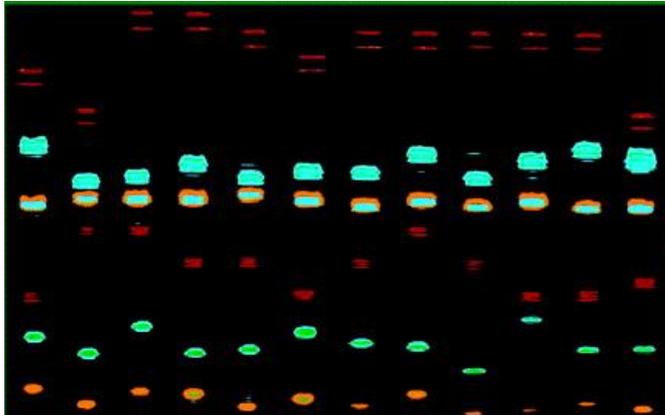


# MARCADORES MOLECULARES: DO MELHORAMENTO A CONSERVAÇÃO

## Aula 10

LGN232 – Genética Molecular



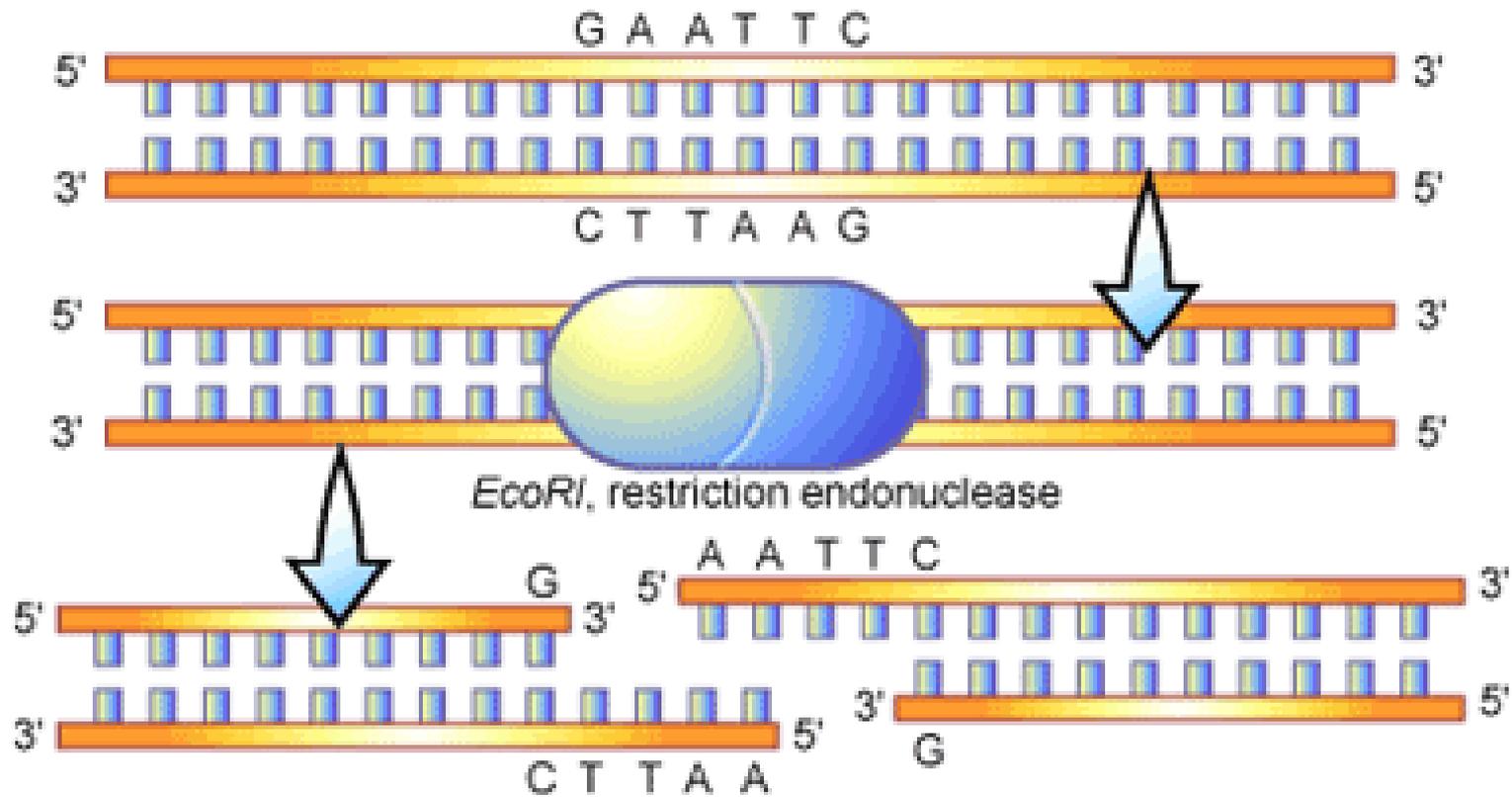
Maria Carolina Quecine  
Departamento de Genética  
mquecine@usp.br

# RELEMBRANDO....

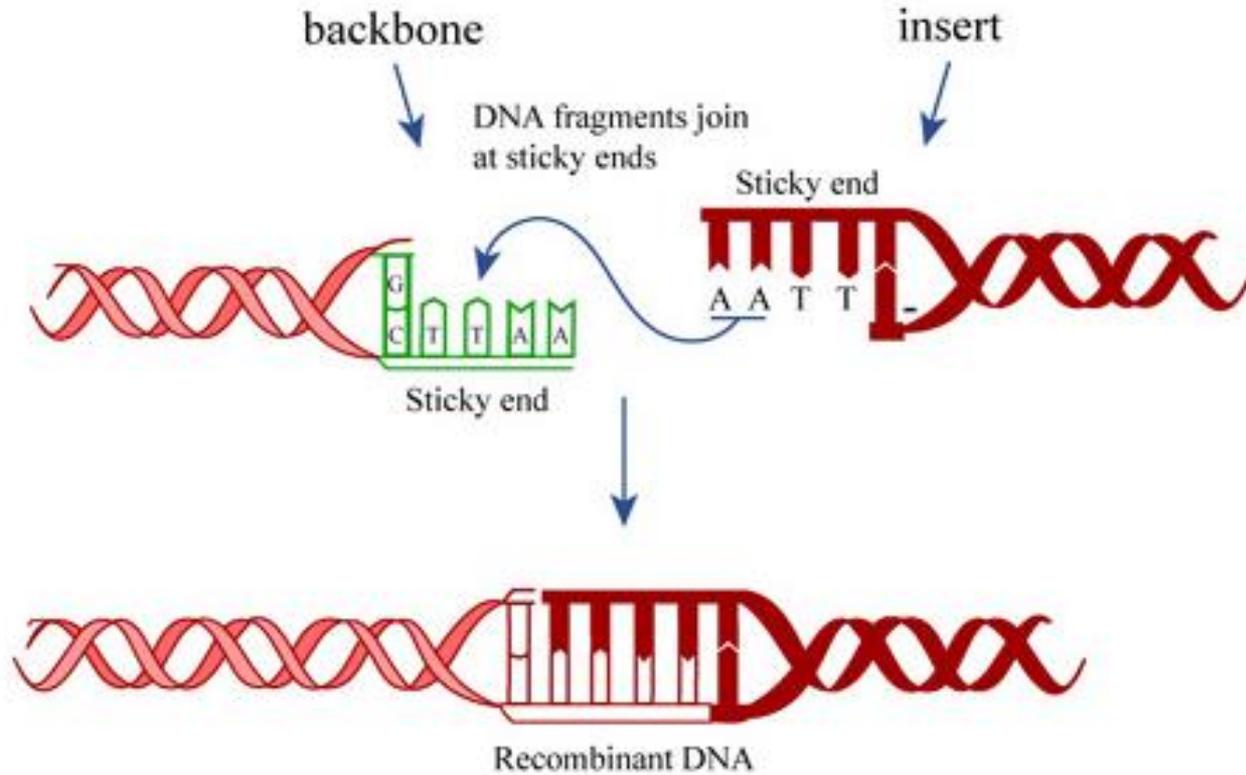


kit de genética molecular

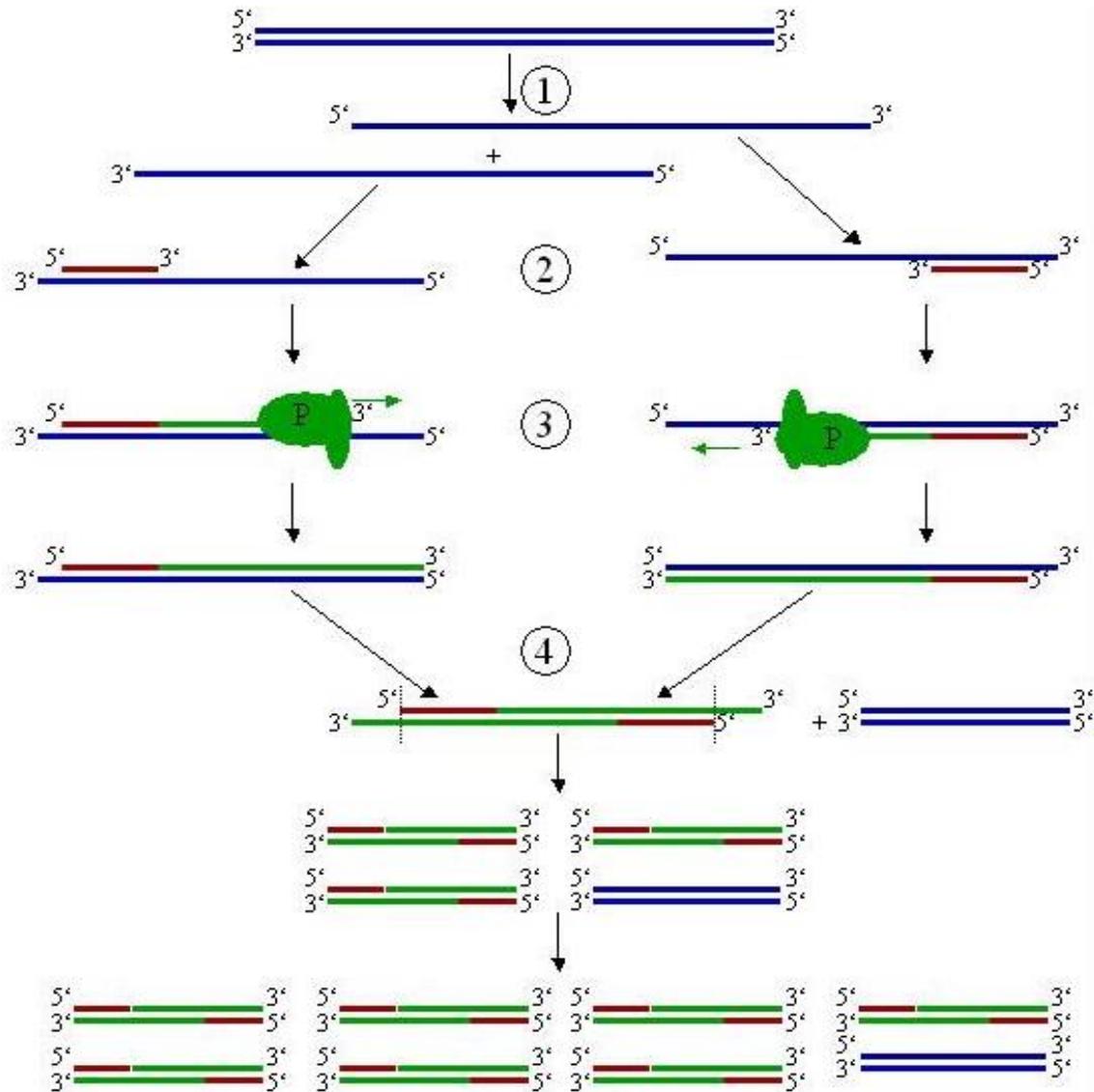
# ENZIMAS DE RESTRIÇÃO



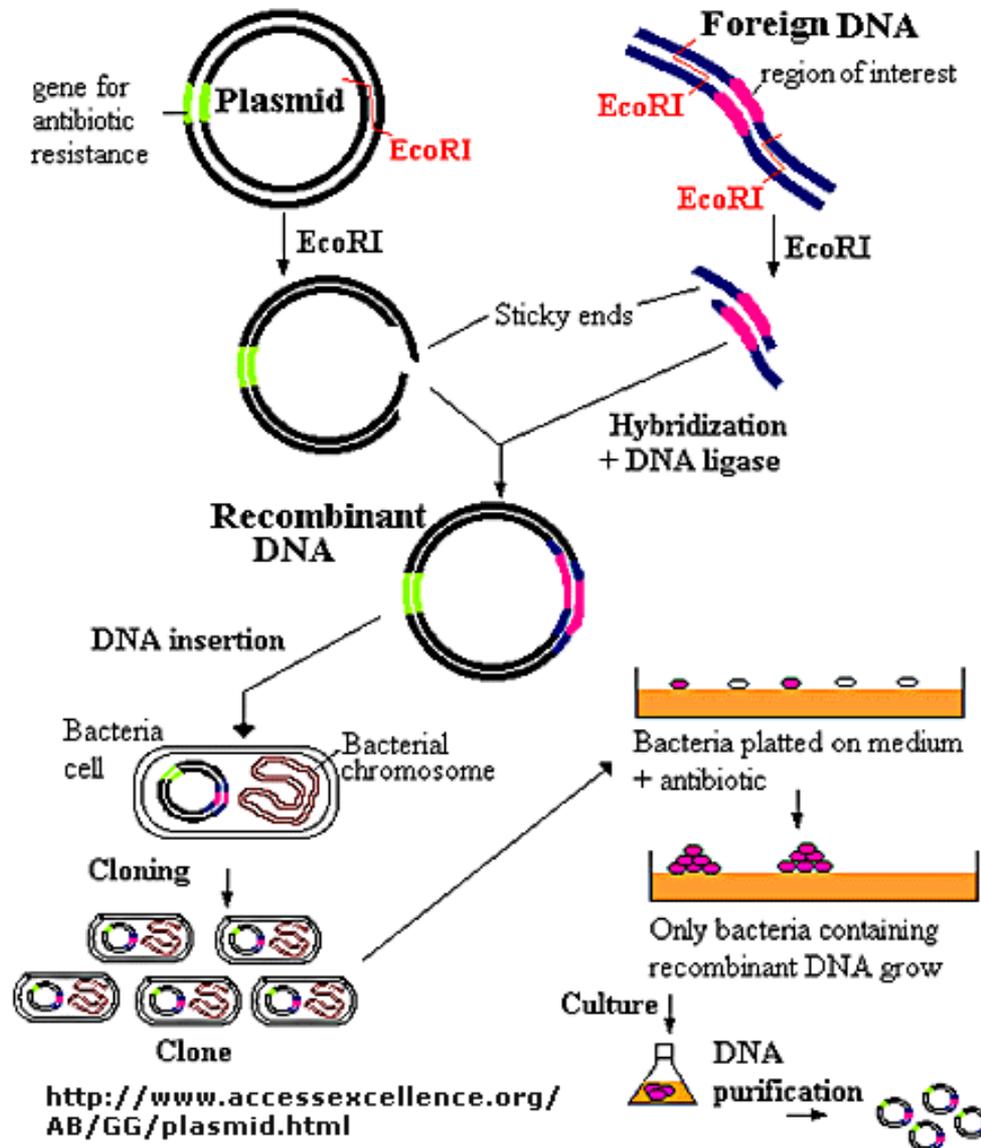
# DNA LIGASES



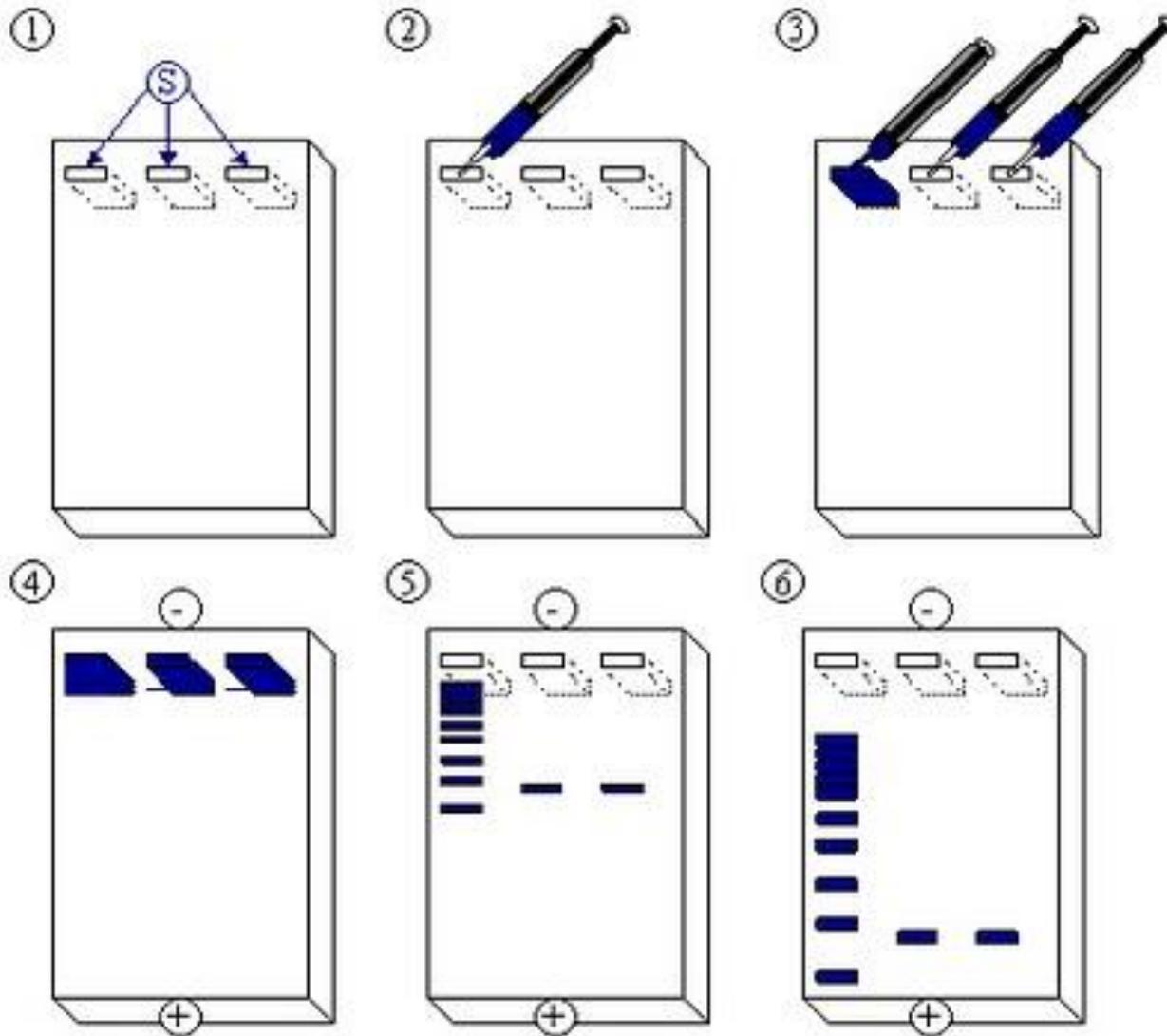
# DNA POLIMERASES



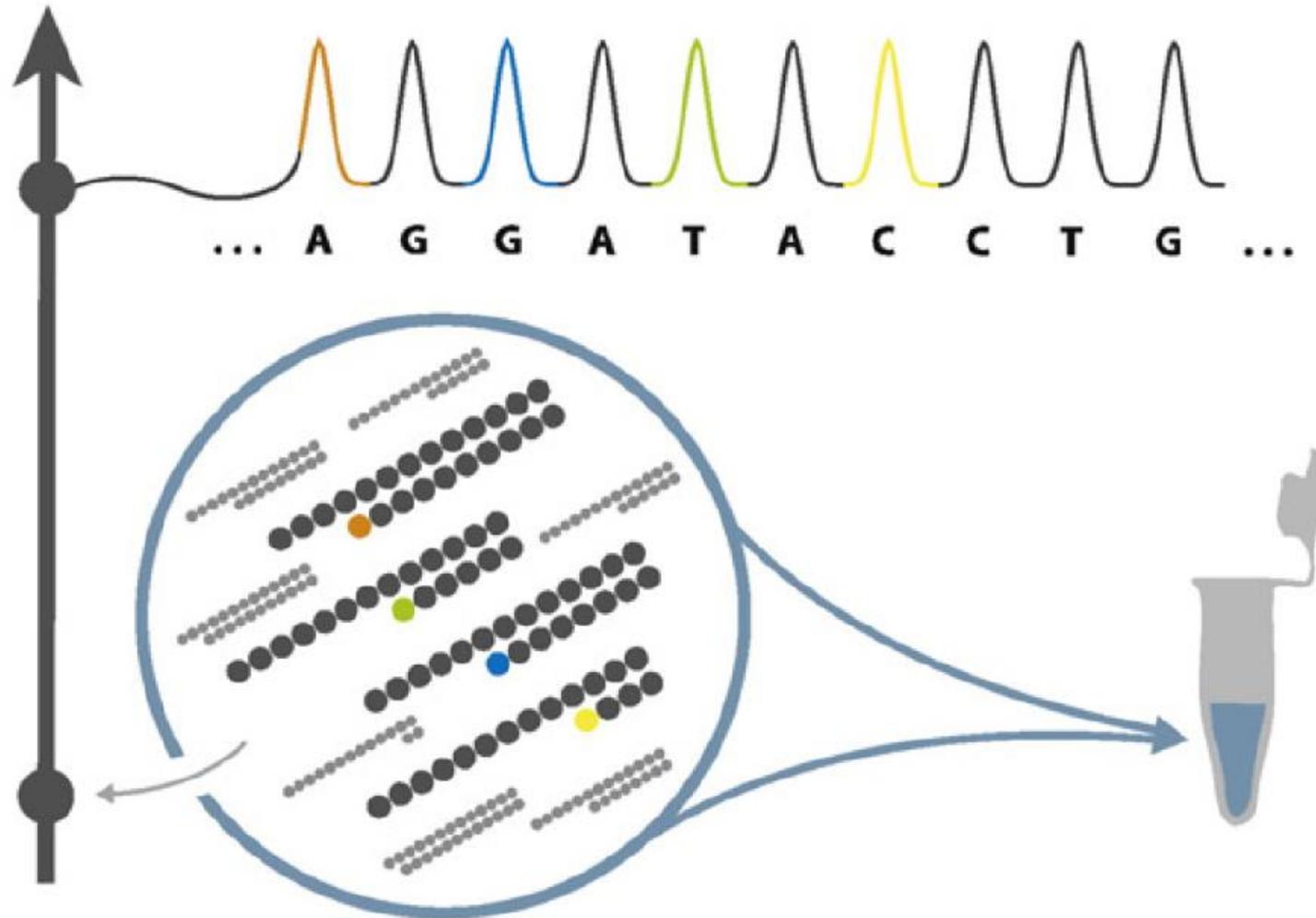
# CLONAGEM MOLECULAR



# 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



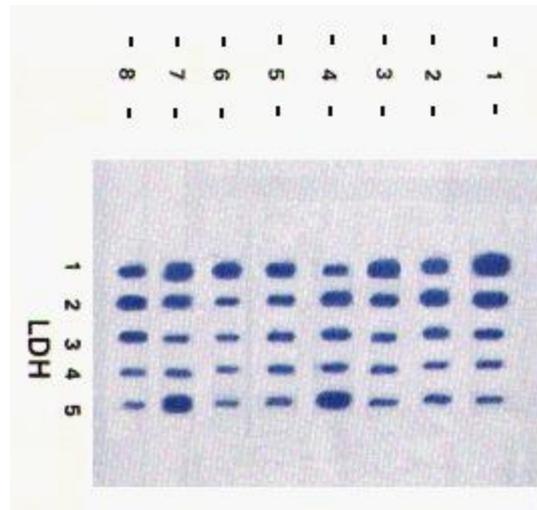
- Polimorfismo



# MARCADORES BIOQUÍMICOS

- Variabilidade observada como resultado da tradução de RNA em proteínas

- Monomorfismo

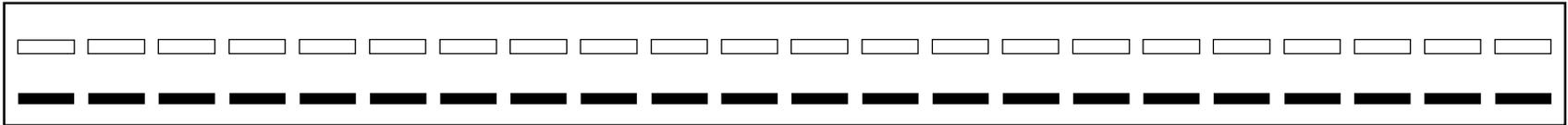


- Polimorfismo

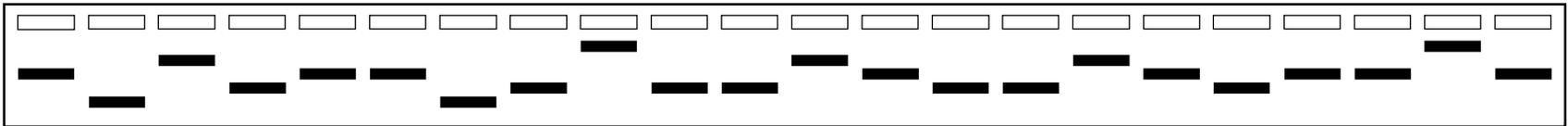


# MARCADORES MOLECULARES

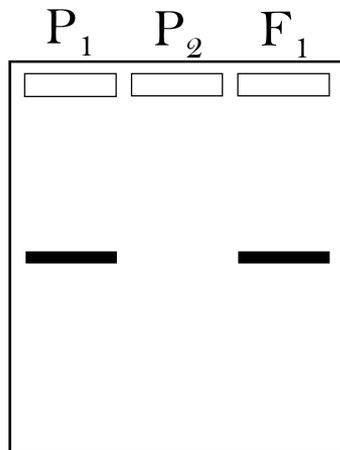
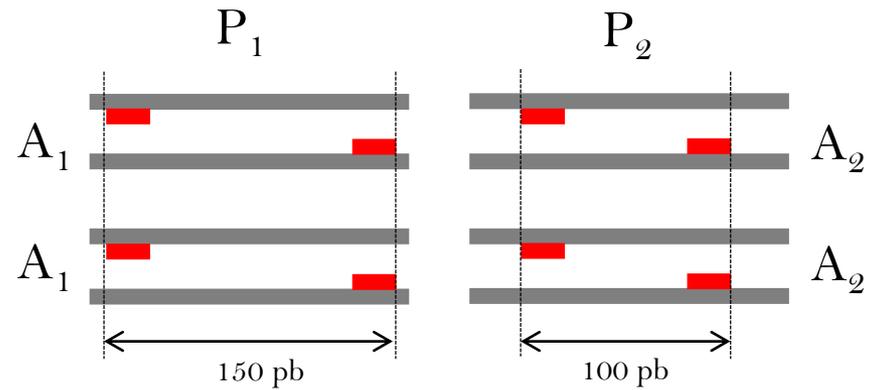
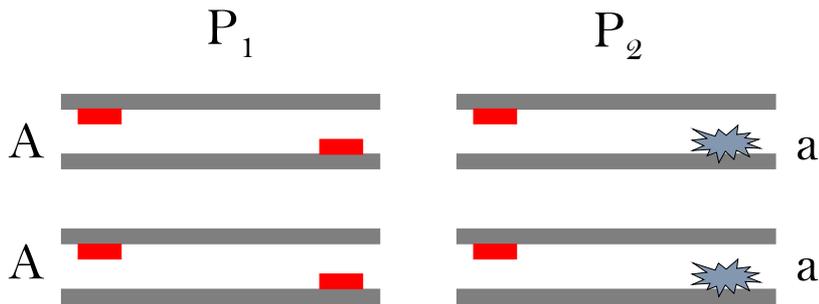
- Variabilidade surge por mutação, que é a base para identificação de marcadores
- Monomorfismo



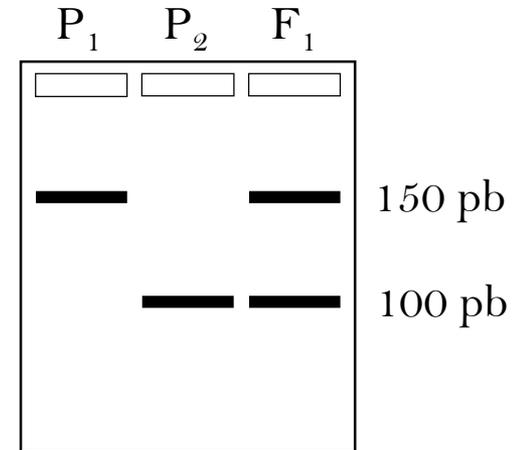
- Polimorfismo



# MARCADORES DOMINANTES E CODOMINANTES?



Dominante

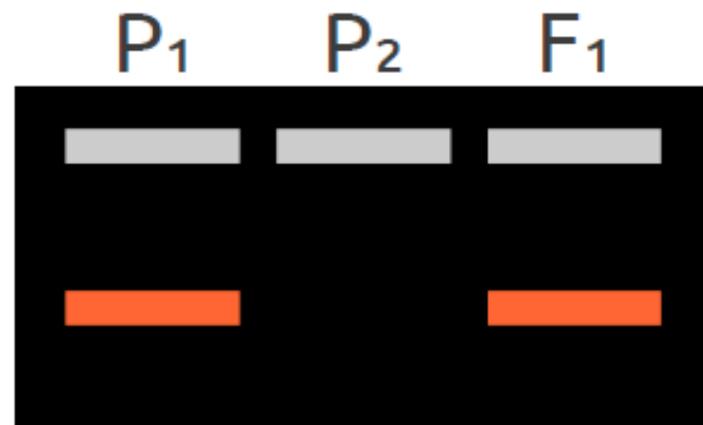
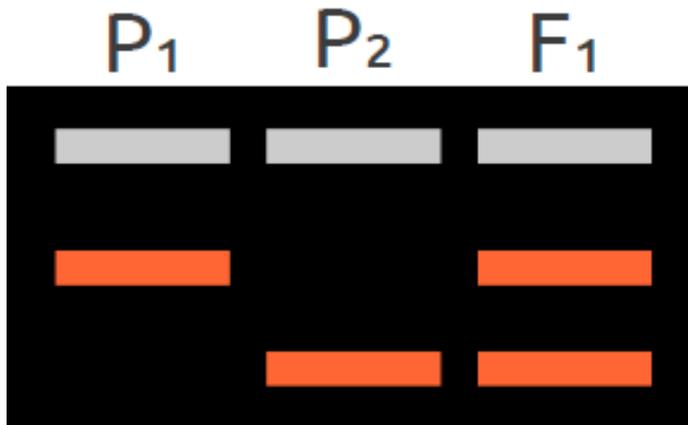


Codominante



# MARCADORES MOLECULARES

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



# **ALGUNS EXEMPLOS DE MARCADORES MOLECULARES**

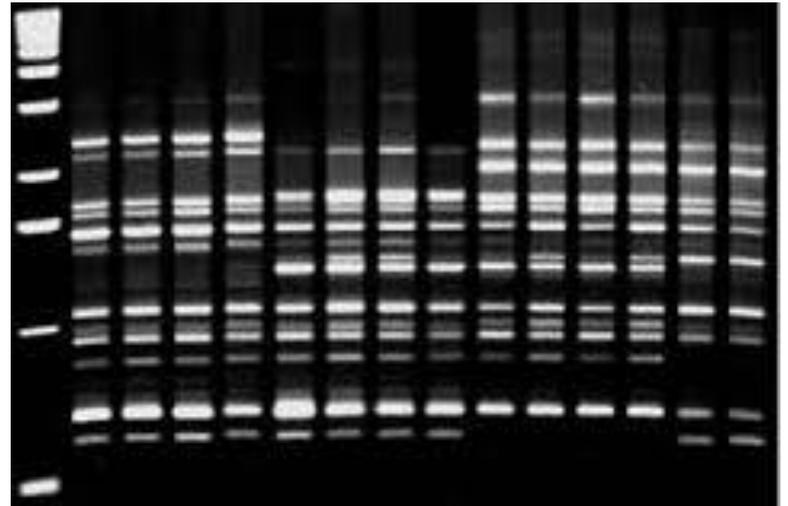
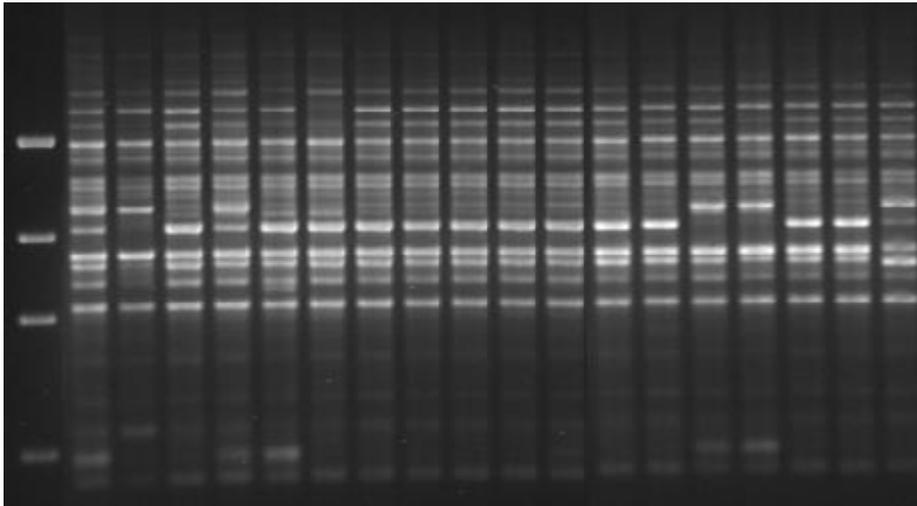
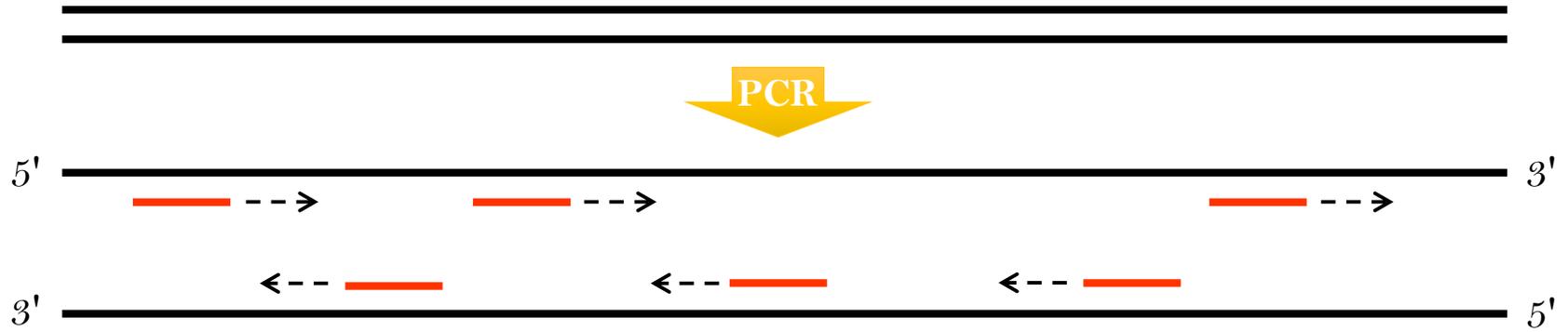
# RAPD

## 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

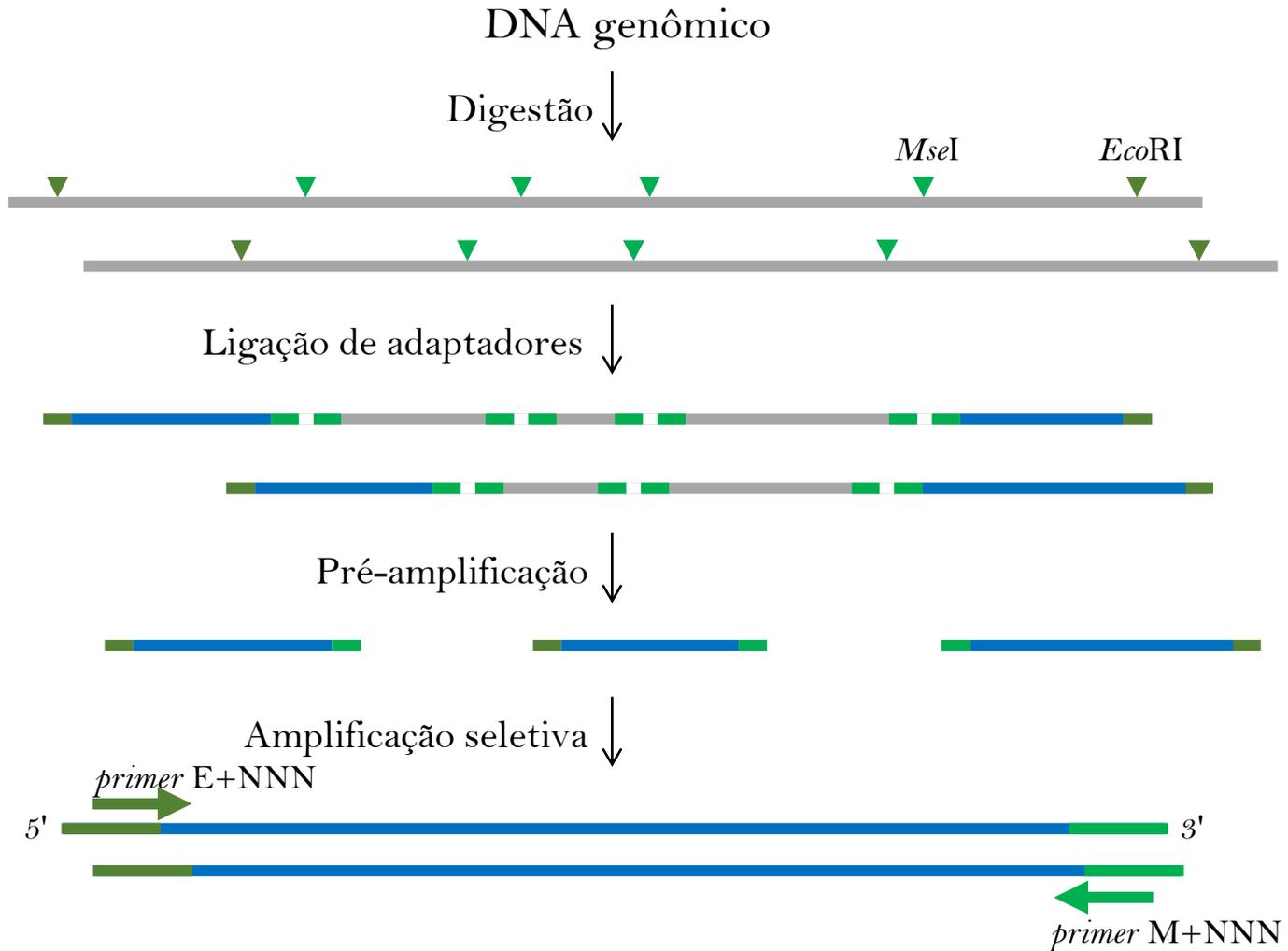
# AFLP

## Amplified Fragment Length Polymorphism

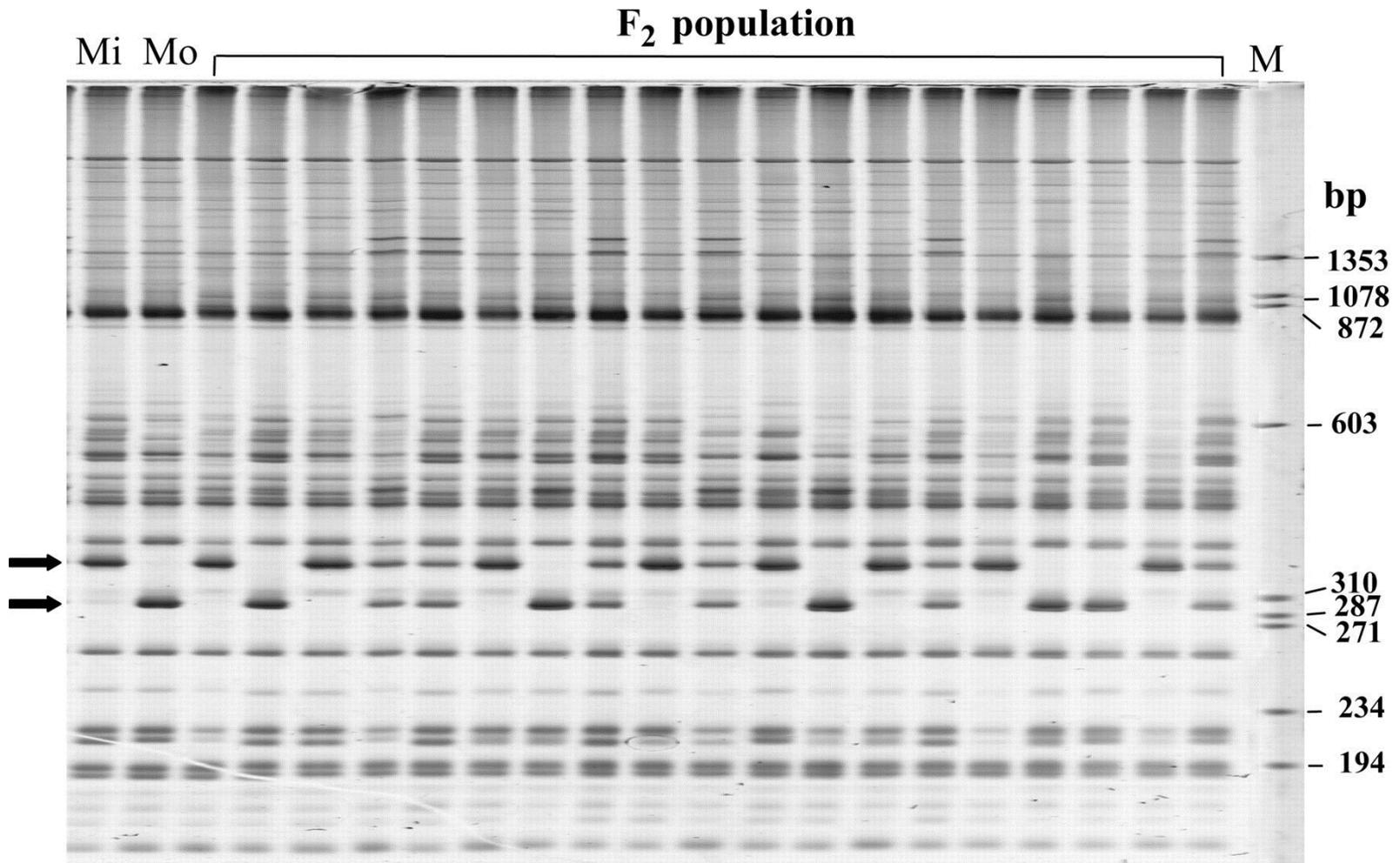
### Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado

- 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

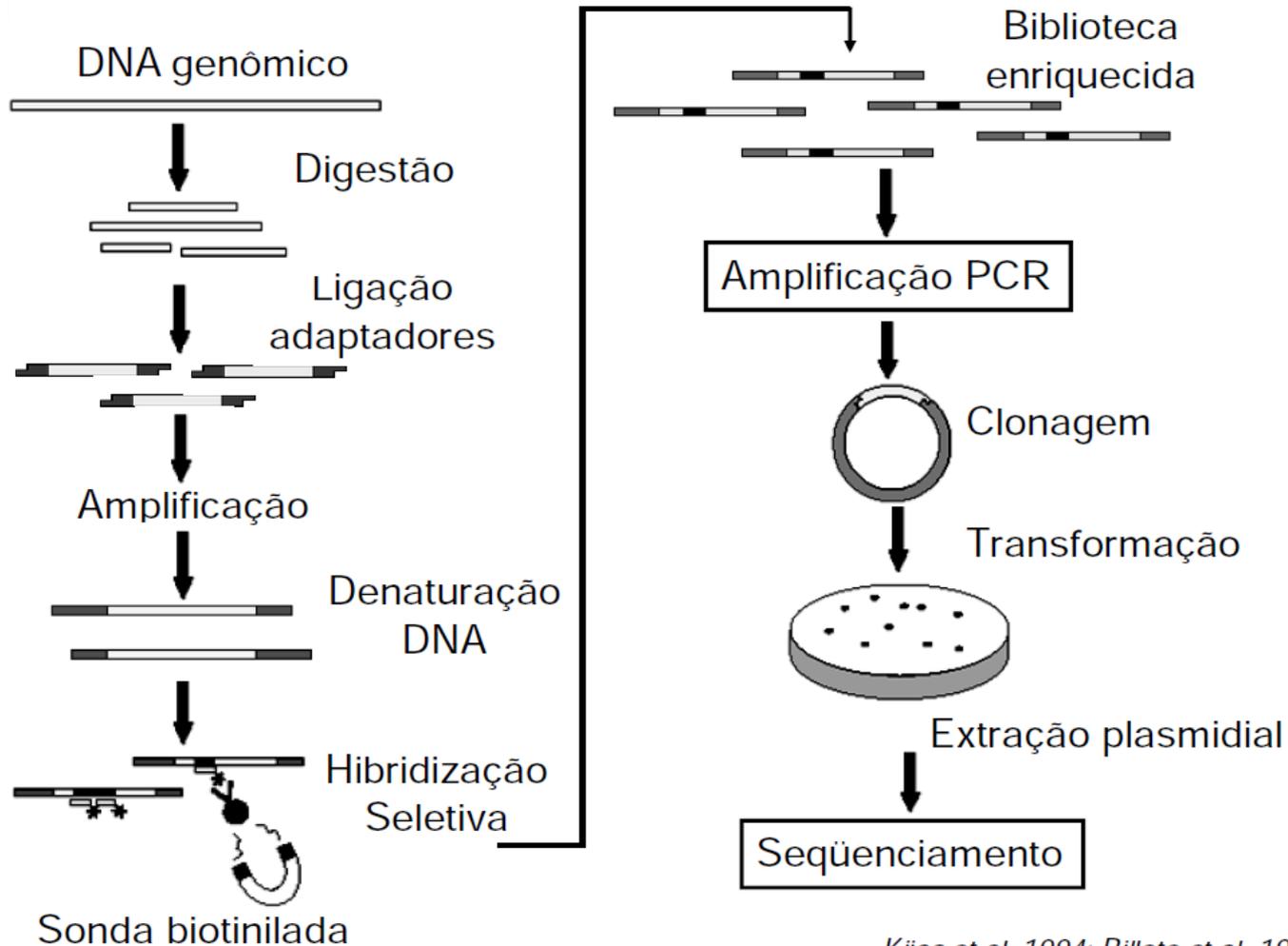
Simple Sequence Repeats

Sequências simples repetidas

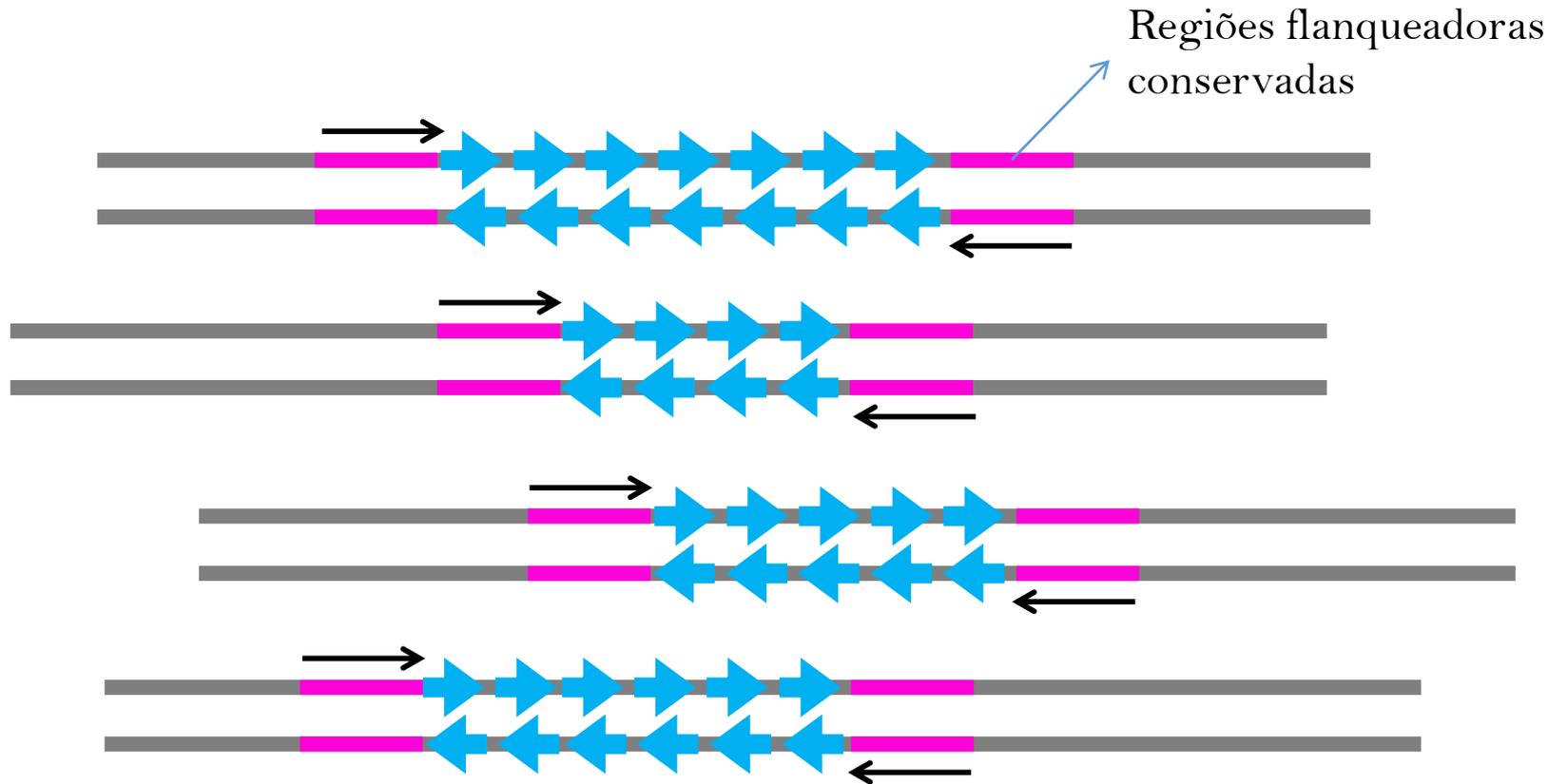
- Pequenas sequências de DNA (1 a 6 nucleotídeos) repetidos em tandem
- **Codominante**
  - Indivíduos heterozigotos são detectados
- Multialélicos e amplamente distribuído no genoma
- **Base genética:**
  - Amplificação de locos específicos de sequências repetitivas
  - Baseados em PCR com primers específicos

# MICROSSATÉLITES

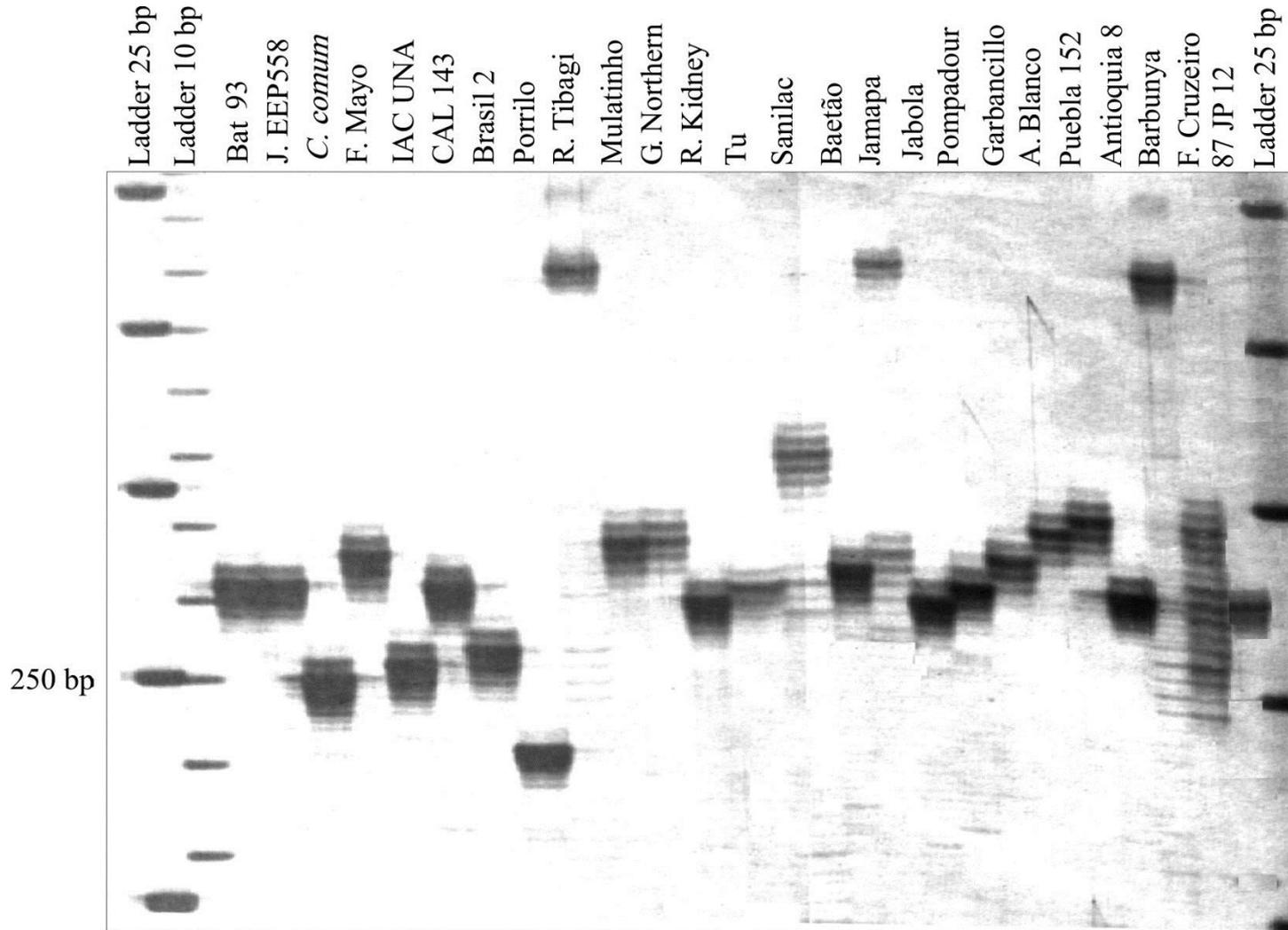
Biblioteca genômica enriquecida com microssatélites



# MICROSSATÉLITES



# MICROSSATÉLITES



[http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g07-007#.UmRVy\\_msjZn](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

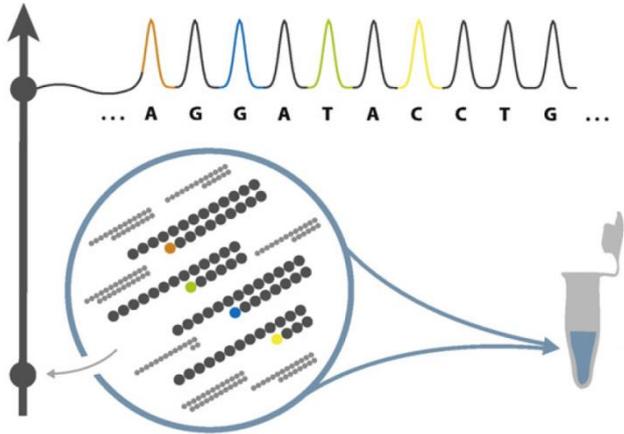
# SNP

## Single Nucleotide Polymorphism Polimorfismo de base única

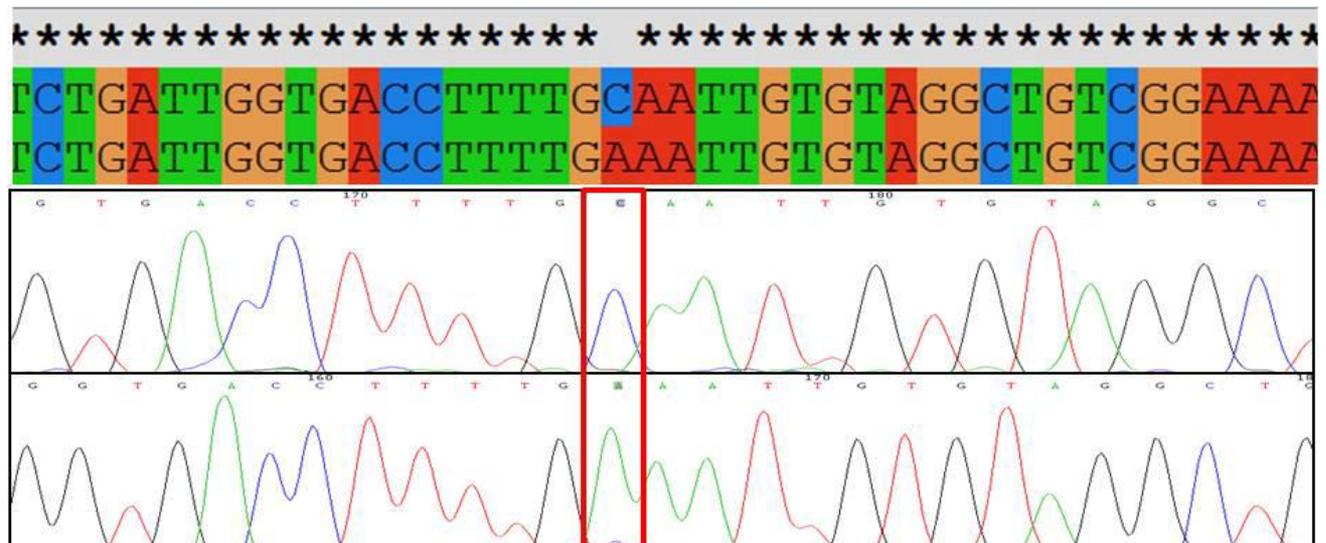
- Polimorfismo resultante da alteração de uma única base
- Abundantes no genoma
- **Codominante e bialélico**
- Há diversas maneiras de se avaliar a variação:
  - Alinhamento e comparação de sequências
  - Métodos baseados em géis
  - Métodos baseados em chips
  - Sequenciamento de 2ª geração, etc.

# 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

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

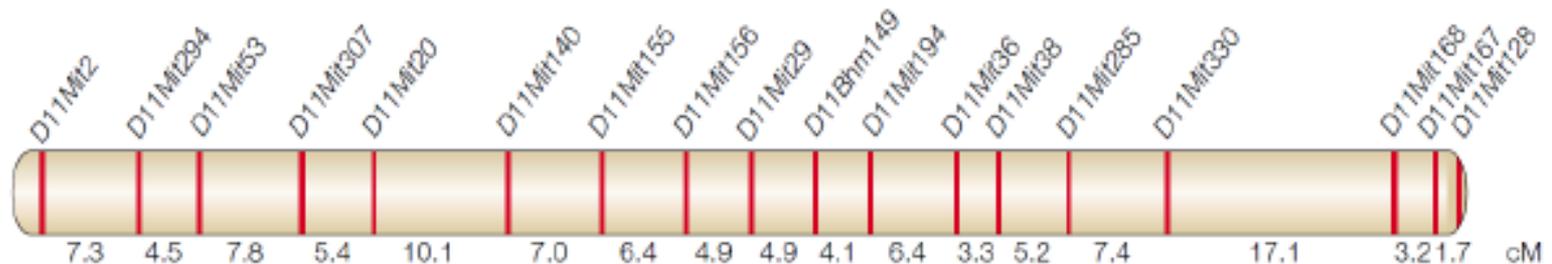
# **USO DOS MARCADORES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS**

# 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

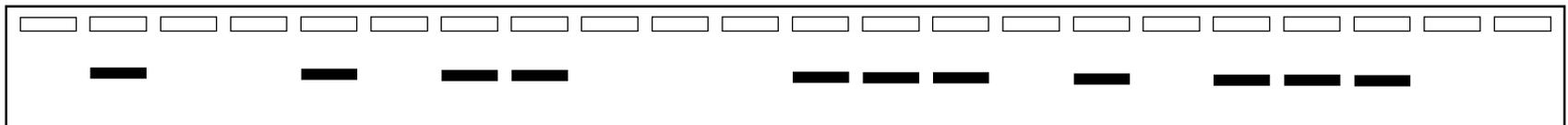
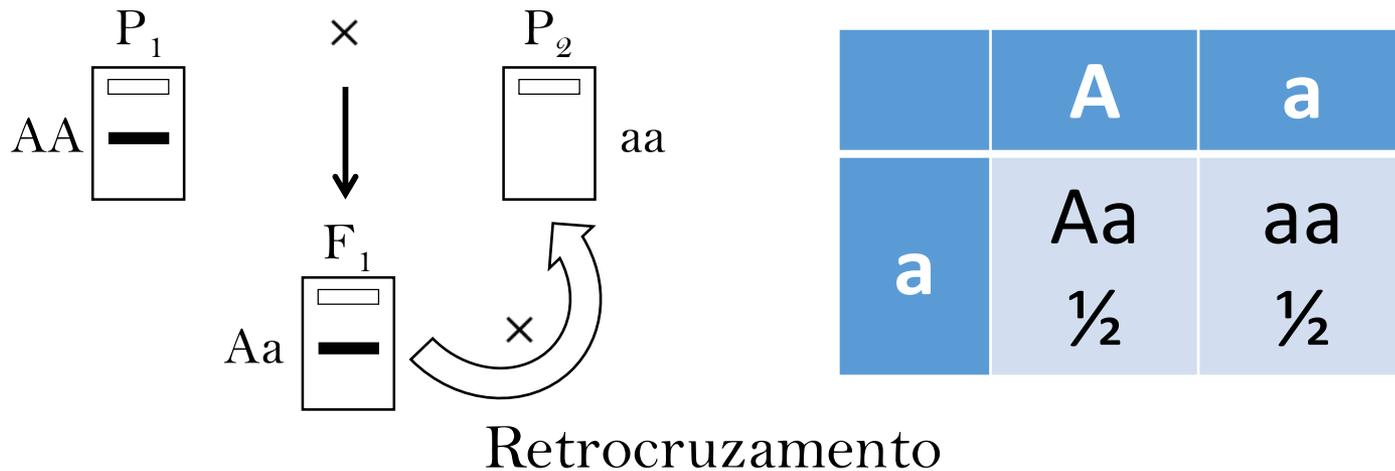


*Mus musculus L.*

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

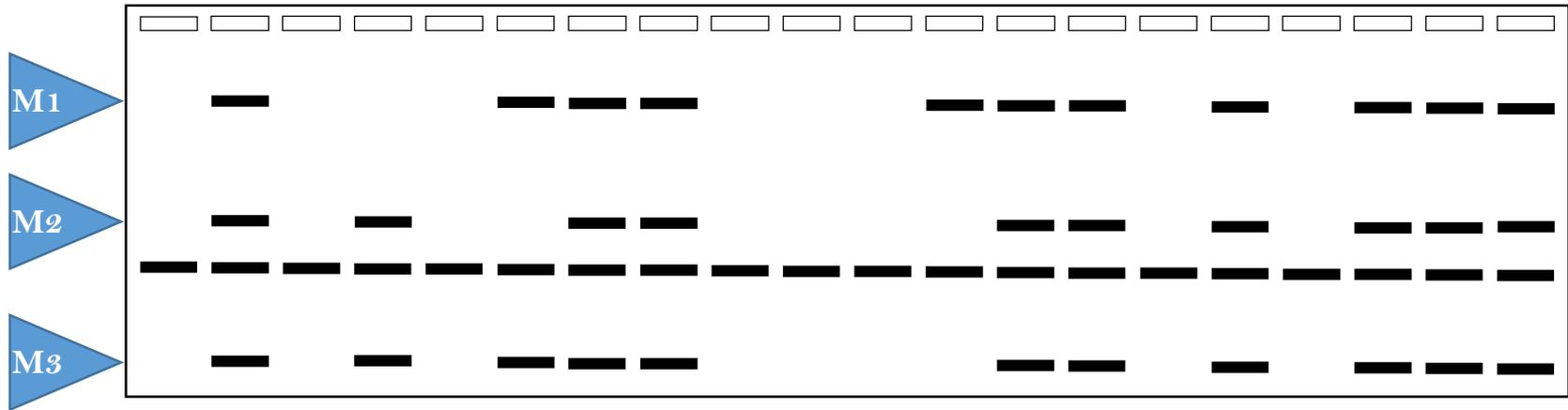
# CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

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



# CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

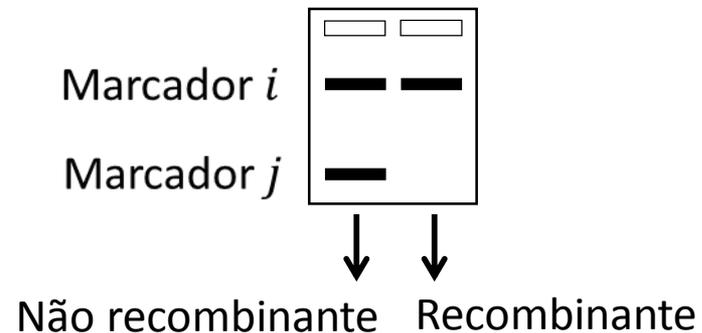
População de retrocruzamento genotipada com três locos AFLP



- Cálculo da fração de recombinação:

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

Comparando dois locos polimórficos



# CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

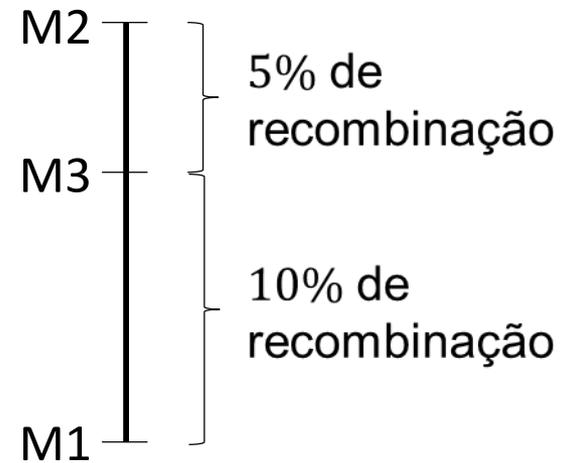
Leitura do gel

	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

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

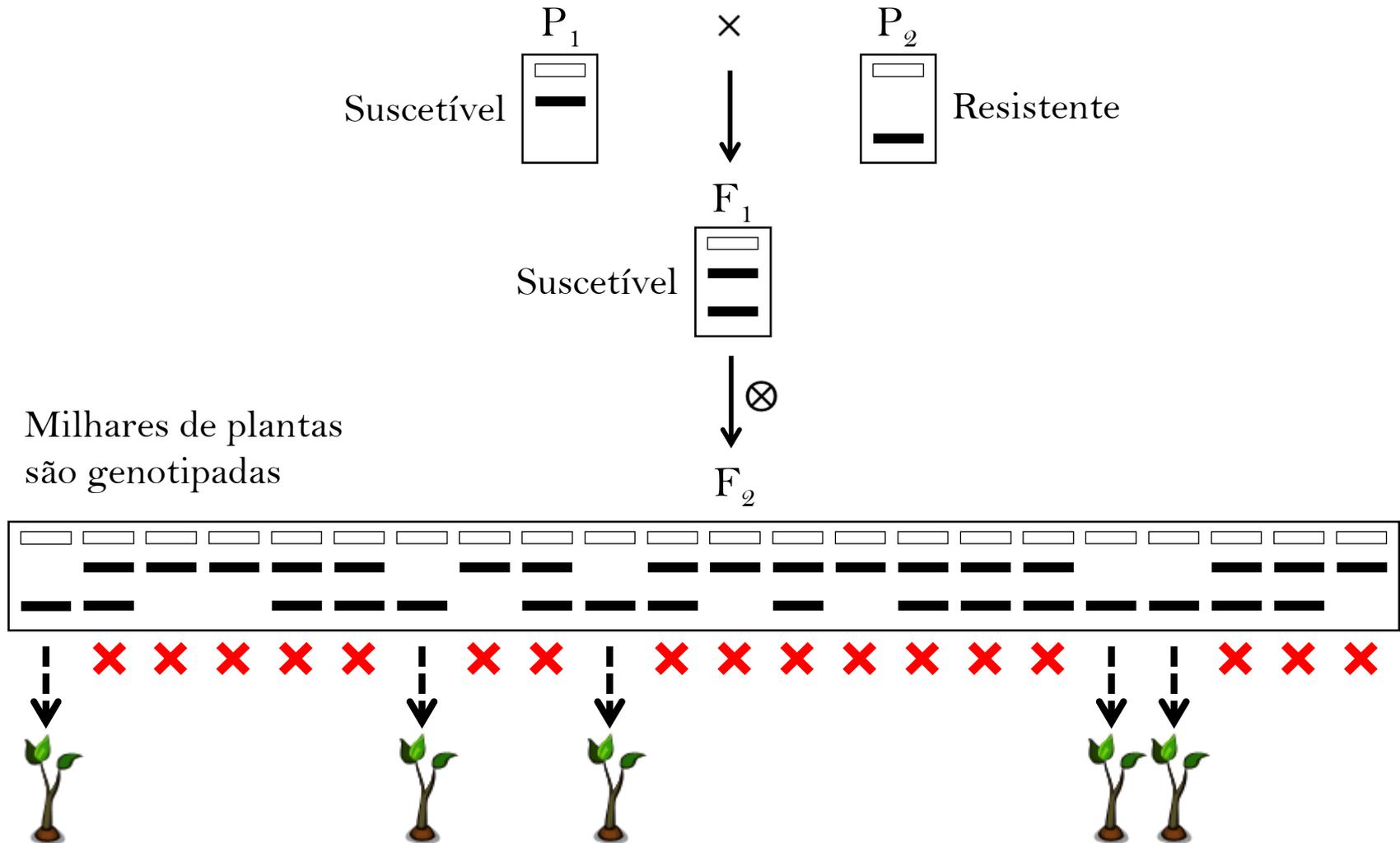
$$r_{1,3} = \frac{2}{20} = 0,10$$

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



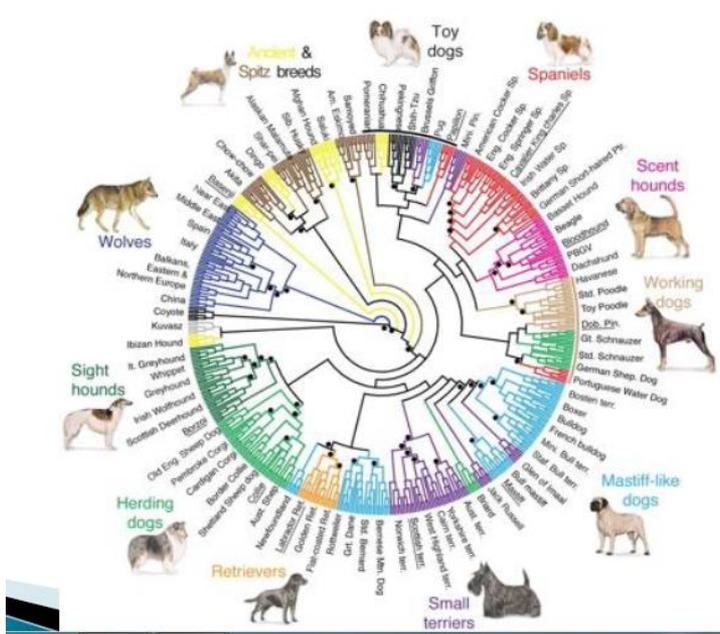
Mapa genético

# SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES

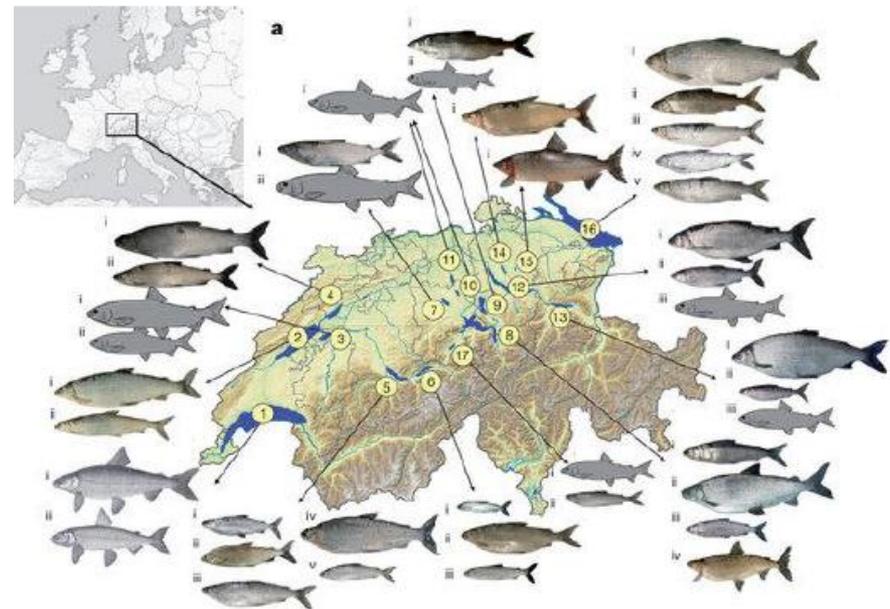


A seleção fenotípica é baseada em marcadores de DNA

# 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

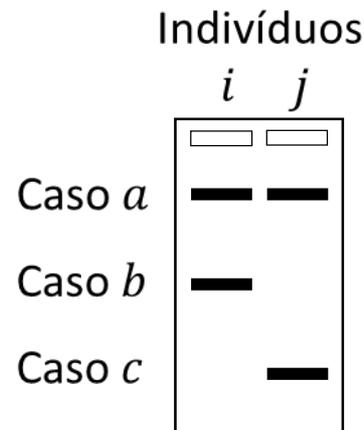
# MARCADORES DOMINANTES

- 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  $j$



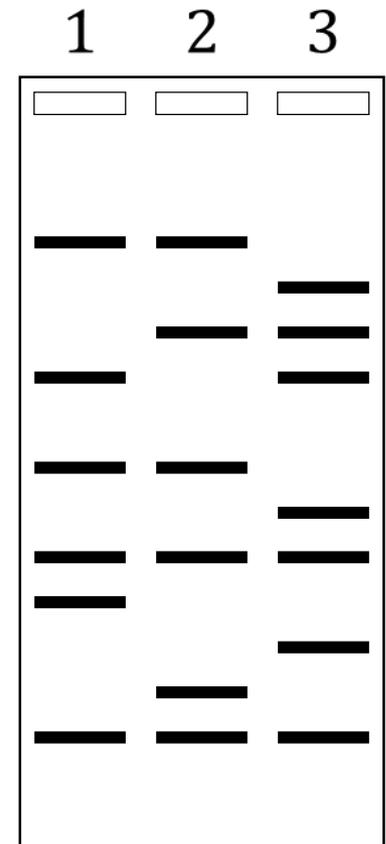
# MARCADORES DOMINANTES

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

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

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

- 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?

## Leitura

Guimarães et al., 2009

