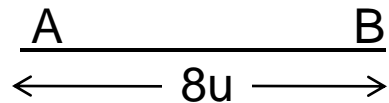


Ligação Gênica II

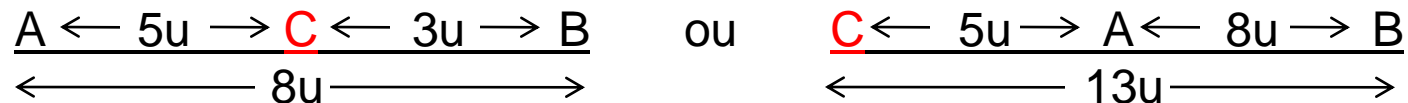
Teste dos Três Pontos

TESTE DOS 3 PONTOS

No cruzamento $\begin{array}{|c|c|} \hline \underline{AB} & \times & \underline{ab} \\ \hline \underline{ab} & & \underline{ab} \\ \hline \end{array}$ obtiveram-se 8% de recombinantes. Portanto:



Suponha agora que um outro gene **C** esteja a 5 unidades de A. Qual seria a posição de **C** no mapa? Há 2 possibilidades para essa localização:



Na 1ª localização a distância entre **C** e B será de 3u; na 2ª essa distância será de 13u. Qual dessas localizações é a verdadeira? Com as informações fornecidas não podemos decidir por qualquer uma delas.

TESTE DOS 3 PONTOS

Se efetuarmos o cruzamento

| | | |
|----|---|----|
| BC | x | bc |
| bc | | bc |

 e neste obtivermos 13% de recombinação teremos então condições para aceitar a 2ª localização como verdadeira.

STURTEVANT desenvolveu um teste (Teste dos 3 pontos) que possibilita avaliar a sequência de 3 genes num só cruzamento, ao contrário do exemplo anterior, onde para determinar a sequência de A, B, e C foi preciso realizar 3 cruzamentos:

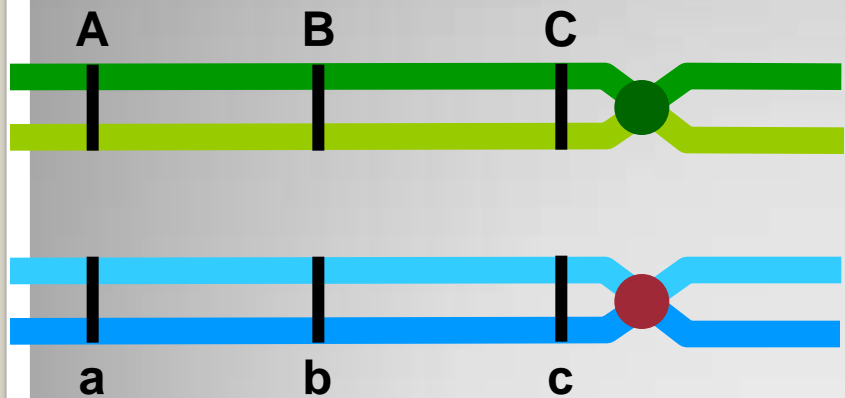
Exemplo 1: Milho

Em milho, uma planta homozigótica para todos os alelos recessivos apresenta fenótipo com plantas virescentes (*gene "a"*), plântulas brilhantes (*gene "b"*) e plantas macho estéril (*gene "c"*). Essa planta foi cruzada com outra heterozigótica para as três características produzindo a seguinte proporção de descendentes:

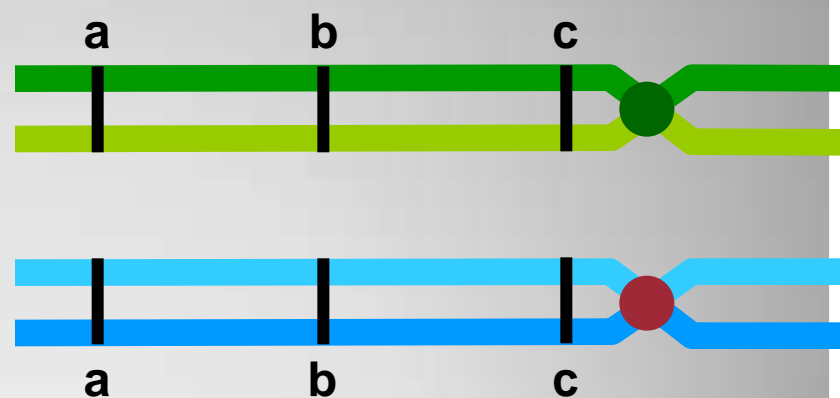
| Fenótipos | Número de descendentes |
|--------------|------------------------|
| A B C | 235 |
| A b c | 62 |
| A B c | 40 |
| a B c | 4 |
| a b c | 270 |
| A b C | 7 |
| a b C | 48 |
| a B C | 60 |
| TOTAL | 726 |

- Determinar a ordem dos genes e construir um mapa genético envolvendo estes três locos.
- Calcular o coeficiente de interferência e interpretar o resultado.
- Qual o genótipo da planta heterozigótica usada no cruzamento-teste?

CRUZAMENTO TESTE



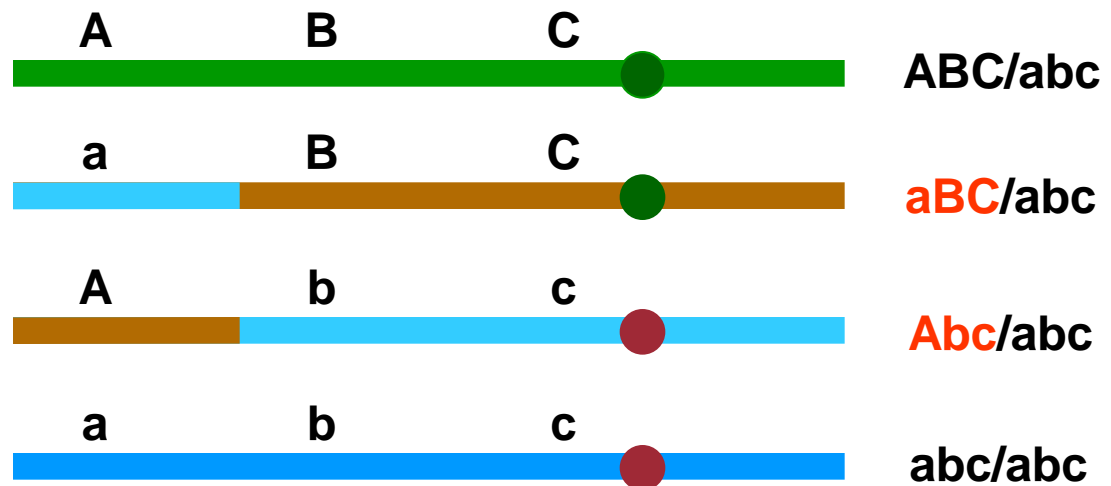
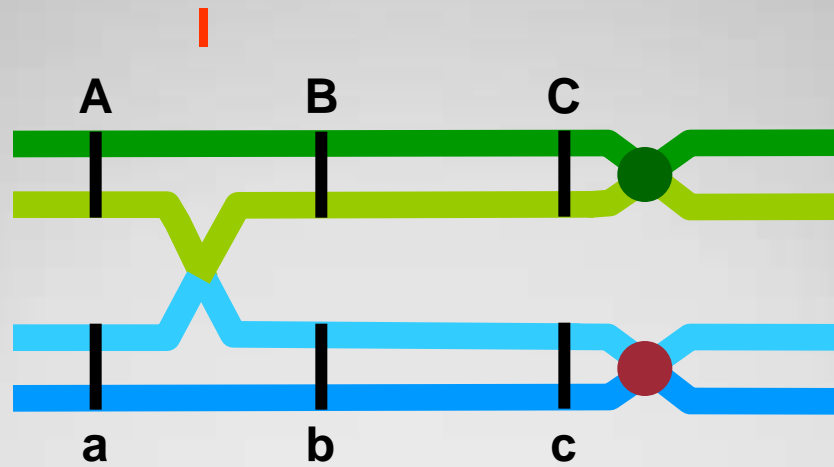
ABC/abc

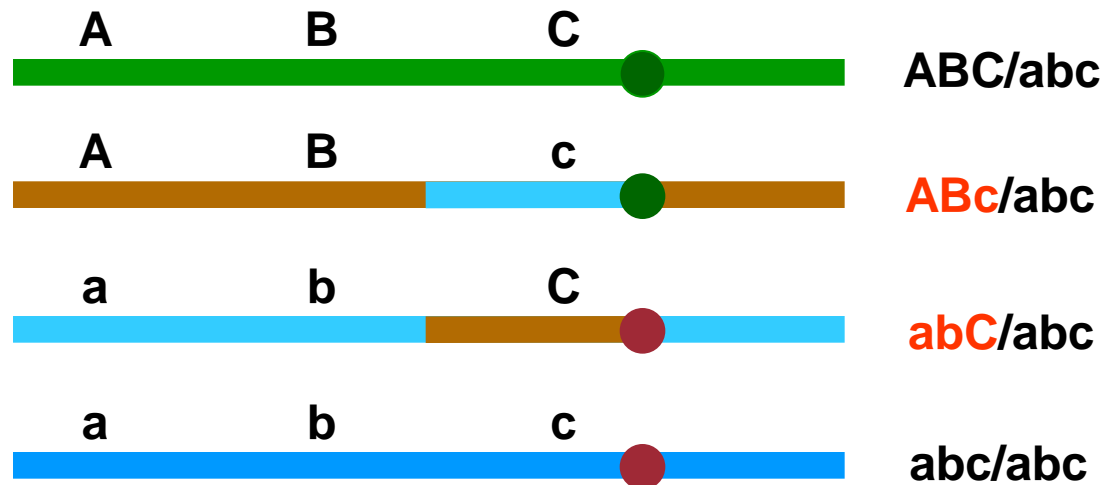
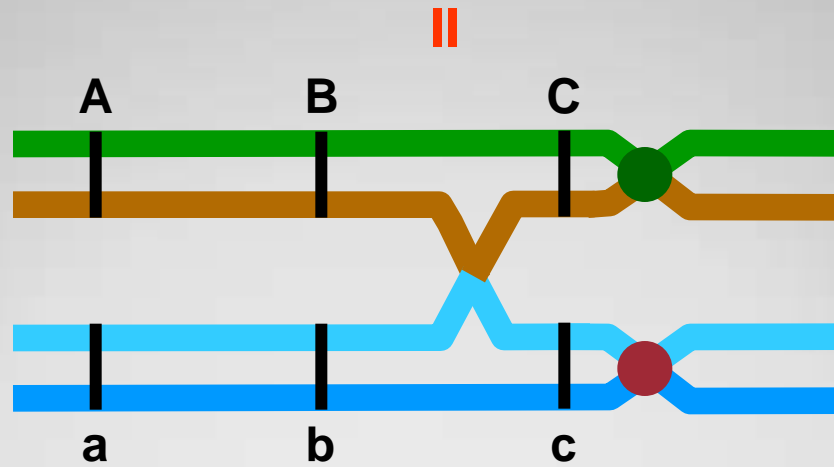


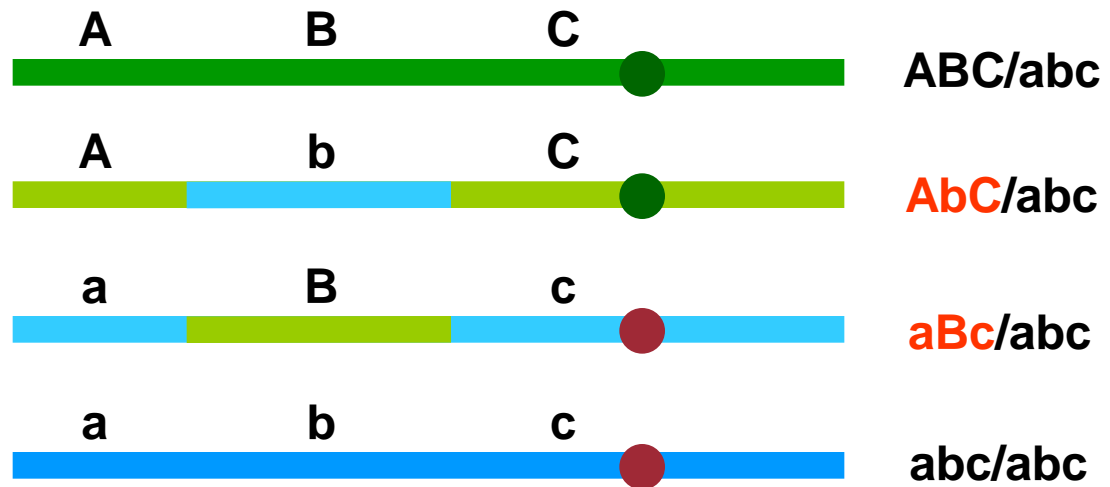
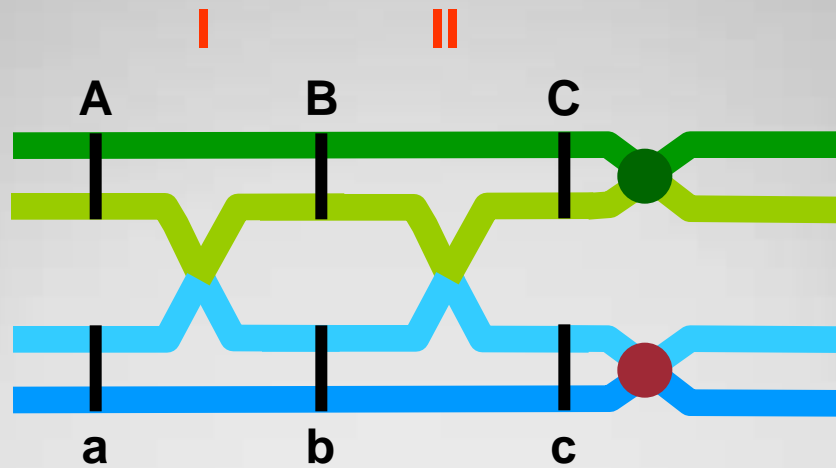
abc/abc

x









| Fenótipos | Número de descendentes |
|--------------|------------------------|
| A B C | 235 |
| A b c | 62 |
| A B c | 40 |
| a B c | 4 |
| a b c | 270 |
| A b C | 7 |
| a b C | 48 |
| a B C | 60 |
| TOTAL | 726 |

- Determinar a ordem dos genes e construir um mapa genético envolvendo estes três locos.
- Calcular o coeficiente de interferência e interpretar o resultado.
- Qual o genótipo da planta heterozigótica usada no cruzamento-teste?

Solução do problema:

Observando os dados, pode-se chegar a algumas conclusões:

1) Os genótipos parentais são: ABC e abc \rightarrow foram os que apresentaram maior frequência \rightarrow parentais

2) A descendência com permuta dupla - duplos recombinantes - representa o produto de duas probabilidades, isto é, permuta entre A e B e entre B e C . Estes são sempre os de menor frequência. $\rightarrow aBc$ e AbC

3) Comparando-se os duplos recombinantes com a ordem dos pais, pode-se verificar que a ordem dos genes no cromossomo é ABC , pois a permuta dupla só alterou o gene B , devendo este estar situado na posição intermediária.

| Fenótipos | Número de descendentes |
|--------------|-------------------------------------|
| A B C/abc | 235 -> parental |
| A b c/abc | 62 -> crossing entre a e b |
| A B c/abc | 40 -> crossing entre b e c |
| a B c /abc | 4 -> crossing duplo entre a - b - c |
| a b c/abc | 270 -> parental |
| A b C/abc | 7 -> crossing duplo entre a - b - c |
| a b C/abc | 48 -> crossing entre b e c |
| a B C/abc | 60 -> crossing entre a e b |
| TOTAL | 726 |

→ Denominaremos de Região I aquela entre A e B e de Região II aquela entre B e C.

→ Para estimar a % de permuta na região I, deve-se considerar todos os recombinantes provenientes da permuta desta região e também os duplo-recombinantes, pois eles também sofreram permuta na região I.

Fenótipos N°

| | | |
|-------|-------|-----|
| | A B C | 235 |
| → | A b c | 62 |
| | A B c | 40 |
| → | a B c | 4 |
| | a b c | 270 |
| → | A b C | 7 |
| | a b C | 48 |
| → | a B C | 60 |
| <hr/> | | |
| | TOTAL | 726 |

Região I

Locos a e b (ignoramos o loco c)

Parentais: AB e ab

Recombinantes: Ab e aB

Região I:

$$C_{(ab)} \rightarrow \frac{62 + 4 + 7 + 60}{726} = 0,183$$

$$FR_{(ab)} = 0,183 \times 100 = 18,3\% \rightarrow 18,3 \text{ cM entre A e B.}$$

Fenótipos N°

A B C 235

A b c 62

A B c 40

a B c 4

a b c 270

A b C 7

a b C 48

a B C 60

TOTAL 726

Região II

Locos b e c (ignoramos o loco a)

Parentais: BC e bc

Recombinantes: Bc e bC

Região II:

$$c_{(bc)} \rightarrow \frac{40 + 4 + 7 + 48}{726} = 0,136$$

$$FR_{(bc)} = 0,136 \times 100 = 13,6\% \rightarrow 13,6 \text{ cM entre B e C.}$$

Fenótipos N°

| | |
|-------|-----|
| A B C | 235 |
| A b c | 62 |
| A B c | 40 |
| a B c | 4 |
| a b c | 270 |
| A b C | 7 |
| a b C | 48 |
| a B C | 60 |

TOTAL 726

Região III

Locos a e c (ignoramos o loco b)

Parentais: AC e ac

Recombinantes: Ac e aC

$$FR_{(ac)} \rightarrow \frac{62 + 40 + 48 + 60}{726} = 0,289$$

$$FR_{(bc)} = 0,289 \times 100 = 28,9\% \rightarrow 28,9 \text{ cM entre A e C.}$$

Região I:

$$ab \rightarrow \frac{62 + 4 + 7 + 60}{726} \times 100 = 18,3\% \rightarrow 18,3 \text{ cM entre A e B.}$$

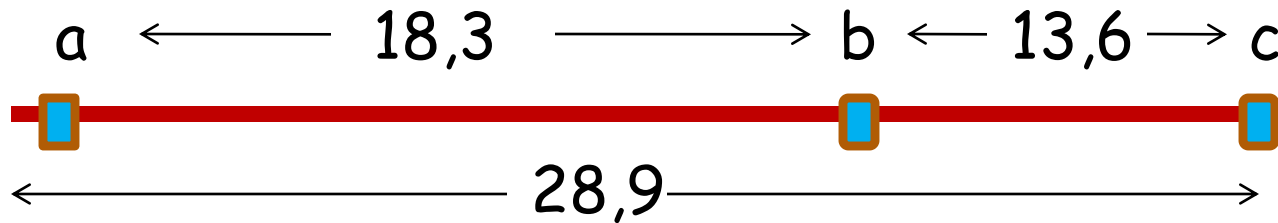
Região II:

$$bc \rightarrow \frac{40 + 4 + 7 + 48}{726} \times 100 = 13,6\% \rightarrow 13,6 \text{ cM entre B e C.}$$

Região III:

$$ac \rightarrow \frac{62 + 40 + 48 + 60}{726} \times 100 = 28,9\% \rightarrow 28,9 \text{ cM}$$

O mapa genético é:



Mas $18,3 + 13,6 = 31,9$ (esperado) \neq $28,9$ (observado).

Porque esta diferença??

Interferência -> Quando a permuta em uma região interfere na ocorrência de outra permuta, nas suas proximidades.

Ou seja, a ocorrência de permuta diminui a probabilidade de outra permuta nas imediações da primeira.

A *interferência* pode ser estimada da seguinte forma:

FRDO = frequência de recombinantes duplos observada

FRDE = frequência de recombinantes duplos esperada

$$I = 1 - \frac{FRDO}{FRDE}$$

$$\text{FRDO} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de duplos recombinantes}}{\text{N}^\circ \text{ total de descendentes}} = \frac{7 + 4}{726} = 0,015$$

FRDE = probabilidade de ocorrer permuta nas regiões I e II, simultaneamente.

$$\text{FRDE} = \text{Dist. região I} \times \text{Dist. região II} \Rightarrow$$

$$0,183 \times 0,136 = 0,025$$

$$\text{Portanto, } I = 1 - \frac{0,015}{0,025} = 0,4 \text{ ou } 40\%$$

Ou seja, 40% das freqüências das permutas duplas esperadas não foram observadas.

O mapa genético para esses três genes é realmente:



Neste exemplo, a ordem se manteve!!

Exemplo 2: Mutantes em *Drosophila*

sc -> scute ou perda de algumas cerdas torácicas

ec -> echinus ou superfície rugosa dos olhos

vg -> asa vestigial

$$\begin{array}{c} \underline{sc^+ec^+vg^+} \\ sc^+ec^+vg^+ \end{array} \quad \times \quad \begin{array}{c} \underline{sc \ ec \ vg} \\ sc \ ec \ vg \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \underline{sc^+ec^+vg^+} \\ sc \ ec \ vg \end{array} \quad \times \quad \begin{array}{c} \underline{sc \ ec \ vg} \\ sc \ ec \ vg \end{array}$$

| | |
|---|-----|
| sc ec vg | 235 |
| sc ⁺ ec ⁺ vg ⁺ | 241 |
| sc ec vg ⁺ | 243 |
| sc ⁺ ec ⁺ vg | 233 |
| sc ec ⁺ vg | 12 |
| sc ⁺ ec vg ⁺ | 14 |
| sc ec ⁺ vg ⁺ | 14 |
| sc ⁺ ec vg | 16 |

1.008

A proporção esperada de 1:1:1:1:1:1:1:1, resultado de um cruzamento teste, não está ocorrendo. Os genes devem, portanto, estar ligados.

Calculamos as frequências de recombinantes tomando um par de genes por vez.

Locos *sc* e *ec* (ignoramos *vg*):

Parentais: *sc ec* e *sc⁺ec⁺*

Recombinantes: *sc ec⁺* e *sc⁺ ec*

sc ec vg 235

sc⁺ ec⁺ vg⁺ 241

sc ec vg⁺ 243

sc⁺ ec⁺ vg 233

sc ec⁺ vg 12

sc⁺ ec vg⁺ 14

sc ec⁺ vg⁺ 14

sc⁺ ec vg 16

Recombinantes

$$FR = \frac{(12+14+14+16)}{1008}$$

$$FR = \frac{56}{1008}$$

$$FR = 0,055 \times 100$$

$$FR = 5,5 \text{ cM}$$

FR = frequência de recombinação

Locos *sc* e *vg* (ignoramos *ec*):

Recombinantes: *sc vg⁺* e *sc⁺ vg*

sc ec vg 235

sc⁺ ec⁺ vg⁺ 241

sc ec vg⁺ 243

sc⁺ ec⁺ vg 233

sc ec⁺ vg 12

sc⁺ ec vg⁺ 14

sc ec⁺ vg⁺ 14

sc⁺ ec vg 16

$$FR = \frac{(243+233+14+16)}{1008}$$

$$FR = \frac{506}{1008} = 0,502$$

$$FR = 0,502 \times 100$$

$$FR = 50,2 \text{ cM} > 50 \text{ cM}$$

Conclusão:

Locos *sc* e *vg* não estão ligados

Recombinantes



Vejam os a FR entre os locos *ec* e *vg*:

- *ec* e *vg* - Recombinantes: *ec vg*⁺ e *ec*⁺ *vg*

Recombinantes

| | |
|--|-----|
| <i>sc ec vg</i> | 235 |
| <i>sc</i> ⁺ <i>ec</i> ⁺ <i>vg</i> ⁺ | 241 |
| <i>sc ec vg</i> ⁺ | 243 |
| <i>sc</i> ⁺ <i>ec</i> ⁺ <i>vg</i> | 233 |
| <i>sc ec</i> ⁺ <i>vg</i> | 12 |
| <i>sc</i> ⁺ <i>ec vg</i> ⁺ | 14 |
| <i>sc ec</i> ⁺ <i>vg</i> ⁺ | 14 |
| <i>sc</i> ⁺ <i>ec vg</i> | 16 |

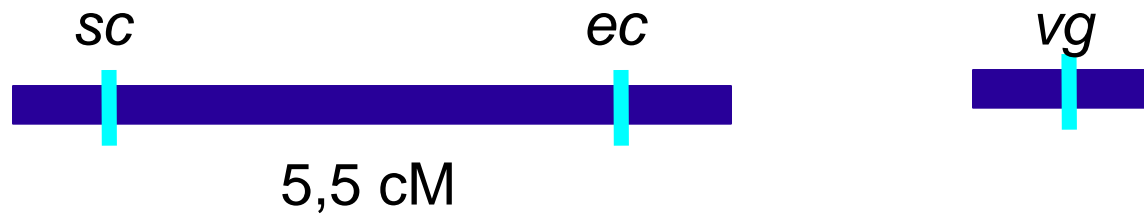
$$FR = \frac{(243+233+12+14)}{1008}$$

$$FR = \frac{502}{1008}$$

$$FR = 0,4980 \times 100$$

$$FR = 49,8 \text{ cM aprox. } 50 \text{ cM}$$

Locos *ec* e *vg* não estão ligados



- Tendo informações a respeito das relações de ligação entre os três genes, podemos reescrever os genótipos dos genitores da seguinte forma:

$$sc^+ ec^+ / sc ec ; vg^+ / vg \quad \times \quad sc ec / sc ec ; vg / vg$$

- Observação: em situações reais, a hipótese de ligação entre os genes ($r=50$ cM) é sempre testada estatisticamente.

Exemplo 3: mutantes em *Drosophila*

v -> olhos vermilion

sv -> cross veinless -> sem nervuras nas asas

ct -> margens das asas cortadas

Parentais: $\frac{v^+ cv ct}{v^+ cv ct} \times \frac{v cv^+ ct^+}{v cv^+ ct^+}$

F1: $\frac{v^+ cv ct}{v cv^+ ct^+} \times \frac{v cv ct}{v cv ct}$

| | |
|--|-------|
| v cv ⁺ ct ⁺ | 580 |
| v ⁺ cv ct | 592 |
| v cv ct ⁺ | 45 |
| v ⁺ cv ⁺ ct | 40 |
| v cv ct | 89 |
| v ⁺ cv ⁺ ct ⁺ | 94 |
| v cv ⁺ ct | 3 |
| v ⁺ cv ct ⁺ | 5 |
| | <hr/> |
| | 1.448 |

Tipos parentais: $v\ cv^+\ ct^+$ e $v^+\ cv\ ct$
-> maiores frequências

Qual a FR entre os locos v e cv ?

Recombinantes: $v\ cv$; $v^+\ cv^+$

$v\ cv^+\ ct^+$ 580

$v^+\ cv\ ct$ 592

$v\ cv\ ct^+$ 45

$v^+\ cv^+\ ct$ 40

$v\ cv\ ct$ 89

$v^+\ cv^+\ ct^+$ 94

$v\ cv^+\ ct$ 3

$v^+\ cv\ ct^+$ 5

Recombinantes

$$FR = \frac{(45+40+89+94)}{1448}$$

$$FR = 268/1448$$

$$FR = 0,1850 \times 100$$

$$FR = 18,5\text{ cM}$$

Qual a FR entre os locos *cv* e *ct*?

Recombinantes: *cv ct⁺* ; *cv⁺ ct*

v cv⁺ ct⁺ 580

v⁺ cv ct 592

v cv ct⁺ 45

v⁺ cv⁺ ct 40

v cv ct 89

v⁺ cv⁺ ct⁺ 94

v cv⁺ ct 3

v⁺ cv ct⁺ 5

Recombinantes



$$FR = \frac{(45+40+3+5)}{1448}$$

$$FR = \frac{93}{1448}$$

$$FR = 0,0640$$

$$FR = 0,0640 \times 100$$

$$FR = 6,4 \text{ cM}$$

Qual a FR entre os locos v e ct?

Recombinantes: v ct ; cv⁺ ct⁺

v cv⁺ ct⁺ 580

v⁺ cv ct 592

v cv ct⁺ 45

v⁺ cv⁺ ct 40

v cv ct 89

v⁺ cv⁺ ct⁺ 94

v cv⁺ ct 3

v⁺ cv ct⁺ 5

Recombinantes

$$FR = \frac{(89+94+3+5)}{1448}$$

$$FR = \frac{191}{1448}$$

$$FR = 0,1320 \times 100$$

$$FR = 13,2 \text{ cM}$$

F1

$\frac{v^+ \text{ cv } ct}{v \text{ cv}^+ ct^+}$

Locos FR (cM)

$v \text{ e } cv \quad 18,5$

$v \text{ e } ct \quad 13,2$

$cv \text{ e } ct \quad 6,4$



$\frac{v^+ \text{ ct } cv}{v \text{ ct}^+ cv^+}$

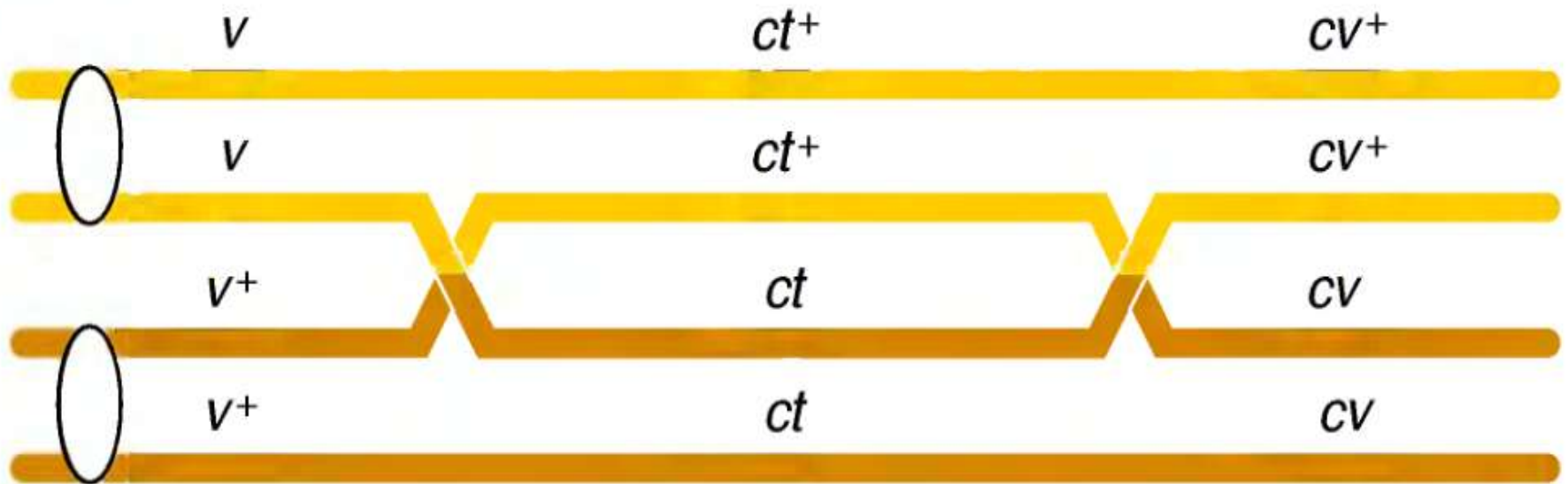
x

$\frac{v \text{ ct } cv}{v \text{ ct } cv}$



Ordem correta dos genes

- Com o cruzamento teste foi possível determinar a ordem dos três genes no cromossomo
- As duas classes mais raras de genótipos correspondem a duplos recombinantes que surgem de dois crossings



As duas distâncias menores somam 19,6 cM, que é maior que 18,5 cM, a distância calculada entre v e cv. Porque?

Pelo modo em que analisamos as duas classes mais raras. Essas são recombinantes duplos.

Para calcular a FR entre v e cv, não computamos os RD. Isto subestima a distância entre v e cv. -> Poderíamos contar as duas classes mais raras duas vezes, pois cada uma delas representa uma recombinação. Portanto:

$$FR = \frac{45 + 40 + 89 + 94 + 3 + 3 + 5 + 5}{1.448} \times 100 = 19,6\%$$

$$FR = 19,6 \text{ cM}$$

Interferência: 1 - coincidência. [I = 1 - C]

$$\text{Coincidência (C)} = \frac{\text{FRDO}}{\text{FRDE}}$$

$$\text{FRDO} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de duplos recomb.}}{\text{N}^\circ \text{ total de descend.}} = \frac{3 + 5}{1.448} = 0,0055$$

$$\text{FRDE} = \text{Dist. região I} \times \text{Dist. região II} = 0,132 \times 0,064 = 0,0084$$

$$I = 1 - \frac{0,0055}{0,0084} = 1 - 0,65 = 0,35 \rightarrow 35\%$$

Se $I = 1$ -> interferência completa \rightarrow FRDO = 0 ($C = 0$)

Neste caso não observamos duplos recombinantes

Se $I = 0$ -> não houve interferência ($C = 1$)

Nesse caso o número de duplo recombinantes observado é igual ao número esperado de duplos recombinantes

Se $0 < I < 1$ -> está ocorrendo interferência

Referências para estudo:

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. 2008. **Introdução à genética**. RJ: Guanabara Koogan, 9ª Ed. 712p. [575.1 161.9].

Cap. 4 - Mapeamento de cromossomos eucarióticos por recombinação

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. 2004. **Genética na Agropecuária**. Lavras: Editora UFLA, 3ª Ed. 472p. [R165g4 e.1 95052].

Cap. 9 - Ligação, permuta genética e pleiotropia