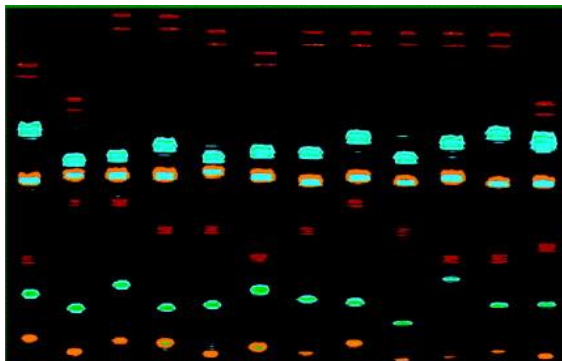


LGN0232 - Genética Molecular

Marcadores Moleculares: Do Melhoramento a Conservação

Aula 10



Antonio Figueira

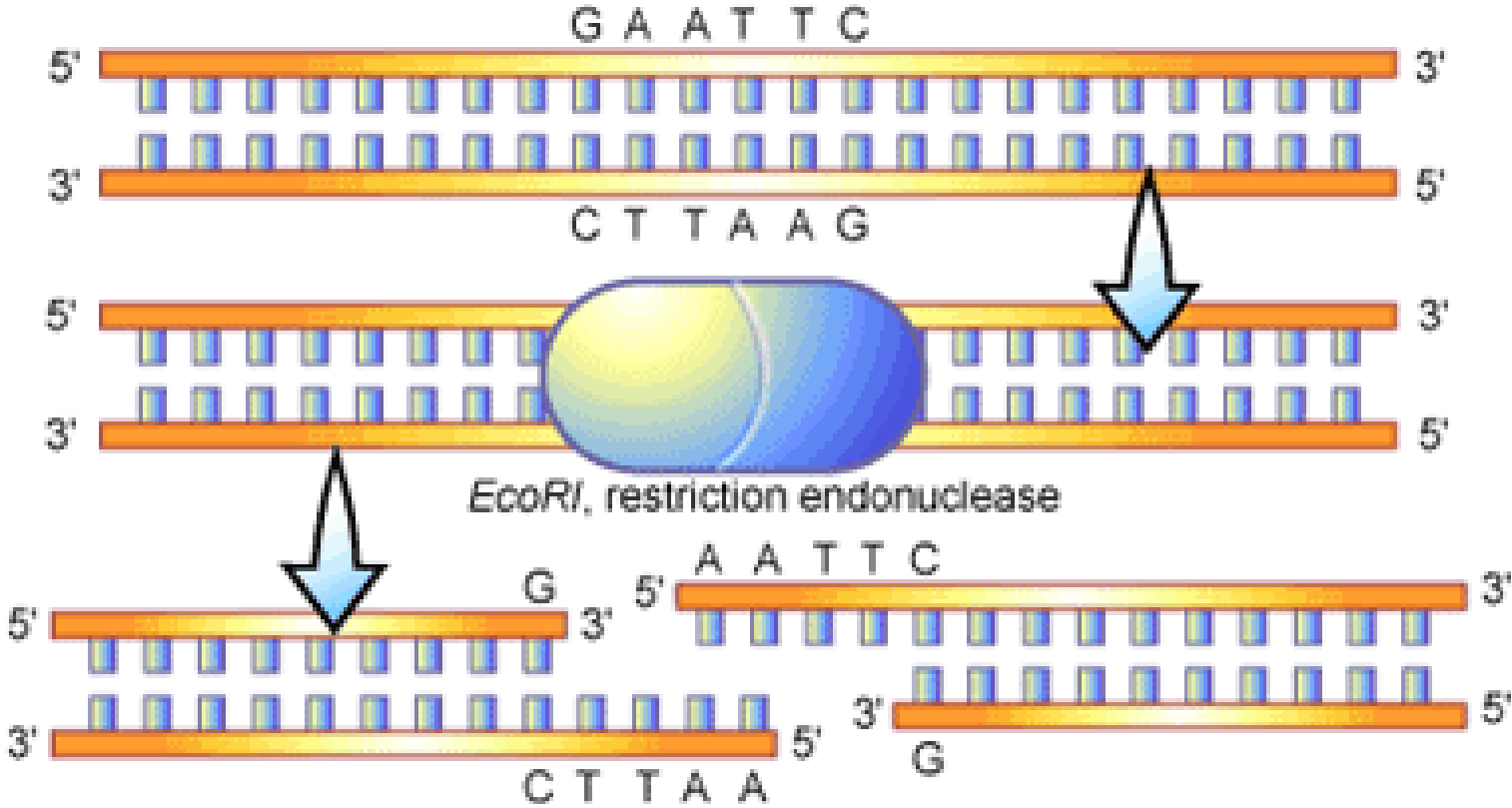
CENA

figueira@cena.usp.br

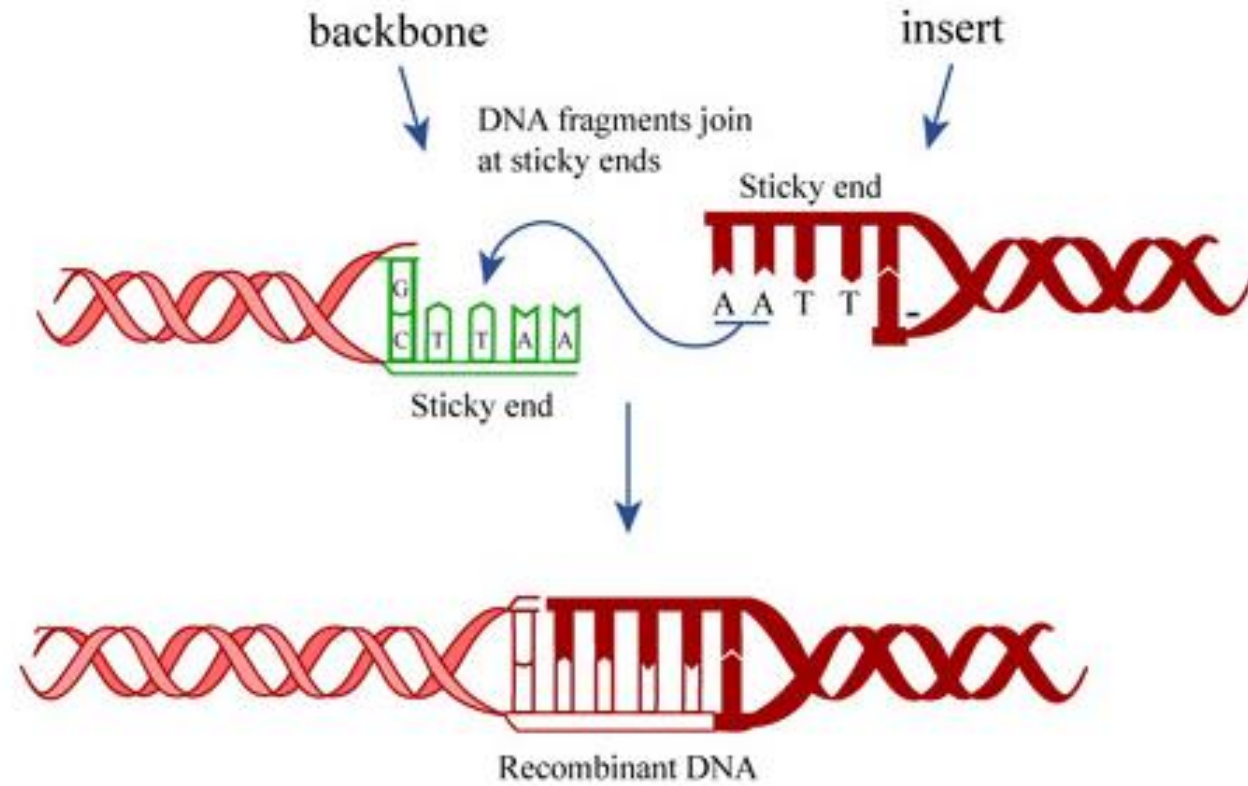
Relembrando...

kit de genética molecular

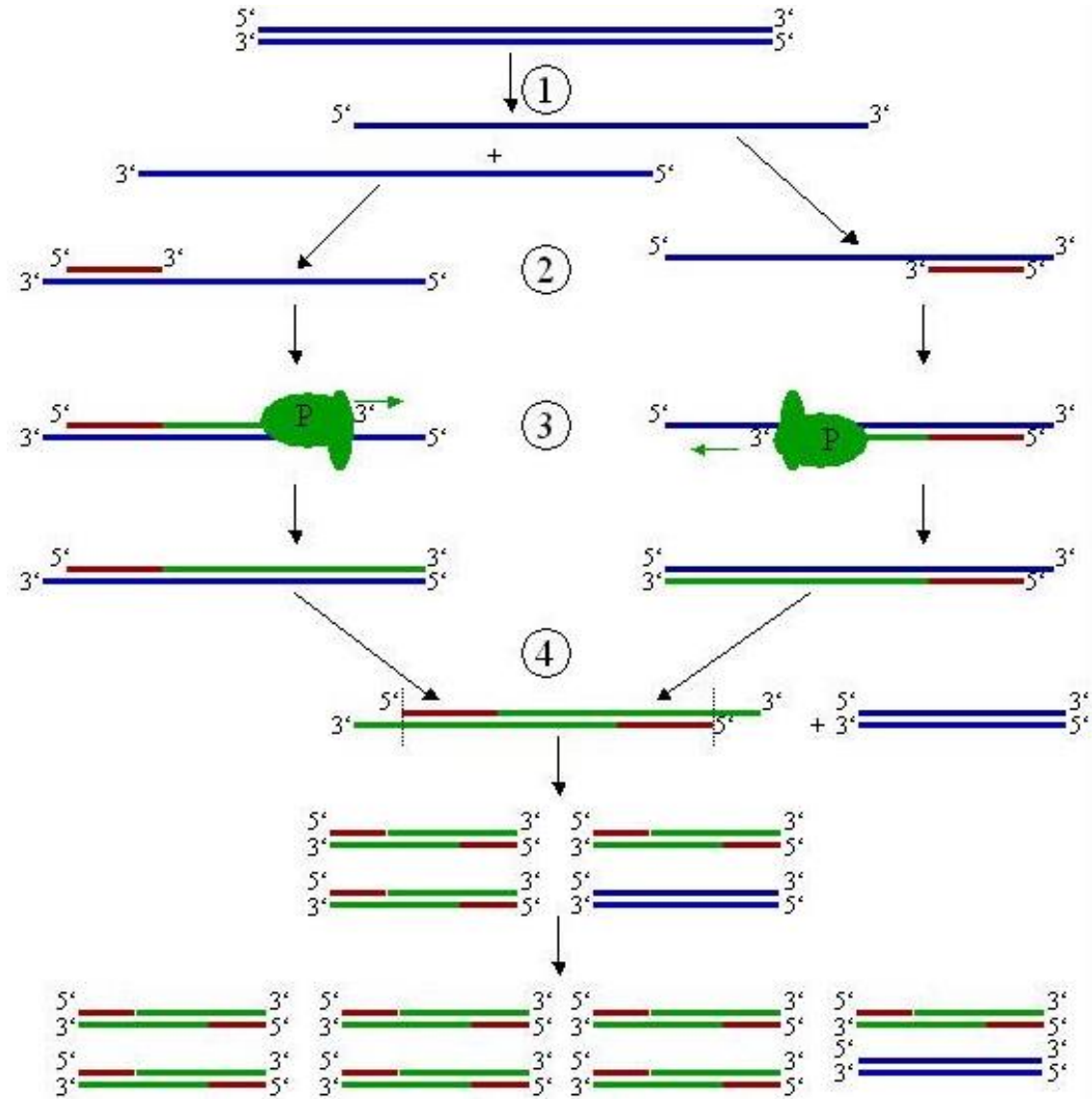
Enzimas de Restrição



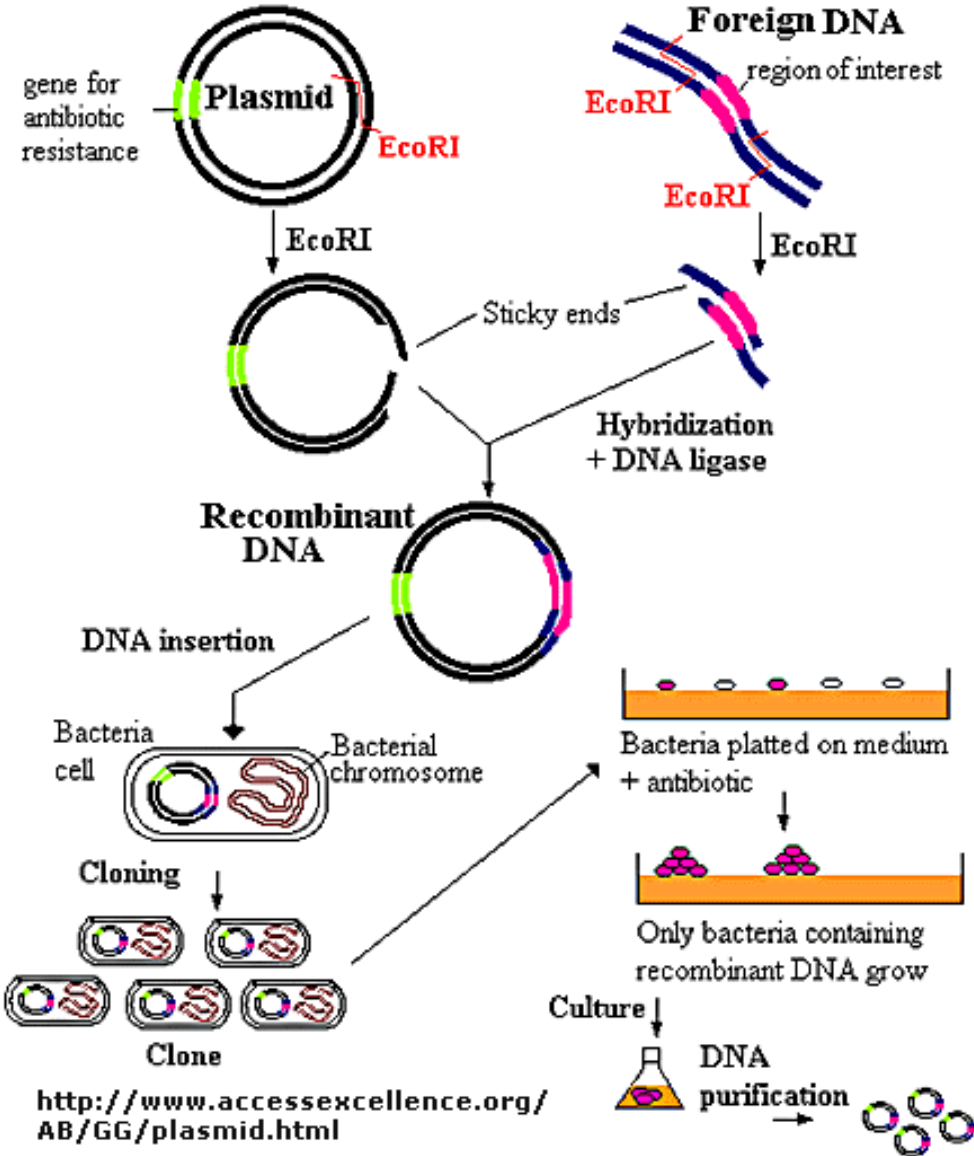
DNA Ligases



DNA Polymerases

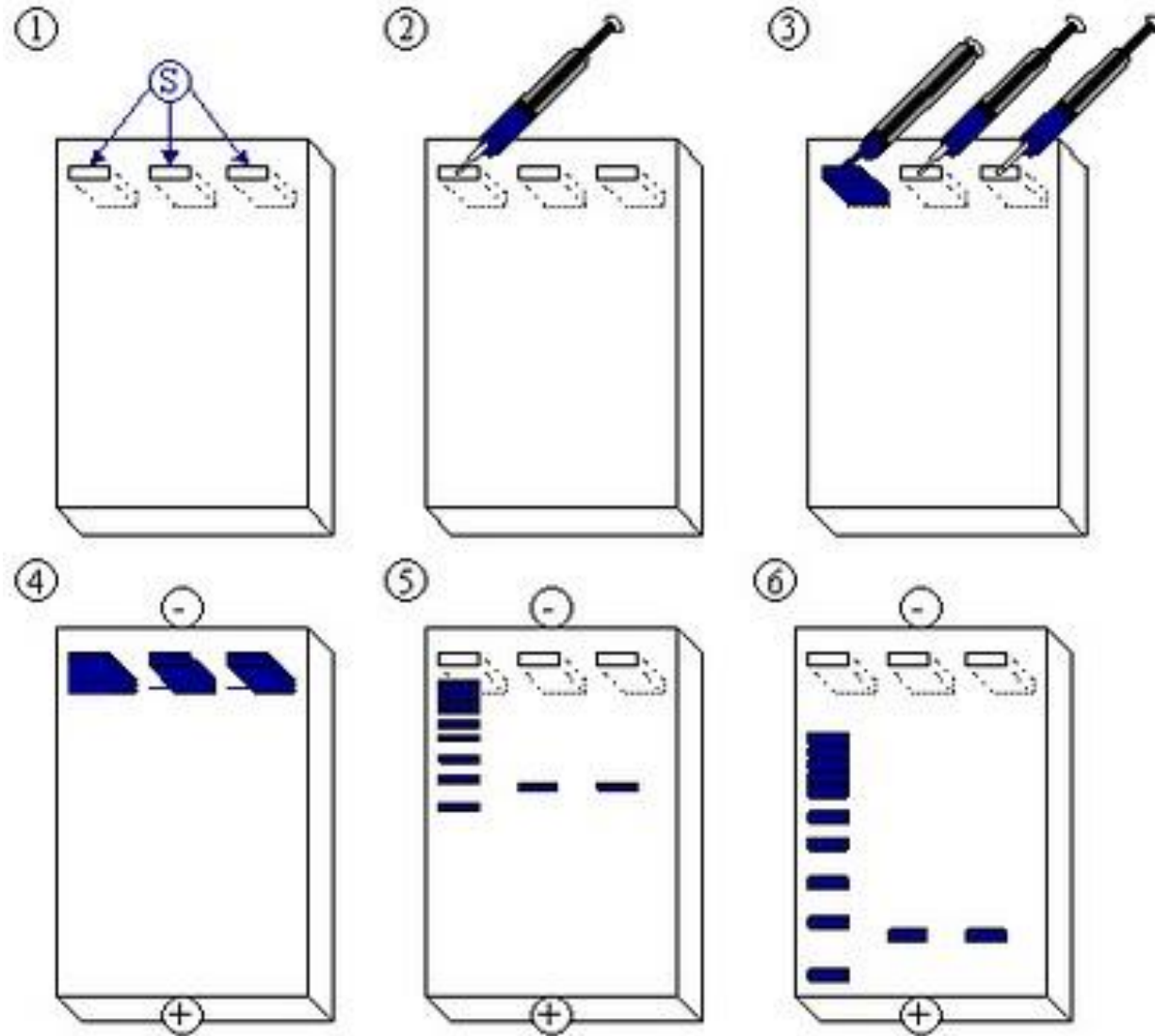


Clonagem Molecular

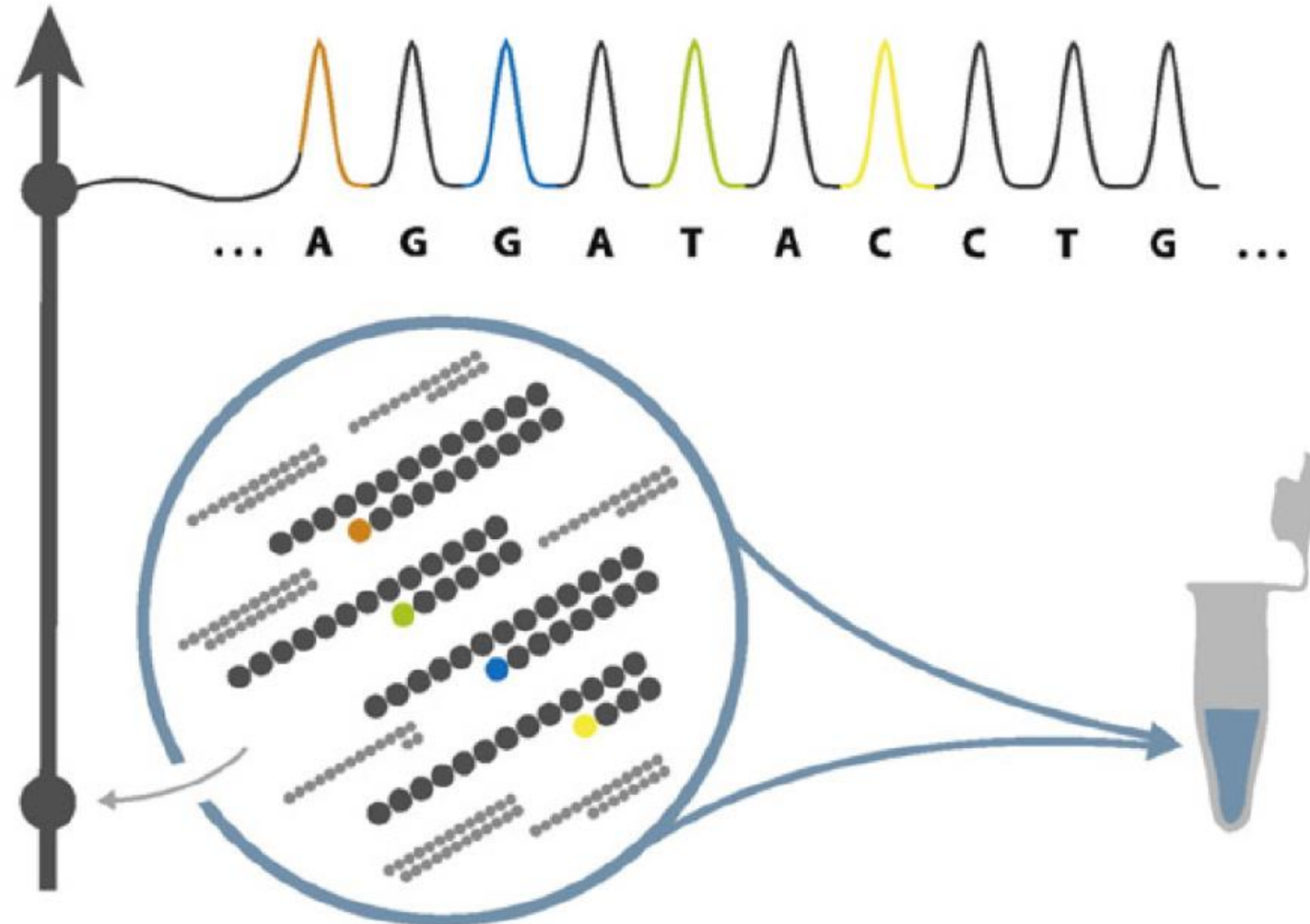


<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/plasmid.html>

Eletroforese 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**



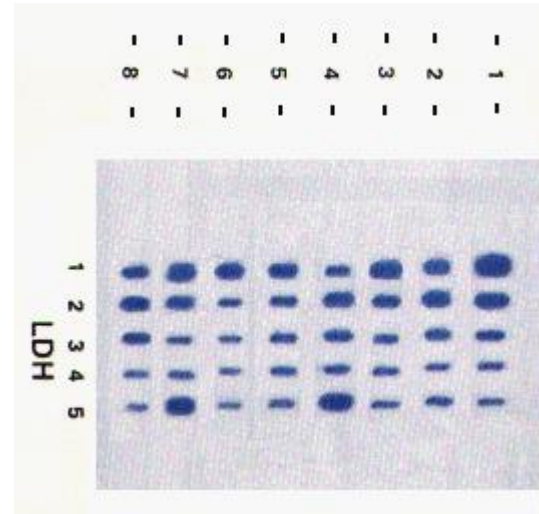
- **Polimorfismo**



Marcadores Bioquímicos

- Variabilidade observada como resultado da tradução de RNA em proteínas – ex. isoenzimas

- Monomorfismo



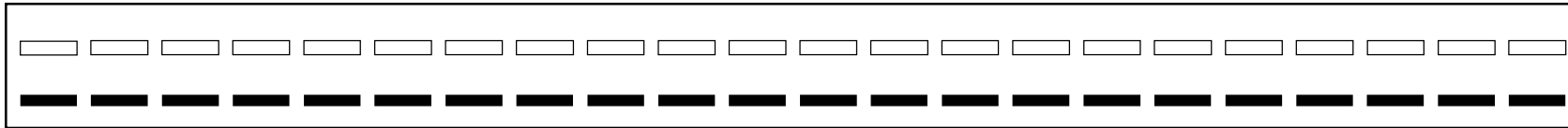
- Polimorfismo



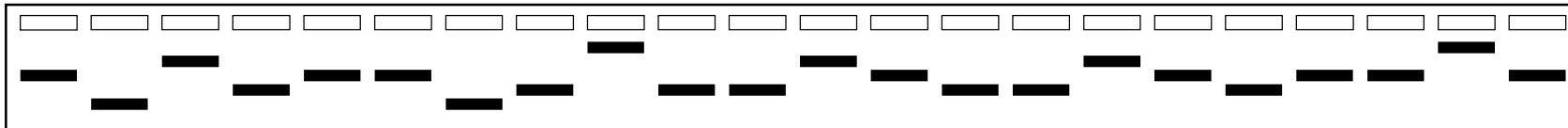
Marcadores Moleculares

- Variabilidade surge por mutação, que é a fundamento para identificação de marcadores moleculares

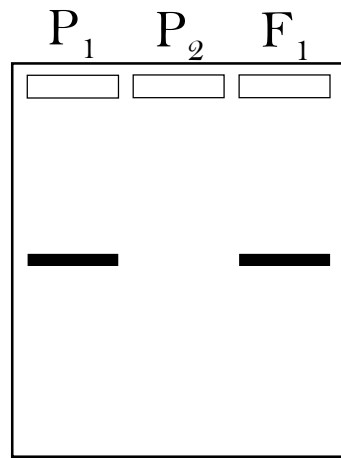
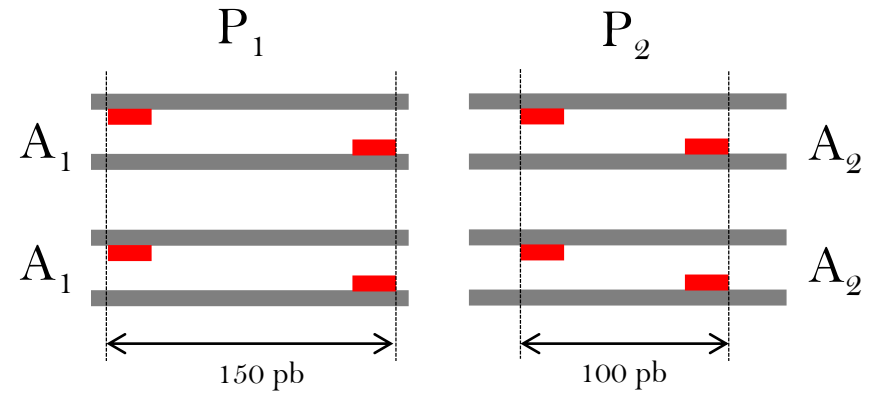
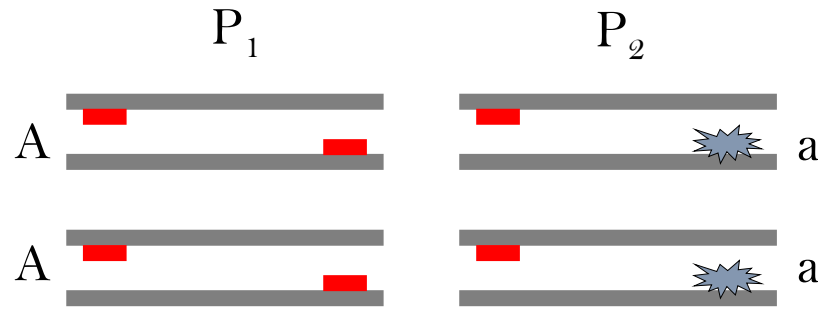
- **Monomorfismo**



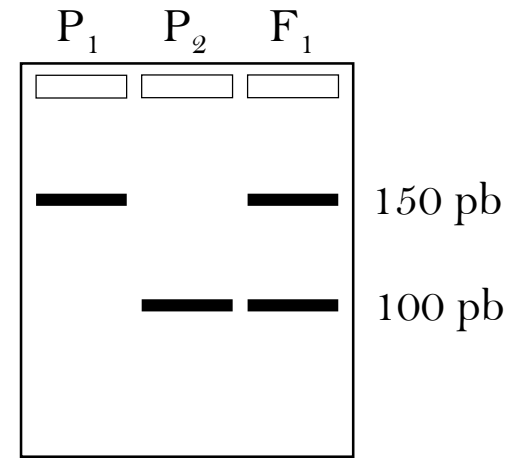
- **Polimorfismo**



Marcadores Dominantes ou Codominantes



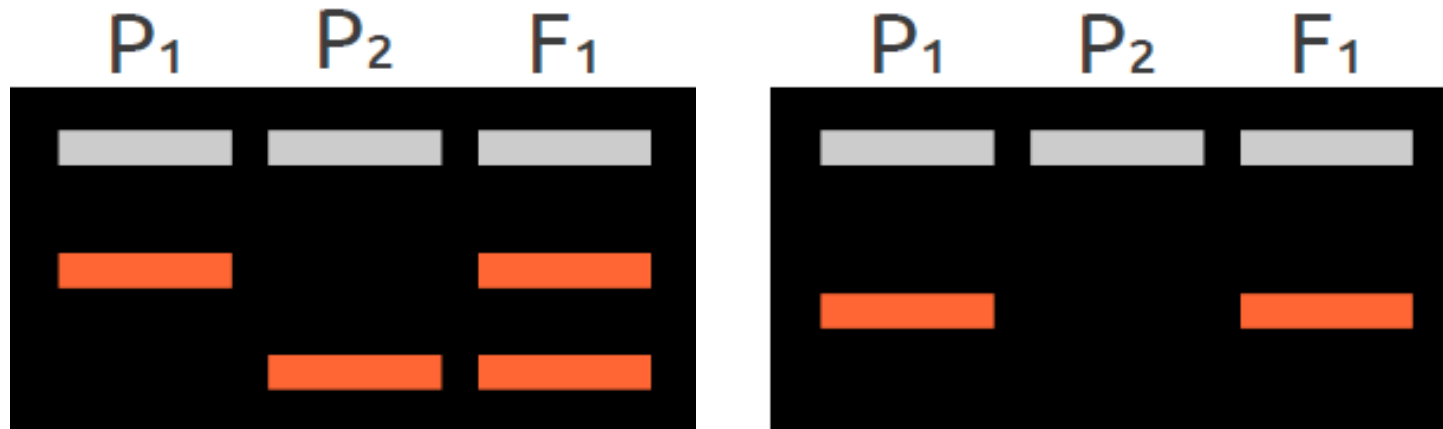
Dominante



Codominante

Marcadores Moleculares

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



Alguns Exemplos de Marcadores Moleculares

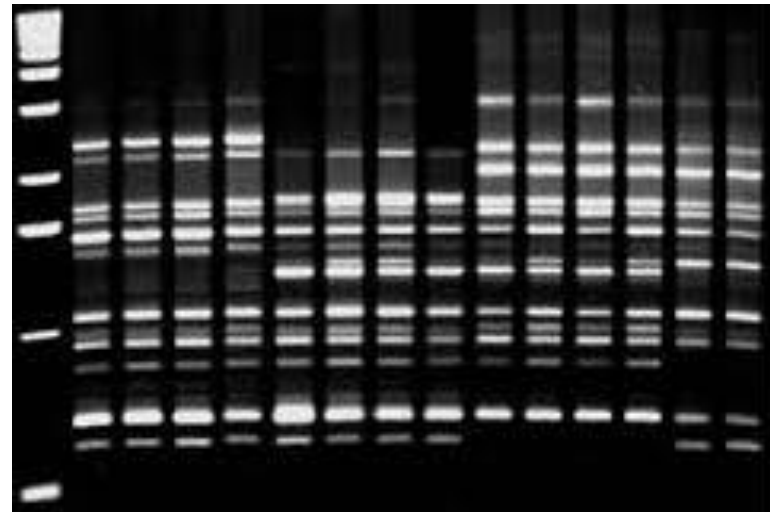
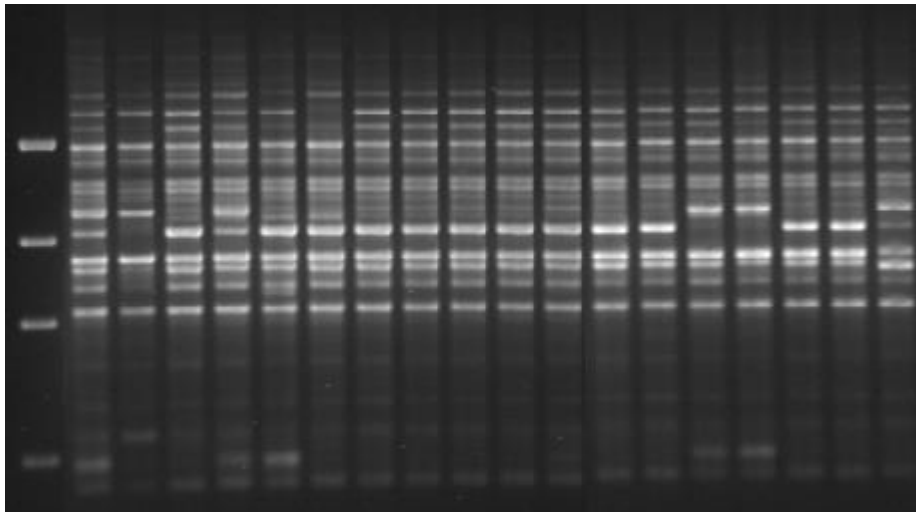
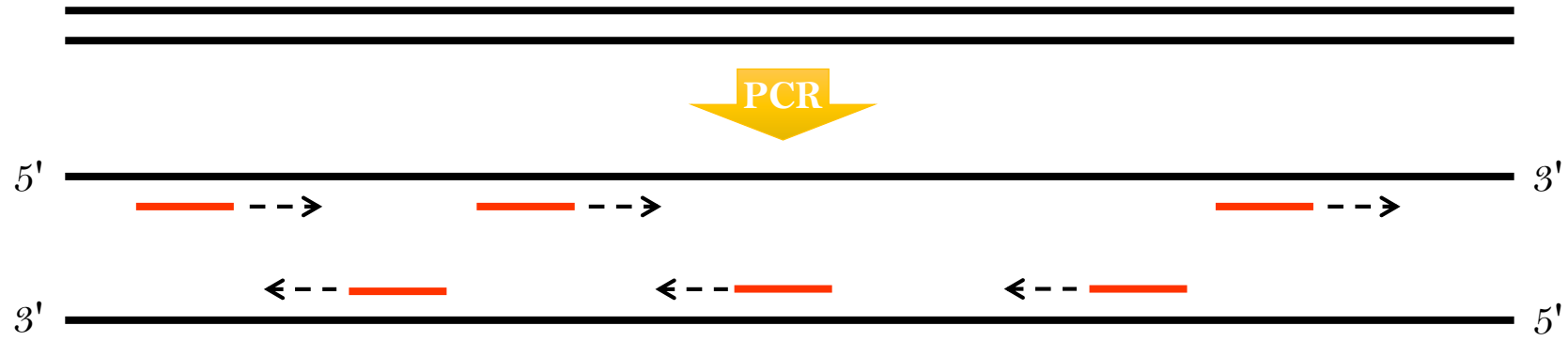
RAPD

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 (arbitrário - >50% G+C)
 - *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

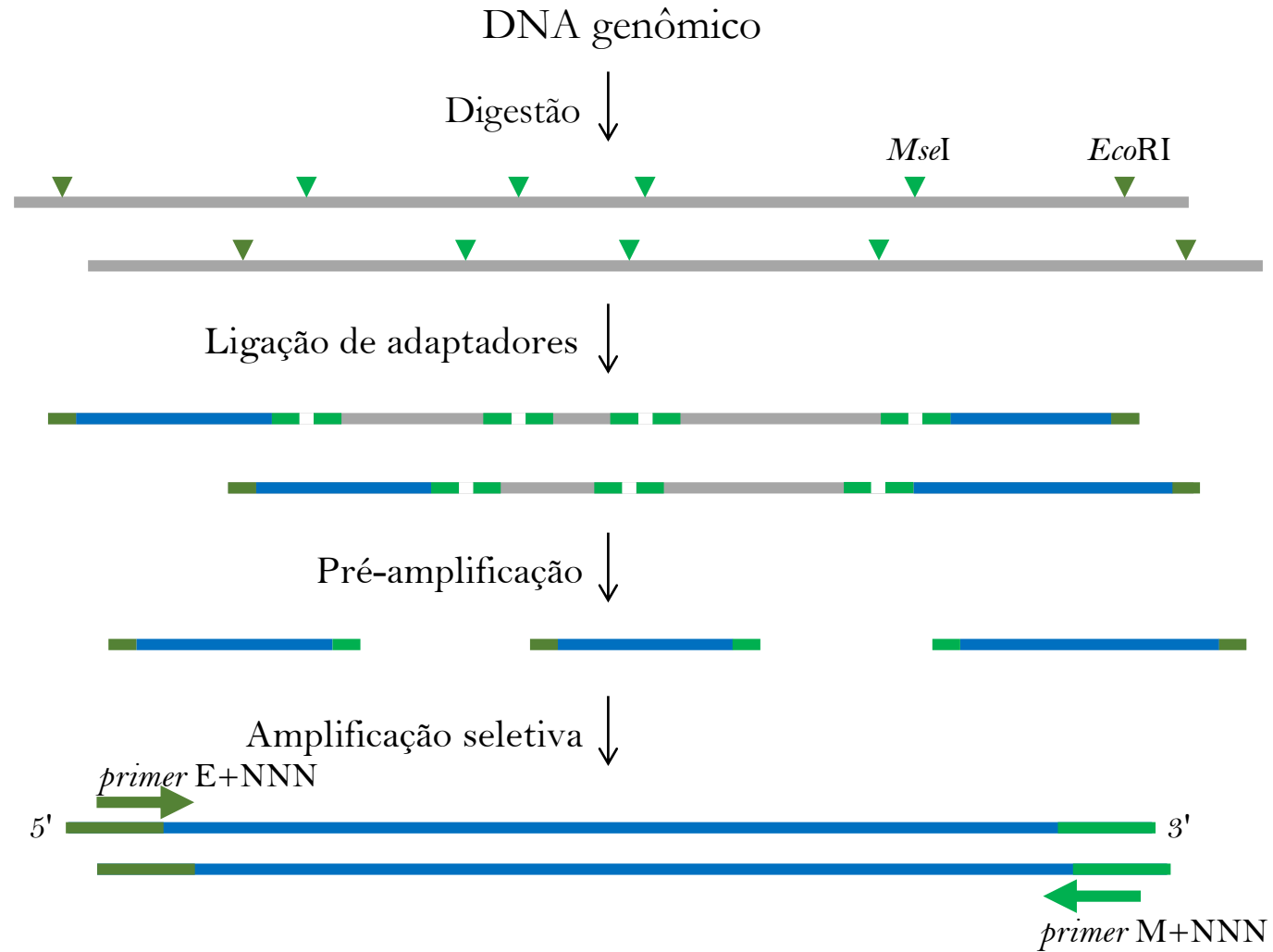
AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism

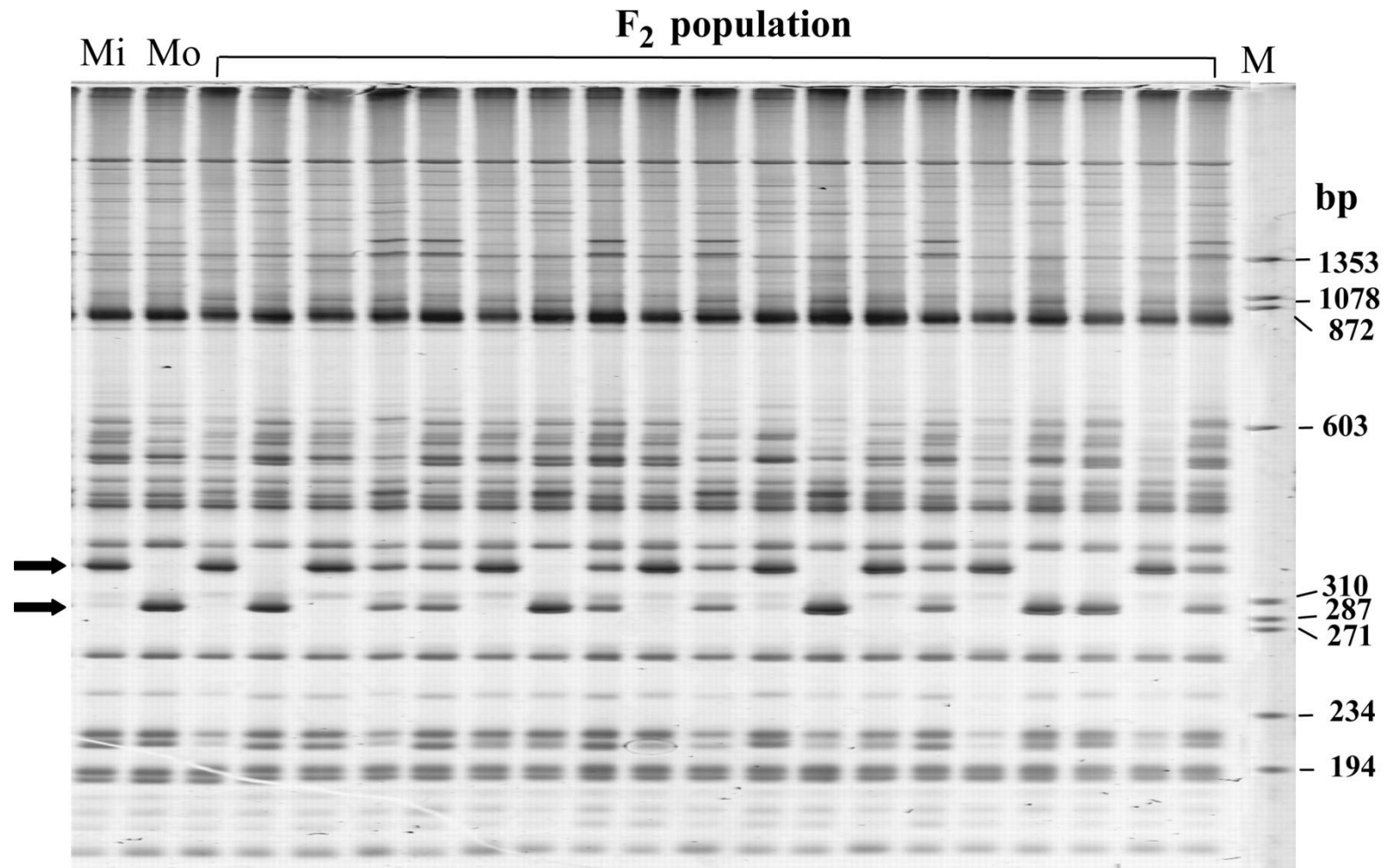
Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado

- 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



AFLP

Vantagens

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

Desvantagens

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

MICROSSATÉLITES ou SSR

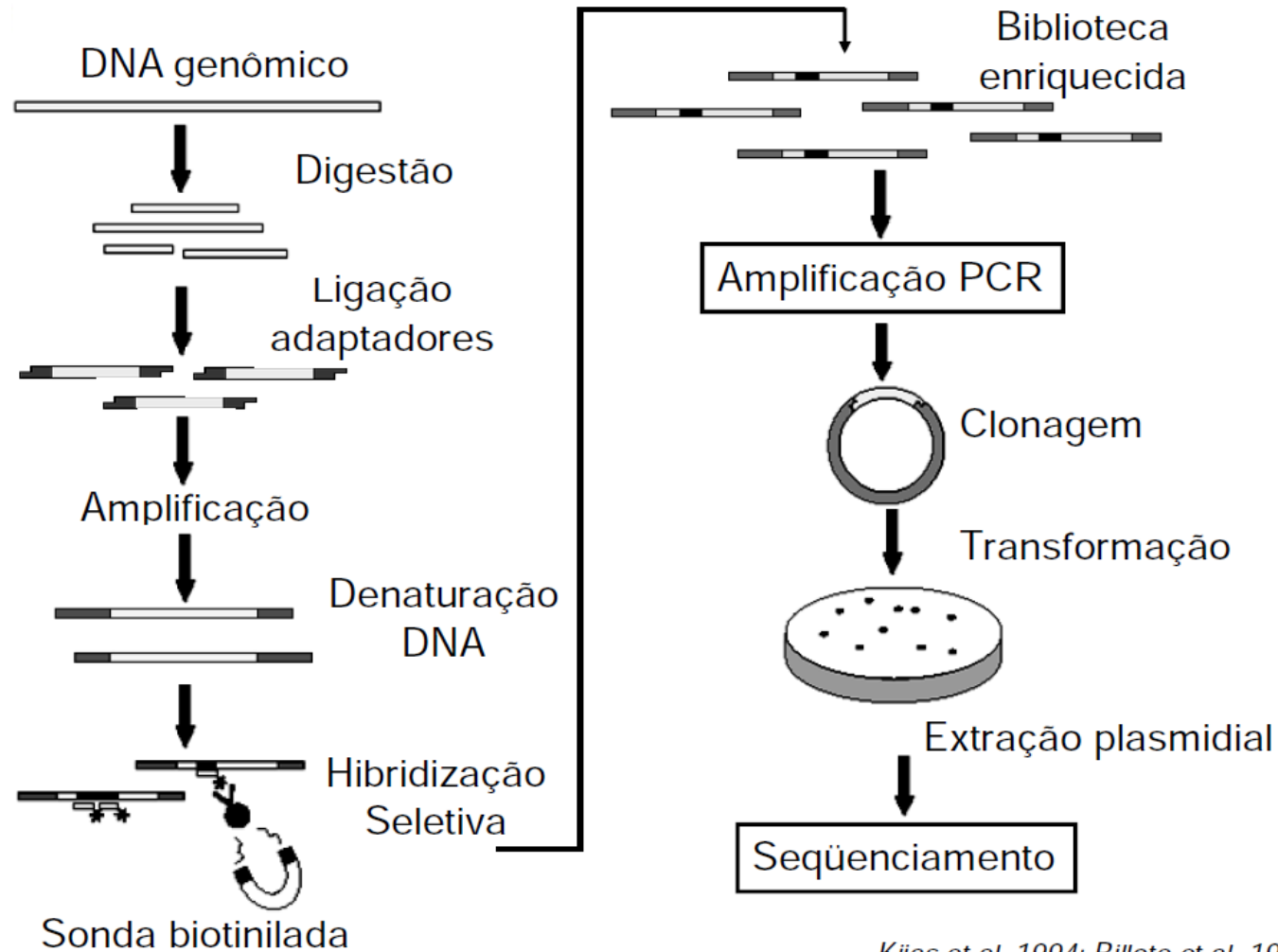
Simple Sequence Repeats = SSR

Sequências simples repetidas

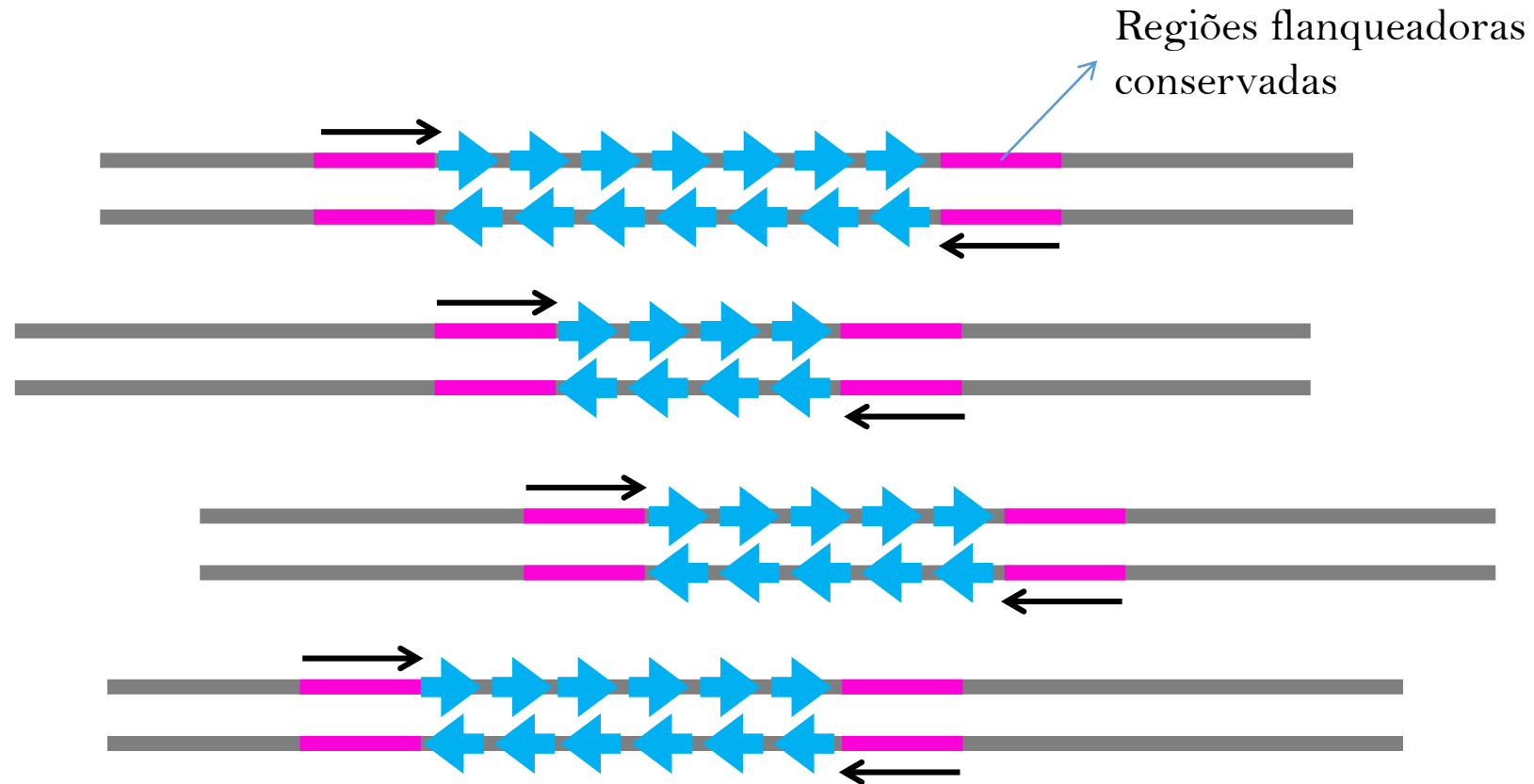
- Pequenas sequências de DNA (1 a 6 nucleotídeos) repetidos em linha (tandem)
- **Codominante**
 - Indivíduos heterozigotos são detectados
- Multialélicos e amplamente distribuído no genoma
- **Base genética:**
 - Amplificação de locos específicos de sequências repetitivas
 - Baseados em PCR com *primers*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

MICROSSATÉLITES (SSR)

Biblioteca genômica enriquecida com microssatélites



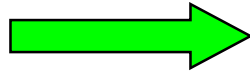
MICROSSATÉLITES (SSR)



MICROSSATÉLITES

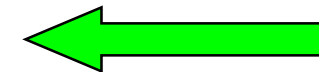
ACTTCATTAA TGTCTTAGGT GGCAGAATAC TTTGATGCAA CAATTTCAAG GGGTGCTGAC ATTAAGTTGG CTGCCAATTG
GATAATGGGT GATATTGCTG CCTATATGAA AAATGAAAAG CTTTCTATTA ATGAGATCAA ACTTATGCCA GAAGAGCTAG
TAGAGCTGAT AGCTTCCATT AAAGGTGGGA CTATCAGTGG AAAGATTGGA AAGGAGGTAA GCATTTGCTT CTTNACTGA
TGCCACTTTC ATGTTCAAAC ATTTGTTAGT AATCCTGTCT ATTTATTTTC ATGGAAGAAT TTTACTAGCT ATTATTCTCC
ACTGTGTAGA TGTGATTTA TAGTTTGTG GATATATAA TTATTGTTTCG TGTTTTTTTT TTTAATCCAA ACTTTATAAT
CTTTCCAAGT GCTTTTCTCC TCCCTGTCTT TTTCTCTAC CACACACACA CACACACACA CACATCATA CAGAAAAAGG
AAAAAGGAAA GAAAGAGAAC AGGAGATATA AAAACCTTTT TTCTTTATCA ATTAGATAAT TAGTTATAAA AGTTTTTCTC
CTGCTTCTTA TCCCTCCGCT AAATGCCTGA TTAACTTTCT GCTGGTAAAG ATTTAAAATA ACTTGTTAAT TTTGGACATG

Primer FOR



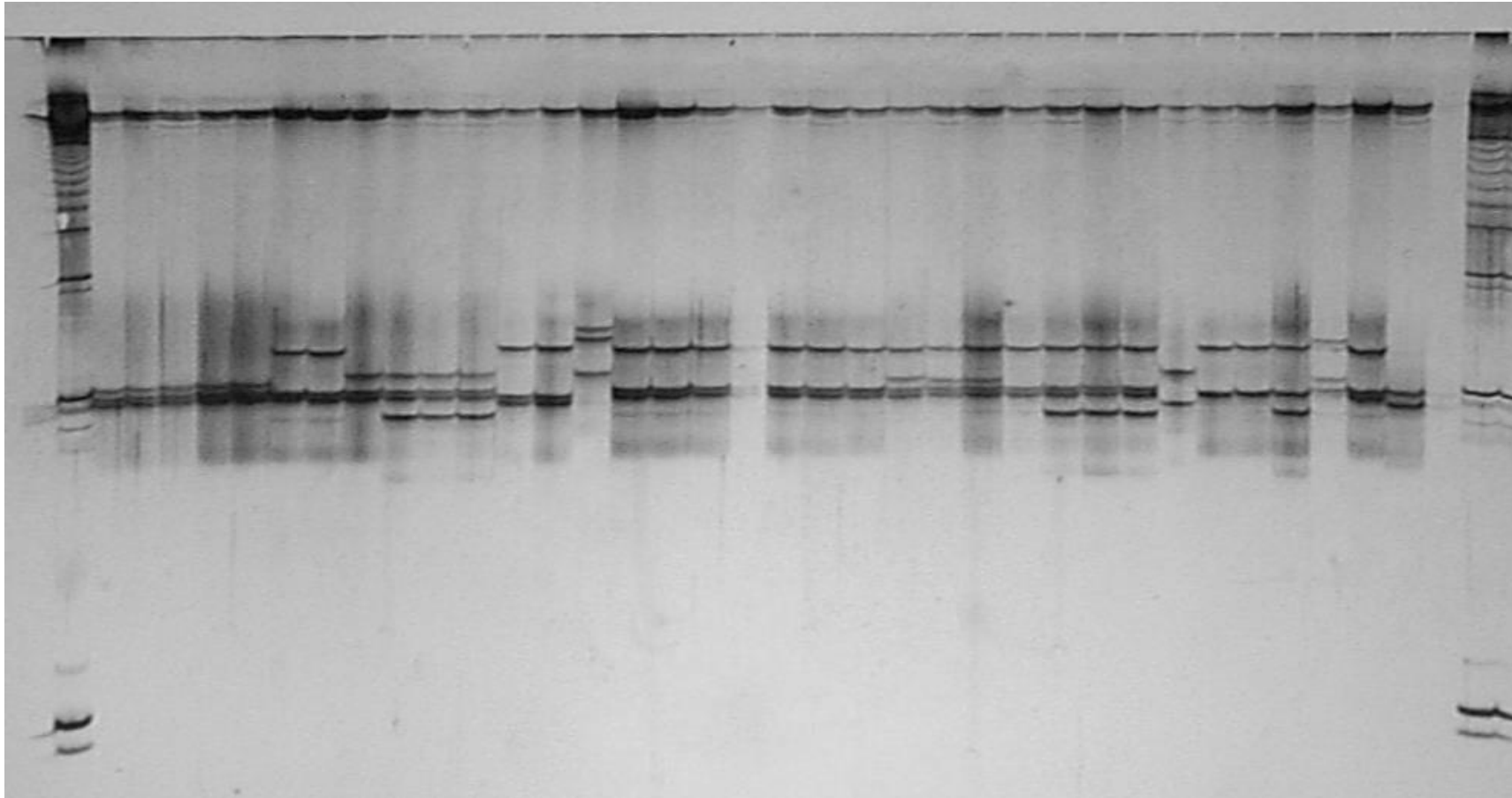
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CACACACACACACACACACAC NNNNNNNNNN NNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN GTGTGTGTGTGTGTGTGTG NNNNNNNNNNNNNNNNNNN

Repetição CA/GT

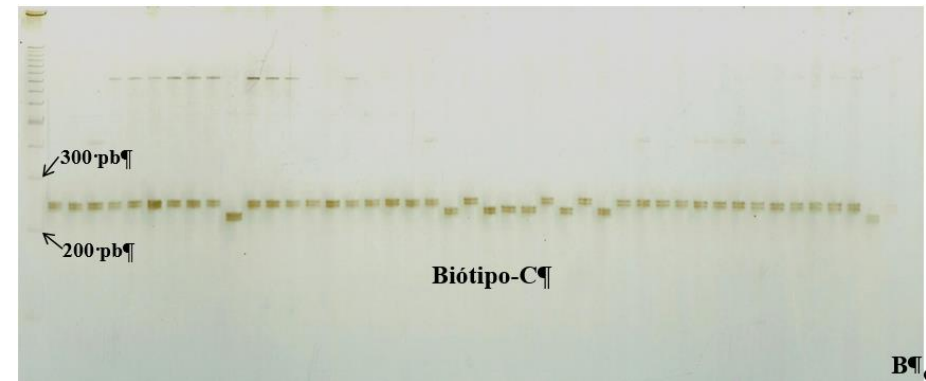
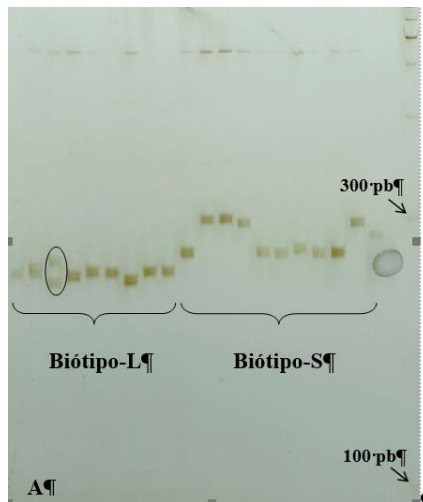
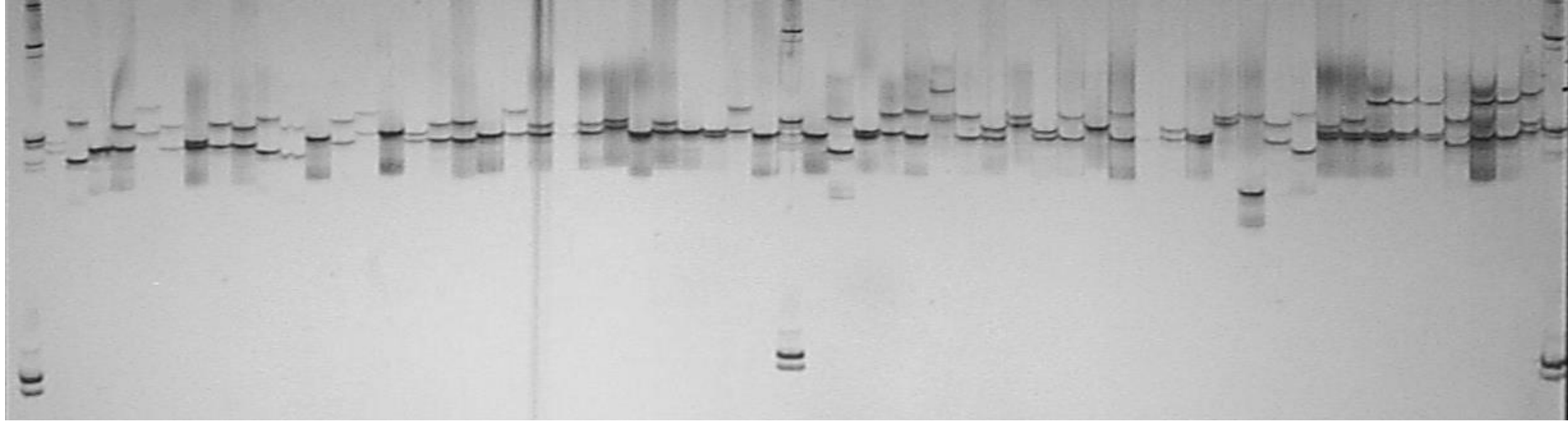


Primer REV

MICROSSATÉLITES



MICROSSATÉLITES



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

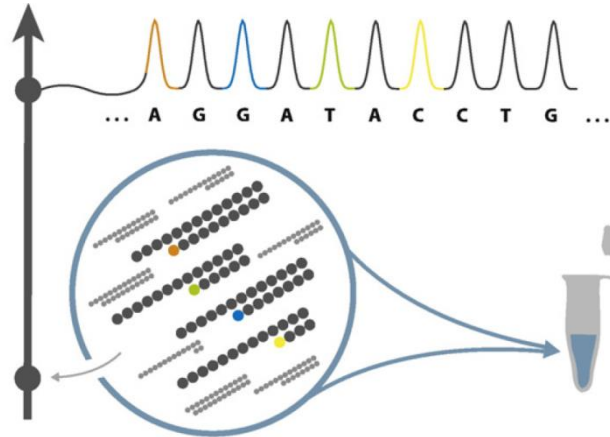
SNP

Single Nucleotide Polymorphism Polimorfismo de base única

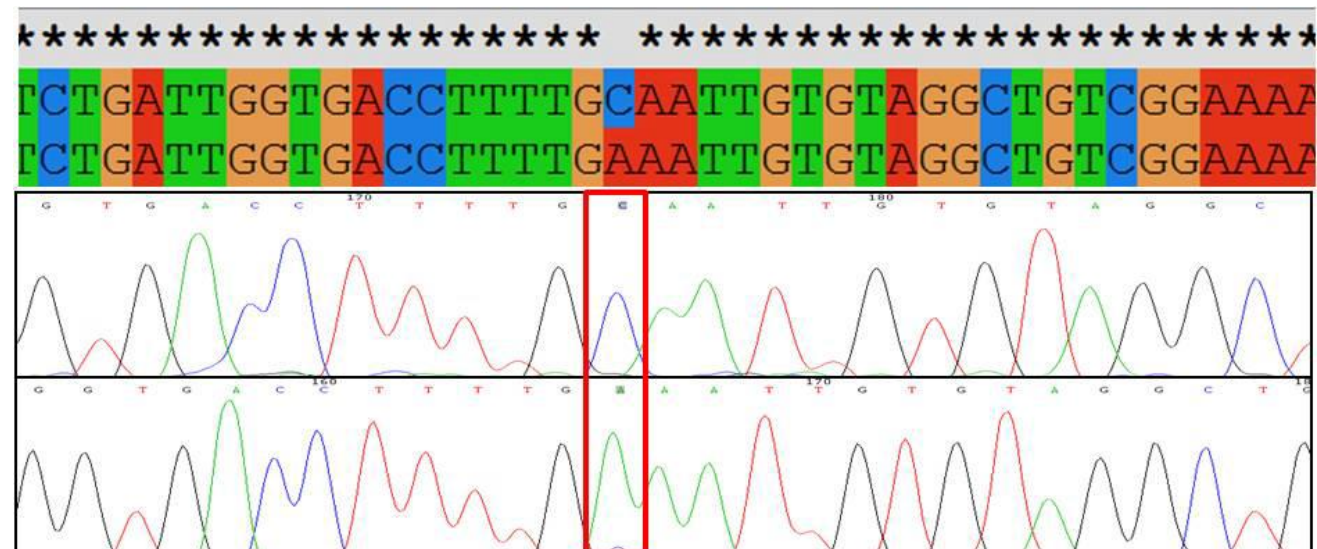
- Polimorfismo resultante da alteração de uma única base
- Abundantes no genoma
- **Codominante e bialélico**
- Há diversas maneiras de se avaliar a variação:
 - Alinhamento e comparação de sequências
 - Métodos baseados em géis
 - Métodos baseados em chips
 - Sequenciamento de 2ª geração, etc.

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 <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

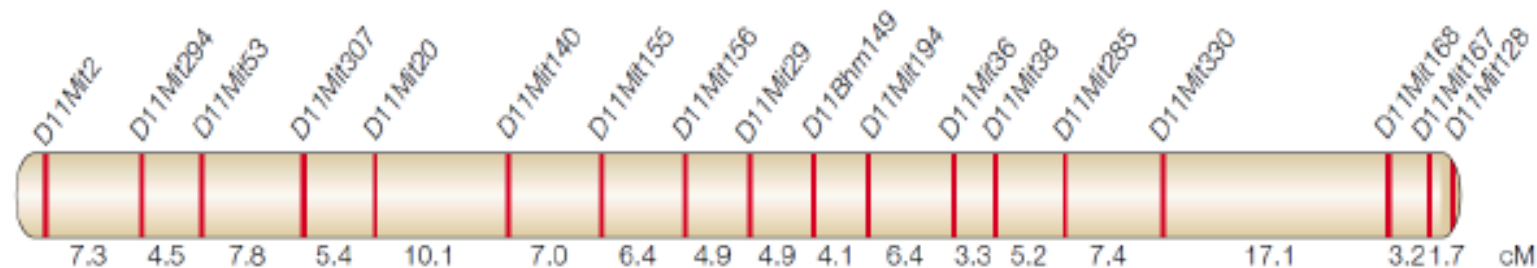
Uso dos Marcadores no Melhoramento de Plantas

Construção de Mapas Genéticos

Mapa genético: representação de ordem e distância entre marcadores genéticos equivalente ao cromossomo

Ligação genética

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

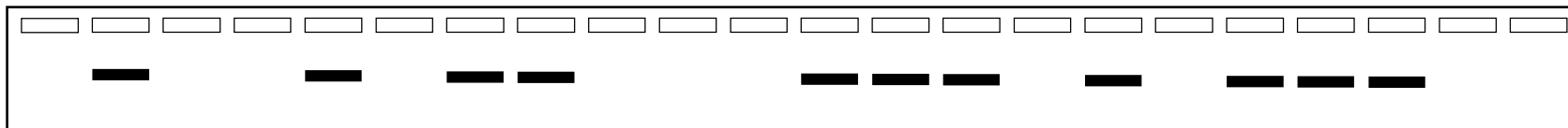
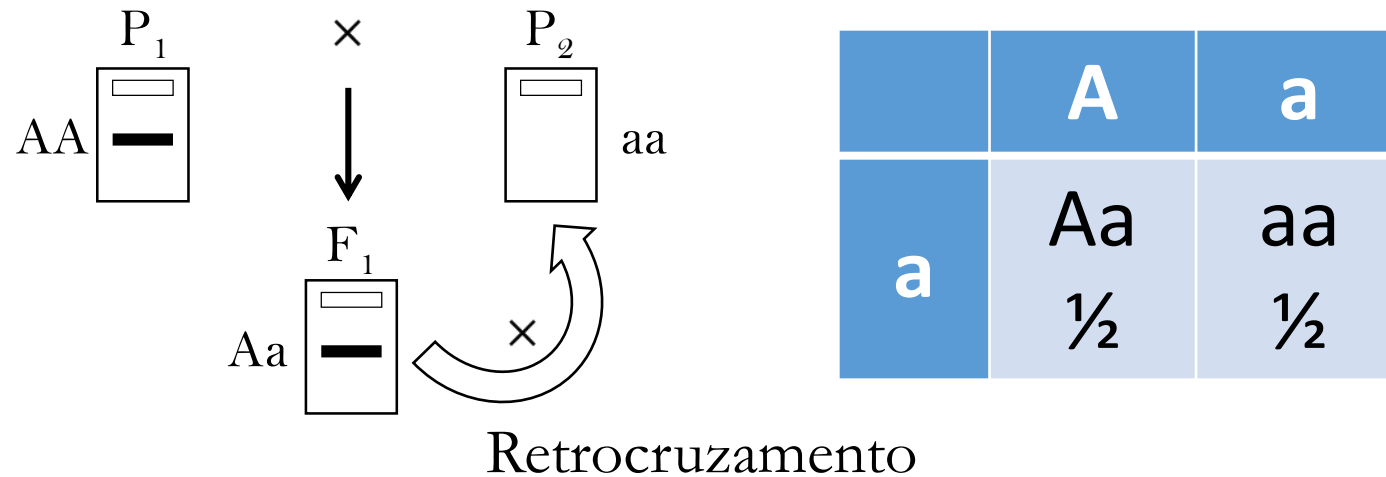


Mus musculus L.

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

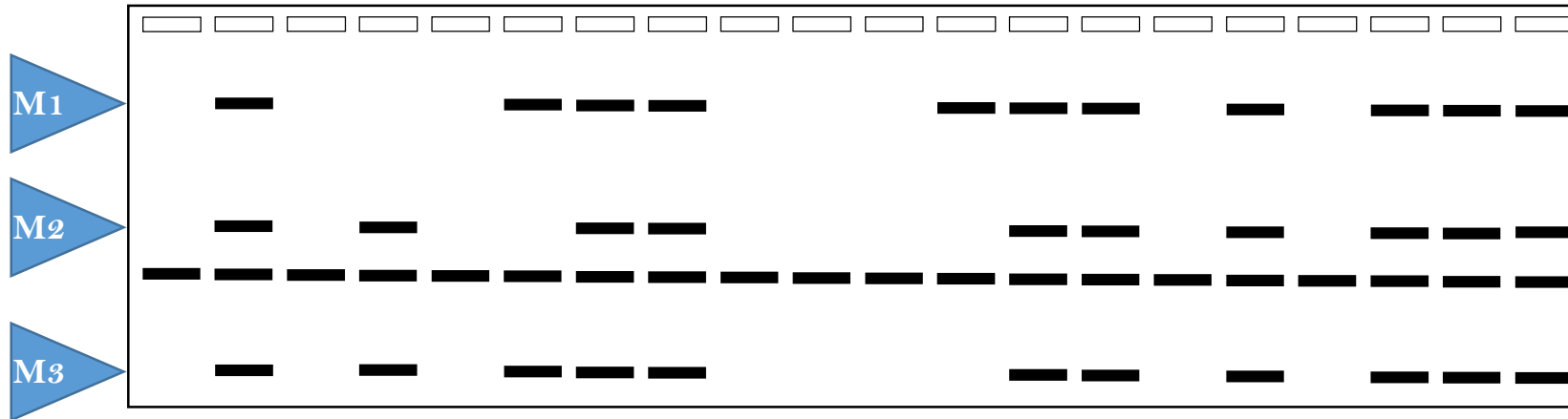
Construção de Mapas Genéticos

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



Construção de Mapas Genéticos

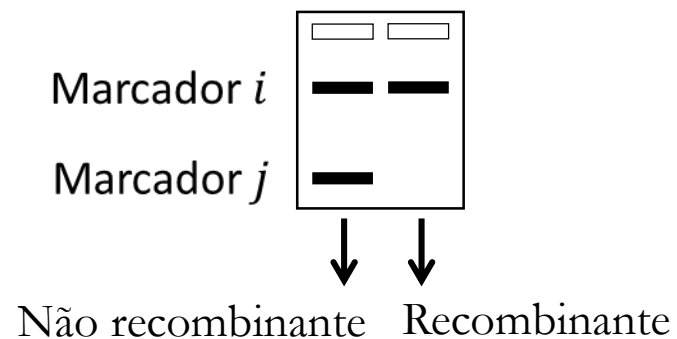
População de retrocruzamento genotipada com três locos AFLP



- Cálculo da fração de recombinação:

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

Comparando dois locos polimórficos



Construção de Mapas Genéticos

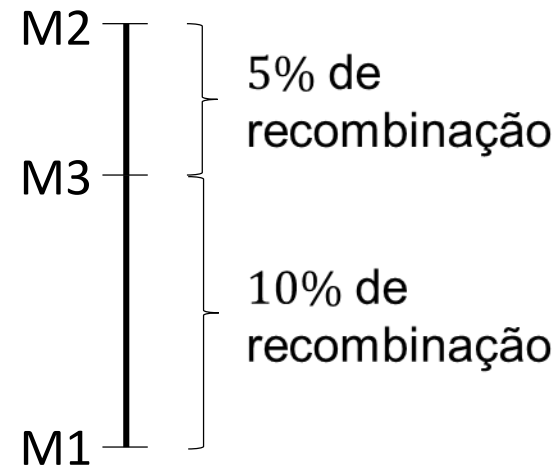
Leitura do gel

	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

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

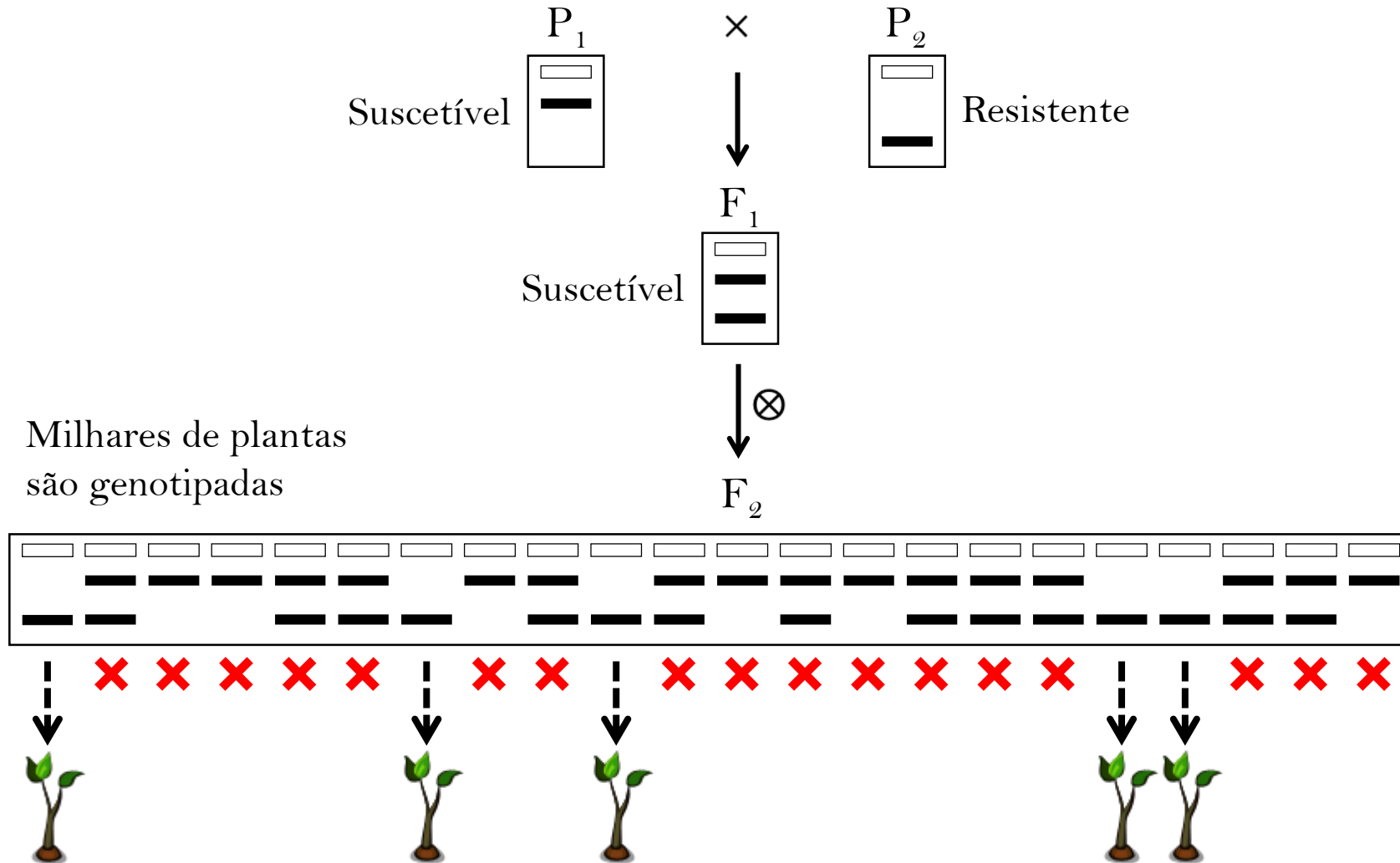
$$r_{1,3} = \frac{2}{20} = 0,10$$

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



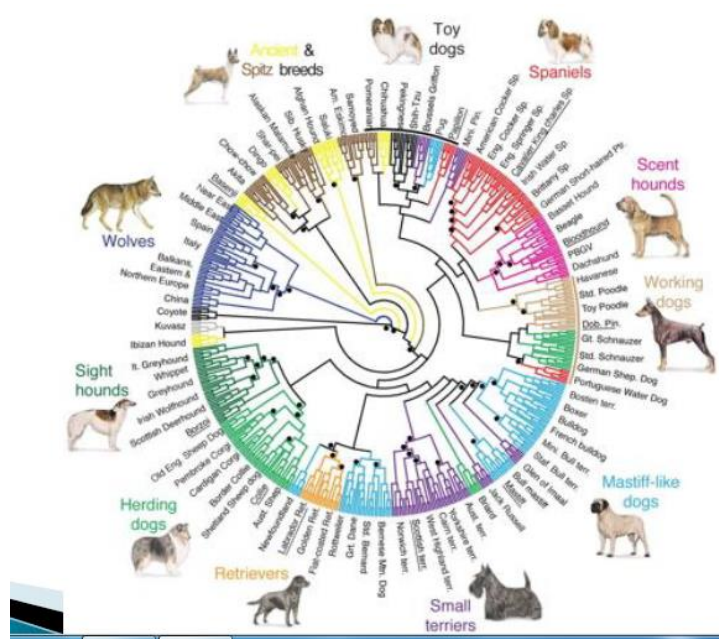
Mapa genético

Seleção Assistida por Marcadores

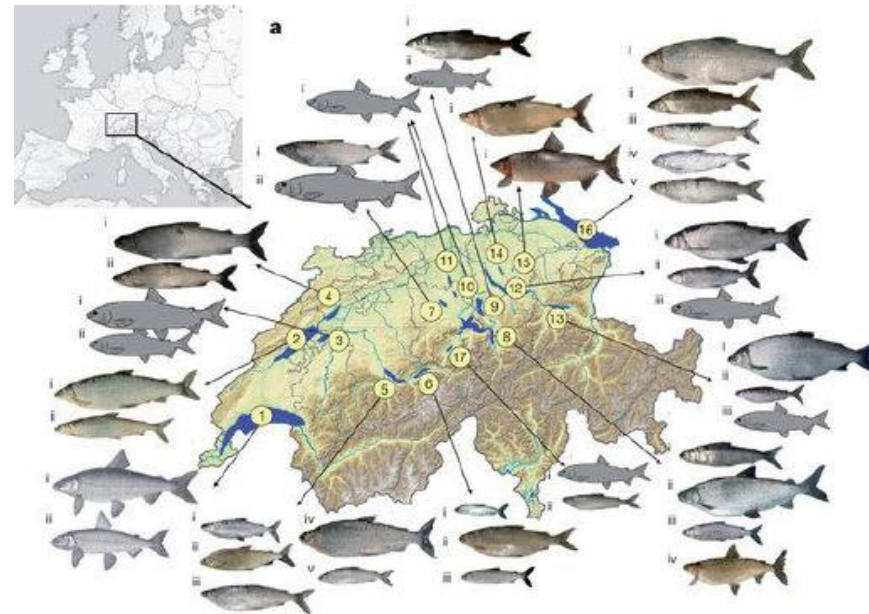


A seleção fenotípica é baseada em marcadores de DNA

Uso de Marcadores em Estudos de Diversidade e Conservação



Filogenia



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

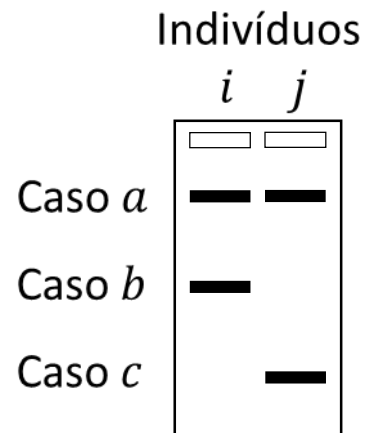
Marcadores Dominantes

- Cálculo de similaridade genética: coeficiente de Jaccard

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

Em que:

- a = nº de locos com alelos presentes nos indivíduos i e j
- b = nº de locos com alelos presentes em i e ausentes em j
- c = nº de locos com alelos ausentes em i e presentes em j



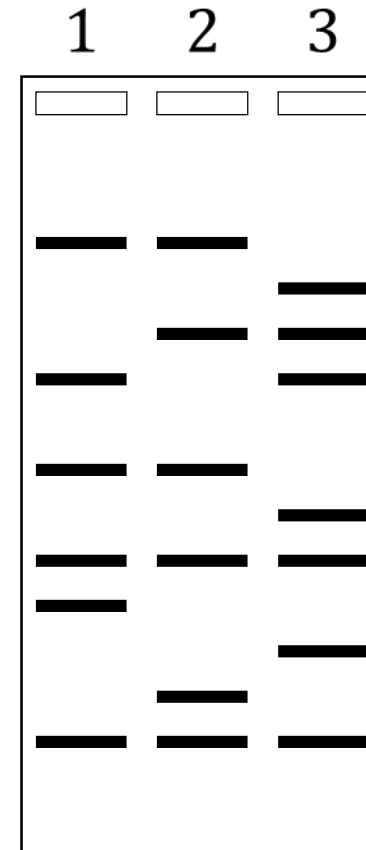
Marcadores Dominantes

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

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

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

- 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?

