

Genotipagem com Beadchip

Genômica Aplicada ao Melhoramento de Plantas

Larissa Xavier

Maio 2025

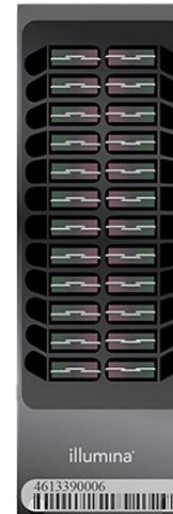
Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)

1. O que são SNPs?

- SNPs são variações de uma única base no DNA entre indivíduos.
- Por exemplo: em uma posição do genoma, um indivíduo pode ter um A e outro pode ter um G.
- Essas variações são comuns e úteis para desenvolvimento de marcadores moleculares.
- Marcadores moleculares podem ser usados em mapeamento genético, seleção assistida por marcadores, diversidade genética.

Tecnologia BeadChip

- **O que é BeadChip?**
 - Plataforma de genotipagem baseada em microarranjos (Illumina)
 - Utiliza esferas (beads) com sondas específicas para SNPs.
- **Exemplo prático:**
 - BeadChip customizado para feijão comum: BARCBean6KBeadChip; BARCBean12KBeadChip (\$21 each sample plus shipping)
 - Capaz de detectar milhares de SNPs simultaneamente.
- **Etapas principais:**
 - Extração e quantificação de DNA.
 - Hibridização com as sondas no chip.
 - Detecção por fluorescência.
 - Leitura dos dados por scanner.



Aplicações no Melhoramento do Feijão

- **Fine mapping**

- Identificação de regiões genômicas associadas a características de interesse (ex: resistência à antracnose ou ferrugem).

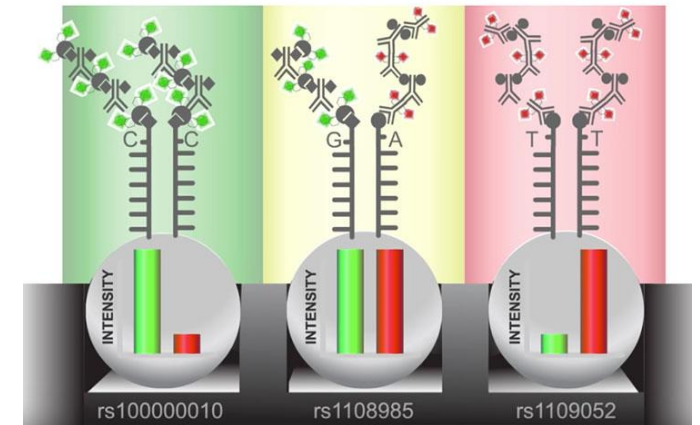
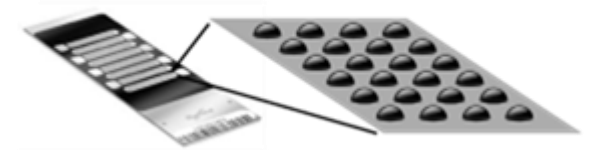
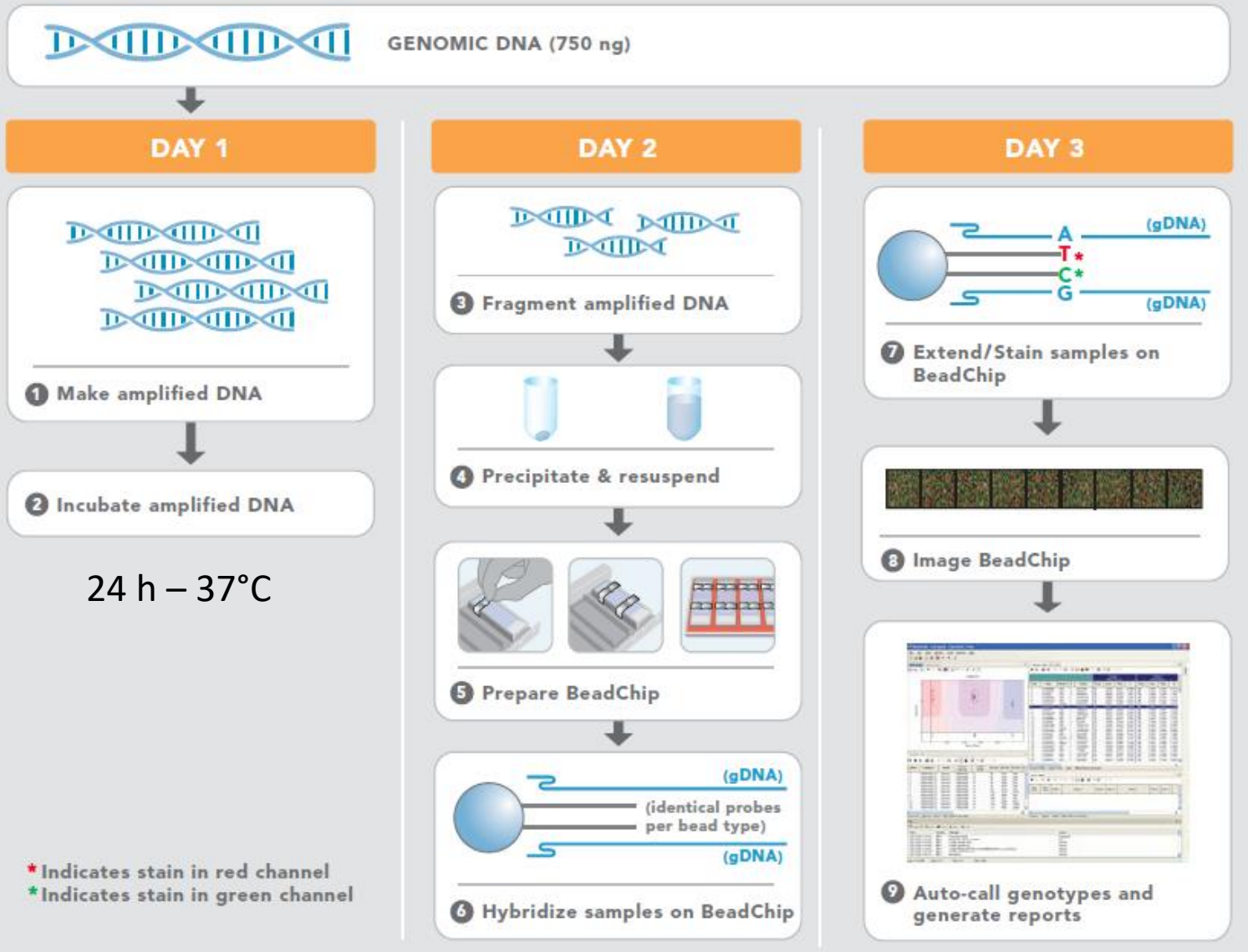
- **Genome-Wide Association Study (GWAs)**

- **Estudos de diversidade genética**

- Comparação entre cultivares elite, linhagens locais, variedades selvagens.

Genotyping - Illumina BeadChip

FIGURE 1: INFINIUM II ASSAY PROTOCOL



Genotyping - Illumina BeadChip

Day 1

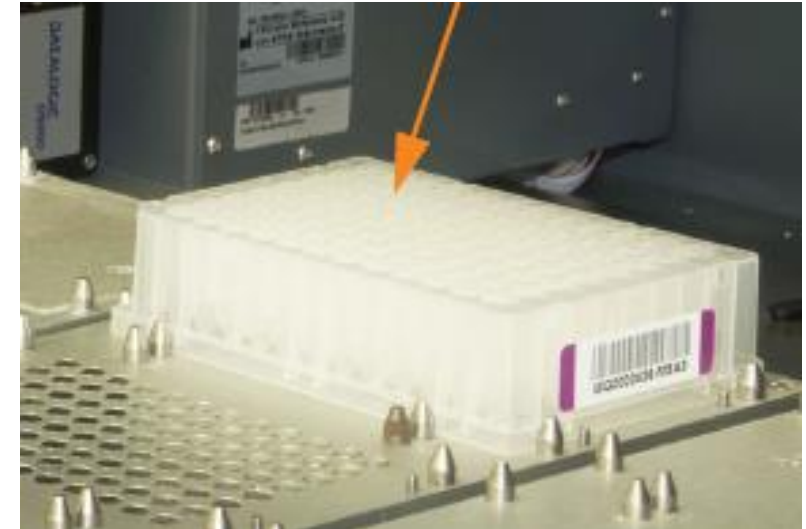


DNA extraction



DNA quantification

5 μ L
50ng/ μ L



Amplificação

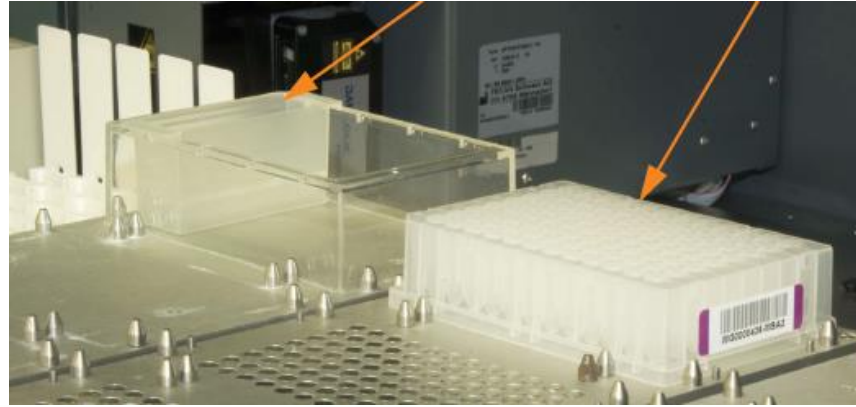
DNA incubado por 24 h – 37°C

Genotyping - Illumina BeadChip

Day 2



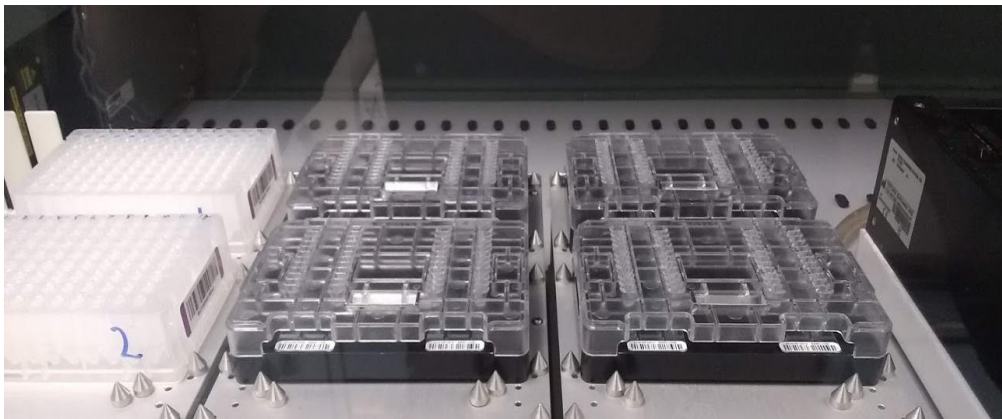
Fragmentação e Precipitação



Resuspensão



Preparo do chip



O DNA fragmentado é aplicado ao chip



Hibridização

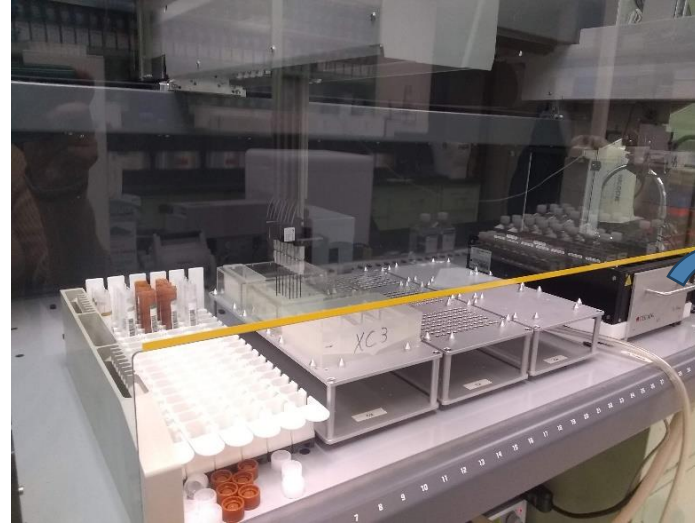
O chip é incubado por 24 horas

Genotyping - Illumina BeadChip

Day 3



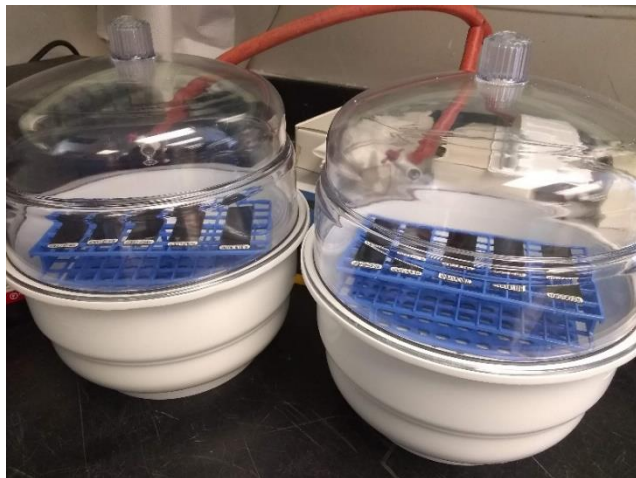
Preparo do chip



Lavagens e Extensão



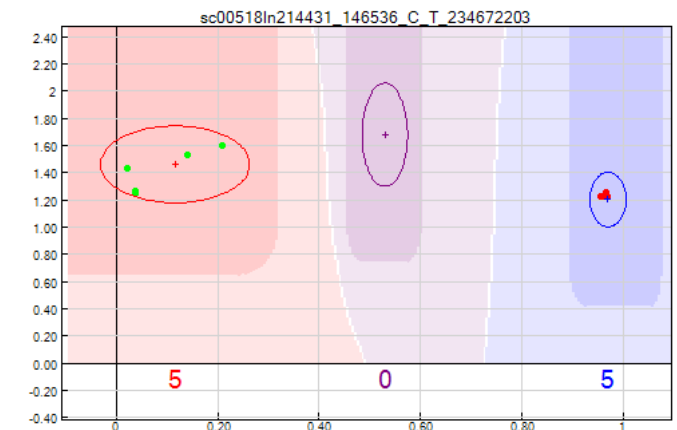
Lavagem



Secagem do chip



Escanemanto do chip



Genoma Studio

Estudo de Caso

- Exemplo de uso do BARCBean12KBeadChip no SGIL-BARC-ARS-USDA.
- Fine mapping do gene de resistência à antracnose na cultivar Andina de feijão comum Beija Flor.

Genoma studio

Genômica Aplicada ao Melhoramento de Plantas

KASP MARKERS AND JOINMAP

Genômica Aplicada ao Melhoramento de Plantas

Kompetitive Allele Specific PCR (KASP)

1. O que é a metodologia KASP?

- É uma técnica baseada em PCR que permite genotipar SNPs de forma rápida, precisa e com baixo custo.
- Dois primers alelo-específicos (Forward), um para cada variante do SNP, e um primer reverso comum (Reverse).
- Sondas fluorescentes ligadas as caudas sintéticas dos primers forward.

2. PCR competitive

- Os dois primers competem para amplificar a região do SNP.
- O primer que casa perfeitamente com o alelo presente no DNA do indivíduo será o amplificado.

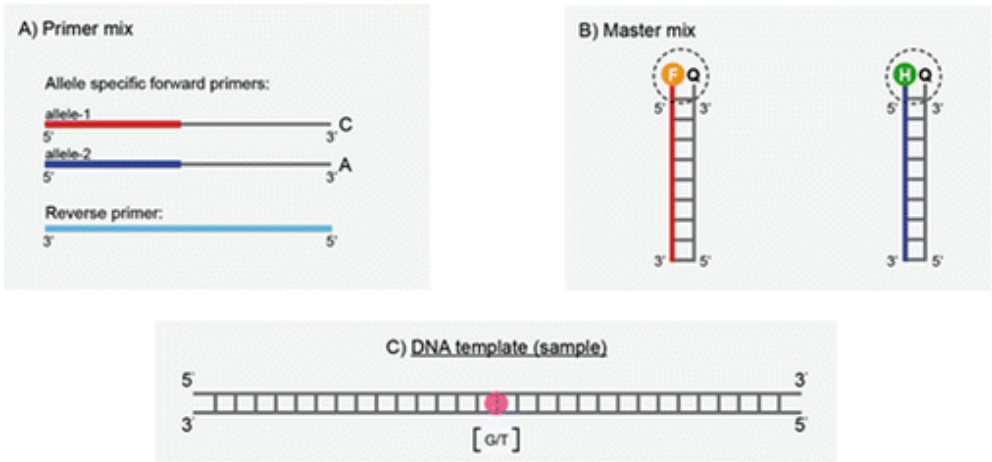
3. Detecção por fluorescência

- Após a PCR, um sistema de leitura detecta qual cor de fluorescência está presente:
 - Cor 1 (ex: FAM) → alelo A
 - Cor 2 (ex: HEX) → alelo G
 - Ambas as cores → heterozigoto (AG)

Kompetitive Allele Specific PCR (KASP)

KASP Genotyping Chemistry

1) Assay components:



Preparo do primer

Reagents	100 (µL)
KASP primer Forward 1 (100µM)	12
KASP primer Forward 2 (100µM)	12
KASP primer reverse (100µM)	30
Water	46

Preparo da PCR

Reagents	Plate of 96 wells	Plate of 384 wells
	1 sample	1 sample
KASP MasterMix (µL)	5	2.5
KASP markers Mix (µL)	0.14	0.07
DNA (µL)	5	2.5

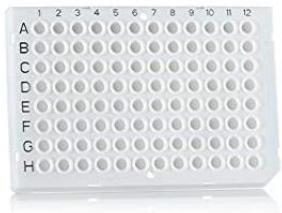
Exemplo de KASP marker:

CTGATAAGGTGCAGAATACACACTGATTTTACATCCATTTTATCTTCATAACACTTCACA[G/A]CCTATTCAACCAAGGACCATTATCTTAAGGAAGTGTTTAAGTAGCTTCTTTGAGGTCTTT

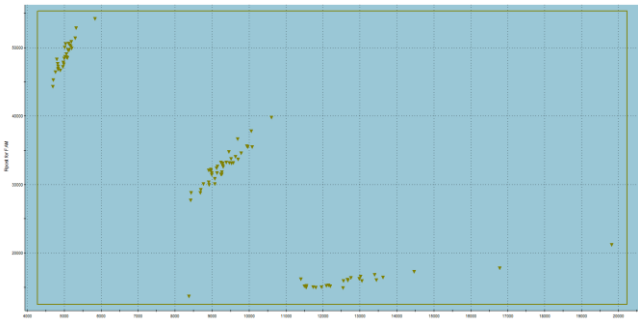
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCCATTTTATCTTCATAACACTTCACAG
GAAGGTGGAGTCAACGGATTCATCCATTTTATCTTCATAACACTTCACAA
CCTCAAAGAAGCTACTTAAACACTTCCTT

Kompetitive Allele Specific PCR (KASP)

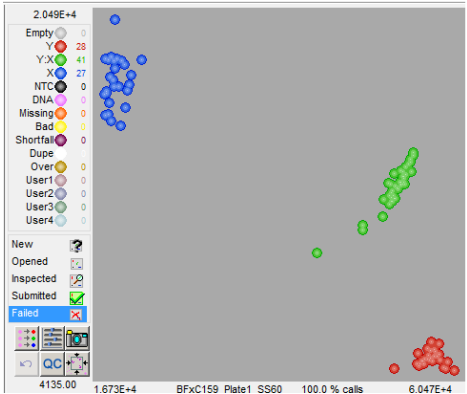
2020



Mx3000P qPCR machine

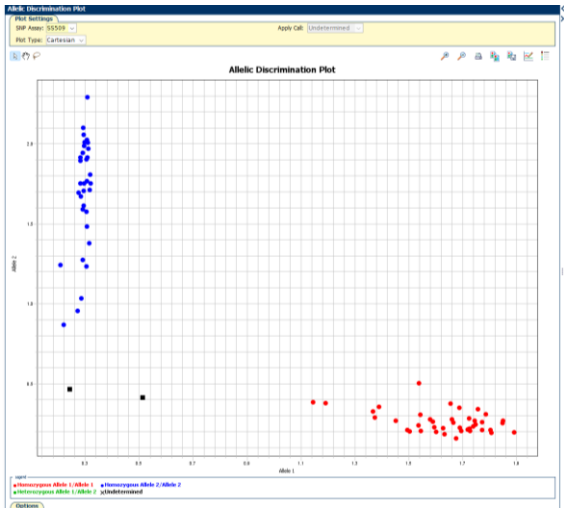
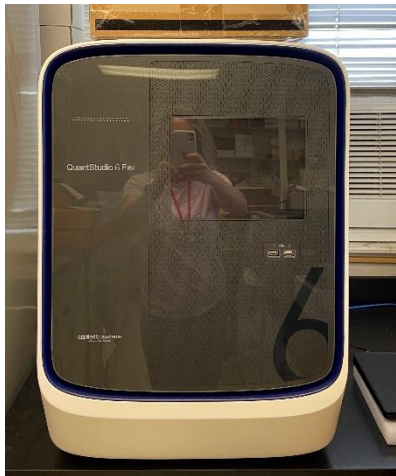
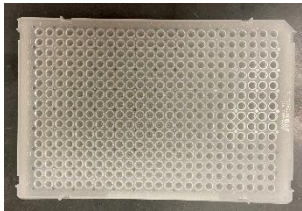


MxPro software



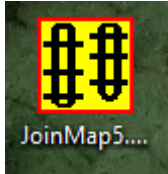
Klustercaller software.

2024

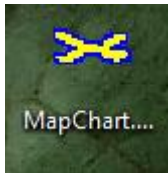


QuantStudio™ Real-Time PCR Software

JoinMap



- O JoinMap calcula as distâncias genéticas a partir da frequência de recombinação observada entre os marcadores, usando funções de mapeamento para converter essas frequências em centiMorgans.
- Ele então usa essas distâncias para agrupar e ordenar os marcadores ao longo dos cromossomos.



- O MapChart é utilizado para desenhar os mapas genéticos que foram calculados por meio do software JoinMap.

Referências

- Hurtado-Gonzales OP, Valentini G, Gilio TAS, Martins AM, Song Q, Pastor-Corrales MA (2017) Fine mapping of *Ur-3*, a historically important rust resistance locus in common bean. *G3* 7(2):557–569. <https://doi.org/10.1534/g3.116.036061>.
- ILLUMINA. GenomeStudio® genotyping module v2.0: software guide. Illumina, inc, 2018.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9828-9832. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9828>
- Song Q, Jia G, Hyten DL, Jenkins J, Hwang EY, Schroeder SG, Osorno JM, Schmutz J, Jackson SA, McClean PE, Cregan PB (2015) SNP assay development for linkage map construction, anchoring whole-genome sequence, and other genetic and genomic applications in common bean. *G3: Genes, Genomes, Genet* 5(11):2285-2290.<https://doi.org/10.1534/g3.115.020594>
- Van Ooijen JW (2006) JoinMap 4, Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps in Experimental Populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93:77–78

Obrigada!

larissafsx@gmail.com
larissa.xavier@usda.com.gov
+1 (240) 224-5333