

Doc. no 18



ISSN 0103-6238



CURSO INTERPRETAÇÃO DE ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES

[illegible]

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Francisco Sérgio Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Diretor-Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores-Executivos

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental

Chefe Geral

Eduardo Alberto Vilela Morales

Chefe Adjunto Administrativo

Hideo Hiramatsu

Chefe Adjunto de Apoio Técnico

Dorremi Oliveira

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Jackson Barcelar Nunes Xavier

EMBRAPA-CPAA. Documentos, 18

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM 010, km 29

Telefone: PABX (092) 622 2012 / 622 4971 (direto)

Fax: (092) 622 1100

Caixa Postal: 319

CEP 69011 970, Manaus, AM

cpaa@cpaa.embrapa.br

Tiragem: Exemplar único

Comitê de Publicações

Dorremi Oliveira (Presidente)

Manoel da Silva Cravo (Suplência da Presidência)

Ângela Maria Conte Leite

Divânia de Lima

Margareth Queiroz dos Santos Bartholo

Marinice Oliveira Cardoso

Palmira Costa Novo Sena

Roberval Monteiro Bezerra de Lima

Sebastião Eudes Lopes da Silva

Suplentes

João Ferdinando Barreto

Terezinha Batista Garcia

Diagramação & Arte

Claudeilson Lima Silva



CURSO DE INTERPRETAÇÃO DE ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES, 1998, Manaus. **Coletânea de postila.** Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998. 2v. não paginado. (EMBRAPA-CPAA. Documentos, 18).

Curso organizado pela Embrapa Amazônia Ocidental em colaboração com o INIA (Madri, Espanha), em 1998. Manaus AM.

ISSN 0103-6238

1. Planta - Biologia molecular - Cursos. 1. Embrapa Amazônia Ocidental. (Manaus, AM). I. Título. II. Série.

CDD 572.82

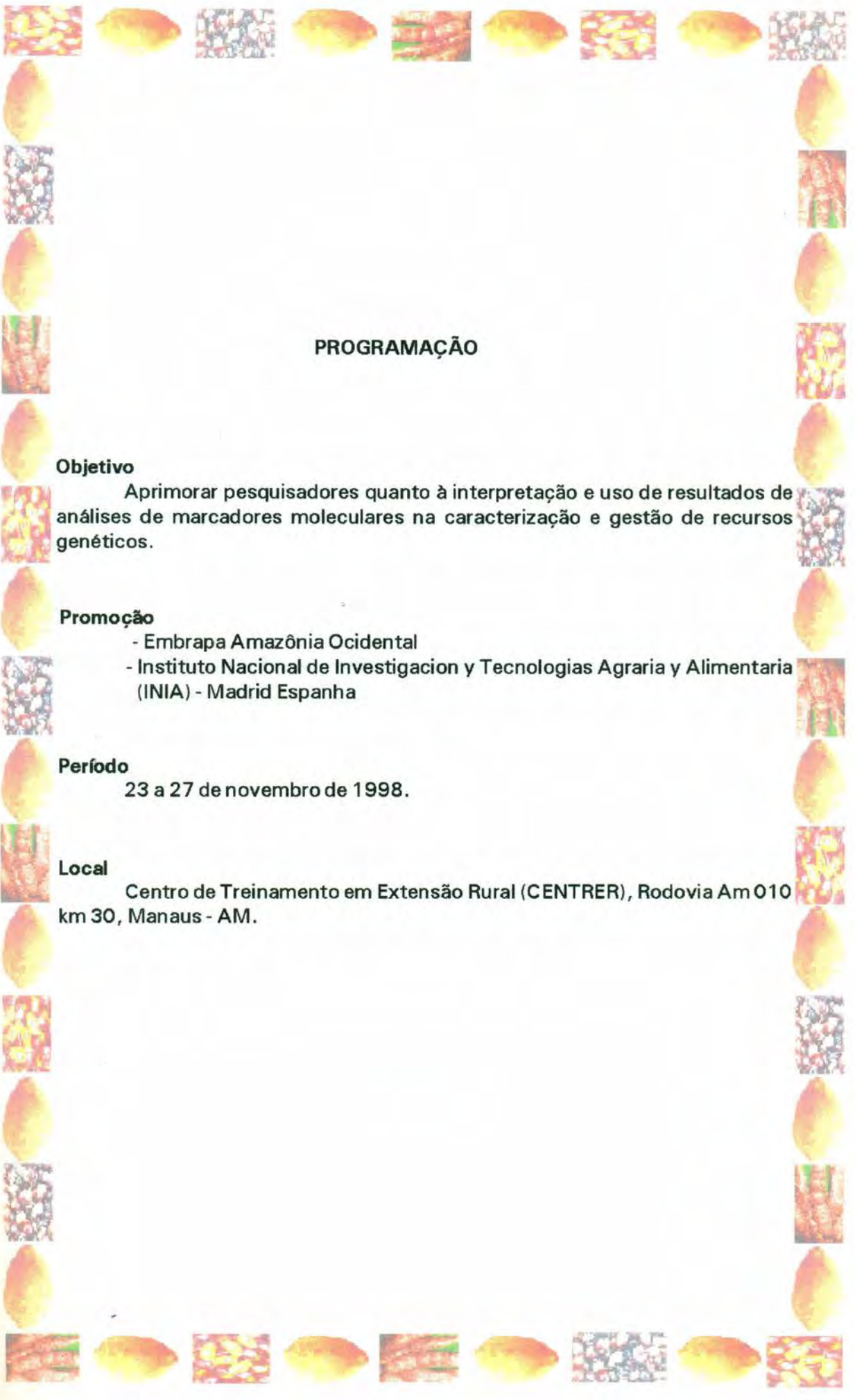
© Embrapa 1998

Organização

Aparecida das G. Claret de Souza

Terezinha Batista Garcia





PROGRAMAÇÃO

Objetivo

Aprimorar pesquisadores quanto à interpretação e uso de resultados de análises de marcadores moleculares na caracterização e gestão de recursos genéticos.

Promoção

- Embrapa Amazônia Ocidental
- Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologias Agraria y Alimentaria (INIA) - Madrid Espanha

Período

23 a 27 de novembro de 1998.

Local

Centro de Treinamento em Extensão Rural (CENTRER), Rodovia Am 010 km 30, Manaus - AM.

SUMÁRIO

Volume 1

Apresentação

Lista de participantes

Conceitos básicos de biologia molecular

Técnicas gerais em biologia molecular

Isoenzimas

RFLPs

RAPDs

AFLPs

Uso de marcadores moleculares na biologia de plantas

Emprego de marcadores moleculares no melhoramento de plantas

Uso de marcadores moleculares para caracterização dos recursos fitogenéticos

Técnicas baseadas na amplificação de fragmentos de DNA conhecidos

Uso de marcadores moleculares (RFLP e AFLP) no estudo e gestão da diversidade genética do gênero *Elaeis*

Volume 2

NTSYS-pc – Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System

TDI's – Lane Manager Versão 2.1 – Manual do Usuário

APRESENTAÇÃO

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem havido, nos últimos anos, uma grande revolução na área de genética e melhoramento de plantas. Face a velocidade em que isto está ocorrendo, acentua-se a necessidade de treinar pessoal visando acompanhar essa evolução e, conseqüentemente, modernizar a pesquisa na Amazônia.

A percepção desse processo levou a Embrapa Amazônia Ocidental e o Instituto Nacional de Investigación y Tecnologías Agrarias y Alimentaria (INIA) – Espanha a realizar, em parceria, o Curso de Interpretação de Análise de Marcadores Moleculares, com resultados que em muito irá contribuir para a multiplicação dos conhecimentos adquiridos. Daí a importância desta coletânea, posta a disposição dos interessados.

Aparecida das Graças Claret de Souza
Terezinha Batista Garcia



Participantes do Curso Interpretação de Análises de Marcadores Moleculares

Nome: Ana Fabíola da Silva Coelho

Área de atuação: Fitotecnia/Cultura de Tecido

Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental

Endereço: Quadra F, casa 10 Vivenda Verde. Cx. Postal 2248

CEP: 69061-970 Manaus/AM.

E-mail: afcoelho@cpaa.embrapa.br

Nome: Aparecida das Graças Claret de Souza

Área de atuação: Fitomelhoramento e Recurso Genético de Cupuaçu

Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental

Endereço: Cx. Postal 319 CEP: 69011-970 -Manaus/AM.

E-mail: claret@internext.com.br

Nome: Charles Roland Clement

Área de atuação: Fitomelhoramento e Recurso Genético de Fruteiras

Instituição: INPA

Endereço: Cx. Postal 478 - CEP: 69061-970 Manaus/AM.

Nome: Edson Barcelos

Área de atuação: Fitomelhoramento e Recurso Genético de Dendê

Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental

Endereço: Cx. Postal 319 CEP: 69011-970 - Manaus/AM.

E-mail: barcelos@cpaa.embrapa.br

Nome: Francisco José da Silva Ledo

Área de atuação: Melhoramento de Plantas

Instituição: Embrapa Acre

Endereço: Cx. Postal 392 CEP: 69901-180 Rio Branco/Acre.

E-mail: ledo@mdnet.com.br fledo@cpafac.embrapa.br

Nome: F. Javier Gallego

Área de atuação: Biologia (Genética Molecular)

Instituição: INIA Madri/Espanha

Endereço: Dpto. de Mejora Genetica y Biotecnologia.

Autopista A-6, Km 7,5. CEP. 28040.

Nome: Joselita Maria Mendes dos Santos

Área de atuação: Genética de População de Mosquitos (Anopheles e Aedes)

Instituição: INPA/CPCS

Endereço: Cx. Postal 478 - CEP: 69061-970 Manaus/AM.

E-mail: jsanto@inpa.gov.br

Nome: João Ferdinando Barreto

Área de atuação: Fitomelhoramento e Banco de Germoplasma de Mandioca.

Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental

Endereço: Cx. Postal 319 CEP: 69011-970 - Manaus/AM.

Nome: Javier Ibañez

Área de atuação: Biologia (Genética Molecular).

Instituição: IMIA Madri/Espanha.

E-mail: jibanez@arrakis.es



Nome: Januário Gama dos Santos
Área de atuação: Microbiologia
Instituição: Universidade do Amazonas
Endereço: Rua 7, nº 343, Alvorada II - Manaus/AM.

Nome: Jânia Lília da Silva Bentes
Área de atuação: Fitopatologia
Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Rua Rio Javari, nº 275 Adrianópolis - Manaus/AM.

Nome: **Lucelisy Silva Borges**
Área de atuação: Biotecnologia Vegetal/Cultura de Tecido
Instituição: IDAM
Endereço: Rua Cametá, Q.2, Nº 9 Conj. Deborah. CEP: 69040-410 - Manaus/AM.
E-mail: luborges@usp.br

Nome: Michele Braule Pinto Ramos
Área de atuação: Silvicultura, Sistemas Agroflorestal
Instituição: Universidade do Amazonas
Endereço: Av. Constantino Nery, nº 2229, Bl. 17, Ap. 110, Chapada. CEP: 69011-000 - Manaus/AM.

Nome: Maria Elizabeth de Assis Elias
Área de atuação: Fisiologia Vegetal
Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Cx. Postal 319 CEP: 69011-970 - Manaus/AM.

Nome: Nelcimar Reis Souza
Área de atuação: Recursos Fitogenéticos
Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Cx. Postal 319 CEP: 69011-970 - Manaus/AM.
E-mail: gsousa@objetivomao.br

Nome: Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
Área de atuação: Microorganismo/Biotecnologia.
Instituição: Universidade do Amazonas
Endereço: Rua Manicoré, nº 250, Cachoeirinha - Manaus/AM.

Nome: Regina Quisen
Área de atuação: Genética e Melhoramento Florestal
Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Cx. Postal 319 CEP: 69011-970 - Manaus/AM.
E-mail: quisen@writeme.com

Nome: Solange de Melo Vêras
Área de atuação: Fitopatologia
Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Rua Lobo D'Almada, 416, Centro CEP: 69010-030 - Manaus/AM.

Nome: Terezinha Batista Garcia
Área de atuação: Fitomelhoramento
Instituição: Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Cx. Postal 319 CEP: 69011-970 - Manaus/AM.
E-mail: tgarcia@cpaa.embrapa.br

Nome: Vicente Torres
Área de atuação: Biologia (Genética Molecular)
Instituição: INIA Madri/Espanha
Endereço: Depto. de Mejora Genetica y Biotecnologia.
Autopista A-6, Km 7,5. CEP. 28040.

Conceitos básicos de Biología Molecular

Conceitos básicos de Biologia Molecular

OBJETIVO DEL MODULO 1.

**FAMILIARIZAR A LOS MEJORADORES Y A LOS RESPONSABLES DE BANCOS DE GERMOPLASMA
CON EL MANEJO DE LA INFORMACION GENETICA ESCRITA EN LAS SECUENCIA DEL DNA.**

CONCEPTOS BASICOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

¿ QUE MOLECULAS PORTAN LA INFORMACION GENETICA ?

DNA y RNA.

¿ QUE MOLECULAS EJECUTAN LA INFORMACION GENETICA ?

PROTEINAS y RNA.

¿ QUE MOLECULAS ACTUAN DE INTERMEDIARIOS ?

RNA.

¿ QUE SE DEBE EXIGIR A UN PORTADOR DE INFORMACION ?

ESTABILIDAD.

¿ QUE SE DEBE EXIGIR A EJECUTORES E INTERMEDIARIOS ?

ESTABILIDAD HASTA CUMPLIR CON SU FUNCION.

¿ QUIEN DETERMINA LA ESTABILIDAD DE UNA MOLECULA ?

SU ESTRUCTURA.

¿ QUIEN DETERMINA LA ESTRUCTURA DE UNA MOLECULA ?

**LA NATURALEZA QUIMICA DE SUS COMPONENTES Y LAS
INTERACCIONES ENTRE ELLOS.**

MORFOLOGIA



AMBIENTE

+

GENOMA



TECNICAS
DE
BIOLOGIA MOLECULAR



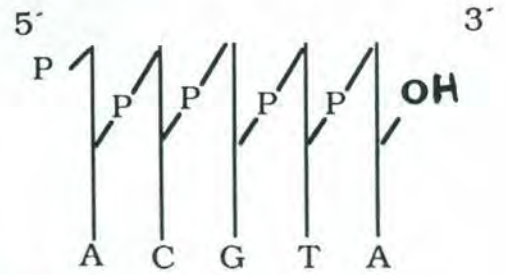
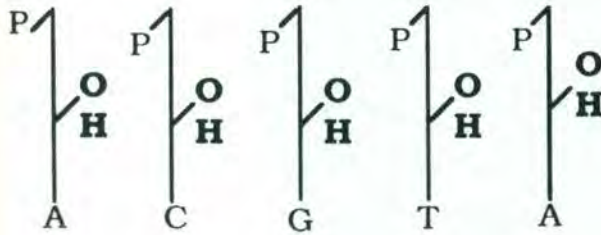
PCR



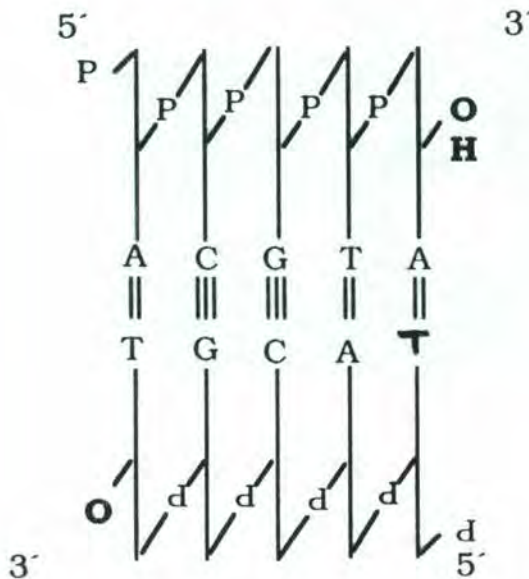
Estructura de Acidos Nucleicos

Estructura primaria.

- enlace fosfodiester
- oligonucleotidos.polinucleotidos
- concepto de secuencia.



- Banda doble.
- apareamiento de bases (complementariedad)
- antiparalelismo



$$[A]=[T]$$

$$[C]=[G]$$

- Doble helice.
- Lineal.
- Circular: Circulo abierto ó Circulo cerrado

Figure 1.5 A nucleic acid has a sugar-phosphate backbone, and only four types of side-group.

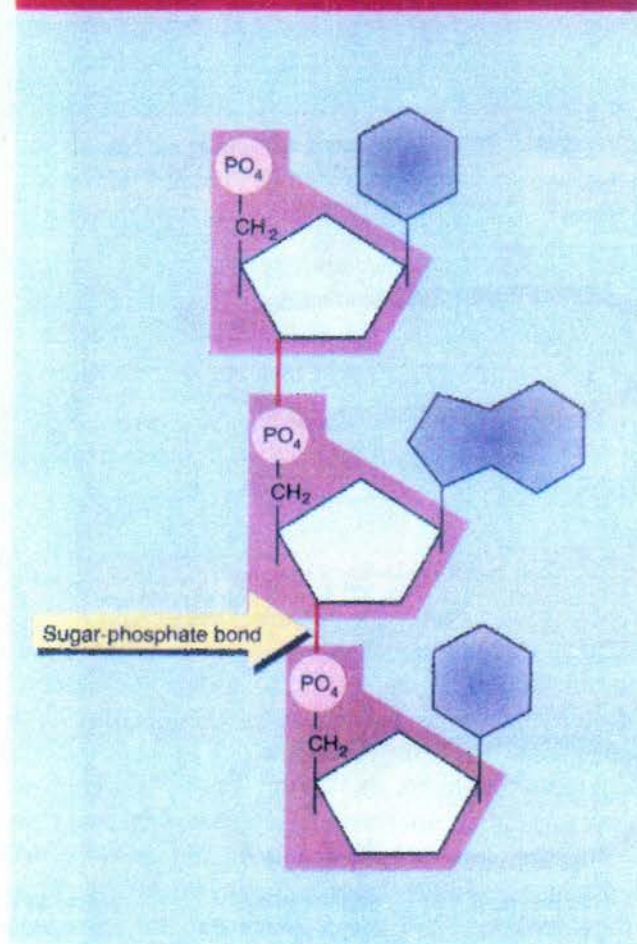
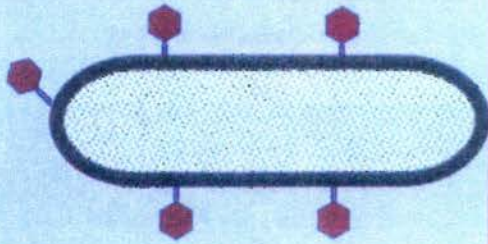
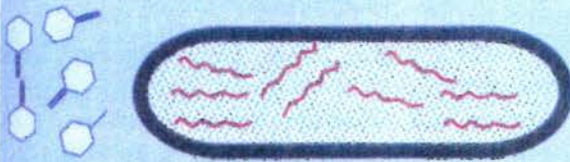


Figure 4.2 The genetic material of phage T2 is DNA

Bacteria are infected with phages labeled with ^{32}P (●) in DNA or with ^{35}S (●) in protein



Separate phage coats and infected bacteria
Phage coats contain 80% of ^{35}S label
Infected bacteria contain 70% of ^{32}P label



Isolate progeny phage particles
Progeny phages have 30% of ^{32}P label and <1% of ^{35}S label

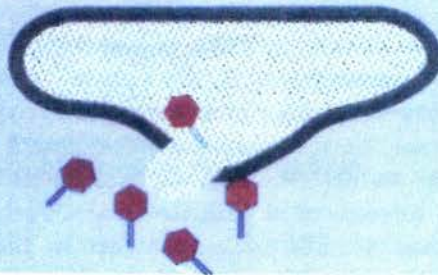
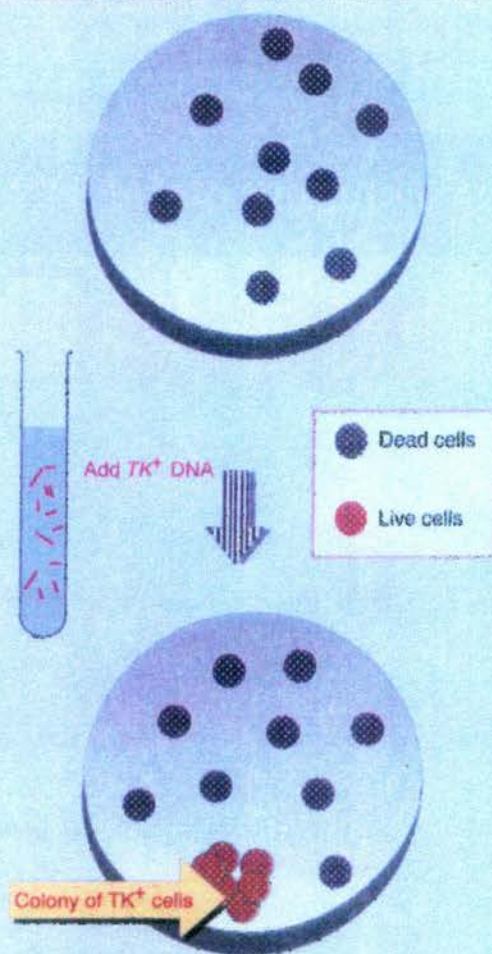


Figure 4.3 Eukaryotic cells can acquire a new phenotype as the result of transfection by added DNA.

Cells that lack *TK* gene cannot produce thymidine kinase and die in absence of thymidine



Some cells take up *TK* gene; descendants of transfected cell pile up into a colony

Figure 4.4 Pyrimidines have a six carbon ring.

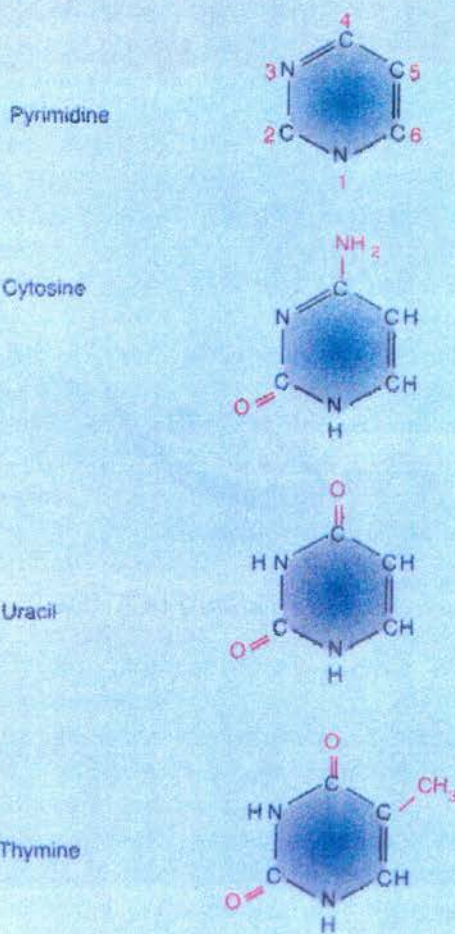
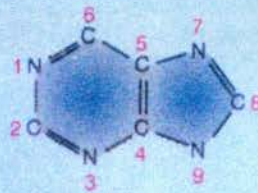
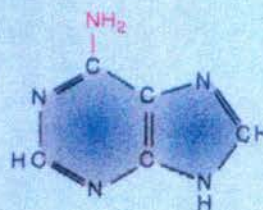


Figure 4.5 Purines consist of two joined carbon rings, with five and six members.

Purine



Adenine



Guanine

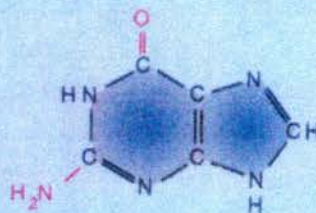


Figure 4.7 A polynucleotide chain consists of a series of 5'-3' sugar-phosphate links that form a backbone from which the bases protrude

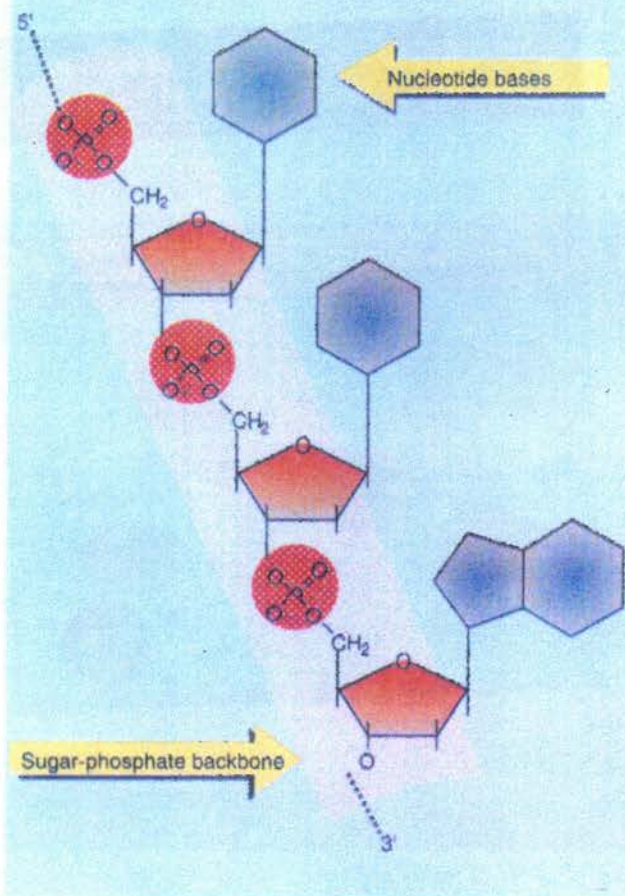


Figure 4.8 Nucleotides may carry phosphate in the 5' or 3' position.

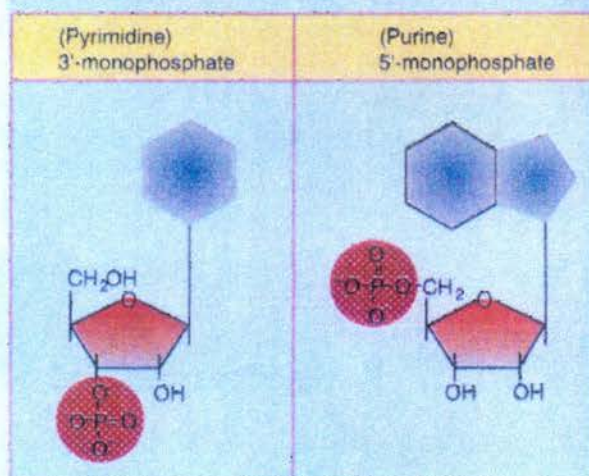


Figure 4.11 Complementary base pairing involves the formation of two hydrogen bonds between A and T, and of three hydrogen bonds between G and C. No other pairs form in DNA.

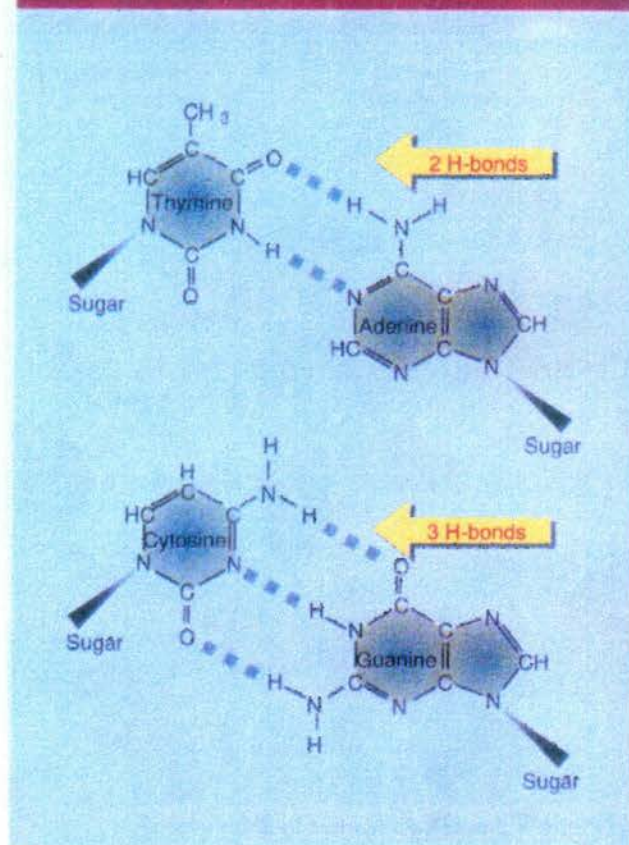


Figure 4.12 The double helix maintains a constant width because purines always face pyrimidines in the complementary A-T and G-C base pairs.

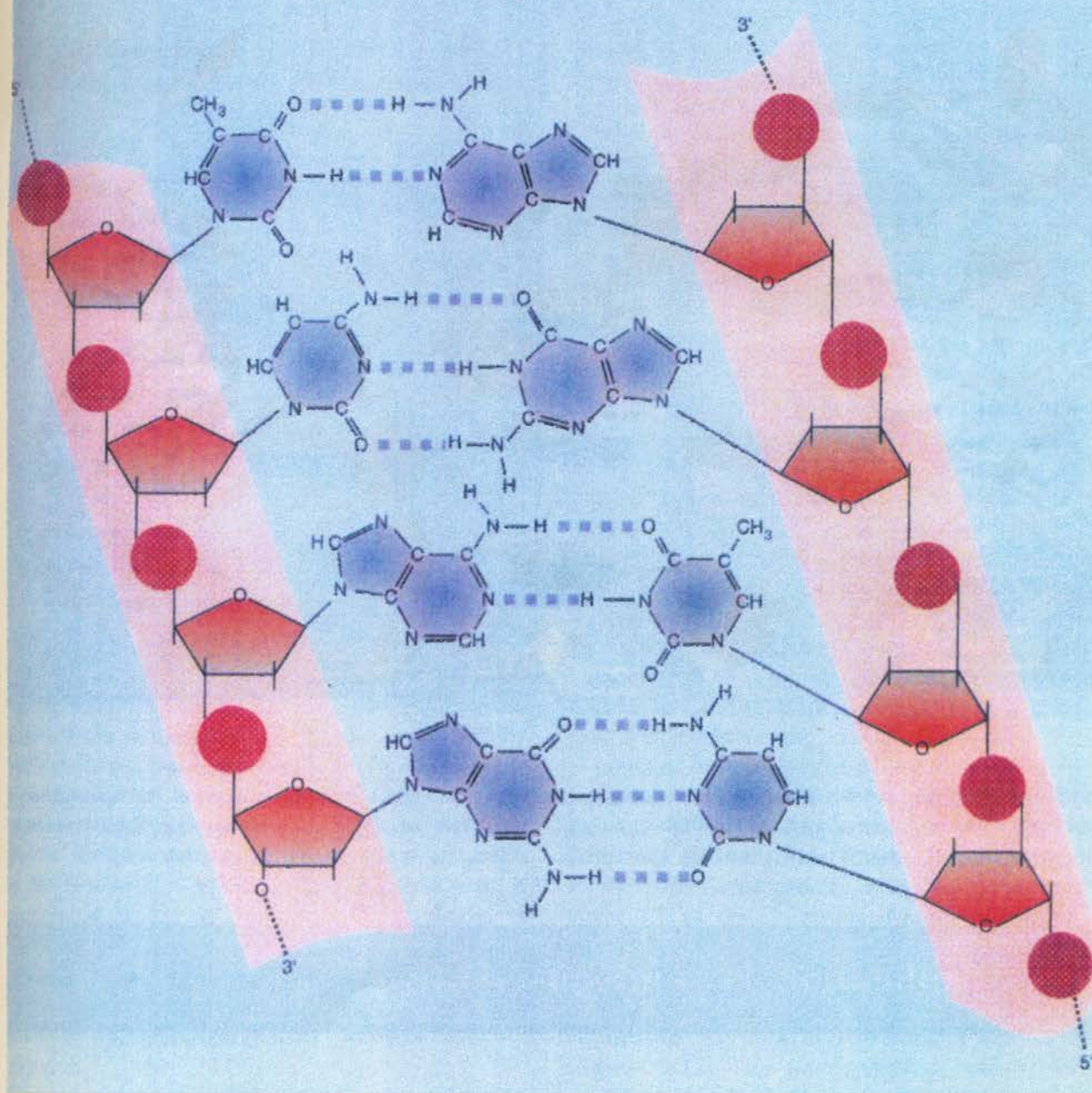


Figure 4.13 Flat base pairs lie perpendicular to the sugar-phosphate backbone.

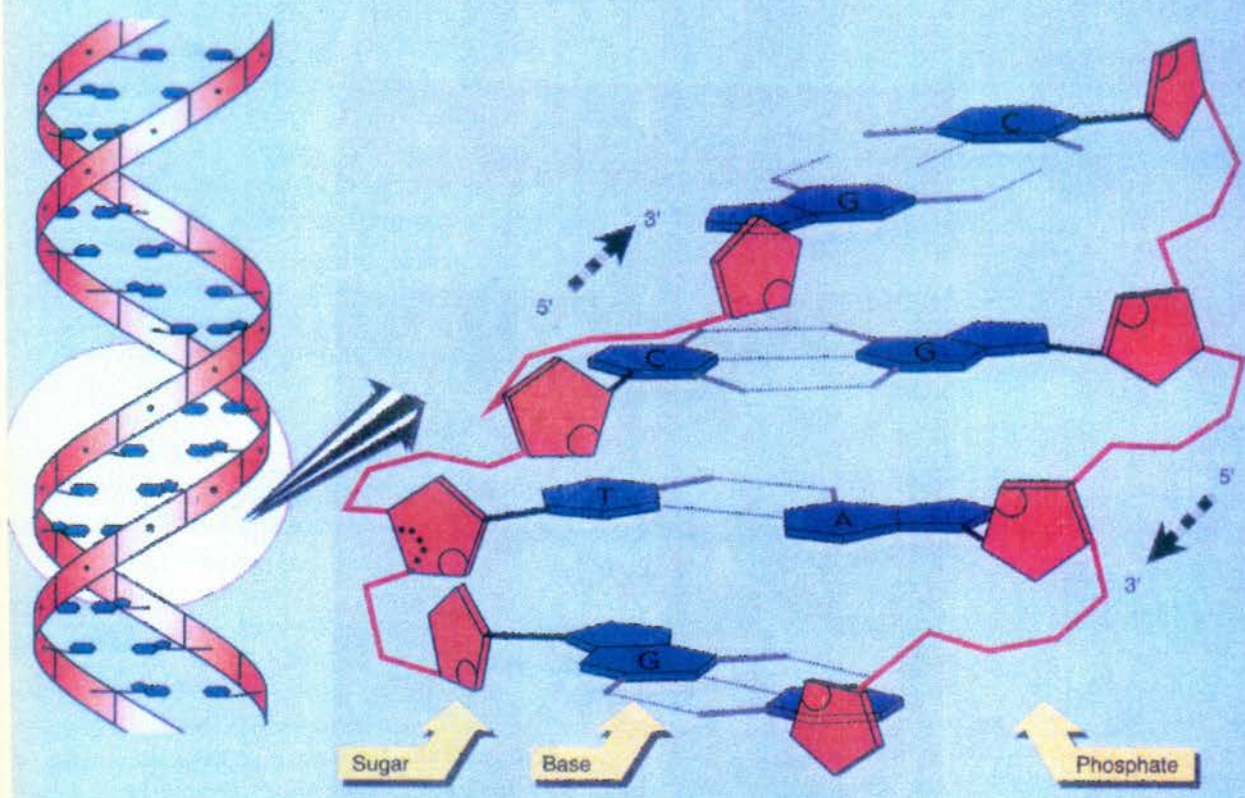


Figure 4.14 The two strands of DNA form a double helix.

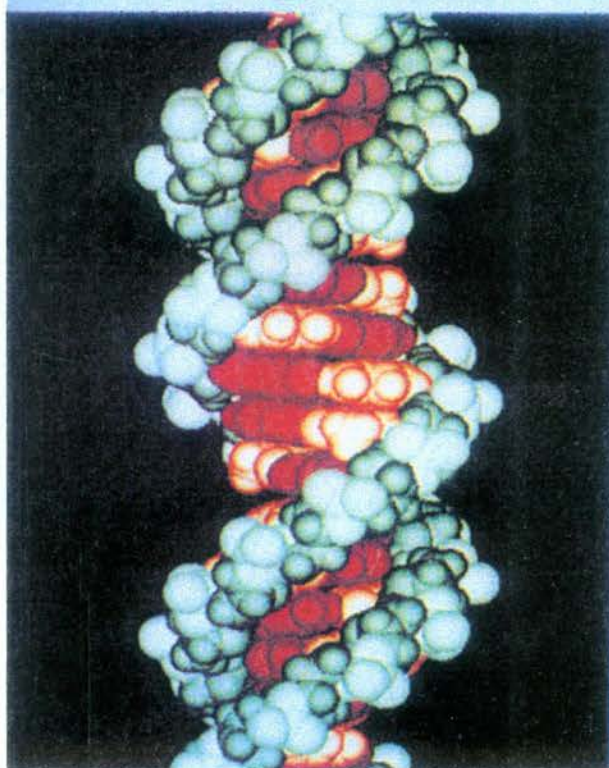
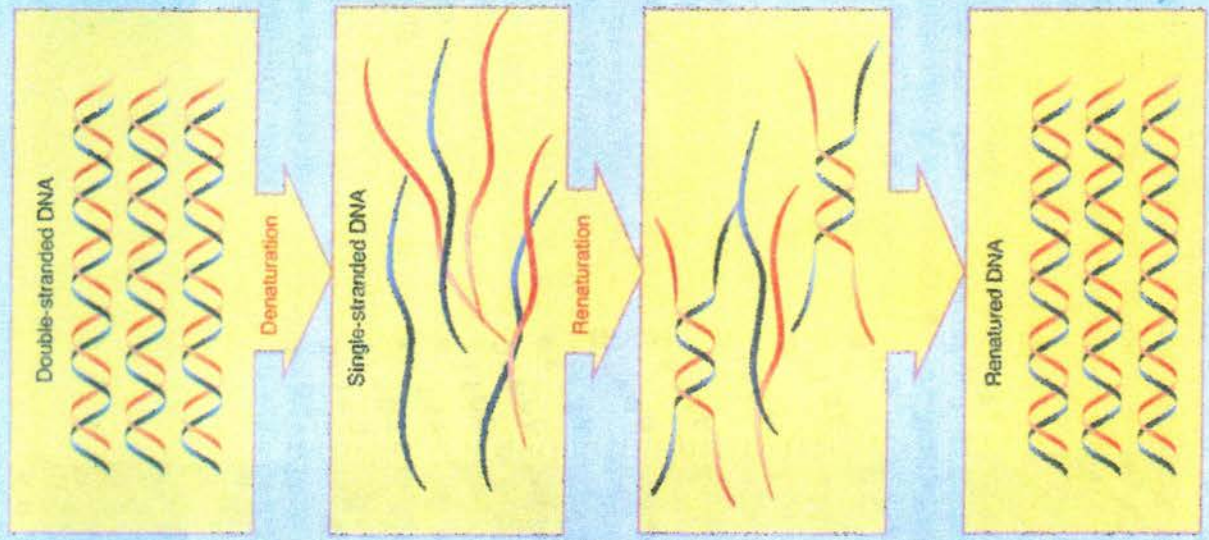
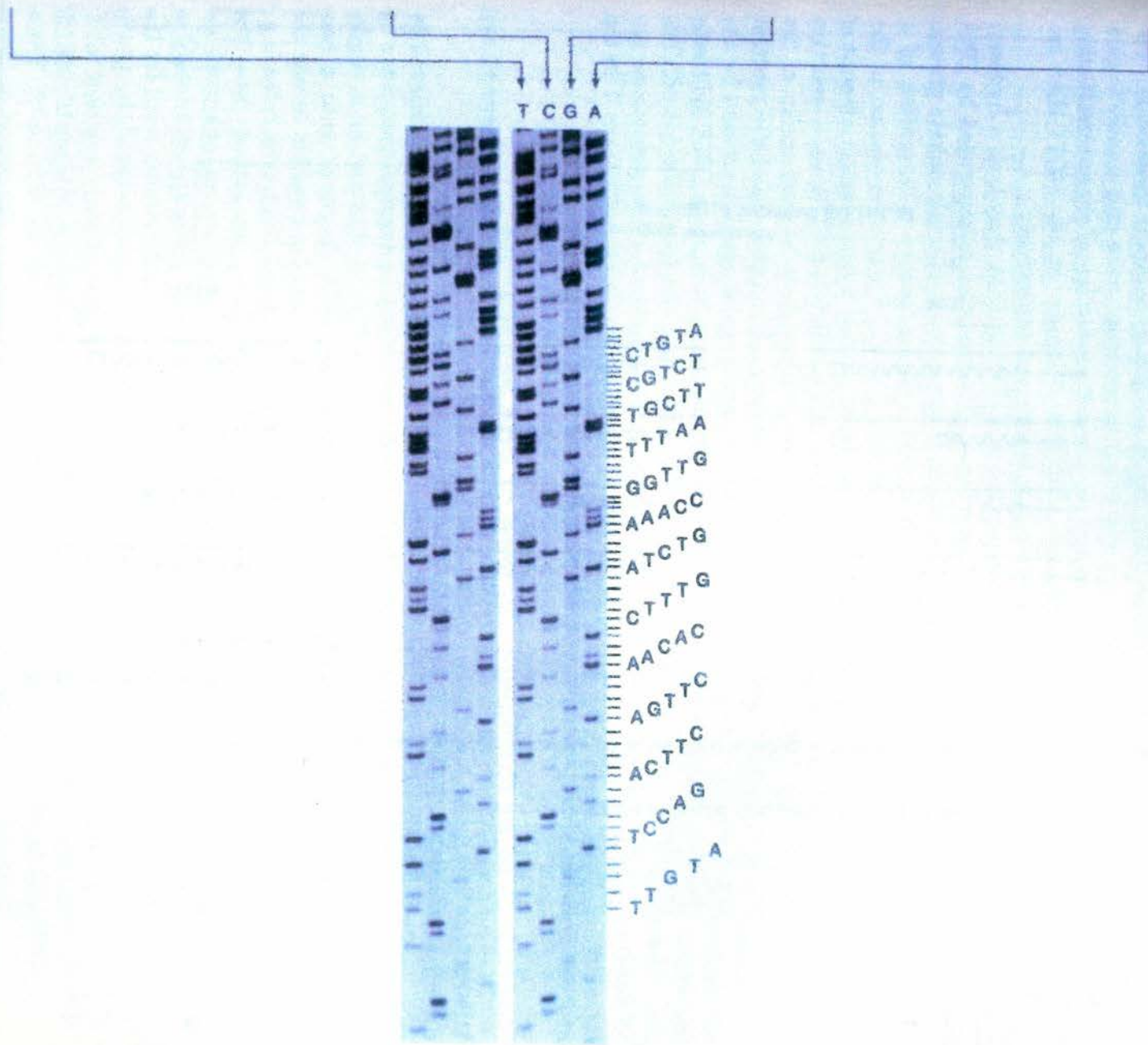
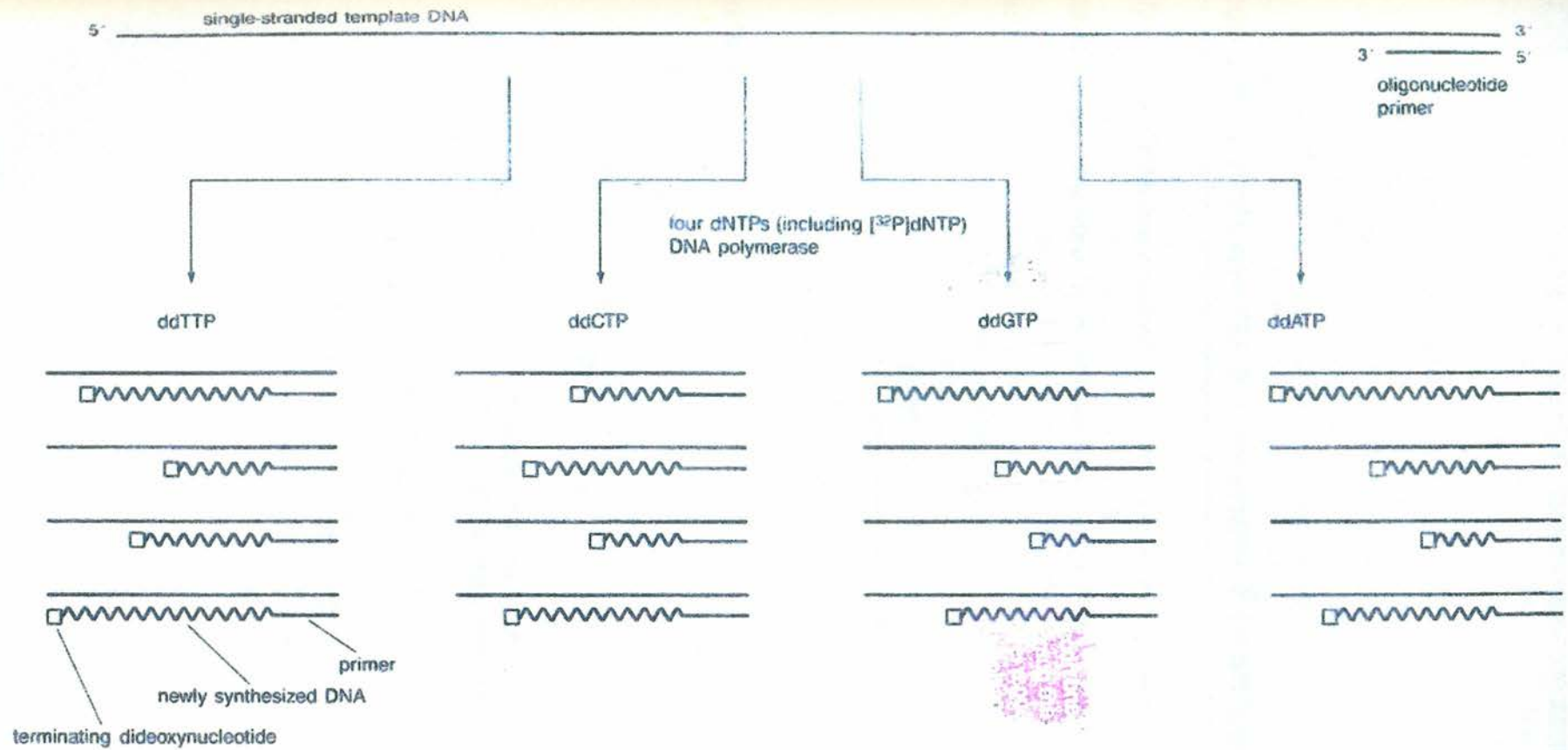


Figure 5.2 Denatured single strands of DNA can renature to give the duplex form.





Sequencing by the Sanger dideoxy-mediated chain-termination method.



The newly synthesized chains terminate when a ddNTP is incorporated in place of the normal dNTP

Denature and separate fragments of radiolabeled DNA by electrophoresis

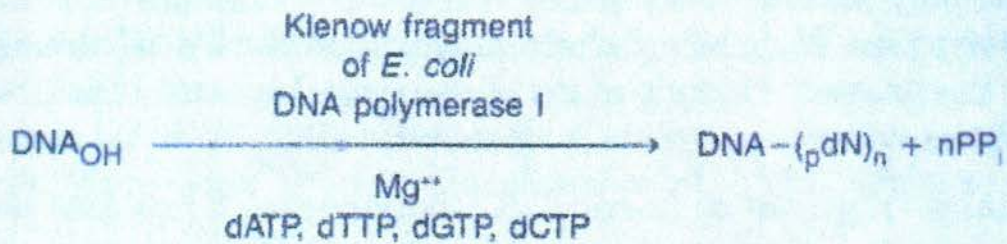


E. coli DNA Polymerase I Klenow Fragment

Activity: 5' → 3' DNA polymerase

Substrate: Single-stranded DNA template with a primer containing a free 3'-hydroxyl group.

Reaction:



For example:

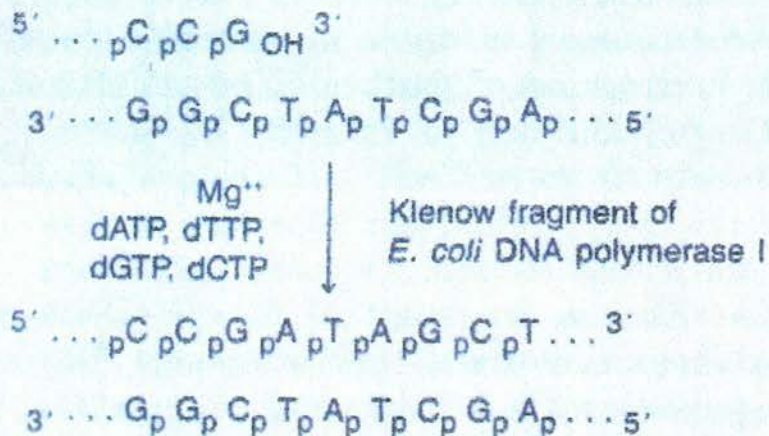
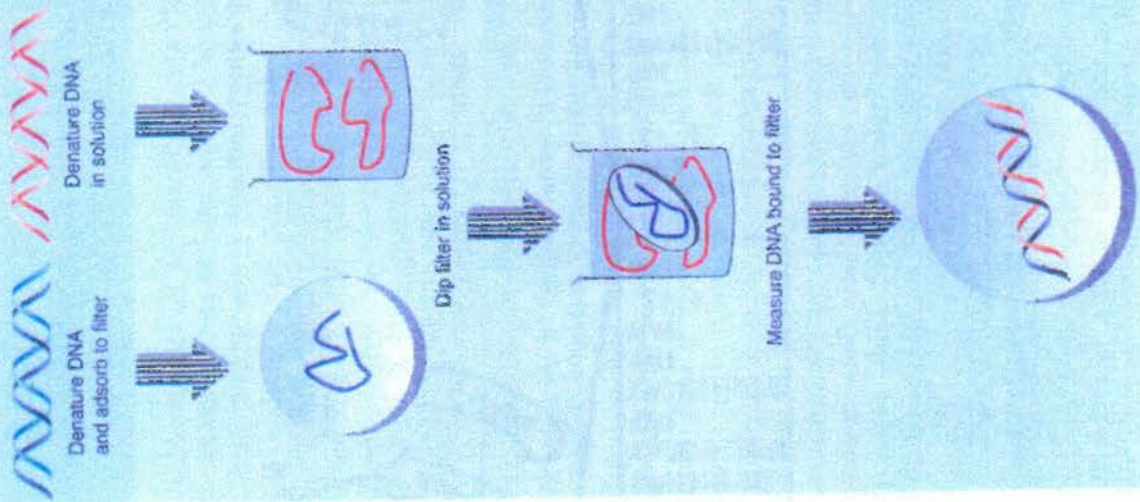
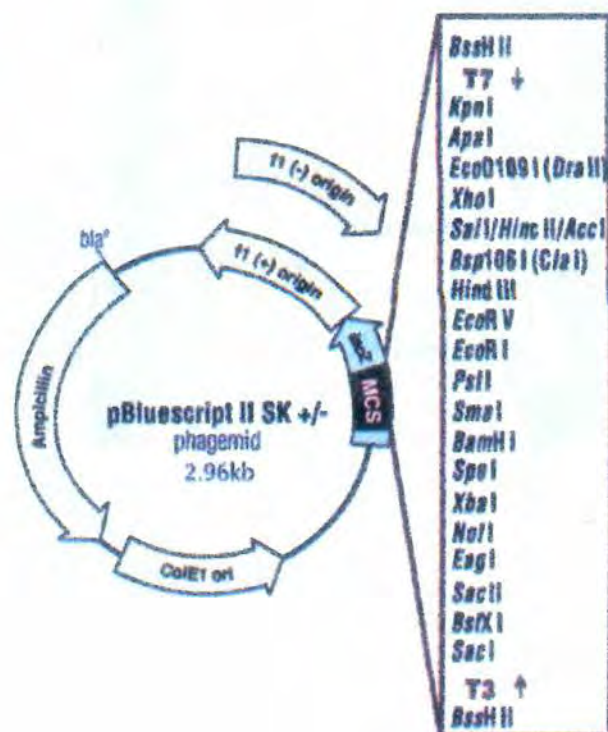
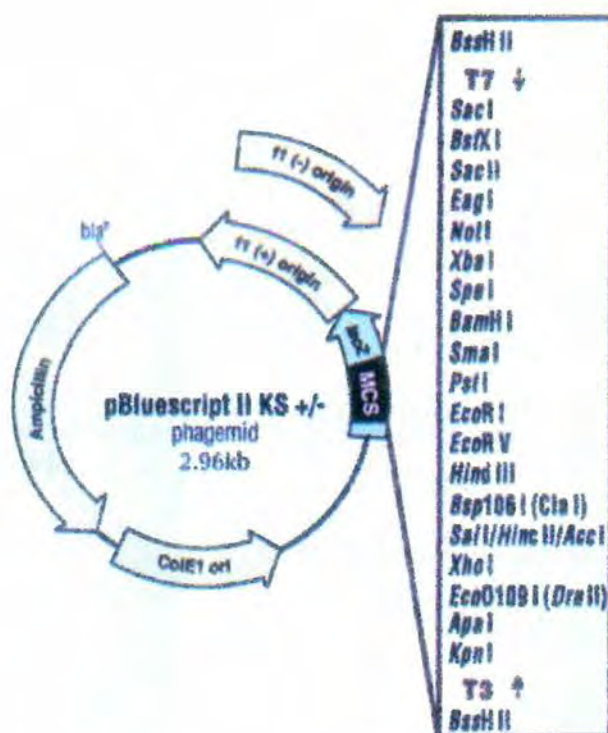


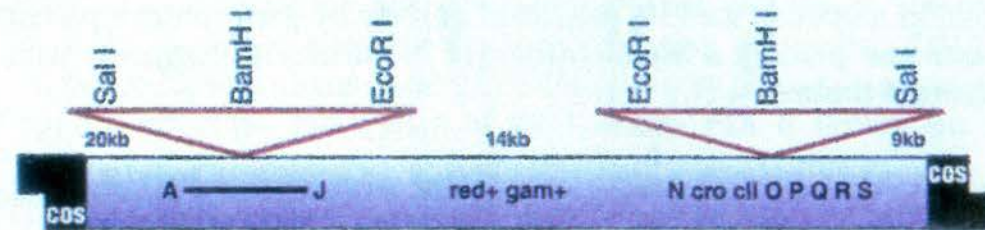
Figure 5.3 Filter hybridization establishes whether a solution of denatured DNA (or RNA) contains sequences complementary to the strands immobilized on the filter.





REFERENCE

I. Frischauf, A.M., et al. (1983) *J. Mol. Biol.* 170: 827.



Map of Lambda EMBL3



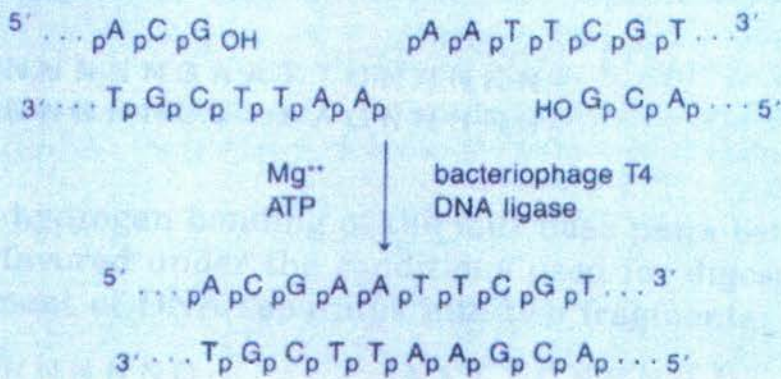
Map of Lambda EMBL4

Bacteriophage T4 DNA Ligase

Activity: Ligation of cohesive DNA termini or nicks

Substrate: Active on double-stranded DNA with complementary cohesive termini that base pair to bring together 3'-hydroxyl and 5'-phosphate termini. In addition, the enzyme is active on nicked DNA and active, albeit far less efficiently, on RNA substrates. (For a more complete description of substrates, see Engler and Richardson 1982.)

Reaction:



LIGATION OF TERMINI CREATED BY RESTRICTION ENZYMES

Compatible Cohesive Termini

If the restriction enzyme cleaves each strand of the substrate DNA on the side of the axis of dyad symmetry, the resulting staggered break yields fragments of DNA that carry protruding cohesive 5' termini. For example, the enzyme *EcoRI* recognizes the sequence



in double-stranded DNA and cleaves it as follows:



The hydrogen bonding of the four base pairs between the sites of cleavage is not favored under the conditions used for digestion. Therefore, the original segment of DNA separates into two fragments:

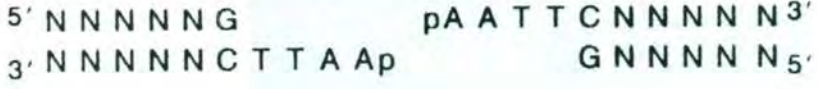


Figure 20.1 Overview: plasmid vectors can be used to clone any fragment of DNA that is inserted at an appropriate site.

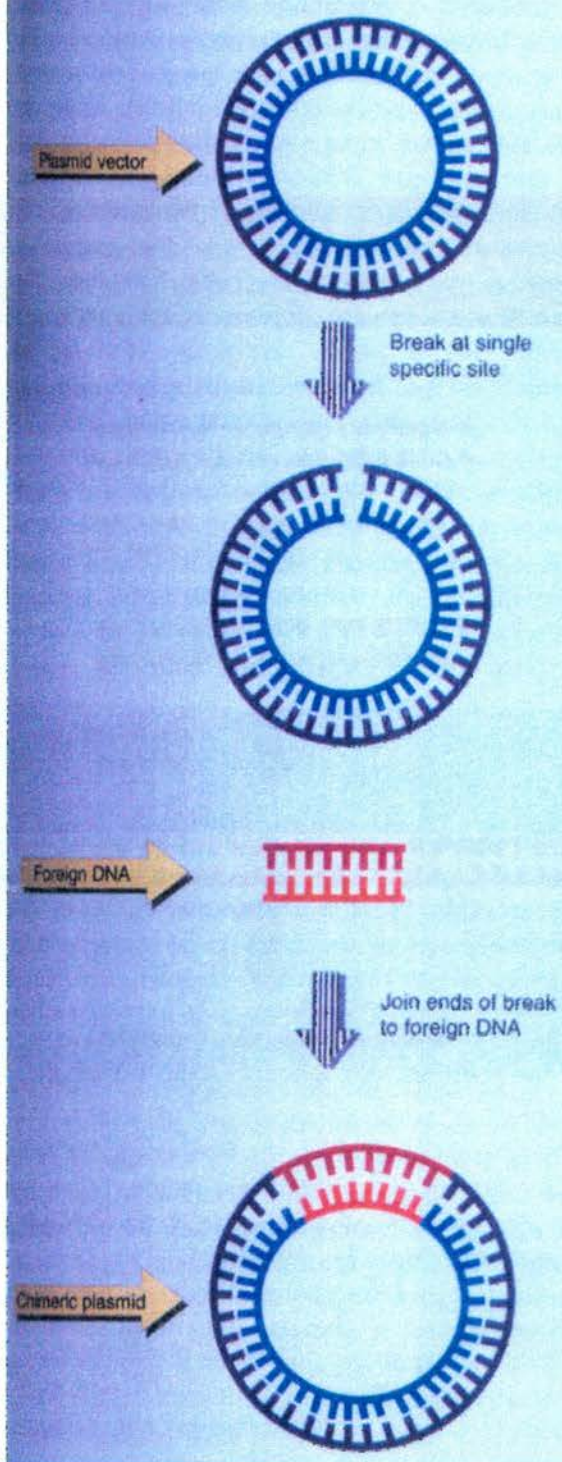


Figure 20.2 Phage vectors can be used to clone a foreign DNA that is inserted into a nonessential region of the genome.

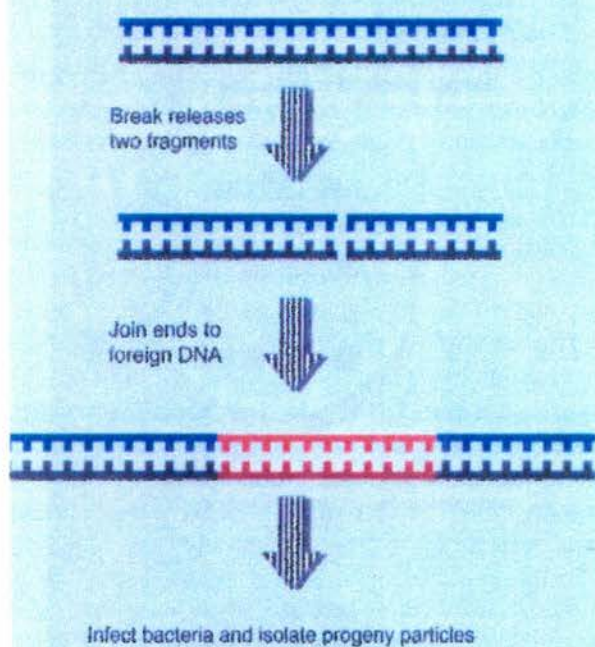


Figure 20.11 Colony hybridization allows a chimeric plasmid carrying a particular sequence to be selected by its complementarity with a radioactively labeled probe.



DOCUMENTACION ANEJA AL ACTA 98-LE-9.

1. Identificación de las muestras correspondientes al acta 98-LE-9 en base a los perfiles de los microsatelites VV S1, VV S2, VV S29, VV MD5 y VVMD7. Los valores recogidos en la tabla corresponden al numero de pares de bases de los fragmentos amplificados para cada microsatelite.

Variedad/Muestra	VV S1	VV S2	VV S29	VV MD5	VV MD7
Cabernet-Sauvignon	179	150 136	178 176	237 229	237
116	179	150 136	178 176	237 229	237
117	179	150 136	178 176	237 229	237
118	179	150 136	178 176	237 229	237
119	179	150 136	178 176	237 229	237
150	179	150 136	178 176	237 229	237
152	179	150 136	178 176	237 229	237
153	179	150 136	178 176	237 229	237
155	179	150 136	178 176	237 229	237
156	179	150 136	178 176	237 229	237
157	179	150 136	178 176	237 229	237
158	179	150 136	178 176	237 229	237
160	179	150 136	178 176	237 229	237
161	179	150 136	178 176	237 229	237
162	179	150 136	178 176	237 229	237
163	179	150 136	178 176	237 229	237
CHARDONNAY	187 181	140 134	176 168	235 231	241 237
121	187 181	140 134	176 168	235 231	241 237
138	187 181	140 134	176 168	235 231	241 237
145	187 181	140 134	176 168	235 231	241 237
151	187 181	140 134	176 168	235 231	241 237
GODELLO	179 159	156 150	168	235 223	241 237
141	179 159	156 150	168	235 223	241 237
RIESLING	187	150 140	176 168	231 223	255 247
149	187	150 140	176 168	231 223	255 247
159	187	150 140	176 168	231 223	255 247
164	187	150 140	176 168	231 223	255 247
165	187	150 140	176 168	231 223	255 247

Variedad/Muestra	VV S1	VV S2	VV S29	VV MD5	VV MD7
Gewürztraminer	187 159	150	168	235 229	255 241
120	187 159	150	168	235 229	255 241
122	187 159	150	168	235 229	255 241
123	187 159	150	168	235 229	255 241
124	187 159	150	168	235 229	255 241
125	187 159	150	168	235 229	255 241
126	187 159	150	168	235 229	255 241
127	187 159	150	168	235 229	255 241
128	187 159	150	168	235 229	255 241
129	187 159	150	168	235 229	255 241
130	187 159	150	168	235 229	255 241
139	187 159	150	168	235 229	255 241
140	187 159	150	168	235 229	255 241
142	187 159	150	168	235 229	255 241
143	187 159	150	168	235 229	255 241
144	187 159	150	168	235 229	255 241
146	187 159	150	168	235 229	255 241
147	187 159	150	168	235 229	255 241
148	187 159	150	168	235 229	255 241
166	187 159	150	168	235 229	255 241
167	187 159	150	168	235 229	255 241
168	187 159	150	168	235 229	255 241
169	187 159	150	168	235 229	255 241
170	187 159	150	168	235 229	255 241
171	187 159	150	168	235 229	255 241
172	187 159	150	168	235 229	255 241
173	187 159	150	168	235 229	255 241
174	187 159	150	168	235 229	255 241
175	187 159	150	168	235 229	255 241
176	187 159	150	168	235 229	255 241

Variedad/Muestra	VV S1	VV S2	VV S29	VV MD5	VV MD7
TEMPRANILLO	179	142 140	172 168	233	251 237
131	179	142 140	172 168	233	251 237
132	179	142 140	172 168	233	251 237
133	179	142 140	172 168	233	251 237
134	179	142 140	172 168	233	251 237
135	179	142 140	172 168	233	251 237
136	179	142 140	172 168	233	251 237
137	179	142 140	172 168	233	251 237
109	187 179	150 136	172 168	233 223	245 237
110	187 179	150 136	172 168	233 223	245 237
111	187 179	150 136	172 168	233 223	245 237
112	187 179	150 136	172 168	233 223	245 237
113	187 179	150 136	172 168	233 223	245 237
114	187 179	150 136	172 168	233 223	245 237
115	187 179	150 136	172 168	233 223	245 237

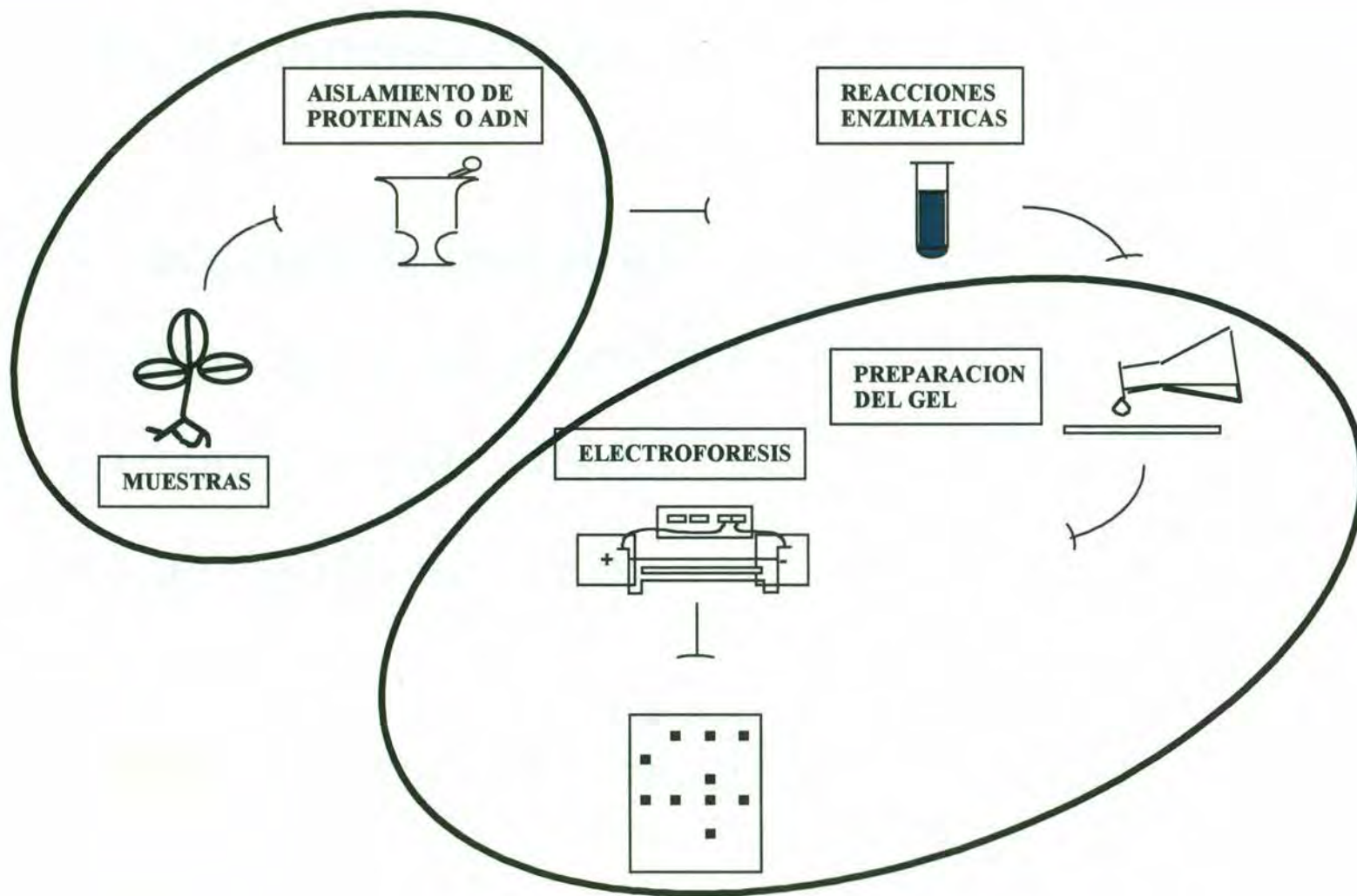
En base a la identidad de los perfiles de las muestras problemas con los de las variedades de referencia se puede concluir que las muestras numeros 116, 117, 118, 119, 150, 152, 153, 155, 156, 157, 158, 160, 161, 162 y 163 del acta 98-LE-9 corresponden a la variedad CABERNET-SAUVIGNON, las muestras numeros 121, 138, 145 y 151 del acta 98-LE-9 corresponden a la variedad CHARDONNAY, la muestra numero 141 del acta 98-LE-9 corresponde a la variedad GODELLO, las muestras numeros 149, 159, 164 y 165 del acta 98-LE-9 corresponden a la variedad RIESLING, las muestras numeros 120, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 147, 148, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 y 176 del acta 98-LE-9 corresponden a la variedad GEWÜRZTRAMINER y las muestras numeros 131, 132, 133, 134, 135, 136 y 137 del acta 98-LE-9 corresponden a la variedad TEMPRANILLO.

do.: Vicente Torres.
Dr. Ing. Agrónomo.

**TÉCNICAS GERAIS EM BIOLOGIA
MOLECULAR**



Técnicas generales en Biología Molecular



- Equipamiento básico.
- Recogida de muestras.
- Preparación de muestras.
- Aislamiento de DNA.
- Valoración de DNA.
- Electroforesis en Geles de Agarosa.

Equipamiento de laboratorio

Incubadores

- xxx Baño de agua
- xxx Termociclador
- xx Incubador para tubos de cultivo

Esterilización

- xxx Autoclave
- xx Horno

Purificación Agua

- xxx Destilador

Centrífugas

- xxx Microfuga

Refrigeradores

- xxx Refrigerador de 4°C
- xxx Congelador de -20°C
- xx Congelador de -80°C
- xx Contenedores para N₂ líquido
- x Máquina de hielo

Radiactividad

- xxx Cuarto de radiactividad

Cuantificación de DNA

- x Espectrofotómetro

Electroforesis

- xxx Fuente de voltaje medio
- xxx Cubetas de electroforesis
- xxx Bandejas y peines

Habitación oscura

- xxx Transiluminador de luz UV
- xxx Protectores de luz UV
- xxx Cámara Polaroid

Equipamiento General

- xx Horno Microondas
- xxx Medidor de pH
- xxx Agitador magnético
- xxx Balanza
- xxx PC+Software
- xxx Micropipetas
- xxx Vidrio, Plástico,...

- Recogida de muestras.
 - Elección del tejido. Tejidos jóvenes.
 - Nitrógeno líquido.
 - Hielo seco.
 - Silica gel.
 - Tampones (metanol, NaCl/CTAB...).
- Preparación de muestras.
 - Liofilización.
 - Congelación. Homogeneizado.

- Aislamiento de DNA.
 - Problemas para la purificación de DNA de plantas: nucleasas endógenas, polisacáridos, polifenoles.
 - Elección del protocolo según los problemas específicos.
 - Protocolos basados en CTAB. Doyle y Doyle, 1987
 - Protocolos basados en SDS/Acetato potásico. Dellaporta et al, 1983.
 - Aislamiento de núcleos.
 - Minipreparaciones.

Liberación de los componentes celulares

Tipo de tejido

- **fresco**
- **congelado**
- **seco**

Trituración

- **Nitrógeno líquido**
- **Bolas de vidrio, acero, tungsteno...**
- **Tierra**

- **Mortero**
- **Homogeneizador eléctrico**
- **Tubo eppendorf**
- **Bolsa de plástico**

Protocolo Básico

- **Homogeneización.**
 - **Liberación de los componentes celulares.**
- **Incubación a altas temperaturas.**
 - **Inactivación de enzimas celulares.**
 - **Precipitación de proteínas y polisacáridos.**
- **Centrifugación.**
- **Precipitación de ácidos nucleicos con alcohol/sales.**

Compuestos fenólicos

- **CTAB**
- **β Mercaptoetanol**
- **Ascorbato**
- **PVP y PVPP**

Polisacáridos

- **CTAB**
- **Isopropanol**
- **SDS + Acetato potásico**

Protección de las nucleasas endógenas

- **EDTA**
- **PEX**
- **Proteinasa K**

Eliminación de proteínas

- **Enzimas proteolíticas**
Proteinasa K
- **Disolventes orgánicos**
Fenol, cloroformo, diclorometano
- **SDS**
- **β Mercaptoetanol**

Métodos Rápidos

- **Procesamiento rápido de muestras**
- **Pequeña cantidad de material de partida PCR**
- **Sin centrifugación**
- **Un solo tubo**
- **Sin machacar**
- **Sin componentes orgánicos**

- Valoración y Cuantificación de DNA.
 - Espectrofotometría. Medida de ácidos nucleicos totales.

Absorción del DNA a 260nm.

$$A_{260}/A_{280} = 2-1,8$$

$$A_{260}/A_{280} < 1,8 \text{ Proteínas residuales}$$

$$A_{260}/A_{280} > 2 \text{ Fenol o cloroformo residuales}$$

$$DNA(\mu g/\mu l) = \frac{A_{260} \times FactorDilución \times 50}{1000}$$

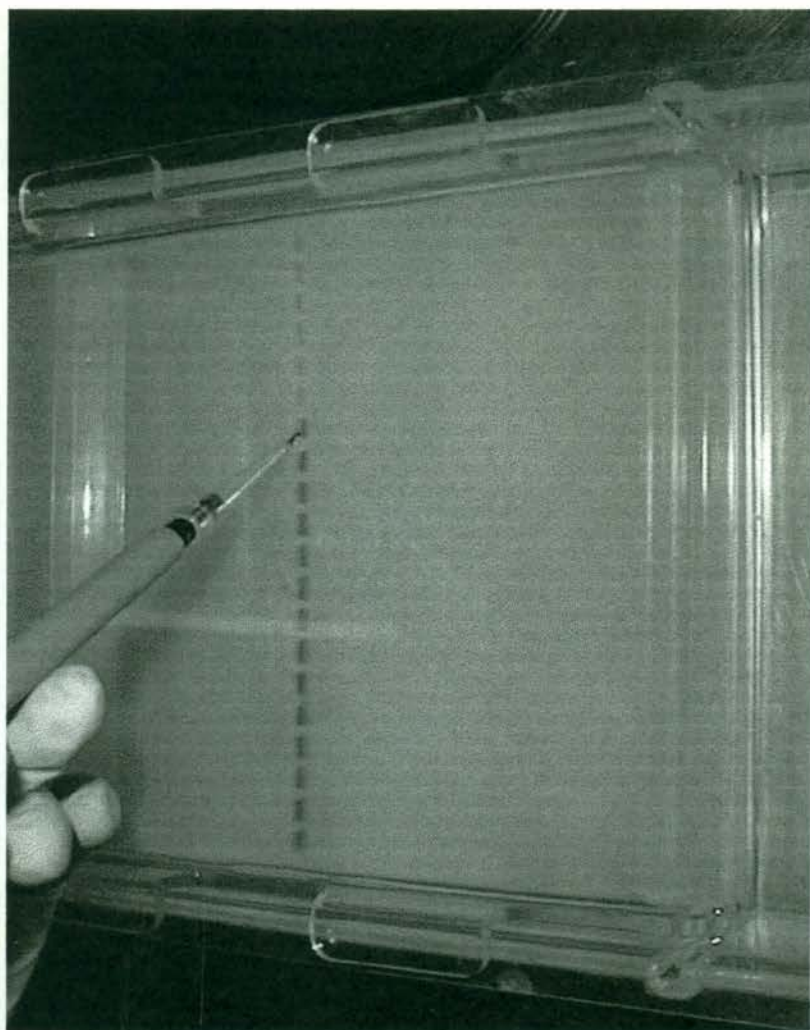
- Valoración y Cuantificación de DNA.
- Emisión inducida de luz ultravioleta con BrEt.
- Fluorescencia de gota.

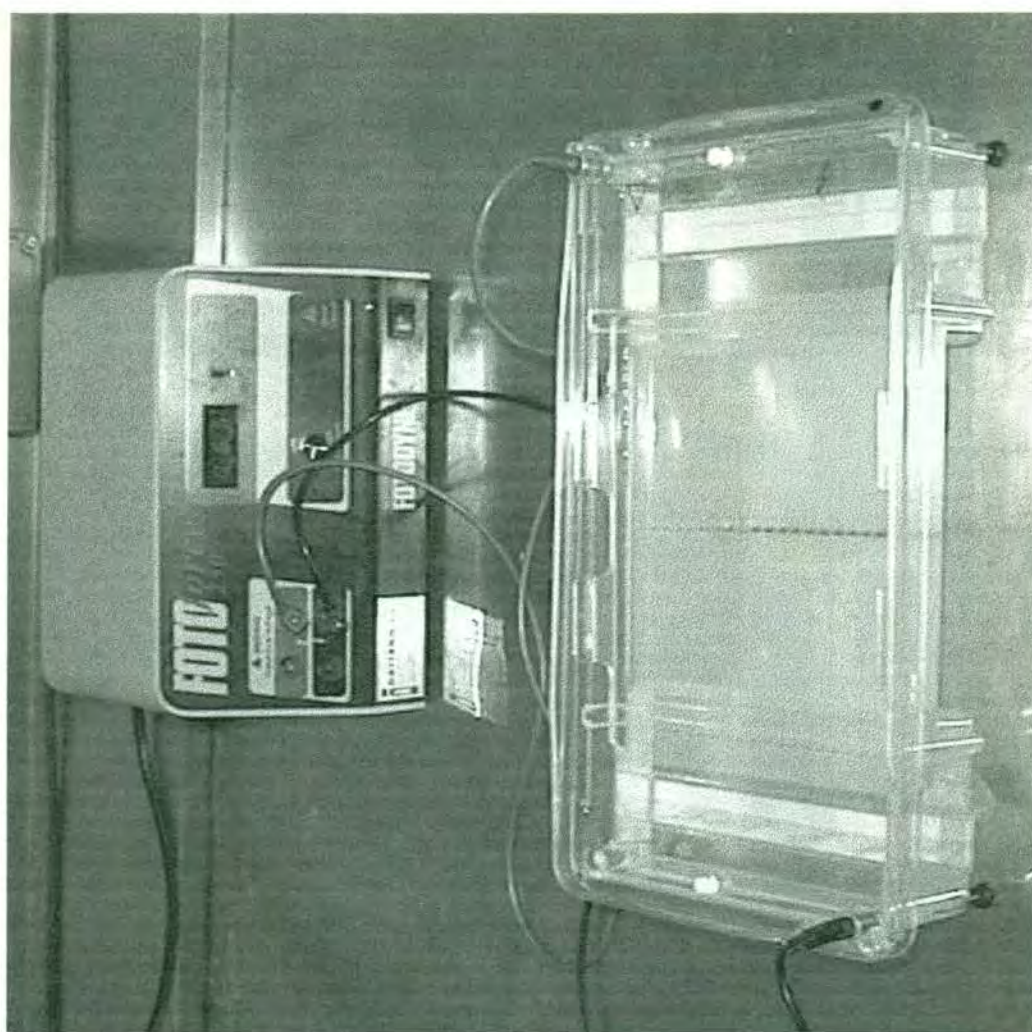


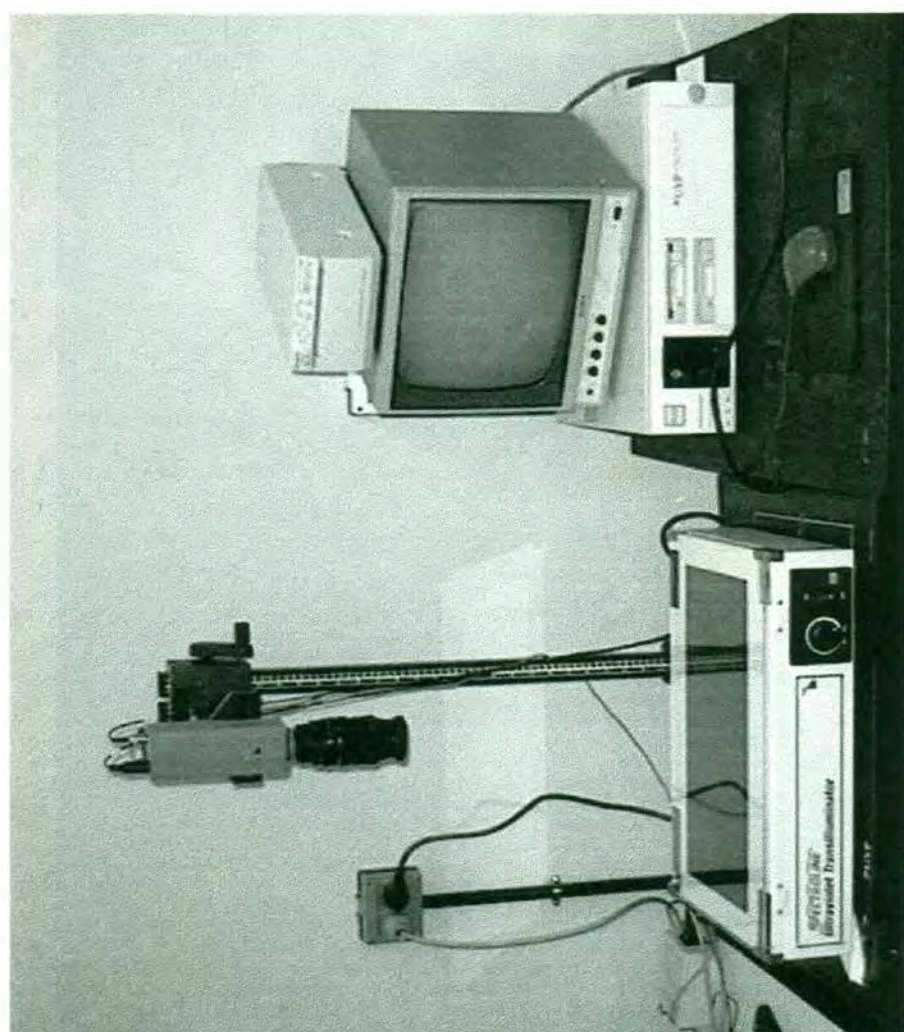
- En gel de Agarosa.

Electroforesis en geles de Agarosa.

- **El DNA esta cargado negativamente a pH neutro.**
- **Separación por Peso Molecular. % Agarosa.**
- **Tinción con Bromuro de Etidio.**



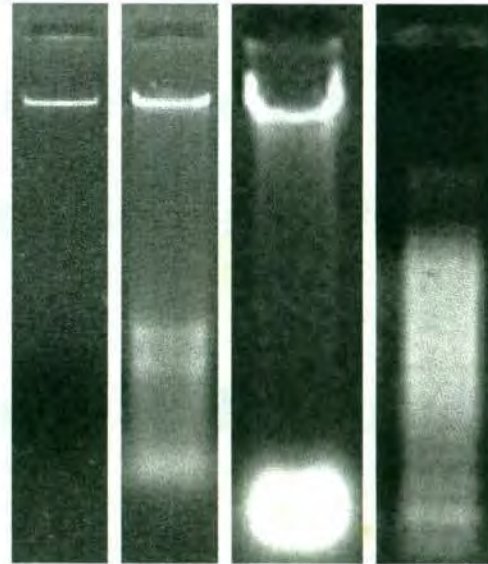
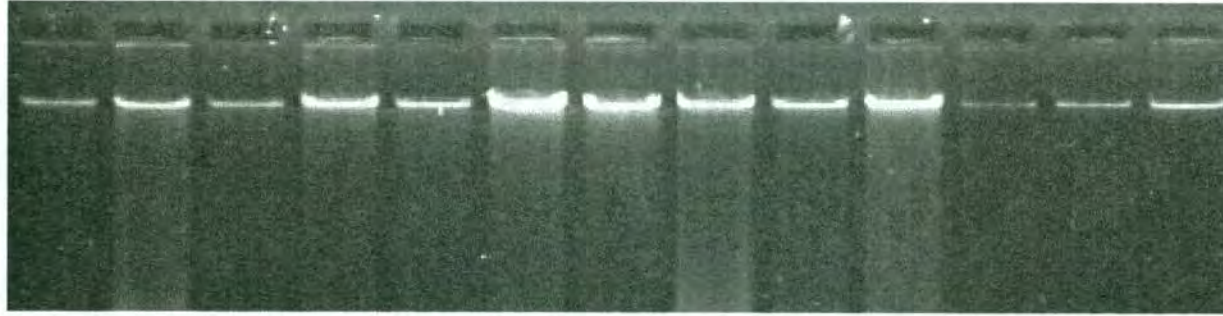






Valoración y Cuantificación de DNA.

•En gel de Agarosa.



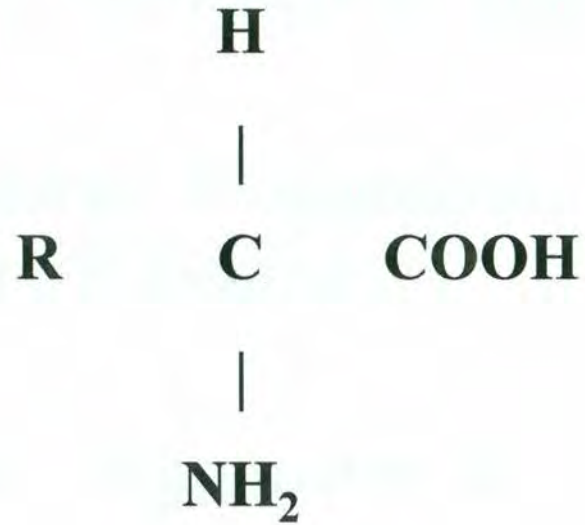
Solución de algunos problemas:

- **$A_{260}/A_{280} < 1,8$ Proteínas residuales → Extracción con fenol-cloroformo**
- **$A_{260}/A_{280} > 2$ Fenol o cloroformo residuales → Precipitación**
- **Sales residuales → Lavado con Etanol 70%**
- **Polisacáridos residuales → Lavado con Isopropanol, CTAB**
- **Polifenoles residuales → Lavado con Butanol**

Isoenzimas

Estructura Proteínas

- Los aminoácidos son las unidades que conforman las proteínas.



- Hay 20 aminoácidos esenciales.

Estructura de las Proteínas

- Estructura primaria: secuencia de aminoácidos.
- Estructura secundaria: Plegamiento característico de las cadenas. α -hélice/ β -lámina.
- Estructura terciaria: Plegamiento de las cadenas.
- Estructura cuaternaria: Unión de dos o más cadenas.

Isoenzimas

Diferentes formas moleculares de una misma enzima con idéntica o similar especificidad de sustrato.

Market y Möller (1959)

Traducción Transcripción Ambiente

DNA → RNA → Proteína → Carácter

Isoenzimas

Extracción



Electroforesis



Tinción



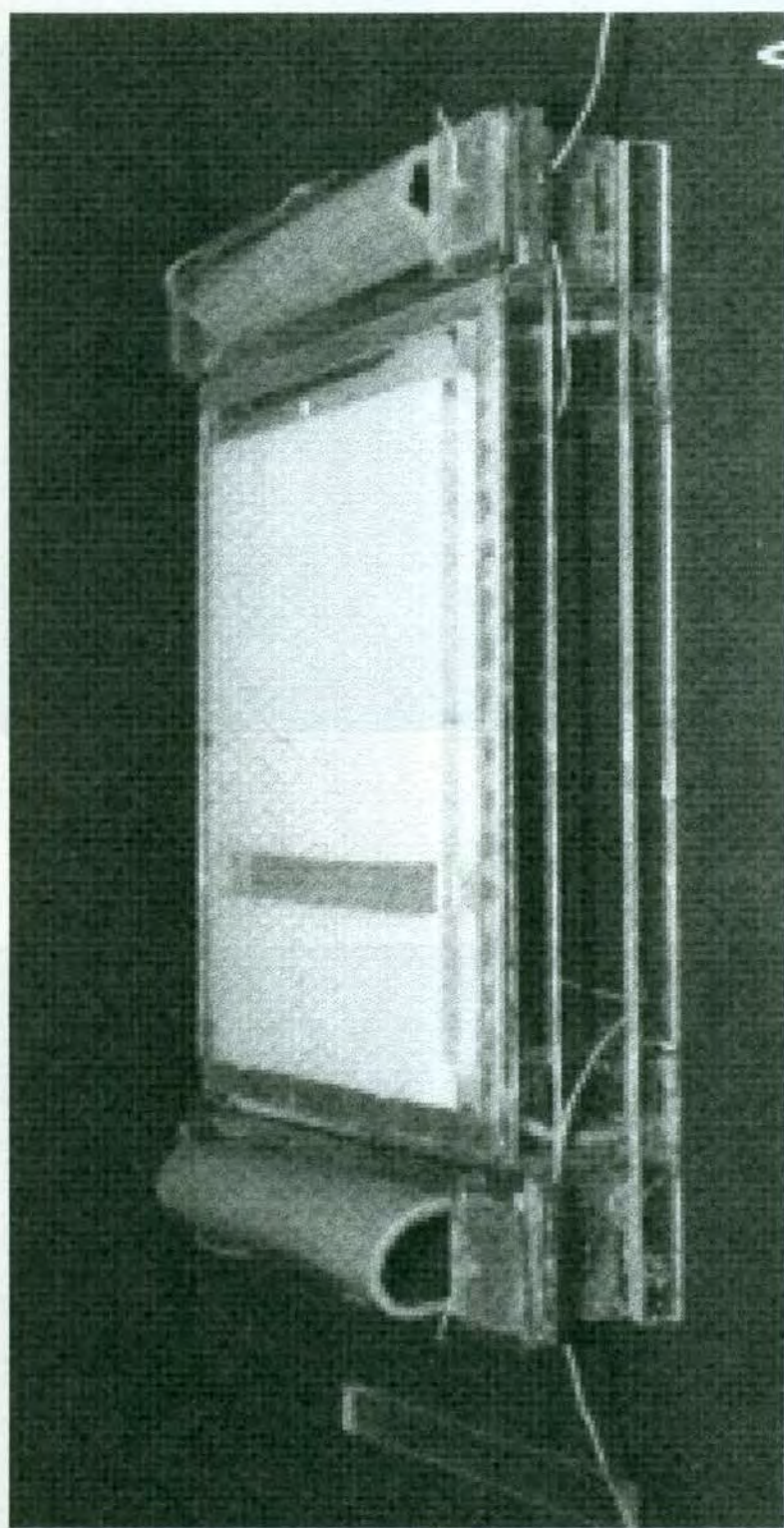
Interpretación

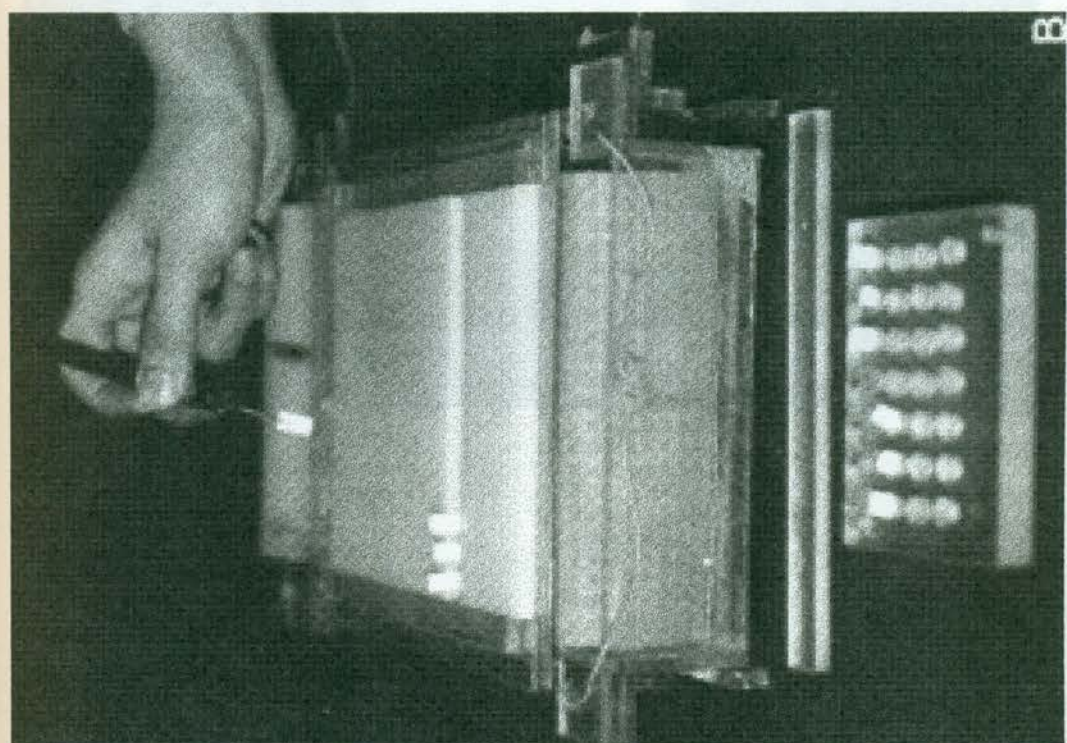
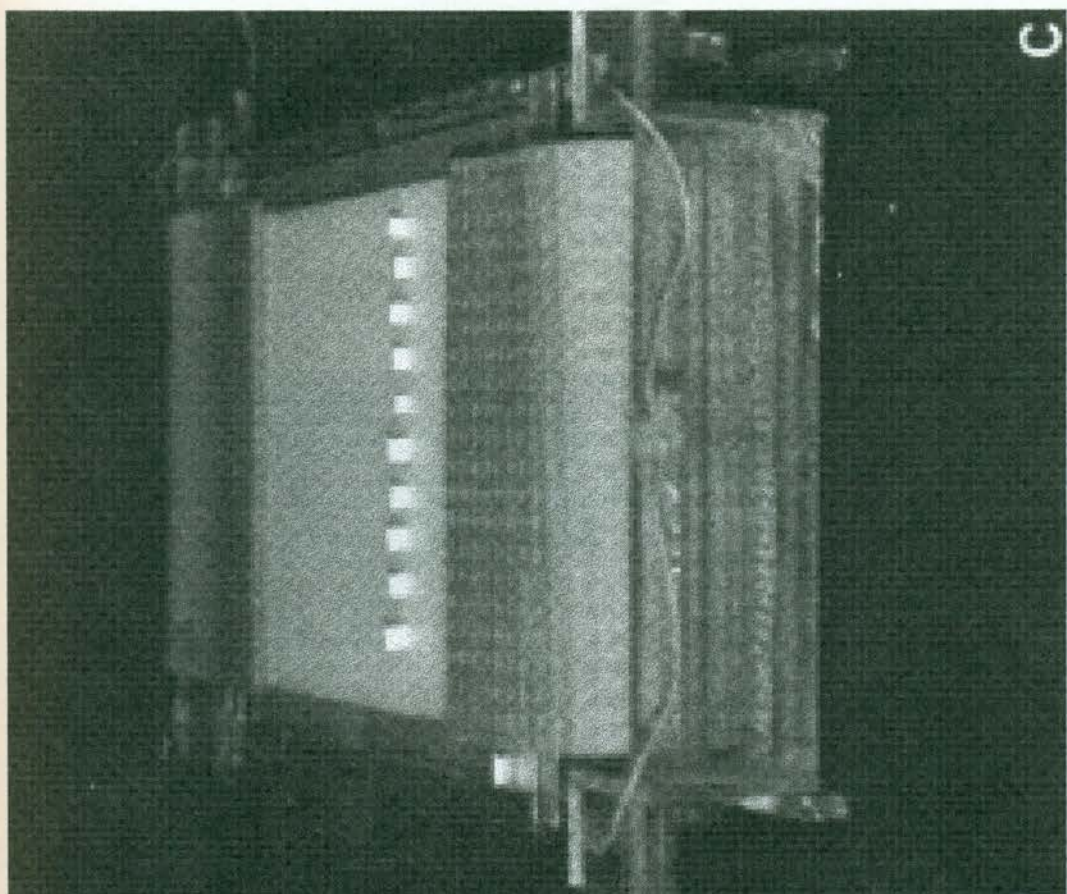
Extracción

- **Métodos NO agresivos. Sin Desnaturalización.**
- **Procesos sencillos, rápidos y poco “limpios”.**

Electroforesis

- **Se detectan diferencias en la carga neta de las isoenzimas**
- **Geles de almidón o acrilamida.**
- **Duración de 4 a 8 horas.**





Tinción

Substrato

↓ ← **Enzima**

Producto

↓ ← **Cromógeno**

Color

Interpretación

Variabilidad isoenzimática

Isoenzimas alélicas y no alélicas

Estructura cuaternaria

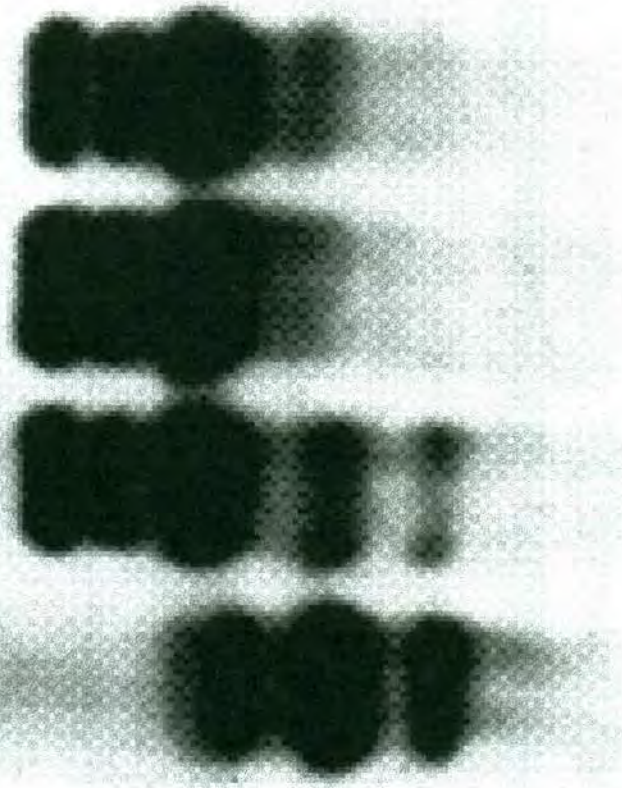
Interpretación

Variabilidad isoenzimática:

- **Tisular:** Diferentes tejidos de un individuo presentan diferentes isoenzimas.
- **Ontogénica:** Un mismo tejido, a lo largo del desarrollo, muestra distintas isoenzimas.
- ⇒ **Poblacional:** Diferentes individuos muestran, en un mismo tejido, diferentes isoenzimas.

VARIABILIDAD TISULAR

E+S SC Ed C



1 2 3 4

TRIGO
HEXAPLOIDE

ESTRUCTURA CUATERNARIA ACTIVA DE LAS ISOENZIMAS

MONOMÉRICA: UNA CADENA POLIPEPTÍDICA



DIMÉRICA: DOS CADENAS POLIPEPTÍDICAS



TETRAMÉRICA: CUATRO CADENAS POLIPEPTÍDICAS



CONTROL GENÉTICO DE ISOENZIMAS EN CENTENO

1 

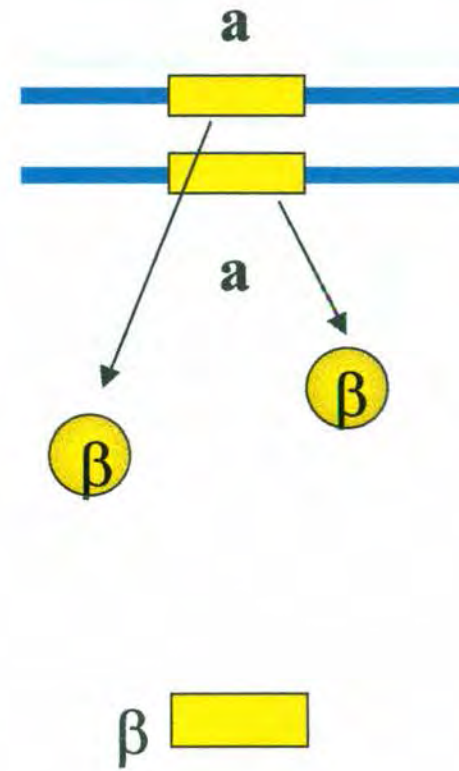
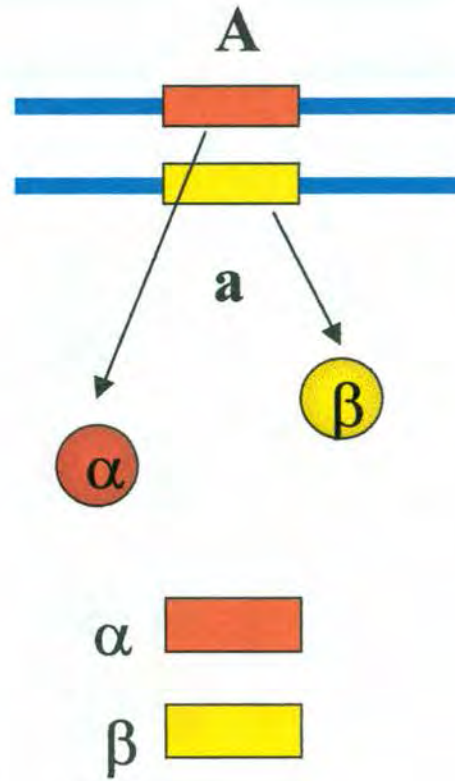
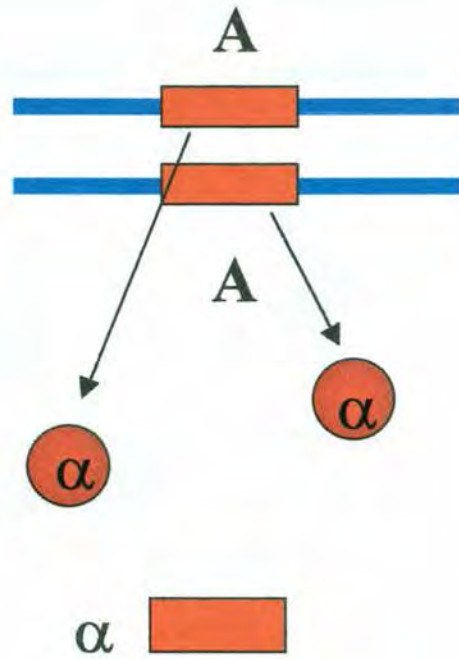
2 

ACONITASA: DOS LOCI, CADA UNO CON DOS ALELOS ACTIVOS

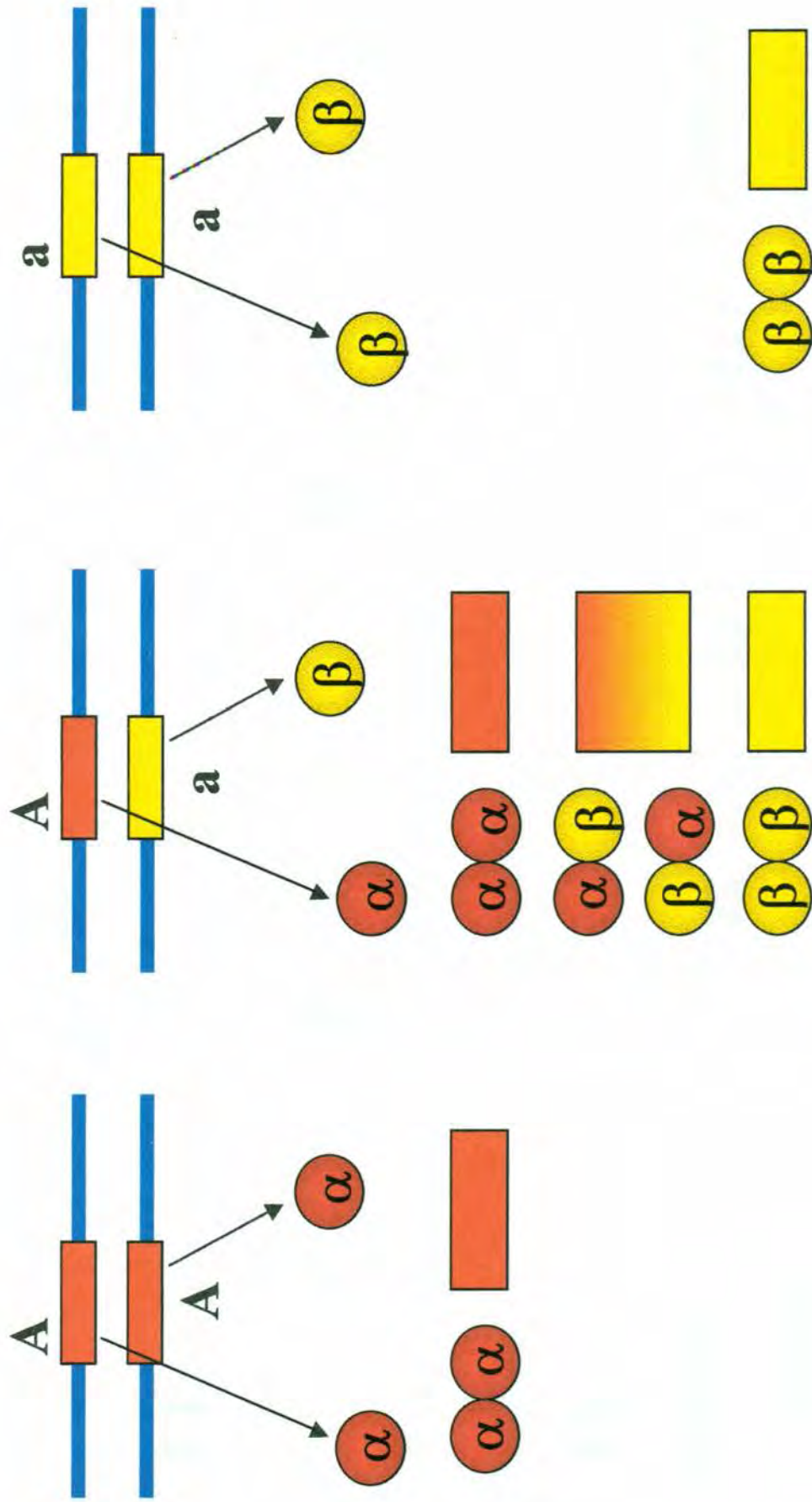
CONTROL GENÉTICO DE ISOENZIMAS

- DEDUCIR EL NÚMERO DE LOCI QUE CONTROLAN UN SISTEMA ENZIMÁTICO
- RELACIONES DE DOMINANCIA O CODOMINANCIA
- DEDUCIR ESTRUCTURA CUATERNARIA
- EMPLEANDO LA MISMA METODOLOGÍA DE MENDEL
- CRUZAMIENTO DE INDIVIDUOS HOMOCIGÓTICOS, OBTENCIÓN DE F1 Y DE F2

MONÓMERO: UN LOCUS CON DOS ALELOS ACTIVOS



DÍMERO: UN LOCUS CON DOS ALELOS ACTIVOS





Aplicaciones de las Isoenzimas

- ◆ Estudios de control genético de isoenzimas
- ◆ Identificación de individuos/cultivares
- ◆ Estudios de genética de poblaciones
- ◆ Construcción de mapas genéticos
- ◆ Programas de mejora

DIFERENTES APLICACIONES DE LAS ISOENZIMAS

IDENTIFICACIÓN DE LÍNEAS Y/O CULTIVARES

DETECCIÓN DE IMPUREZAS O MEZCLAS EN VARIEDADES

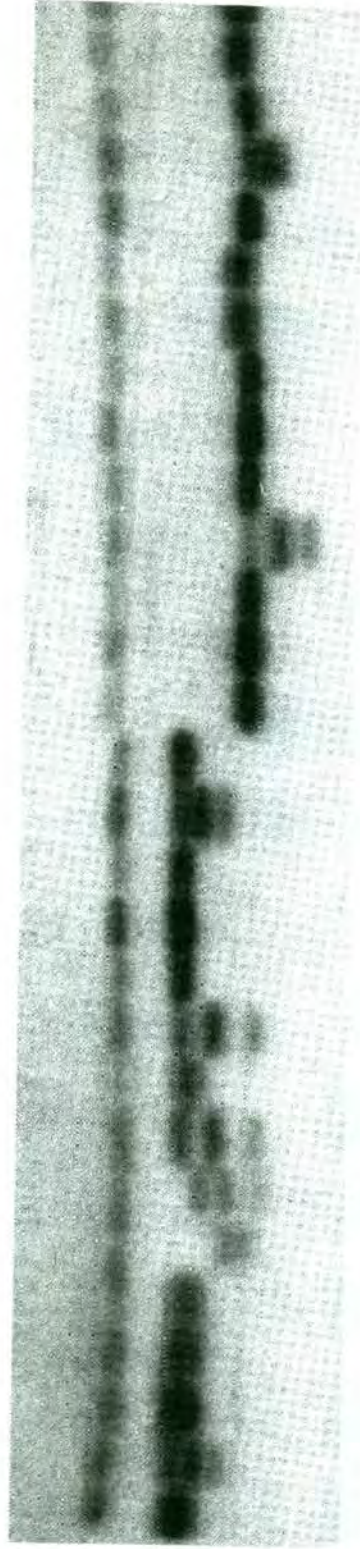
PUREZA DE HÍBRIDOS

MARCADORES GENÉTICOS EN PROGRAMAS DE SELECCIÓN

Brassica oleracea

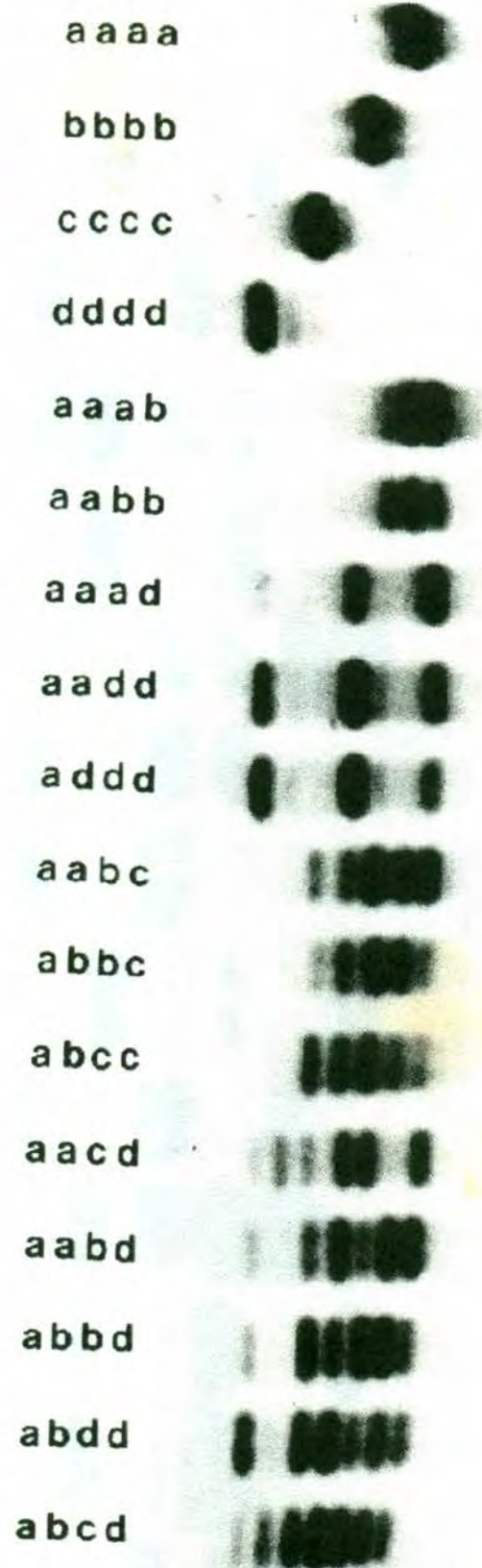


PGM: serie alélica

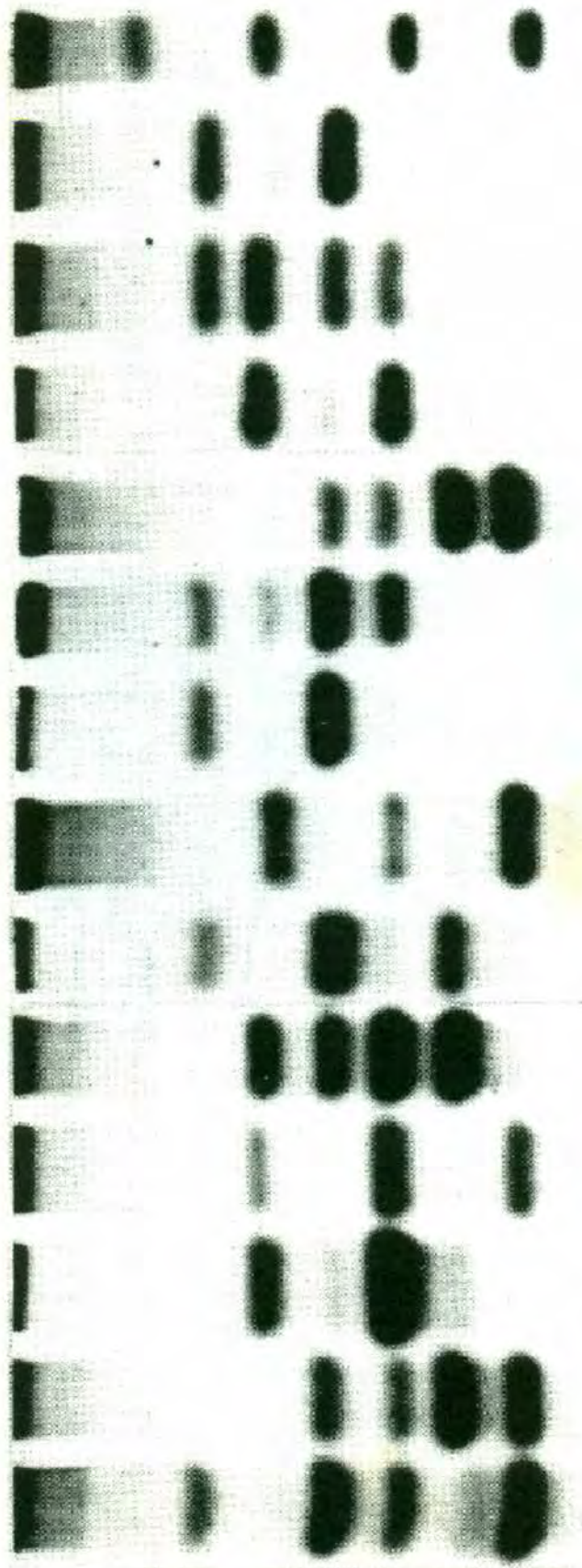


PGI: serie alélica

0 1 2 3 4 5 +



CENTENO



ACPH

Equipamiento:

- Refrigeradores
 - Fuentes de electroforesis
 - Cubetas de electroforesis
 - Medidor de pH
 - Agitador
 - Bomba de vacio
 - Camara fotográfica
- \$ 25.000**

Ventajas de las isoenzimas

- ✧ Método robusto y reproducible
- ✧ Herencia mendeliana codominante
- ✧ Están poco o nada influenciadas por el ambiente
- ✧ Rápido y simple
- ✧ Bajo coste

Desventajas de las isoenzimas

- ✧ Número limitado (<30)
- ✧ No analiza directamente el material hereditario
- ✧ Se analizan únicamente genes estructurales con información para proteínas solubles (no es una muestra al azar del genoma)

RFLPs

RFLPs

Restriction Fragment Length

Polymorphisms

REFLPS

Restriction Fragment Length
Polymorphisms

RFLPs

- Los RFLPs examinan diferencias en el tamaño de fragmentos de DNA específicos.
- Generalmente se realizan en DNA total.
- Requieren DNA de alto peso molecular de gran pureza.

Aislamiento de DNA



Corte con enzimas de restricción



Separación por electroforesis



Transferencia a un filtro



**Visualización de fragmentos específicos de DNA con sondas
radiactivas**



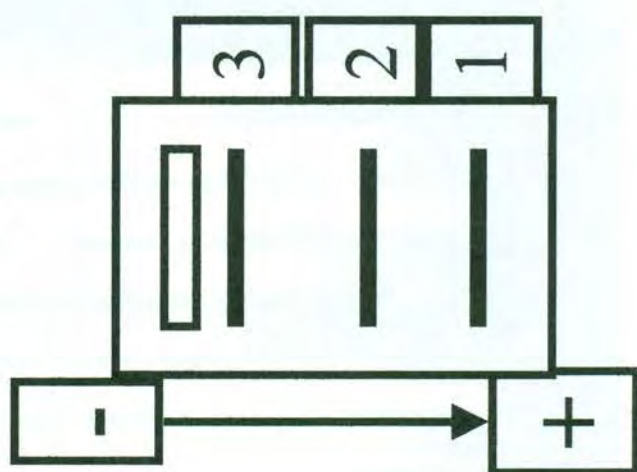
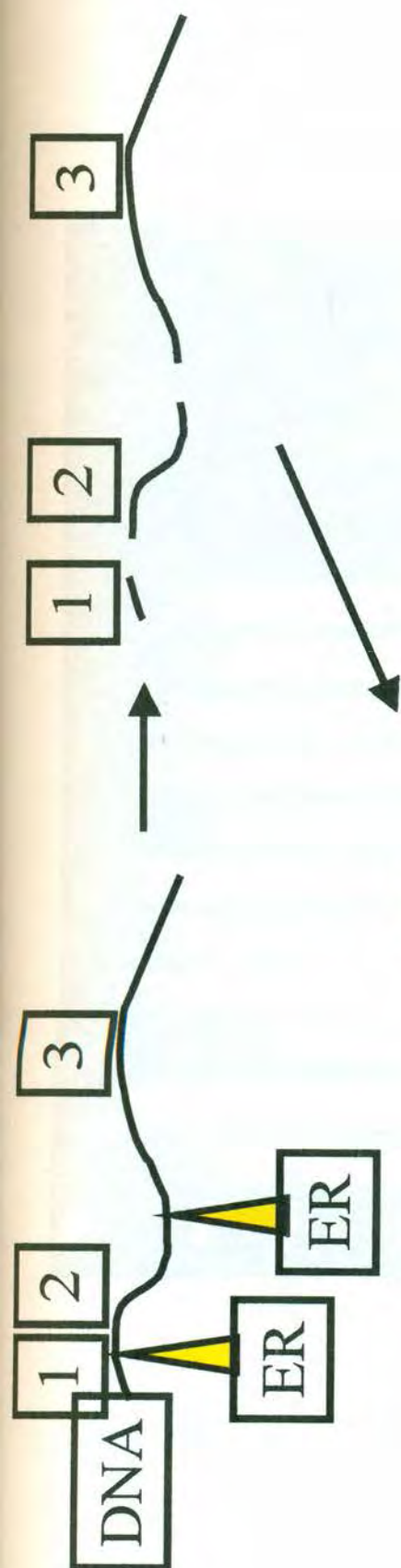
Análisis de resultados

Enzimas de restricción

- **Son endonucleasas que reconocen una secuencia específica de DNA.**
- **Cuando detectan esa secuencia cortan el DNA produciendo fragmentos pequeños.**

Electroforesis en geles de agarosa

- **Separación de todos los fragmentos digeridos por peso molecular.**



3

5

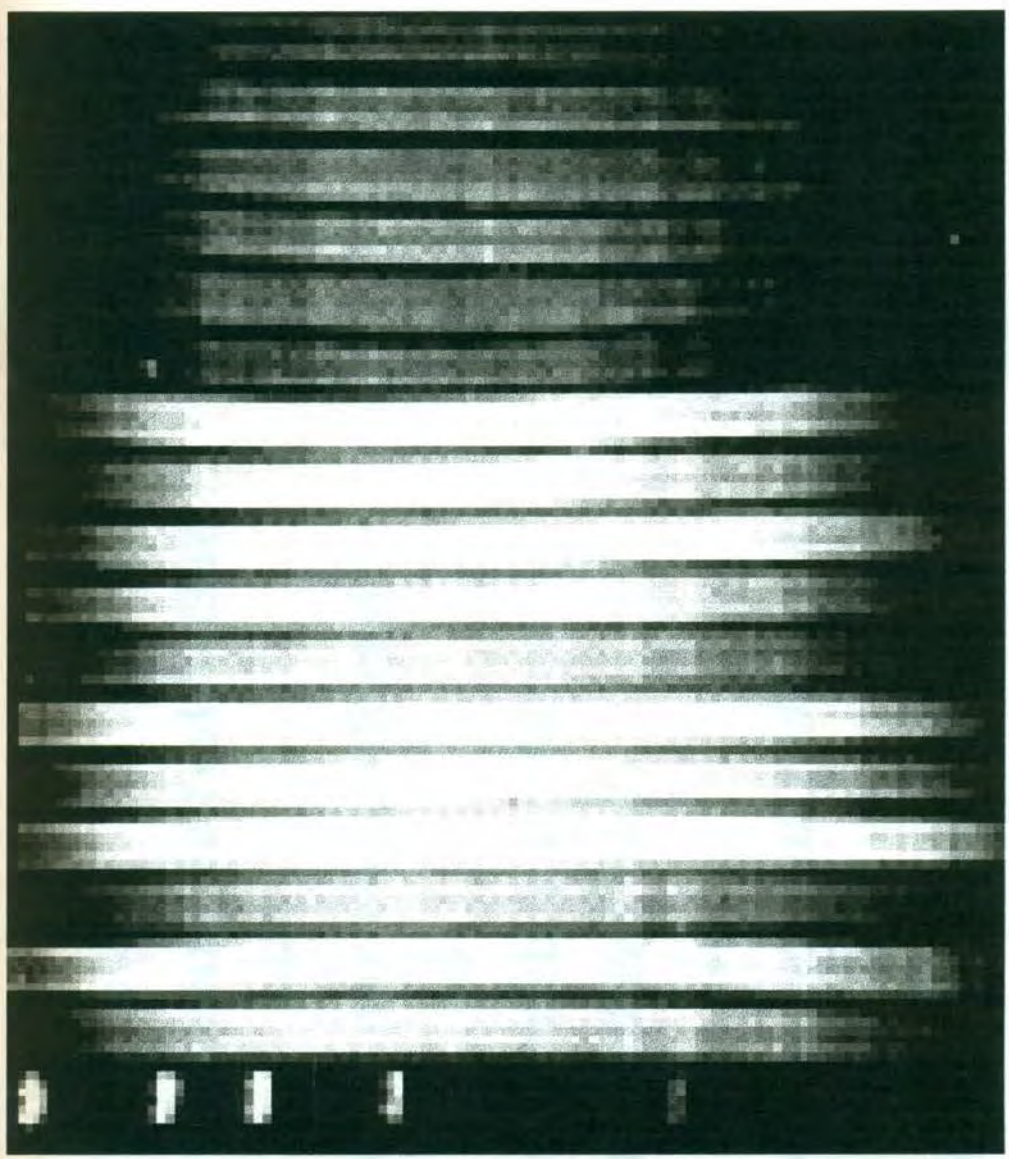
1

3

5

1

ANG



Aislamiento de DNA



Corte con enzimas de restricción



Separación por electroforesis



Transferencia a un filtro

(*Southern blot*)



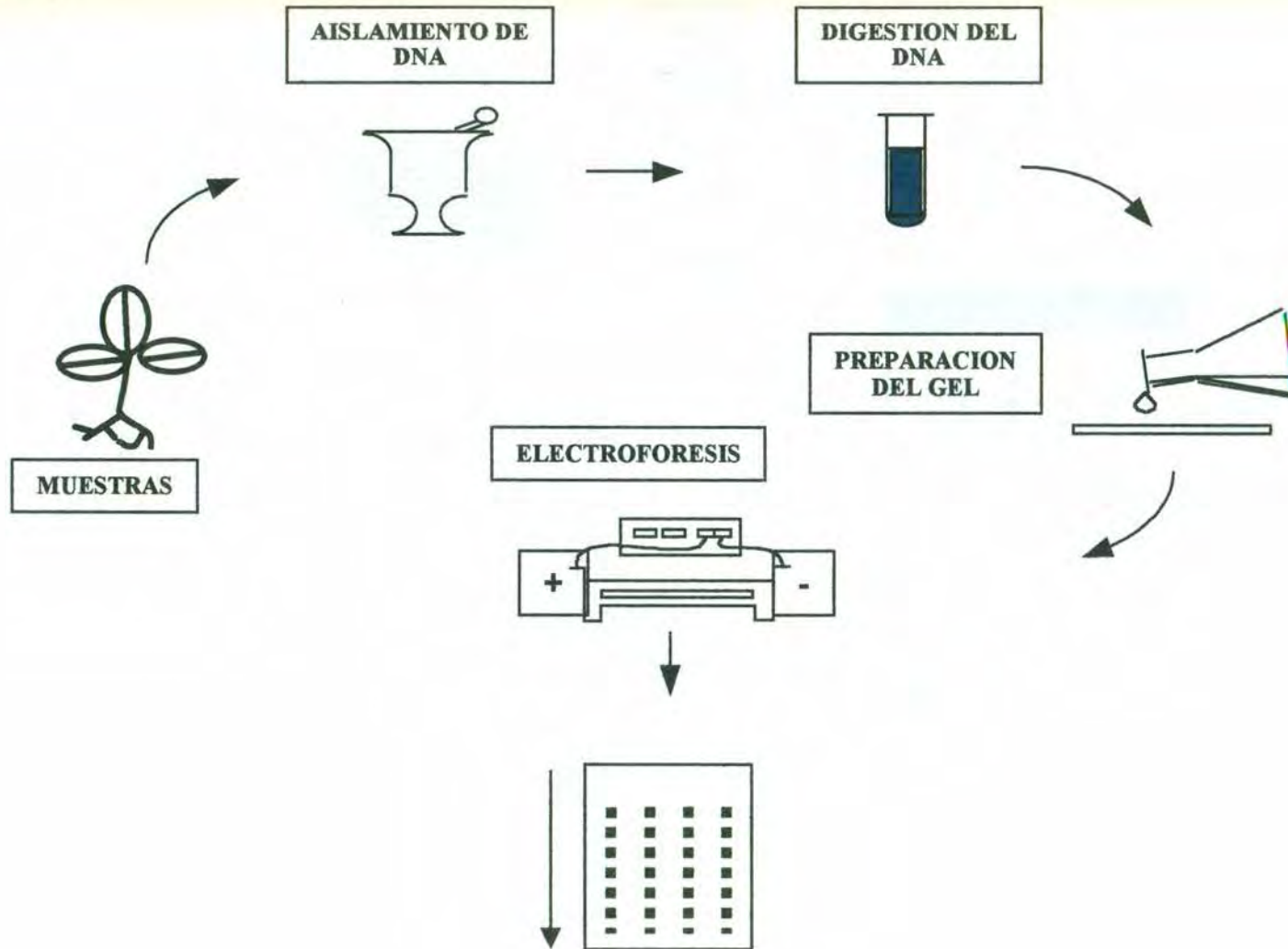
Hibridación con sondas radiactivas*

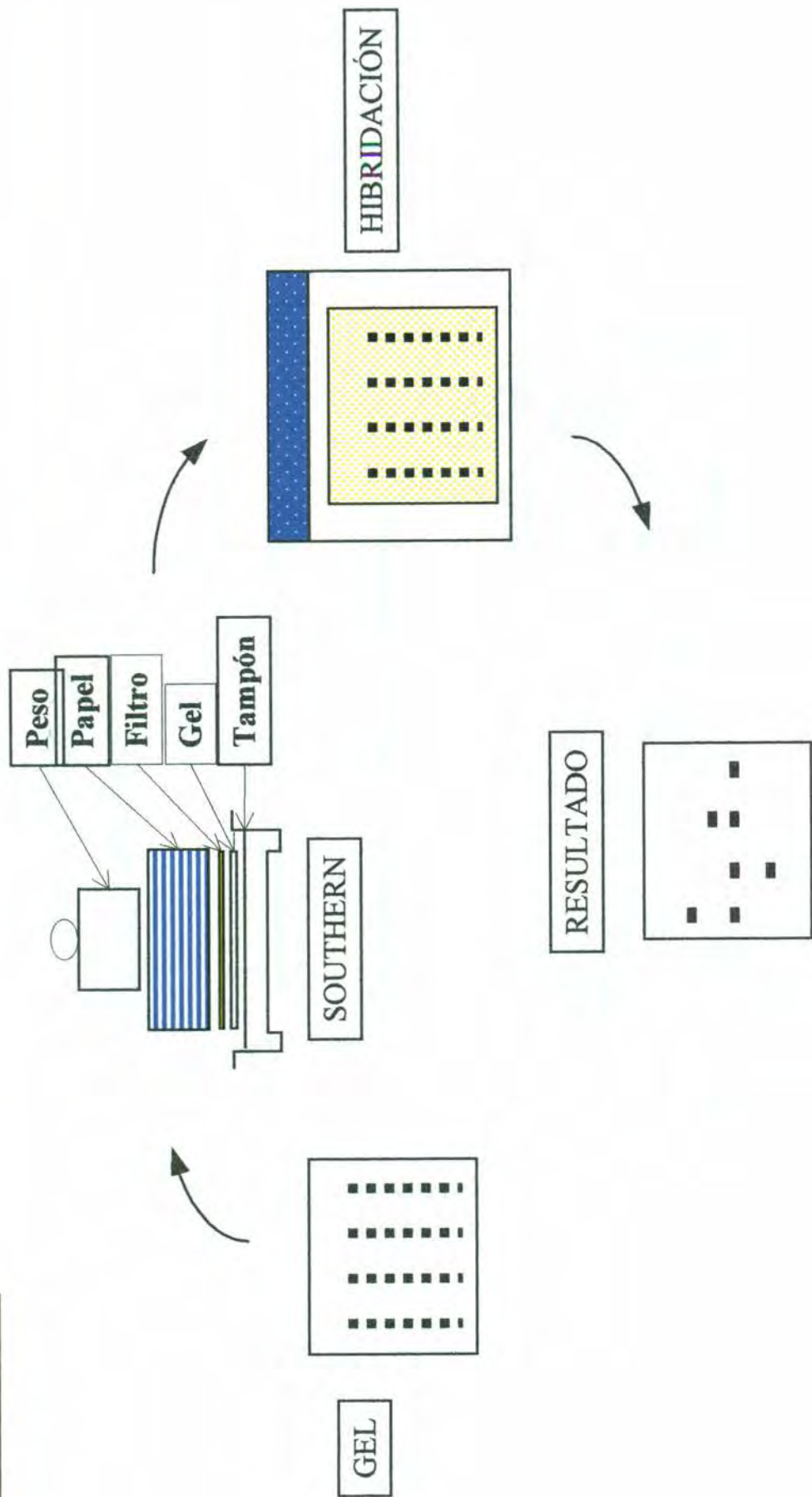


Análisis de resultados

- **Construcción de librerías.**
- **Selección de sondas.**
- **Marcaje.**

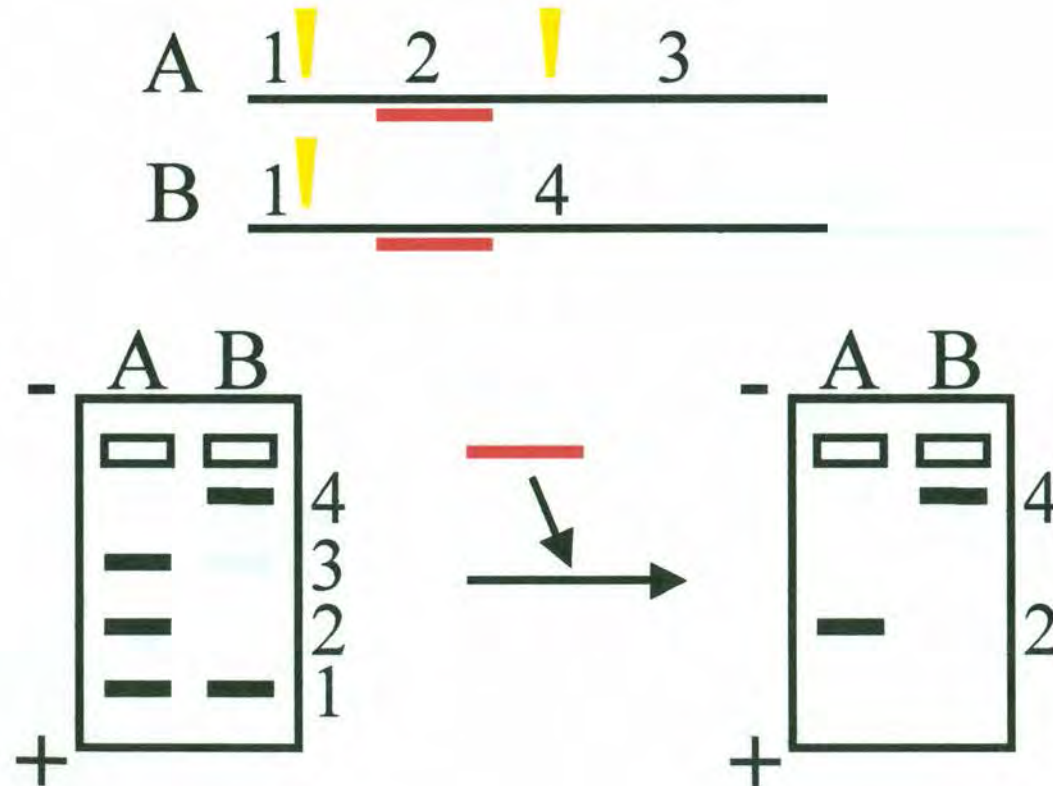
RFLPs





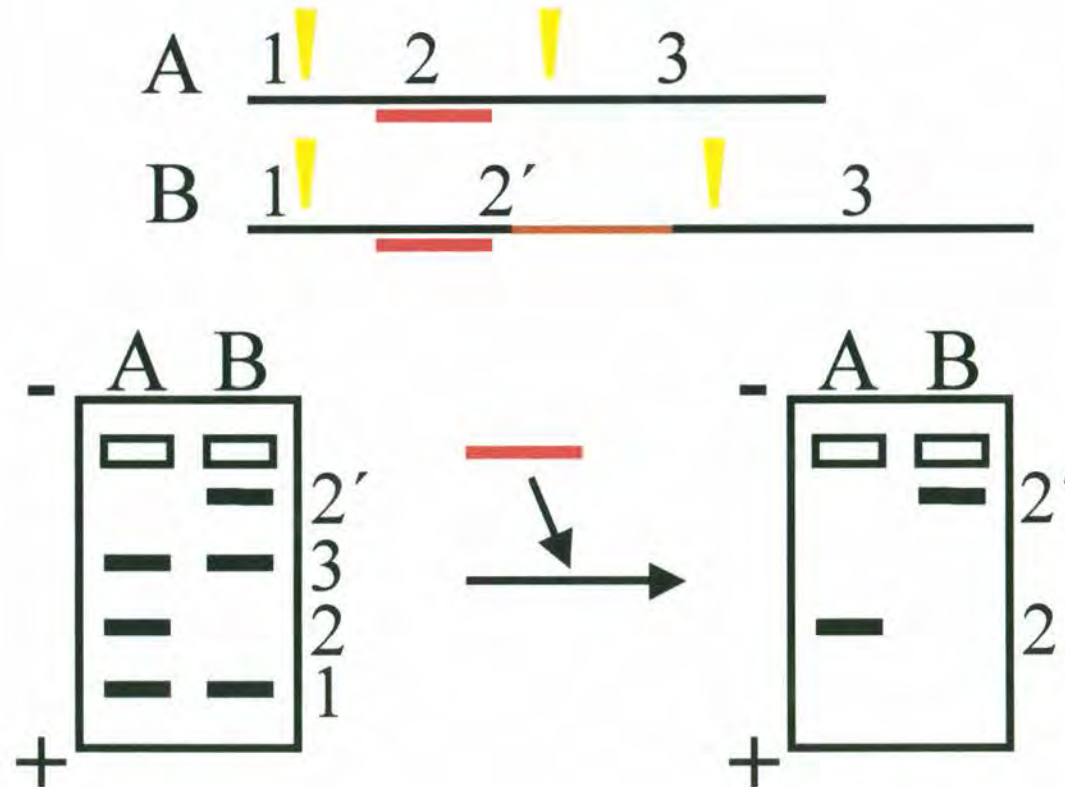
Origen de los RFLPs

- Sustituciones de bases. Mutaciones puntuales en la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción

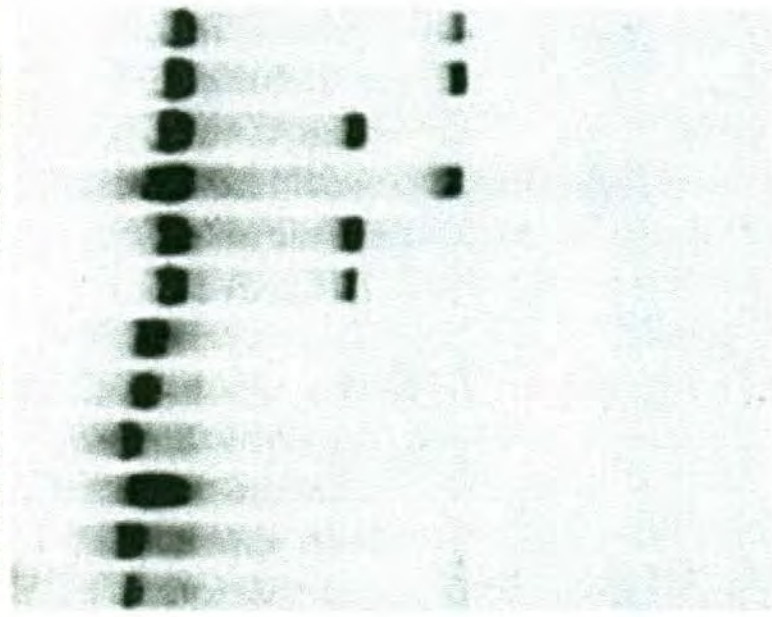


Origen de los RFLPs

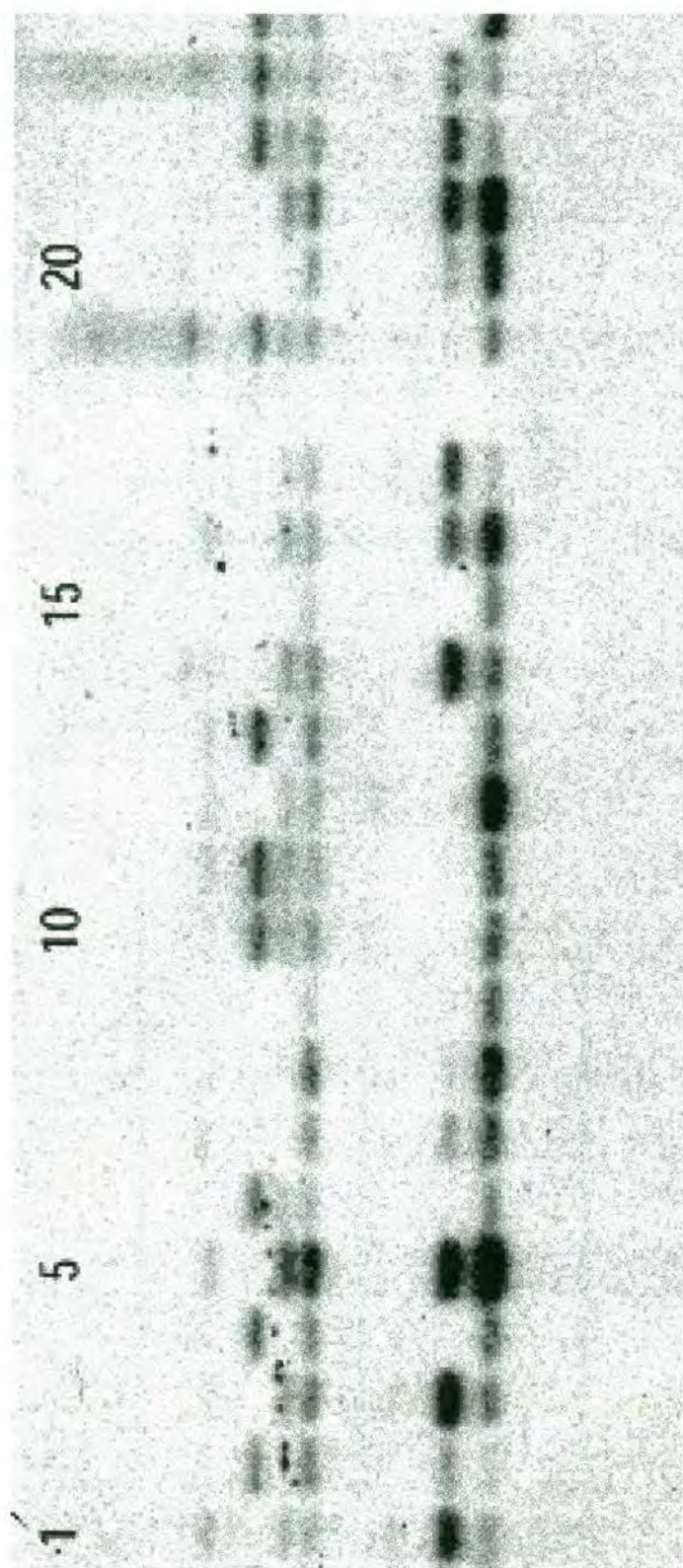
- Inserciones/deleciones de segmentos de DNA.



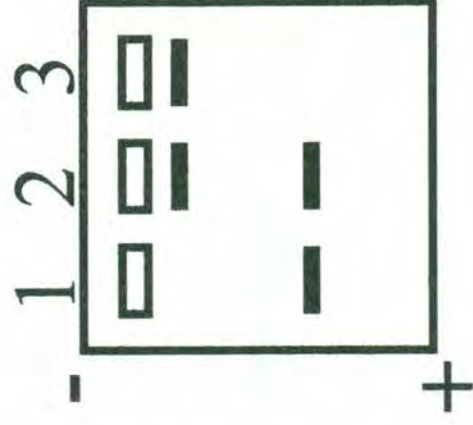
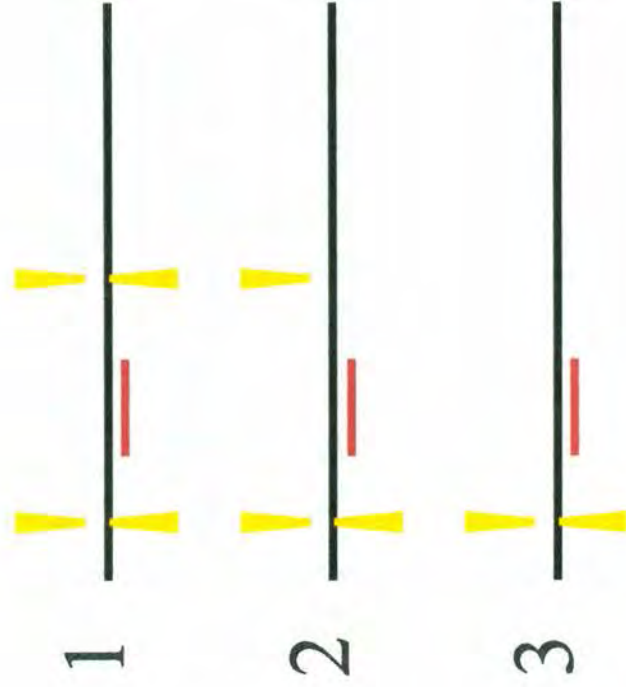
*Bam*HI *Eco*RI



*La clave es la elección de la enzima de restricción y
de la sonda.*



Los RFLPs son marcadores codominantes



Procedencia de las sondas

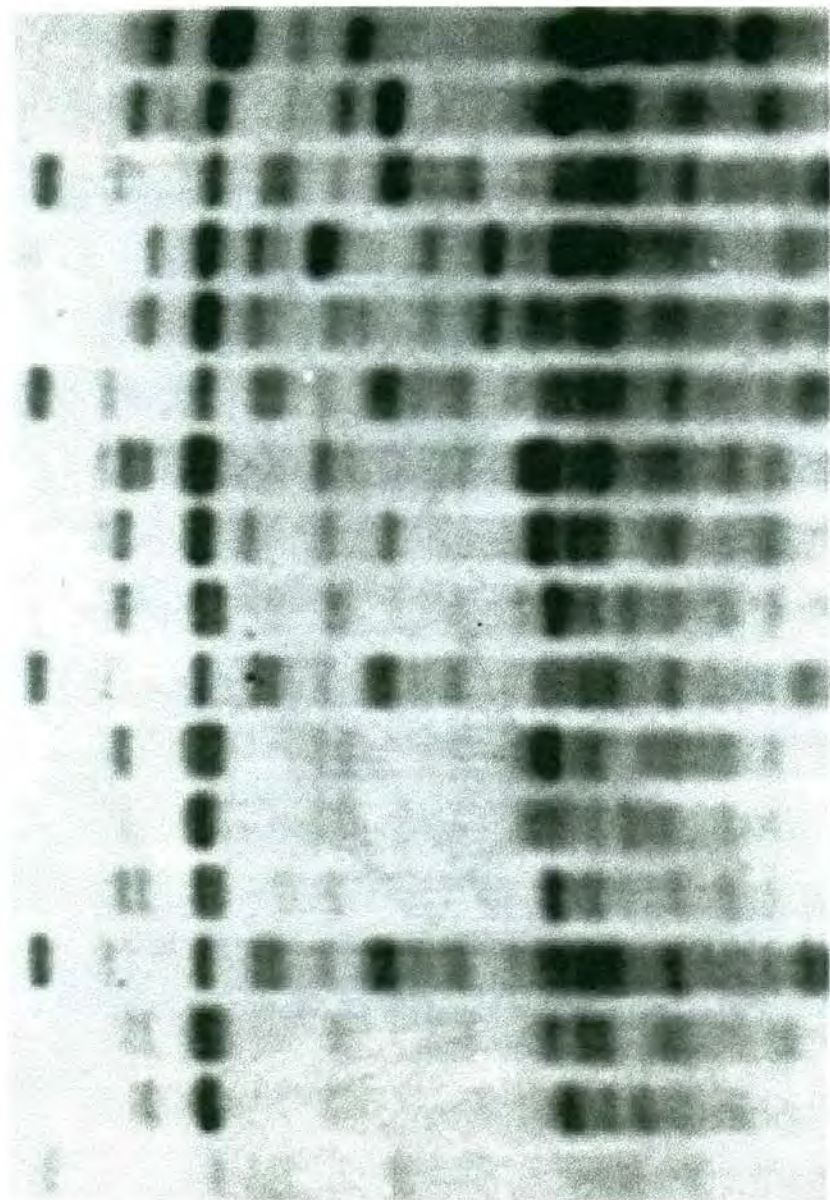
- DNA nuclear.
 - Librerías genómicas
 - librerías de cDNAs
- DNA de cloroplastos y mitocondrias

Son bastante específicas de especie

Sondas de múltiples loci

- Repeticiones en tandem
 - Minisatélites
 - Microsatélites
- Análisis de muchos loci simultáneamente
- Elevado polimorfismo.

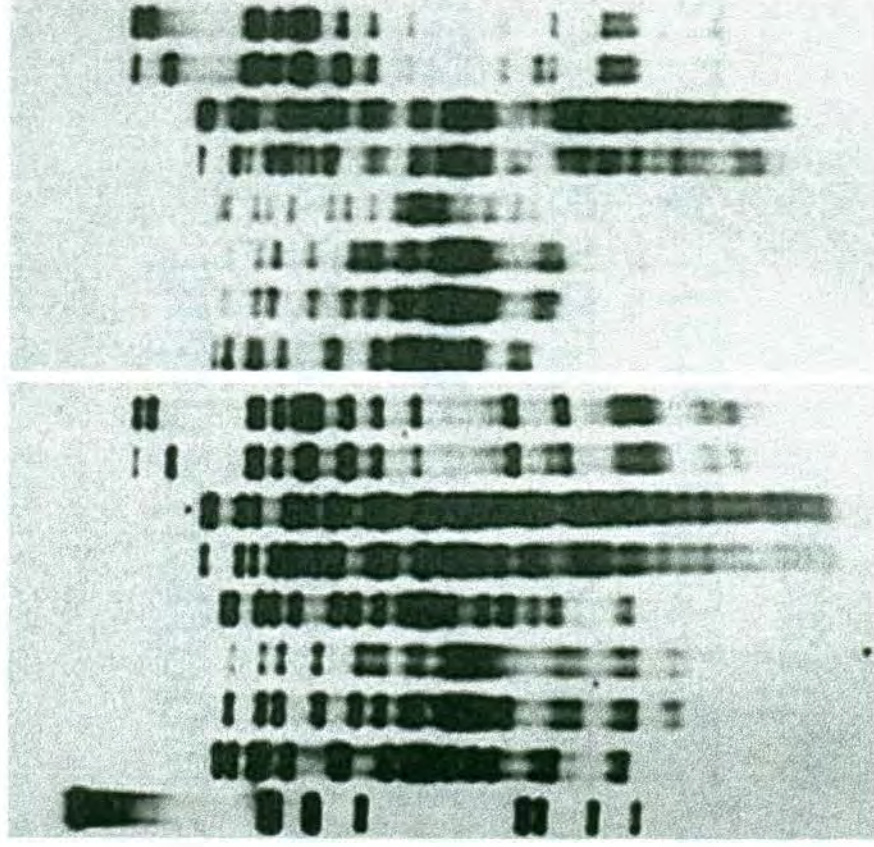
Son muy poco específicas de especie



Minisatélite (M13)

Dig

^{32}P



Microsatélite

Ventajas de los RFLPs

- ↗ Elevada reproducibilidad
- ↗ Herencia mendeliana codominante
- ↗ Interpretación sencilla de los resultados
- ↗ Ilimitado número de marcadores
- ↗ Sin influencia ambiental. Análisis directo del material hereditario.
- ↗ Análisis en fases tempranas.

Desventajas de los RFLPs

- ✧ Requieren conocimiento previo del genoma.
- ✧ Laboriosos.
- ✧ Metodología lenta.
- ✧ Relativamente caros.
- ✧ Uso de radiactividad.

Aplicaciones de los RFLPs

- ◆ Identificación de individuos/cultivares
- ◆ Estudios de variabilidad.
- ◆ Construcción de mapas genéticos
- ◆ Localización de genes cualitativos y cuantitativos.
- ◆ Estudios de genética de poblaciones

Consumibles:

• Extracción de DNA	\$ 1
• Digestión	\$ 0,4
• Blot	\$ 0,3
• Hibridación	\$ 0,3
• Detección	\$ 0,1

\$ 2.1 por muestra

RFLPs

- Los RFLPs son variaciones en los patrones de restricción del ADN, revelados por hibridación con sondas.
- Estas diferencias se producen por mutaciones puntuales o por reorganizaciones (inserciones/deleciones) del DNA.
- Las sondas deben ser desarrolladas.
- Es una tecnología robusta y con capacidad para generar un elevado número de marcadores.
- Los mayores problemas están relacionados con la laboriosidad y el uso de radiactividad.

RAPDs

RAPDs

Random Amplified

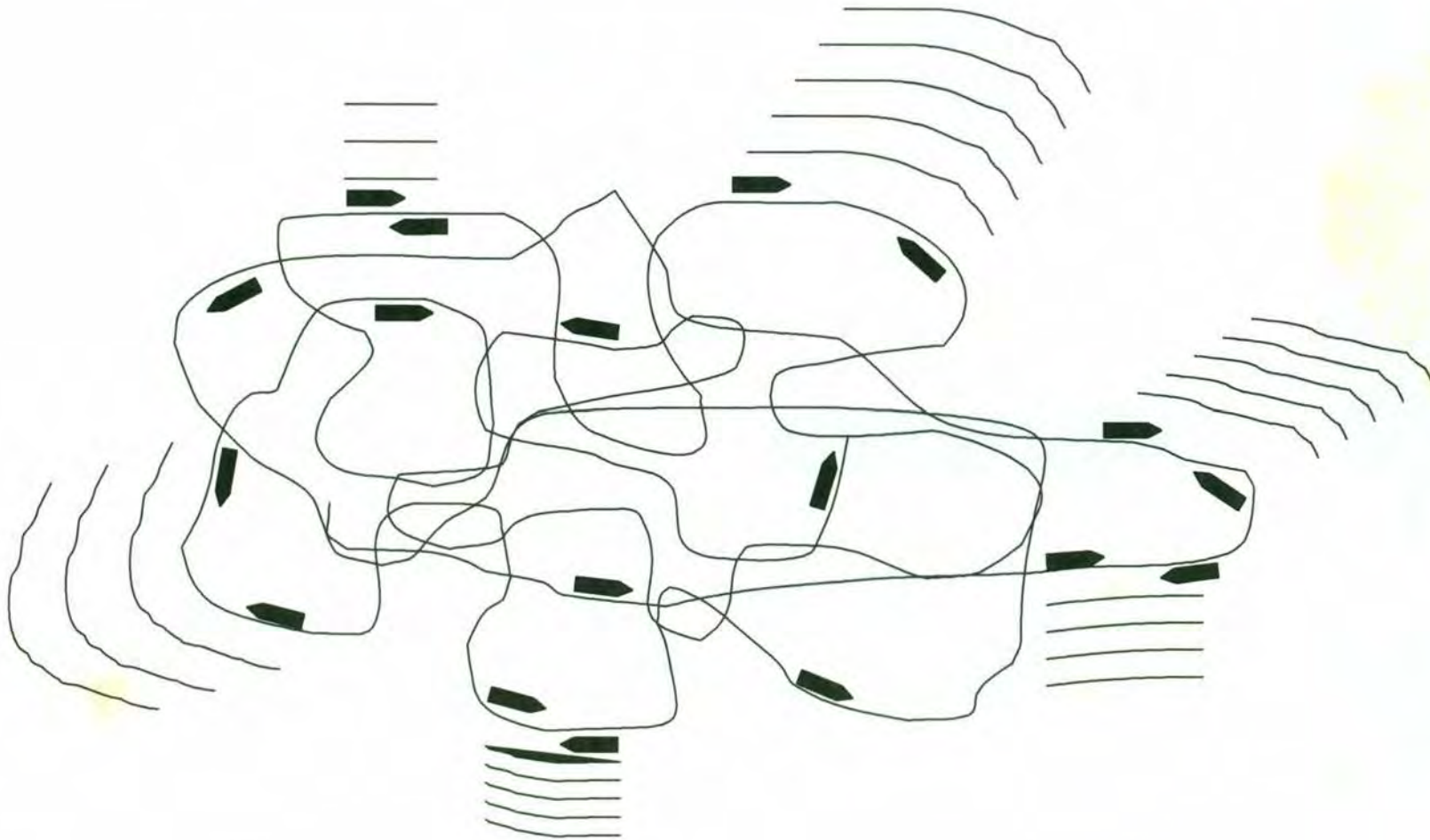
Polymorphic DNAs

RAPDs

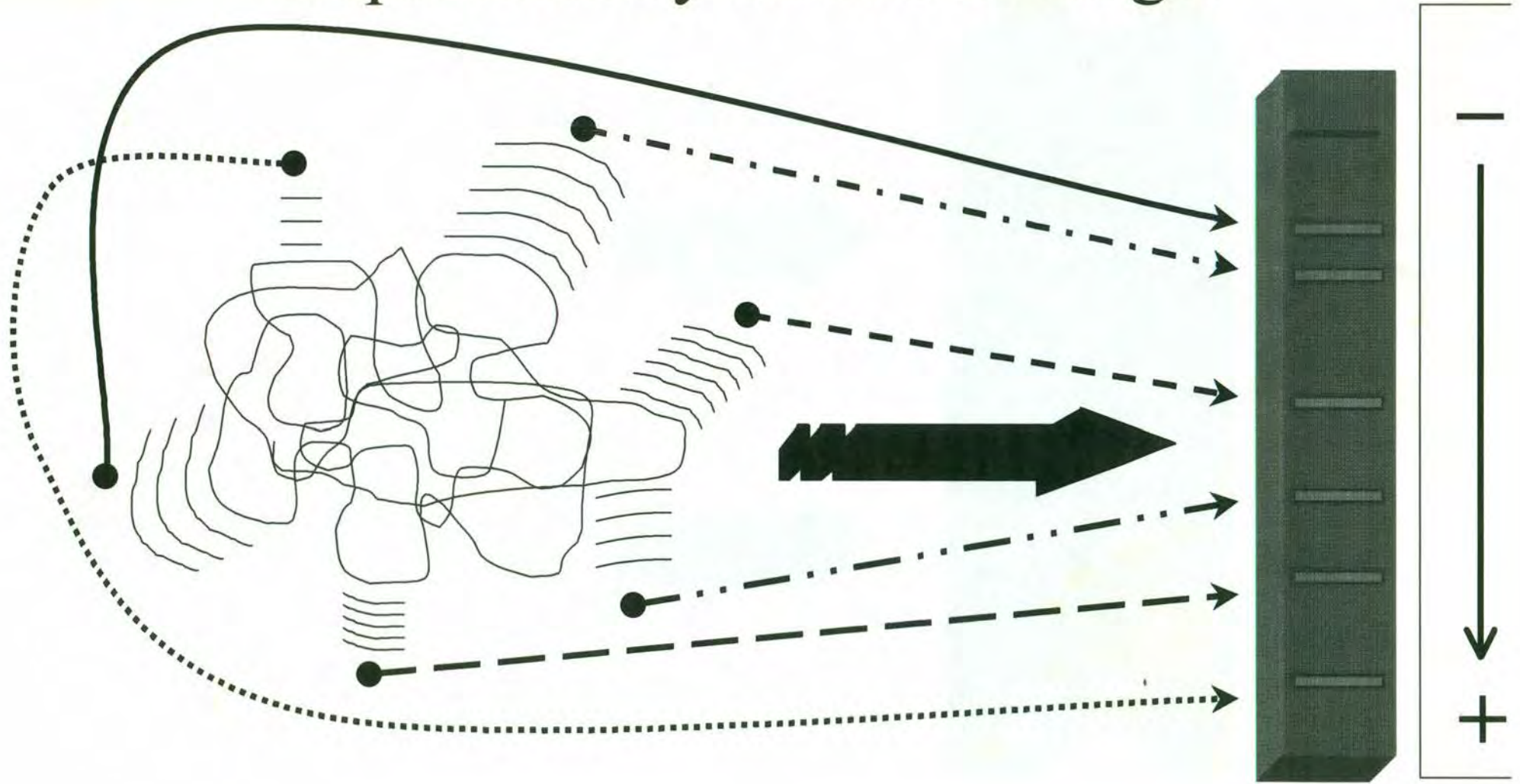
Random Amplified
Polymorphic DNAs

- Consiste en la amplificación mediante PCR de un ADN anónimo, utilizando para ello un cebador de secuencia arbitraria
- Normalmente se usa un solo cebador, de 10 nucleótidos de longitud y con un contenido alto en G+C
- Ejemplo: OP-A01 **CAGGCCTTC**

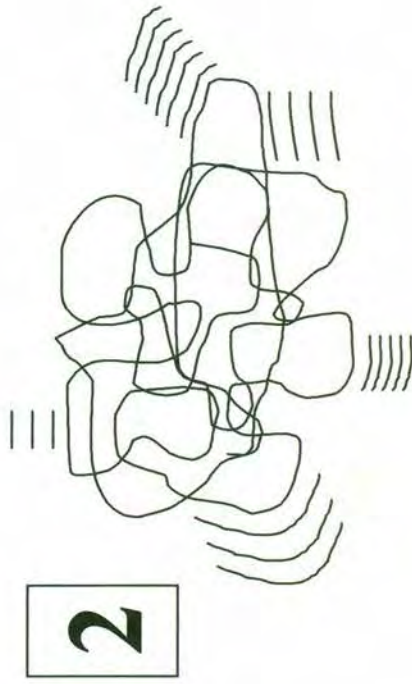
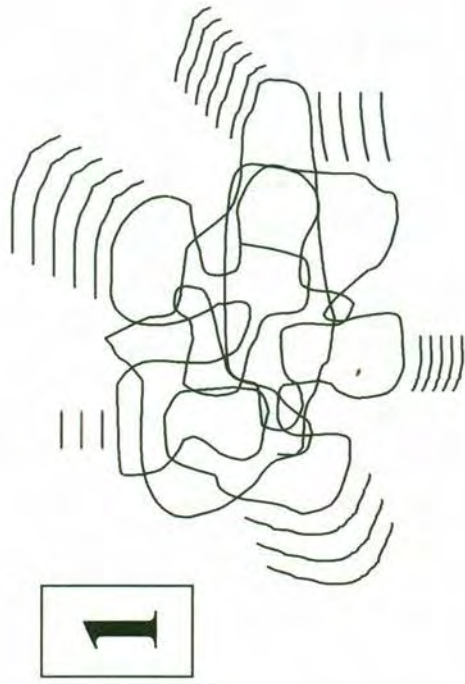
Amplificación de ADN anónimo con cebadores de secuencia arbitraria



Correspondencia entre fragmentos amplificados y bandas en un gel

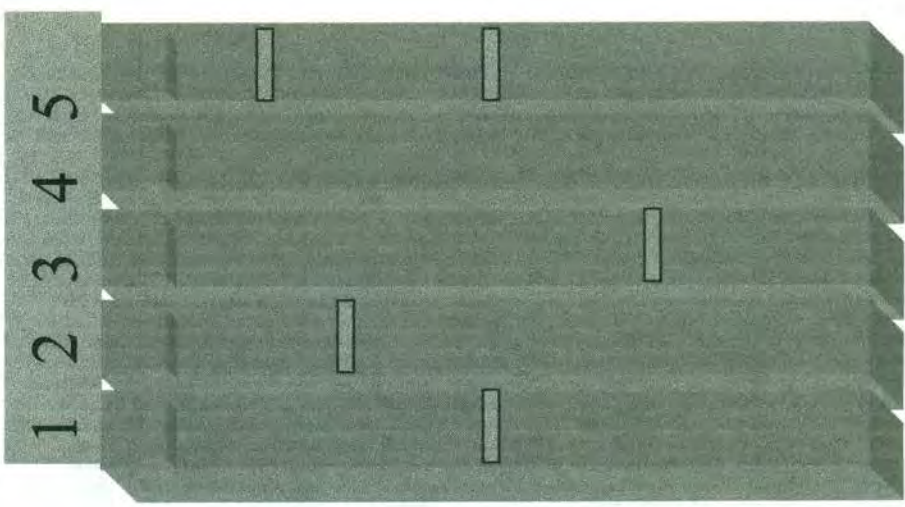
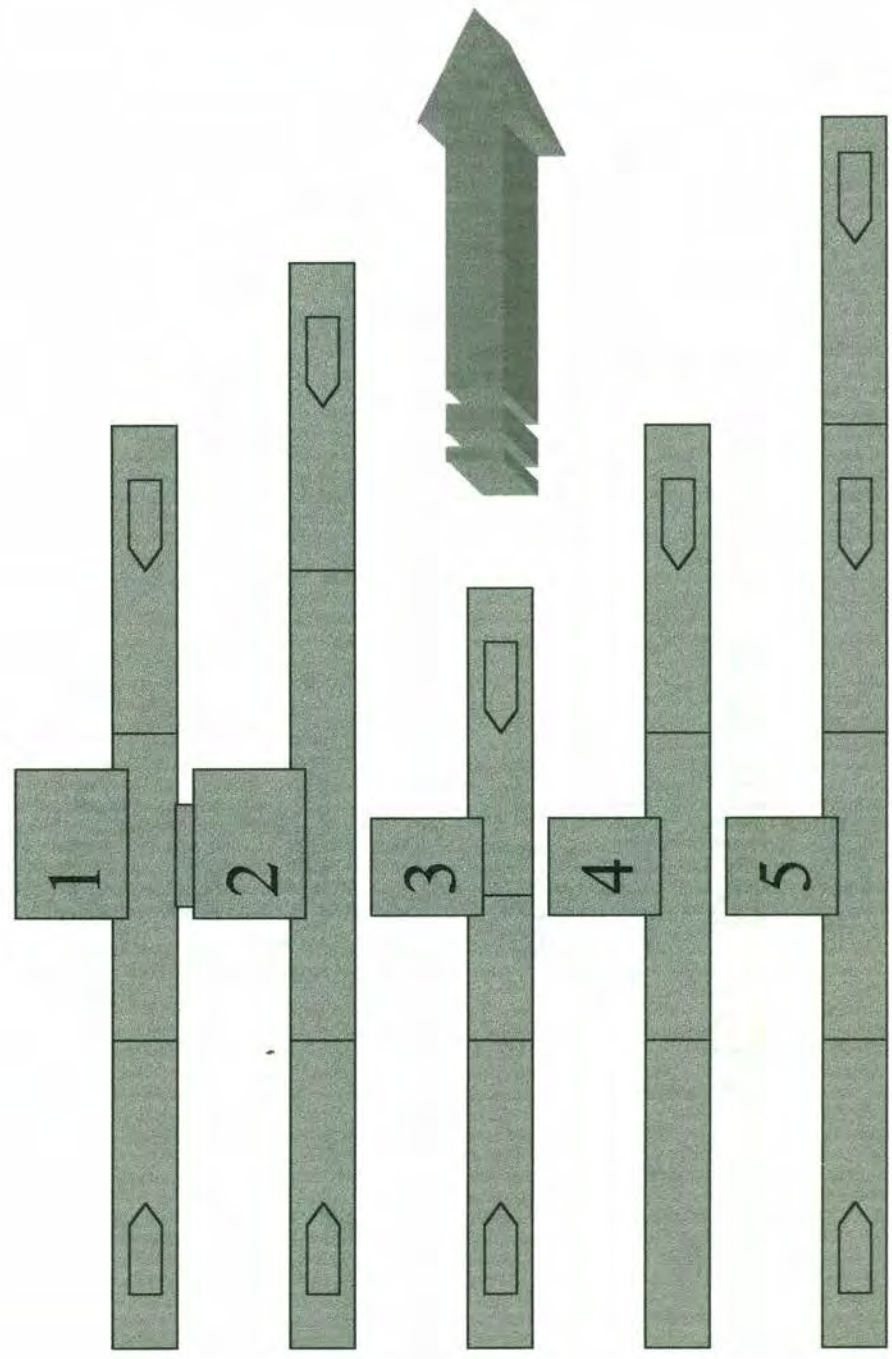


Obtención de RAPDs



Procedimiento básico para RAPDs

- Obtener el material vegetal
- Extraer el ADN
- PCR + Electroforesis + Fotografía
- Obtener la matriz de resultados
- Interpretar los resultados



Mezcla de reacción para RAPDs

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 8,3	10 mM
KCl	50 mM
Gelatina	0,001%
Cl ₂ Mg	2 mM
dNTPs	4 x 100 µM
Cebador	0,2 µM
ADN Polimerasa	0,02 U/µL
ADN	1 ng/µL

Programa de PCR para RAPDs

- 45 ciclos

Amplificación

94°C

1 min

Desnaturalización

36°C

1 min

Unión cebadores

72°C

2 min

Polimerización

J.G.K. Williams et al. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531-6535 (1990)

Mezcla de reacción para RAPDs con el fragmento Stoffel

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 8,3	10 mM
KCl	50 mM
Cl ₂ Mg	5 mM
dNTPs	4 x 200 µM
Cebador	0,4 µM
Fragmento Stoffel	0,08 U/µL
ADN	~1 ng/µL

Programa de PCR para RAPDs con el fragmento Stoffel

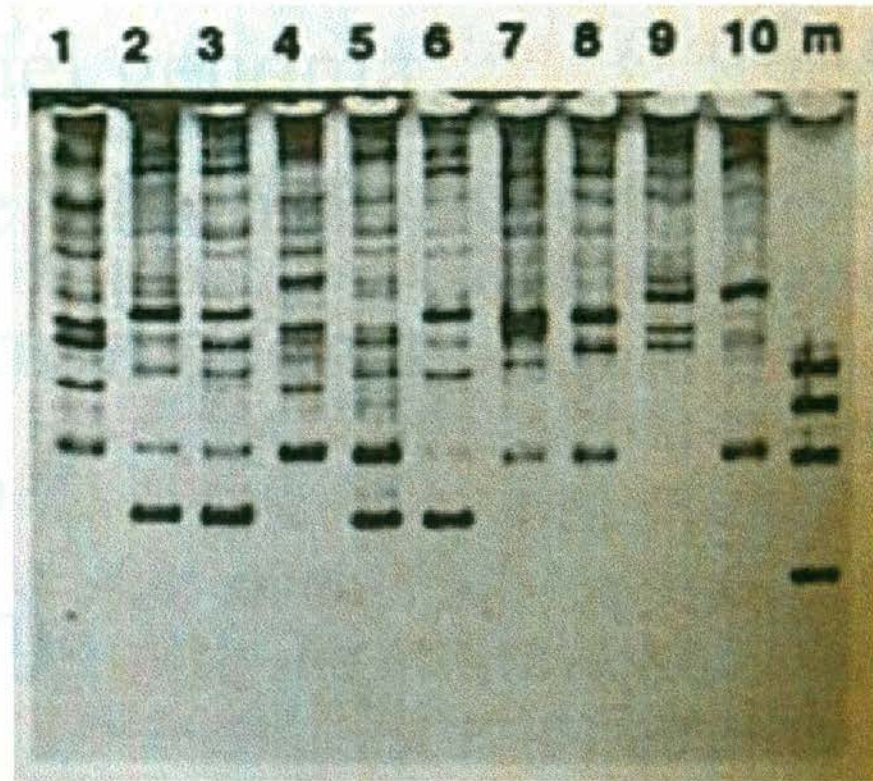
• 1 ciclo		Desnaturalización
94°C	6 min	inicial
• 40 ciclos		Amplificación
94°C	1 min	Desnaturalización
35°C	1 min	Unión cebadores
Rampa a 72°C	1 min 30 seg	Inicio polimerización
72°C	6 min 30 seg	Polimerización

Programa de PCR “touchdown” para RAPDs con el fragmento Stoffel

• 1 ciclo		Desnaturalización
94°C	2 min	inicial
• 10 ciclos		“Touchdown”
94°C	30 seg	Desnaturalización
Rampa a T ^a unión	-1,5°C/seg	
55°C (-1°C/ciclo)	1 min 30 seg	Unión del cebador
Rampa a 72°C	1 min 30 seg	Inicio polimerización
72°C	4 min 30 seg	Polimerización
• 25 ciclos		Amplificación
94°C	30 seg	Desnaturalización
Rampa	-1,5°C/seg	
45°C	1 min	Unión del cebador
Rampa a 72°C	1 min 30 seg	Inicio polimerización
72°C	4 min 30 seg	Polimerización
• 1 ciclo		Extensión final
72°C	10 min	

Métodos de separación/detección

- Agarosa/bromuro de etidio
- Poliacrilamida/nitrato de plata



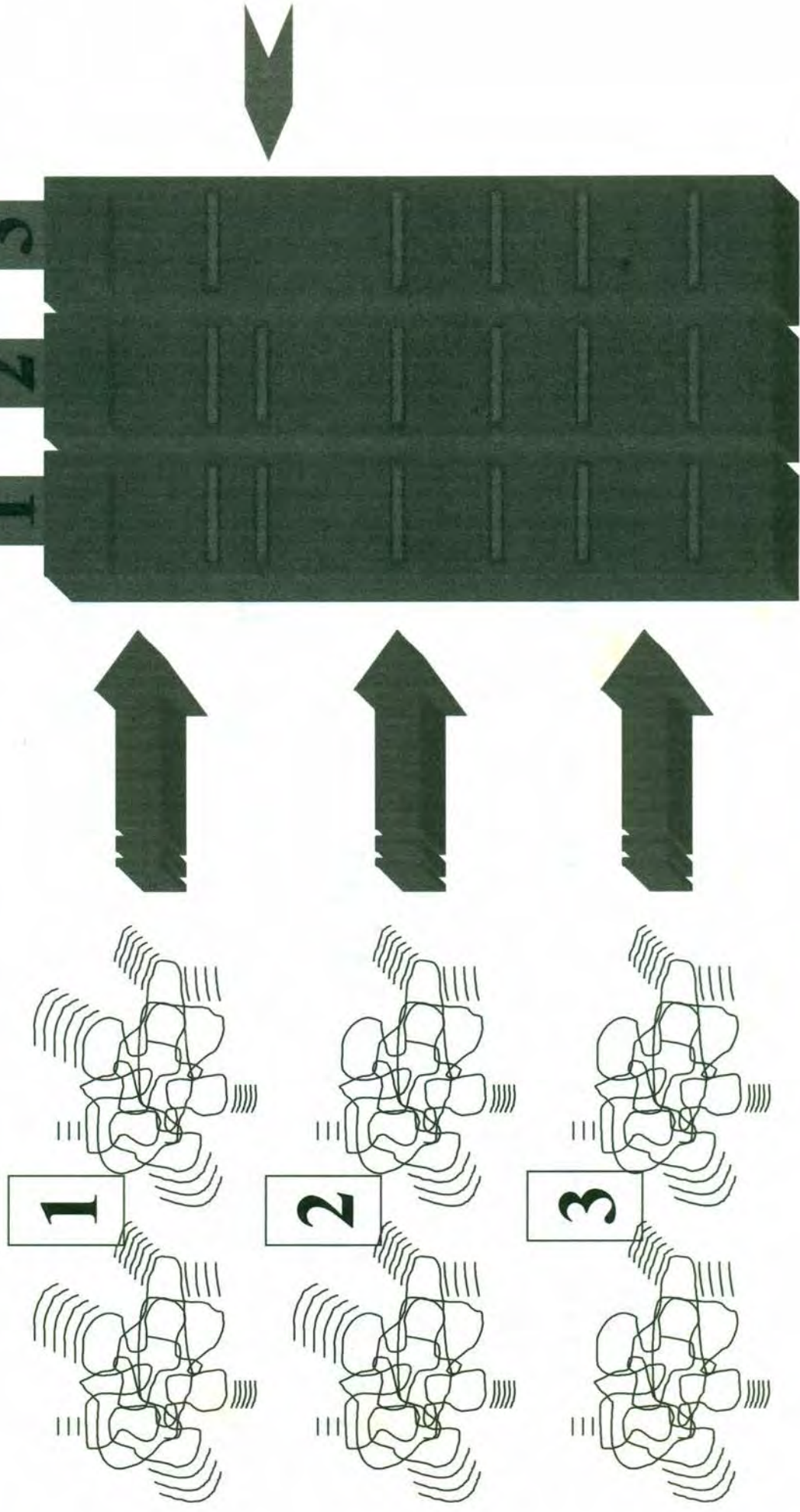
Ventajas de los RAPDs

- ✧ Anónimos: No requieren conocimiento previo del genoma
- ✧ Ensayo rápido, simple y barato
- ✧ Número ilimitado de marcadores
- ✧ Polimorfismo elevado
- ✧ Analizan todo el genoma

Desventajas de los RAPDs

- ✧ Herencia dominante
- ✧ Reproducibilidad intra-laboratorio
- ✧ Interpretación de bandas
- ✧ Transferibilidad a otros laboratorios

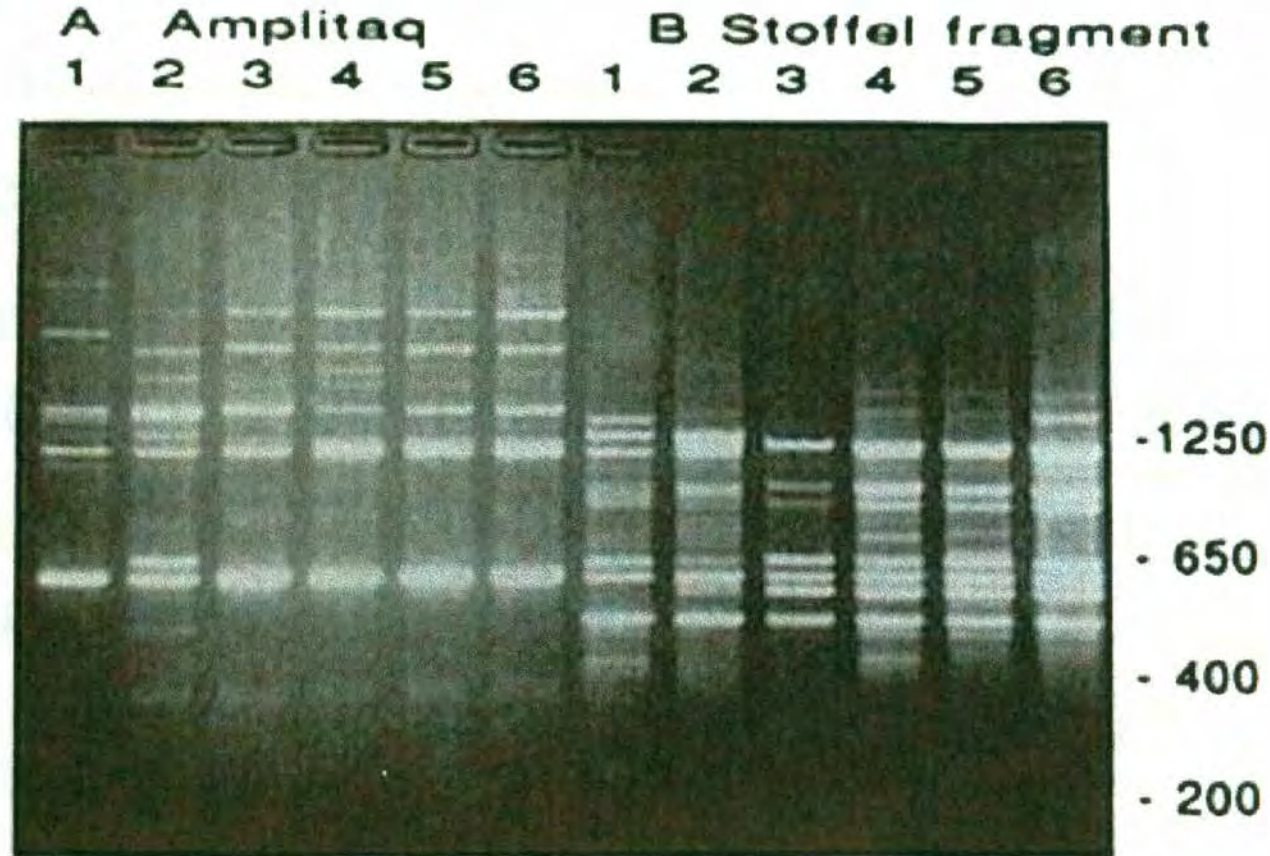
Los RAPDs son marcadores dominantes



Reproducibilidad de RAPDs

- La técnica RAPDs es muy sensible a alteraciones del protocolo
- Es necesario optimizarlo al comienzo y no cambiarlo
- Parámetros a controlar:
 - Marca de la ADN polimerasa
 - Cantidad y calidad del ADN
 - Concentraciones en la mezcla de reacción
 - Marca del termociclador
 - Programa de amplificación
 - Condiciones de electroforesis

Perfiles de RAPDs obtenidos con dos ADN Polimerasas diferentes



Interpretación de bandas de RAPDs

- Subjetividad: ¿qué bandas se incluyen en el análisis y cuáles no?
- Problemas de la co-migración:
 - Una banda del mismo tamaño en dos individuos NO representa necesariamente el mismo fragmento de ADN
 - Una banda NO contiene necesariamente un único fragmento de ADN

Interpretación de bandas de RAPDs

- Subjetividad: ¿qué bandas se incluyen en el análisis y cuáles no?
- Problemas de la co-migración:
 - Una banda del mismo tamaño en dos individuos NO representa necesariamente el mismo fragmento de ADN
 - Una banda NO contiene necesariamente un único fragmento de ADN

Aplicaciones de los RAPDs en plantas

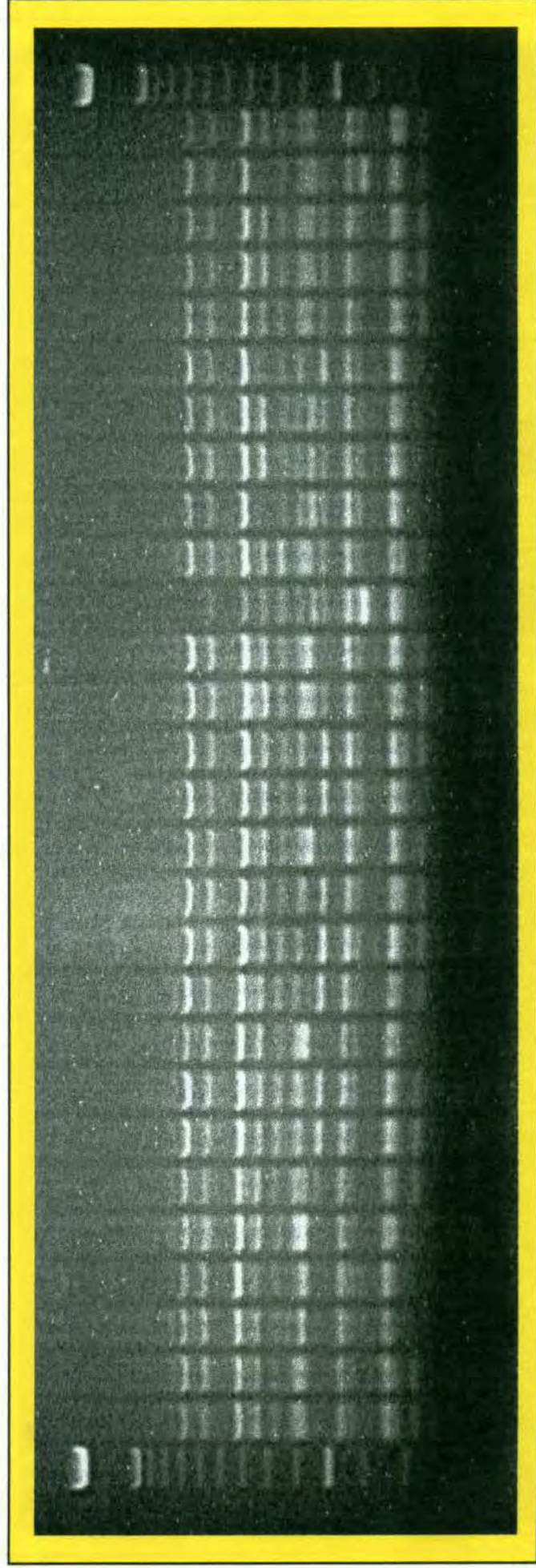
- Estudios de diversidad genética
- Estudios taxonómicos (relaciones fenéticas)
- Establecimiento de genealogías (paternidad)
- Determinación de pureza híbrida
- Elaboración de mapas genéticos
- “Etiquetado” de genes
- Identificación de material vegetal

Identificación de material vegetal

- Cultivares propagados vegetativamente
- Cultivares propagados por semilla:
autogamia y alogamia
- “Sports” vegetativos y otros mutantes
- Material propagado *in vitro*: variación somaclonal

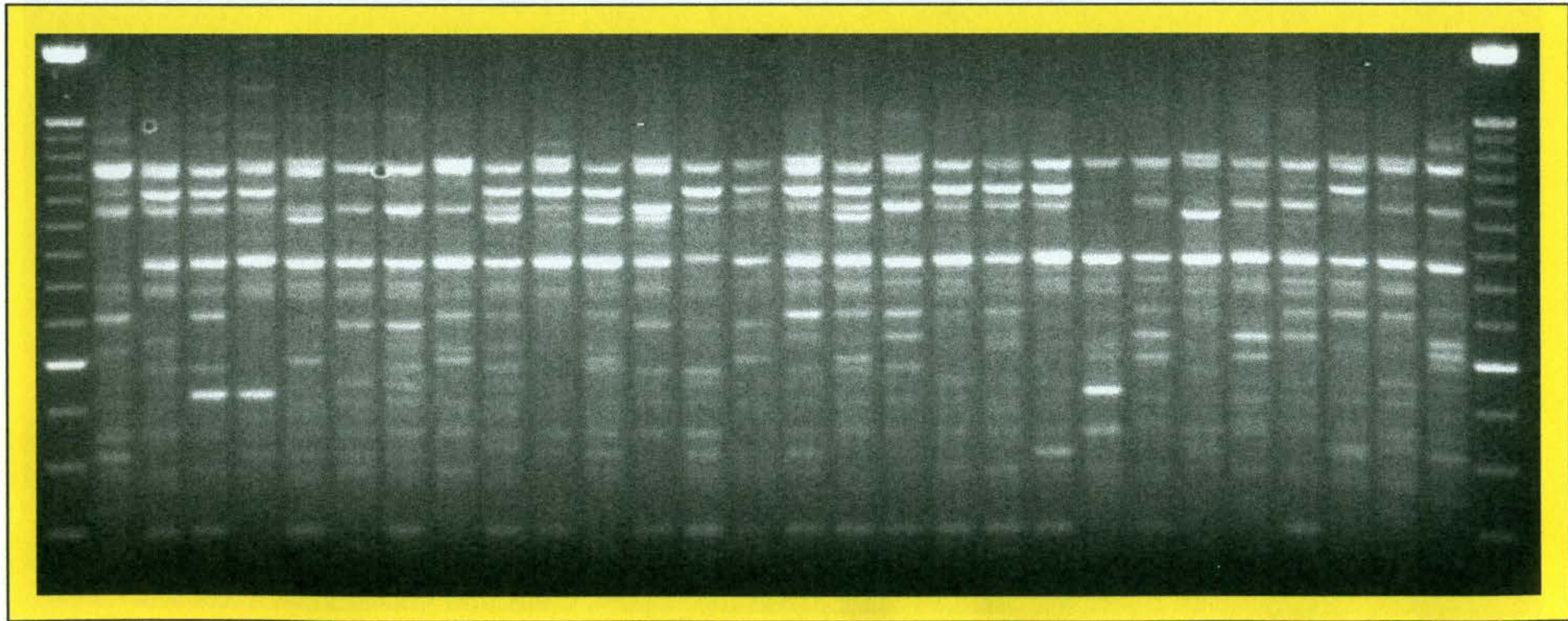
Perfiles de RAPDs de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.)

Cebador OP-D03

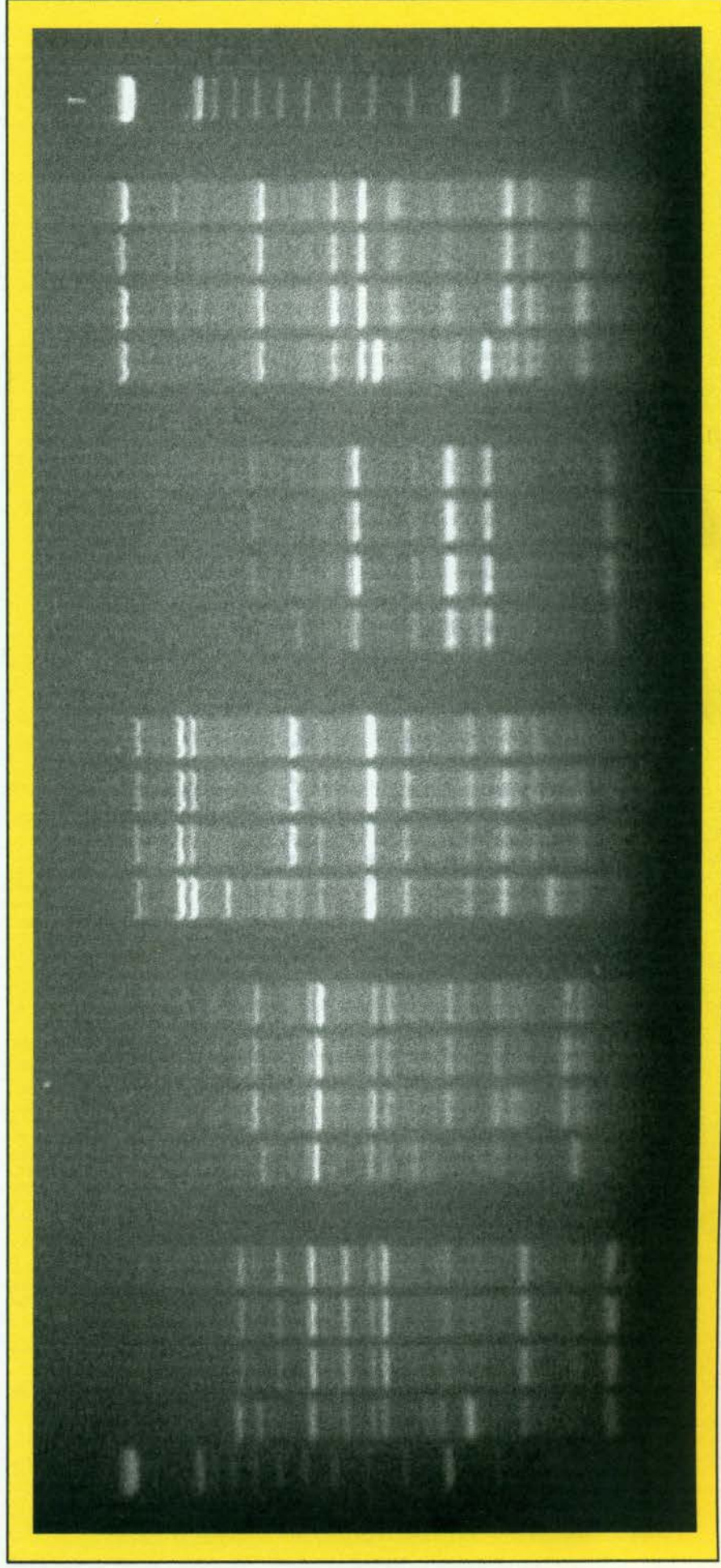


Perfiles de RAPDs de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.)

Cebador OP-E02



Análisis de identidad mediante RAPDs en vid (*Vitis vinifera* L.)



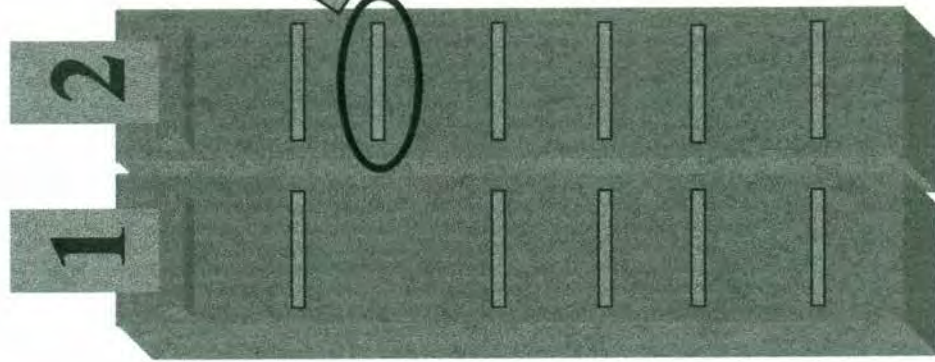
Técnicas basadas en la amplificación de fragmentos de ADN anónimo

MAAP: Multiple Arbitrary Amplicon Profiling

- RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
- AP-PCR: Arbitrary Primed PCR
- DAF: DNA Amplification Fingerprinting

SCARs

Sequence Characterized
Amplified Regions

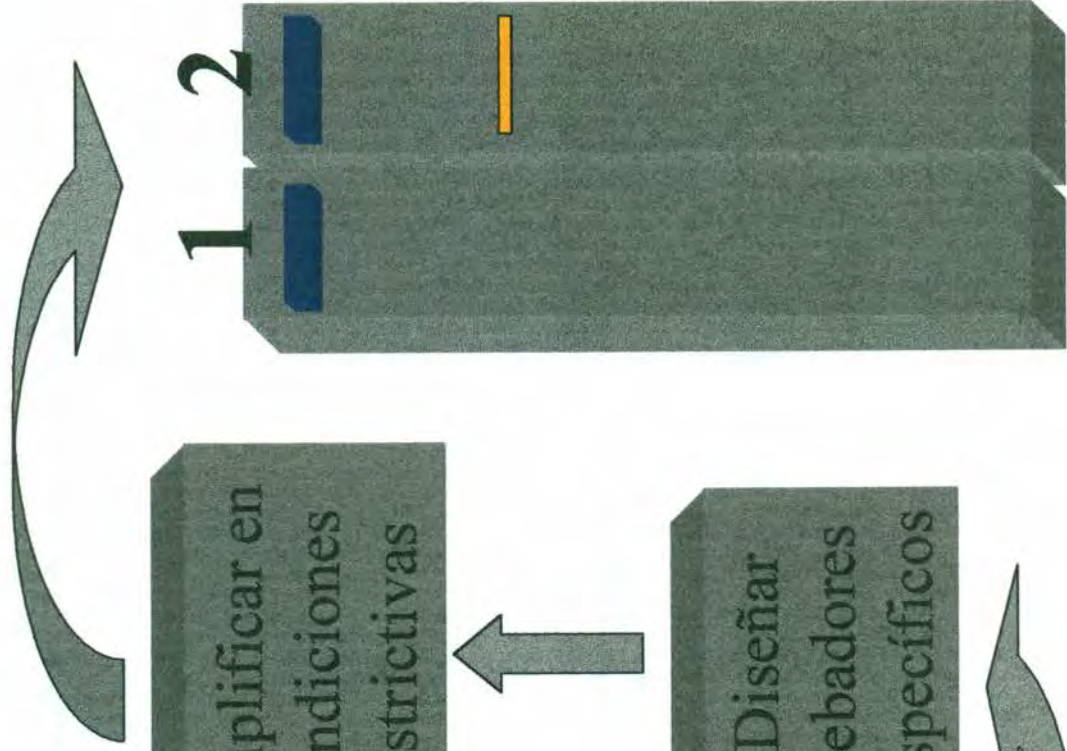


Clonar el
fragmento

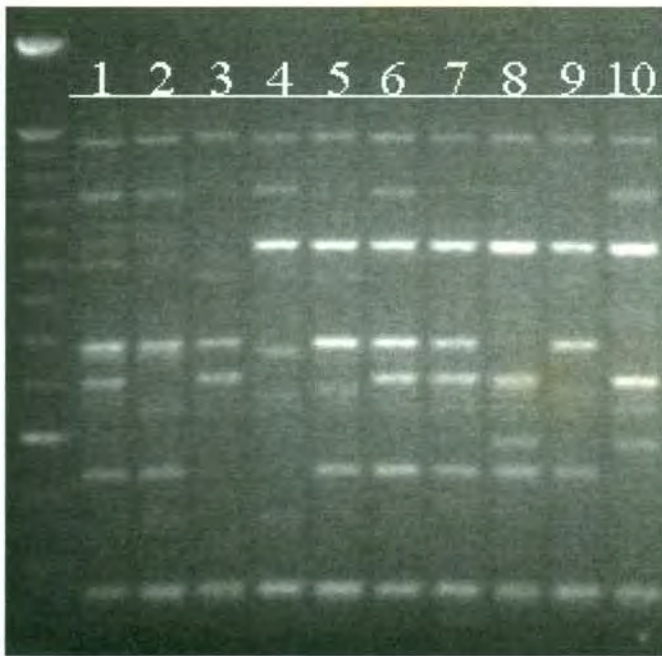
Secuenciar
el fragmento

Diseñar
cebadores
específicos

Amplificar en
condiciones
restrictivas



RAPDs

[illegible]

AFLPs

AFLPS

**Amplified Fragment
Length Polymorphisms**

AFLPs

- Combinación de RFLPs (*Robustez*) y PCR (*Potencia*).
- Obtención de un elevado número de marcadores.
- Requieren DNA de alto peso molecular de gran pureza.
- Metodología de creciente empleo.

Aislamiento de DNA



Corte con enzimas de restricción



Ligamiento de adaptadores



PCR con cebadores marcados



Separación por electroforesis

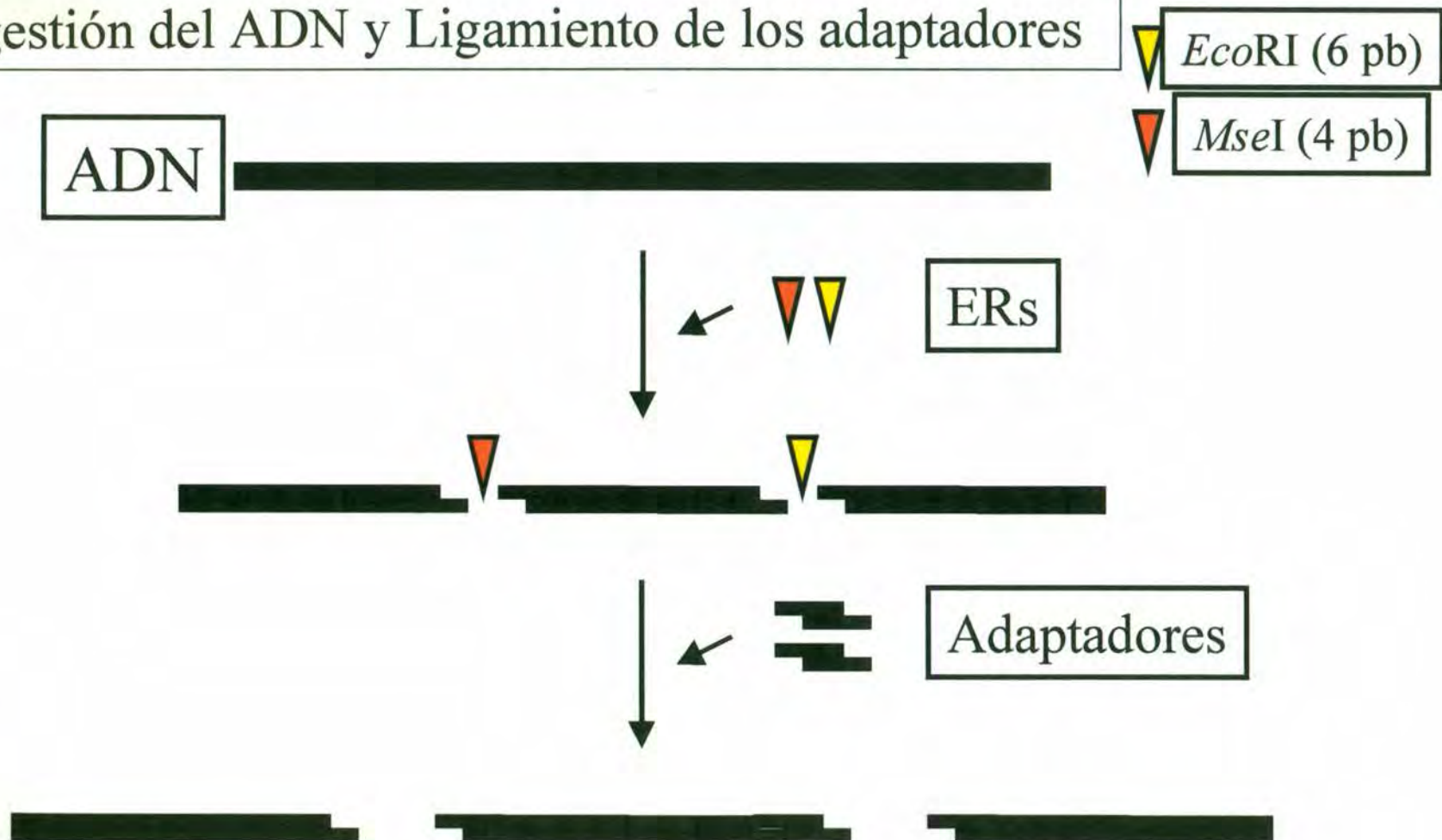


Análisis de resultados

Los AFLPs se desarrollan en tres fases:

1. Preparación del ADN y Ligamiento de los adaptadores
2. PCR preselectiva
3. PCR selectiva

1. Digestión del ADN y Ligamiento de los adaptadores



AFLPs

La unión de los adaptadores supone la pérdida de las dianas



A. Digestión



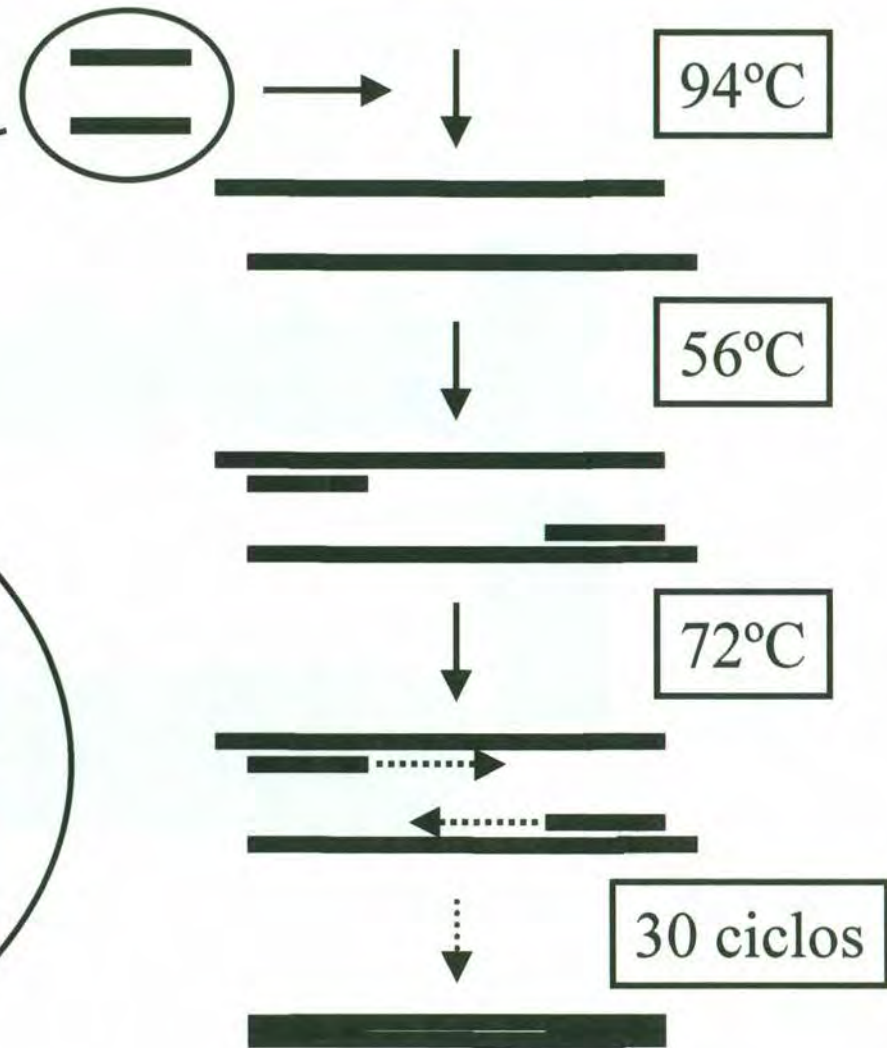
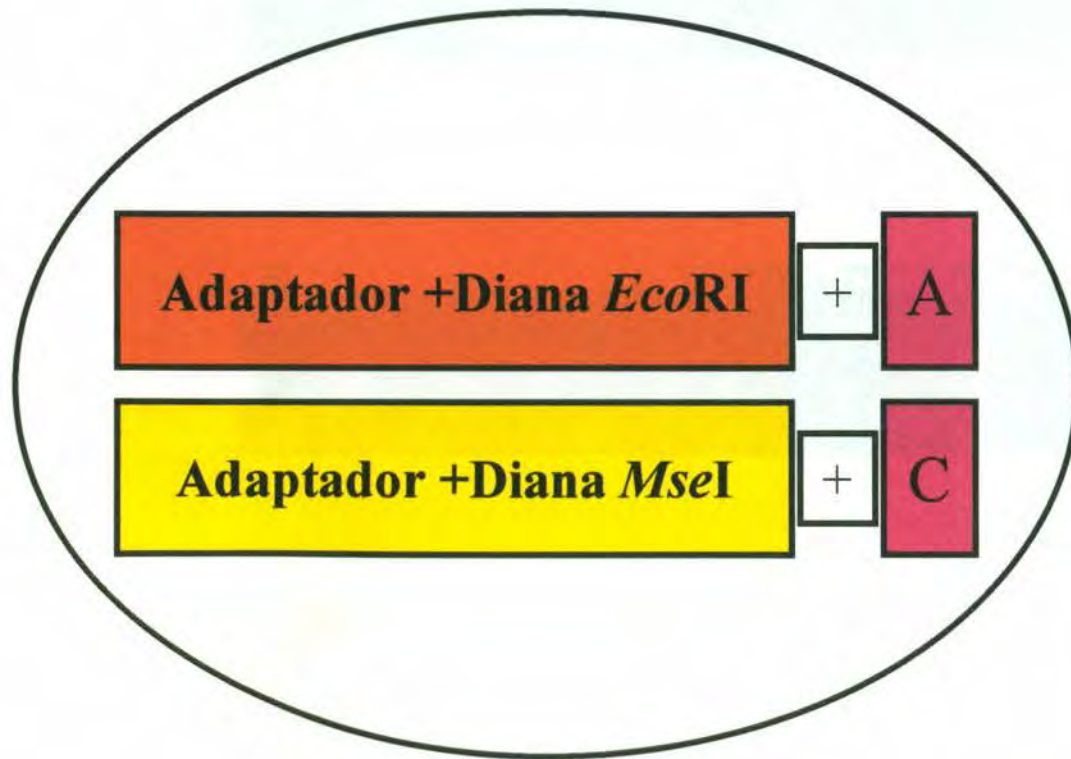
B. Ligamiento



AFLPs

2. PCR preselectiva

Reducción: 1/16



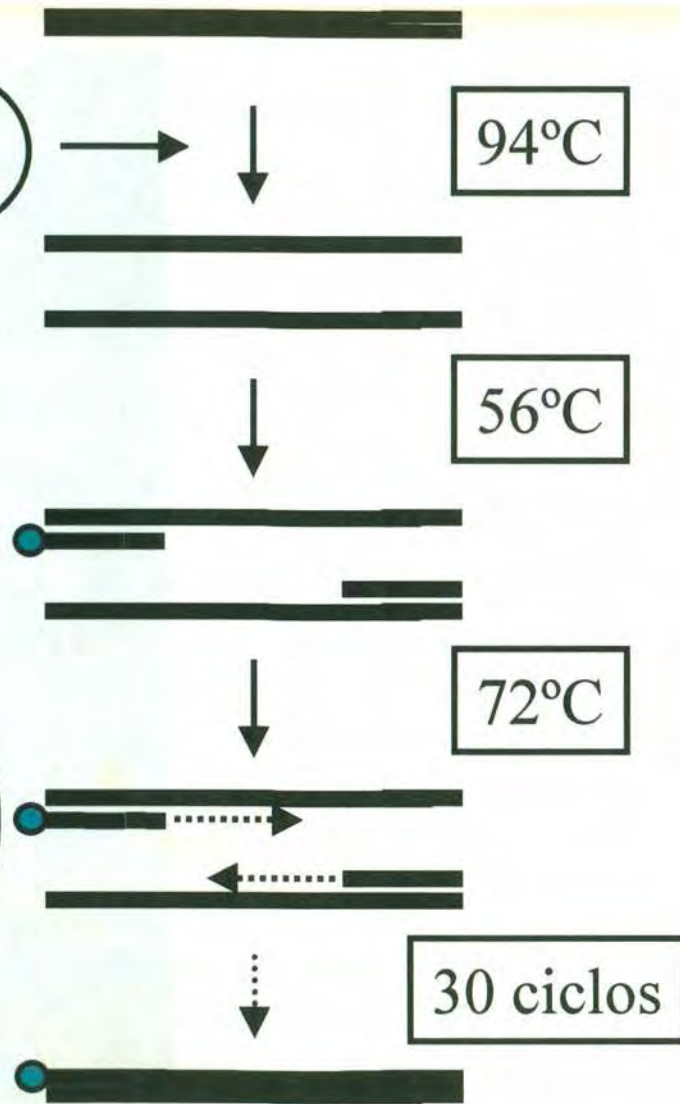
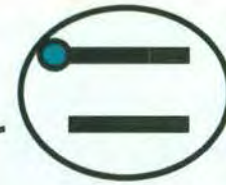
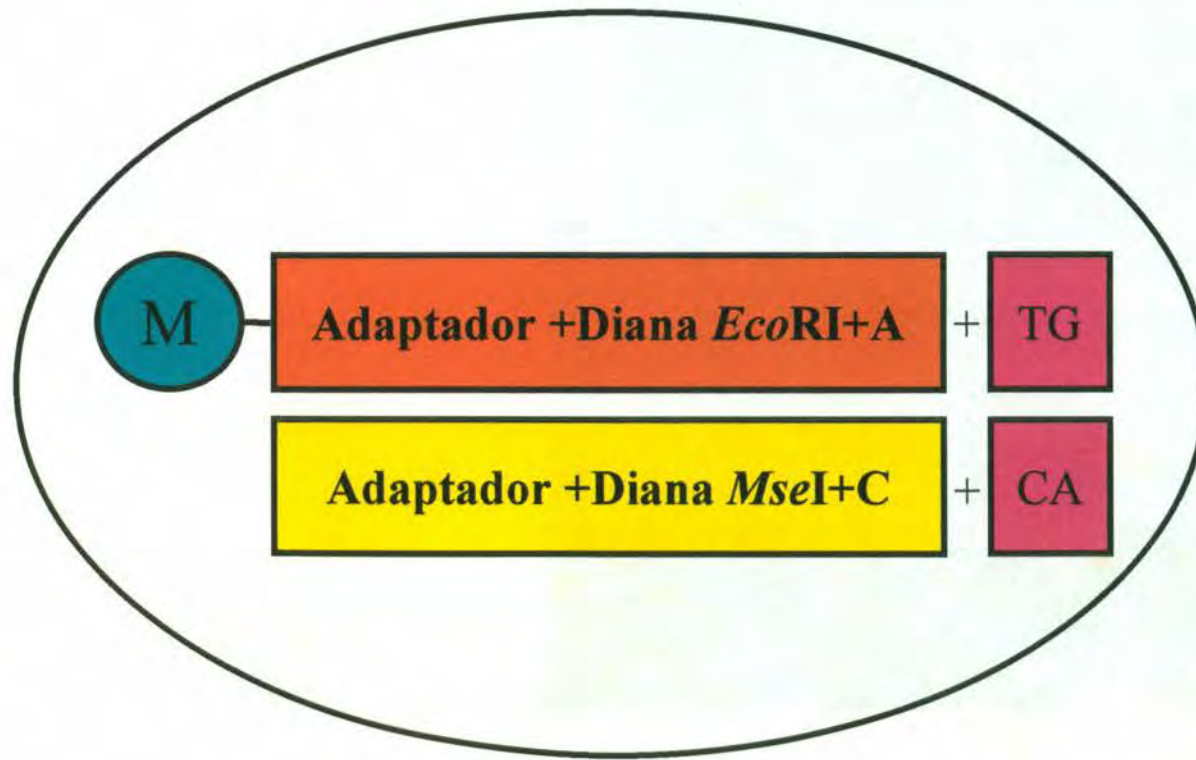
AFLPs



AFLPs

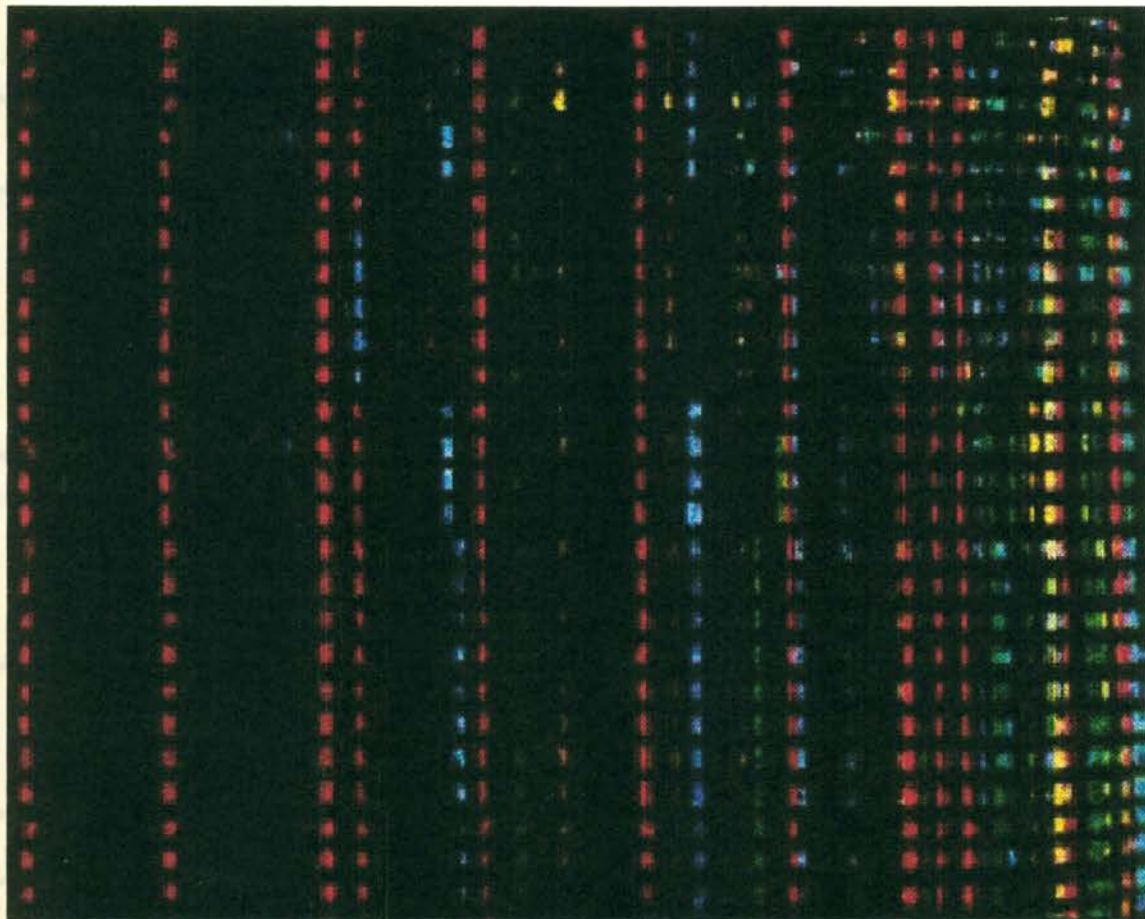
3. PCR selectiva

Reducción: 1/256



[illegible]

AFLPs



Origen del polimorfismo de los AFLPs

- Sustituciones de bases. Mutaciones puntuales en:

1. la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción

2. la base del extremo 3' del *cebador preselectivo*

+/-

3. las bases del extremo 3' del *cebador selectivo*.



- Inserciones/deleciones de segmentos de DNA.

Diferentes
tamaños

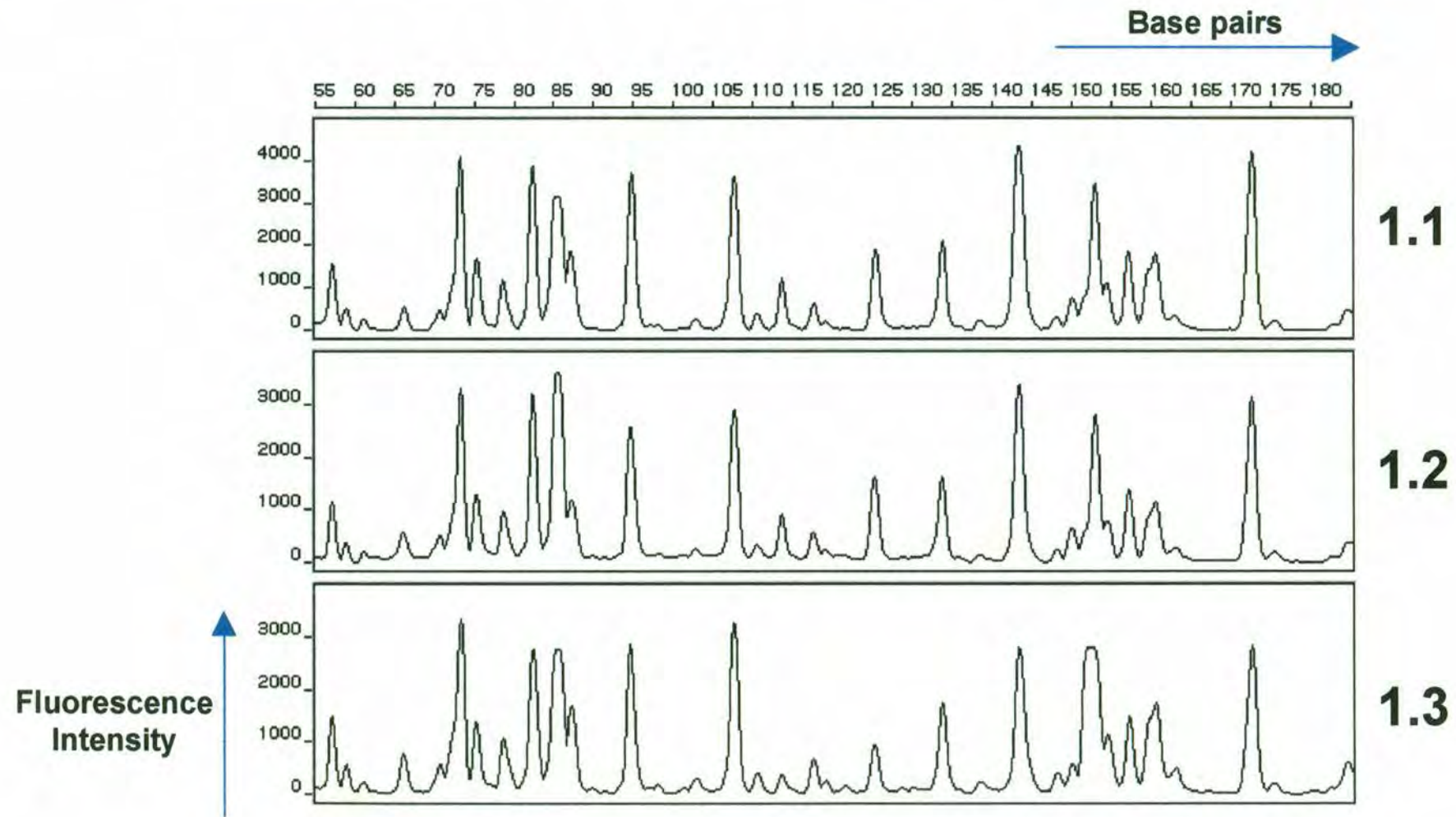
Ventajas de los AFLPs

- ✧ No requieren conocimiento previo del genoma
- ✧ Elevada reproducibilidad
- ✧ Número ilimitado de marcadores
- ✧ Polimorfismo elevado
- ✧ Analizan todo el genoma
- ✧ Requieren poca cantidad de ADN
- ✧ Sin influencia ambiental. Análisis directo del material hereditario.
- ✧ Análisis en fases tempranas.

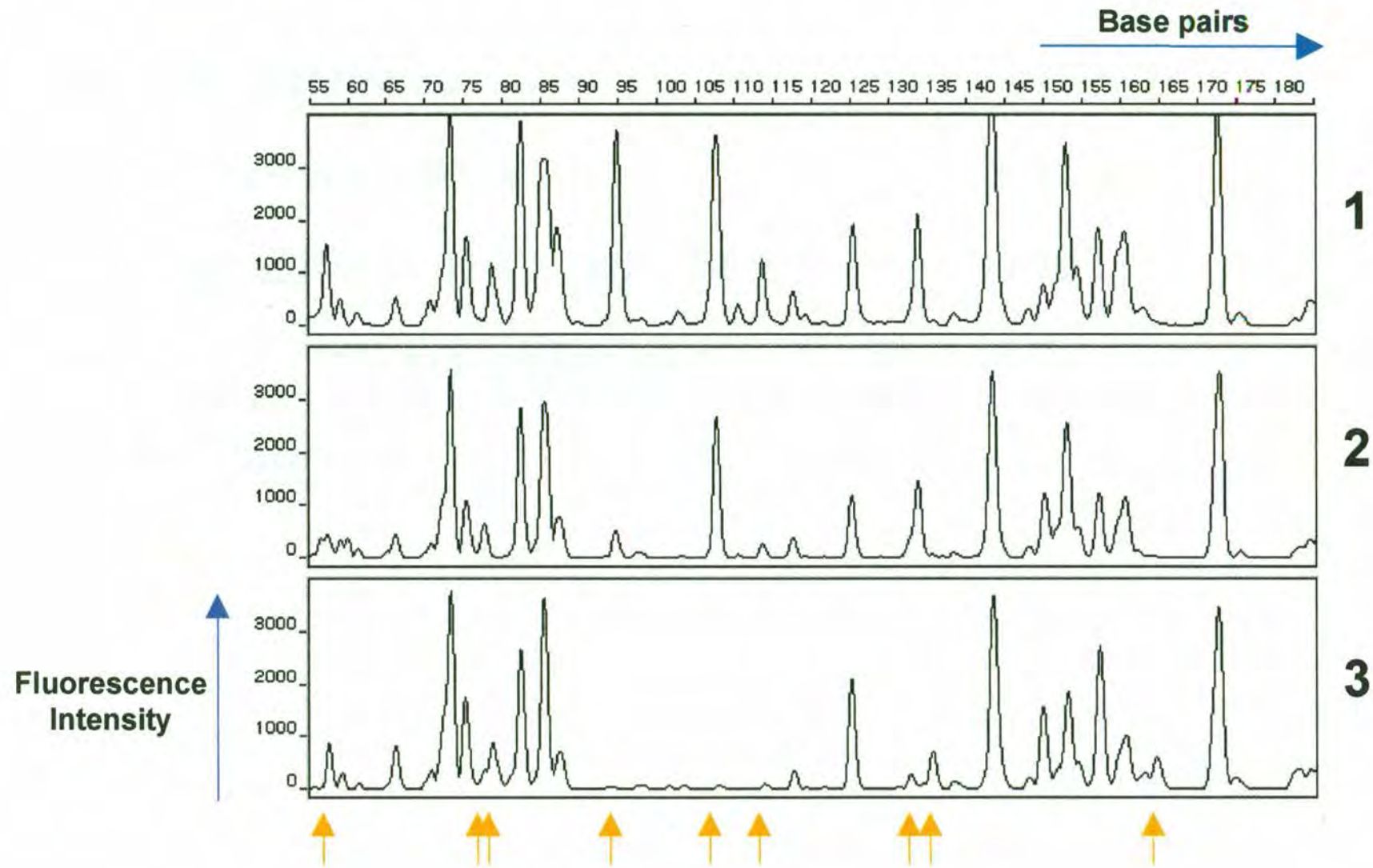
Desventajas de los AFLPs

- ✧ Elevado coste
- ✧ Procedimiento laborioso
- ✧ Herencia dominante
- ✧ Problemas de interpretación

AFLP patterns of embryos proceeding from the same genotype



AFLP patterns of embryos proceeding from different genotypes



Consumibles:

Extracción de DNA	\$ 1 - 4
• Preparación de DNA (DL+PCRI)	\$ 10
• PCRII (~ 150 marcadores)	\$ 7
• Electroforesis	\$ 2
	\$ 20 por muestra

RFLPs

\$ 2/ muestra

\$ 2/ marcador

AFLPs

\$ 20/ muestra

\$ 0,13/ marcador

Comparison of the different molecular screening techniques

Characteristics	RFLPs	RAPDs	Seq Tag SSRs	AFLPs	PCR-Seq
Development costs (\$ per probe)	Medium (100)	Low (none)	High (500)	Low (none)	High (500)
Level of Polymorphism	Low - Medium	Medium	High	Medium	Medium
Automation?	No	Yes/No	Yes/No	Yes/No	Yes
Cost of Automation	High	Medium	High	High	High
Reliability	High	Low	High	Medium	High
Level of Skill Required	Low	Low	Low - Medium	Medium	High
Cost (\$ per assay)	High (2.00)	Low (1.00)	Low (1.00)	Medium (1.50)	High (2.00)

Uso de Marcadores Moleculares na Biologia de Plantas.

Uso de Marcadores Moleculares na Biologia de Plantas.



MARCADORES MORFOLOGICOS

- Nº LIMITADO
- MULTIGENICOS
- CARACTERES DE MADUREZ
- ENTRENAMIENTO Y SUBJETIVIDAD
- INFLUENCIA DEL AMBIENTE

Limitaciones de los marcadores morfológicos e isoenzimas

- Influencia del ambiente
- Número limitado de caracteres

MORFOLOGIA

AMBIENTE

+

GENOMA



PCR

TECNICAS
DE
BIOLOGIA MOLECULAR



MARCADORES MOLECULARES

- ANALISIS DIRECTO DEL MATERIAL HEREDITARIO
- SIN INFLUENCIA AMBIENTAL
- ANALISIS DE MUCHOS INDIVIDUOS EN POCO TIEMPO
- N° ILIMITADO DE MARCADORES
- SENCILLO Y RAPIDO
- ANALISIS EN ESTADIOS TEMPRANOS

El tipo de marcador molecular perfecto

- Alto polimorfismo
- Herencia mendeliana codominante
- Detección fácil, rápida y barata
- Elevada reproducibilidad y transferibilidad
- Distribución frecuente y aleatoria en el genoma

Elección de la técnica molecular

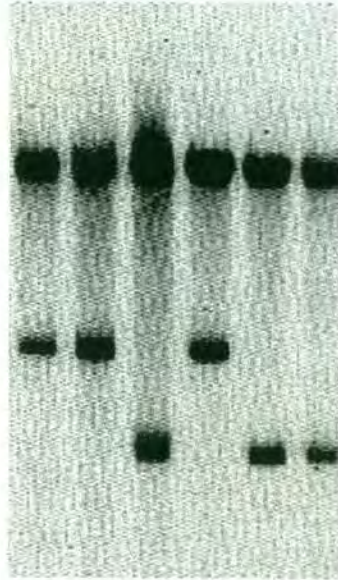
- Objetivo buscado
- Disponibilidad de ADN
- Nivel de discriminación taxonómico
- Número de loci
- Reproducibilidad y transferibilidad
- Rapidez y coste
- Equipamiento y complejidad técnica

MARCADORES MOLECULARES

1) ISOENZIMAS (Nº LIMITADO)



2) DIGESTION → RFLPs (PROCESO LABORIOSO Y EMPLEO DE RADIOACTIVIDAD)

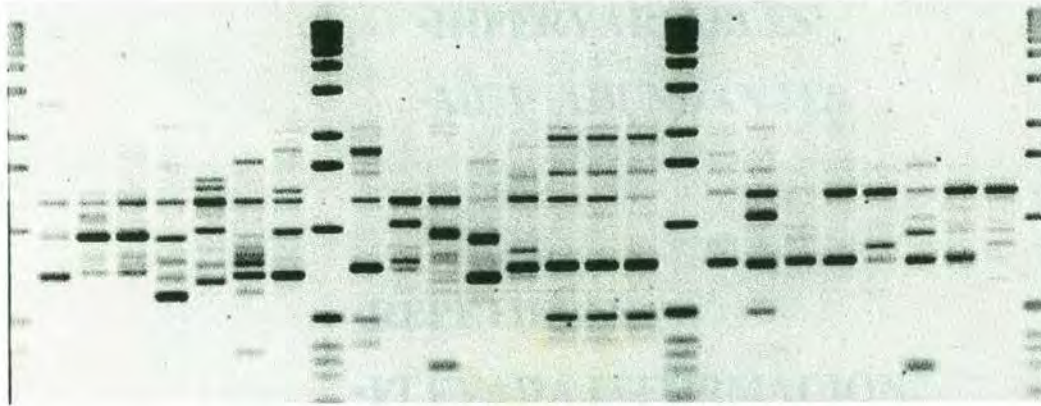


MARCADORES MOLECULARES

3) AMPLIFICACION (PCR)

- *DESCONOCIMIENTO SECUENCIA*

RAPDs (REPETIBILIDAD)



- *CONOCIMIENTO SECUENCIA*

MICROSATELITES

4) DIGESTION Y AMPLIFICACION

AFLPs

MICROSATELITES

AMPLIFICACION → CONOCIMIENTO DE LA SECUENCIA

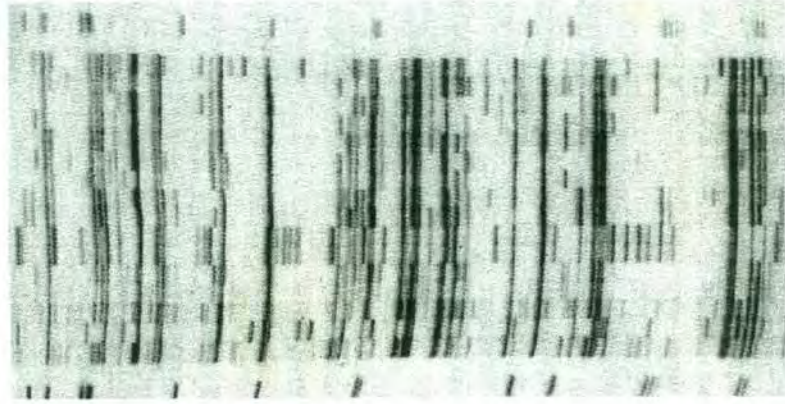
- **HIPERVARIABLES**
- **MUY ABUNDANTES**

- **REPETIBLES**
- **ELEVADA INFORMACION**



AFLPs

- DIGESTION Y AMPLIFICACION
- CIENTOS DE CARACTERES POR EXPERIMENTO



Ejemplos de Géneros de plantas donde se han usado MM basados en la PCR

Rhodophyta

Gelidium

Bryophyta

Scopelophila

Pteridophyta

Azolla

Trichomanes

Sporophyta

Gymnospermae

Juniperus

Picea

Pinus

Pseudotsuga

Angiospermae

Allium

Amelanchier

Apium

Arabidopsis

Arachis

Aster

Avena

Beta

Betula

Brassica

Buchloë

Callitriche

Capsicum

Carica

Cicer

Citrullus

Citrus

Cornus

Cynodon

Chamaecytisus

Chrysanthemum

Datisca

Dendranthema

Dendroseris

Echinochloa

Eleusine

Encelia

Eremochloa

Eucalyptus

Euphorbia

Festuca

Gaudichaudia

Gliricidia

Glycine

Gossypium

Helianthus

Herrania

Hordeum

Iris

Lactoris

Lactuca

Linum

Liriodendron

Lophopyrum

Lycopersicon

Malus

Medicago

Microseris

Musa

Myriophyllum

Nicotiana

Oryza

Pennisetum

Phaseolus

Phragmites

Pisum

Poa

Pogogyne

Poncirus

Populus

Prunus

Raphanus

Robinsonia

Rosa

Rubus

Saccharum

Secale

Silene

Sinapis

Solanum

Sorghum

Stylosanthes

Syringa

Tetramolopium

Theobroma

Triticum

Vaccinium

Vicia

Vitis

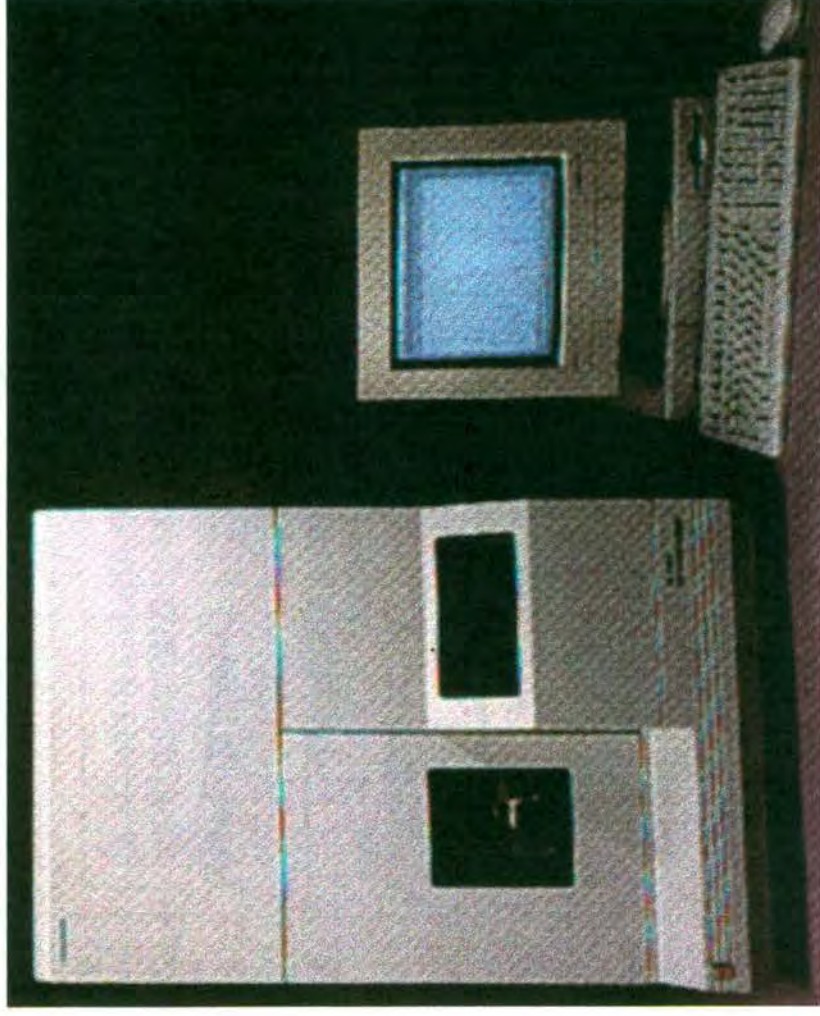
Yucca

Zea

Zoysia

ANALIZADOR GENETICOABI PRISM

310



AFLPs / MICROSATELITES

ABI PRISM 310

- **EXACTITUD CALCULO PESOS MOLECULARES**
- **AUTOMATIZACION**

- **SIMPLIFICACION DEL PROCESO**
- **REPETIBILIDAD**

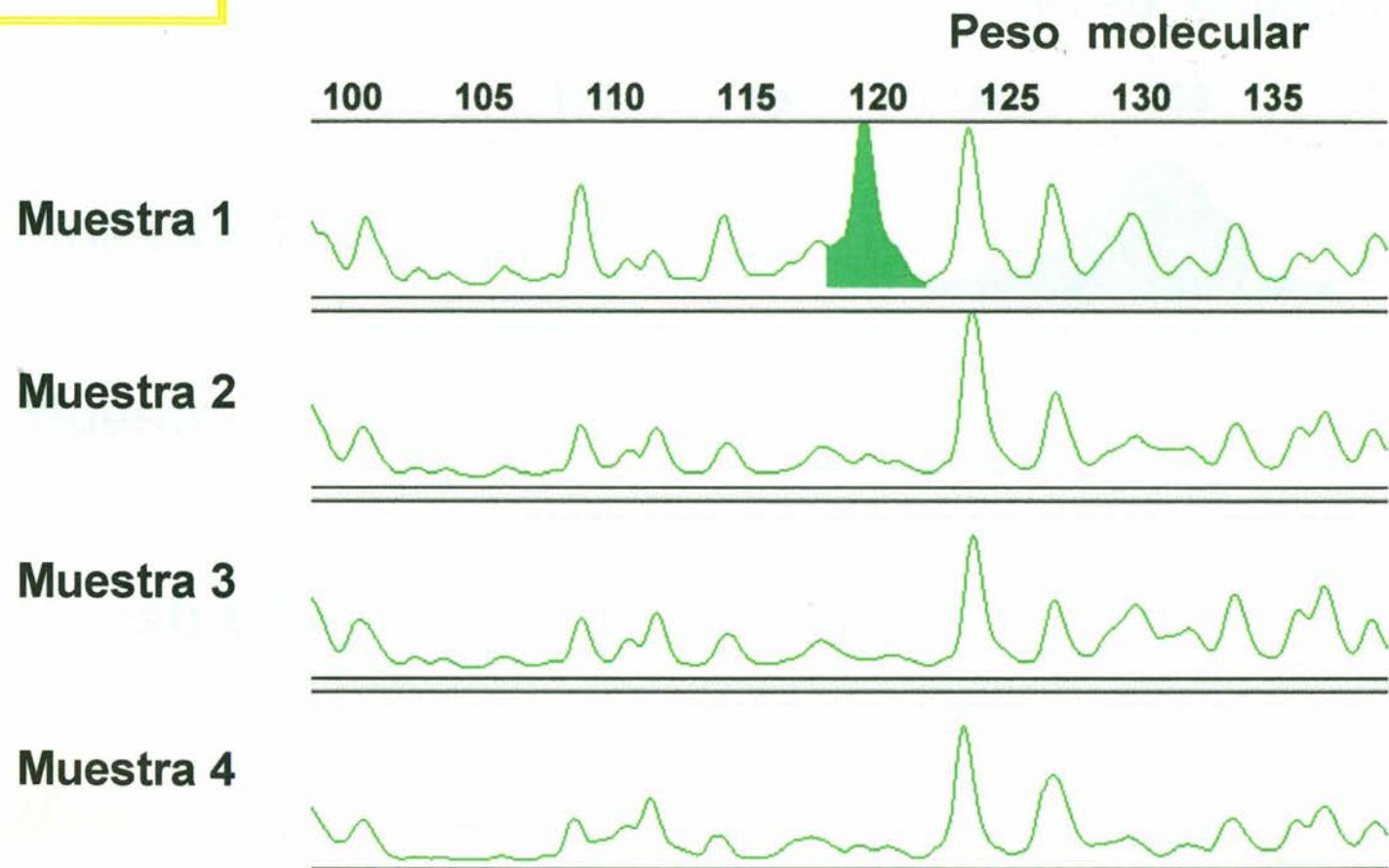
FIABILIDAD

EFICACIA

- **EXPERIMENTOS MULTIPLES**
- **SIN RADIOACTIVIDAD**

FLUORESCENCIA

AFLPs

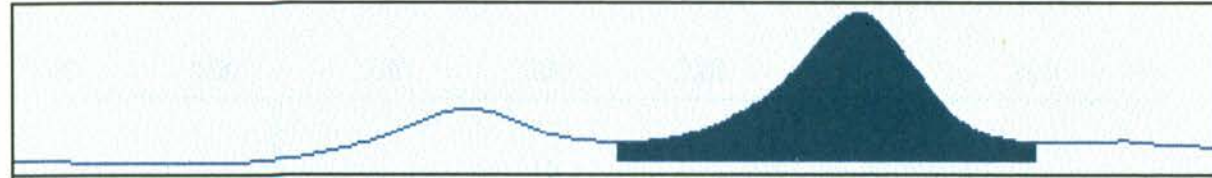


AFLPs

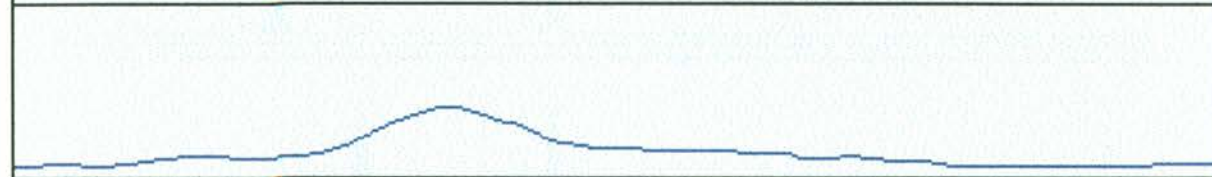
Peso molecular

191 193 195 197 199 201

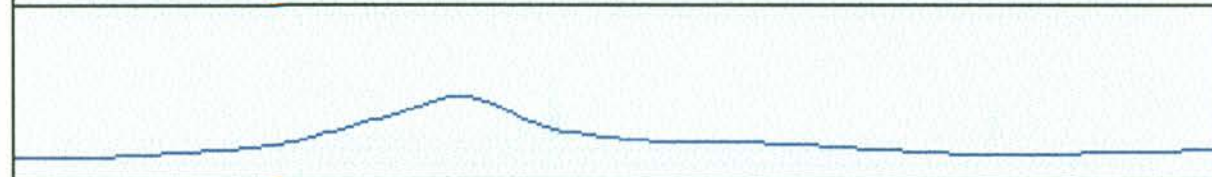
Muestra 1



Muestra 2



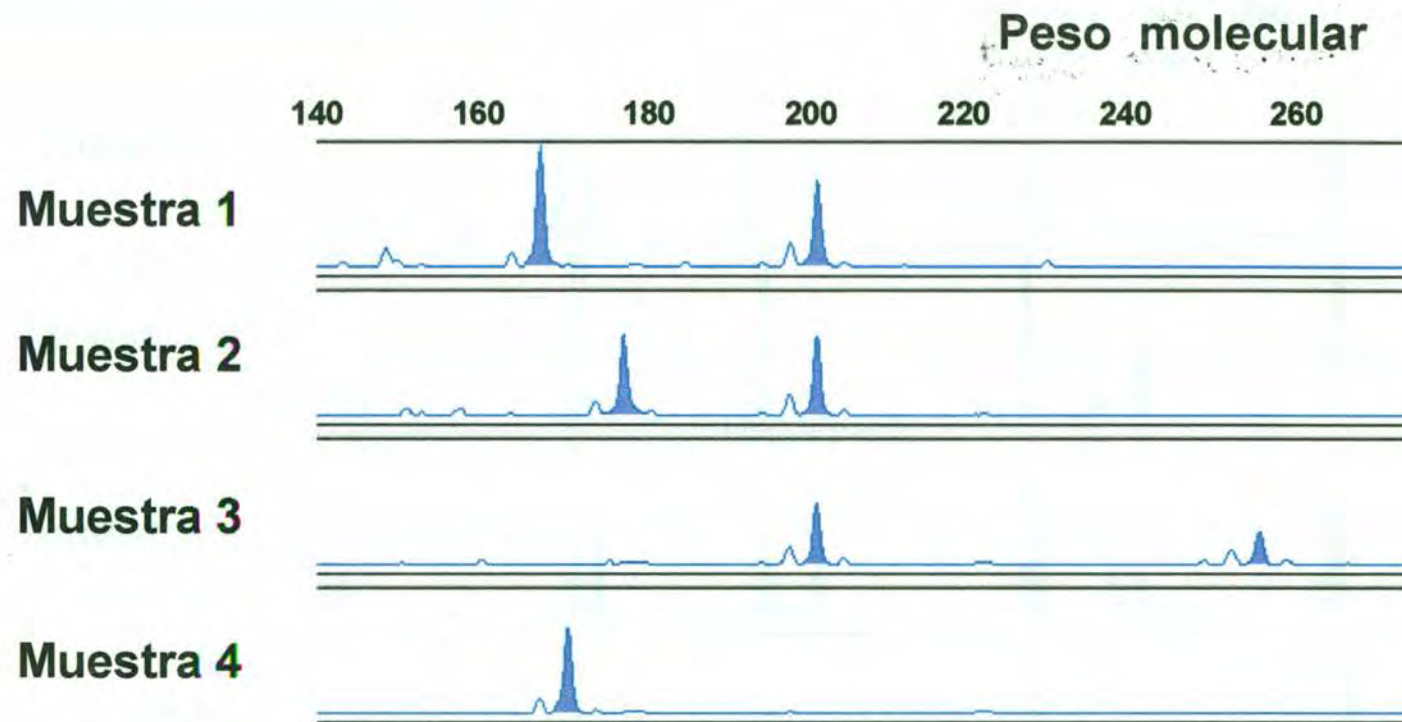
Muestra 3



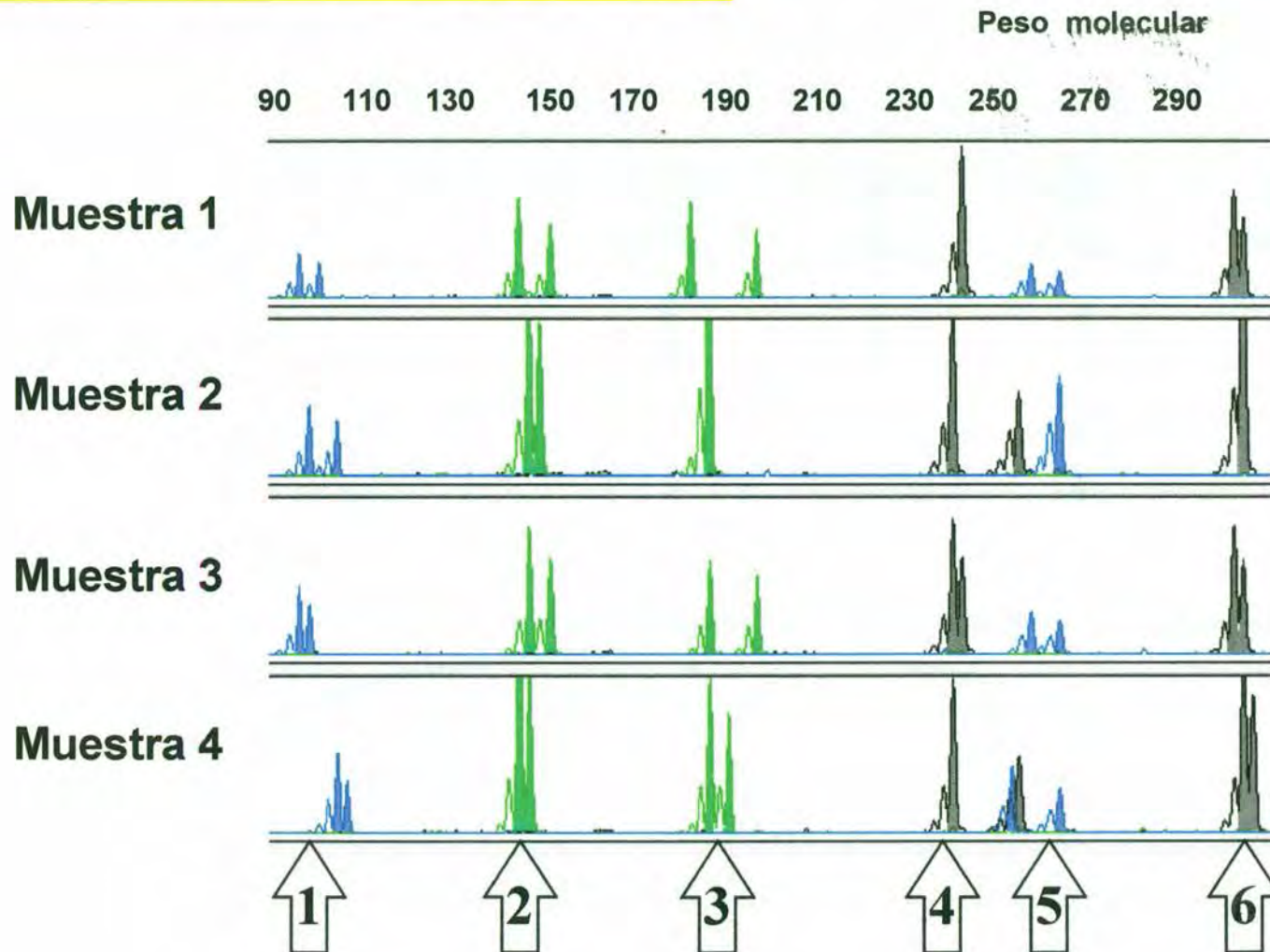
Muestra 4



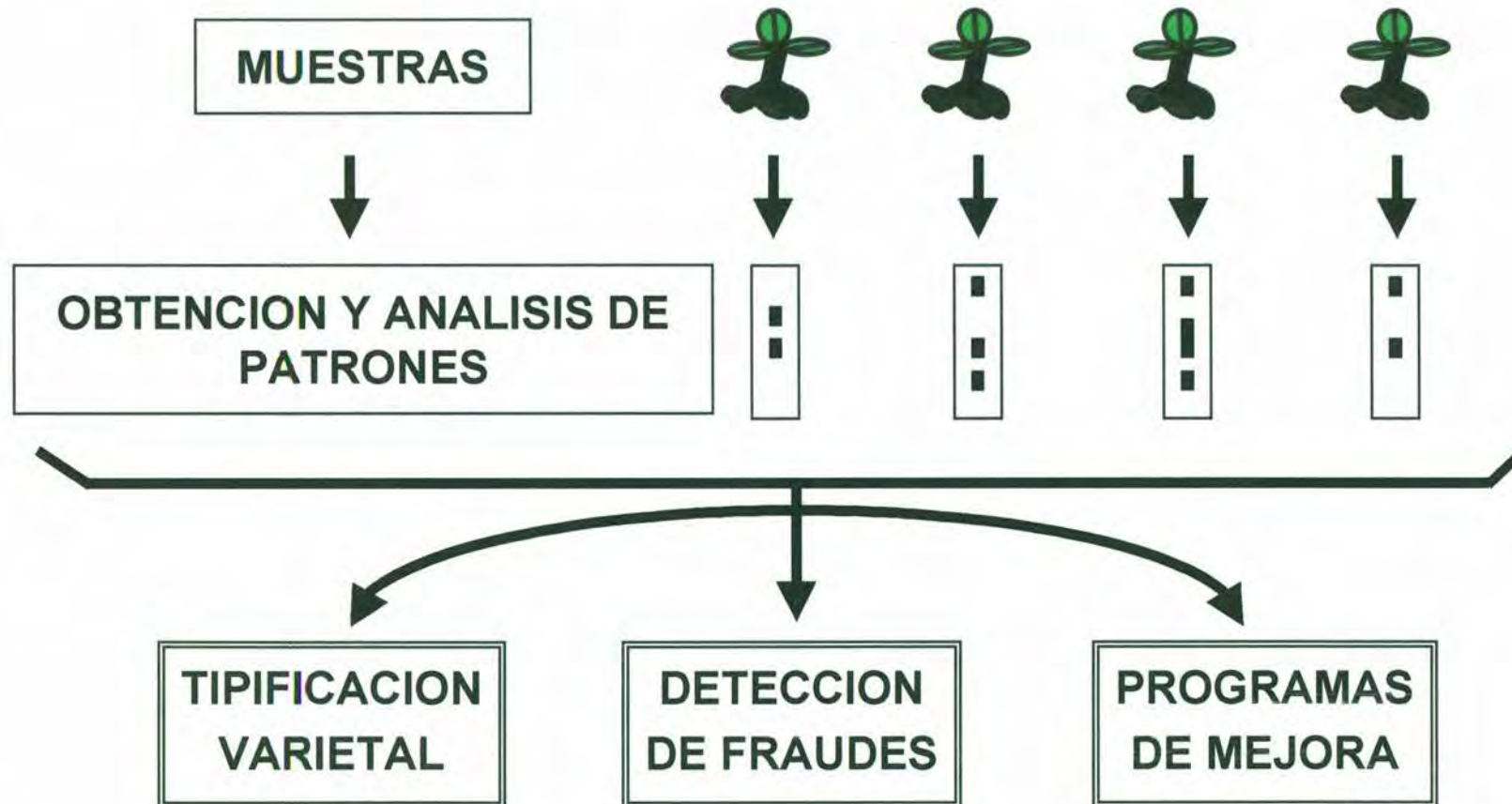
MICROSATELITES



MEZCLA DE MICROSATELITES



APLICACIONES DE LOS MARCADORES MOLECULARES



USO DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS.

Localización de Genes de Interés Agronómico

- Orden lineal de los loci.
- Establecimiento de proximidad relativa entre loci.
- Realización de cruzamientos: Retrocruzamientos y F2s.

Dominancia vs Codominancia

Aproximación clásica:

- Poblaciones segregantes.
- Desequilibrio de ligamiento: asociaciones de loci próximos en un cromosoma.
- Cruzamientos entre individuos muy “diferentes”.

P



F1



50%:50% 25%:75%

A B

A B

F2

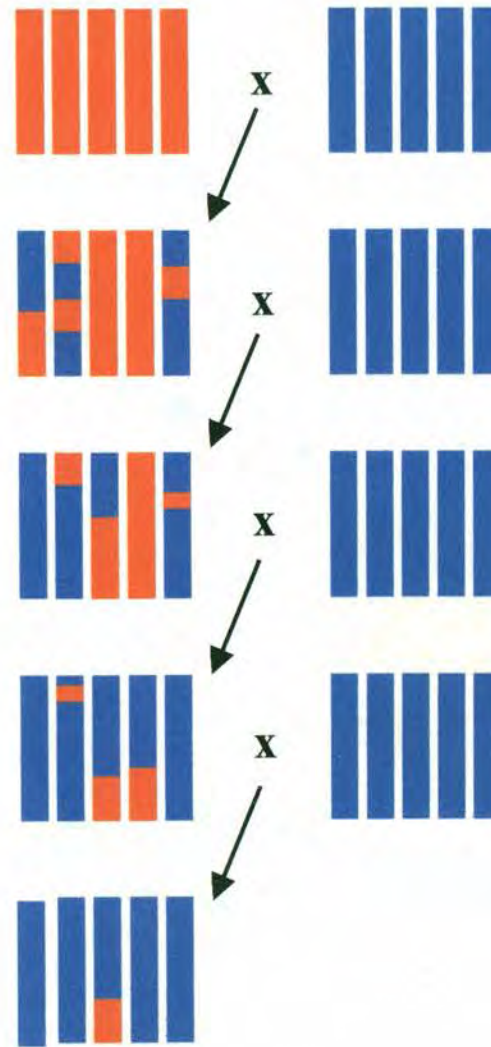
Retrocruzamiento

Aproximaciones alternativas:

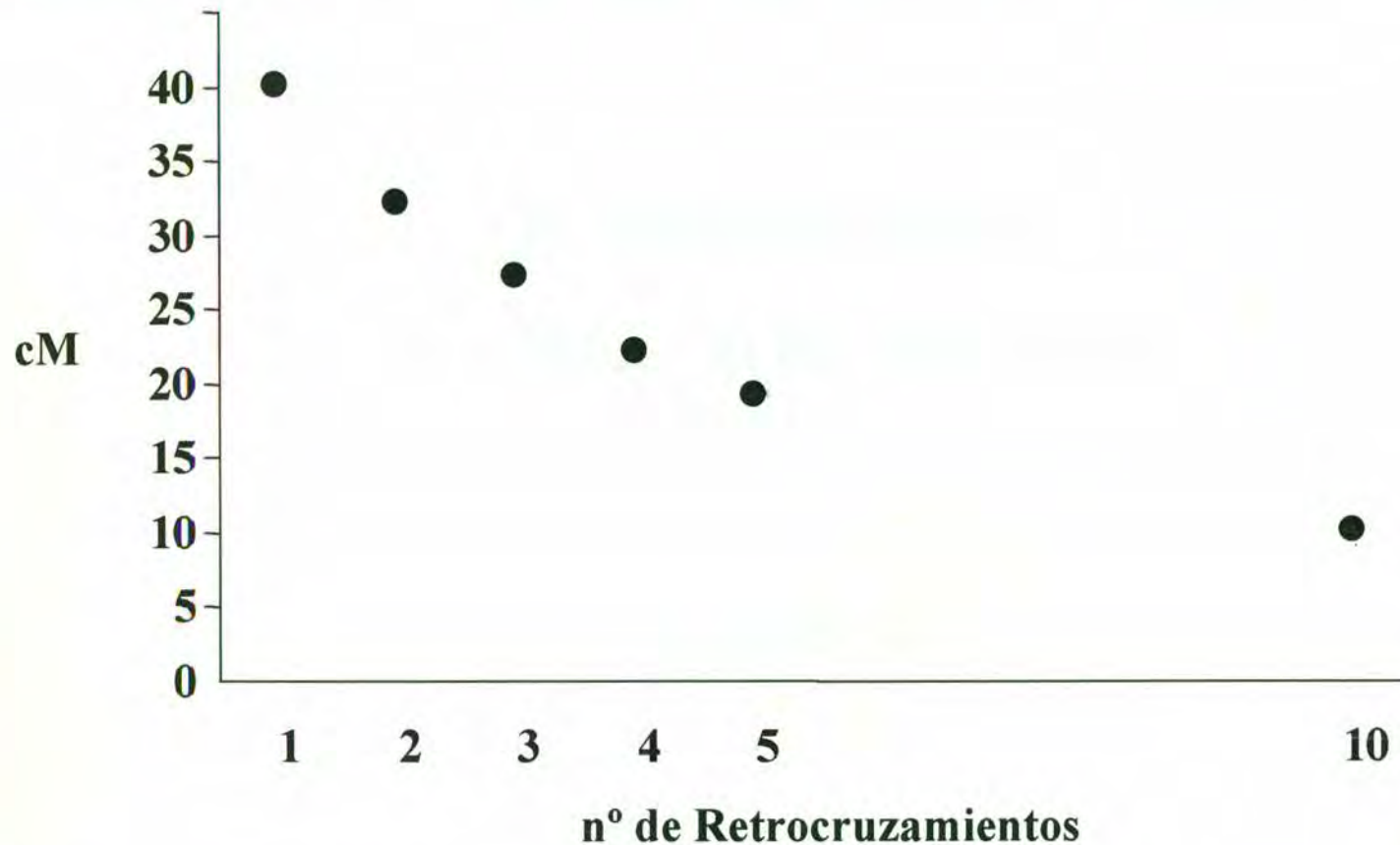
- Líneas casi isogénicas (NILs).
- Análisis de bloques segregantes (BSA).

Desarrollo de líneas casi isogénicas (NILs).

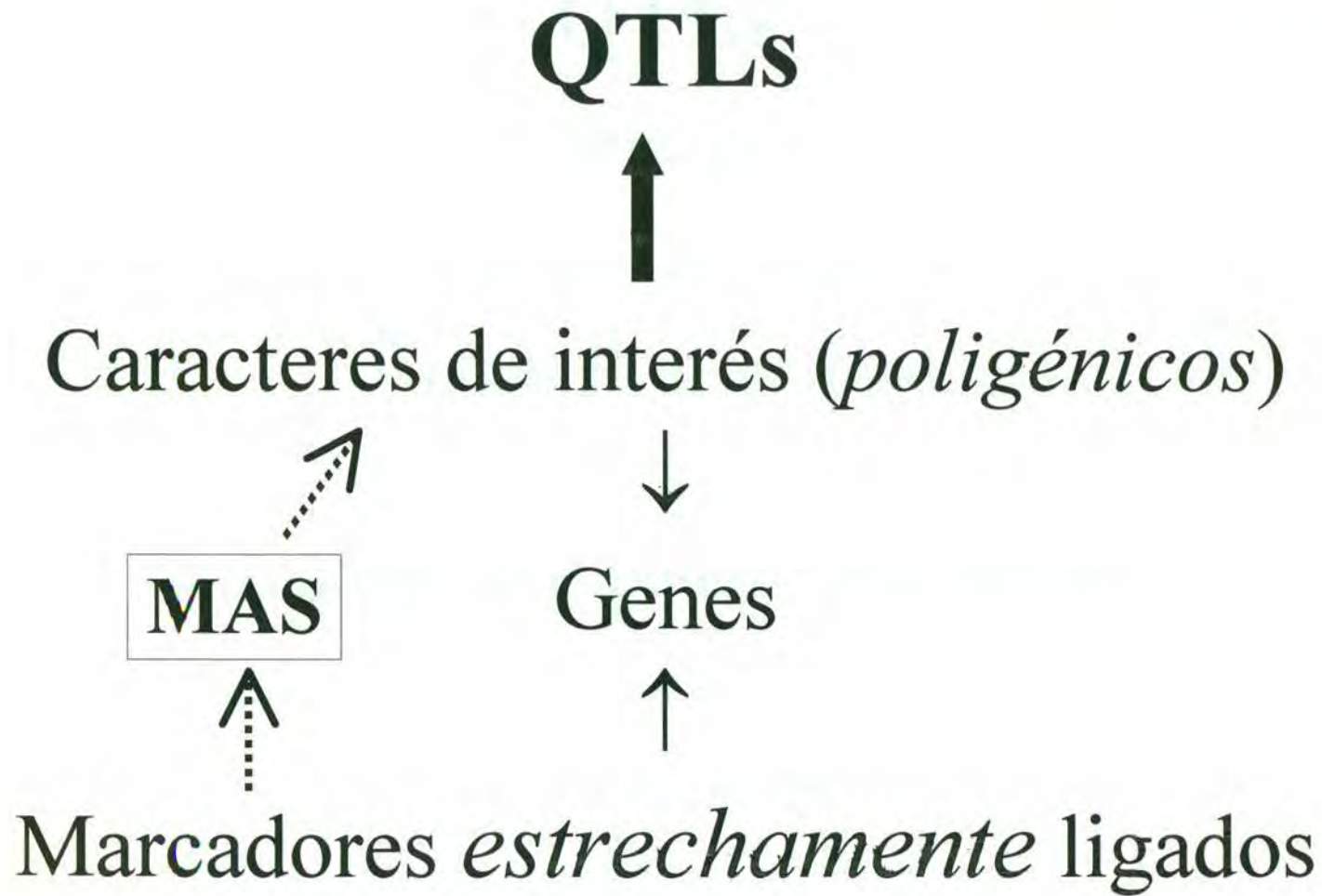
- Retrocruzamientos recurrentes



Desaparición de la cromatina “no deseada” en función del número de retrocruzamientos.



Hanson, 1959. Genetics 44: 833-7



QTLs

↑↑↑ generaciones.

↑↑↑ número de individuos.

↑↑↑ número de marcadores.



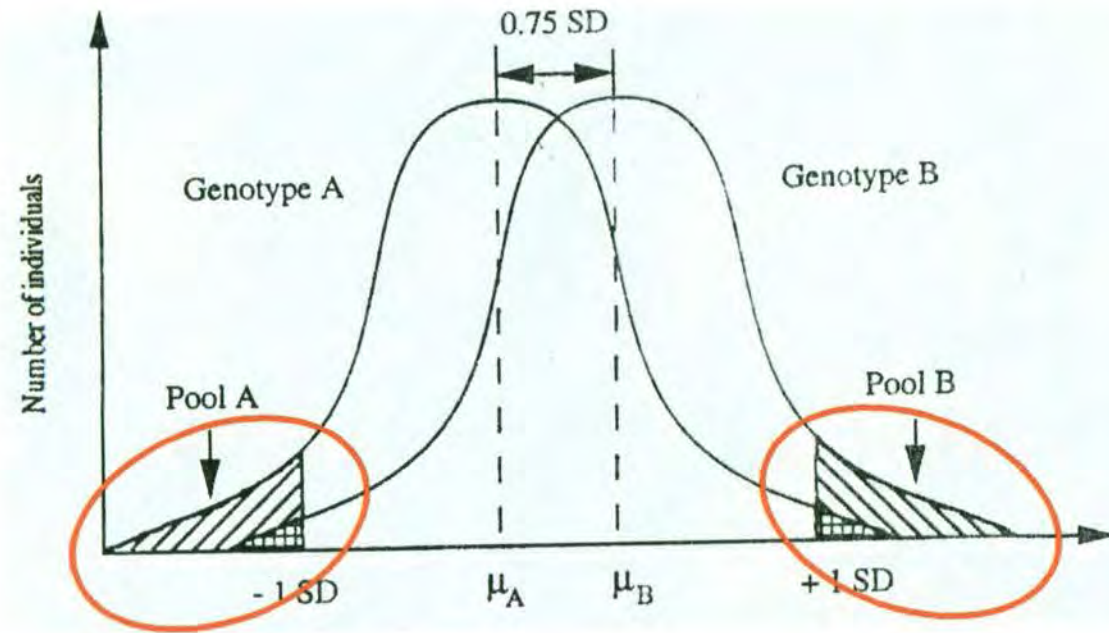
Análisis de Bloques Segregantes



↓↓↓ Tiempo

↓↓↓ Dinero

Análisis de bloques segregantes (BSA).



Diferentes combinaciones de *Genes* y *Ambientes* pueden ser responsables de los fenotipos “extremos”

Precauciones para hacer BSA con QTLs

- Poblaciones homocigóticas.
- Muchos individuos
- Hacer réplicas, si es posible.
- Emplear cruzamientos con variación extrema.
- Genotipado selectivo (si se está mejorando un solo carácter).

Ventajas de la Mejora Asistida por Marcadores Moleculares

- La selección por marcadores no está influenciada por el ambiente.
- Selección en estados tempranos (embrión, semilla, plántula).
- Selección en ambientes sin stress (invernaderos...).
- Los heterocigotos son detectables (marcadores codominantes) →

Ahorro de una generación por ciclo.

- Tamaños de población menores.

**USO DE MARCADORES
MOLECULARES PARA
CARACTERIZAÇÃO DOS RECURSOS
FITOGENÉTICOS**

Uso de marcadores moleculares para caracterización de germoplasma

Recursos fitogénéticos

- Son la suma de todas las combinaciones de genes producidas en el proceso de evolución de una especie.
- Comprenden desde especies silvestres de uso agrícola potencial hasta genes clonados (Hidalgo 1991).
- El término recursos genéticos implica que el material (germoplasma) tiene o puede tener valor económico o utilitario, actual o futuro, siendo de especial importancia aquel que contribuye a la seguridad alimentaria (IBPGR 1991).

Recursos genéticos en agricultura

Incluye material reproductivo o propagado vegetativamente de:

- Cultivares en uso actual y nuevas variedades
- Cultivares obsoletos
- Cultivares tradicionales y locales
- Parientes silvestres próximos a especies cultivadas
- Stocks genéticos especiales incluyendo líneas de mejoradores y líneas élite, aneuploides y mutantes

Recursos genéticos en silvicultura

Materiales heredables contenidos dentro y entre especies de árboles que tienen o pueden tener un valor económico, científico o social para las personas (FAO, 1993).

* La
gran
acerc

Conservación de recursos fitogenéticos : Objetivo

Preservar una muestra de la diversidad genética existente de la especie en cuestión tan amplia como sea científica y económicamente posible, incluyendo genes, caracteres y genotipos reconocidos en el presente.

- La efectividad en la consecución de este objetivo dependerá en gran medida de la cantidad de información genética disponible acerca de ese germoplasma.

Conservación de recursos fitogenéticos: Métodos

- *In situ* (en su hábitat natural, dinámica)
- *Ex situ* (fuera de hábitat natural, selectiva)
- Complementaria (*in situ* y *ex situ*)

Conservación *in situ*

Consiste en la conservación de genes o genotipos de plantas en su ambiente natural.

Objetivo: Permitir que la evolución continúe, incrementando la cantidad de diversidad que puede ser conservada y reforzando los vínculos entre los conservadores y las comunidades que tradicionalmente han mantenido y usado los recursos.

Conservación *in situ*: Puntos clave

- **Localización:** Identificación de poblaciones a conservar basada en la diversidad genética presente, el valor del recurso y su estado de peligro.
- **Gestión:** Asegurar el mantenimiento de la variabilidad intra- e inter-específica con el tiempo.
- **Accesibilidad:** Proporcionar información genética suficiente para usuarios potenciales.

Conservación *ex situ*

- **Objetivo:** mantener las accesiones sin cambios en su constitución genética, es decir, minimizar la posibilidad de mutación, selección, deriva genética y contaminación.
- **Alternativas:**
 - Bancos de semillas
 - Bancos de campo
 - Bancos *in vitro*
 - Criopreservación

Conservación *ex situ*: Puntos clave

- **Adquisición:** Planificación de estrategias de recolección e intercambio de material.
- **Mantenimiento:** Identificación de duplicados. Advertir cambios en la estructura genética.
- **Caracterización:** Estimación de la diversidad genética de la colección en comparación con la global de la especie.
- **Accesibilidad:** Proporcionar información genética suficiente para usuarios potenciales. Identificación rápida de caracteres valiosos.

Caracterización y evaluación de germoplasma

- *Sirve para determinar*
 - la variabilidad genética de la colección
 - la estructura genética de las muestras
 - las relaciones entre accesiones
- *y para identificar*
 - genes útiles que estimulen el uso del germoplasma
 - redundancia y duplicados para eliminarlos
 - ausencias para incorporarlas

Uso de marcadores moleculares para CRF *ex situ*

- Estudio del material presente en los Bancos de germoplasma:
 - ¿Qué material hay?
 - ¿Cuántas duplicaciones?
 - ¿Es necesario aportar nuevo material?
- Evaluación de métodos de recolección y propagación de material:
 - ¿Interesan más las poblaciones marginales o las mayoritarias?
 - ¿Contienen las primeras muchos alelos únicos?
 - ¿Está justificado el esfuerzo para identificarlas y recolectarlas?
 - ¿Cómo diseñar estrategias eficientes de muestreo?
 - ¿Cómo localizar zonas donde se debe conservar material?
 - ¿Cuál es la mejor manera de propagar especies?
 - ¿Pueden formularse criterios para construir las colecciones núcleo?

Los marcadores moleculares aportan medidas de:

- Identidad: Catalogación de las accesiones. Determinación de la existencia de erosión genética en una accesión o población.
- Similitud genética
- Estructura genética: Partición de la variación entre individuos, accesiones, poblaciones y especies.
- Detección: Presencia de un determinado alelo o secuencia de nucleótidos.

Los marcadores moleculares aportan medidas de:

- Identidad
- Similitud genética
- Estructura genética
- Presencia

Análisis de identidad

- Observar directamente de los resultados
- Obtener la matriz de resultados
- Catalogar de las accesiones
- Calcular de índices de variabilidad

Análisis de similitud genética

- Obtener la matriz de resultados
- Calcular los coeficientes de similitud
- Realizar el análisis de agrupamiento
- Realizar el análisis de ordenación

Análisis de la estructura genética

- Obtener la matriz de resultados
- Analizar de la variación entre individuos, accesiones, poblaciones y especies
- Analizar de la distancia genética entre poblaciones
- Analizar de diferenciación entre poblaciones

Uso de marcadores moleculares para CRF *in situ*

- ¿Qué diversidad genética hay?
- ¿Cómo se mantiene en el ecosistema?
- ¿Cómo funcionan los sistemas de control aplicados?
- ¿Qué genes pueden ser útiles?

Uso de marcadores moleculares para CRF *ex situ*

1/ Estudio del material presente en los
Bancos de germoplasma:

- ¿Qué material hay?
- ¿Cuántas duplicaciones?
- ¿Es necesario aportar nuevo material?
- ¿Qué genes pueden ser útiles?

Uso de marcadores moleculares para CRF *ex situ*

2/ Evaluación de métodos de recolección y propagación de material:

- ¿Interesan más las poblaciones marginales o las mayoritarias?
- ¿Contienen las primeras muchos alelos únicos?
- ¿Está justificado el esfuerzo para identificarlas y recolectarlas?
- ¿Cómo diseñar estrategias eficientes de muestreo?
- ¿Cómo localizar zonas donde se debe conservar material?
- ¿Cuál es la mejor manera de propagar especies?
- ¿Pueden formularse criterios para construir las colecciones núcleo?

Técnicas Baseadas na Amplificação de Fragmentos de DNA Conhecidos.

Técnicas basadas en la amplificación de fragmentos de ADN conocidos

STS: Sequence-Tagged Sites

- ISSR: Inter-Simple Sequence Repeat
- SCAR: Sequence Characterised Amplified Region
- CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
- STMS: Sequence-Tagged Microsatellite Sites

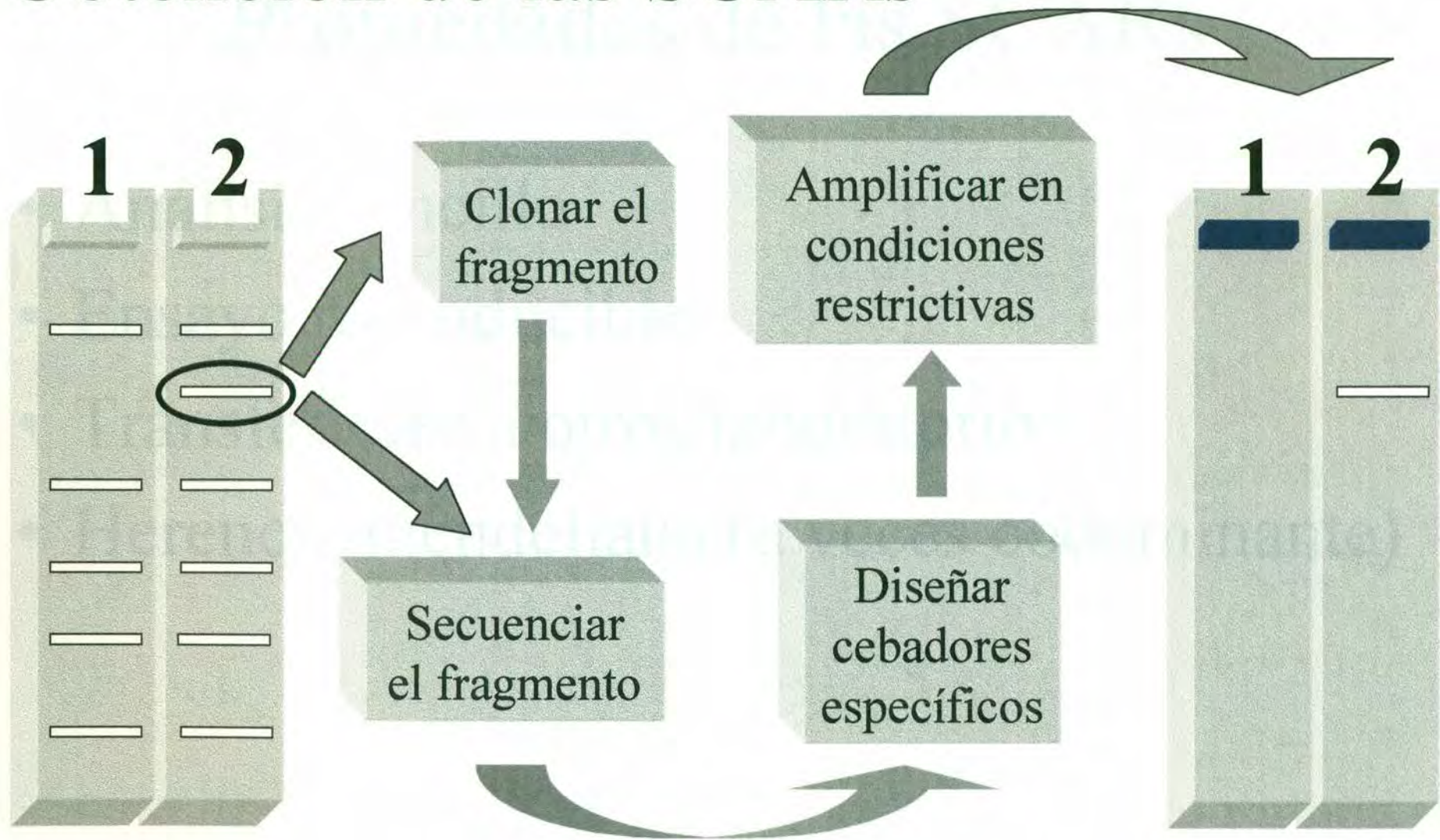


SCARs

Sequence Characterized
Amplified Regions



Obtención de las SCARs



Propiedades de las SCARs

- Análisis sencillo
- Ensayo reproducible
- Transferibles a otros laboratorios
- Herencia mendeliana (a veces codominante)

Microsatélites

Repeticiones en tándem de secuencias cortas de ADN, de 1 a 10 pares de bases de longitud, para formar secuencias de menos de 150 pb.

Ejemplos: $(GA)_{14}$, $(GAT)_{10}$, $(CATC)_8$

...GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA...

...GATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT...

...CATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATC...

Sinónimos: SSRs, STRs

STMSS

Sequence-Tagged
Microsatellite Sites

105 pb

Obtención de las secuencias flanqueantes

¿Existen secuencias útiles en los bancos de secuencias?

↓ NO

Utilizar microsatélites como sondas
para aislar clones en una genoteca



Secuenciar los
clones positivos



Diseñar cebadores
específicos

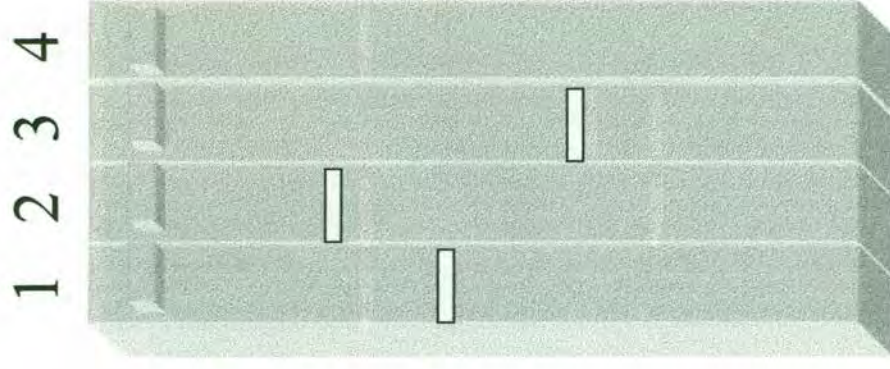
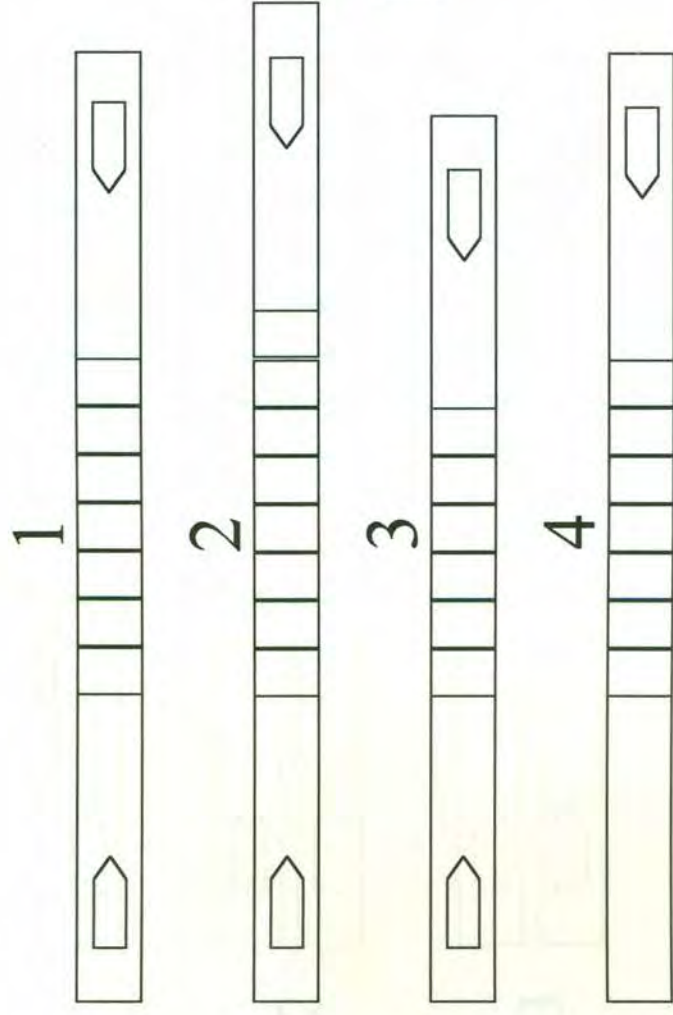
SÍ ↓

Identificar secuencias
que contengan
microsatélites

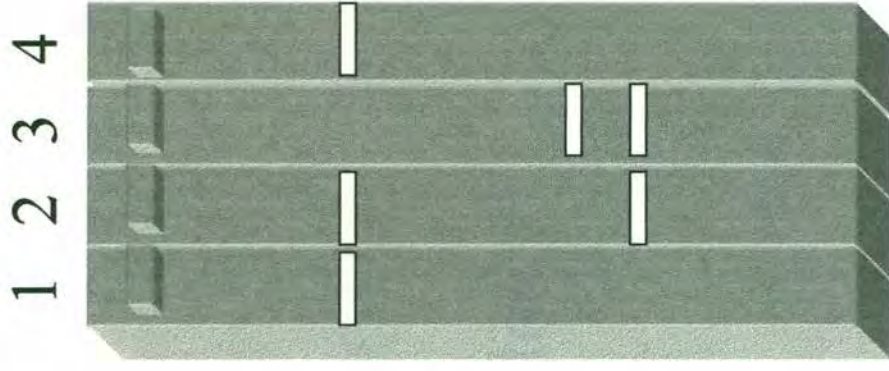


PCR

Origen del polimorfismo de los STMSs



Los STMs son marcadores codominantes



Procedimiento básico para los STMSs

- Obtener el material vegetal
- Extraer el ADN
- PCR + Electroforesis
- Determinar el tamaño molecular de los fragmentos
- Interpretar los resultados

Mezcla de reacción para STMSs

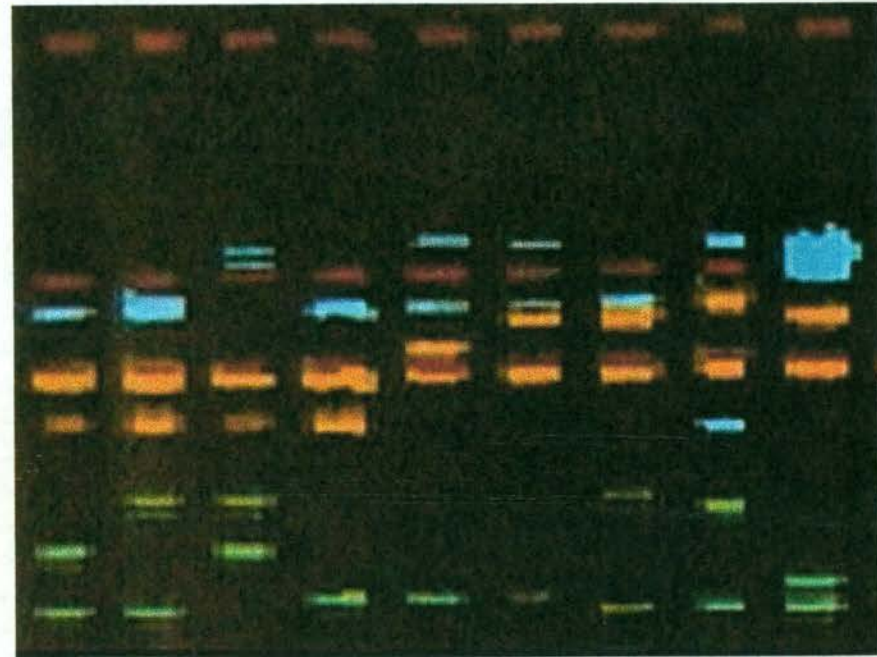
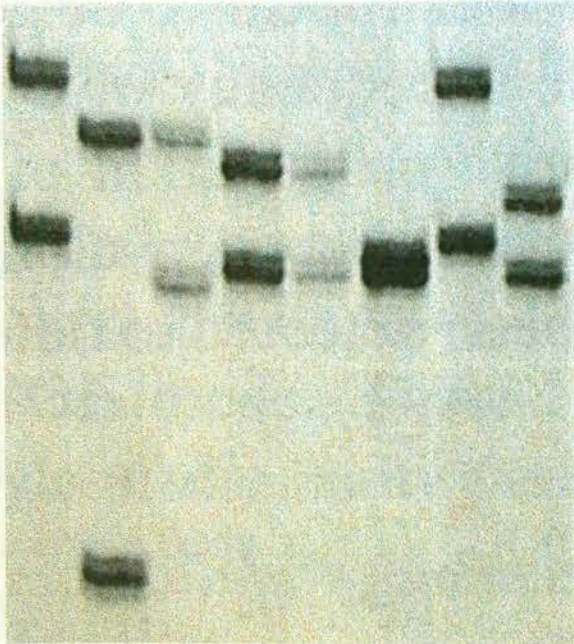
Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 8,3	10 mM
KCl	50 mM
Cl ₂ Mg	1-4 mM
dNTPs	4 x 200 µM
Cebador	0.2-1 µM
ADN Polimerasa	0.05 U/µL
ADN	~1 ng/µL

Programa de PCR para STMSs

• 1 ciclo		Desnaturalización
94°C	5 min	inicial
• 25-45 ciclos		Amplificación
94°C	30 seg	Desnaturalización
50-60°C	1 min	Unión cebadores
72°C	1 min	Polimerización
• 1 ciclo		Polimerización final
72°C	10 min	

Métodos de separación/detección

- PAA/ radiactividad
- PAA/ fluorescencia



Genotipos de 10 variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) en 6 loci STMS

	VVS5		VVS29		VVMD7		VVS2		VVS1		VVMD5	
Delight	100	150	170	170	238	248	135	145	181	188	232	234
Loose Perlette	118	150	170	178	246	252	133	145	181	188	232	234
Chasselas apyrene	110		178	180	238	246	133	143	183	190	226	234
Corinto blanco	118	150	170	170	236	238	133	145	181	181	234	238
Graziella I	110	118	170	178	248	248	145	149	180	190	232	234
Sultanina	100	118	170	178	238	252	145	151	181	188	232	232
Pirovano 166A	118		170	170	248	252	133	141	181	188	230	232
Sultana moscata	118		170	178	238	248	149	151	181	188	226	232
Graziella II	110	118	170	178	248	248	145	149	180	190	232	234
Basile Logothetis	100		170	178	248	252	145	149	181	181	226	232

Ventajas de los STMSs

- ✧ Polimorfismo muy elevado
- ✧ Número enorme de loci
- ✧ Herencia mendeliana codominante
- ✧ Interpretación sencilla de los resultados
- ✧ Reproducibilidad muy alta
- ✧ Resultados transferibles entre laboratorios
- ✧ Posible automatización

Desventajas de los STMSs

- ✧ Requiere conocimiento previo del genoma:
 - ✧ Inicialmente lentos
 - ✧ Inicialmente costosos
- ✧ Coste medio*

Aplicaciones de los STMSs

- ◆ Identificación de individuos/cultivares
- ◆ Determinación de pureza híbrida
- ◆ Reconstrucción de genealogías
- ◆ Construcción de mapas genéticos
- ◆ Estudios de diversidad genética
- ◆ Estudios evolutivos

Ejemplo de determinación de la probabilidad de identidad con una variedad dada

Sultanina

STMS	VVS1	VVS2	VVS5	VVS29	VVMD5	VVMD7
Genotipo	181/188	145/151	100/118	170/178	232/232	238/252
Frecuencia	0,24	0,04	0,04	0,59	0,09	0,04

Sultanina

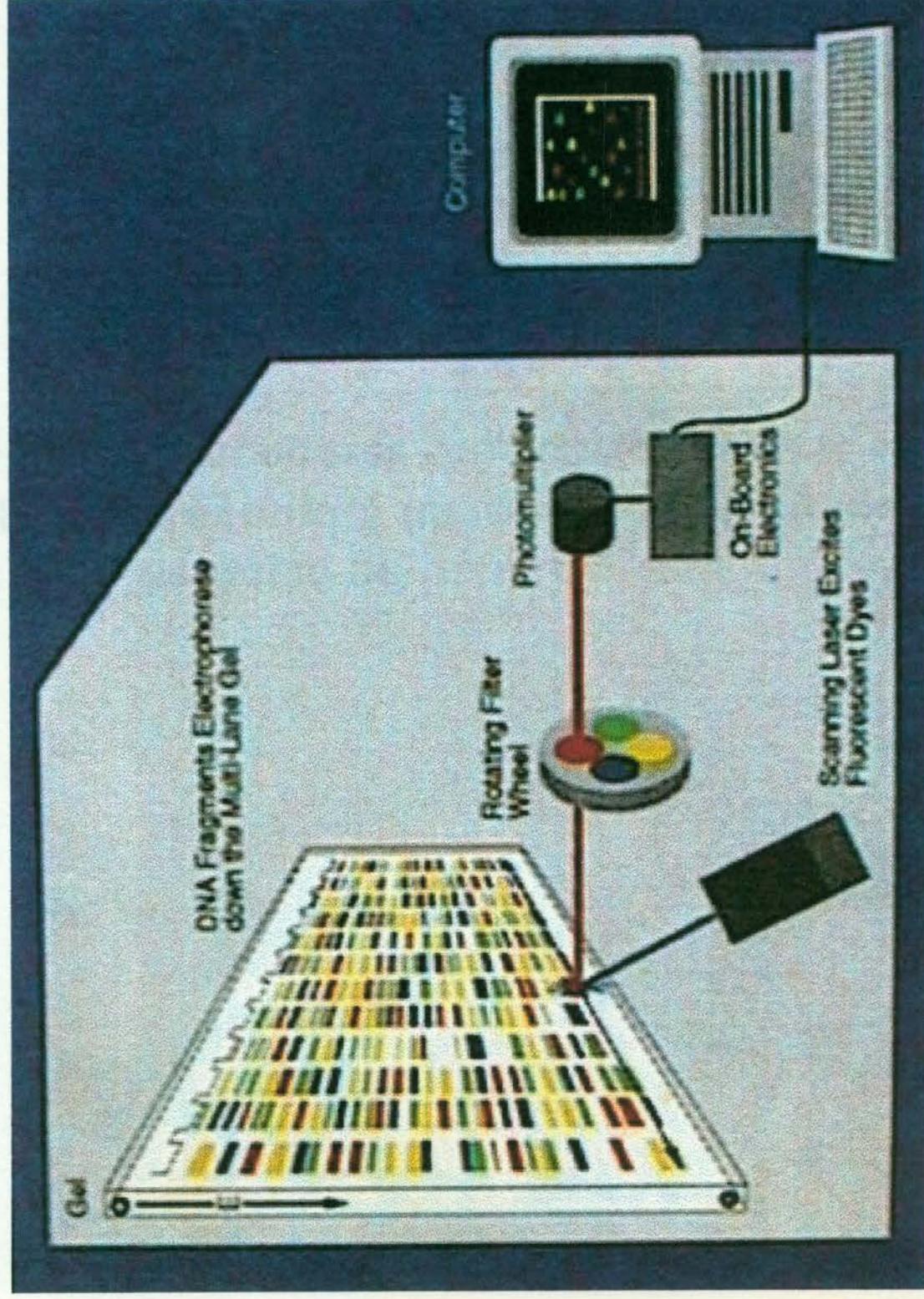
STMS	VVS1		VVS2		VVS5		VVS29		VVMD5	VVMD7	
Alelos	181	188	145	151	100	118	170	178	232	238	252
Frecuencia	0,71	0,14	0,15	0,24	0,12	0,29	0,54	0,39	0,37	0,29	0,13
Probabilidad	2x0,71x0,14		2x0,15x0,24		2x0,12x0,29		2x0,54x0,39		0,37x0,37	2x0,29x0,13	

Probabilidad de identidad con Sultanina = $4,3 \cdot 10^{-6}$
1 en 230.876

Premisas necesarias para usar la regla del producto de frecuencias génicas

- Panmixia
- Loci selectivamente neutros
- Ausencia de alelos nulos
- Loci independientes

Análisis de fluorescencia



Uso de marcadores moleculares (RFLP e AFLP) no estudo e gestão da diversidade genética do gênero *Elaeis*

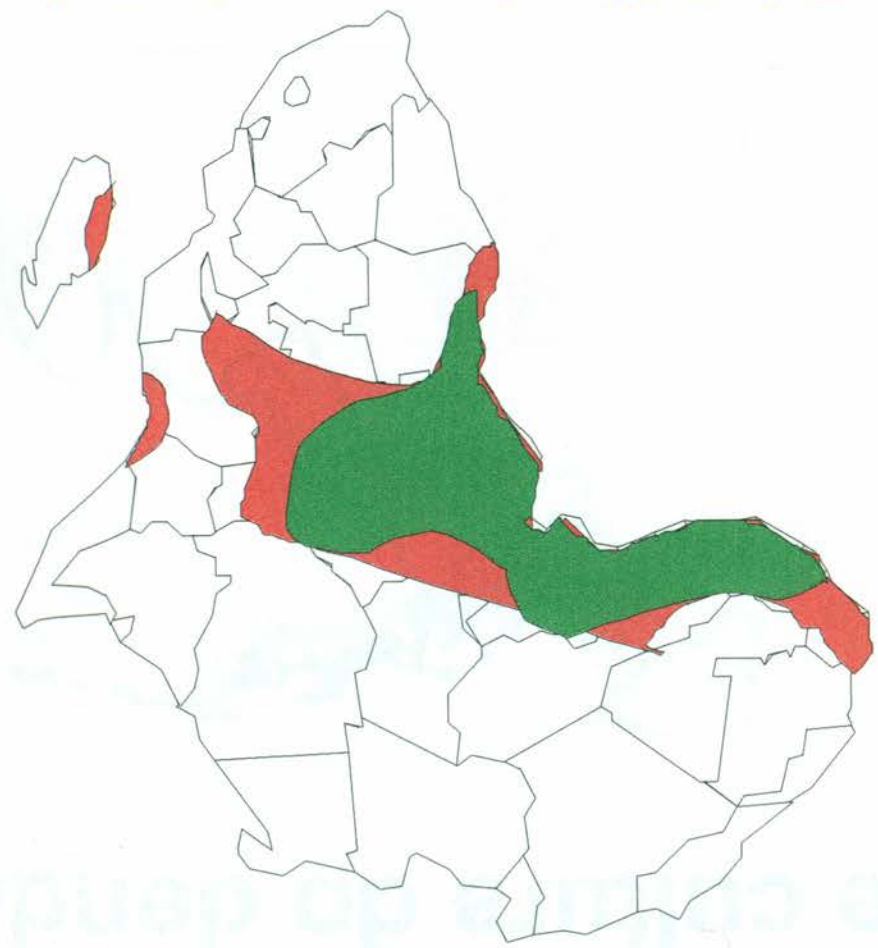
(*E. oleifera* (Kunth) Cortés Guineensis Jacq.)

**Uso de marcadores
moléculares (RFLP e AFLP) no
estudo e gestão da diversidade
genética do gênero *Elaeis*
(*E. oleifera* (Kunth) Cortés e *E. guineensis* Jacq.)**

Taxonomia do gênero *Elaeis*

- ***Arecaceae (Palmae),
Cocoeae (Coccoineae),
Elaeidinae***
- **Monocotiledonea**
- **Perene**
- **Monoica, Alógama**
- **Duas espécies sobre dois continentes**

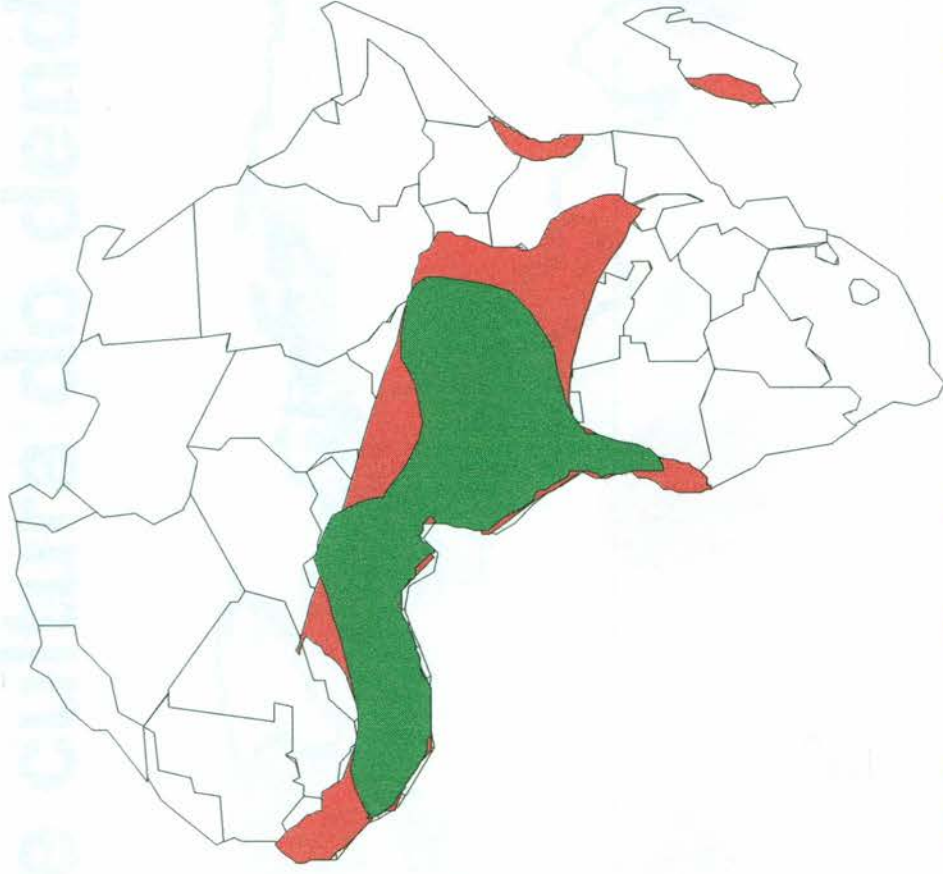
Origem do *E. guineensis*



● Distribuição natural
(Haddon, 1976)

● Distribuição subspontânea
(Zeven, 1967)

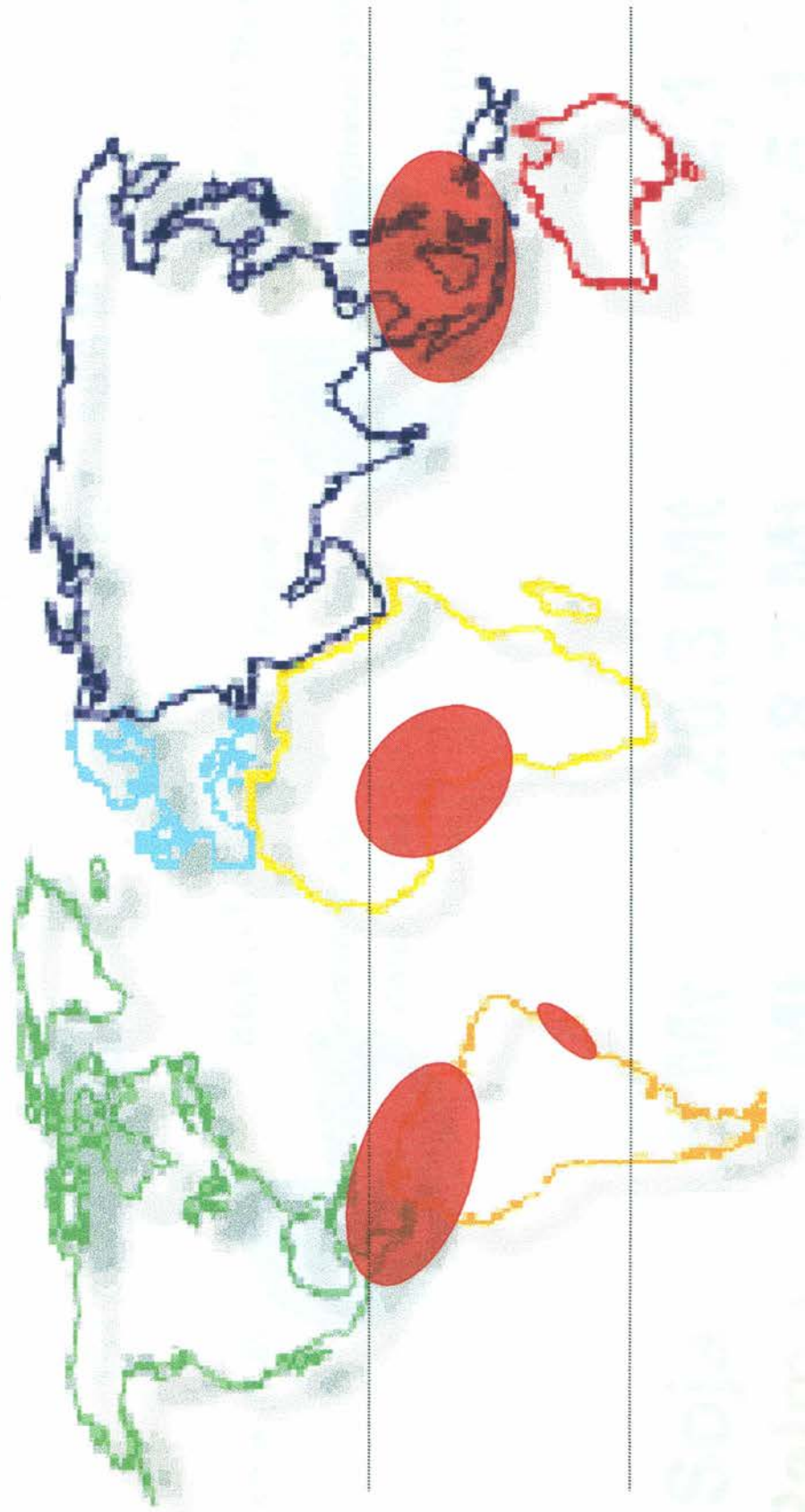
Origem do *E. guineensis*



● Distribuição natural
(Hardon, 1976)

● Distribuição subespontânea
(Zeven, 1967)

Area de cultura do dendezeiro

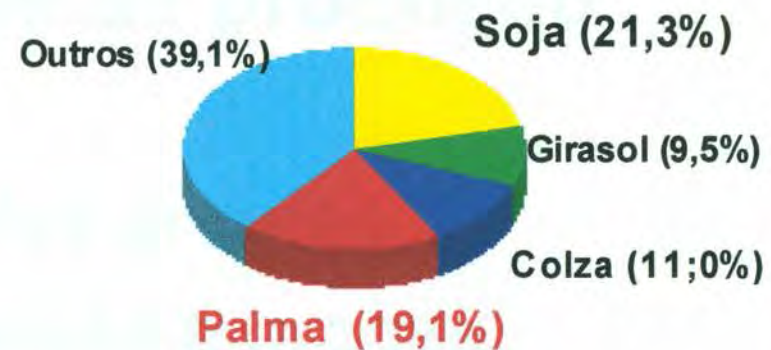


Produção mundial de óleos e corpos graxos

1977 - 44,8 M ton



1997 - 95,6 M ton



Soja	: 9,5 Mt	→	20,3 Mt	→	x 2,1
Palma	: 3,6 Mt	→	18,2 Mt	→	x 5,1

Objetivos do melhoramento genético do dendezeiro

- **Redução dos custos de produção**
 - **Rendimento**
 - **Redução do porte das árvores**
 - **Resistência às doenças e pragas**
- **Qualidade do óleo**

Origem do *E. oleifera*



 Distribuição natural
(Henderson, 1995)

O dendezeiro americano

Elaeis oleifera

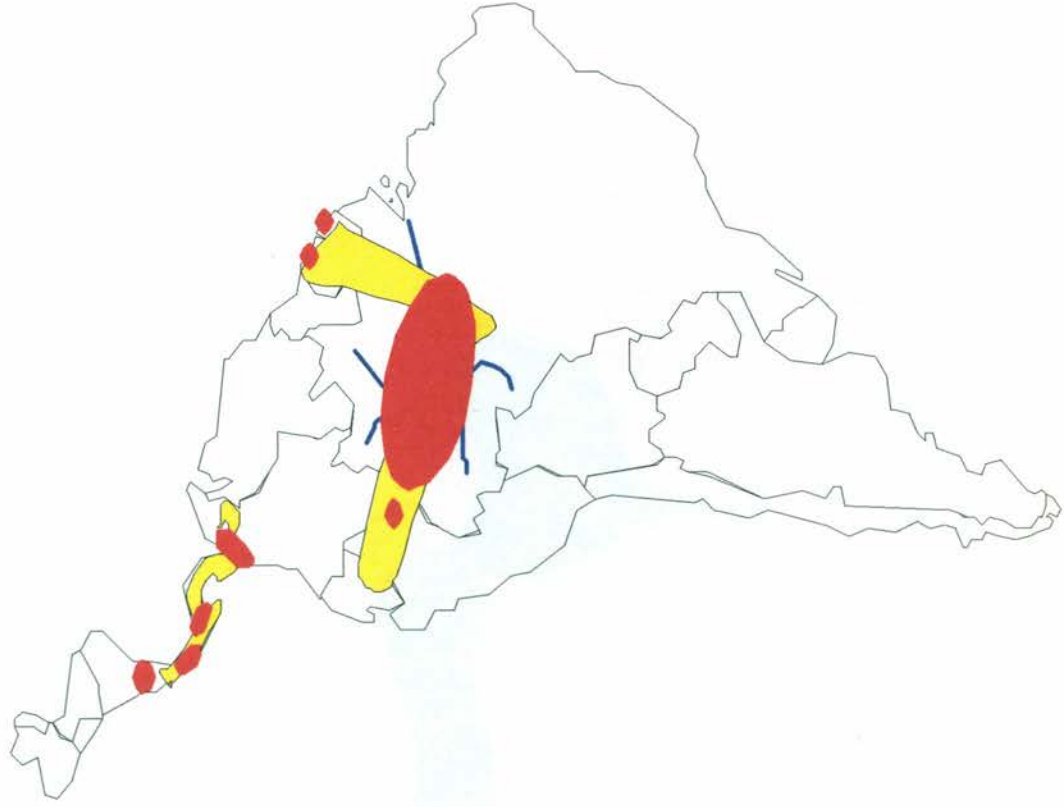
- **Qualidade do óleo**
- **Crescimento em altura**
- **Resistência à doenças e pragas**

Objetivos do estudo

- **Diversidade genética e sua estruturação no *E. oleifera***
 - **Utilização**
 - **Gestão**
 - **Novas prospecções**
- **Relação entre as duas espécies**
 - **Problema dos híbridos**

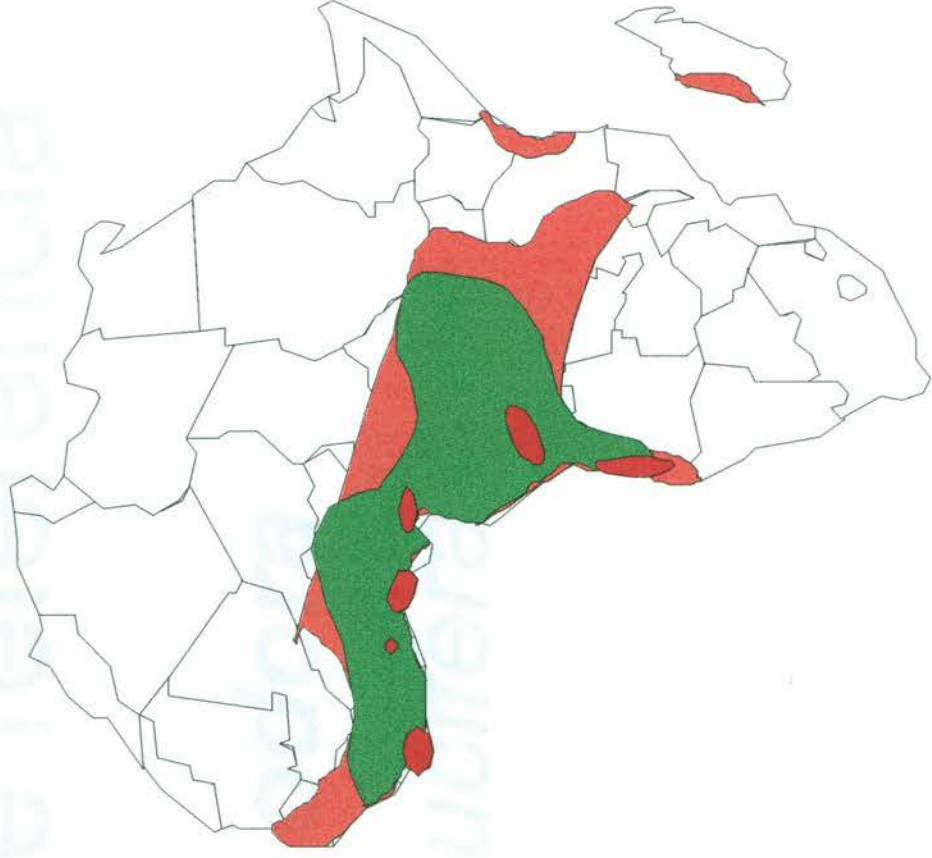
Origem do material vegetal de *E. oleifera*

Origem	População	Individuo
Brasil	59	177
Colombia	5	16
Costa Rica	3	9
Nicarágua	1	4
Panama	8	14
Guiana	2	10
Peru	1	5
Suriname	2	6
Total	81	241



Origem do material vegetal de *E. guineensis*

Origem	População	Indivíduo
Costa do Marfim	2	6
Bénin	1	1
Nigéria	5	6
Camargos	3	3
Congo/Zaire	2	8
Angola	2	5
Indonésia/Deli	4	5
Brasil/Bahia	4	4
Total	23	38



Espécies de referência

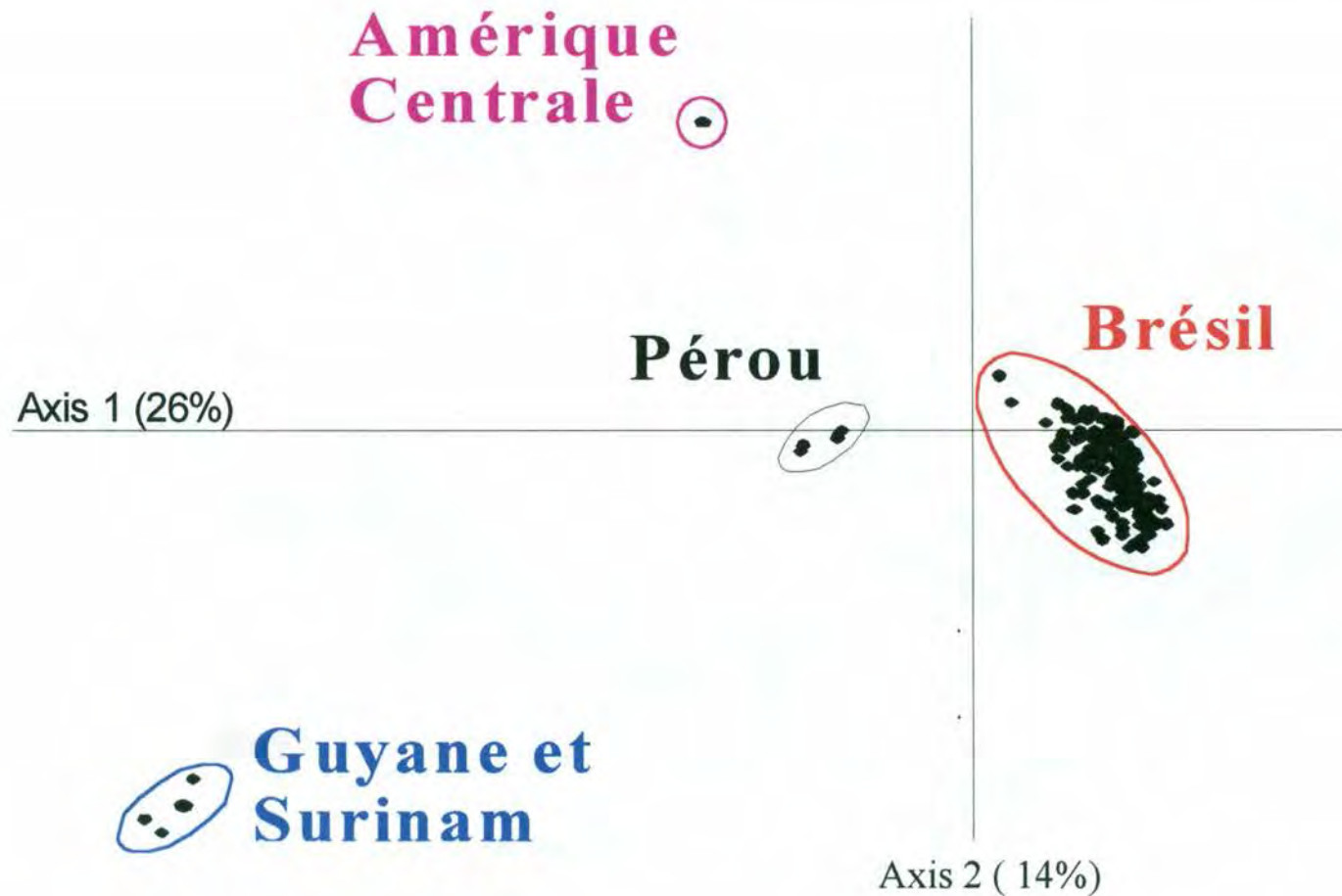
- *Barcella odora*
- *Cocos nucifera*

- Marcadores RFLP
 - Nuclear
 - 37 sondas ADNc, 1 ADNr
 - Cytoplasmatico
 - 4 sondas mitocondriais
 - 2 sondas cloroplasticas
- Marcadores AFLP
 - 3 primers/Enzimas
- Quantidade de ADN

Diversidade do *E. oleifera* sobre 19 locus RFLP

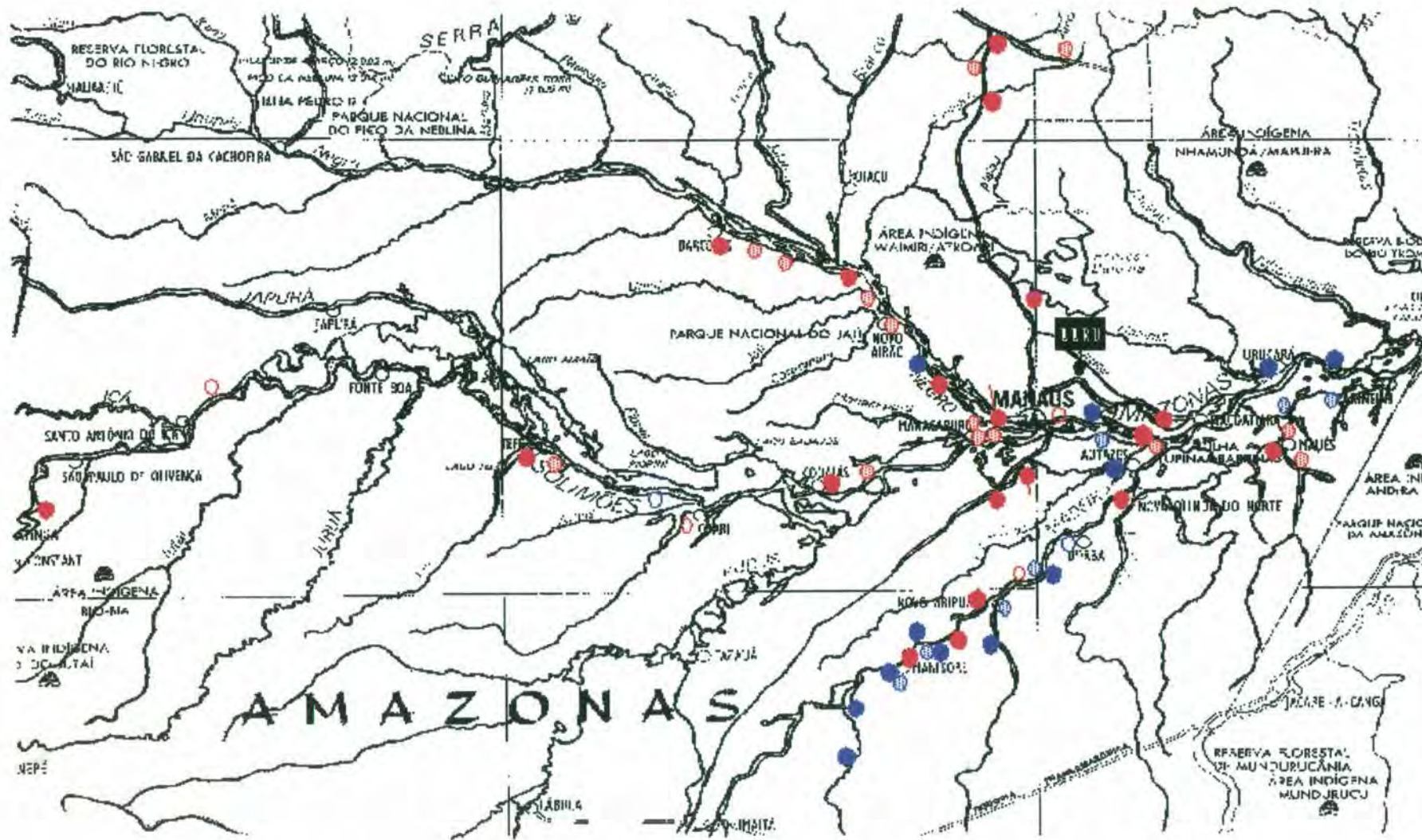
Nível	Popu- lação	Indi- viduo	Na	He	Fst
Espéce	36	241	59	0,404	74 %
Brasil	32	177	46	0,245	35 %
Peru	1	5	21	0,029	
Suriname	2	6	20	0,026	
Guiane	2	10	19	0,000	
América Central	17	43	19	0,000	

E. oleifera

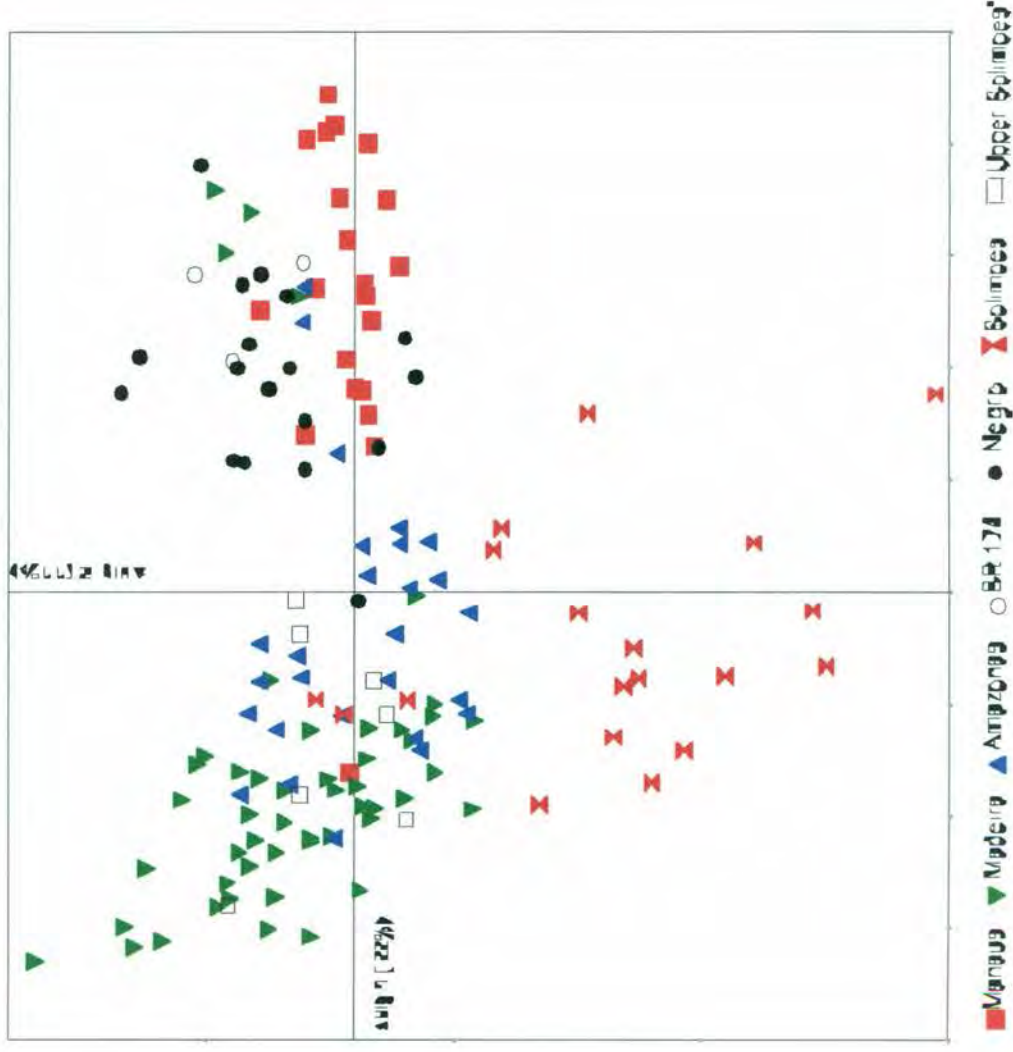


AFC sobre 59 alelos em 19 locus, 241 indivíduos.

Localização das populações brasileiras de *E. oleifera*

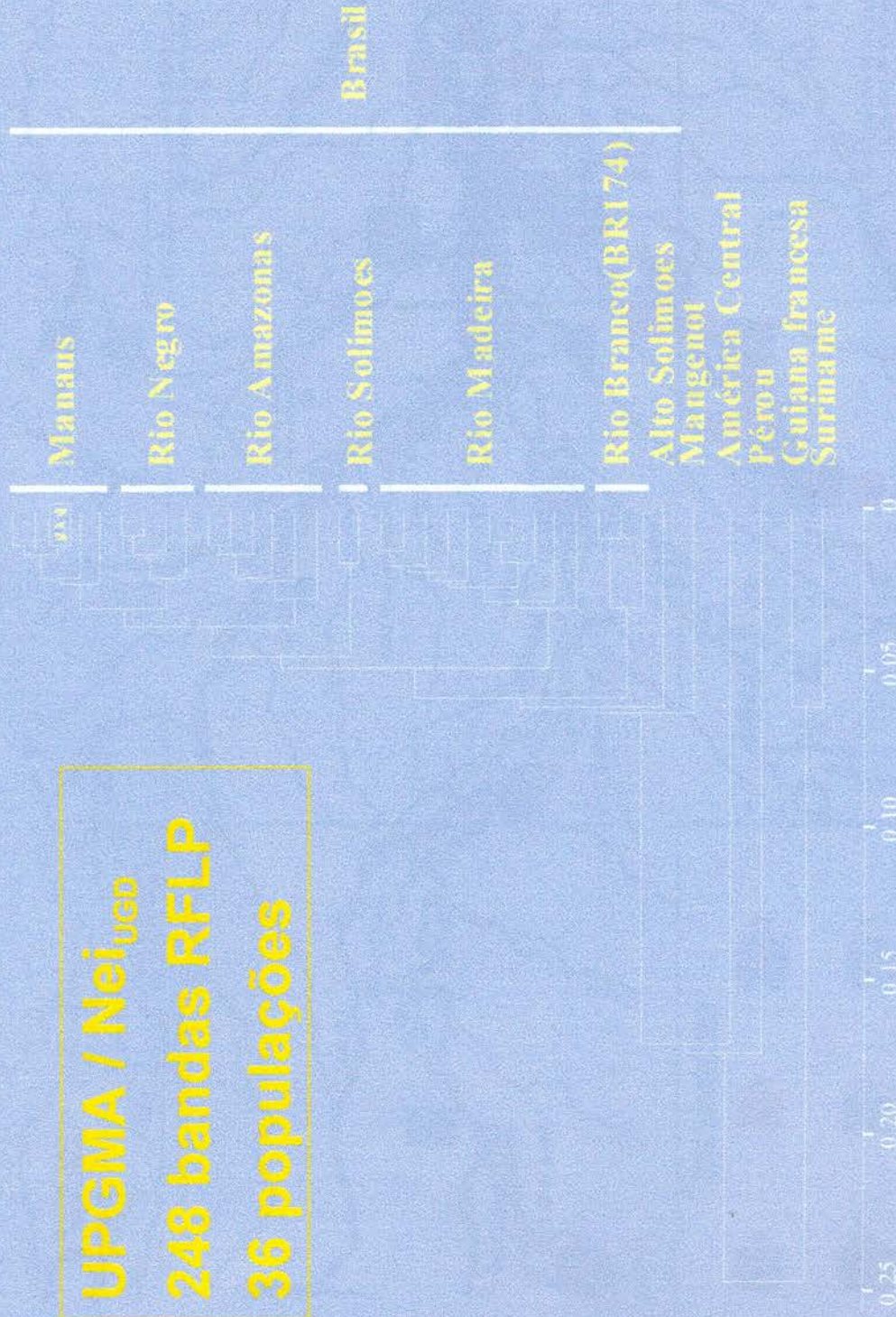


Organização da diversidade no *E. oleifera* do Brasil

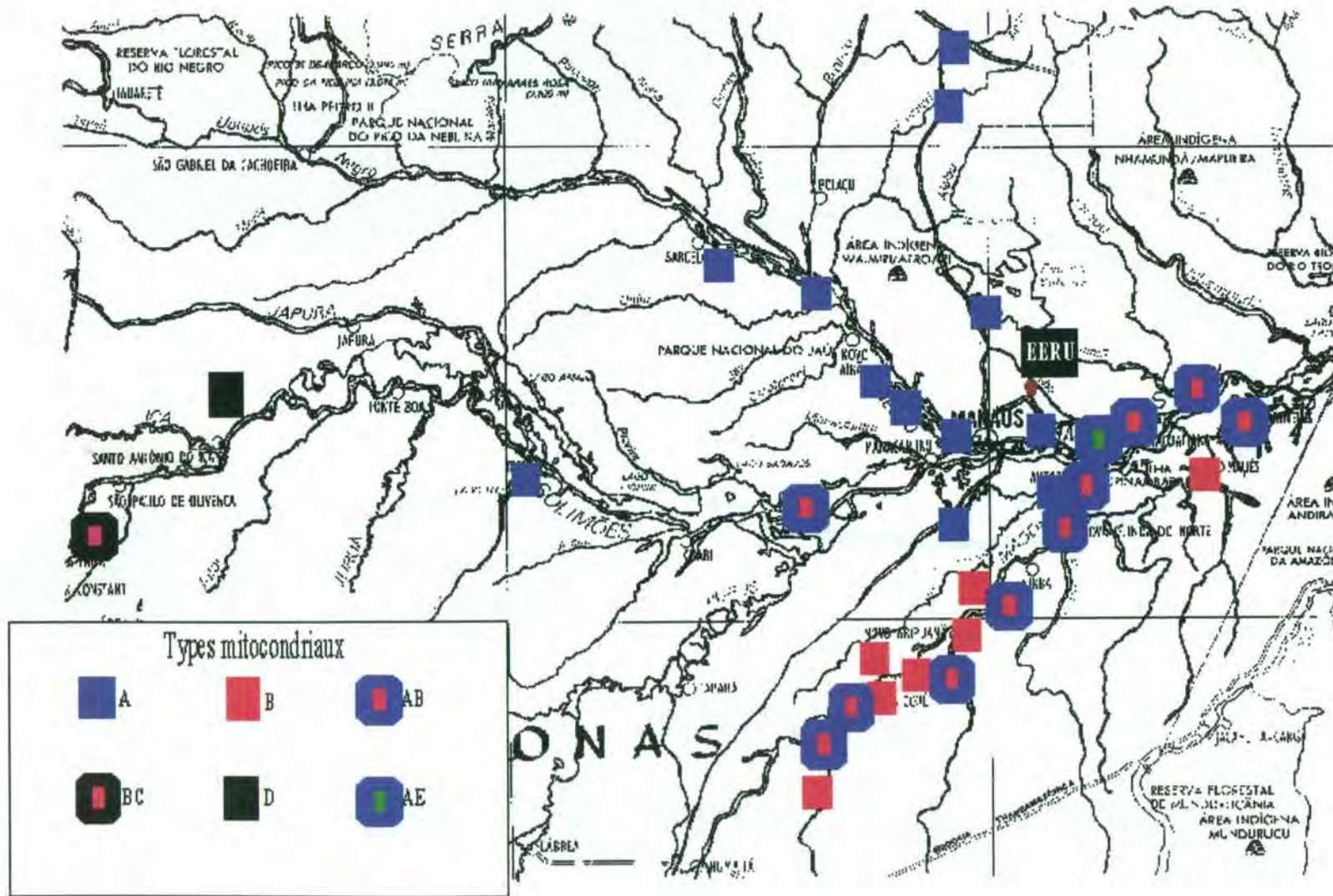


Organização da diversidade no *E. oleifera*

UPGMA / Nei_{UGD}
248 bandas RFLP
36 populações

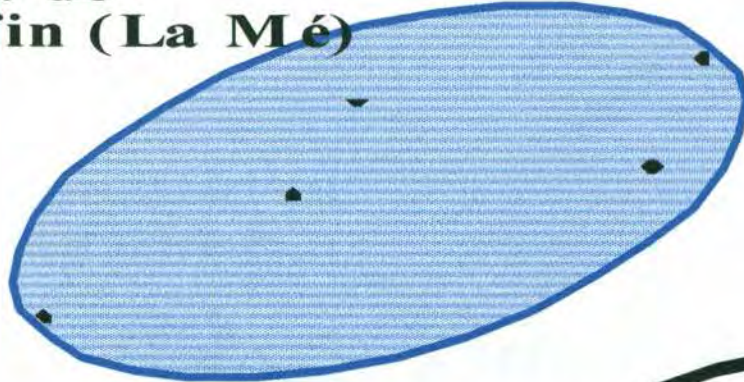


Distribuição dos tipos mitocondriais

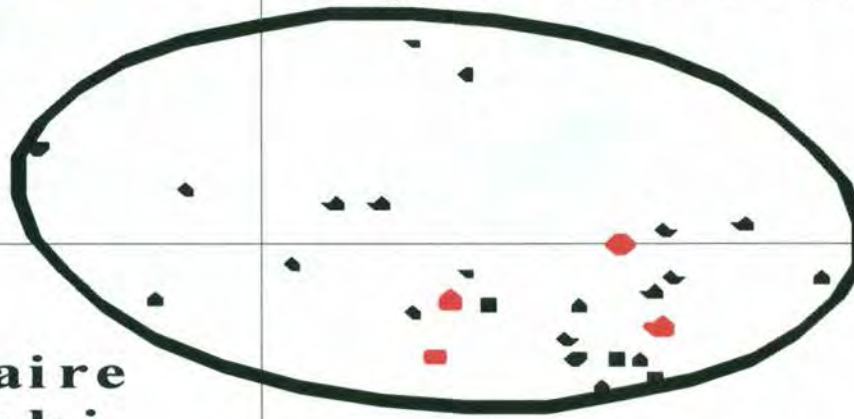


E. guineensis

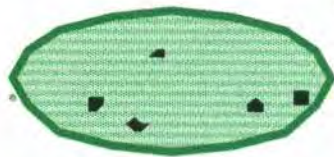
**Costa do
Marfin (La Mé)**



**Deli e outras
origens africanas**



Axe 1 (14%)



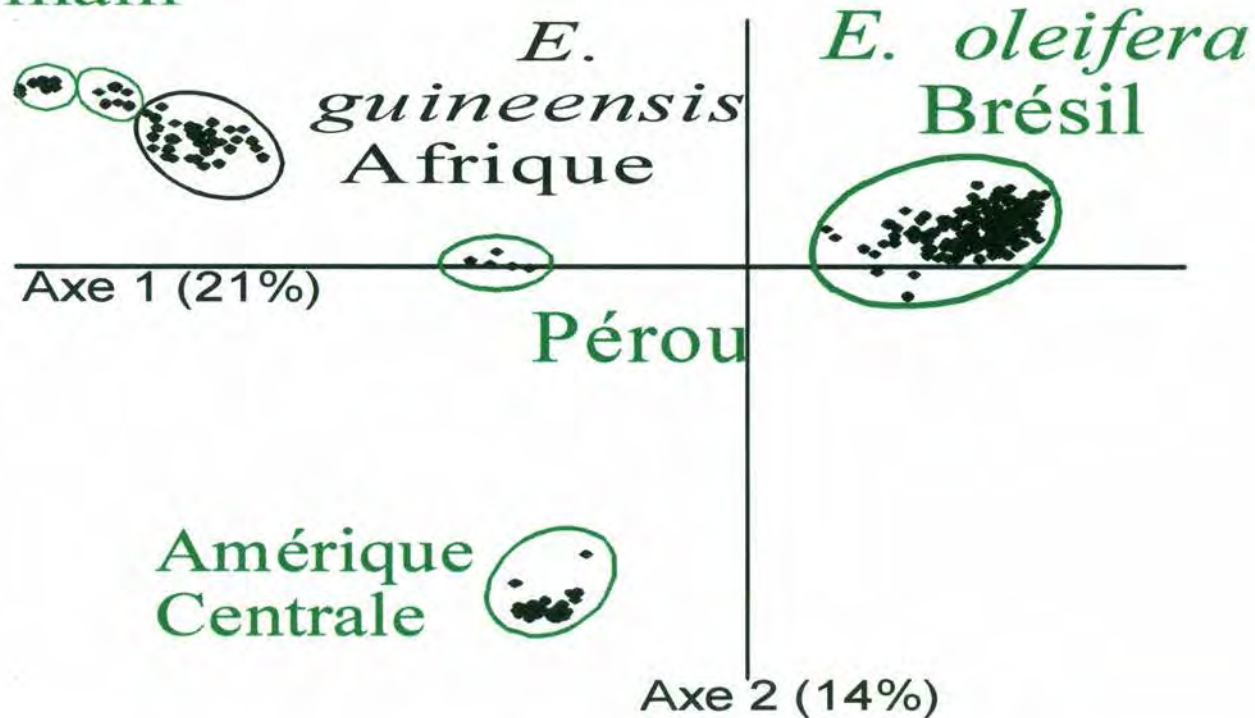
**Congo/Zaire
(Yangambi
Sibiti)**

Axe 2 (10%)

AFC sobre 170 bandas, 37 sondas
RFLP em 38 individuos

Elaeis spp

Guyane et
Surinam



AFC sobre 298 bandas
241 *E. oleifera* e 38 *E. guineensis*

Diversidade no gênero *Elaeis* em 19 locus RFLP

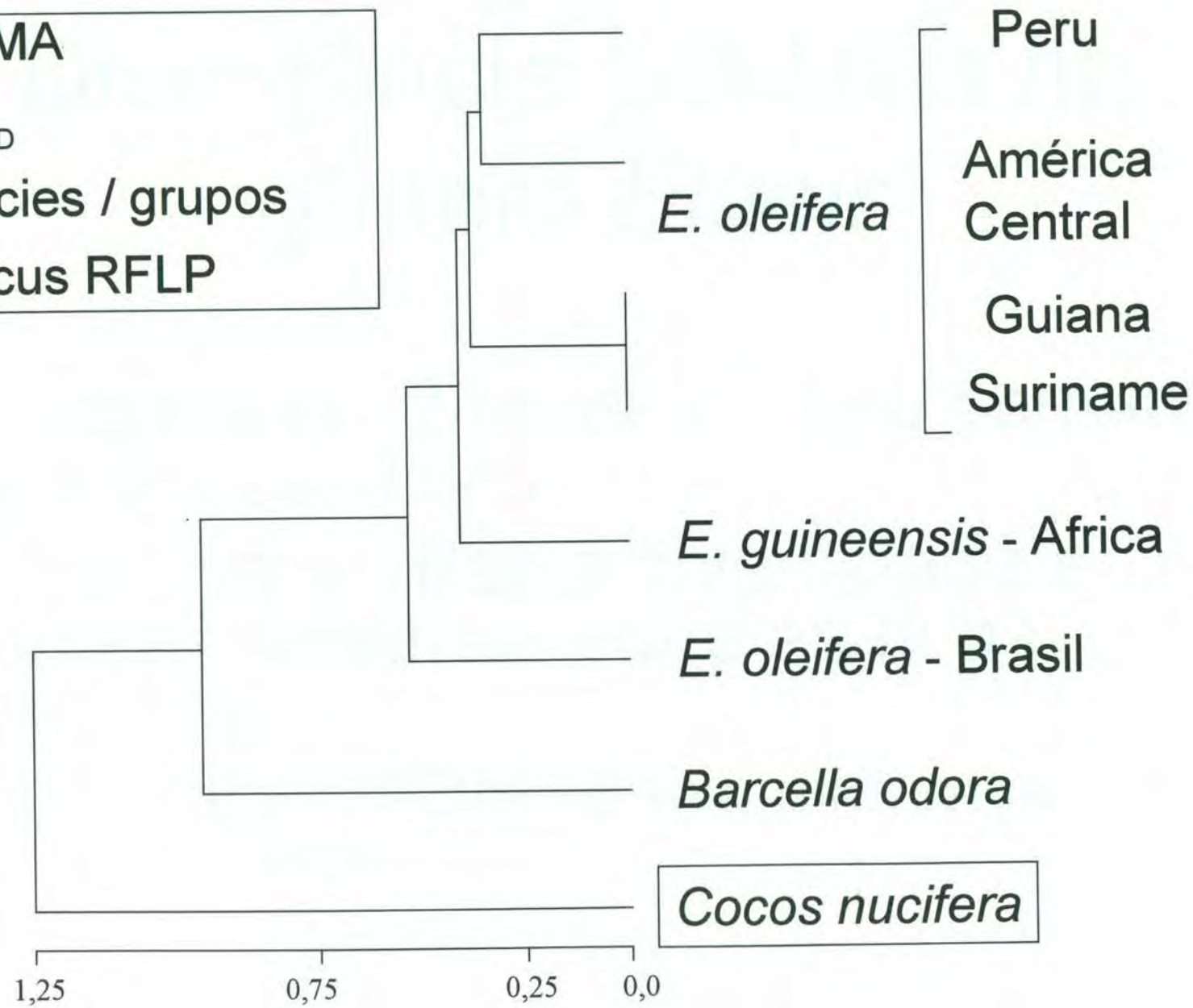
Nível	Popu- lação	Indi- viduo	Na	He
<i>E. guineensis</i>	23	38	49	0,289
<i>E. oleifera</i>	36	241	59	0,404
<i>E. oleifera</i> Brasil	32	177	46	0,245

UPGMA

Nei_{UGD}

Espécies / grupos

19 locus RFLP



Divergência genética no gênero *Elaeis*

- Cloroplasto - 2 tipos, um tipo comum às duas espécies
- Mitochondria - Baixa diversidade e baixa divergencia entre as duas espécies
- Quantidade d'ADN - Baixa diferença intra e inter espécie

E. oleifera

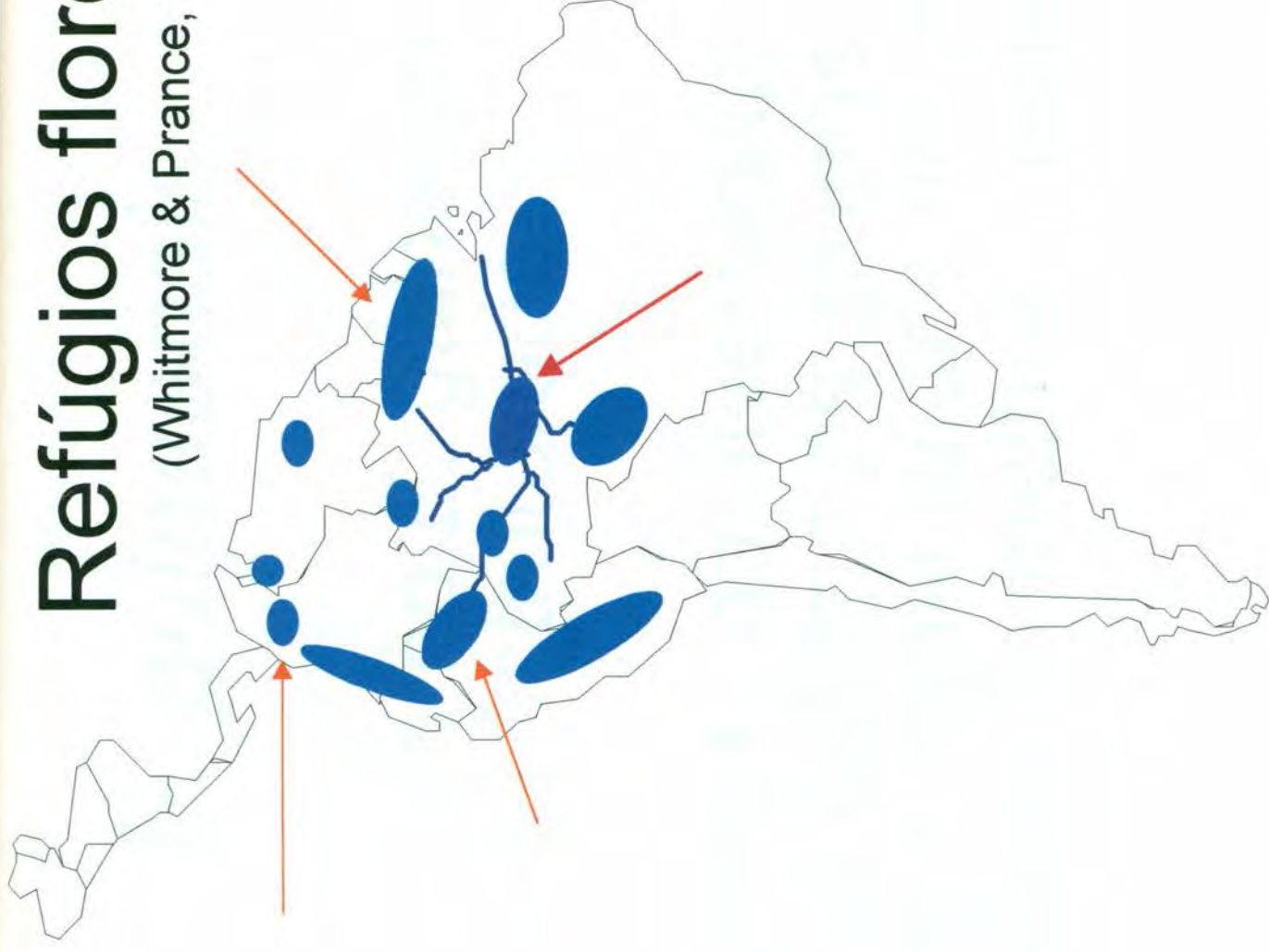
- Diversidade genética
 - estruturada segundo as origens geográficas
 - origem brasileira estruturada segundo a rede fluvial
 - mais importante na região da alta amazônia

Diversidade genética no *E. oleifera*

- Forte redução do efetivo
- Isolamento genético entre as origens
- Dériva genética

Refúgios florestais

(Whitmore & Prance, 1987)



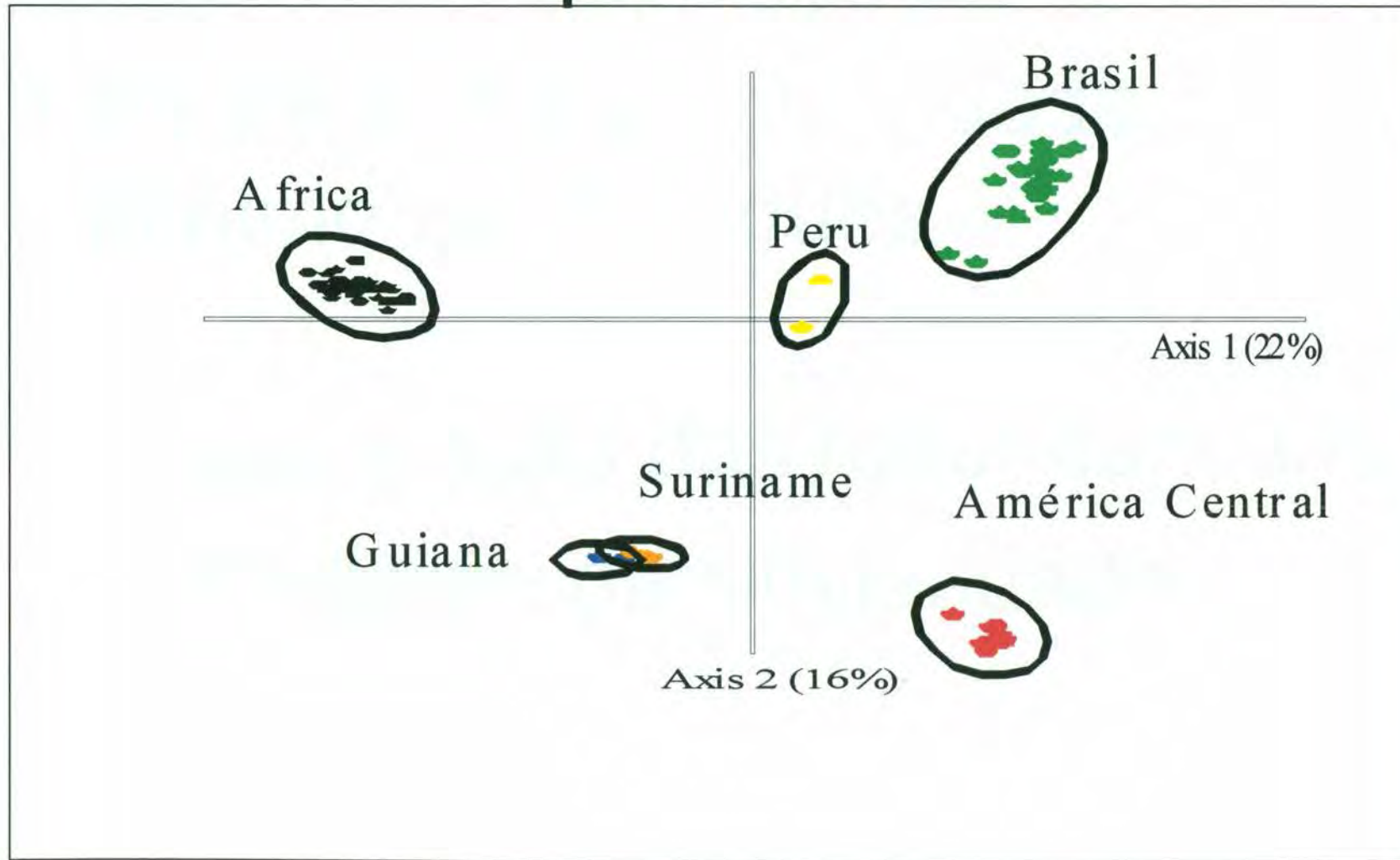
E. guineensis

- Diversidade no *E. guineensis* levemente estruturada
- Estruturação da diversidade genética confirma os grupos genéticos constituídos pelos programas de melhoramento

Gênero *Elaeis*

- Diversidade genética importante nas duas espécies
- Baixa divergência entre as duas espécies

Diversidade genética revelada por AFLP



“CORE COLLECTION”

- Representar a diversidade com o mínimo de indivíduos
 - Eliminação das redundâncias
 - Redução da similaridade

“Core collection” para o *E. oleifera*

Coleção de base



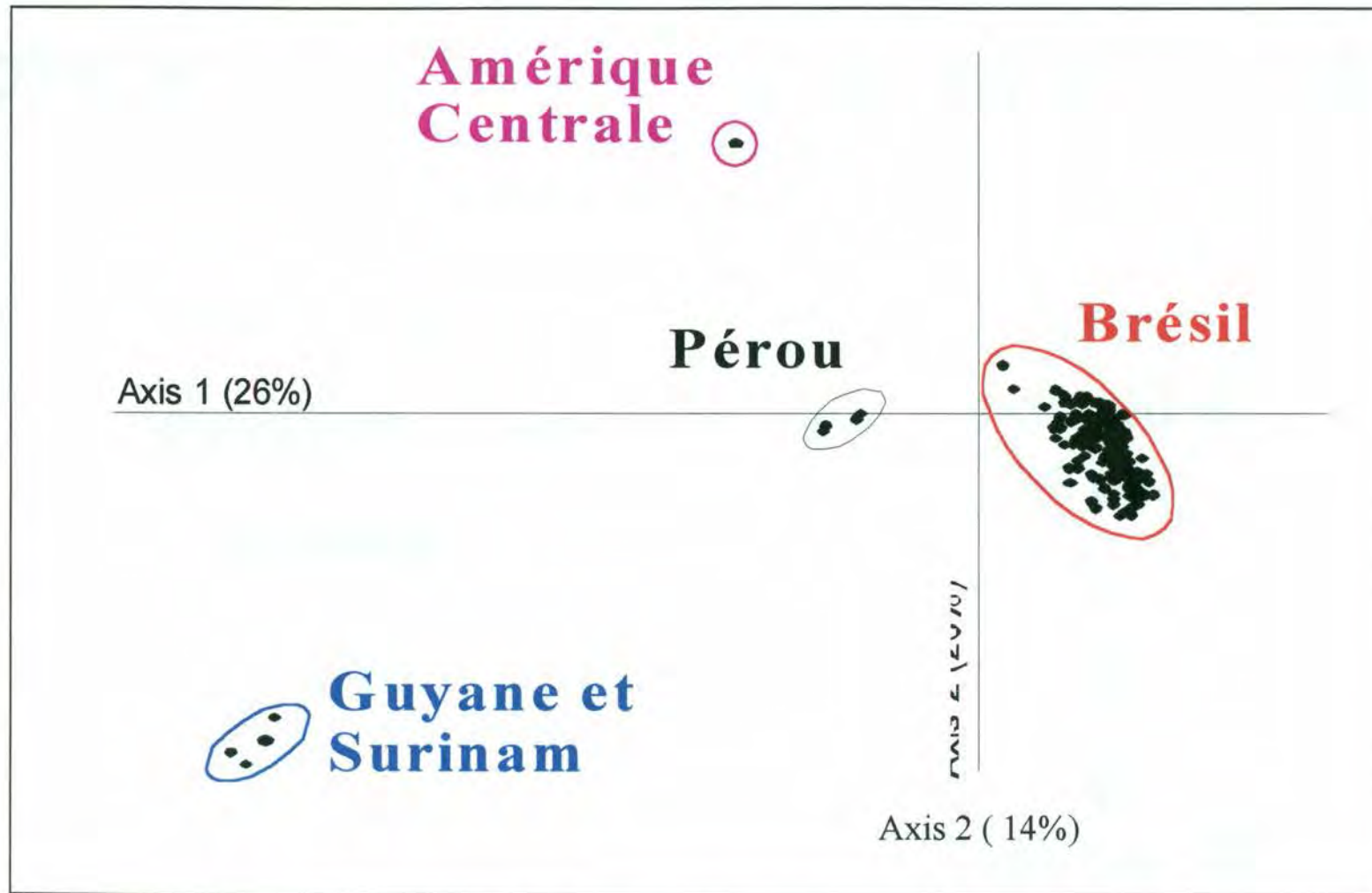
Na = ?

Coleção de trabalho



Na = 58

“Core collection por PCSS”

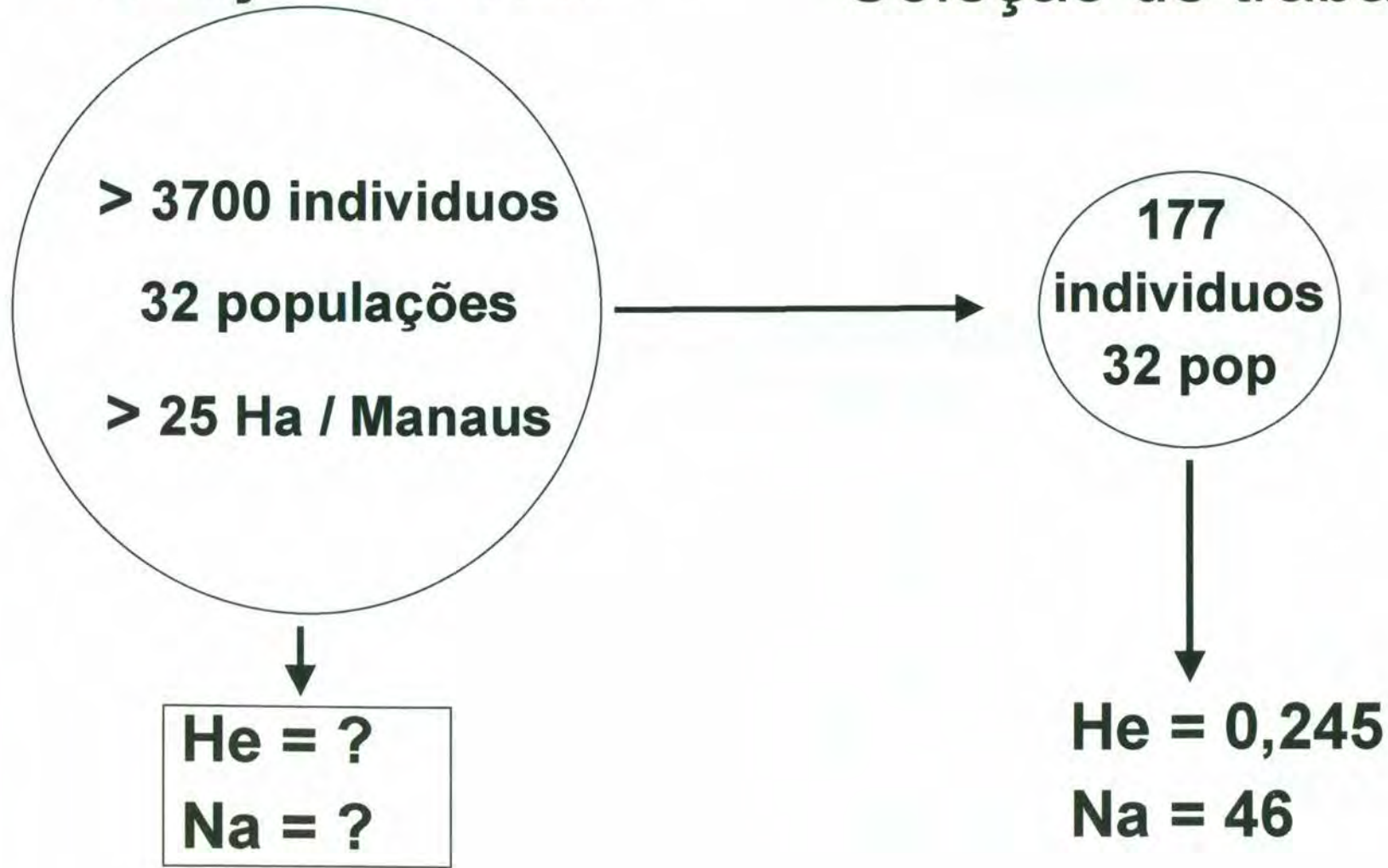


AFC sobre 58 alelos em 19 locus
e 226 indivíduos.

Coleção de *E. oleifera* da EMBRAPA

Coleção de base

Coleção de trabalho

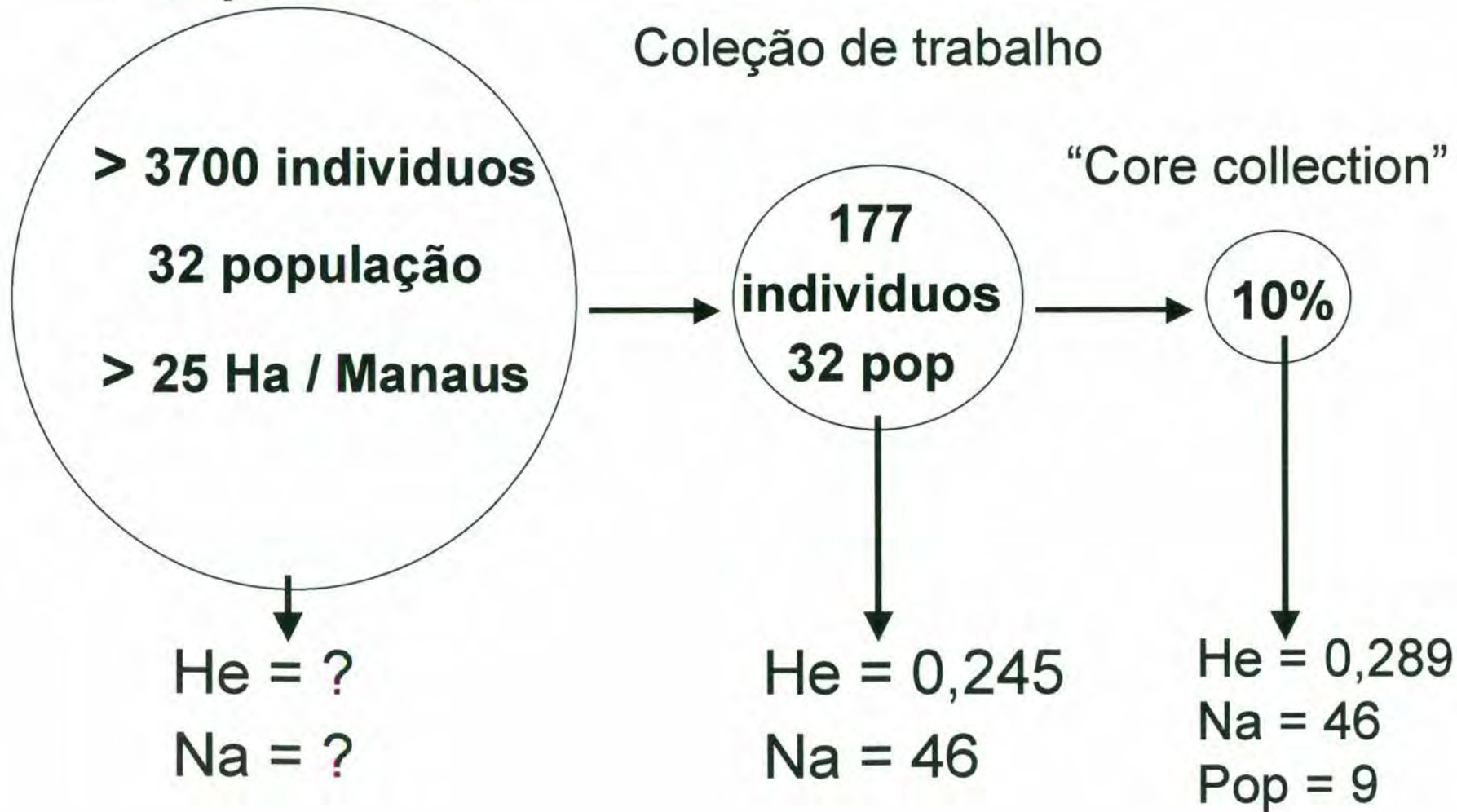


“Core collection” para a coleção de *E. oleifera* da EMBRAPA

Coleção de Base

Coleção de trabalho

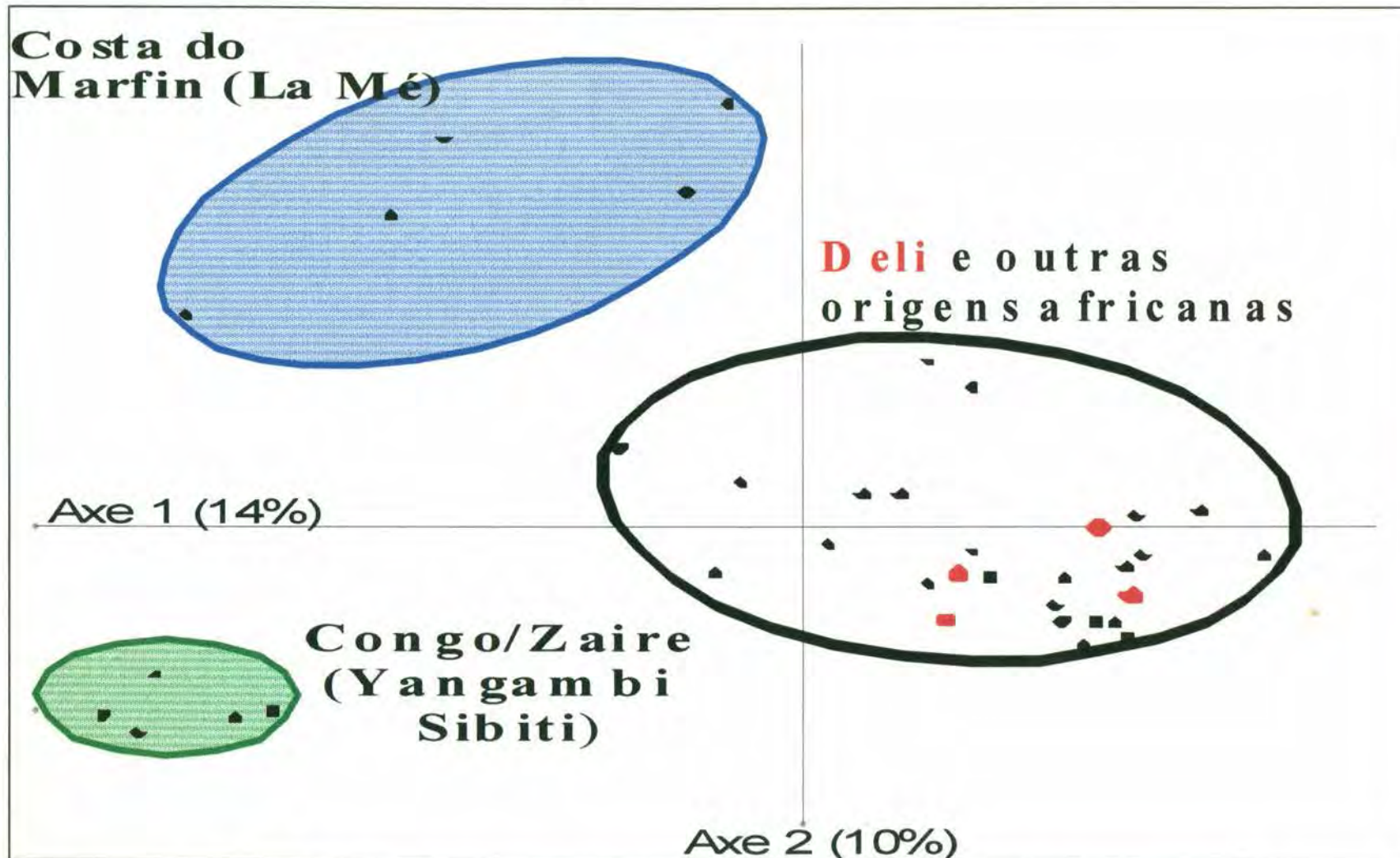
“Core collection”



PERSPECTIVAS

- “Core collection” da EMBRAPA
- Prospeção na alta Amazonia
- Introdução de material de outras origens
- Avaliação de cruzamentos
La Mé x Yangambi

E. guineensis



AFC sobre 170 bandas, 37 sondas
em 38 indivíduos