

LGN0232 - Genética Molecular

**Marcadores Moleculares:
Uso no Melhoramento e na Conservação**

Aula 11

Antonio Figueira

CENA

figueira@cena.usp.br

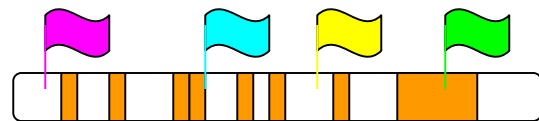
Genética e Melhoramento

- Seleção inconsciente e “arte”
 - da invenção da Agricultura até século XIX
- 1900s – (Re)descoberta* dos princípios genéticos de Mendel
- 1920-50 - Melhoramento genético científico
 - Genética quantitativa e biometria
(fenótipo é previsor ruim do valor genético!)
- 1970-80s em diante – desenvolvimento de marcadores **genéticos** moleculares

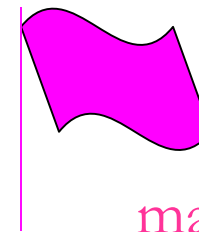
* [Carl Correns](#), [Erich von Tschermak](#) e [Hugo De Vries](#)

Genética e Melhoramento

- Sucesso no melhoramento depende da capacidade de **distinguir fatores genéticos herdáveis dos ambientais**
- Marcadores genéticos são unidades herdáveis simples
- Marcadores genéticos quando associados a características de interesse aumentam a eficiência de seleção



cromossomo

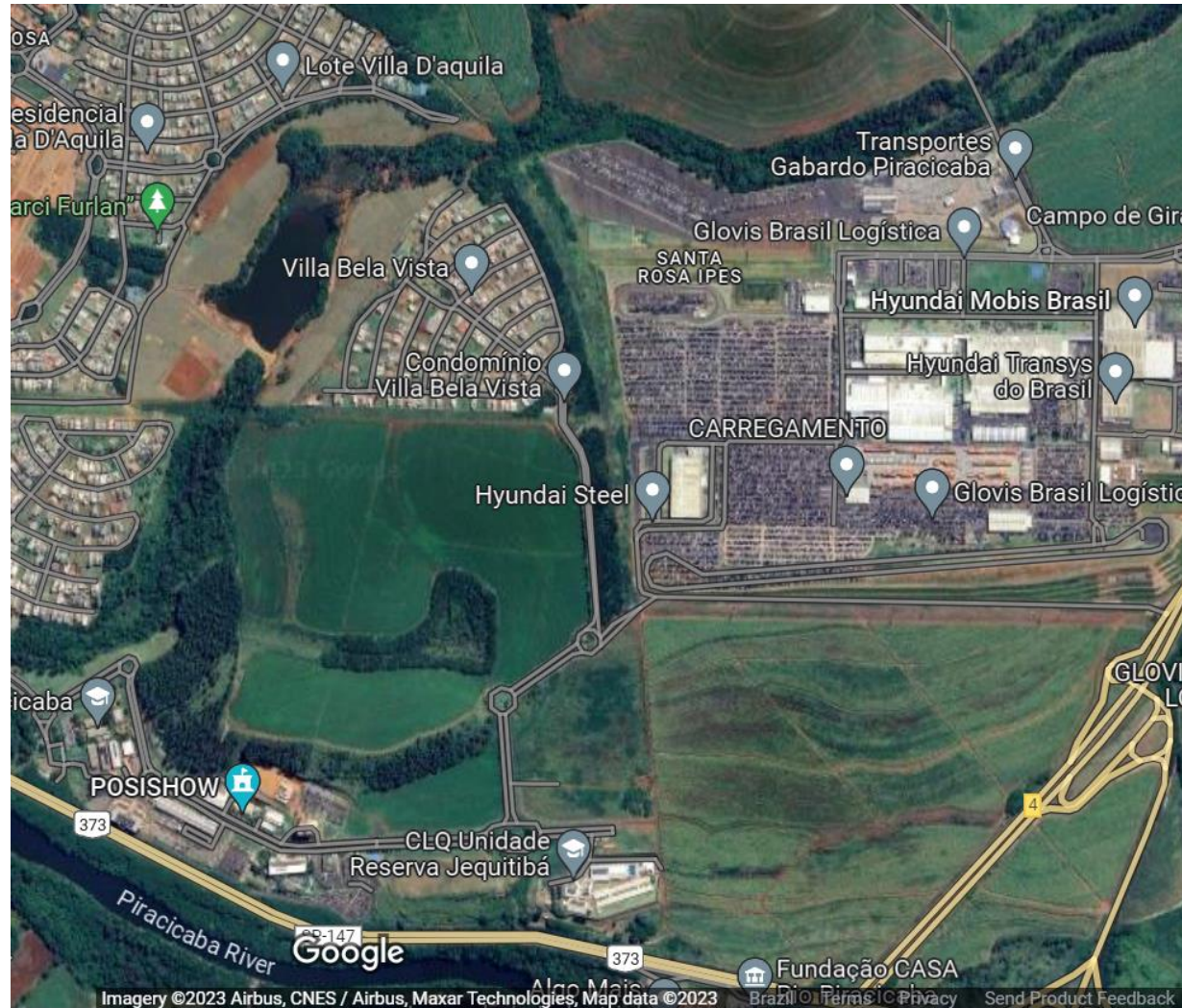


marcadores

Mapa de local em Piracicaba



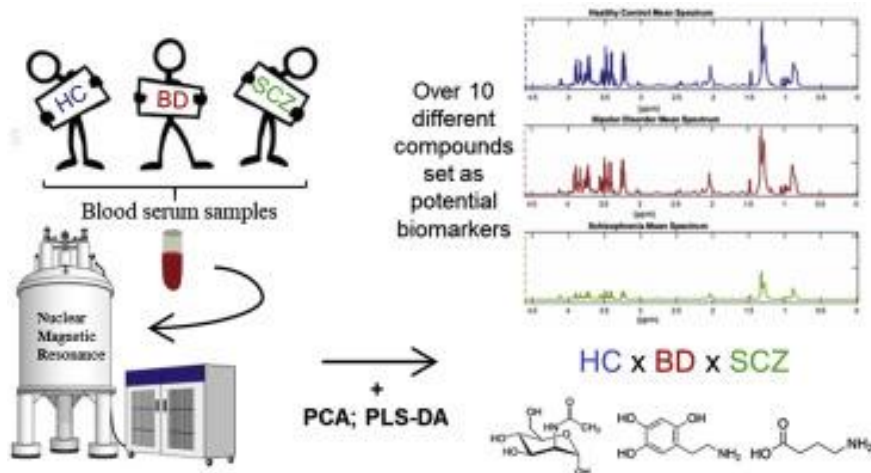
Mapa de local em Piracicaba



“Marcadores” ???

Peripheral biomarkers allow differential diagnosis between schizophrenia and bipolar disorder

Ljubica Tasic^a, Acioly L.T. Larcenda^{b,c}, João G.M. Pontes^a, Tássia B.B. C. da Costa^a, João V. Nani^{d,g}, Lucas Gelain Martins^a, Leonardo A. Santos^c, Marielle F.Q. Nunes^{b,c}, Marcelo P.M. Adelino^{b,c}, Mariana Pedrini^b, Quirino Cordeiro^e, Felipe Bachion de Santana^f, Ronei J. Poppi^f, Elisa Brietzke^b, Mirian Akemi Furuie Hayashi^{d,g}



Ex. Marcador bioquímico em sangue

Exame de sangue permite diagnosticar esquizofrenia e bipolaridade



Estudo pode levar a exame capaz de diagnosticar esquizofrenia e bipolaridade

07 de agosto de 2020



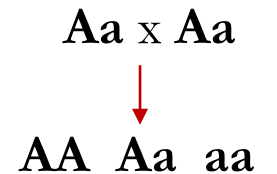
Maria Fernanda Ziegler | Agência FAPESP – Metodologia desenvolvida por pesquisadores brasileiros poderá permitir a criação de um exame de sangue capaz de diagnosticar duas doenças psiquiátricas com sintomas semelhantes: a esquizofrenia e o transtorno bipolar.



Metodologia desenvolvida por pesquisadores da Unifesp e da Unicamp se baseia na análise do padrão de metabólitos presentes no sangue; inovação foi patenteada e descrita no *Journal of Psychiatric Research*.

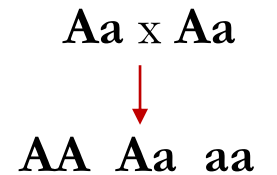
Mas o que é um Marcador Genético?

- Variação ou polimorfismo que, numa população segregante, se comportam de acordo com as leis Mendelianas!
- Baseiam-se na existência de variabilidade genética e na possibilidade de sua detecção
- **Tipos:**
 - **Morfológicos**
 - Bioquímicos (isoenzimas)
 - Moleculares – DNA (microsatélites, SNPs)



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 genética e na possibilidade de sua detecção
- **Tipos:**
 - **Morfológicos**
 - Bioquímicos (isoenzimas)
 - Moleculares – DNA (microsatélites, SNPs)

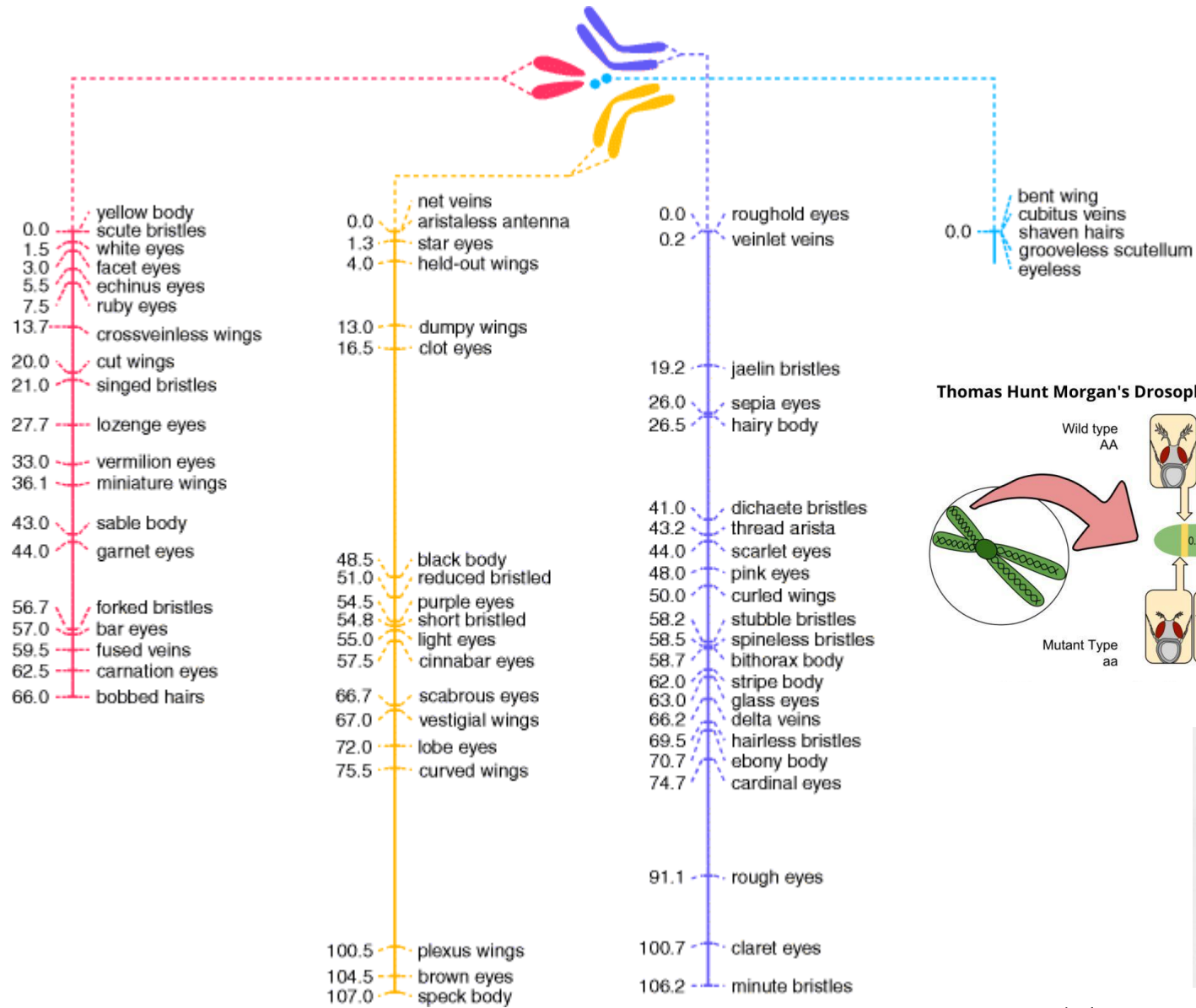


O ideal seria sequenciar todos os genótipos, mas.....

Se usa Marcador Genético Molecular como proxy!



Clockwise, from the top: brown eyes, cinnabar (a shade of deep red), sepia, vermilion (a shade of orange-red), white, and red. The white-eyed fly also has a yellow body



Thomas Hunt Morgan
Nobel de 1933

Drosophila – mapa genético com marcas morfológicas

Marcadores Morfológicos

ISSN 1022-7954, Russian Journal of Genetics, 2020, Vol. 56, No. 12, pp. 1406–1415. © Pleiades Publishing, Inc., 2020.
Russian Text © The Author(s), 2020, published in Genetika, 2020, Vol. 56, No. 12, pp. 1366–1377.

REVIEWS AND THEORETICAL ARTICLES

Morphological Genetic Markers in Plants

Yu. V. Chesnokov^{a, *}, V. M. Kosolapov^b, and I. V. Savchenko^c

^aAgrophysical Research Institute, St. Petersburg, 195220 Russia

^bWilliams Federal Research Center for Forage Production and Agroecology, Lobnya, Moscow oblast, 141055 Russia

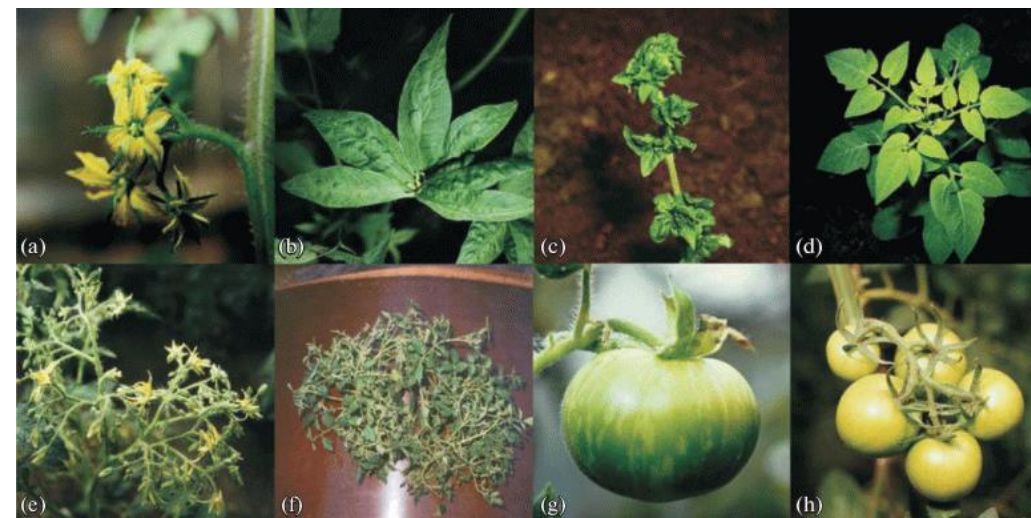
^cAll-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, 117216 Russia

*e-mail: yuv_chesnokov@agrophys.ru

Received January 14, 2020; revised February 7, 2020; accepted February 19, 2020

Abstract—The review discusses the possible use of morphological genetic markers in plants. Definitions and terminology of such concepts as “marker,” “phenotype,” “genotype,” “epigenotype,” and “genetic marker” are given. The properties and distinguishing features of genetic markers are given. Some mutant marker forms are described and the feasibility of creating and utilizing collections of mutant marker forms for their practical use in genetics and breeding of agricultural plants is considered. It is indicated that the main sources of genotypic variation, the basis, reflection, and manifestation of which is polymorphism, including marker polymorphism, which manifests itself not only at the morphological but also at the biochemical or molecular levels, are mutations and recombinations. The role and significance of the first phenotypic genetic markers obtained from the fruit fly *Drosophila* by means of experimental mutagenesis methods is noted; it allowed T. Morgan and colleagues to establish the exact location of the genes in the linkage groups and use it as a basis to create the first genetic “maps” of *Drosophila* chromosomes. The main disadvantages of morphological genetic markers are that they are few in number and are influenced by environmental factors or depend on the stage of development of the plant or its organ or tissue in which they are found. In addition, they do not cover the entire genome, but are located in certain genomic loci, in which the genes are concentrated. This means that it is not possible to use morphological markers that do not cover the entire genome for the purpose of genotyping or establishing genetic distances. However, despite these exceptions, morphological markers still remain a relevant and very useful scientific tool in genetic and breeding practices. Many of these markers are genetically linked to important economically significant and agronomic traits, which makes it possible to drastically reduce the cost and simplify the production of new forms significant for genetics and breeding. It is noted that the problem of genetic analysis of economically valuable traits can be a field of activity for further methodological optimization and “bridge building” between classical and molecular genetics and plant selection, as well as other biological disciplines.

Keywords: morphology, phenotype, genetic marker, terminology, marker forms in plants, marker-assisted selection



(a) mut 25 (*sl* gene); (b) mut 26 (*mc* gene); (c) mut 27 (*Cu* gene); (d) mut 28 (*yv*, *coa*, and *c* genes); (e) mut 34 (*mult* gene); (f) mut 35 (*fa* gene); (g) mut 36 (*gs* gene); (h) mut 38 (*u* gene)

Histórico de Marcadores

1. Karl Sax (1923): propôs método para localização de QTLs

ligação entre genes de característica qualitativa (cor de semente) e quantitativa (peso de semente)

Problema: ausência de mutações múltiplas em estoques de elite

2. Hunter & Marker (1957): marcas **bioquímicas** - proteínas

desenvolveram **isoenzimas** em gel de amido

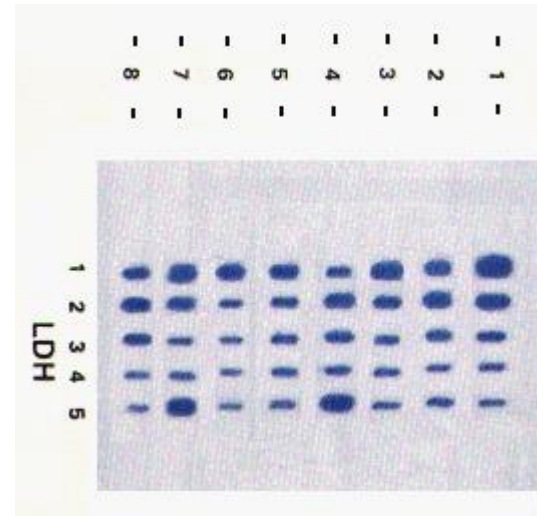
3. Hubby & Lewontin (1966)

demonstraram que 30% de loci de isoenzimas exibiam polimorfismo em populações selvagens de *Drosophila*

Marcadores Bioquímicos

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

- Monomorfismo



- Polimorfismo

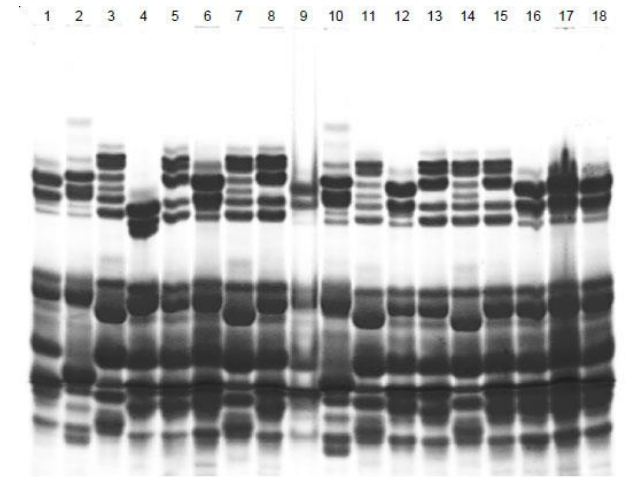


FIG. 1. Exemplo de um gel mostrando os eletroforegramas de hordeínas de cinco cultivares de cevada.

Slots (1), (9) e (18) contêm o padrão, cultivar BR 2. Cada slot contém extrato proteico de uma única semente das seguintes cultivares: Embrapa 43 (2), (3), (7), (10), (11), (14); Embrapa 127 (5), (8), (13), (15); Embrapa 128 (6), (12), (16); Embrapa 129 (4); BR 2 (17). O topo da figura é a origem (pólo positivo).

Histórico de Marcadores

1970s - ferramentas moleculares

desenvolvimento de vetores de clonagem; enzimas de restrição; polimerases; ligases; Southern (1977), **PCR** proposto por Mullis & Faloona (1987)

- **RFLP** proposto por Botstein *et al.* (1980) descrito para humanos
- **VNTR** por Jeffrey (1987)
- **RAPD** por Rafalski *et al.* (1990)
- **SSR (microsatélites)** em plantas por Akkaya *et al.* (1992)
- **AFLP** por Zabeau & Vos (1993)
- **SNPs** em *Arabidopsis* por Cho *et al.* (1999)

Origem do Polimorfismo Molecular

1. Mutações pontuais - SNPs

A. ATCTCGTGATTCCTAGTCGTA
TAGAGCACTAAGGGATCAGCAT ex. Sítio *Eco*RI

B. ATCTCGTGATTAATAGTCGTA
TAGAGCACTAATATCAGCAT

2. Pequenas inserções e/ou deleções- InDels

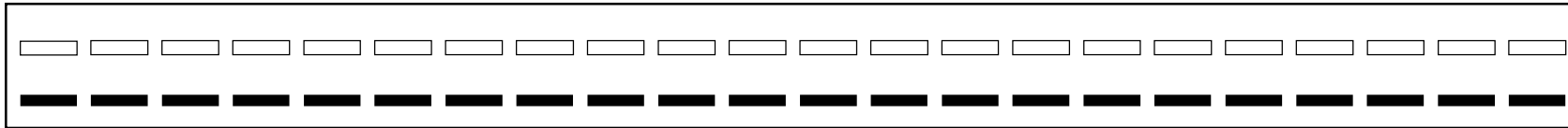
A. ATCTCGTCTAGTCGTA
TAGAGCAGATCAGCAT

B. ATCTCGT---GTCGTA
TAGAGCA---CAGCAT

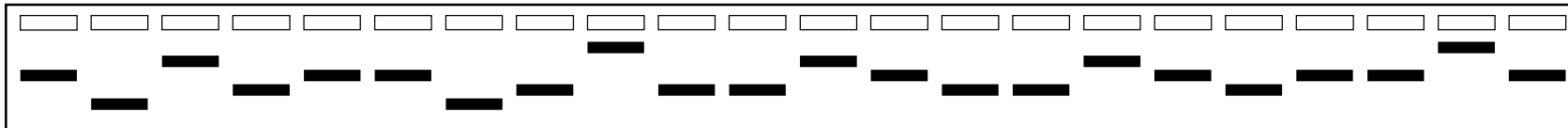
Marcadores Moleculares

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

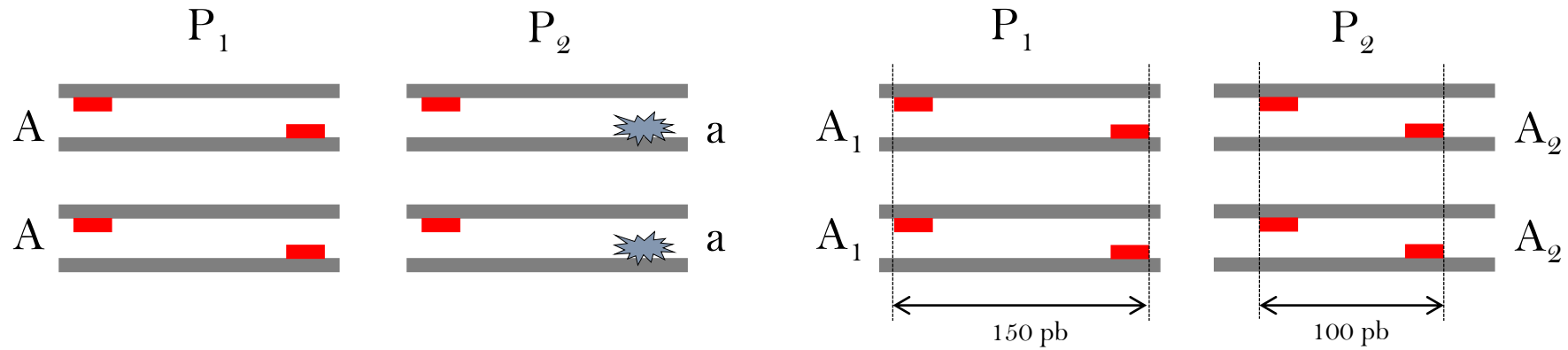
- **Monomorfismo**



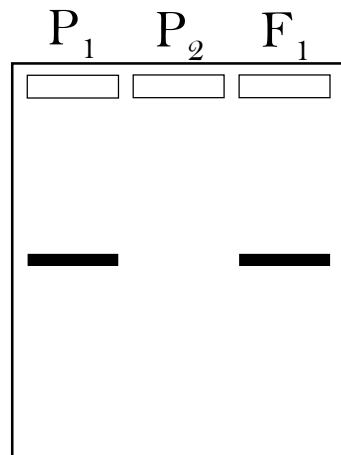
- **Polimorfismo**



Marcadores Dominantes ou Codominantes

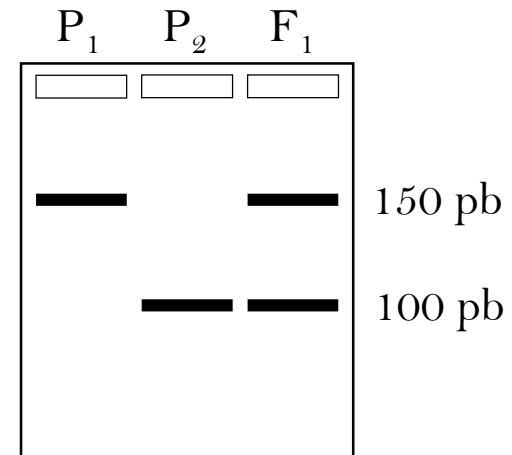


AA x aa
↓
Aa



Dominante

A₁A₁ x A₂A₂
↓
A₁A₂



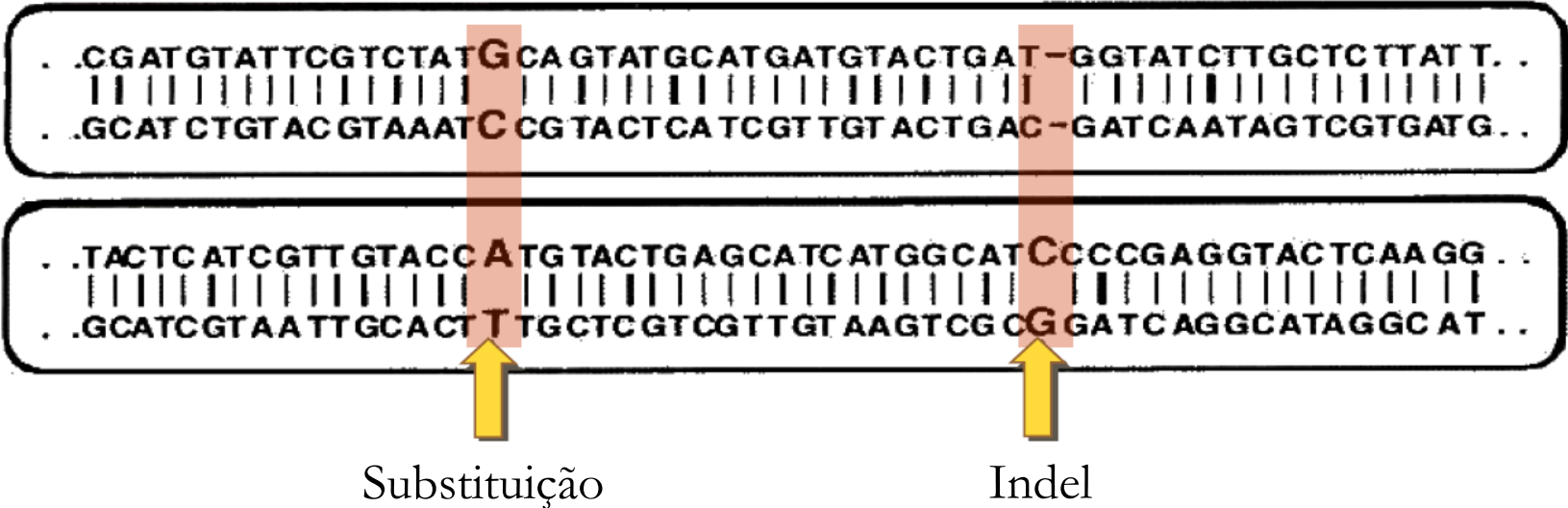
Codominante

Marcadores Moleculares - SNPs

Origem do polimorfismo

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

Polimorfismos de base: causados por substituição de bases nitrogenadas



Aplicações de Marcadores no Melhoramento

- **Mapeamento genômico**
 - Seleção Assistida por Marcadores - MAS
 - Seleção Genômica - GWAS
 - Clonagem/Identificação de genes
- **Diversidade genética e filogenia**
 - Conservação e caracterização de germoplasma
 - Identificação de acessos
 - Seleção de genitores para cruzamentos e populações
 - Filogenia e Evolução

Marcadores Moleculares em Uso

MICROSSATÉLITES ou SSR

Simple Sequence Repeats = SSR

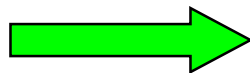
Sequências simples repetidas

- Pequenas sequências de DNA (1 a 6 nucleotídeos) repetidos em linha (*tandem*)
- Presentes em Eucariotos e Procariotos
- Presentes em região codificadora ou não codificadoras
- **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 ou SSR

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 GGATATATAA TTATTGTTTCG TGTTTTTTTT TTTAATCCAA ACTTTATAAT
CTTTCCAAGT GCTTTTCTCC TCCCTGTCTT TTTCTCTAC CACACACACA CACACACACA CACA CTCATA CAGAAAAAGG
AAAAAGGAAA GAAAGAGAAC AGGAGATATA AAAACCTTTT TTCTTTATCA ATTAGATAAT TAGTTATAAA AGTTTTTCTC
CTGCTTCTTA TCCCTCCGCT AAATGCCTGA TTAACCTTCT GCTGGTAAAG ATTTAAAATA ACTTGTTAAT TTTGGACATG

Primer FOR



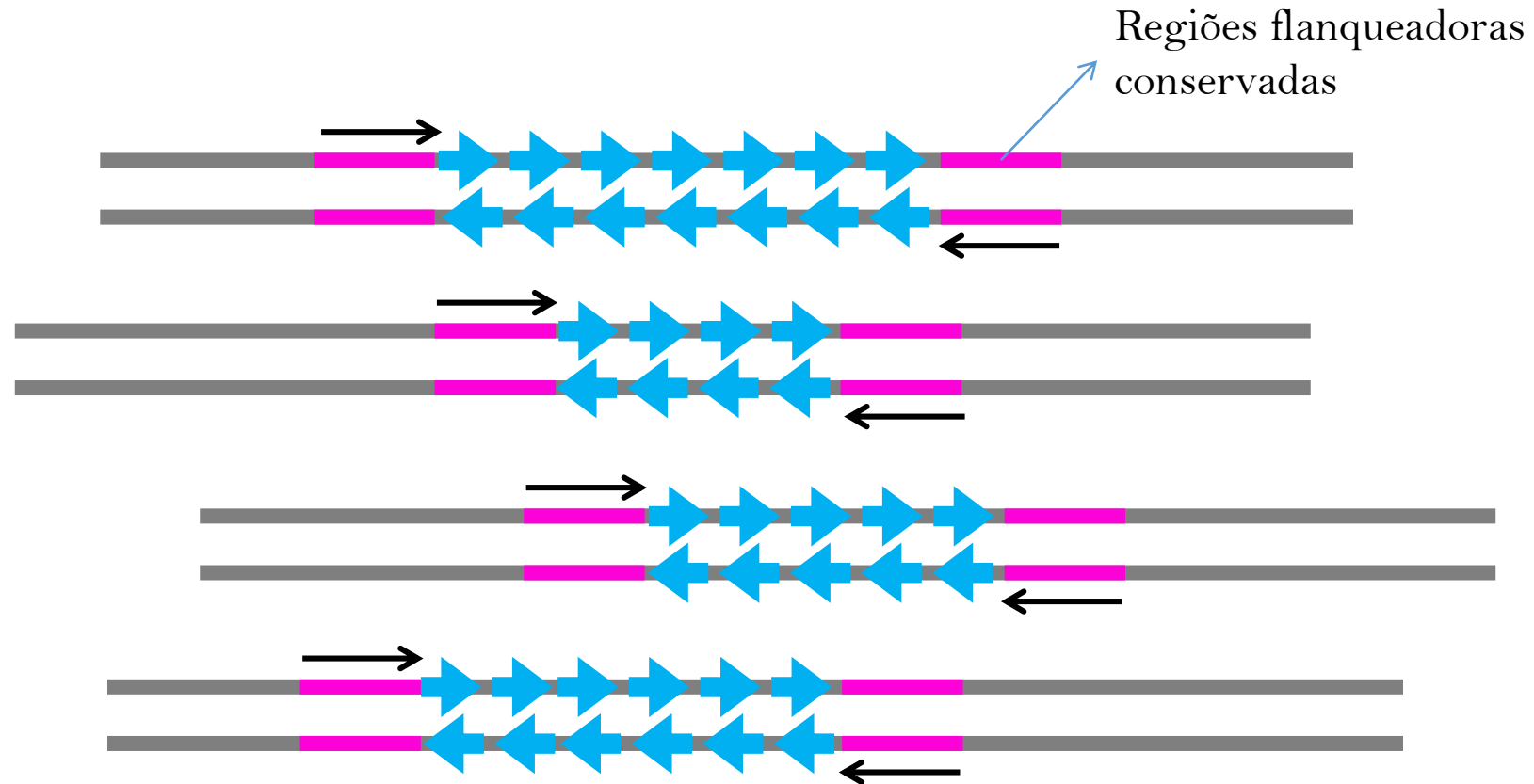
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CACACACACACACACACACAC NNNNNNNNNN NNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN GTGTGTGTGTGTGTGTGTG NNNNNNNNNNNNNNNNNNN

Repetição CA/GT



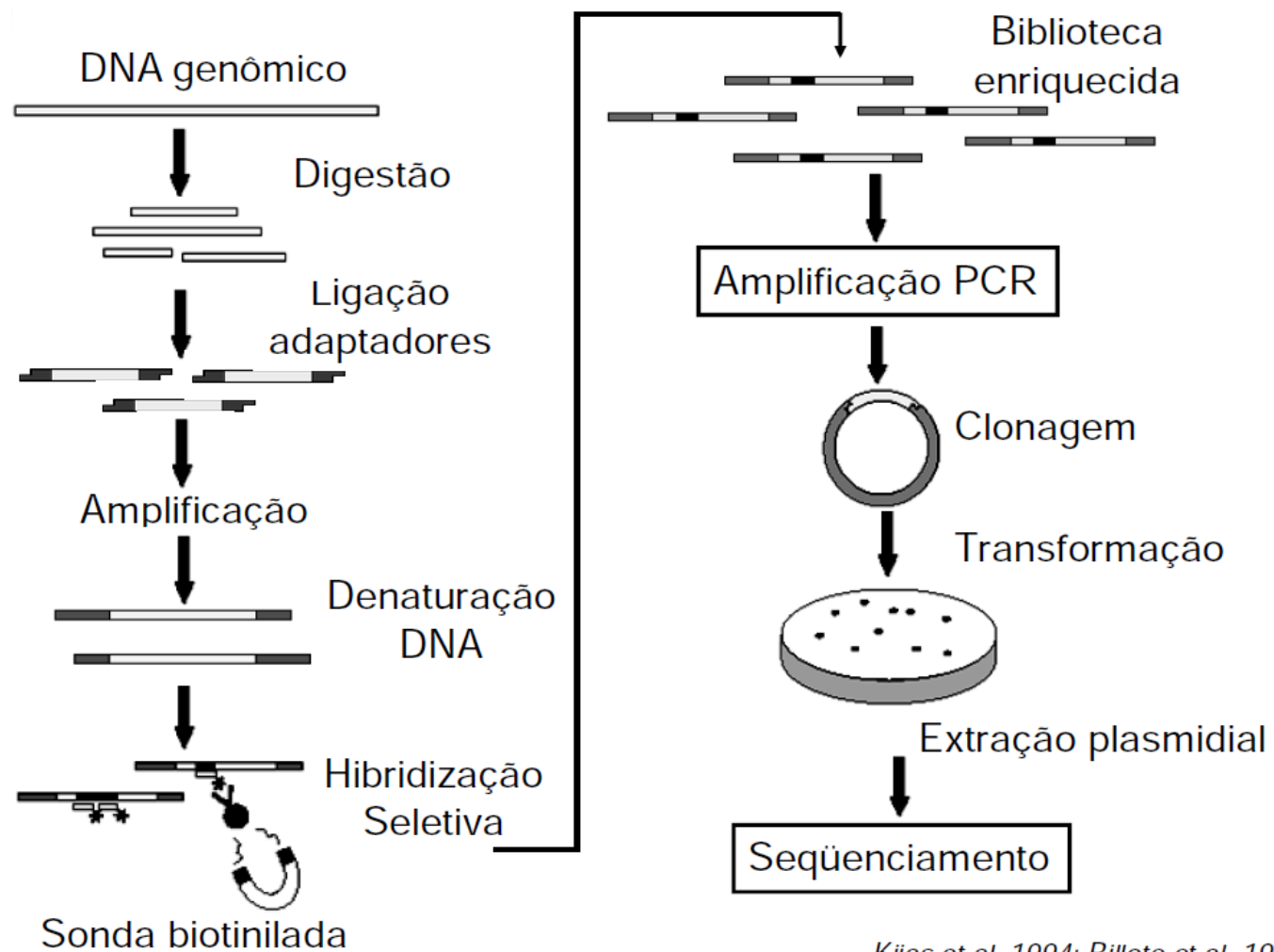
Primer REV

MICROSSATÉLITES ou SSR

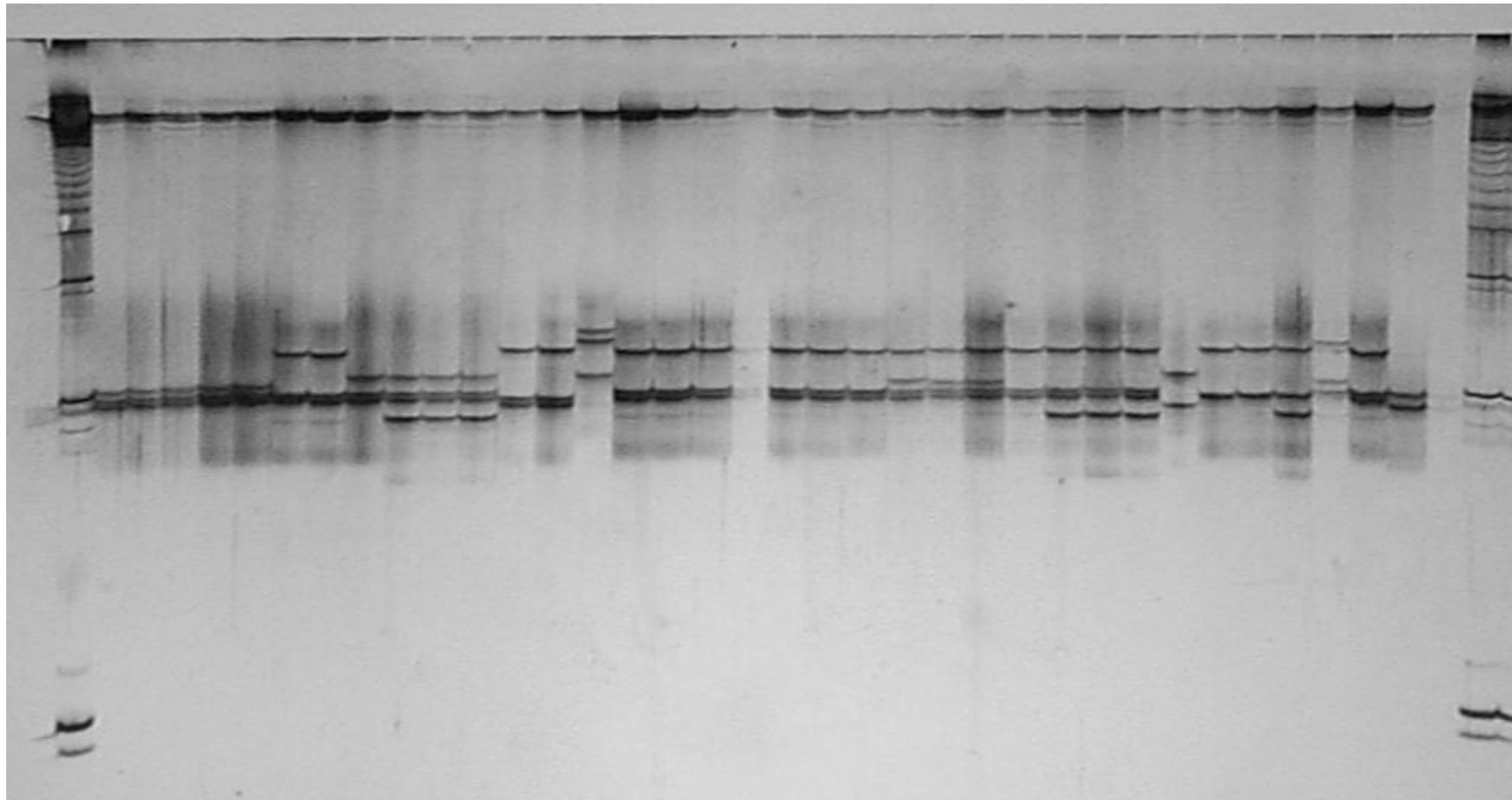


MICROSSATÉLITES ou SSR

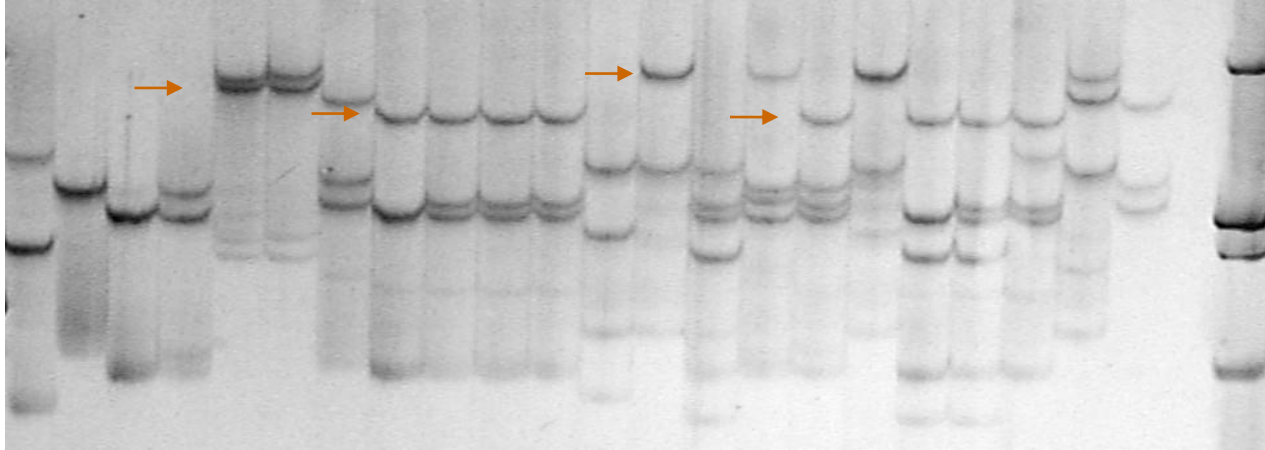
Biblioteca genômica enriquecida com microssatélites



Microssatélites (SSR)

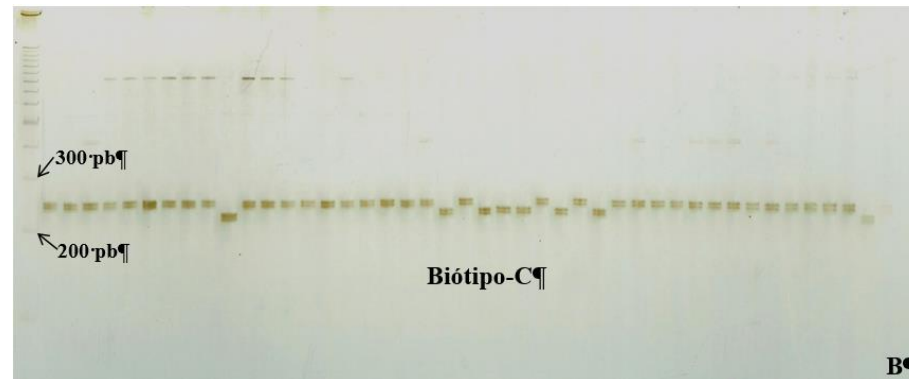
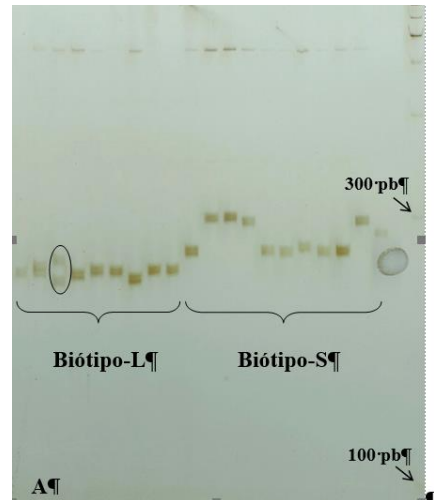


Microssatélites (SSR)



Seta: alelos genoma B

Musa balbisiana



Microsatélites (SSR)

Vantagens

- Baseiam-se em PCR
- Altamente reprodutíveis
- Codominantes e multialélicos
- **Desvantagens**
 - Há necessidade de informações de sequências oriundas de bibliotecas genômicas ou de cDNA
 - Custo inicial
 - Baixa saturação

Ainda apresenta indicações de uso

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

Polimorfismo de base única

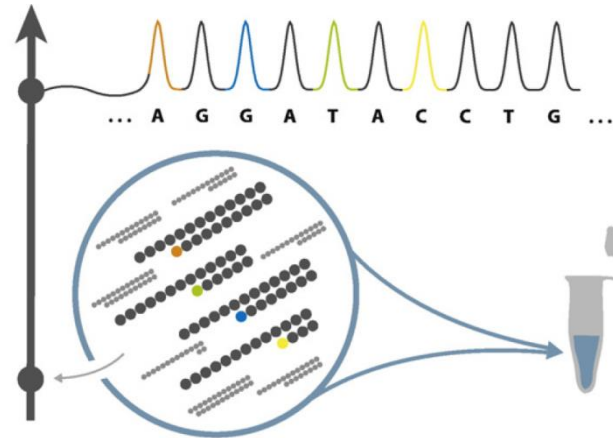
- Polimorfismo resultante da alteração de uma única base
- Abundantes no genoma
- Codominante e bialélico
- Alta processividade – baixo custo por unidade de dado
- Há diversas maneiras de se avaliar a variação:

Alinhamento e comparação de sequências

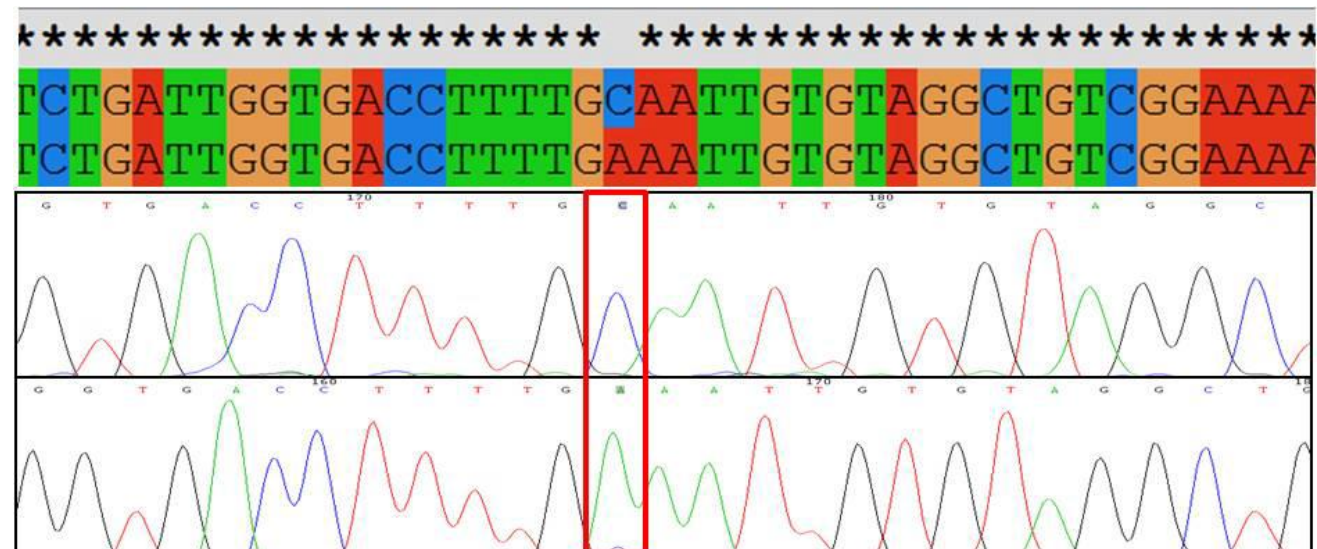
- Métodos baseados em chips (*arrays*) – *Infinium, Axiom, GoldenGate,..*
- Plataformas de genotipagem (*TaqMan, KASP, Fluidigm Dynamic Arrays, LGC KASP, ArrayTape,..* .)
- NGS – sequenciamento do genoma, *Genotype-by-Sequencing, RAD-Seq, DArTseq, RESTseq, RESCAN,..*

SNP

Sequenciamento



Alinhamento de
sequências



SNP

Exemplos de plataforma de genotipagem por SNPs

Genotyping Platform	Technology	SNP x sample combinations	Capital investment	Cost per sample	Advantages
Illumina Infinium iSelect HD	Fixed array	3,072 – 700K SNPs x 24 samples	High (iScan)	Moderate to high	Highly multiplexed
Affymetrix Axiom	Fixed array	50K SNPs x 384 samples; 650K SNPs x 96 samples	High (GeneTitan)	Moderate to high	Highly multiplexed
Douglas Array Tape	Flexible, PCR-based	1 SNP/sample x 76,800 reactions/reel	Very High (Nexar, Soellex, Araya)	Very low	Ultra high-throughput
Fluidigm Dynamic Arrays	Flexible, PCR-based	96 SNPs x 96 samples; 24 SNPs x 192 samples	Moderate (IFC Controller, FC1, EP1)	Low	High-throughput
RE-based GBS	Genotyping by sequencing	~10K-100K SNPs x 96 or 384 samples	Low to moderate (NGS outsourced or in-house)	Low to moderate	Lots of data relative to the cost
Amplicon sequencing	Genotyping by sequencing	Variable (e.g. 20-500 SNPs x 48-384 samples)	Low to moderate (NGS outsourced or in-house)	Low to moderate	Multiple targeted loci at once

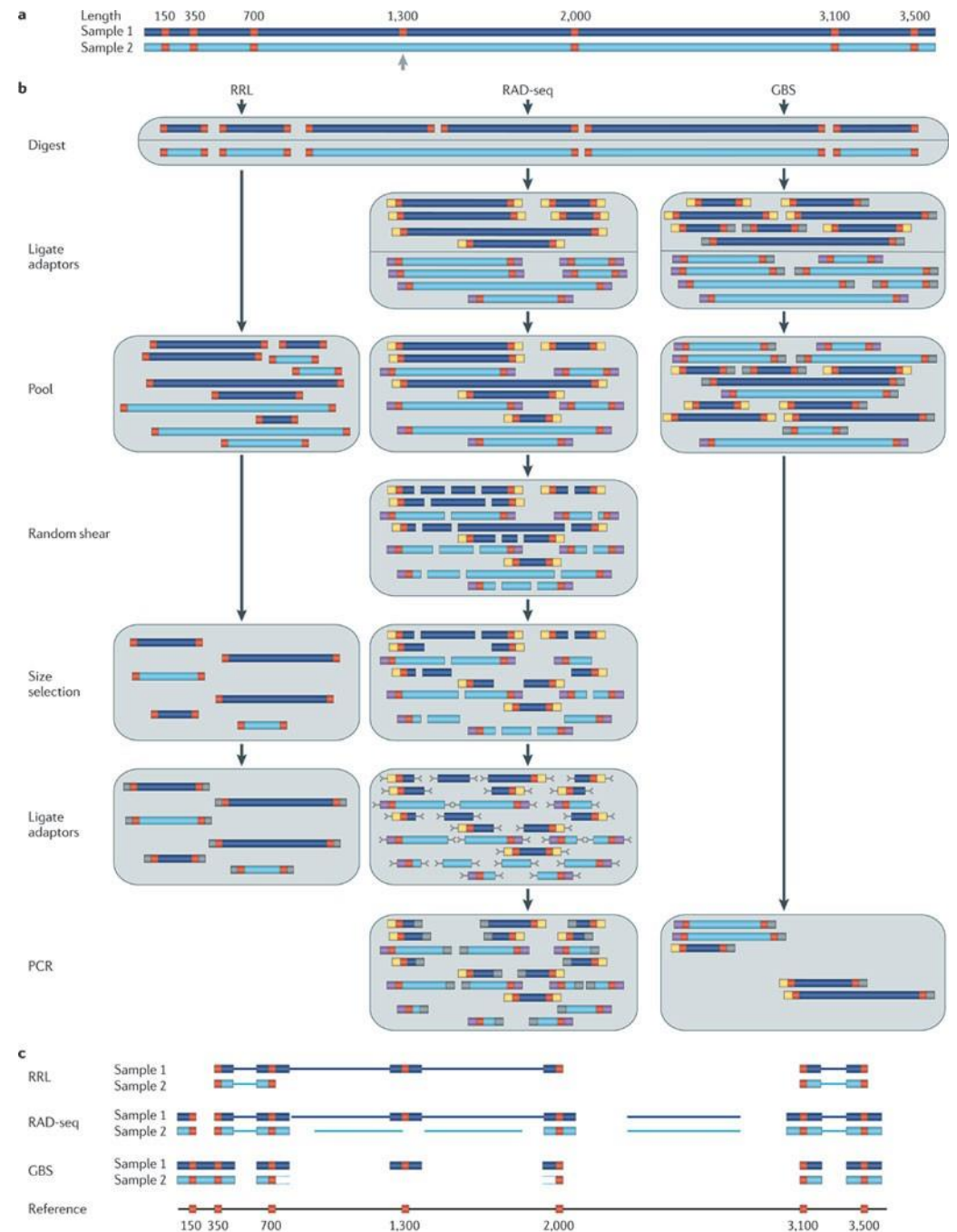
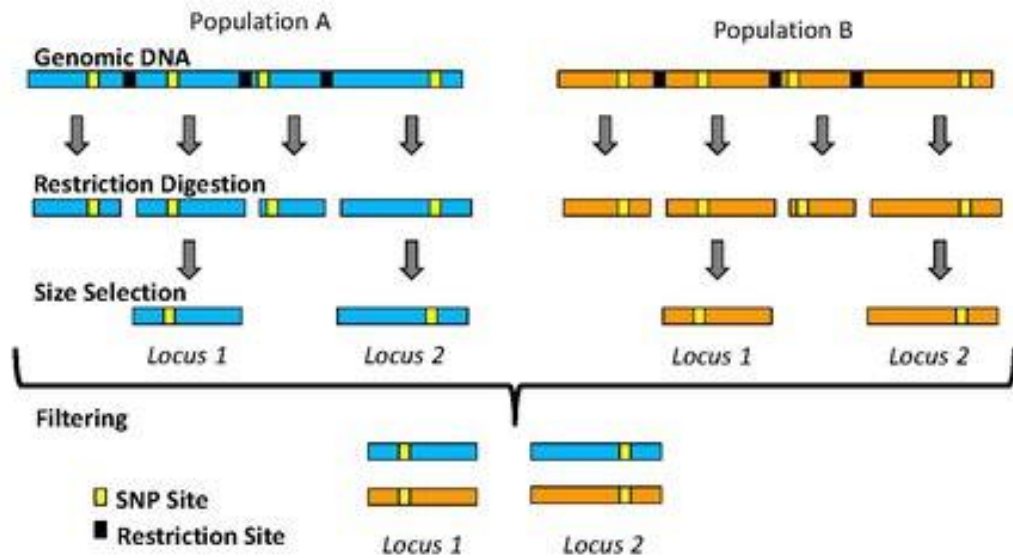
SNP

Métodos de NGS para genotipagem

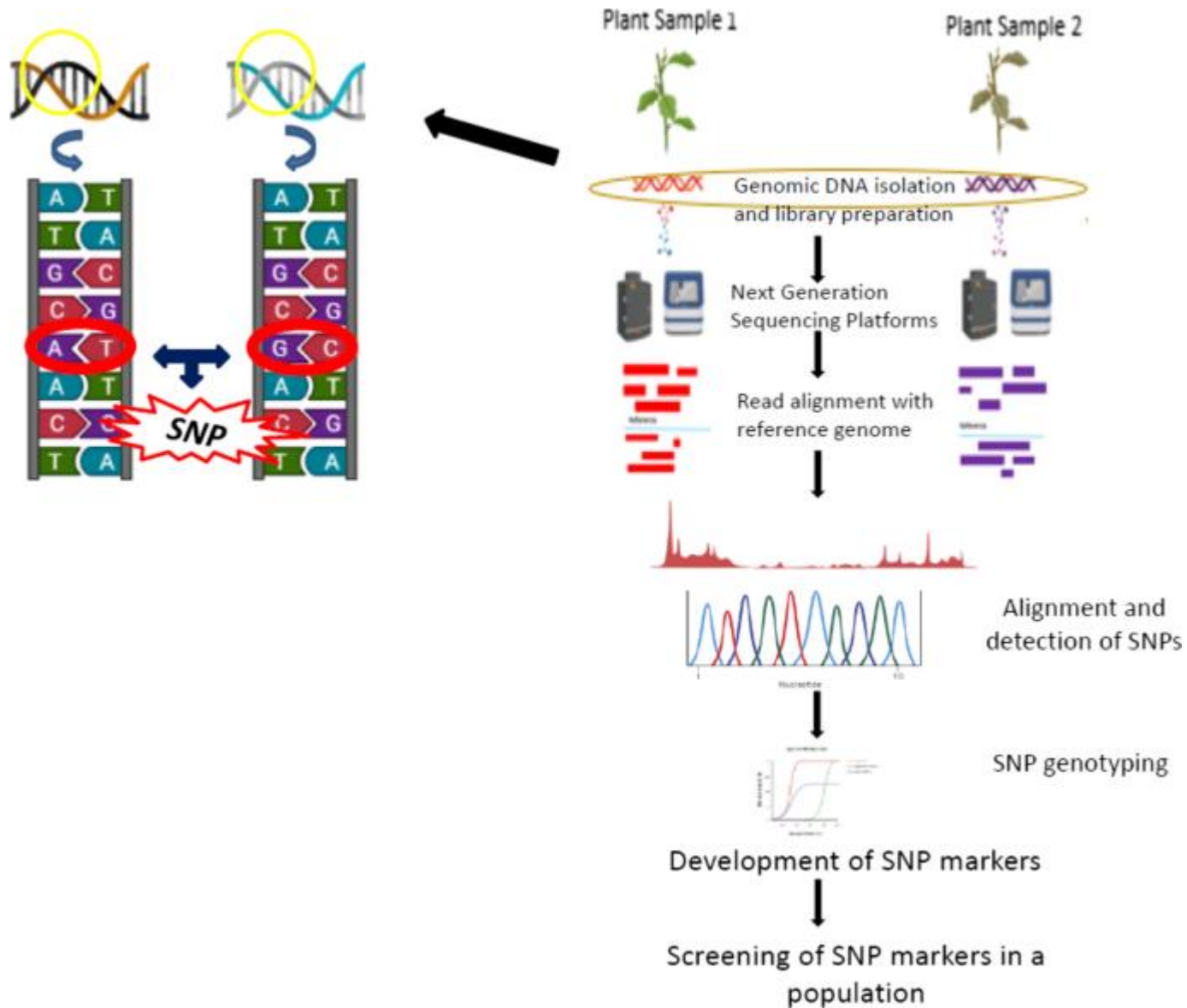
1. **Métodos de *reduced-representation* – redução da complexidade do sequenciamento**
 - Indicado quando ausência de genoma referencia
 - Uso em genética de populações
 - Emprega enzimas de restrição para redução da complexidade
 - *Ex. Restriction-site-Associated DNA sequencing (RAD-seq)*
2. **Baixa cobertura**
 - Uso em estudos de QTL e *Marker Assisted Selection*
 - *Genotype-by-sequencing (GBS)* – baixa cobertura de sequenciamento

SNP RADseq

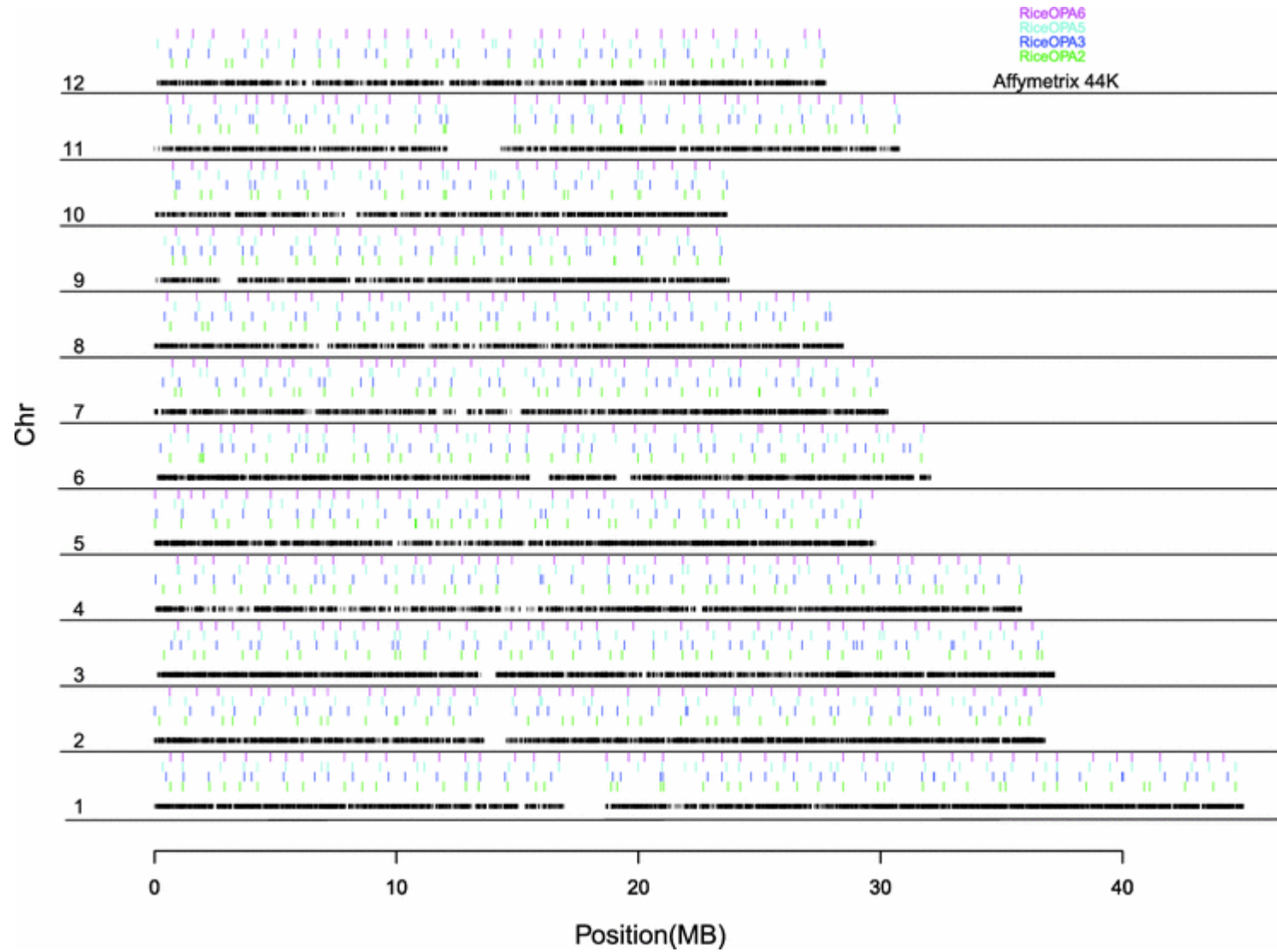
Restriction-site Associate DNA Sequencing (RADseq)



SNP – Genotype by Sequencing



SNP em arroz



SNP

Target
↓

Subgroup	id5000197	id5000200	id5000204	id5000205	ud5000025	id5000209	id5000217	id5000223
IND	A	T	G	T	T	A	A	C
IND	A	T	G	T	T	A	A	G
IND	A	T	G	N	T	A	N	C
IND	A	T	G	T	T	A	A	C
IND	A	T	G	T	T	A	A	C
IND	A	T	G	T	T	A	A	G
IND	A	C	G	T	T	A	A	G
IND	A	T	G	T	T	A	A	C
IND	A	T	G	T	T	A	A	C
IND	A	T	G	T	T	A	N	C
IND	A	T	G	T	T	A	A	G
IND	A	T	G	T	T	A	A	G
IND	A	T	G	T	T	A	A	C
AUS	A	C	G	T	T	A	A	G
AUS	A	C	A	C	T	A	C	C
AUS	C	C	G	T	C	G	C	C
AUS	A	C	G	T	T	A	A	G
AUS	C	C	G	T	C	G	C	C
AROMATIC	A	C	G	T	T	A	A	G
AROMATIC	A	C	G	T	T	A	A	G
AROMATIC	A	C	G	T	T	A	A	G
AROMATIC	A	C	G	T	T	A	A	G
AROMATIC	A	C	G	T	T	A	A	G
AROMATIC	A	C	G	T	T	A	A	G
TEJ	A	C	A	C	T	A	C	C
TEJ	A	C	A	C	T	A	C	C
TEJ	A	C	A	C	T	A	C	C
TEJ	A	C	A	C	T	A	C	C
TEJ	A	C	A	C	T	A	C	C
TEJ	A	C	A	C	T	A	C	C
TEJ	A	C	A	C	T	A	C	C

Example of patterns of informative SNPs within and between subgroups. A subset of the rice 44K SNP data from Zhao *et al.* 2011 is shown for representative accessions from four subgroups: *indica* (IND), *aus* (AUS), *aromatic* (Aromatic), and *temperate japonica* (TEJ). Eight SNP loci are shown flanking a gene target, with three SNPs outlined: id5000200 is an example of a SNP mostly monomorphic within subgroups, but polymorphic between *indica* the others; ud5000025 is an example of a SNP monomorphic within all groups except for two *aus* accessions; and id5000223 is segregating within *indica* and *aus*, and polymorphic between *aromatic* and *temperate japonica*. In practice, the minor allele frequencies (MAF) within and between subgroups will be used as criteria during the SNP selection process.

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

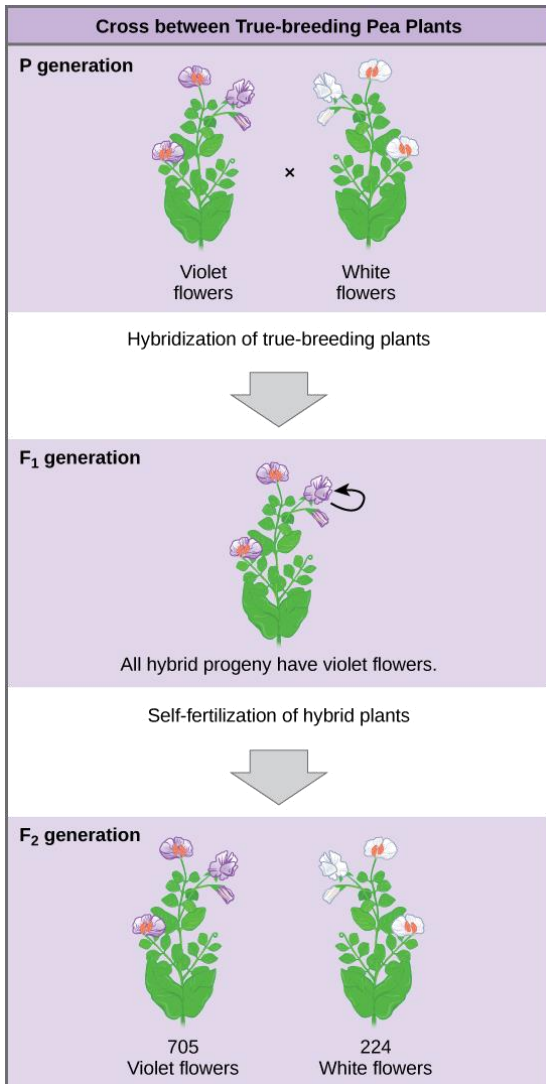
	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Base genética	PCR com <i>primers</i> arbitrários	Digestão e PCR com <i>primers</i> seletivos	PCR com <i>primers</i> específicos	Sequenciamento
Tipo de herança	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
Número de locos	Vários	Vários	Único	Único
Número de alelos	Dois	Dois	Vários	Dois

Uso dos Marcadores no Melhoramento de Plantas

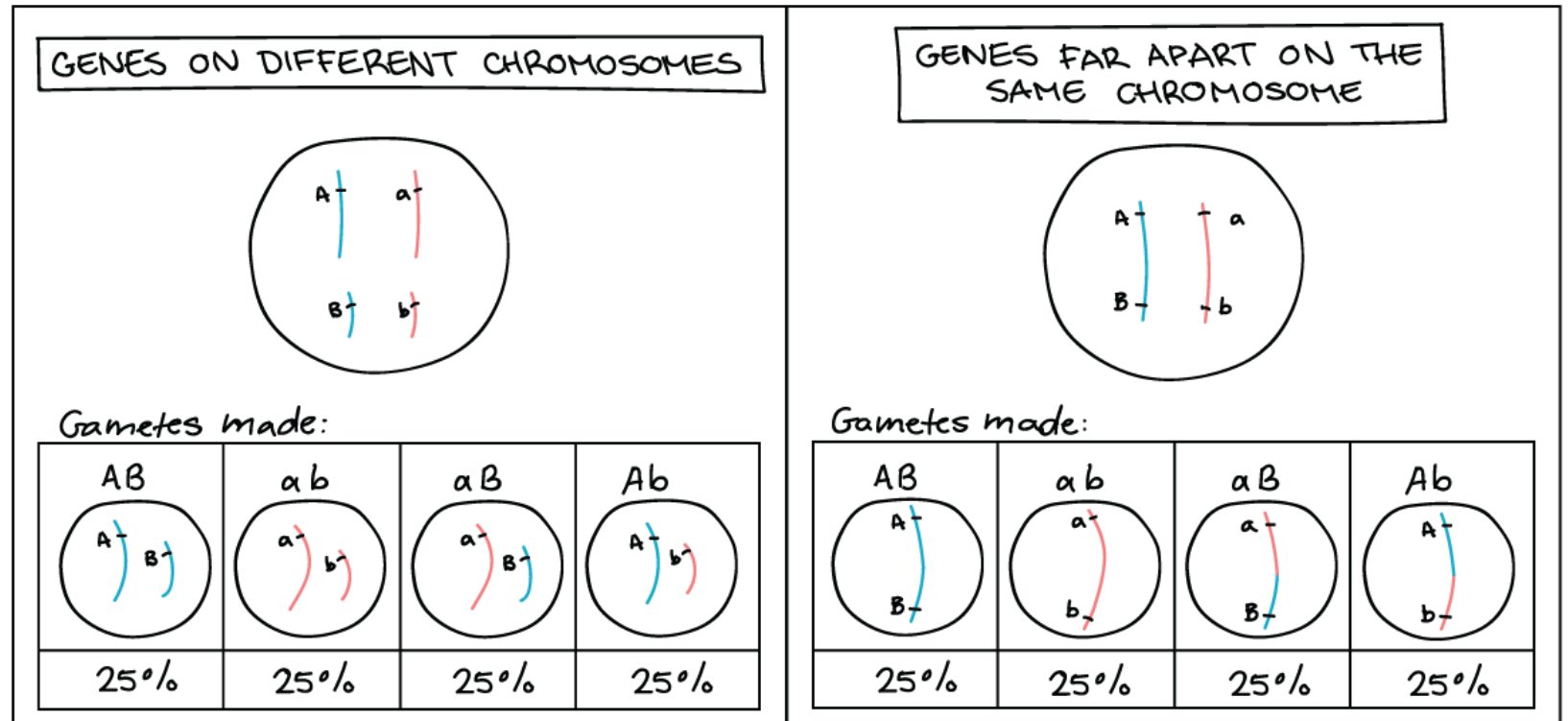
Aplicações no Melhoramento

- **Mapeamento genômico**
 - Seleção Assistida por Marcadores - MAS
 - Seleção Genômica - GWAS
 - Clonagem/Identificação de genes

Construção de Mapas Genéticos



Segregação de um loco

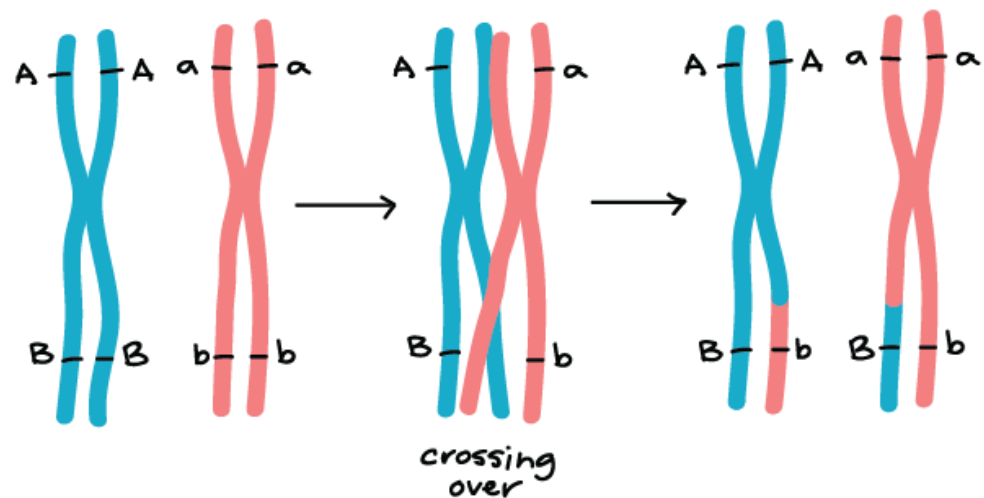


Segregação de **dois locos independentes**

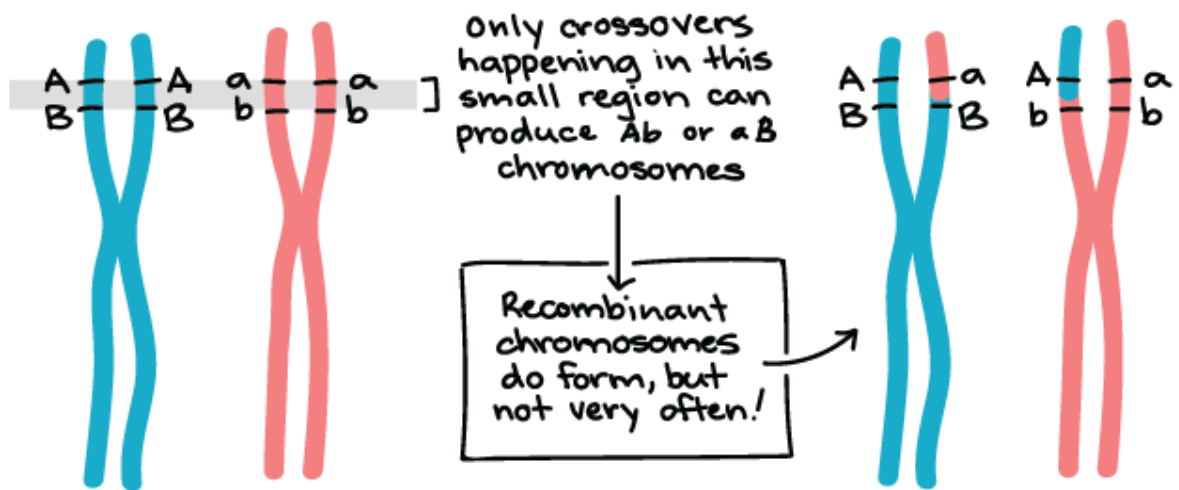
Genes em cromossomos distintos

Mesmo cromossomo mas distantes

Construção de Mapas Genéticos



GENES CLOSE TOGETHER ON THE SAME CHROMOSOME



Gametes made:

AB	Ab	aB	ab
48%	2%	2%	48%

Recombinant (between Ab and aB)
Parental (between AB and ab)

Construção de Mapas Genéticos

F₁

pr⁺ vg⁺
pr vg
double heterozygote



x

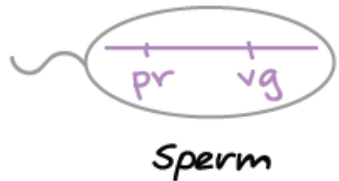
TESTER - homozygous recessive for both genes

pr vg
pr vg



Egg cells

F₂



pr ⁺ vg ⁺ pr vg	pr vg pr vg	pr ⁺ vg pr vg	pr vg ⁺ pr vg
1339	1195	151	154

PARENTAL

RECOMBINANT

Frequência de Recombinação = $\frac{\text{recombinantes}}{\text{no. total}} \times 100\%$

$$\text{Recombinação} = \frac{151 + 154}{1339 + 1195 + 151 + 154} \times 100\%$$

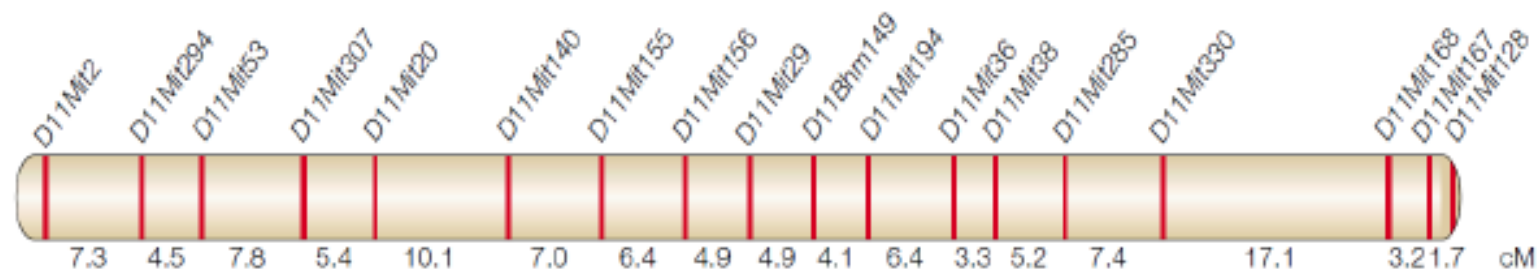
$$\text{Recombinação} = 10,7\%$$

Construção de Mapas Genéticos

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

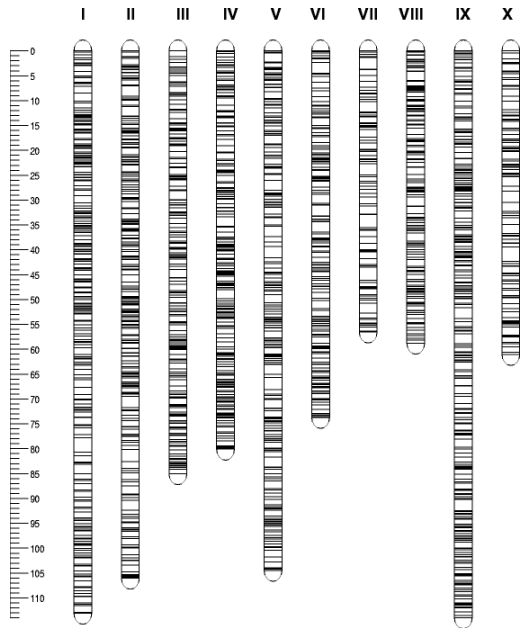
Ligação genética

- A herança conjunta de diferentes locos se dá 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



QTL resistência a vassoura de bruxa do cacauero

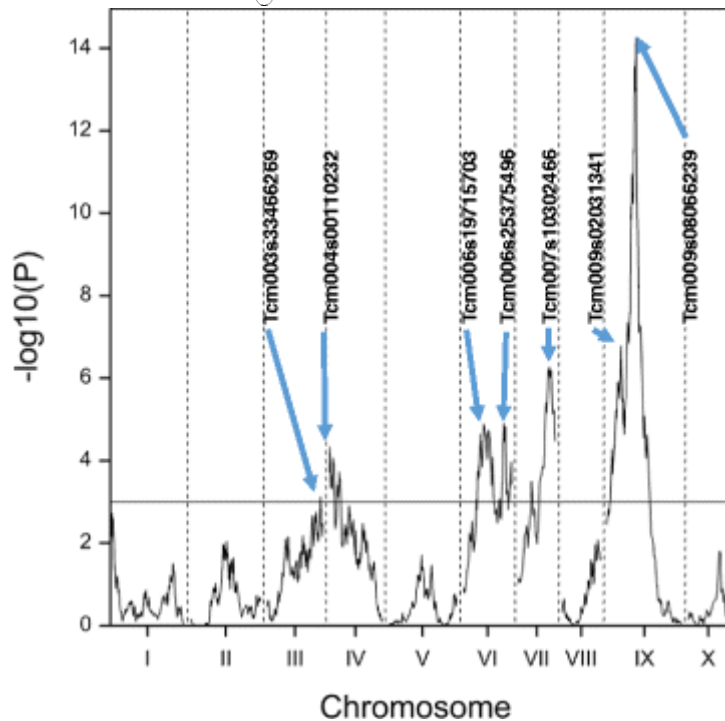


Table 4 Alleles for each of the parental haplotypes (T1, T2, C1 and C2) of 'TSH 1188' and 'CCN 51' for each QTL and representative SNP marker associated with WBD

QTL	SNP marker	TSH 1188		CCN 51	
		Allele T1	Allele T2	Allele C1	Allele C2
QTL3.1	Tcm003s33466269	G	G	G	T
QTL4.1	Tcm004s00110232	T	C	C	C
QTL6.1	Tcm006s19715703	T	T	T	C
QTL6.2	Tcm006s25375496	G	T	G	G
QTL7.1	Tcm007s10302466	G	G	A	G
QTL9.1	Tcm009s08066239	A	G	A	A
QTL9.2	Tcm009s02031341	A	G	A	A

The alleles marked in bold are segregating in MP01 and are also the favorable alleles associated with WBD resistance

Royaert et al. (2016)

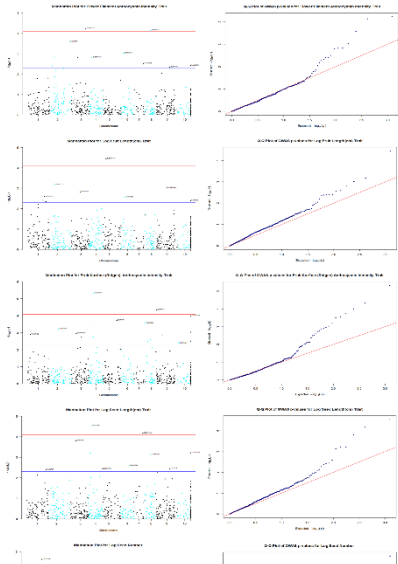
Table 3 Effects of selected QTL, values of the significance level $-\log_{10}(P)$ and % variance accounted for by including markers in the final QTL model

Marker	Chromosome	Position (cM)	$-\log_{10}(P)$	Trait	TSH-1188	CCN-51	TSH 1188 × CCN 51	% variance
Tcm003s33466269	III	81.53	3.739	VB	0.069 (0.0483)	0.086 (0.0480)	-0.025 (0.0479)	0.6
				CB	0.054 (0.0449)	0.209 (0.0446)	0.032 (0.0445)	3.3
Tcm004s00110232	IV	0.55	6.031	VB	0.177 (0.0483)	-0.111 (0.0487)	0.015 (0.0486)	2.9
				CB	0.248 (0.0455)	-0.033 (0.0452)	0.014 (0.0452)	4.7
Tcm006s19715703	VI	31.01	3.679	VB	-0.107 (0.0520)	0.190 (0.0551)	0.118 (0.0496)	5.2
				CB	-0.059 (0.0484)	0.120 (0.0512)	0.036 (0.0461)	2.5
Tcm006s25375496	VI	61.73	2.318	VB	0.015 (0.0551)	0.015 (0.0551)	-0.097 (0.0491)	3.1
				CB	-0.169 (0.0483)	0.0206 (0.0512)	-0.111 (0.0456)	5.4
Tcm007s10302466	VII	47.55	8.306	VB	-0.105 (0.0478)	-0.105 (0.0478)	-0.080 (0.0486)	6.3
				CB	0.146 (0.0452)	-0.100 (0.0444)	-0.139 (0.0452)	3.4
Tcm009s02031341	IX	13.73	3.557	VB	-0.221 (0.0579)	-0.221 (0.0579)	-0.094 (0.0500)	6.0
				CB	-0.065 (0.0498)	-0.203 (0.0538)	-0.024 (0.0465)	1.7
Tcm009s08066239	IX	44.36	11.24	VB	0.383 (0.0539)	0.057 (0.0573)	-0.062 (0.0503)	13.5
				CB	0.239 (0.0501)	0.110 (0.0533)	-0.049 (0.0467)	6.2

QTL and haplotypes	Total	Observed		Expected		P-value	% resistant
		Resistant	Suscept.	Resistant	Suscept.		
QTL9.1_T1	230	111	119	115	115	5.98E-01	48.26
QTL9.1_T2	229	188	41	114.5	114.5	2.63E-22	82.10
QTL9.1_C1	236 ^a	159	77	118	118	9.41E-08	67.37
QTL9.1_C2	218 ^a	136	82	109	109	2.55E-04	62.39

Mapeamento por Associação

- Genotipagem de 421 acessos de cacauero
- Analisaram 27 características →
- 836 SNPs por GoldenGate Assay



Trait	TASSEL Marker	Chr	Position	TASSEL F	TASSEL MLM P	TASSEL Marker R ²	FarmCPU P
Flower filament anthocyanin intensity	TcSNP1483	3	32,973,816	10.01	5.81E ⁻⁰⁵	0.019	NA
	TcSNP1441	8	25,385,284	9.8	7.14E ⁻⁰⁵	0.048	NA
Fruit surface (ridges) anthocyanin intensity	TcSNP401	4	20,485,872	12.73	4.78E ⁻⁰⁶	0.071	2.58E ⁻⁰⁸
	TcSNP644	9	1,220,437	10.31	4.57E ⁻⁰⁵	0.059	NA
Fruit shape orbicular	TcSNP1351	3	34,216,420	19.96	6.73E ⁻⁰⁹	0.109	NA
	TcSNP1477	3	17,127,233	12.13	8.30E ⁻⁰⁶	0.069	NA
Fruit shape obovate	TcSNP1477	3	17,127,233	12.13	8.20E ⁻⁰⁶	0.069	NA
	TcSNP1353	3	34,216,420	19.96	6.73E ⁻⁰⁹	0.109	NA
Fruit length	TcSNP1110	5	1,969,054	16.79	5.29E ⁻⁰⁵	0.047	NA
Log fruit length	TcSNP1110	5	1,969,054	17.56	3.60E ⁻⁰⁵	0.049	NA
Log seed length	TcSNP344	4	8,445,308	18.01	2.88E ⁻⁰⁵	0.050	1.51E ⁻⁰³
	TcSNP953	4	2,822,152	11.10	7.61E ⁻⁰⁴	0.034	7.68E ⁻⁰³
	TcSNP897	3	23,362,296	8.46	2.61E ⁻⁰⁴	0.051	6.01E ⁻⁰³
	TcSNP733	5	2,070,839	8.39	4.0 E ⁻⁰³	0.025	1.71 E ⁻⁰³
	TcSNP1333	7	9,085,336	9.89	6.75E ⁻⁰⁵	0.055	
Seed length (cm)	TcSNP733	5	2,070,839	7.08	8.2E ⁻⁰³	0.022	6.73E ⁻⁰³
	TcSNP344	4	8,445,308	11.31	8.66E ⁻⁰⁴	0.034	7.49E ⁻⁰³
Seed length:width	TcSNP897	3	23,362,296	12.09	8.57E ⁻⁰⁶	0.067	
	TcSNP733	5	2,070,839	17.89	3.05E ⁻⁰⁵	0.051	1.12375E ⁻⁰⁸
Log seed length:width	TcSNP823	5	2,546,863	9.49	9.97E ⁻⁰⁵	0.053	
	TcSNP841	5	36,814,269				9.71745E ⁻⁰⁷
Log seed number	TcSNP785	1	31,785,158	11	2.38E ⁻⁰⁴	0.059	
Seed number	TcSNP1333	7	9,085,336	35.51	1.15E ⁻¹⁴	0.170	
	TcSNP1390	1	35,918,110				1.33E ⁻⁰¹
	TcSNP1160	4	21,647,012	116.1	1.35E ⁻⁰⁴	0.261	
Log seed cotyledon mass	TcSNP555	4	29,189,575	12.23	5.37E ⁻⁰⁴	0.037	5.7E ⁻⁰⁴
	TcSNP344	4	8,445,308	8.79	3.0 E ⁻⁰³	0.026	9.9E ⁻⁰⁴
	TcSNP932	9	14,794,475				9.56678E ⁻⁰⁵
Seed cotyledon mass (g)	TcSNP555	4	29,189,575	9.41	2.0 E ⁻⁰³	0.028	1.01E ⁻⁰¹
	TcSNP933	4	2,822,152				1.98E ⁻⁰²
	TcSNP733	5	2,070,839				4.27833E ⁻⁰⁴
Log seed width	TcSNP555	4	29,189,575	9.73	1.9E ⁻⁰²	0.029	6.31401E ⁻⁰²
Seed width (cm)	TcSNP555	4	29,189,575	11.34	8.50E ⁻⁰⁴	0.034	4.57572E ⁻⁰²
Log Pod Index	TcSNP555	4	29,189,575	9.35	2.0 E ⁻⁰³	0.028	3.33E ⁻⁰¹
	TcSNP642	8	16,399,147	12.08	5.77E ⁻⁰⁴	0.037	1.09E ⁻⁰²
Pod Index	TcSNP555	4	29,189,575	11.39	8.24E ⁻⁰⁴	0.035	1.09E ⁻⁰¹
	TcSNP642	8	16,399,147	12.61	4.39E ⁻⁰⁴	0.038	1.02E ⁻⁰¹

Descriptor/trait	State [sample size for each trait]
1. Flower, anthocyanin intensity in column of pedicel (FL_PCOL_C)	1 = green, 2 = reddish, 3 = red [n = 10].
2. Flower, sepal length (mm) (FL_SEP_LEN)	[n = 10]
3. Flower, anthocyanin intensity on ligule (FL_LIG_COL)	0 = absent, 3 = slight, 5 = intermediate, 7 = intense [n = 10]
4. Flower, ligule width (mm) (FL_LIG_WID)	[n = 10]
5. Flower, anthocyanin intensity in filament (FL_FIL_COL)	0 = absent, 3 = slight, 5 = intermediate, 7 = intense [n = 10]
6. Flower, style length (mm) (FL_STY_LEN)	[n = 10]
7. Flower, ovule number (FL_OV_NUM)	[n = 10]
8. Fruit, shape (FR_POSH)	1 = oblong, 2 = elliptic, 3 = obovate, 4 = orbicular], 5 = oblate or other (specified). [n = 10]
9. Fruit, basal constriction (FR_PBC)	0 = absent, 1 = slight, 2 = intermediate, 3 = strong, 4 = wide shoulder [n = 10]
10. Fruit, apex form (FR_PAF)	1 = attenuate, 2 = acute, 3 = obtuse, 4 = rounded, 5 = mammillate, 6 = indented [n = 10]
11. Fruit, surface texture (rugosity or degree of wartiness) (FR_PST)	0 = absent, 3 = slight, 5 = intermediate, 7 = intense [n = 10]
12. Fruit, surface anthocyanin intensity in mature ridges (FR_PRCM)	0 = absent, 3 = slight, 5 = intermediate, 7 = intense [n = 10]
13. Fruit, ridge disposition (FR_PFD)	1 = equidistant, 2 = paired [n = 10]
14. Fruit, primary ridge separation (FR_PFS)	1 = slight, 2 = intermediate, 3 = wide [n = 10]
15. Fruit, pod wall hardness [n = 10] (FR_HH (qualitative); FR_QHH (quantitative))	3 = ≤ 1.6 megapascals (MPa), 5 = > 1.6 MPa ≤ 2.0, MPa, 7 = > 2.0 MPa
16. Fruit, length (cm) (FR_POL)	[n = 10]
17. Fruit, width (cm) (FR_POW)	[n = 10]
18. Fruit length to width ratio (FR_PODL_W)	
19. Seed, number (FR_BEN)	[n = 10]
20. Seed, shape (FR_BES)	1 = oblong 2 = elliptic 3 = ovate
21. Seed, cotyledon colour (FR_BEC)	1 = white, 2 = grey, 3 = light purple, 4 = medium purple, 5 = dark purple, 6 = mottled [n = 40]
22. Wet bean mass (total) (g) (FR_WABW)	[n = 10]
23. Cotyledon length (cm) (FR_BL)	[n = 20]
24. Cotyledon width (cm) (FR_BEW)	[n = 20]
25. Cotyledon mass (g) (FR_BW)	[n = 20]
26. Cotyledon length to width ratio (FR_BENL_W)	
27. Pod index	The number of pods/fruits required to produce 1 kg of dried cocoa (1000/ (average dried cotyledon mass × average seed or bean number) [n = 10]

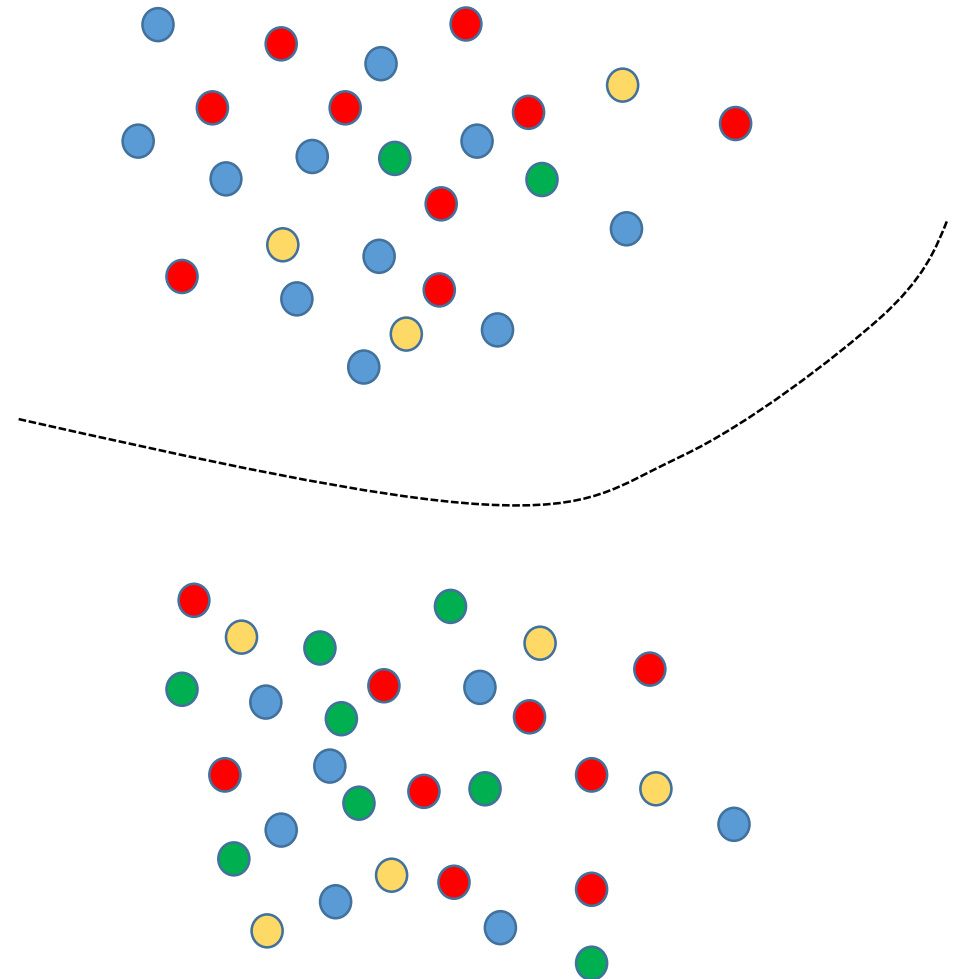
Traits of economic importance are highlighted in bold.

Uso de Marcadores Moleculares na Conservação

Genética de Populações

População: um grupo de indivíduos da mesma espécie que potencialmente podem se acasalar, produzindo descendência, e vivem dentro de uma área geográfica restrita no mesmo período de tempo.

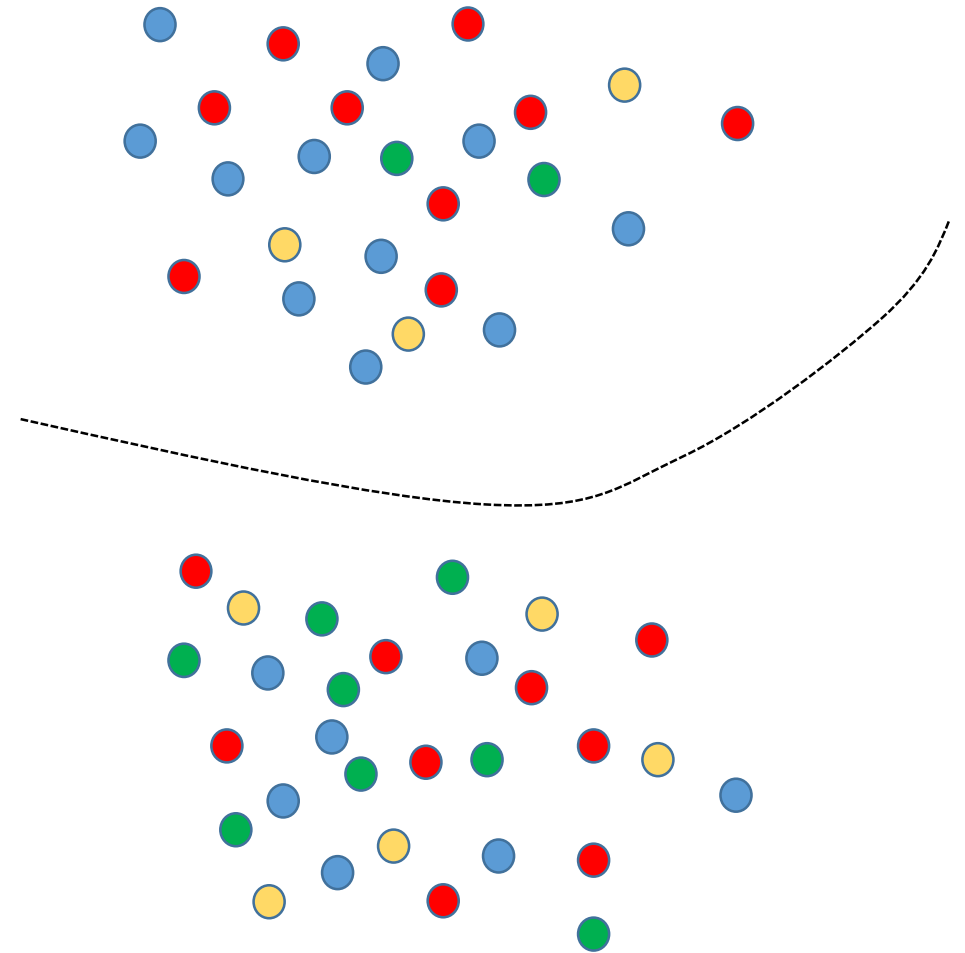
Empregar marcadores moleculares para definir características das populações de uma espécie para fins de conservação



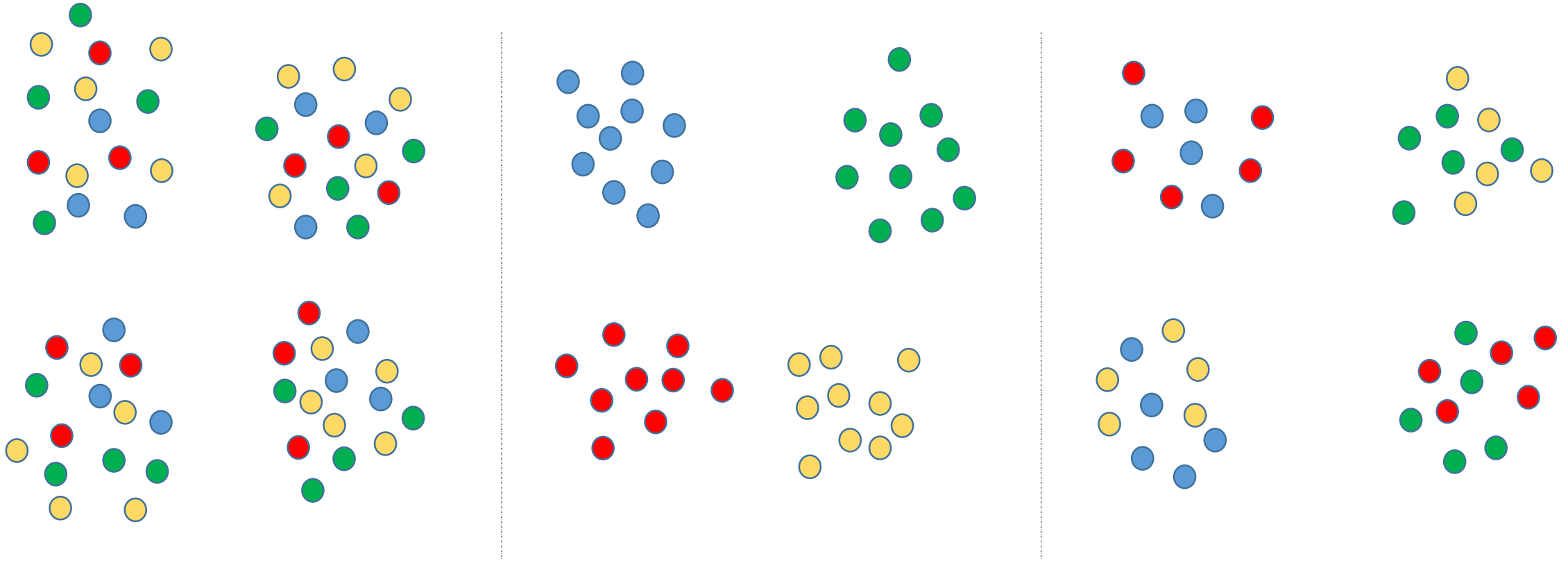
Genética de Populações

As espécies em geral não constituem uma única **unidade panmítica** onde os indivíduos se acasalam aleatoriamente em toda a distribuição da espécie.

- Estão subdivididas em *entidades menores*, que podem organizar-se no *espaço, tempo, ecologia, ...*
- Podem existir *diferentes níveis de subdivisão* que podem ou não estar hierarquicamente organizados;
- As espécies podem estar dividida em grupos ou regiões e estes divididos em unidades menores... até chegarmos a uma unidade básica da população que constitui um grupo homogêneo



Estrutura Genética de Populações



Variabilidade genética não estruturada
entre populações (uma população)

Mesmo nível de variabilidade,
mas está organizada
entre populações

Mesmo nível de variabilidade,
mas está organizada **entre e dentro**
das populações

Diversidade Genética

- A **diversidade genética** é uma medida da quantidade de variabilidade existente dentro ou entre populações e/ou espécies
- Redução na diversidade genética – redução na capacidade de se adaptar a novas pressões seletivas, tais como mudanças climáticas, pragas ou doenças, mudanças na disponibilidade de recursos – aumentando risco de extinção

Diversidade Genética

- A **diversidade genética** pode ser medida por índices a partir de marcadores moleculares:
 - Número de alelos
 - Número de locos polimórficos
 - Heterozigozidade (Fst ou equivalentes: Gst, Rst, fst)
 - Diversidade haplotípica
 - Diversidade nucleotídica

Diversidade Genética



100 V V

160 V A



140 A A

Frequência Fenotípica

$260/400 = 0,65$ vermelho

$140/400 = 0,35$ amarelo

Frequência Genotípica

$100/400 = 0,25$ V V

$160/400 = 0,40$ V A

$140/400 = 0,35$ A A

Frequência alélica

$360/800 = 0,45$ V

$440/800 = 0,55$ A

Forças que afetam a estruturação genética das populações


- **Fluxo gênico** – troca entre populações (migração ou dispersão)
- **Deriva genética** – mudança na frequência de alelos entre gerações ao acaso
- **Tamanho efetivo** - indivíduos que se reproduzem e conseguem deixar descendentes)
- **Gargalo genético** - redução drástica do tamanho da população, com perda de variabilidade genética
- **Efeito fundador** - estabelecimento de nova população por poucos fundadores originais
- **Seleção natural** – alteração na adaptação
- **Reprodução** – sexuada x assexuada, comportamento e endogamia







Estrutura Genética de Populações

Importância para estudar a estrutura genética das populações

- **Conservação Genética:** organização da diversidade entre ou dentro das populações
- **Melhoramento Genético:** avaliar a diversidade genética da espécie disponível
- **Manutenção da Diversidade:** estratégias para manter a diversidade da espécie
- **Fragmentação de Populações:** recuperação de ambientes degradados

High rates of pollen and seed flow in *Hymenaea stigonocarpa* on a highly fragmented savanna landscape in Brazil

Andrea S. Garcia¹ · Eduardo A. Bressan¹ · Maria Victoria R. Ballester¹ · Antonio Figueira¹  · Alexandre M. Sebbenn²

-  Water body
-  Pasturelands
-  Native vegetation
-  Bushy cerrado
-  Adults
-  Juveniles

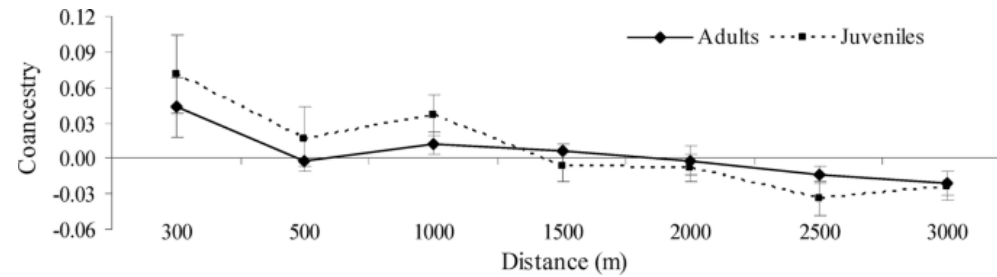
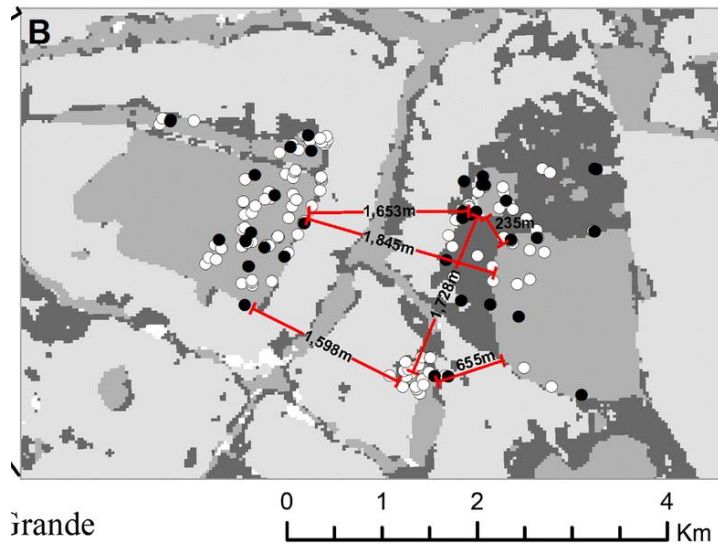
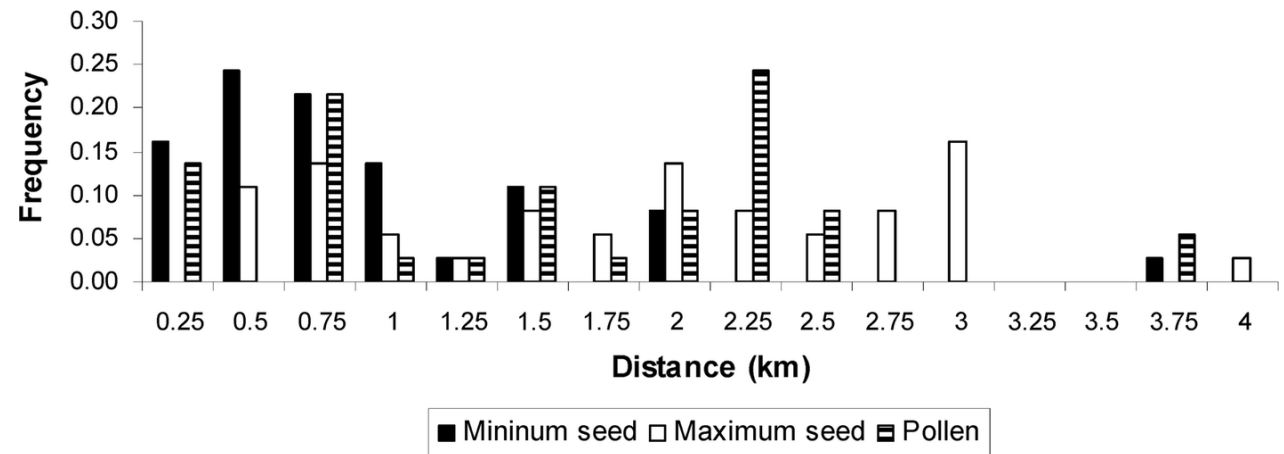


Table 2 Distance of pollen and seed (minimum and maximum) dispersal

	Pollen dispersal (m)	Minimum seed dispersal (m)	Maximum seed dispersal (m)
Mean dispersal distance \pm 2SE	1451 \pm 307	809 \pm 224	1725 \pm 308
Median distance	1356	632	1766
Range of dispersal distance	1290 to 3578	39 to 3562	273 to 3914

SE standard error



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

Estudo Dirigido

1. O que são marcadores moleculares?
2. Definir marcadores moleculares.
3. O 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?

