

Marcadores Moleculares

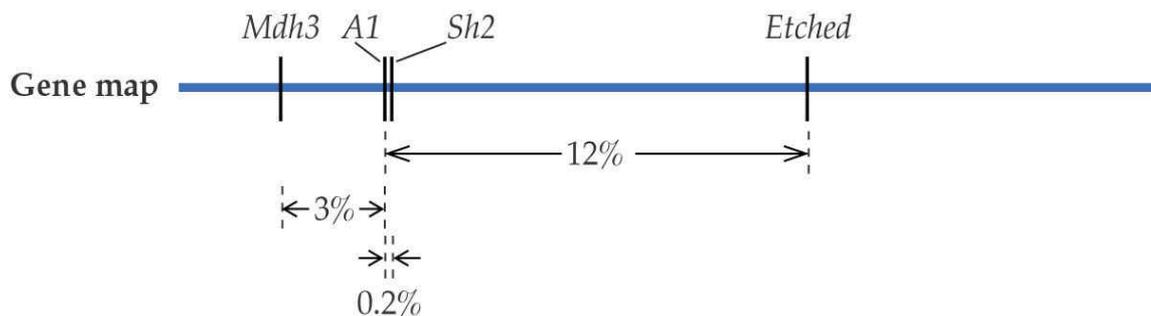
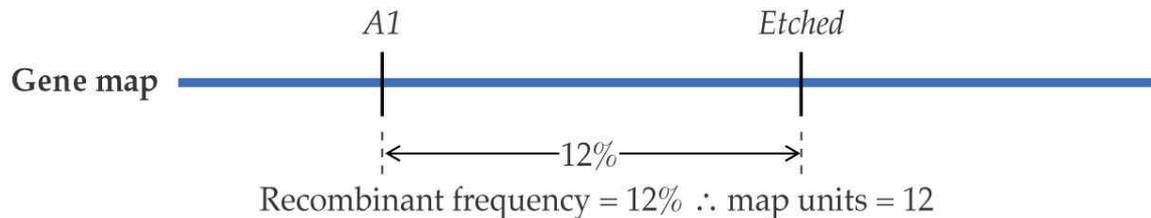
Conceitos básicos de genética : distância genética, mapa genético

1 Unidade de mapa genético (1cM): a **distância genética** entre **dois genes** para a qual, a cada 100 produtos de meioses (gametas), 1 é recombinante.

Frequência de recombinantes entre os dois genes : 0.01 (1 %).

Segregação independente: Dois genes em diferentes cromossomos estão a 50 cM ou muito longe no mesmo cromossomo (50% de recombinantes).

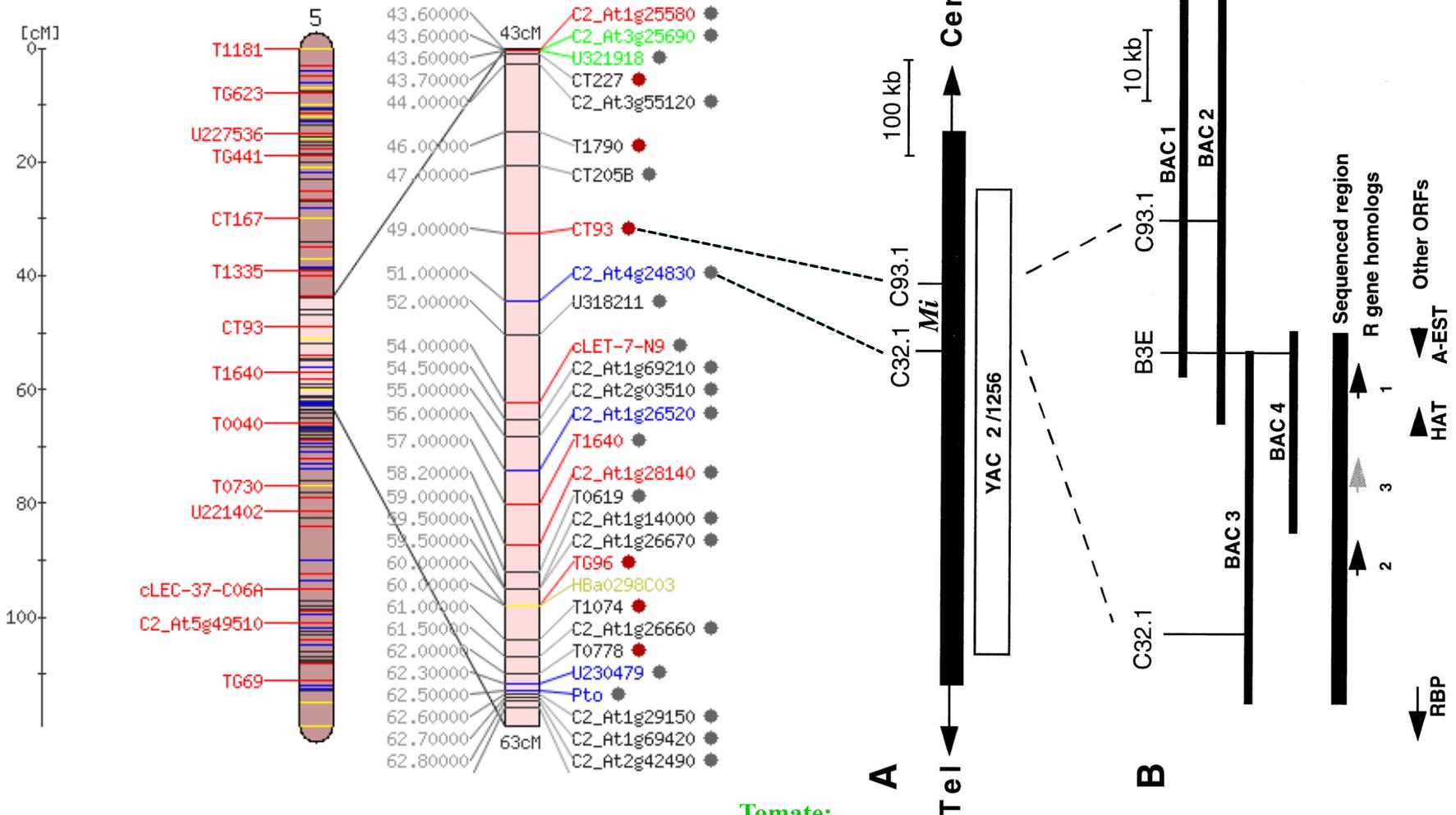
Genes ligados: segregação não independente: distancia menor que 50 cM.



Mapa genético vs mapa físico

Distância genética (cM)

Distância física (Kb)



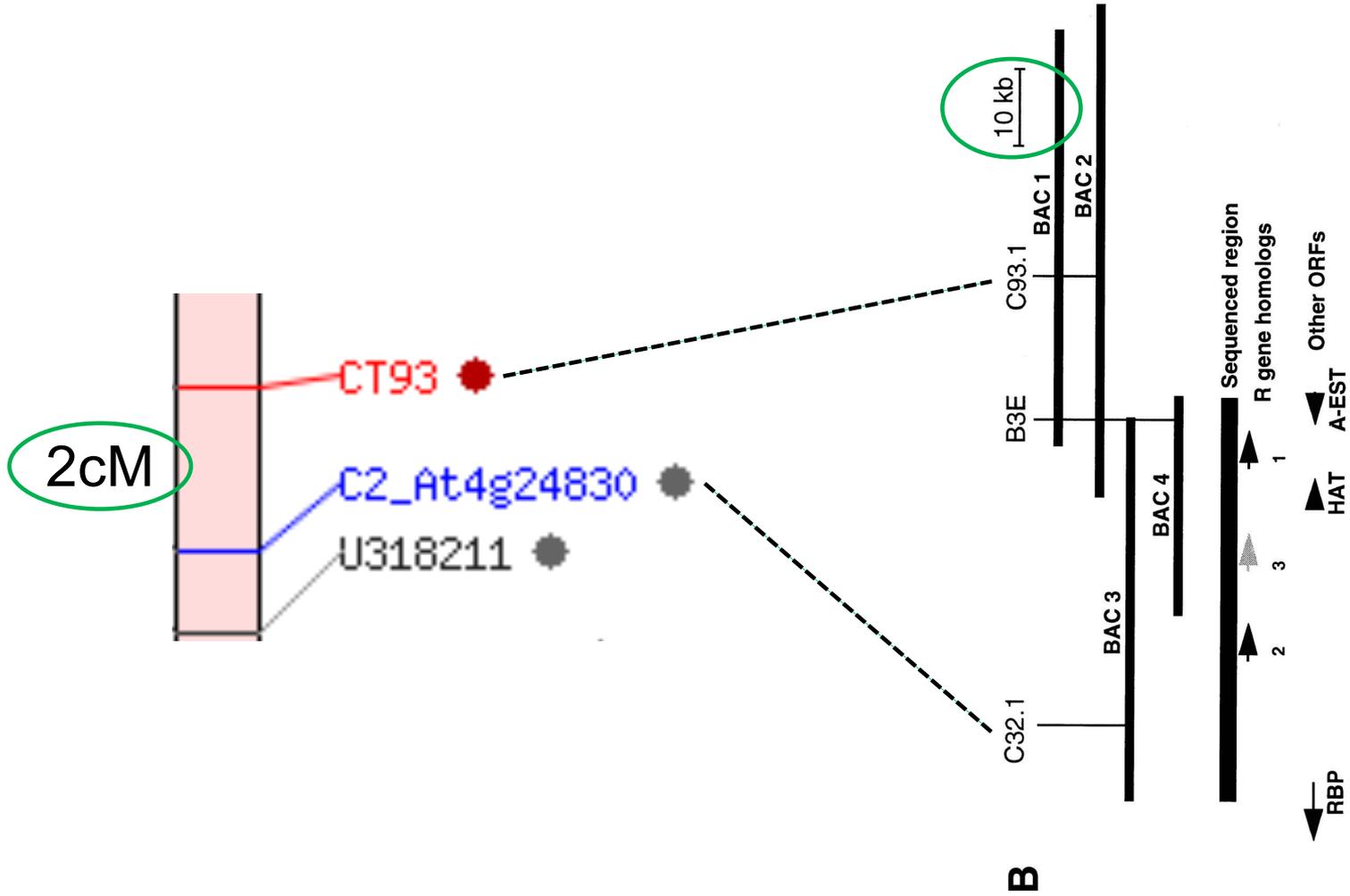
Tomate:

0.04 cM ≈ 100 Kb (depende da região genômica)

- 0.0004=frequência de recombinação

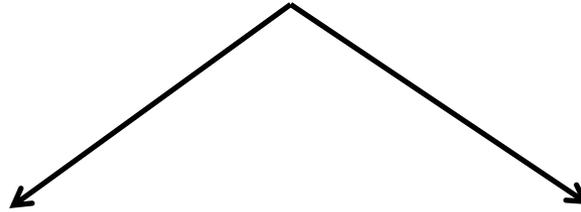
- 4 recombinantes em 10.000 gametas (meioses)

Os marcadores moleculares nos permitem transpor a distância genética à física



Marcadores genéticos:

“Loci que presentan polimorfismos ou variabilidade experimentalmente detectáveis, un tipo de herencia predecível segundo as leis de Mendel e não são influenciados pelo ambiente.”

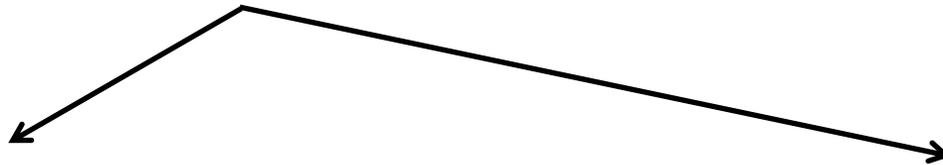


Fenotípicos

Características fenotípicas
polimórficas (secuencias de DNA
expresas)

Molecular Genotípico

Fragmento de DNA (a
maioria não é expresada)



Morfológico

Bioquímico

(isoenzima, proteína de reserva)

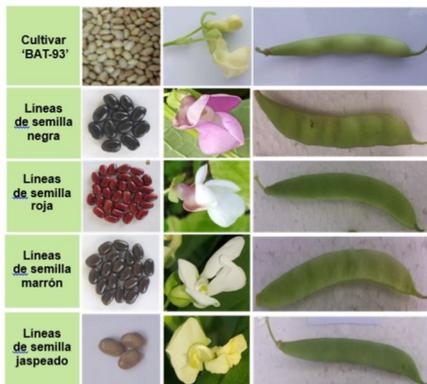
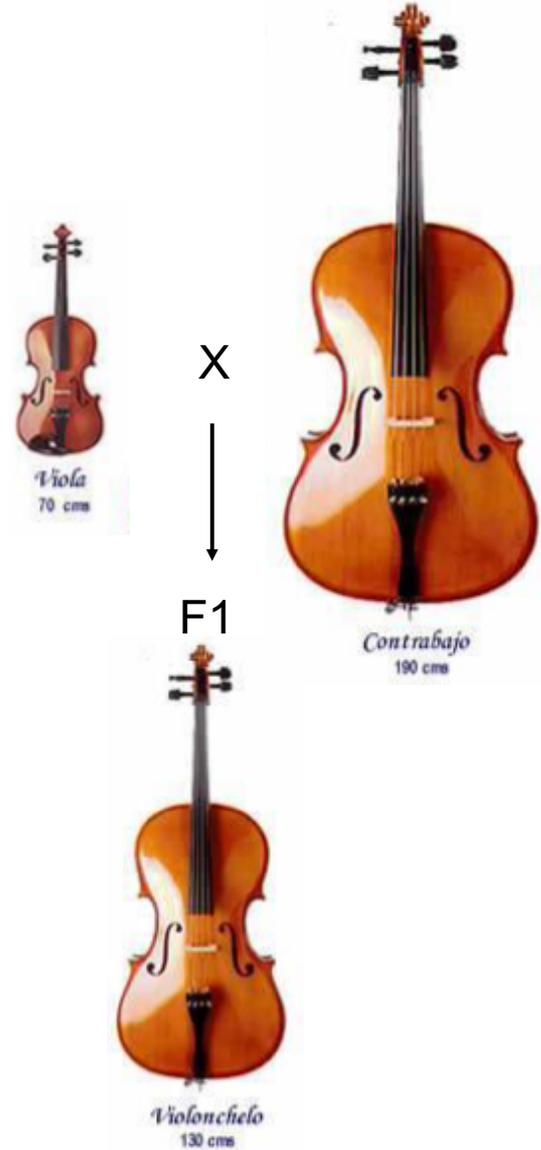
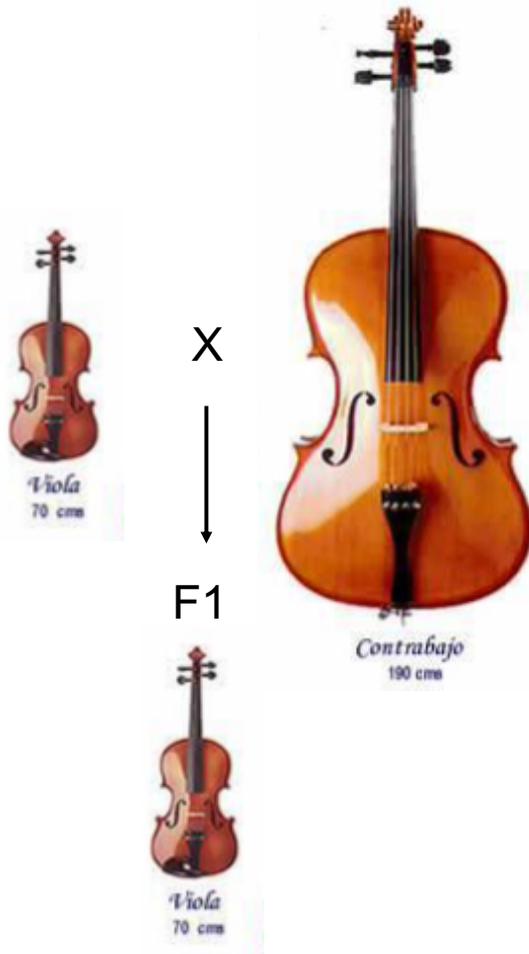


Figura 1. Cultivar comercial 'BAT-93' y líneas de *P. vulgaris* obtenidas en el Programa de mejoramiento genético del IBP.

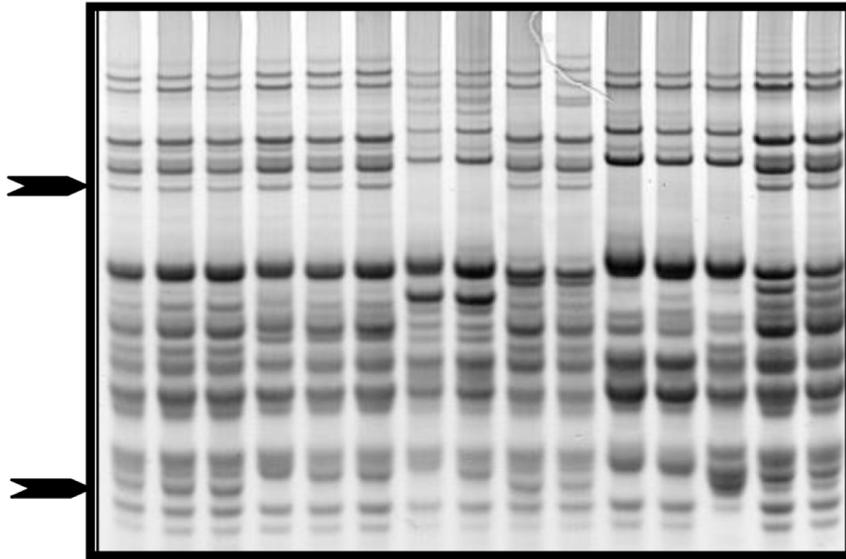
Marcadores genéticos:

Dominantes

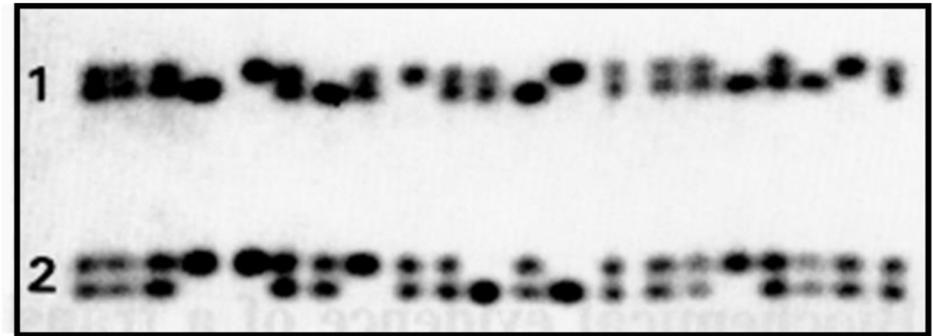
Codominantes



Marcador Fenotípico Bioquímico:



proteína de reserva de trigo
(GLUTENINAS)



isoenzima: ACONITASE, dois
loci com dois alelos cada em
centeio

Marcador Molecular Genotípico:

É um sítio potencialmente polimórfico para uma variação no DNA não necessariamente associada com uma variação fenotípica pois pode ser uma sequência não expressa.

RFLP (restriction fragment length polymorphism) —————> **Southern**

PCR

RAPD (random amplified polymorphism DNA)

SSR (simple sequence repeats) = **microsatélites** = **VNTRS** (variable number of tandem repeats)

AFLP (amplified fragment length polymorphism)

SCAR (sequence-characterized amplified regions) = **STS** (sequence-tagged sites)

SNPs (single nucleotide polymorphisms) —————> **New Generation Sequencing**

Marcador Molecular Genotípico: Aplicações

- Caracterização e identificação de variedades, cultivares, etc.
- Verificação de pedigree.
- Determinação do grau de relação entre genótipos.
- Quantificação da variabilidade genética do germoplasma.
- Caracterização e identificação de fitopatógenos (diferentes linhagens).
- *Marker assistance selection* para programas de melhoramento.

Marcador Molecular Genotípico: Aplicações

MELHORAMENTO:

Utilizando marcador/es fortemente ligado/s (o um intervalo de marcadores) a um caráter de interesse é possível a manipulação de caracteres mono- ou multi-gênicos com precisão e velocidade.

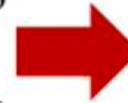
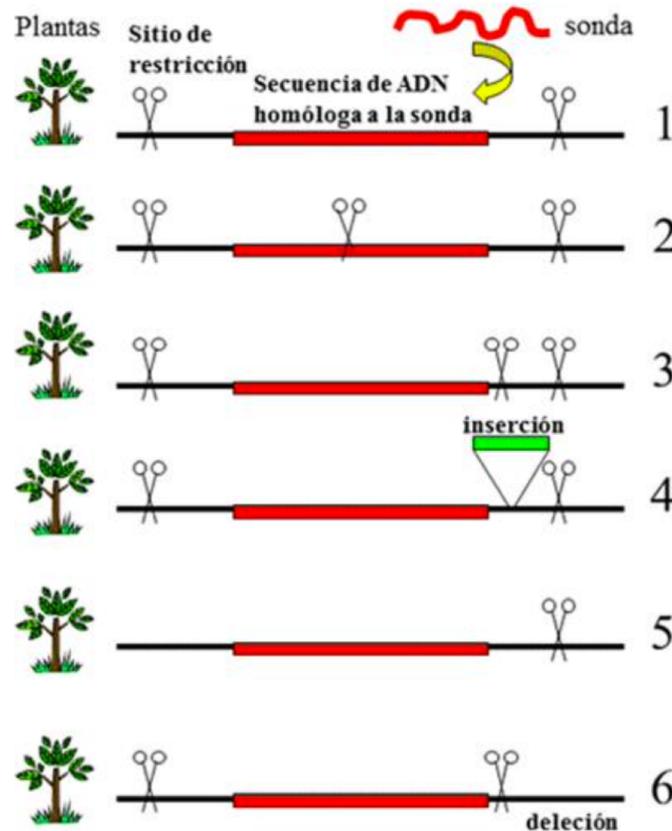
Vantagens comparativas ao método clássico de melhoramento:

- ganho de tempo já que não é necessário ter plantas adultas para testar o fenótipo.
- permite controlar vários caracteres simultaneamente.
- livre de influência ambiental.
- evita a manipulação de patógenos.
- retrocruzamento o introgressão assistida (seleção do fundo genético).

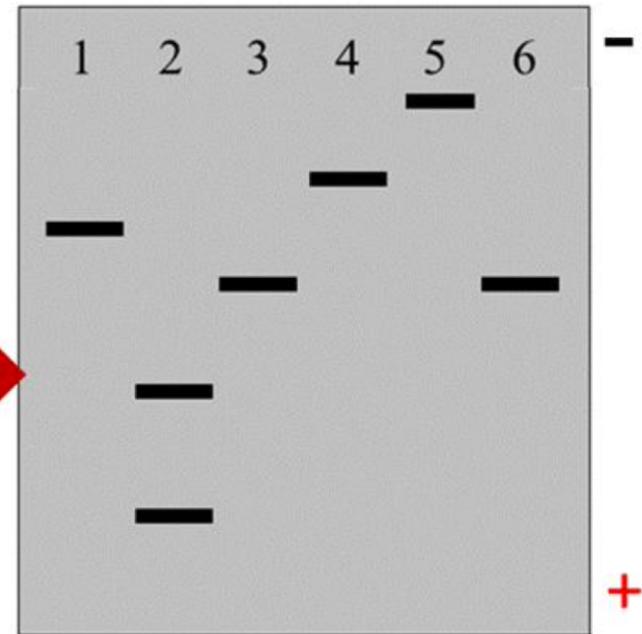
Marcador Molecular Genotípico:

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

PLANTAS HOMOLOGAS



Autoradiografía



Mutaciones en sitios de restricción, inserciones, deleciones, rearrreglos

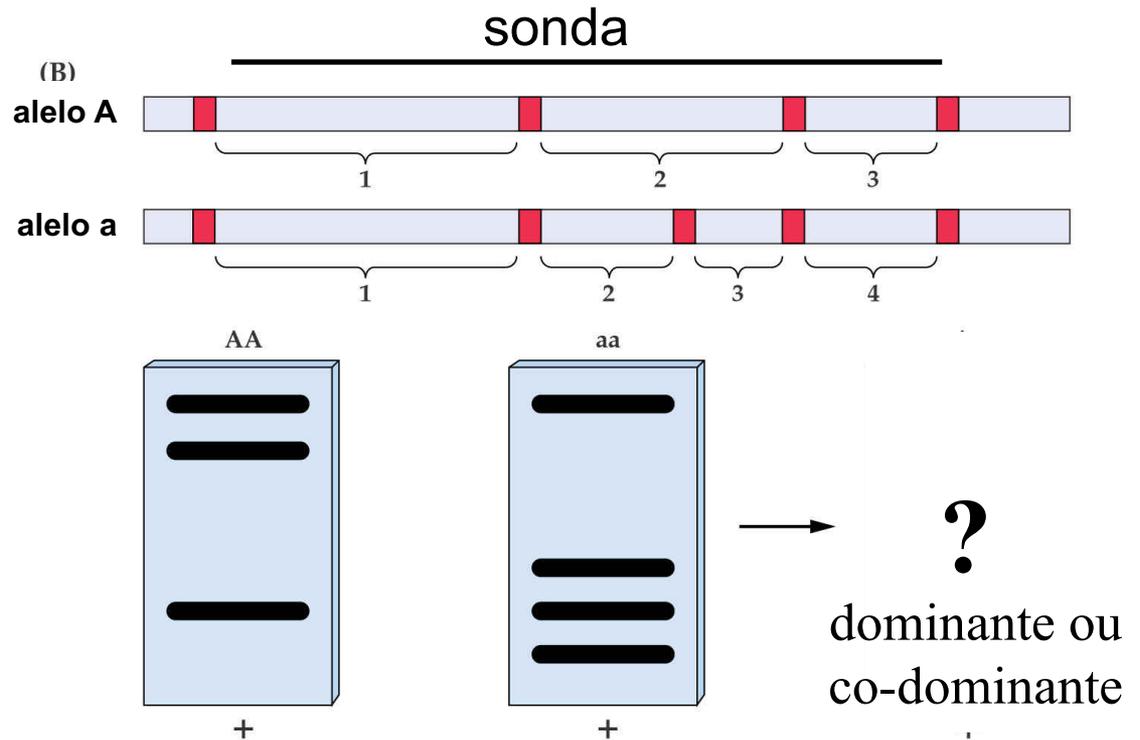
Sondas: fragmento de DNA (insertos de bibliotecas genômicas ou de cDNA). Não necessariamente conheço a sequencia das sondas.

Todas as bandas possuem parte da sonda e, conseqüentemente, correspondem ao mesmo lugar do genoma.

Marcador Molecular Genotípico: RFLP (restriction fragment length polymorphism)

(A)

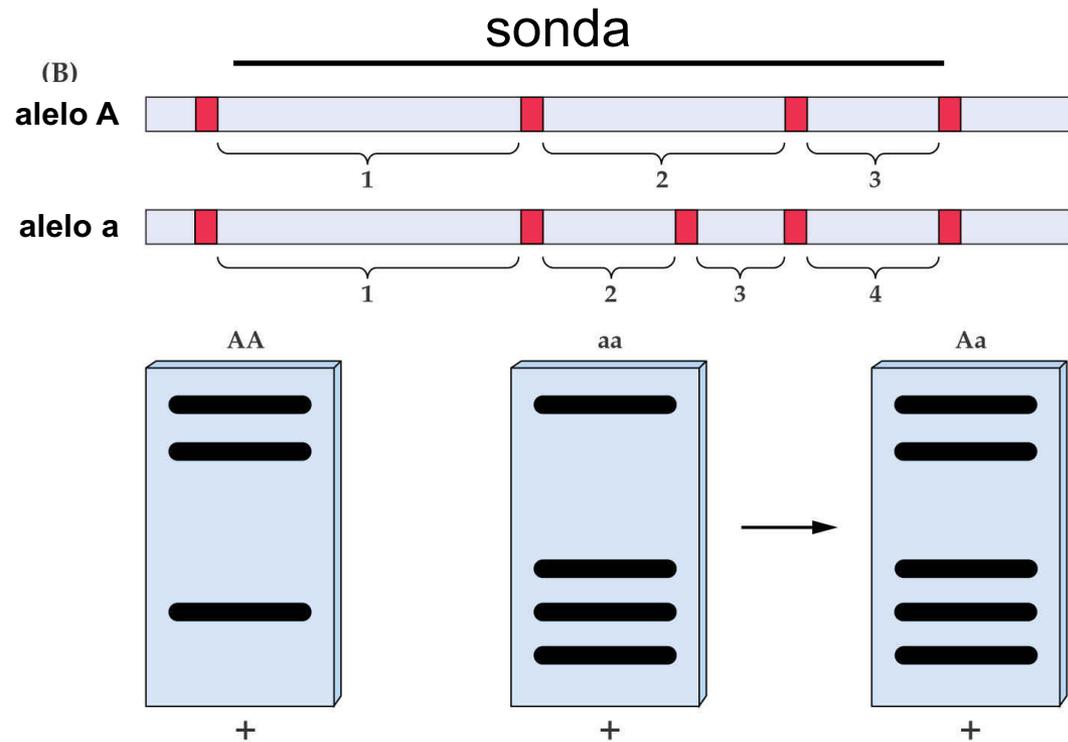
Enzyme	Restriction Site
<i>Bam</i> HI	G G A T C C C C T A G G
<i>Eco</i> RI	G A A T T C C T T A A G
<i>Hind</i> III	A A G C T T T T C G A A
<i>Hpa</i> II	C C G G G G C C
<i>Mbo</i> I	G A T C C T A G
<i>Hae</i> III	G G C C C C G G
<i>Eco</i> RV	G A T A T C C T A T A G



Marcador Molecular Genotípico: RFLP (restriction fragment length polymorphism)

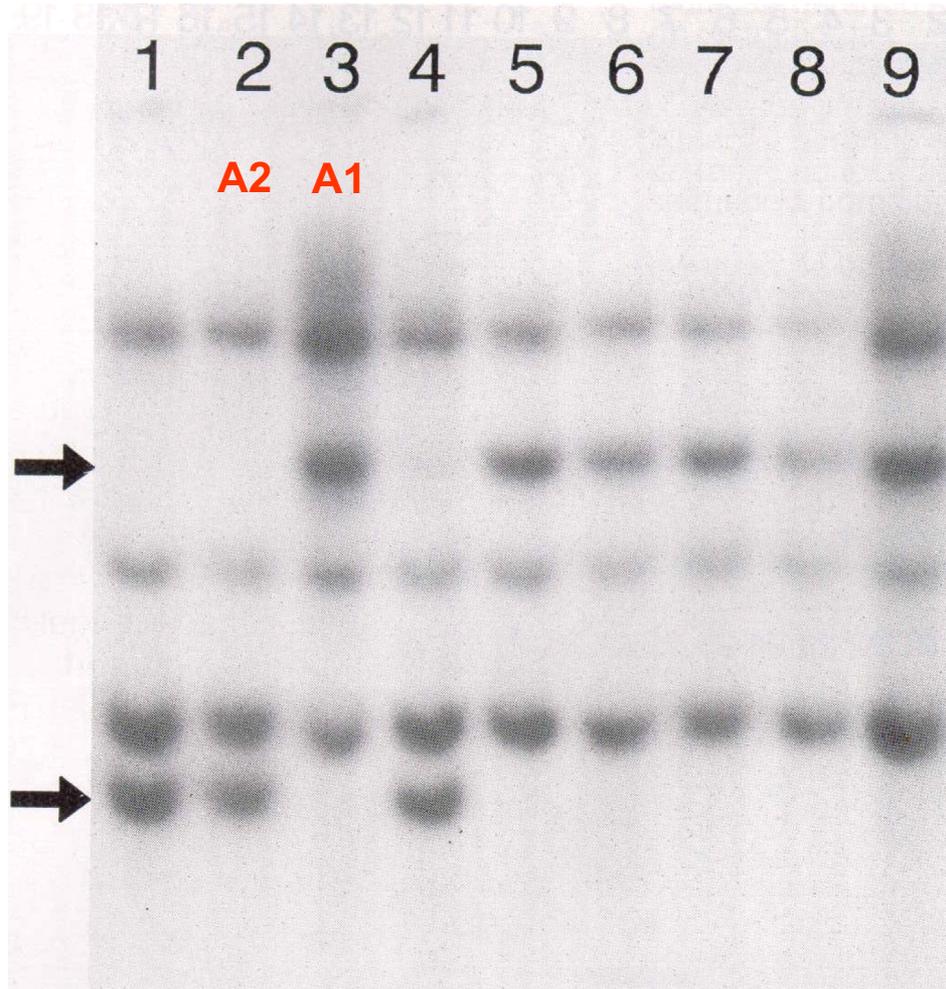
(A)

Enzyme	Restriction Site
<i>Bam</i> HI	G <u>G</u> A T C C C C T A G G
<i>Eco</i> RI	G <u>A</u> A T T C C T T A A G
<i>Hind</i> III	A <u>A</u> G C T T T T C G A A
<i>Hpa</i> II	C <u>C</u> G G G G C C
<i>Mbo</i> I	G <u>A</u> T C C T A G
<i>Hae</i> III	G G <u>C</u> C C C <u>G</u> G
<i>Eco</i> RV	G A T <u>A</u> T C C T A <u>T</u> A G



RFPL: marcador co-dominante!!!!!!
Permite identificar o heterozigoto.

Marcador Molecular Genotípico:
RFLP (restriction fragment length polymorphism)



Autorradiografia

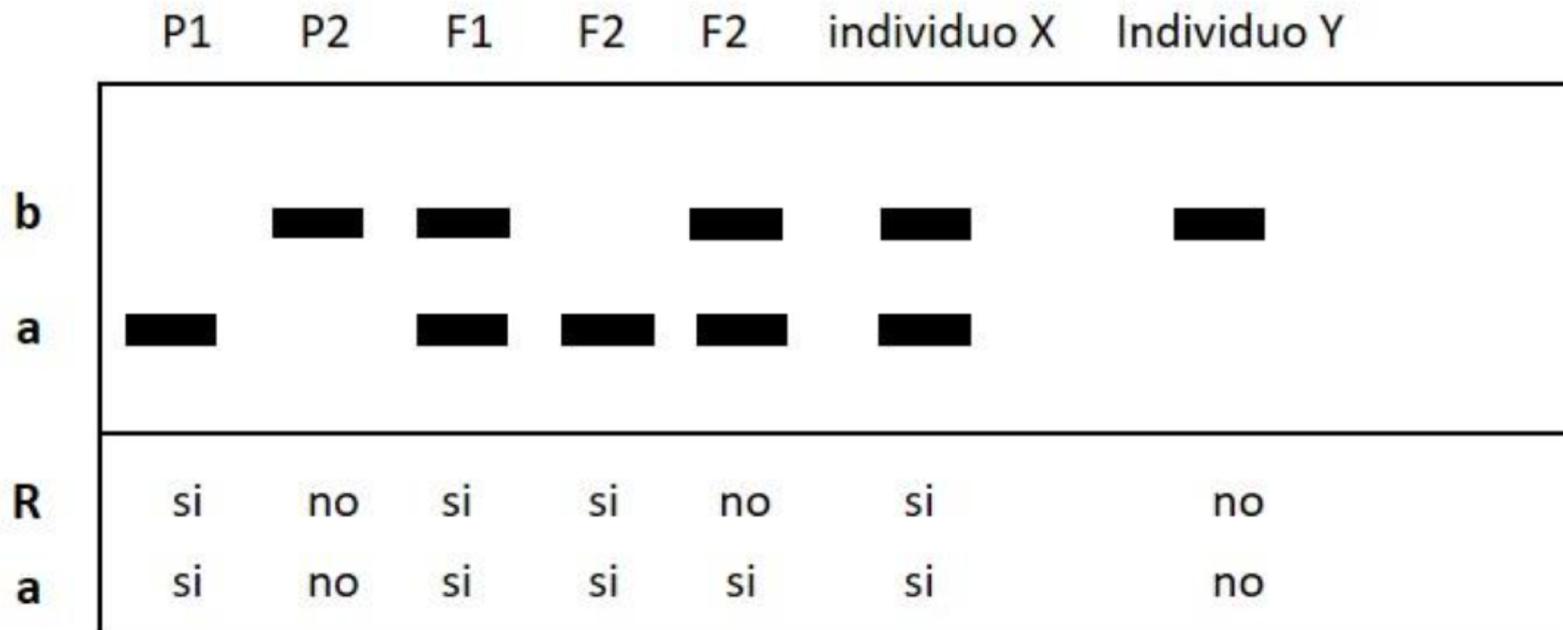
Marcador Molecular Genotípico:

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Parental 1
Resistente ao fungo com o
alelo RFLP **a**

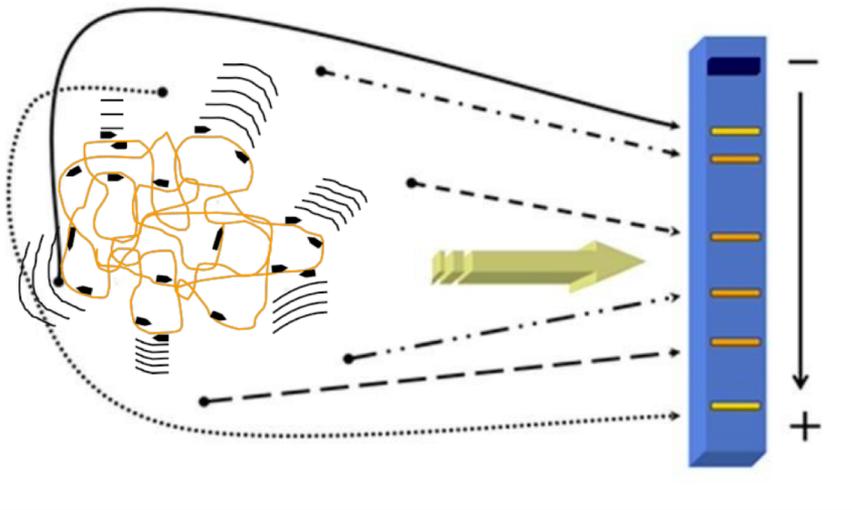
X

Parental 2
Susceptível ao fungo com
o alelo RFLP **b**

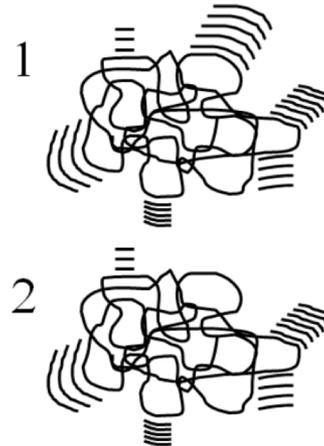


Marcador Molecular Genotípico: RAPD (random amplified polymorphism DNA) PCR com um único iniciador e gel de agarose

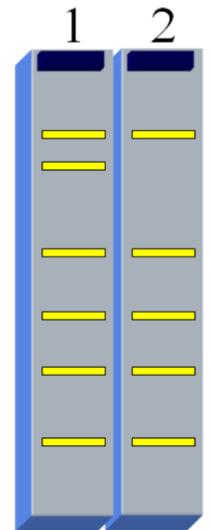
Cada banda corresponde a um lugar diferente e aleatório do genoma.



ADN individuo 1

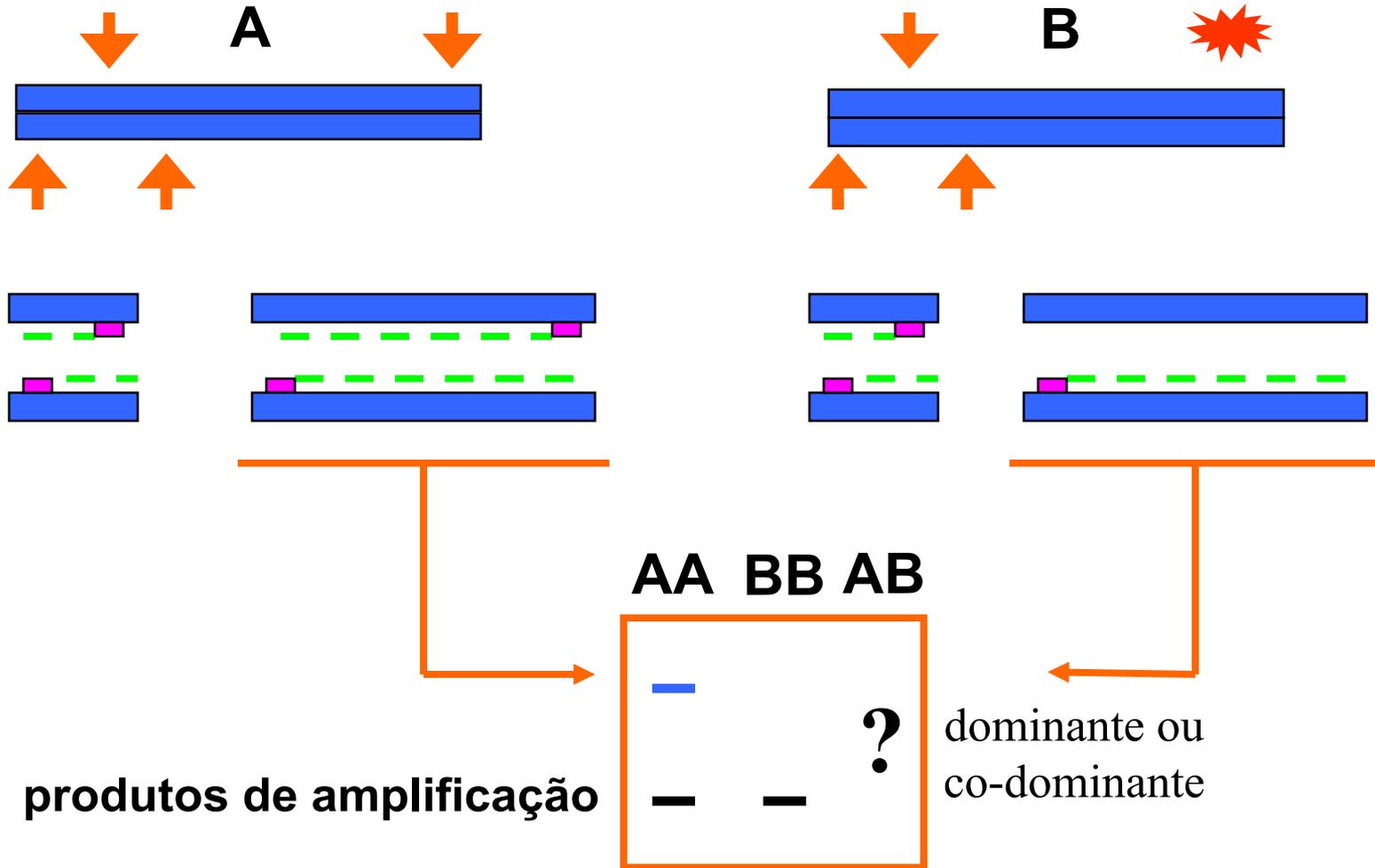


ADN individuo 2

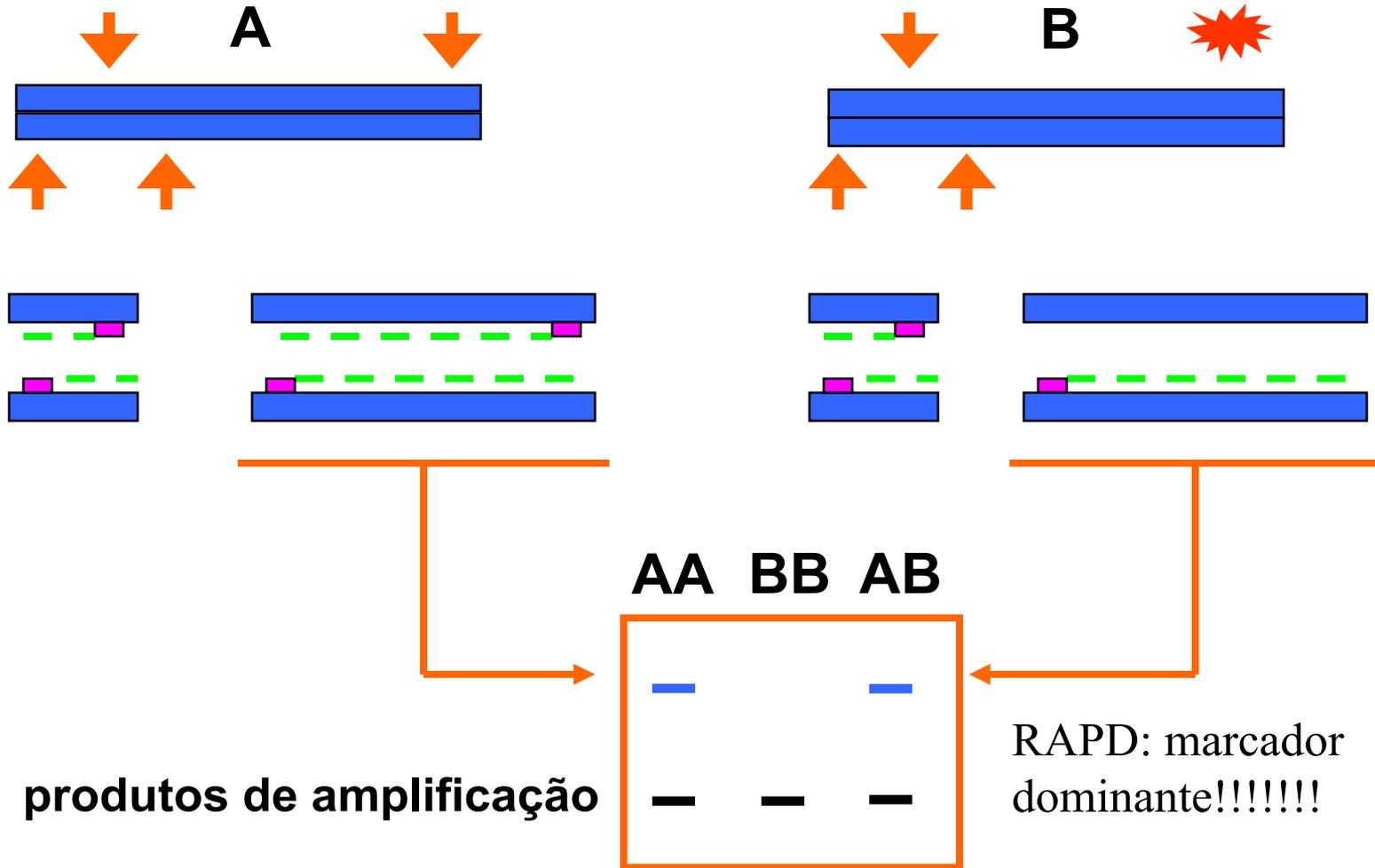


Electroforesis en gel de agarosa

Marcador Molecular Genotípico: RAPD (random amplified polymorphism DNA)

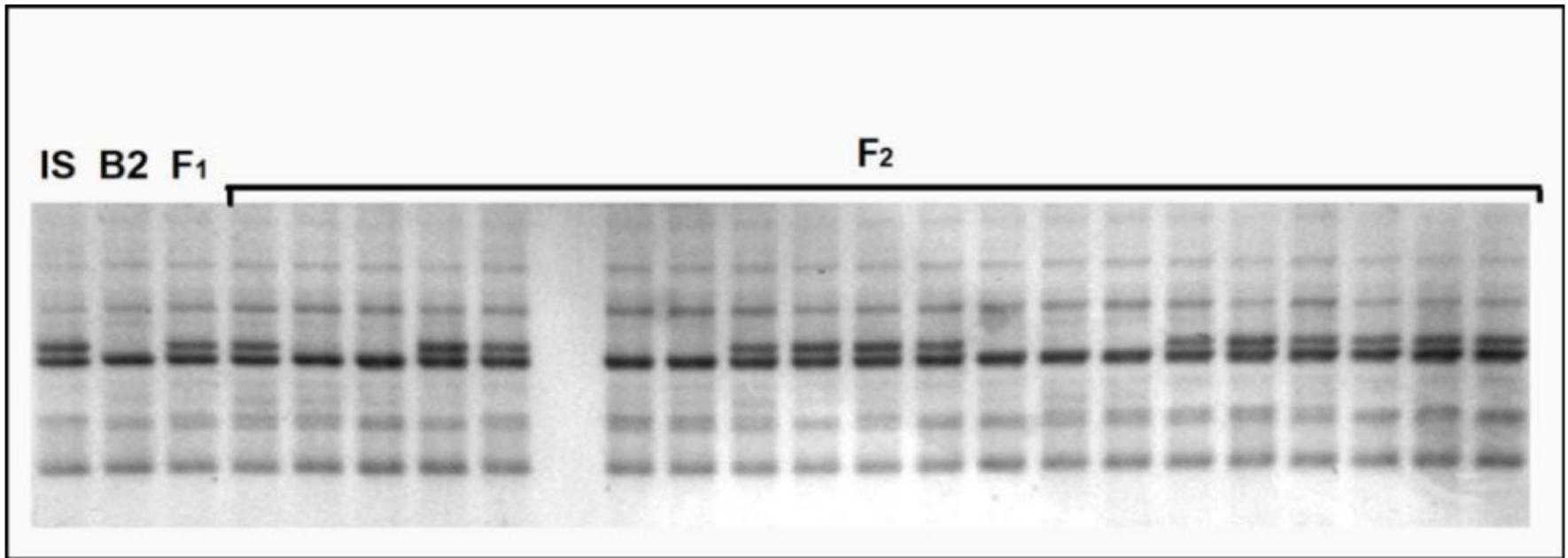


Marcador Molecular Genotípico: RAPD (random amplified polymorphism DNA)



Marcador Molecular Genotípico: RAPD (random amplified polymorphism DNA)

Parentais, F1 e F2 de população segregante para o caráter brotado pré-colheita em sorgo. Gel de agarose corados com brometo



CADA BANDA É UM MARCADOR e corresponde a diferentes regiões do genoma!

Marcador Molecular Genotípico: **RAPD (random amplified polymorphism DNA)**

- Iniciadores de sequência aleatória de 8-10b \Rightarrow temperaturas de “annealing” muito baixas $\approx 35^{\circ}\text{C}$.
- Problema de co-migração de bandas.
- Baixa reprodutibilidade: é necessário padronizar muito bem todos os processos:
 - extração de DNA;
 - quantidade;
 - Taq polimerase;
 - condições da PCR, etc.

Marcador Molecular Genotípico:

SSR (simple sequence repeats) ou microsátélites ou VNTRs

- repetições em tandem de 1-4 nucleotídeos dispersas ao longo de todo o genoma.
- amplificação por PCR com iniciadores específicos para as regiões flanqueadoras.
- altos níveis de polimorfismo. Variabilidade gerada por “replication slippage”.
- são espécie-específicos, por tanto precisam ser desenvolvidos para cada espécie.
- Gel de poliacrilamida para resolver fragmentos com um base de diferença.

Marcador Molecular Genotípico:

SSR (simple sequence repeats) ou microsátélites ou VNTRs

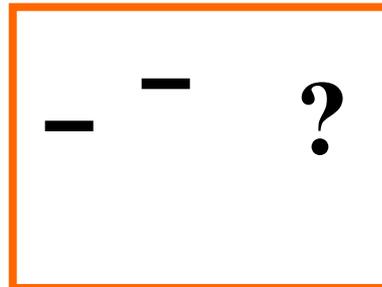
A (TTA)₉

TTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT
AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA

B (TTA)₁₀

TTATT
AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA

AA BB AB

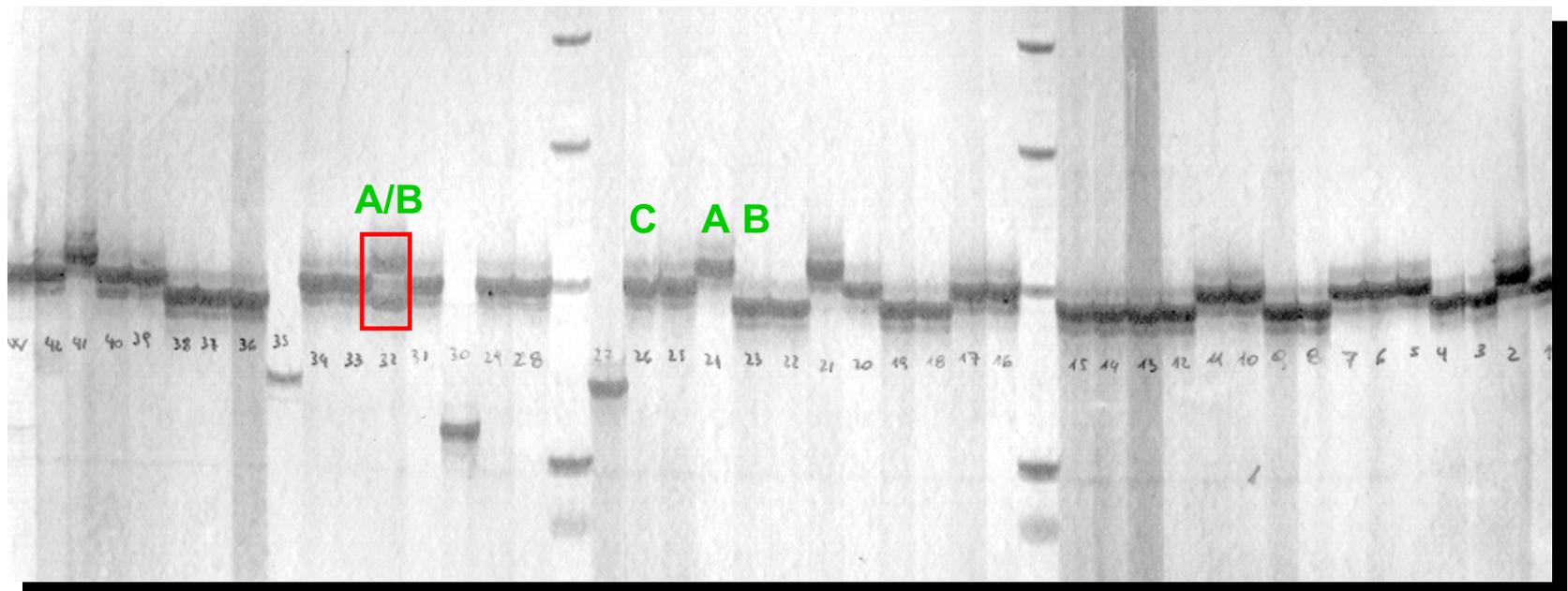


dominante ou
co-dominante

Marcador Molecular Genotípico:

SSR (simple sequence repeats) ou microsátélites ou VNTRs

Soja (*Glycine max*)

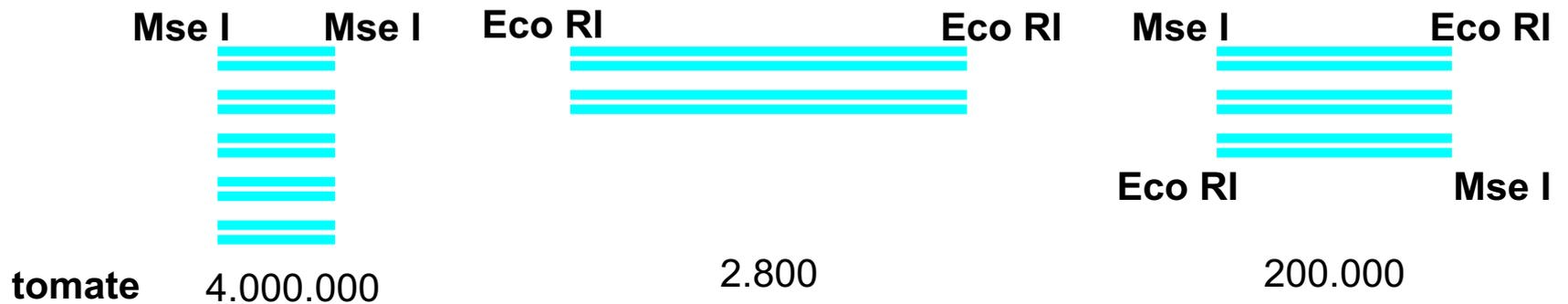


Todas as bandas com as sequências únicas flanqueadoras, consequentemente, correspondem ao mesmo lugar do genoma.

Marcador Molecular Genotípico: AFLP (amplified fragment length polymorphism)

DNA genômico

1- digestão com Mse I (4pb) e Eco RI (6pb)



Marcador Molecular Genotípico: AFLP (amplified fragment length polymorphism)

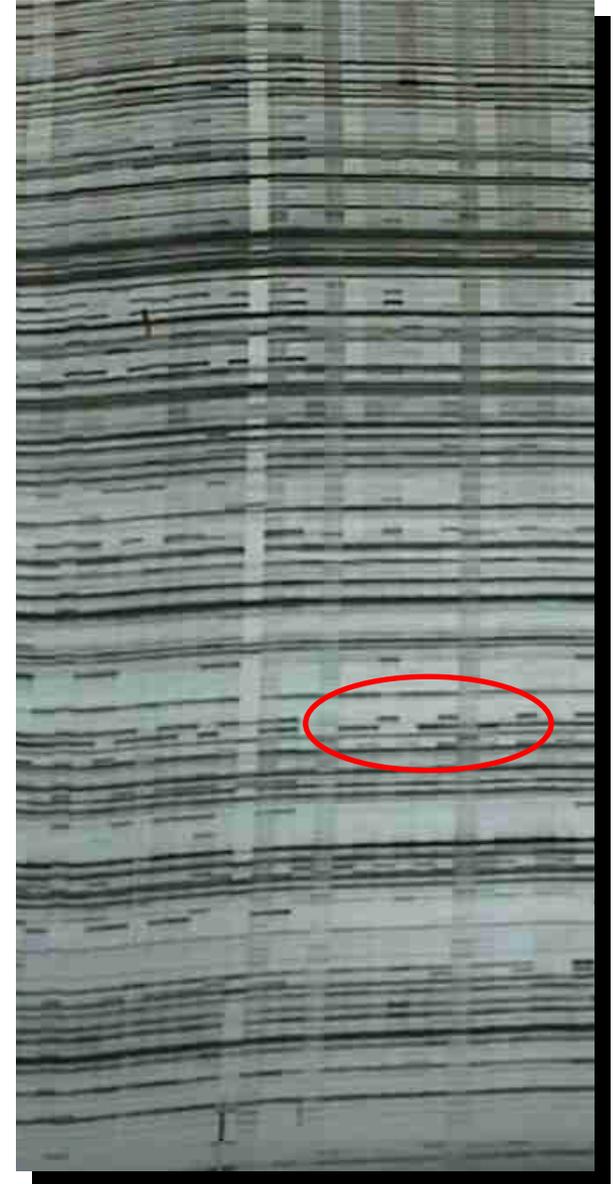


Géis de poliacrilamida
corados com prata ou o
iniciador EcoRI marcado
(Eco-Eco; Eco-Mse)

CADA BANDA É UM MARCADOR

Cada banda corresponde a um lugar diferente e aleatório do
genoma.

Dominante ou recessivo??????

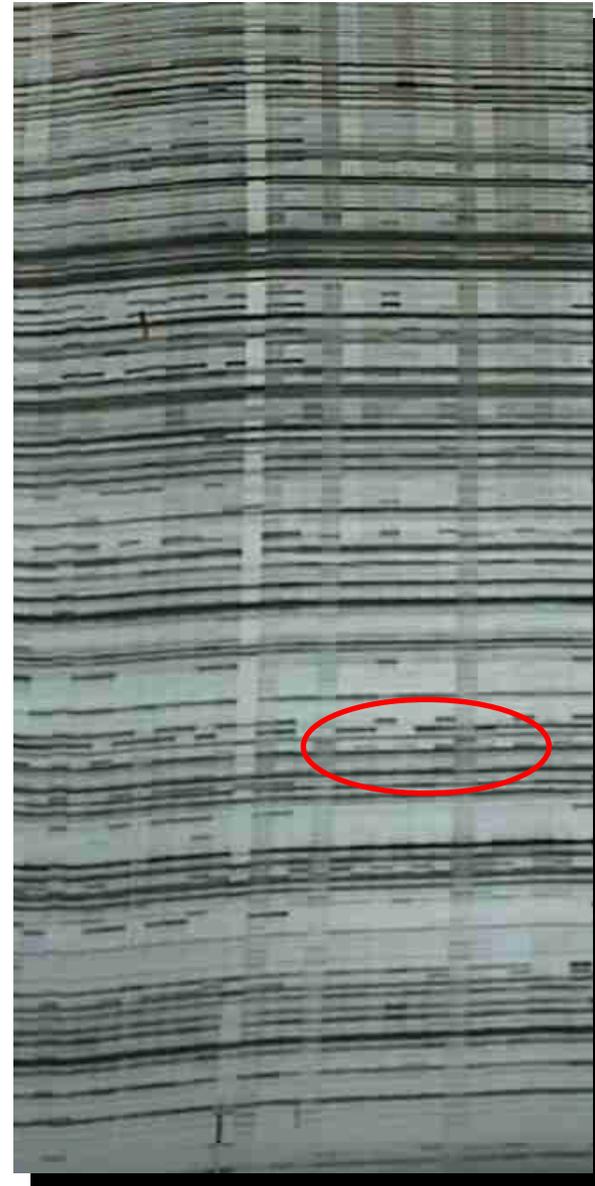


Marcador Molecular Genotípico: AFLP (amplified fragment length polymorphism)

CADA BANDA É UM MARCADOR

Dominante!!!!!!!!!!

**Caso haja mutação em sitio de restrição
alguma banda nova vai aparecer ou
alguma vai sumir.**

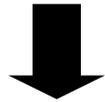


Marcador Molecular Genotípico:
STS (sequence-tagged sites) ou SCAR

Amplificação por PCR de un marcador específico:
conversão dos RFPLs em marcadores de PCR.



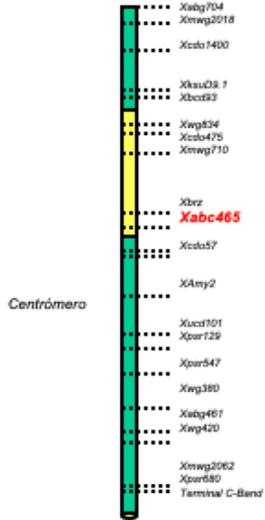
Evitam-se o southern, hibridación e uso de radioativo



**úteis para programas de melhoramento
assistido**

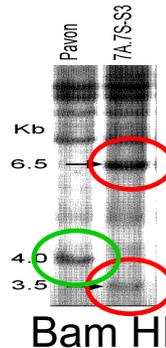
Marcador Molecular Genotípico: STS (sequence-tagged sites) ou SCAR

Mapa genético do cromossomo 7A

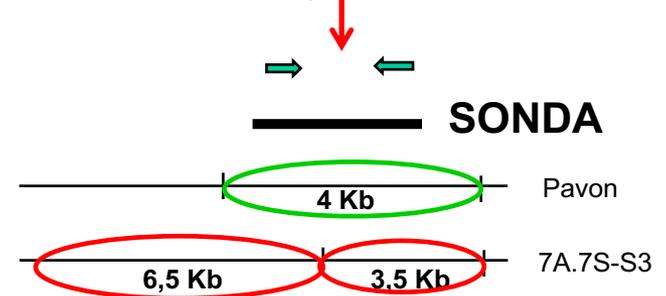


1-Banda presente no genotipo P7A.7S-S3 que cosegrega com o meu carácter de interesse

RFLP de ADN genômico de P7A.7S-S3 digerido com Bam HI

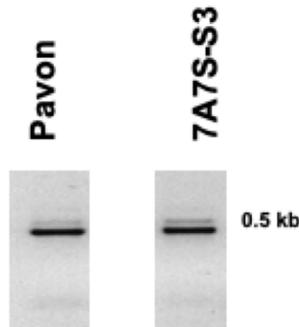


Sítio Bam HI presente em 7A7S-S3

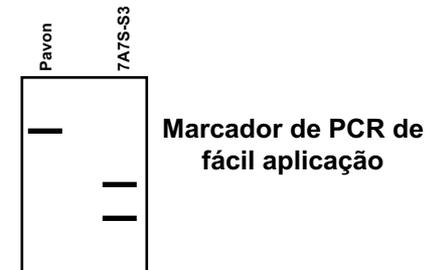


2- Amplificação por PCR de Pavon e 7A7S-S3 com primers desenhados sobre a sequência da sonda

Sítio Bam HI presente em 7A7S-S3



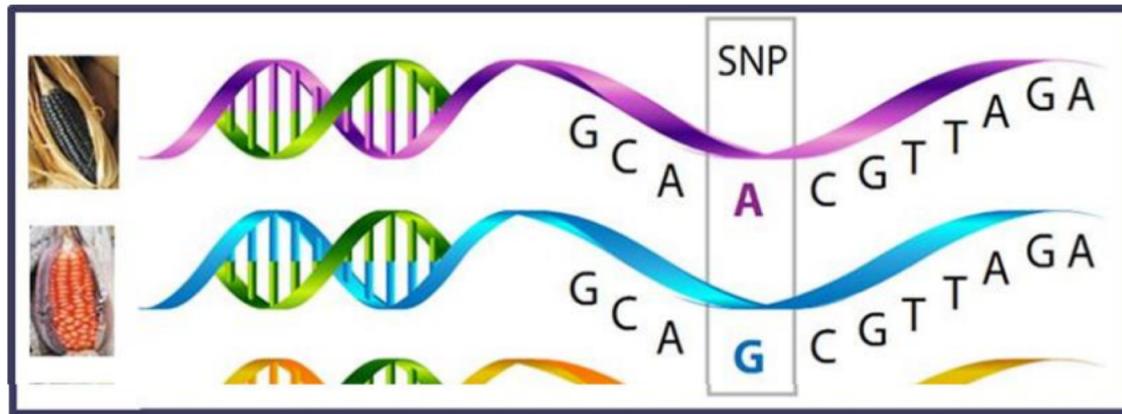
3-Amplificação, digestão com Bam HI e gel de agarose



Marcador Molecular Genotípico: SNPs (single nucleotide polymorphism)

Sequenciamento total do genoma

SNP (*Single nucleotide polymorphism*)



A frequência de SNPs nos genomas vegetais é de 1pb cada 100–500 bp, dependendo da espécie:

- 1 SNP/490 bp em soja
- 1 SNP/540 bp em feijão

Marcador Molecular Genotípico: SNPs (single nucleotide polymorphism)

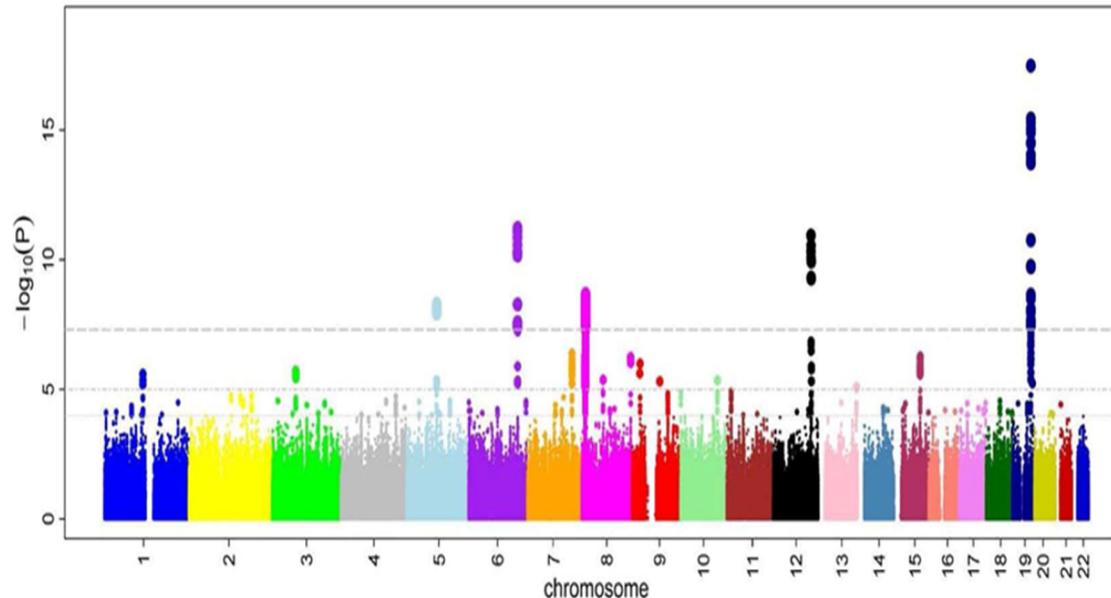
GWAS (genome wide association study)

Sequenciamento completo do genoma de muitos indivíduos por NGS



Analisar a correlação (regressão) entre a presença de um SNP e determinado caráter

Our population-based genome-wide association study demonstrates four novel loci associated with retinal venular caliber, an endophenotype of the microcirculation associated with clinical cardiovascular disease.



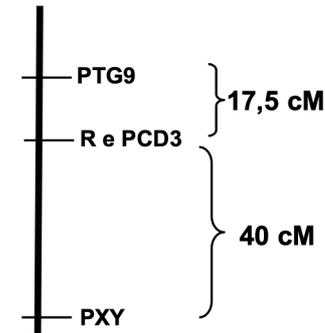
Construindo um mapa genético

- 1 marcador fenotípico qualitativo (R, S e Parcialmente)
- 3 marcadores moleculares de RFLP
 - espécie diploide
 - 20 indivíduos F2

	Parentais		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sonda/ Marcador	R	S	P	P	R	R	P	R	R	P	R	R	P	P	R	S	R	S	R	S	P	R
PTG9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCD3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PXY	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Analisando apenas contra o fenótipo:

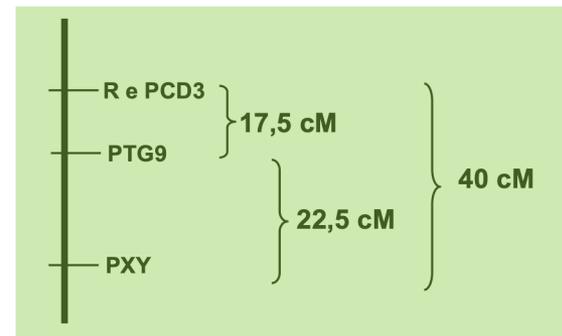
- PCD3: 0 gametas recombinantes com o fenótipo (0 cM)
- PTG9: 7 gametas recombinantes com o fenótipo ($17,5 \text{ cM} = 7 \cdot 100/40$)
- PXY: 16 gametas recombinantes com o fenótipo ($40 \text{ cM} = 16 \cdot 100/40$)



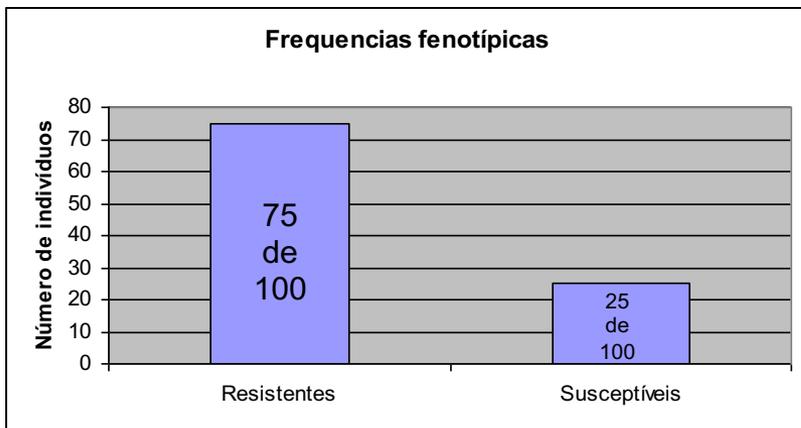
MAS

Analisando distâncias entre os marcadores:

- PTG9 vs PCD3: 7 recombinantes (17,5 cM)
- PTG9 vs PXY: 9 recombinantes (22,5 cM)
- PXY vs PCD3: 16 recombinantes (40 cM)



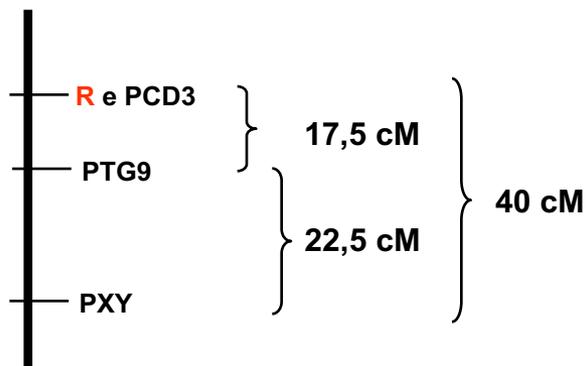
Caracteres qualitativos



Segregação mendeliana, neste caso: 3:1
 Determinados por genes **únicos** **dominantes**

Sonda/ Marcador	Parentais		1
	R	S	P
PTG9	—	—	—
PCD3	—	—	—
PXY	—	—	—

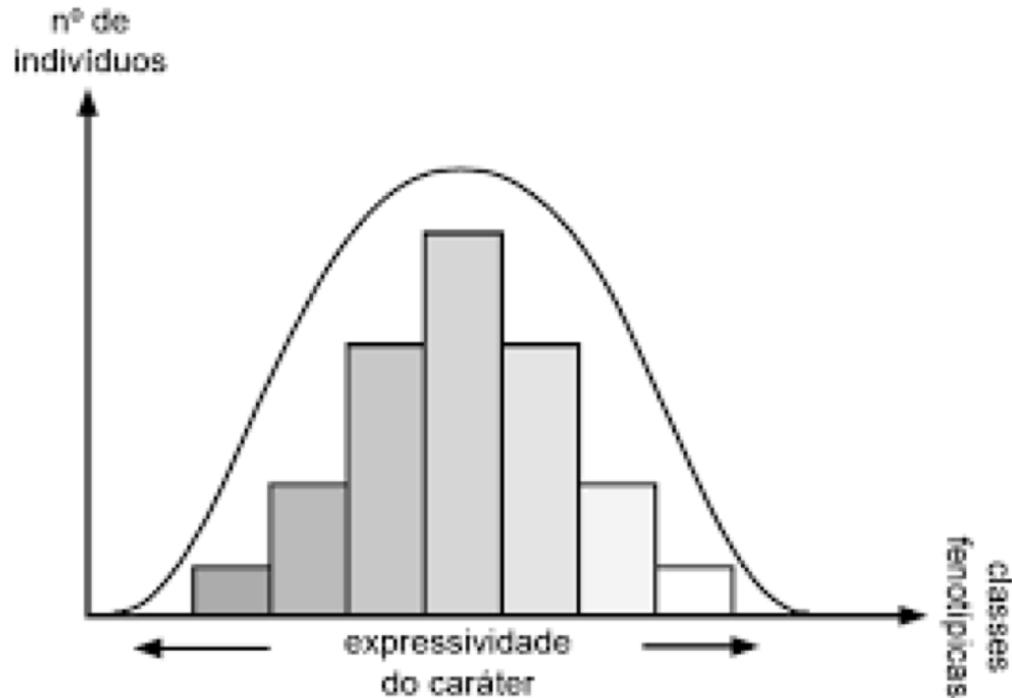
Segregação mendeliana, neste caso: 1:2:2:1
 Determinados por genes **únicos** **co-dominantes**



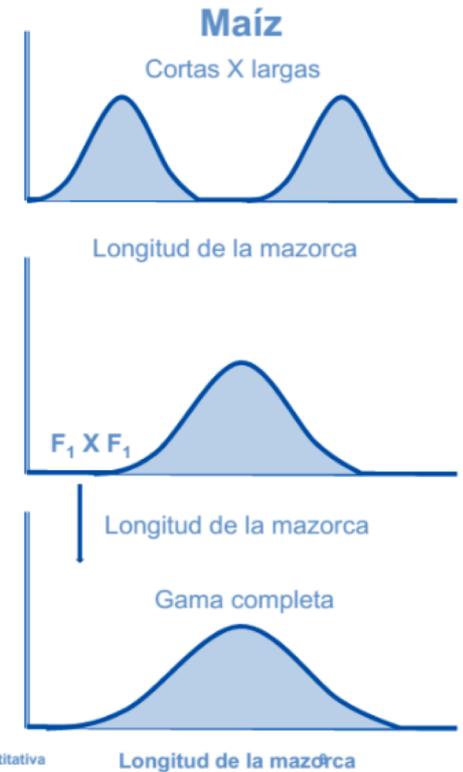
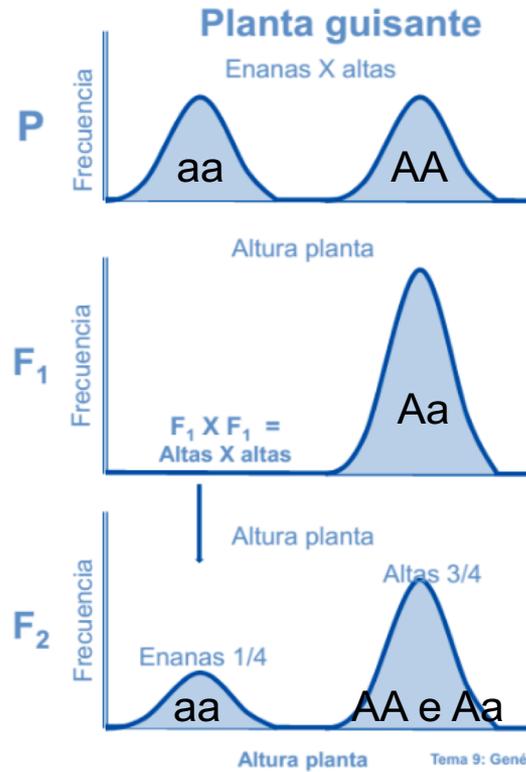
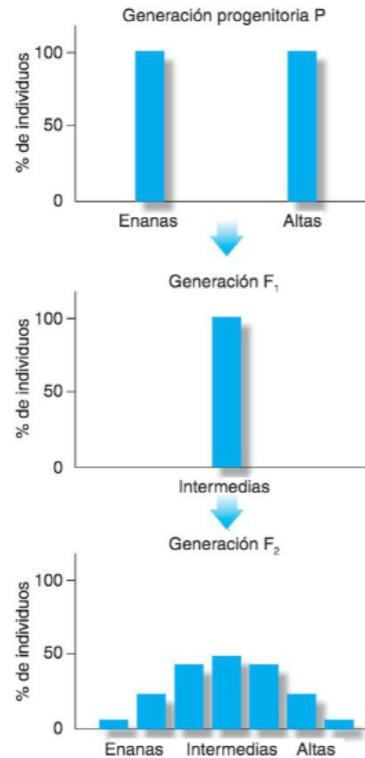
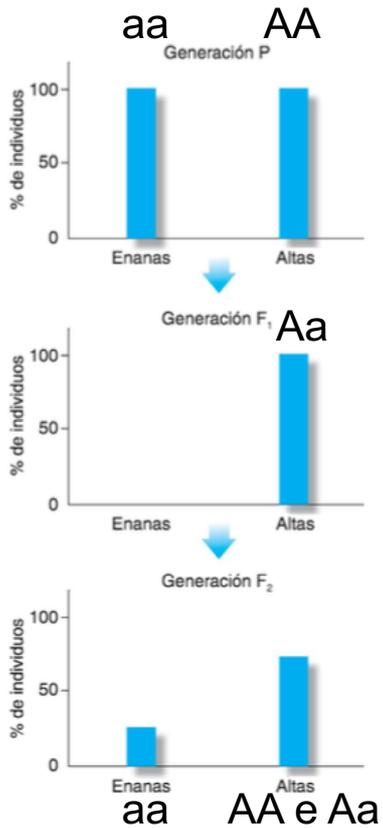
Mapeo e localizo facilmente

Caracteres quantitativos

- Distribuição contínua.
 - Determinados pela ação de vários genes que atuam de forma aditiva sobre o caráter.
 - Cada gene possui um padrão de heritabilidade próprio.
 - Influência ambiental.
- e.g. peso, altura, rendimento, etc



Caracteres cualitativos vs cuantitativos

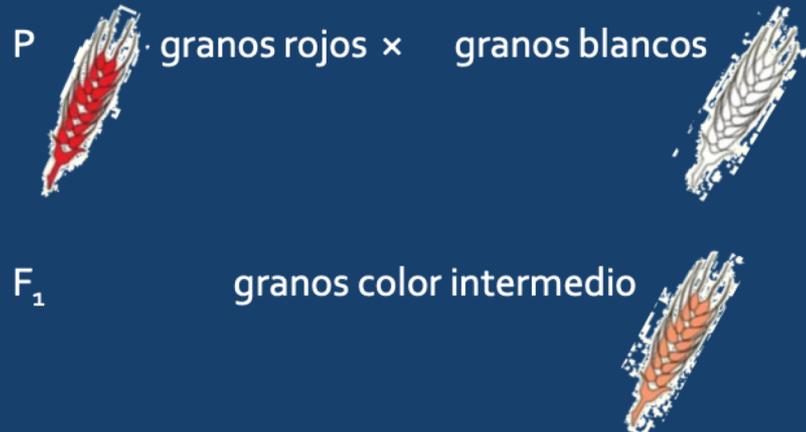


Caracteres cuantitativos



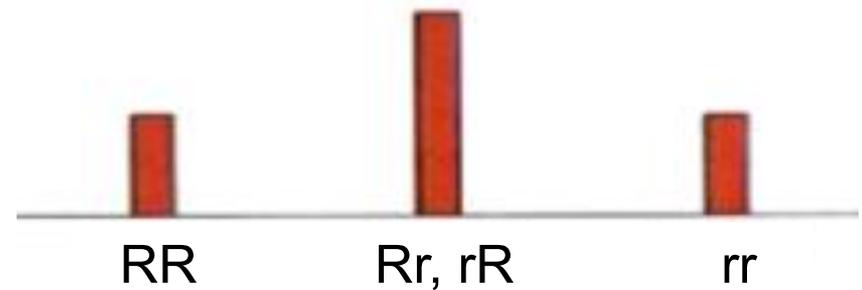
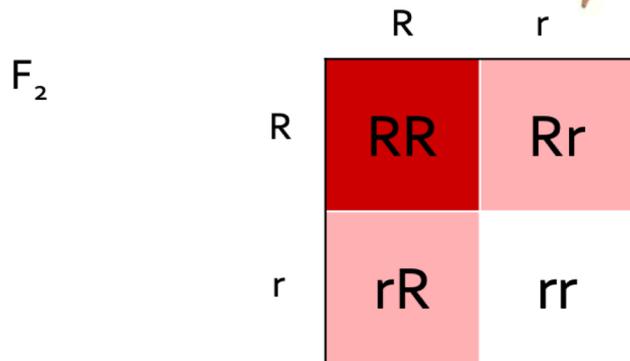
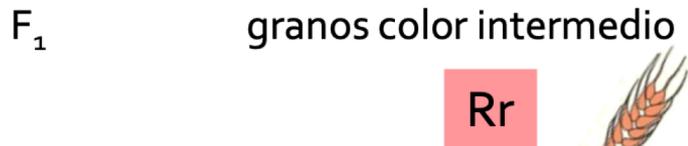
EXPERIMENTO NILSSON-ELHE

- Primer experimento (1909) sobre herencia poligénica.
- Intensidad de color del grano de trigo: rojo a blanco.
- Cruzó 2 líneas puras que diferían en color, la F_1 tuvo un color intermedio, y en la F_2 obtuvo al menos 7 clases fenotípicas.



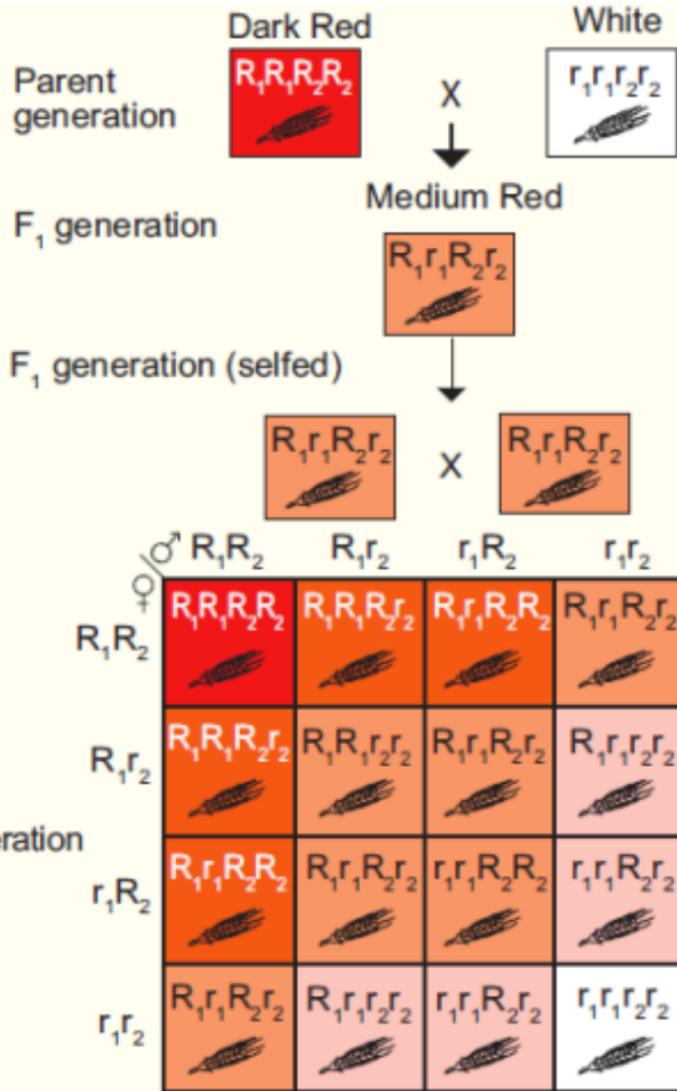
Como se explica????

1 gene de herança codominante

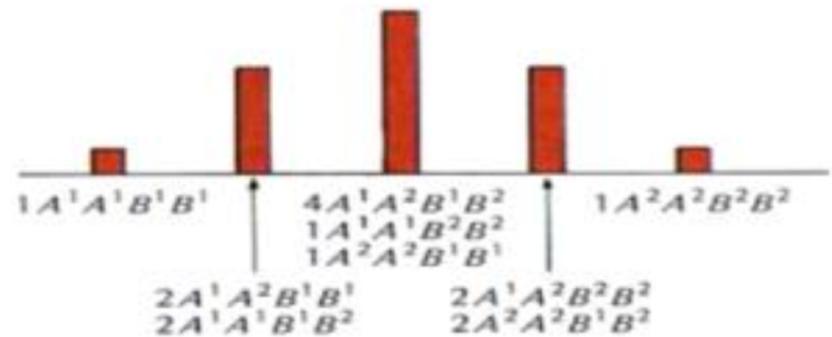


Três classes fenotípicas

2 genes de igual efeito e herança codominante



1:3:8:3:1



Cinco classes fenotípicas
(2° lei de Mendel)

Cálculo das frequências fenotípicas

Binômio de Newton $(p+q)^{2n}$

n : número de loci; p e q frequências segundo herança

- $(a + b)^0 = 1 \rightarrow$ todo número elevado a zero é igual a 1.
- $(a + b)^1 = a + b \rightarrow$ todo número elevado a 1 é igual a ele mesmo.
- $(a + b)^2 = (a + b) (a + b) = a^2 + 2ab + b^2$
- $(a + b)^3 = (a + b) (a + b) (a + b) = (a+b) (a^2 + 2ab + b^2) = a^3 + 3a^2b + 3ab^2 + b^3$

No caso de codominância

En ausencia de dominancia el binomio sería

$$\left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}\right)^{2n}$$

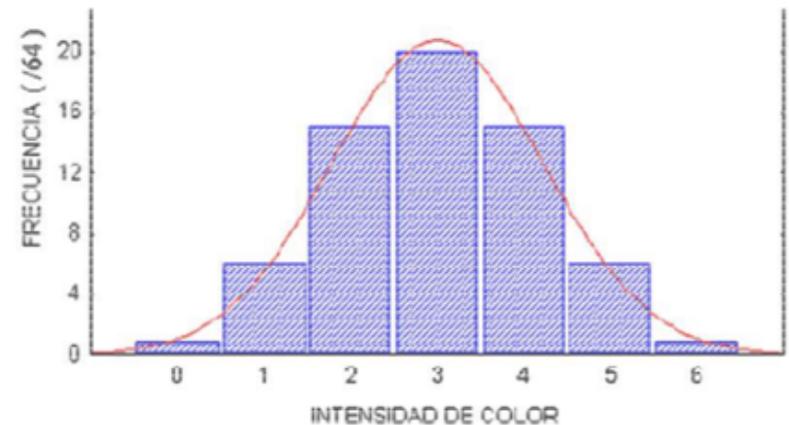
Así, con 1 *locus* tendremos el $\left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}\right)^2 = \frac{1}{2} + \frac{1}{4} + \frac{1}{2}$

con 2 *loci* $\left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}\right)^4 = \frac{1}{16} + \frac{4}{16} + \frac{6}{16} + \frac{4}{16} + \frac{1}{16}$

y con 3 *loci* $\left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}\right)^6 = \frac{1}{64} + \frac{6}{64} + \frac{15}{64} + \frac{20}{64} + \frac{15}{64} + \frac{6}{64} + \frac{1}{64}$

3
5
7

3 loci

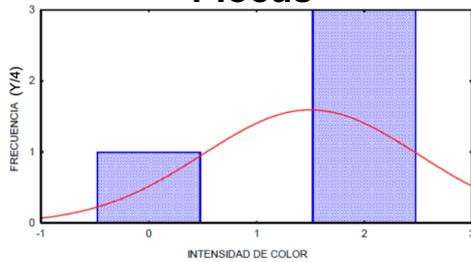


Cálculo das frequências fenotípicas

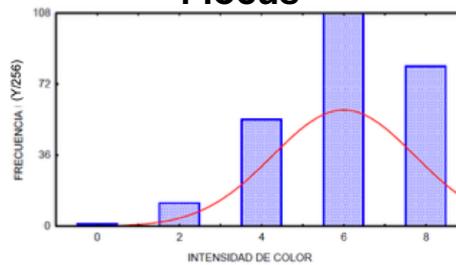
No caso de dominância

$$\left(\frac{3}{4} + \frac{1}{4}\right)^n$$

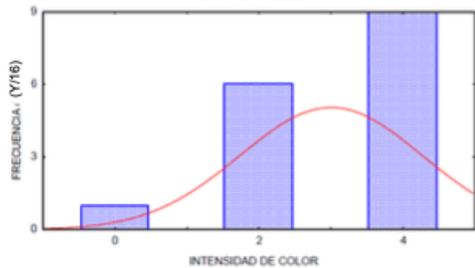
1 locus



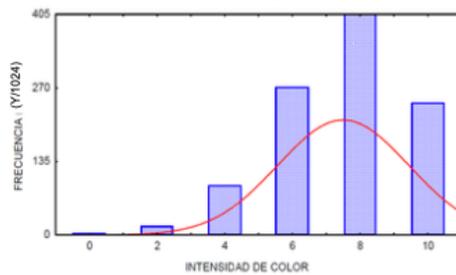
4 locus



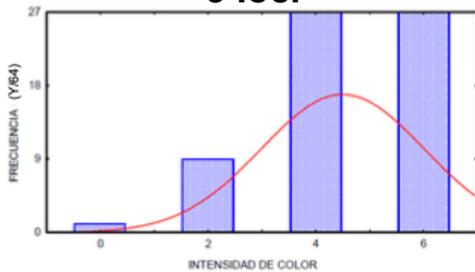
2 loci



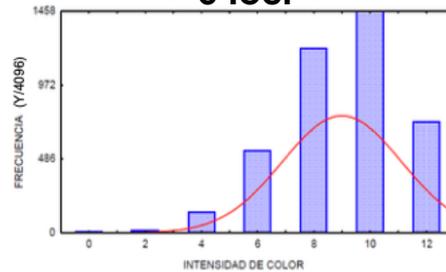
5 loci



3 loci



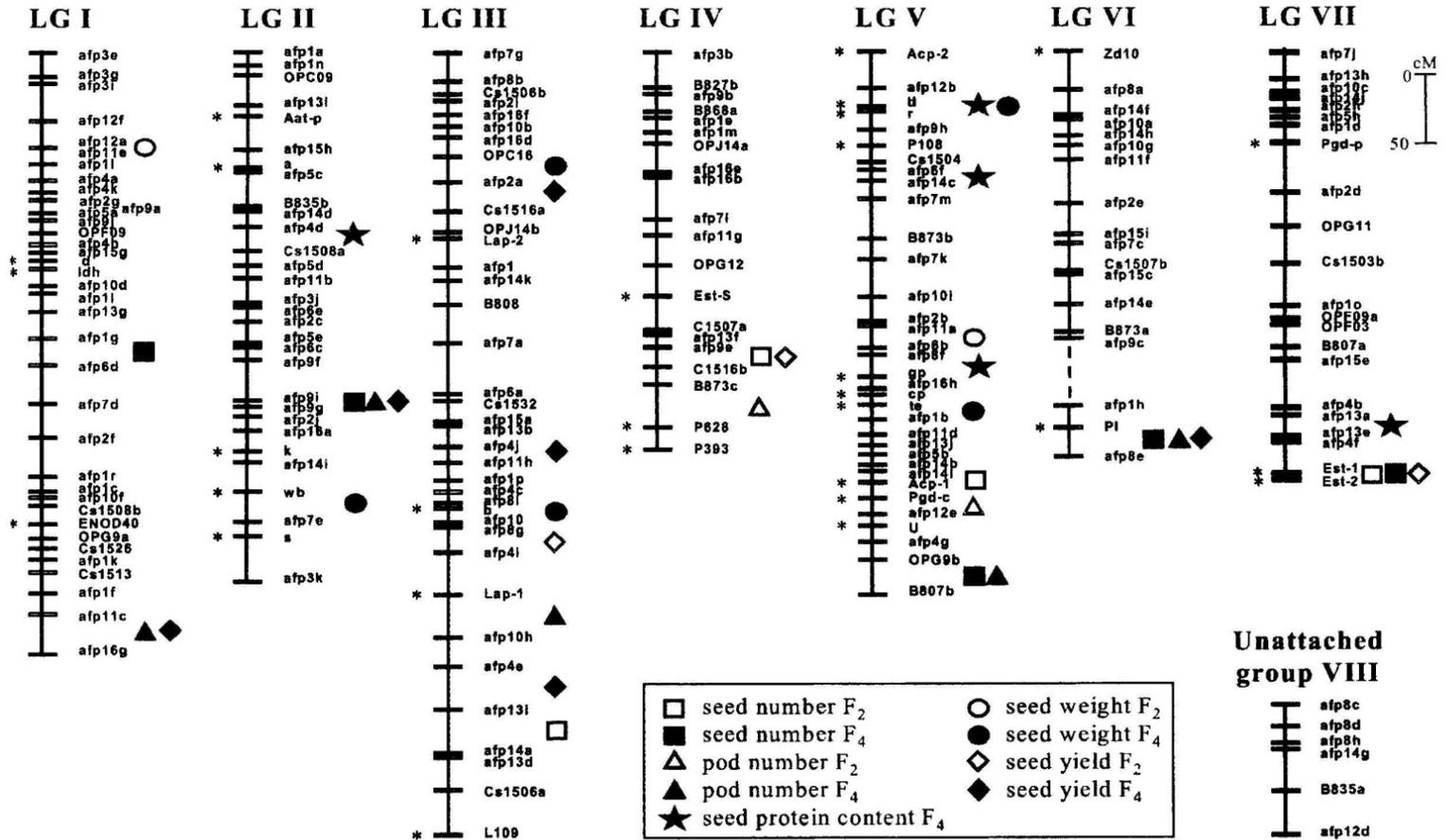
6 loci



São necessários muitos mais loci para aproximar à curva normal

Mapeamento de caracteres quantitativos

QTLs controlling yield-related traits in *Pisum sativum* (Irzykowska and Wolko 2004)



Posso clonar um QTL??? Do QTL ao gene:

Fragmento do cromossoma 4 de tomate

Mapa genético

Mapa físico
Clones de uma biblioteca genômica

Genômica:
Sequenciamento dos clones e identificação de genes que possam estar relacionados aos caracteres de interesse

QTL
Caracteres quantitativos

HOJE TEMOS O GENOMA!!!!

SSR76 (37.5)
T1161 (38.0)
C2_At3g02870 (38.5)
vitE
C2_At1g44446 (40.5)
C2_At1g44790 (40.5)
C2_At3g17590 (43.0)
TG147 (45.0)
cLEB-7-L1 (46.0)
C2_At2g14260 (46.7)
T1460 (47.0)
TG47 (49.0)

SSR76 (37.5)

T1161 (38.0)

vitE

C2_At1g44446 (40.5)

100 Kb

ATTCTTGAT...TCAGGATCAG
TCCTAGTCTGCAT...TGACATGGACAATGAC
GTTACTGGTACACA...ATGACATGACAGATAT
GTCCTATAGATACCAGAC...ATGACAGATACGAT

Aqui está o gene!!!!

