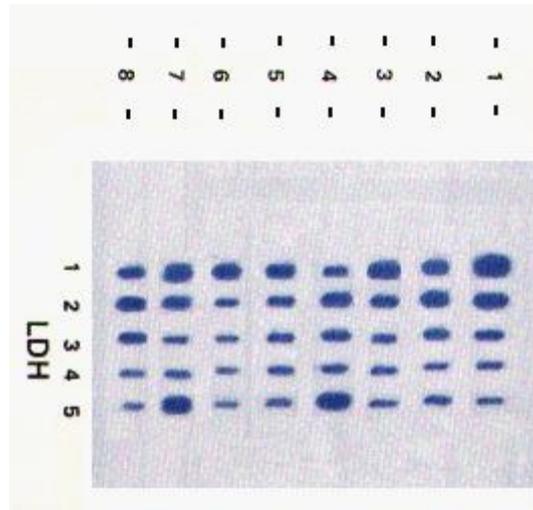


MARCADORES BIOQUÍMICOS

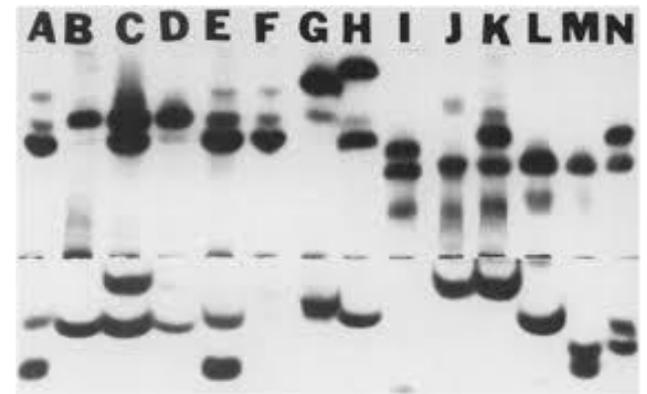
ATIVIDADE ENZIMÁTICA

- Variabilidade observada como resultado da tradução de RNA em proteínas

- ✓ Monomorfismo



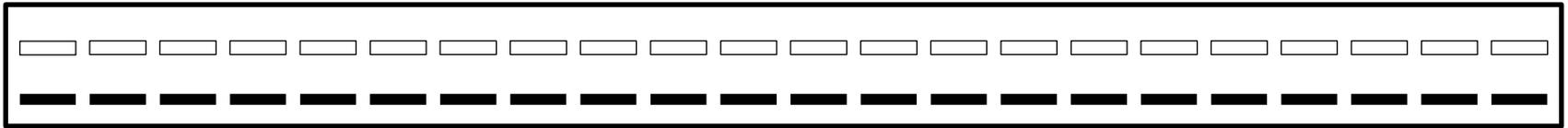
- ✓ Polimorfismo



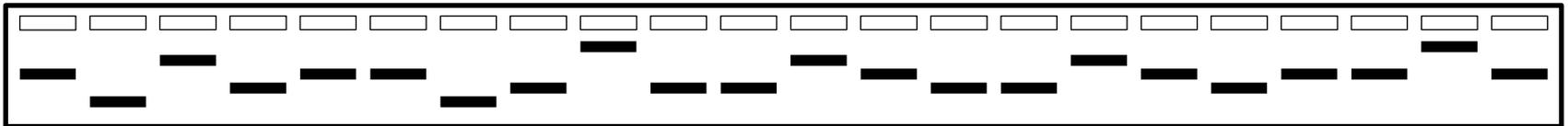
MARCADORES MOLECULARES

- Variabilidade → mutação: que é a base para a identificação de marcadores moleculares

- ✓ Monomorfismo



- ✓ Polimorfismo



Gel de eletroforese

MARCADORES MOLECULARES

- Origem do polimorfismo
 - Polimorfismos de tamanho: originados por indels (inserções ou deleções)
 - Polimorfismos de base: causados por substituição de bases nitrogenadas

DNA Sequence

...AATGCTTT**GGGCA...**

DNA Sequence with a Change in One Nucleotide from a T to an A

...AATGCTTA**GGGCA...**

DNA Sequence with a Deletion of the T Nucleotide

...AATGCTT GGGCA...

DNA Sequence with an Addition of an Extra T Nucleotide

...AATGCTTTT**GGGCA...**

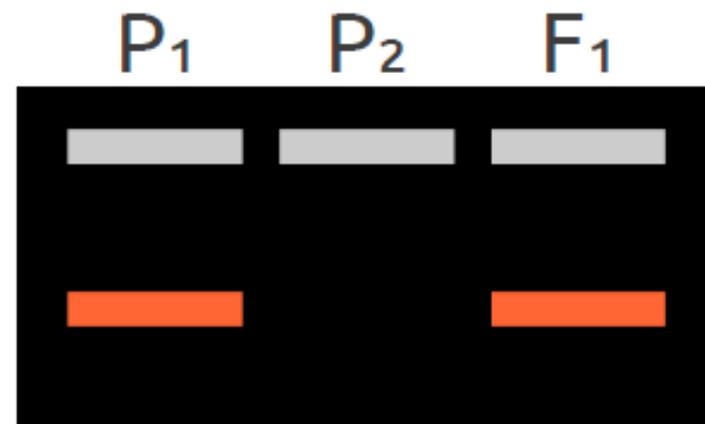
Substituição

Deleção

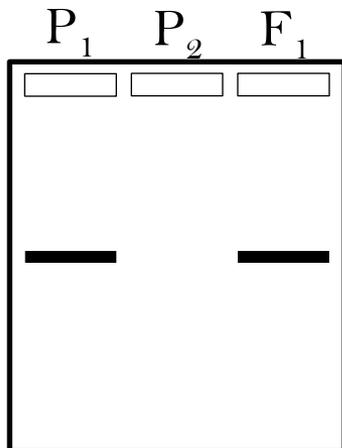
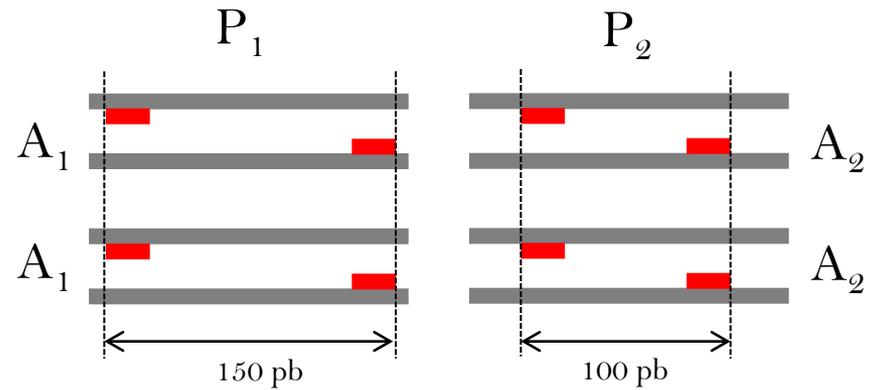
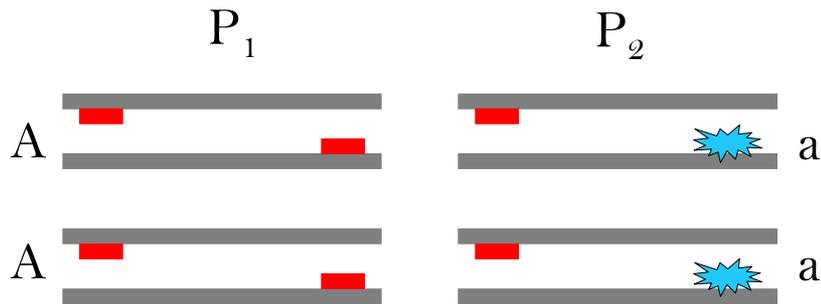
Inserção

MARCADORES MOLECULARES

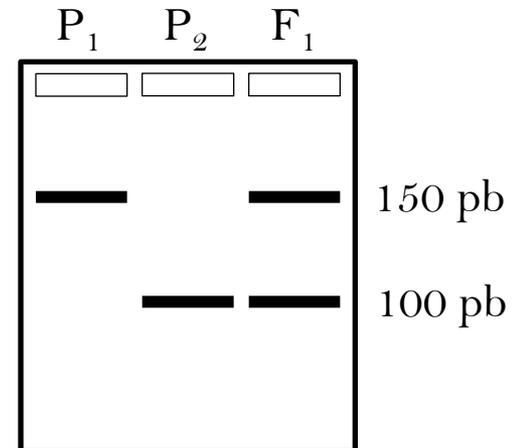
- Herança
 - Dominantes: não se identificam heterozigotos
 - Codominantes: identificam-se heterozigotos



MARCADORES DOMINANTES E CODOMINANTES

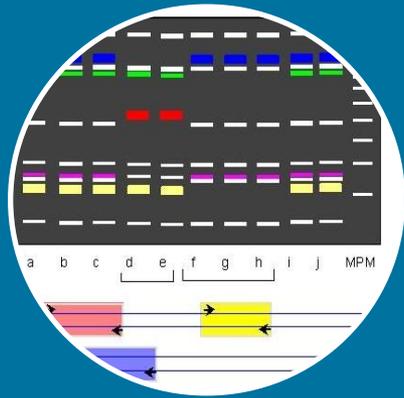


Dominante



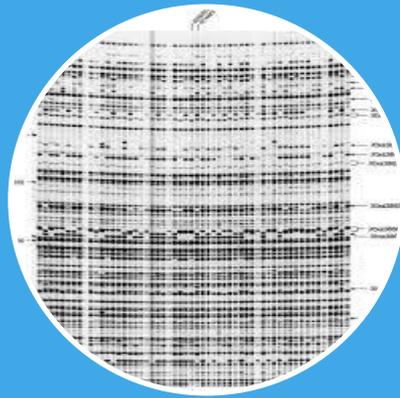
Codominante

TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES



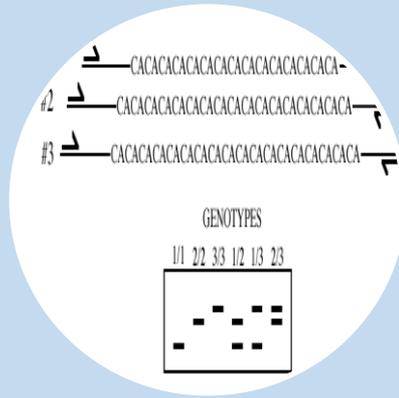
Polimorfismo no tamanho de fragmentos de DNA amplificados ao acaso

- **RAPD**
- PCR e gel de eletroforese



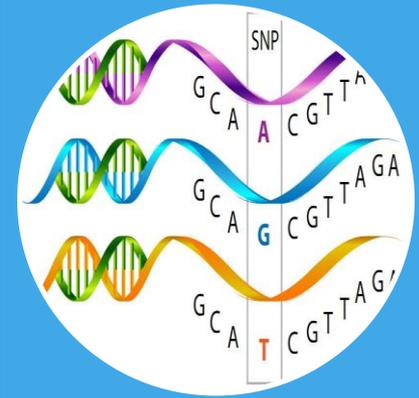
Polimorfismo no tamanho de fragmentos de DNA amplificados

- **AFLP**
- Enzimas de restrição, Primers, PCR e gel de eletroforese



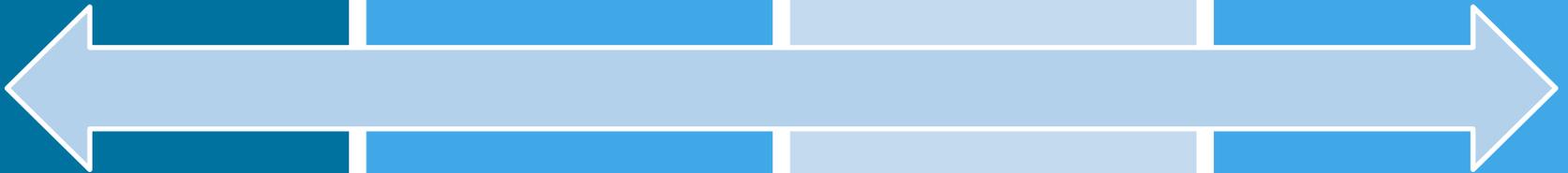
Polimorfismo no tamanho de sequências repetitivas simples no DNA

- **Microsatélite**
- Primers, PCR, e gel de eletroforese



Polimorfismo de base única

- **SNP**
- Sequenciamento



RAPD

Random Amplified Polymorphism DNA

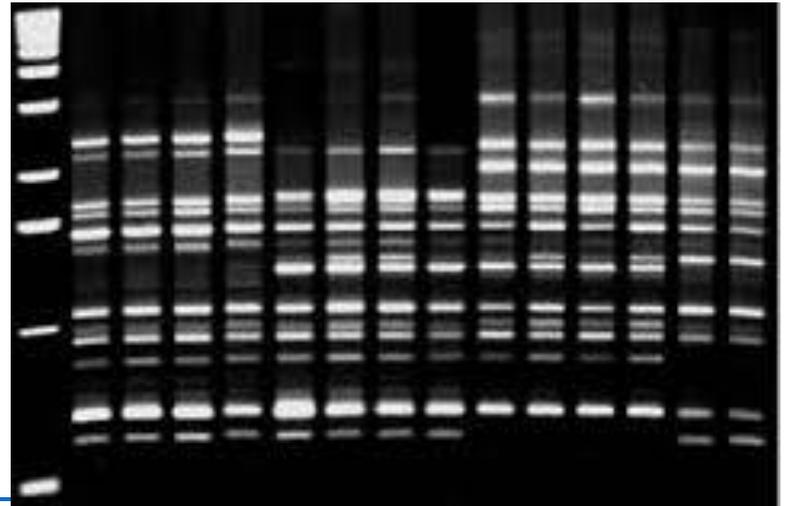
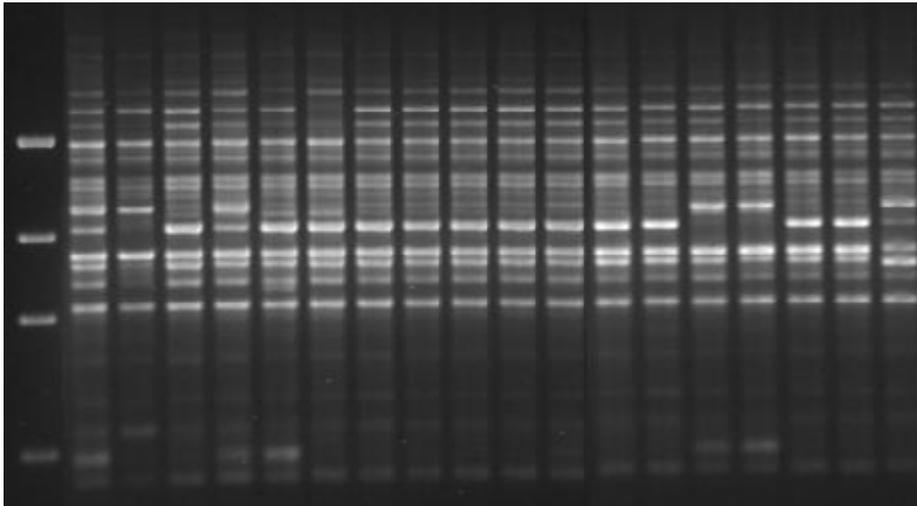
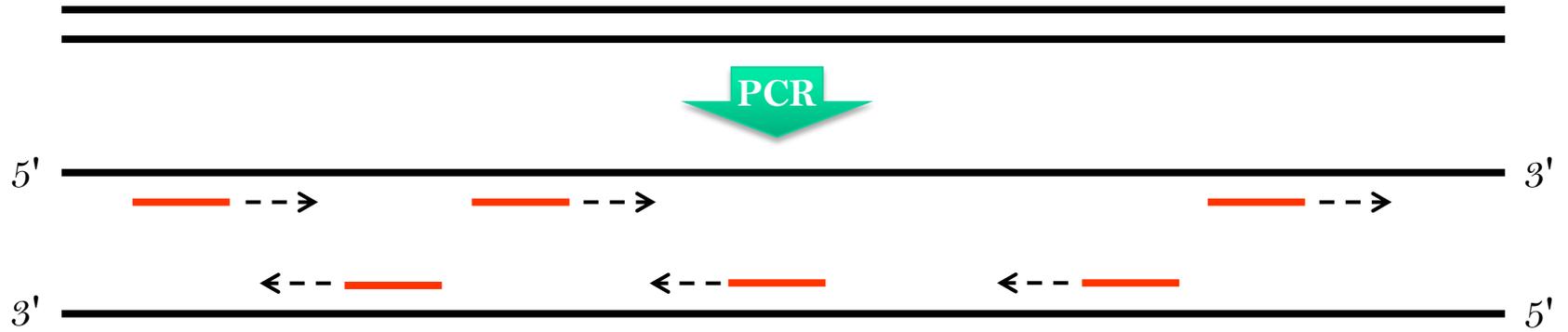
Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

- 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



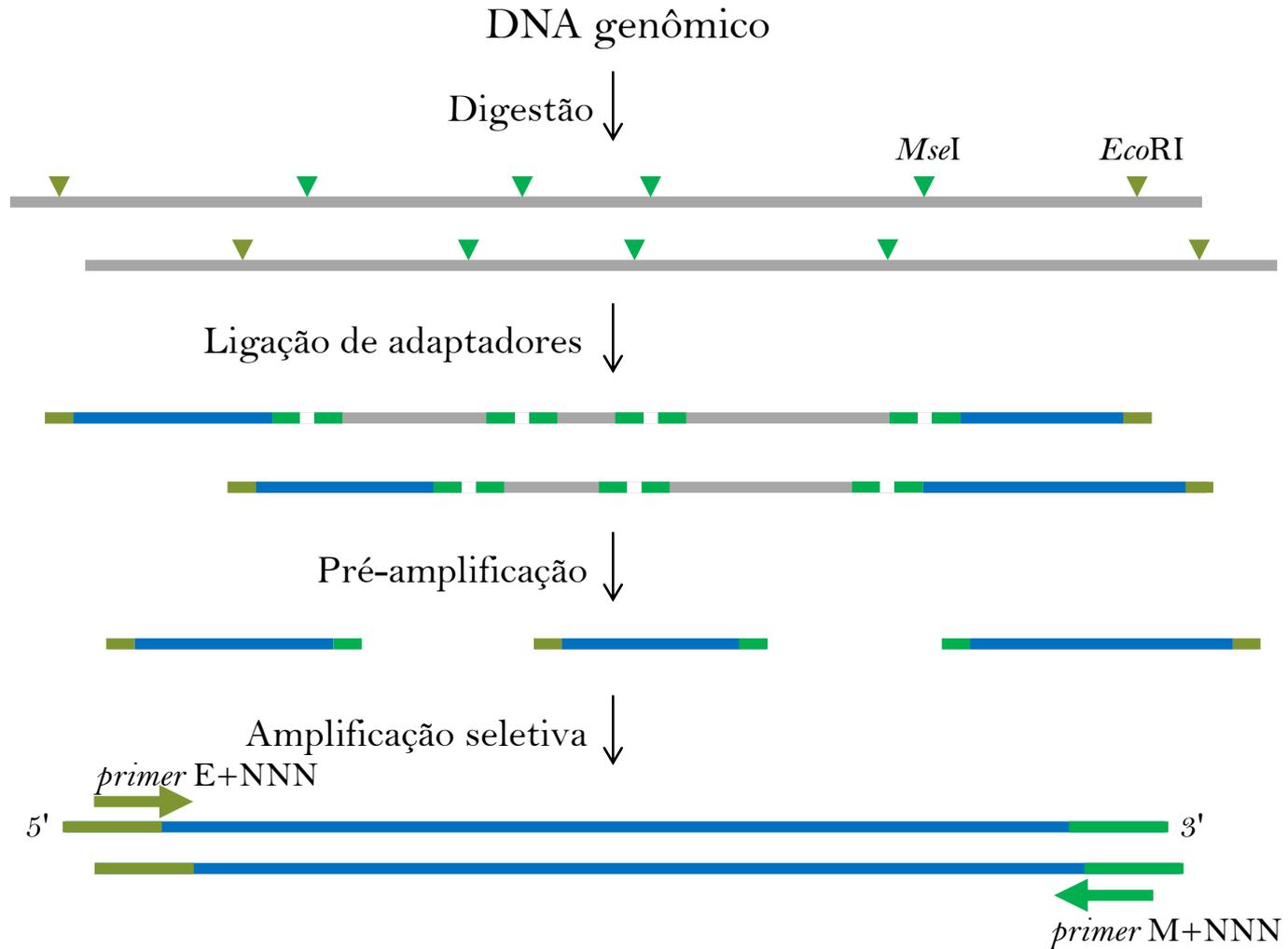
AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism

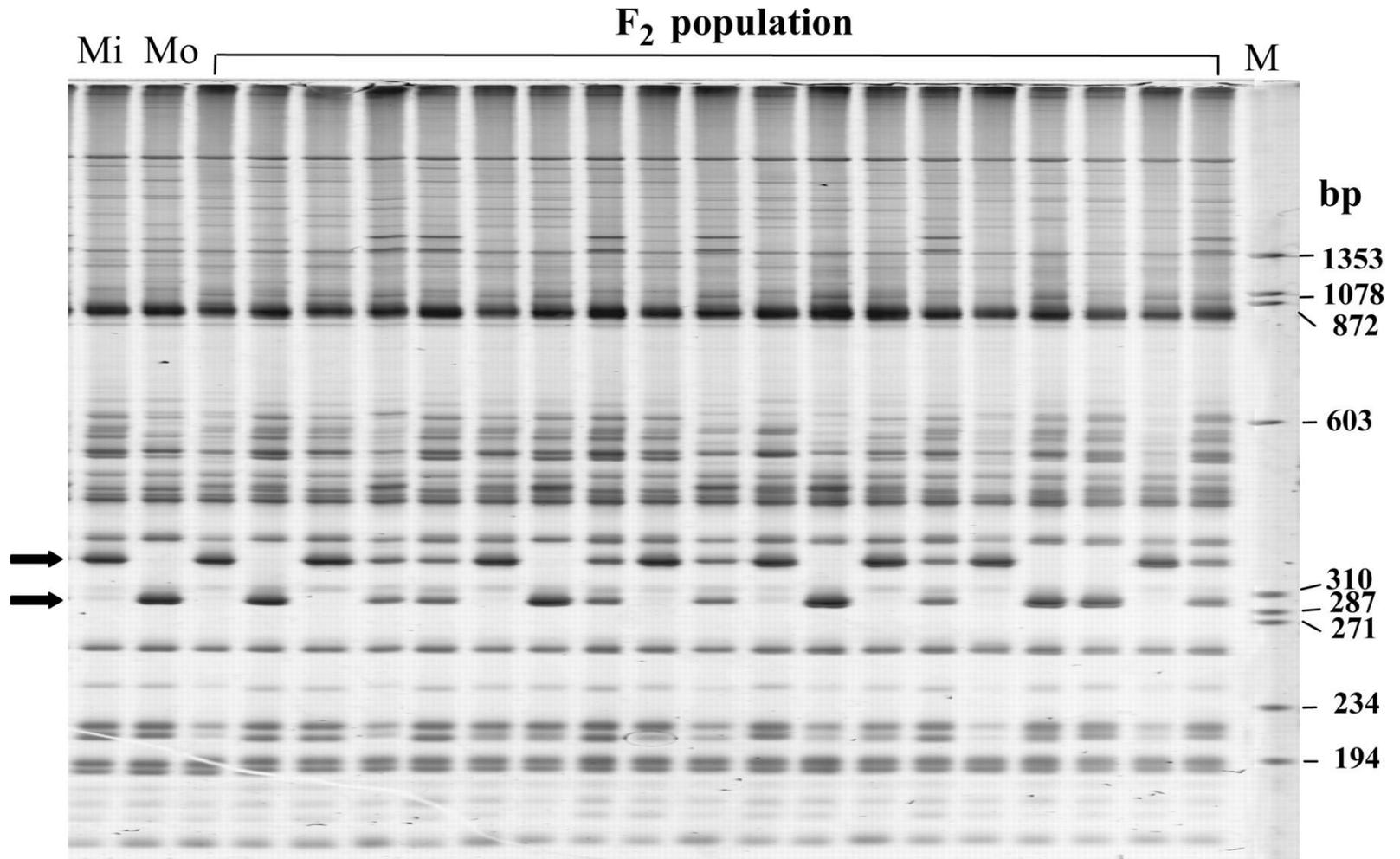
Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado

- 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>

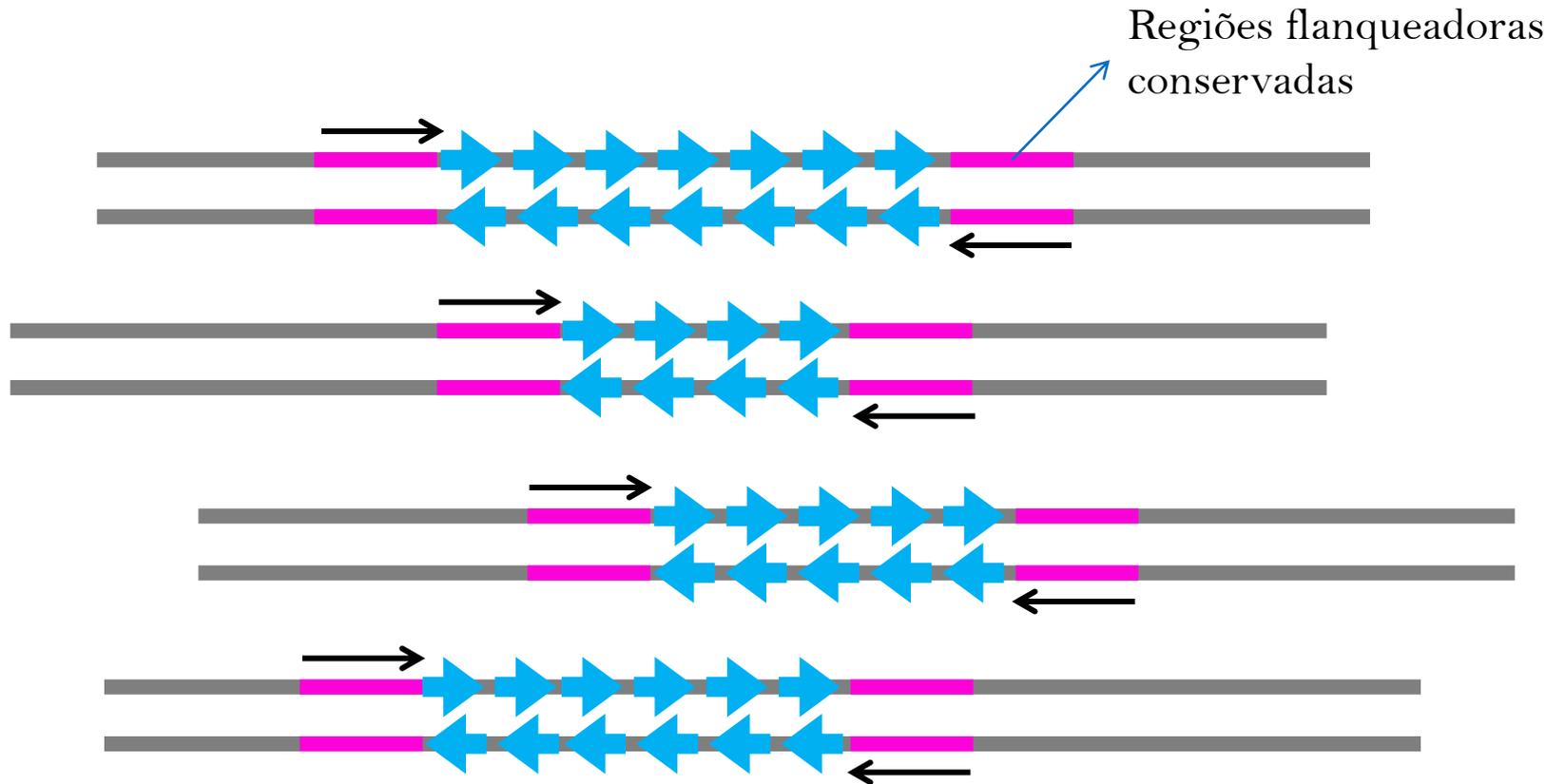
MICROSSATÉLITES ou SSR

Simple Sequence Repeats

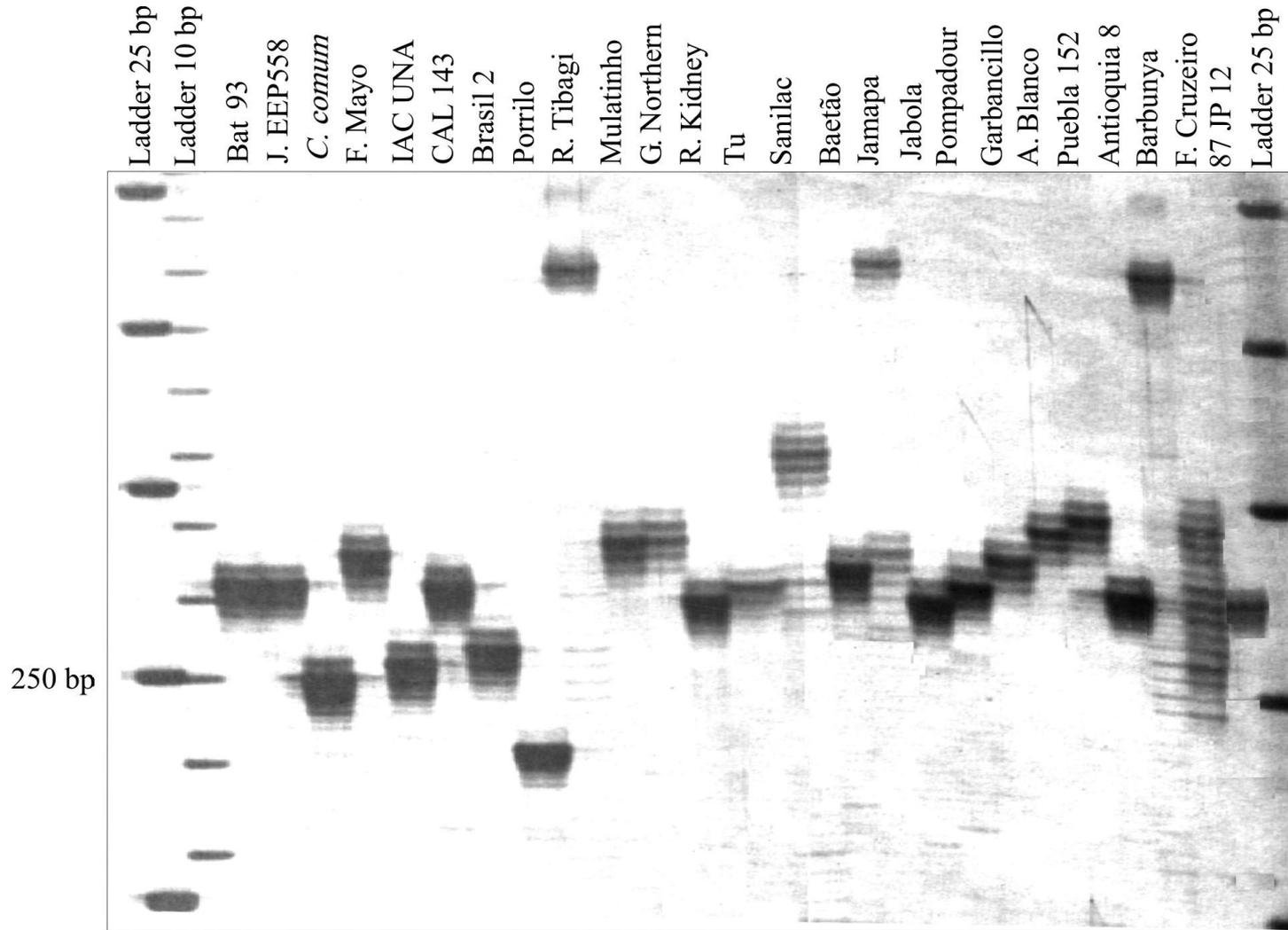
Sequências simples repetidas

- 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



MICROSSATÉLITES



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

SNP

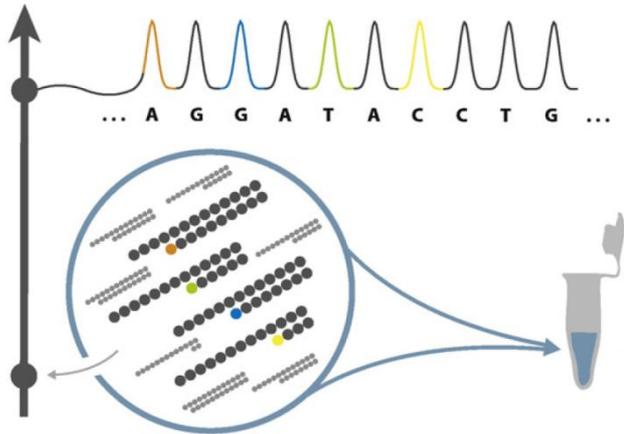
Single Nucleotide Polymorphism

Polimorfismo de base única

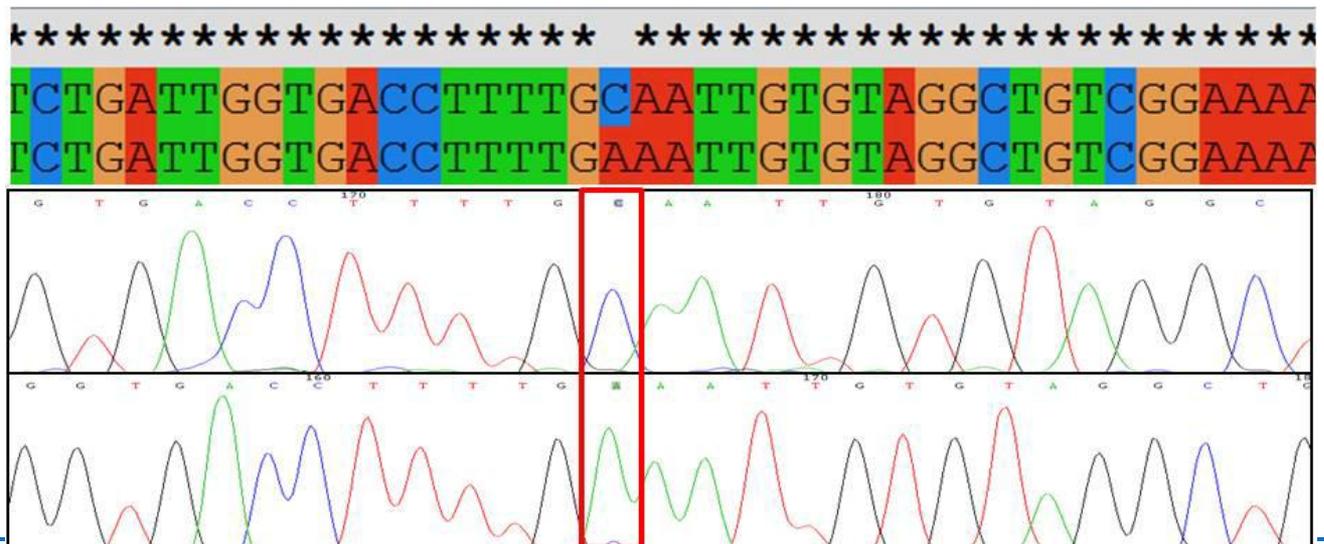
- Polimorfismo resultante da alteração de uma única base
 - Abundantes no genoma
 - Codominante e bialélico
 - Há diversas maneiras de se avaliar a variação:
 - Alinhamento e comparação de sequências
 - Métodos baseados em géis
 - Métodos baseados em chips
 - Sequenciamento de 2^a geração, etc.
-

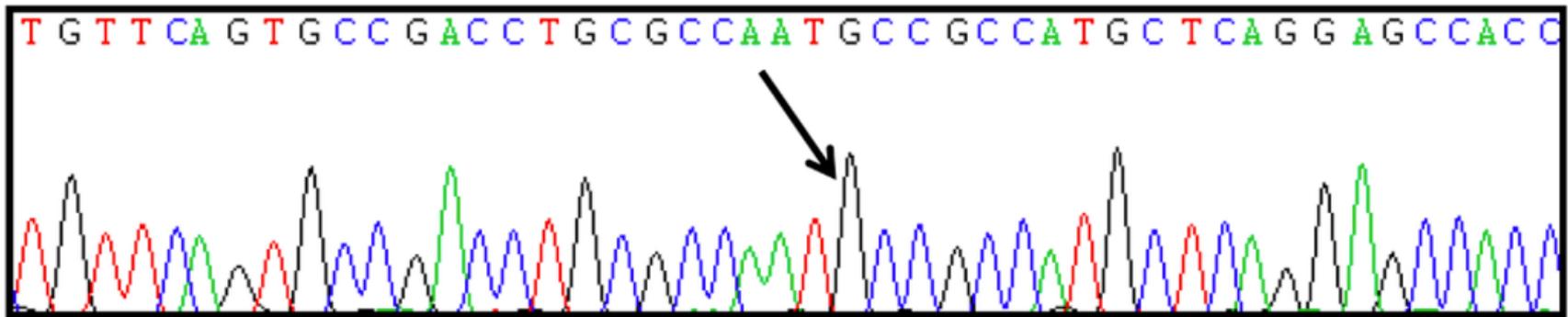
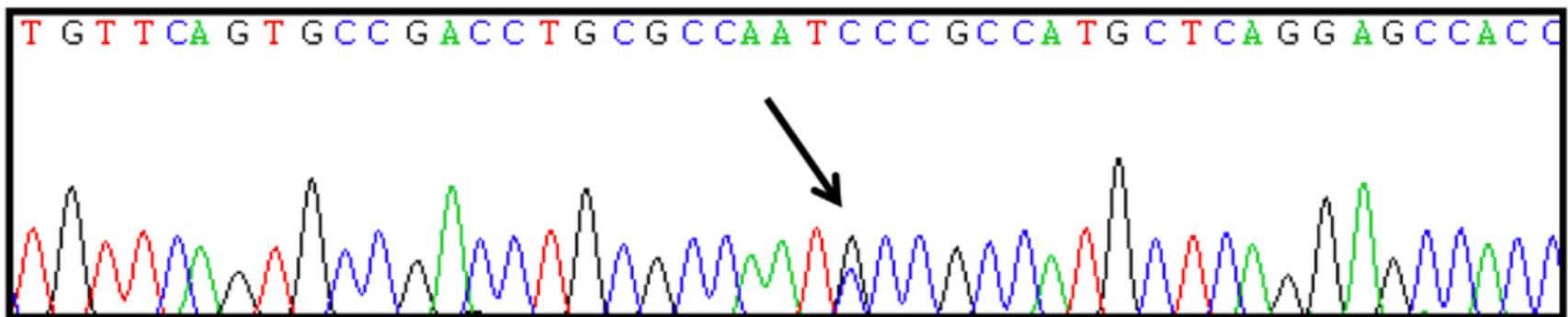
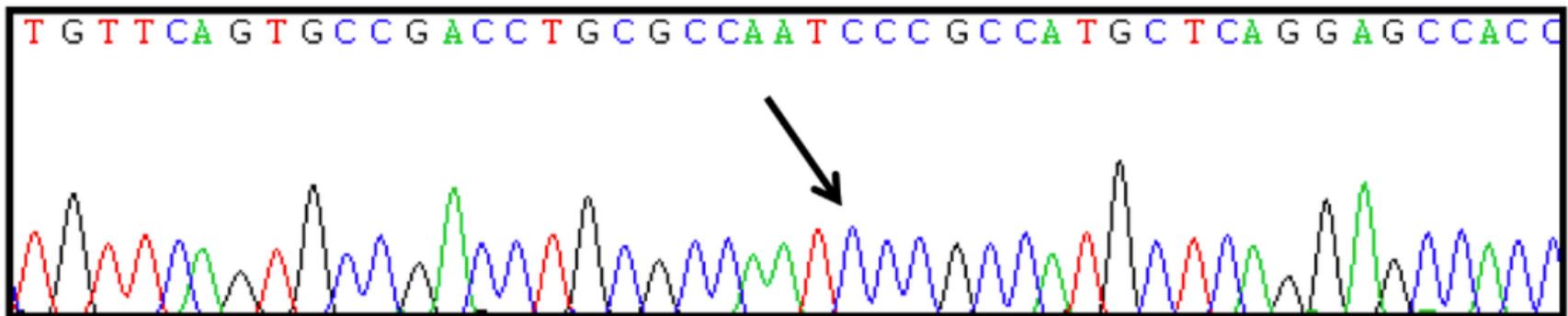
SNP

Sequenciamento



Alinhamento de sequências





COMPARAÇÃO DOS MARCADORES

	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Base genética	PCR com <i>primers</i> arbitrários	Digestão e PCR com <i>primers</i> seletivos	PCR com <i>primers</i> 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

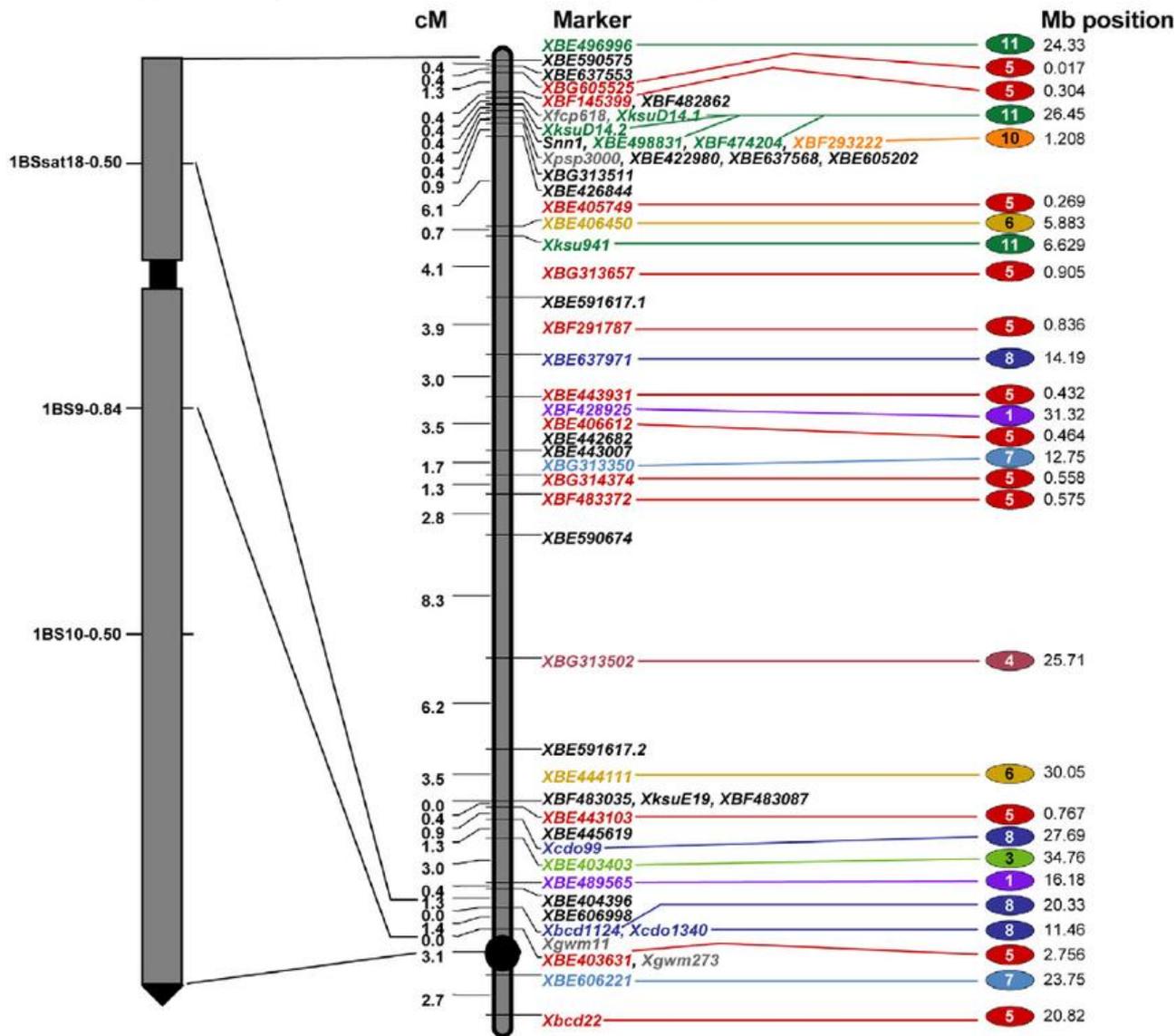
CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

- Mapa genético: representação de ordem e distância entre marcadores genéticos
- Ligação genética
 - A herança conjunta de diferentes locos dá-se por conexão física

1BS Physical Map

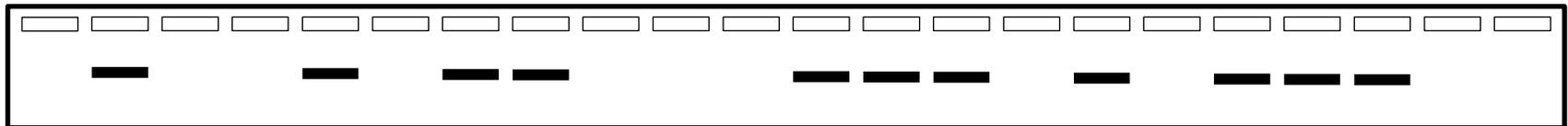
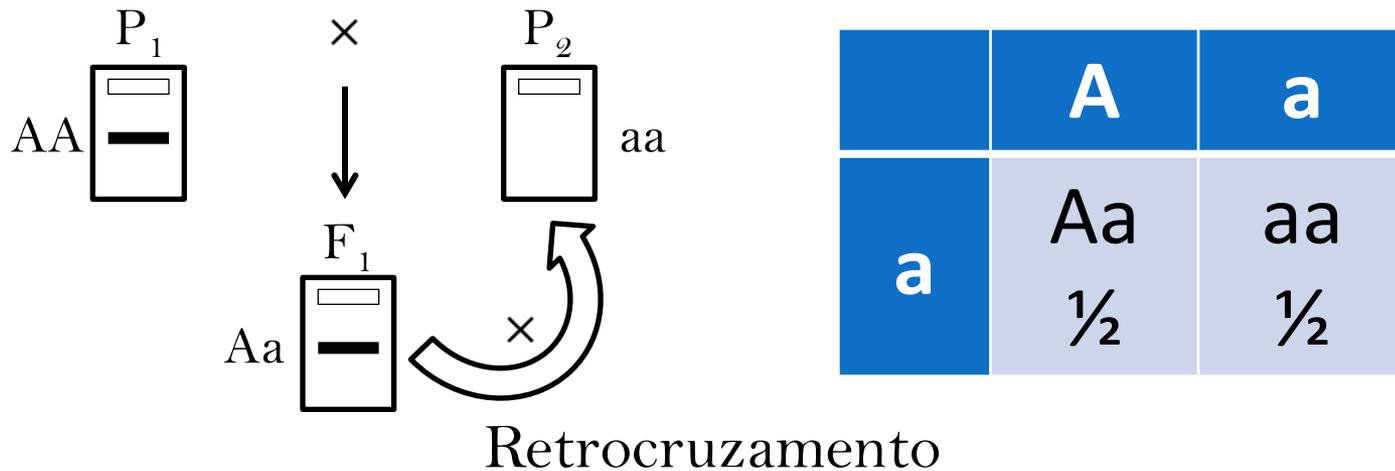
CS x CS-DIC 1B Genetic Map

Rice Chromosome



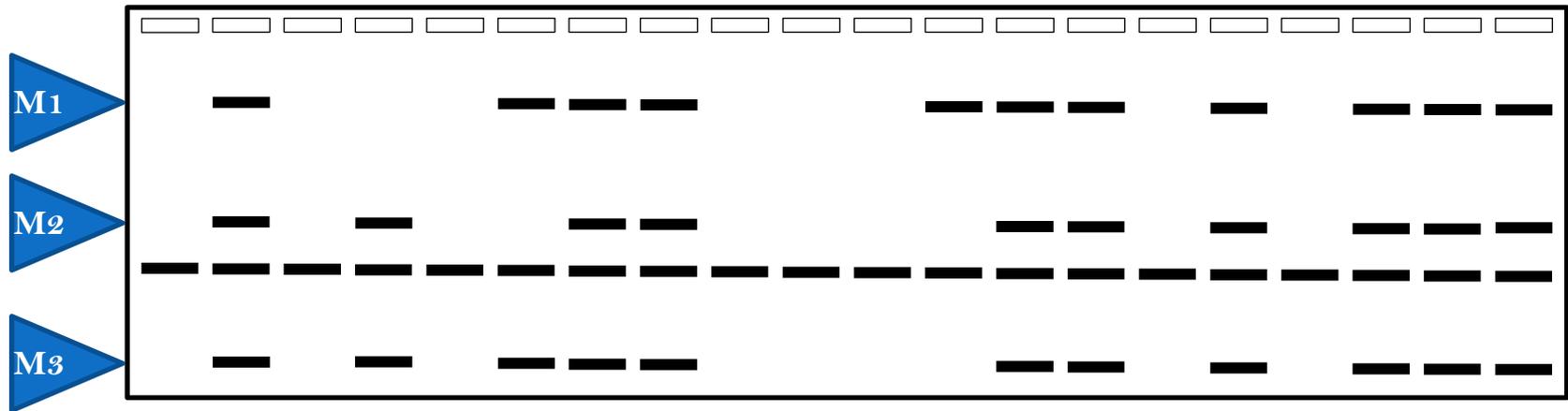
CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

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



CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

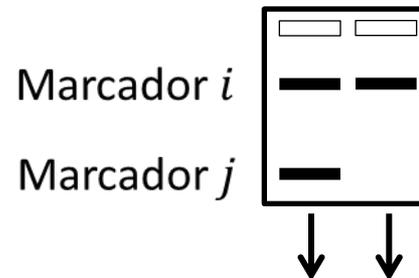
População de retrocruzamento genotipada com três locos AFLP



- Cálculo da fração de recombinação:

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

Comparando dois locos polimórficos



Não recombinante Recombinante

CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

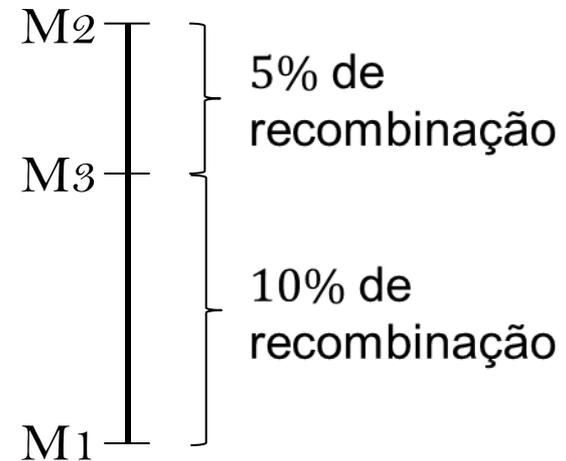
Leitura do gel

	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

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

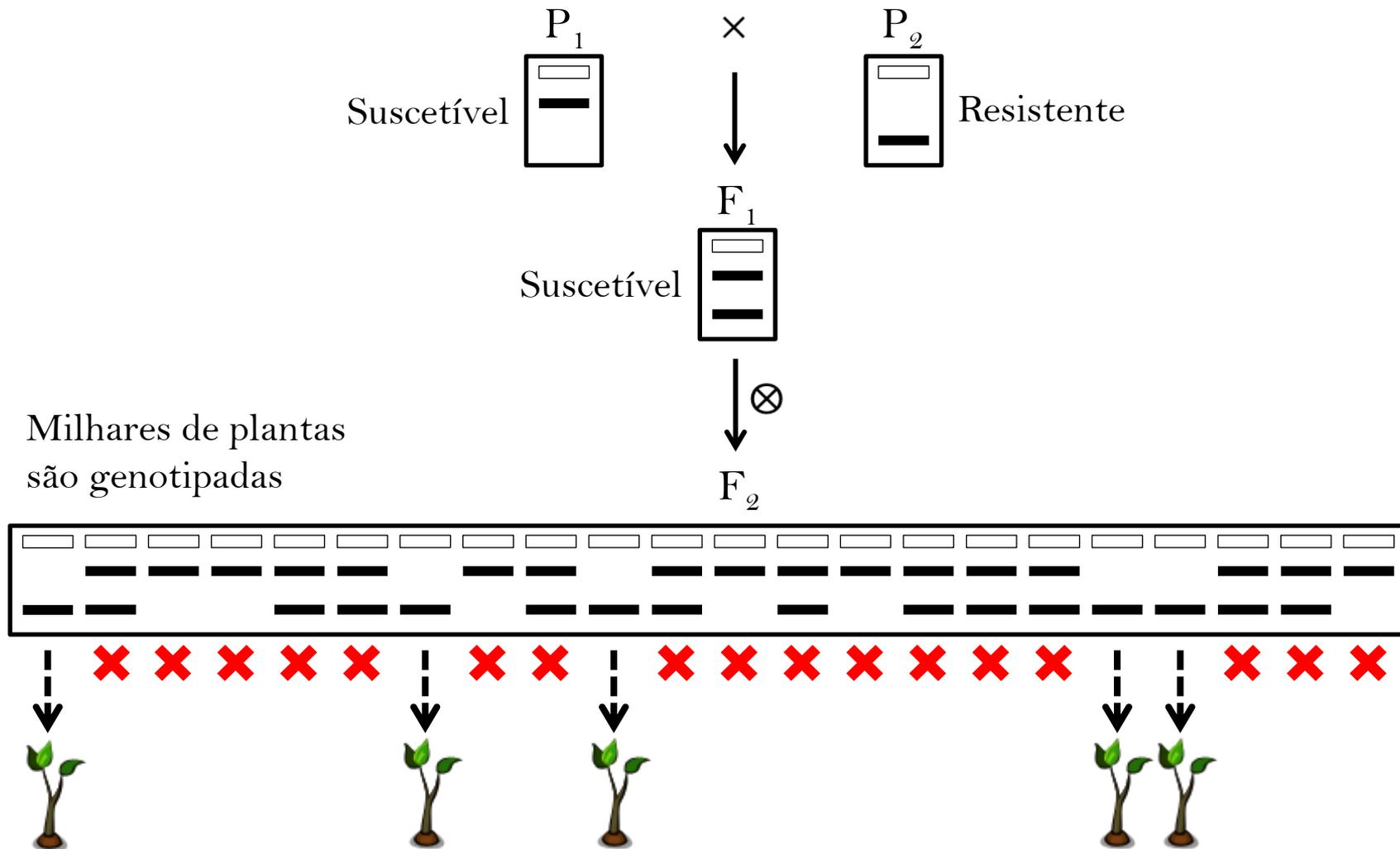
$$r_{1,3} = \frac{2}{20} = 0,10$$

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



Mapa genético

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES



A seleção fenotípica é baseada em marcadores de DNA

Review

Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era

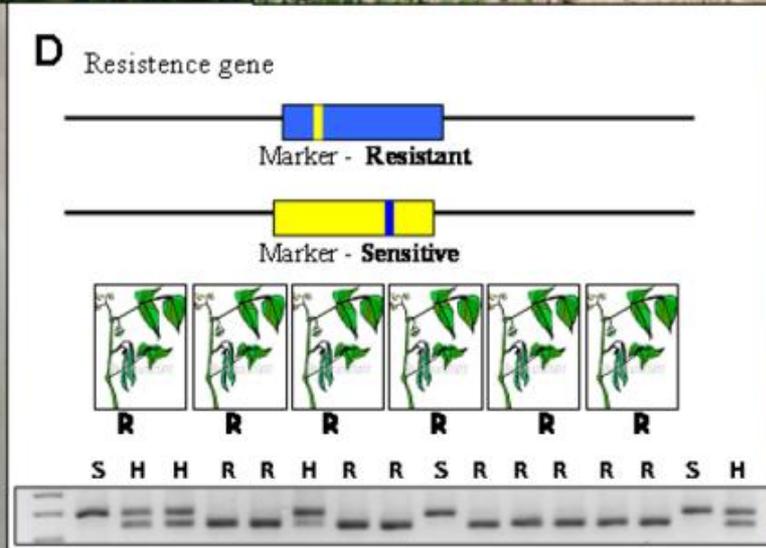
Petr Smýkal^{1,2,*}, Gregoire Aubert³, Judith Burstin³, Clarice J. Coyne⁴, Noel T. H. Ellis⁵, Andrew J. Flavell⁶, Rebecca Ford⁷, Miroslav Hýbl¹, Jiří Macas⁸, Pavel Neumann⁸, Kevin E. McPhee⁹, Robert J. Redden¹⁰, Diego Rubiales¹¹, Jim L. Weller¹² and Tom D. Warkentin¹³

¹ Agritec Plant Research Ltd., Šumperk 787 01, Czech Republic; E-Mail: hybl@agritec.cz

² Department of Botany, Palacký University, Olomouc 783 71, Czech Republic

³ INRA-UMRLEG, Dijon 21065, France; E-Mails: Gregoire.Aubert@dijon.inra.fr (G.A.); burstin@dijon.inra.fr (J.B.)

⁴ Western Regional Plant Introduction Station, USDA, Pullman, WA 99164-6402, USA; E-Mail: coynec@wsu.edu



USO DOS MARCADORES NA CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA

<http://vimeo.com/69343714>

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. E nos estudos de diversidade genética e conservação das espécies?

