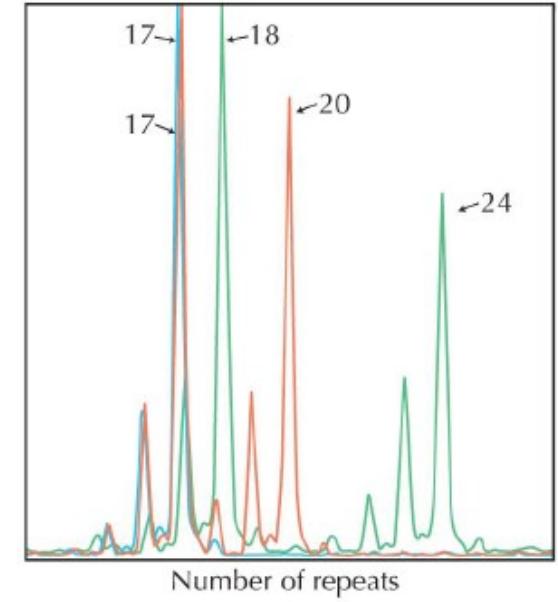
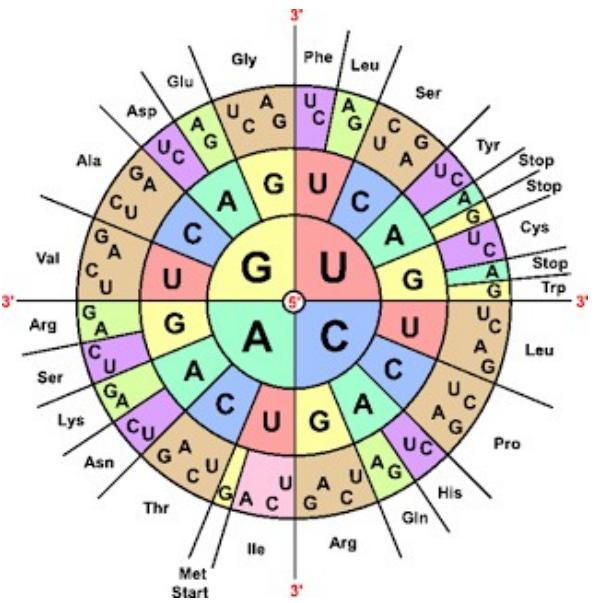
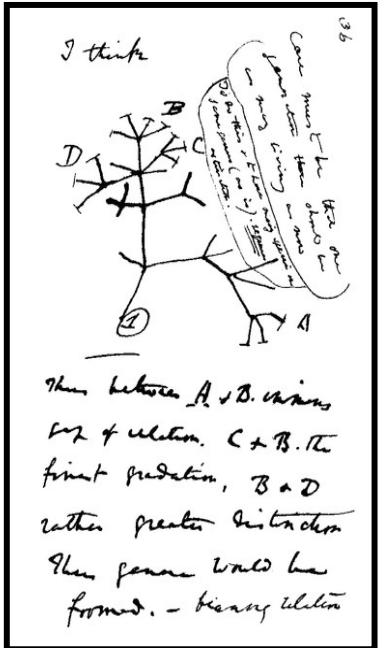


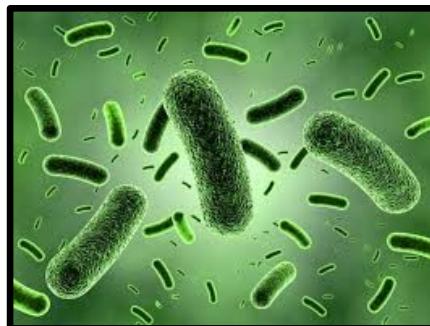
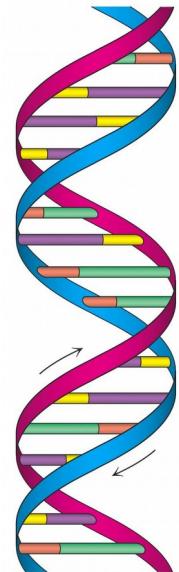


Ácidos nucleicos y MARCADORES MOLECULARES



Rosalinda Tapia López

Los ácidos nucleicos, macromoléculas universales portadores de la información genética de todos los organismos



Todas las células
de un organismo
portan el mismo
DNA



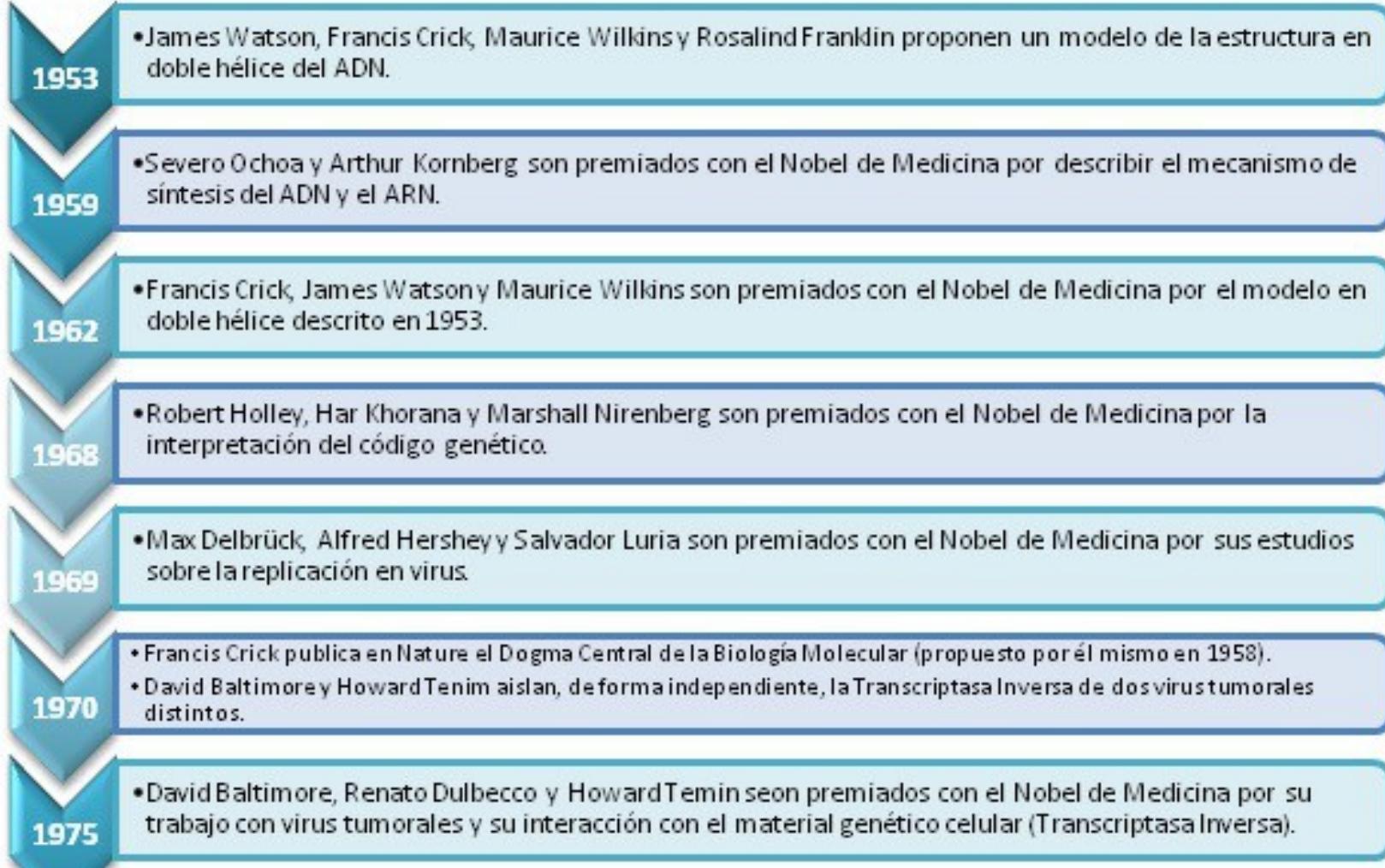
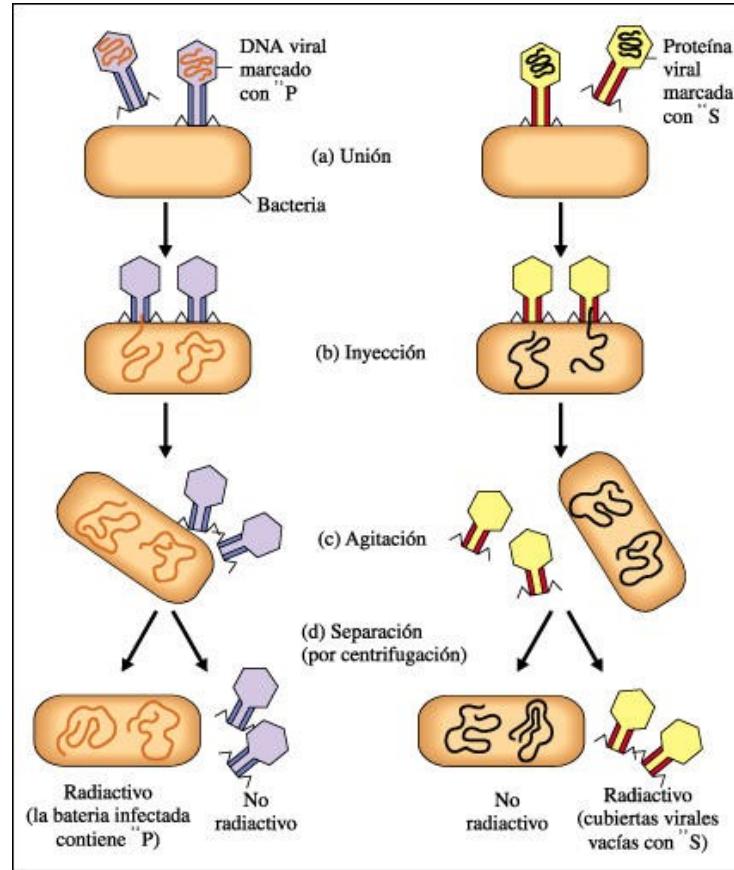
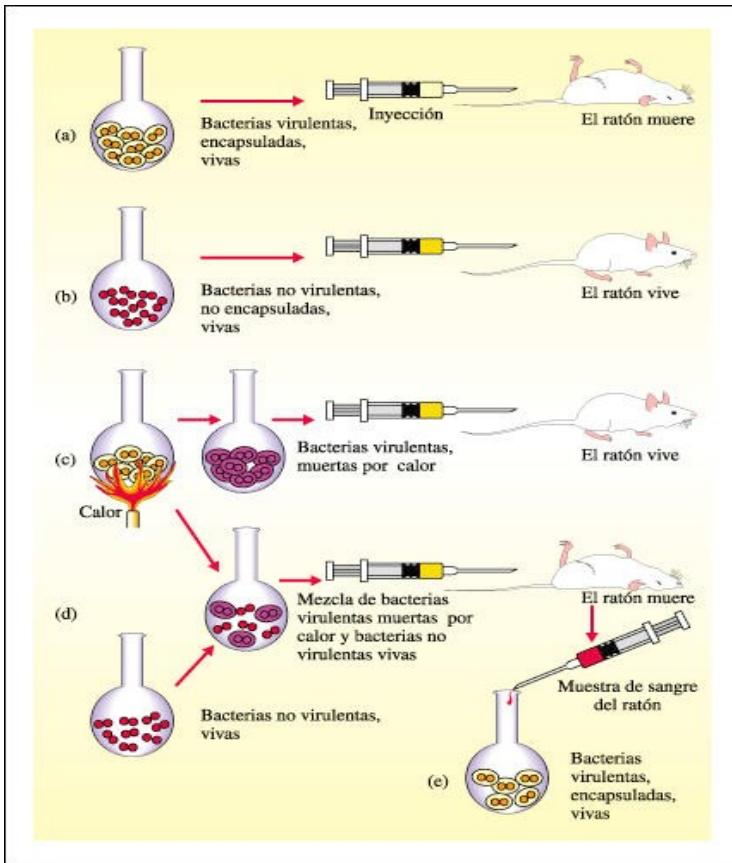


Figura 1. Línea temporal con los principales descubrimientos en relación al material genético (1953-1975).
Fuente: elaboración propia a partir de webs²

DNA es el material genético



Principio Transformante 1928

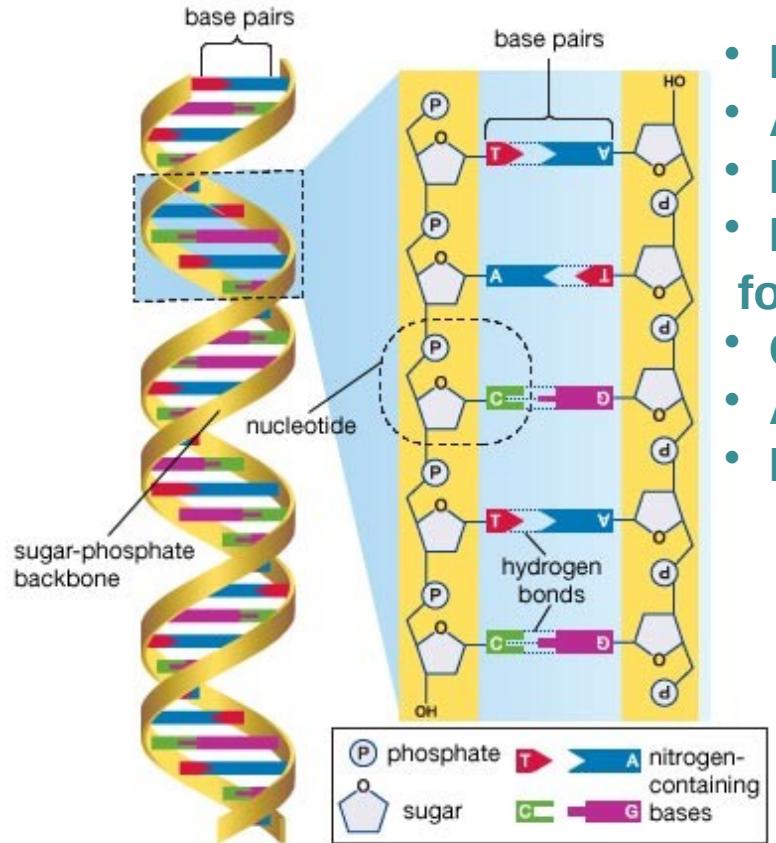
Frederick Griffith

Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty.

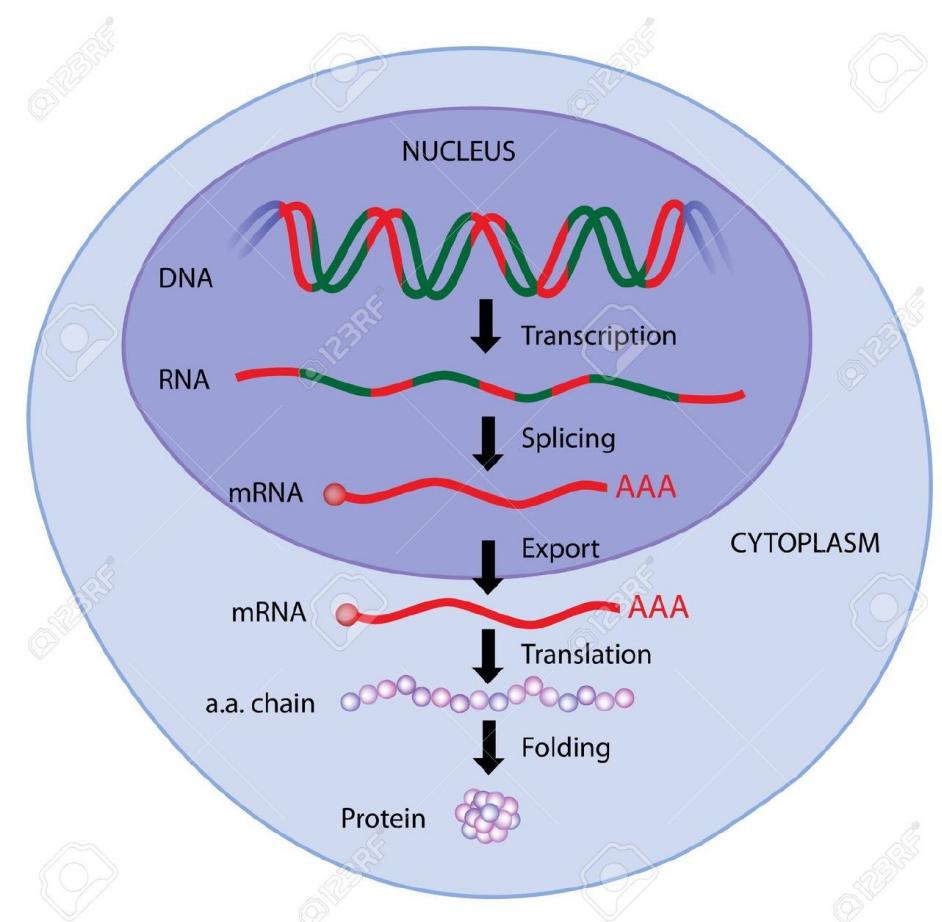
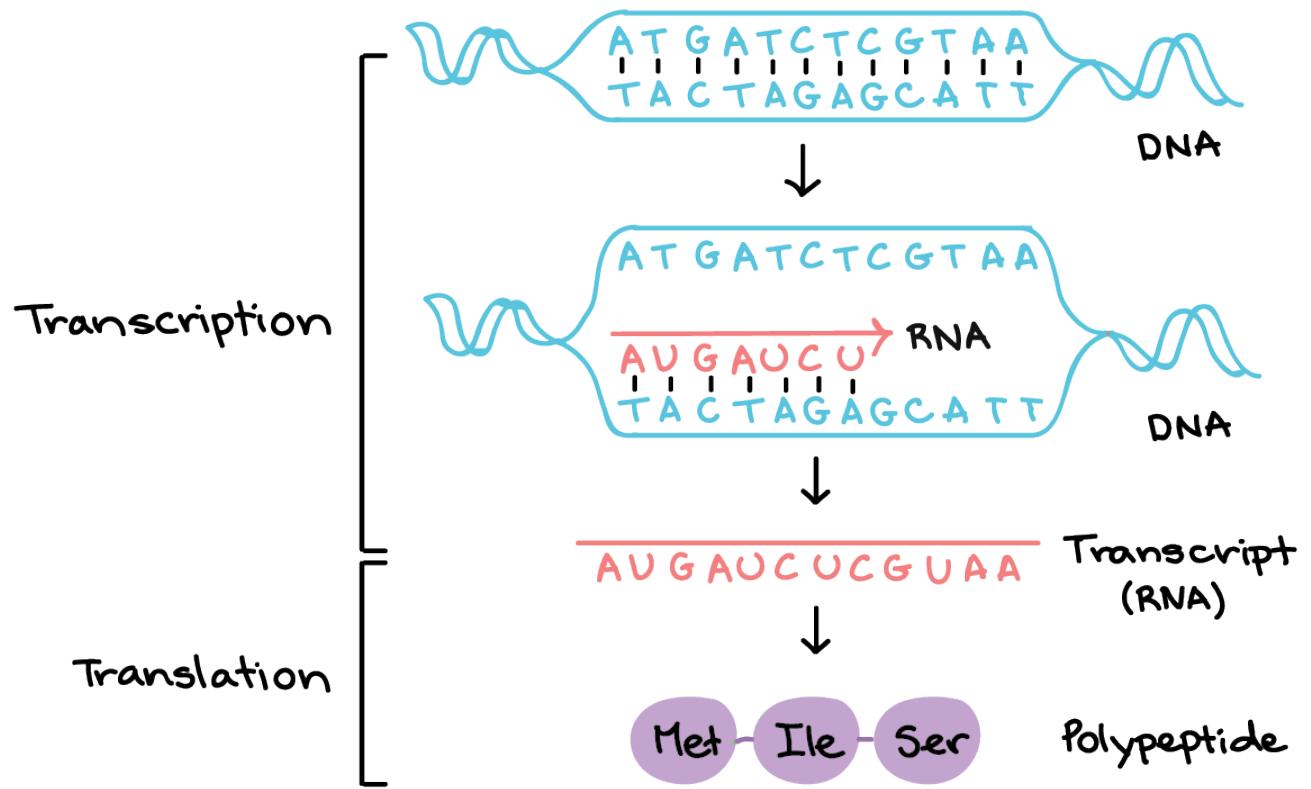
El DNA, es el material genético

Hershey y M. Chase

Los ácidos nucleicos, macromoléculas universales portadores de la información genética de todos los organismos



- Doble hélice
- Antiparalela
- Dirección 5'-3'
- Nucleotidos unidos por enlaces fosfodiester
- Grupos fosfatos dirigidos hacia fuera
- Azúcares/bases en el centro
- Doble cadena unida por puentes de H2



Código Genético

Segunda Letra

Primera Letra

	U	C	A	G		
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U	
C	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C	
A	UUA Leu	UCA Ser	UAA STOP	UGA STOP	A	
G	UUG Leu	UCG Ser	UAG STOP	UGG Try	G	
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U	
A	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C	
G	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A	
C	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G	
A	AUU Iso	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U	
G	AUC Iso	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C	
A	AUA Iso	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A	
G	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G	
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
C	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
A	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A	
G	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G	

Tercera Letra

Definiciones

- **Fenotipo:** Característica o atributo morfológicos, bioquímicos o conductuales.
- **Genotipo:** Conjunto de genes que posee un organismo; composición genética para un locus específico
- **Gen:** Unidad funcional de la herencia.
- **Alelo:** Uno de las diferentes formas de un gen; Variante en una secuencia de DNA.
- **Locus:** Secuencia definida de DNA en un cromosoma. Puede o no ser un gen.
- **Frecuencia alélica:** La proporción de copias de un gen en una población para un alelo dado

Los marcadores genéticos se suelen dividir en dos grupos, los **marcadores bioquímicos**, detectados como variaciones en la secuencia de aminoácidos para la que codifica el marcador, y **marcadores moleculares** basados en el ADN, detectados a nivel de la secuencia de nucleótidos del marcador con o sin cambios observables en el fenotipo. Los llamados **marcadores morfológicos**, identificados mediante rasgos en el fenotipo (color, tamaño, etc), pueden ser considerados como un marcador genético, sin embargo, hoy en día son mucho menos utilizados.

Isoenzimas

Enzimas son un tipo de proteínas con diferentes isoformas, que catalizan la misma reacción bioquímica.

Estructuralmente similares, pero genéticamente distintas. Código genético Difieren en capacidades catalíticas, electroforéticas, tamaño, carga, conformación

Su síntesis es dependiente del estado de desarrollo, condición ambiental, tejido, órgano

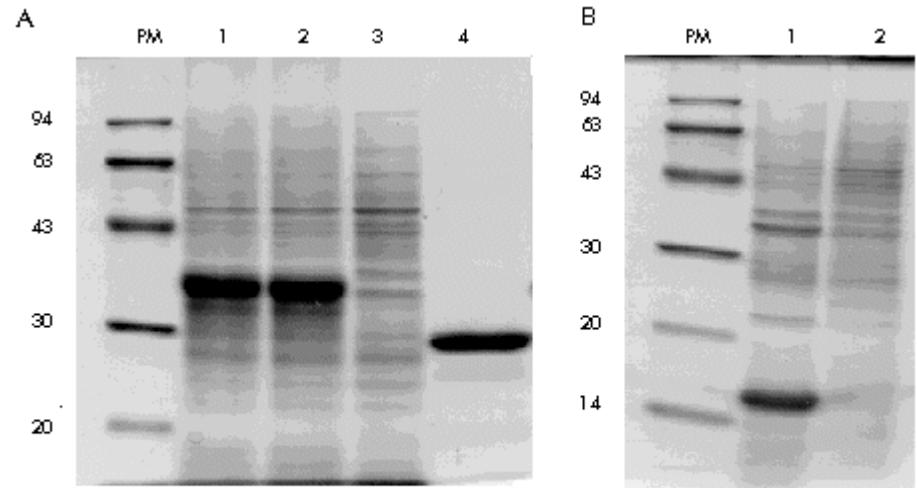


Figura 2. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% de los dones que expresan la TnIcar. Carrilera 1, pRTI2.8; carrilera 2, pRTI4.5; carrilera 3, control negativo; carrilera 4, TnIcar natural. B) Bedroforesis en gel de poliacrilamida 15% del clon que expresa el fTnIcar. Carrilera 1, pRTI4.5; carrilera 2, control negativo; PM, marcador de peso molecular.

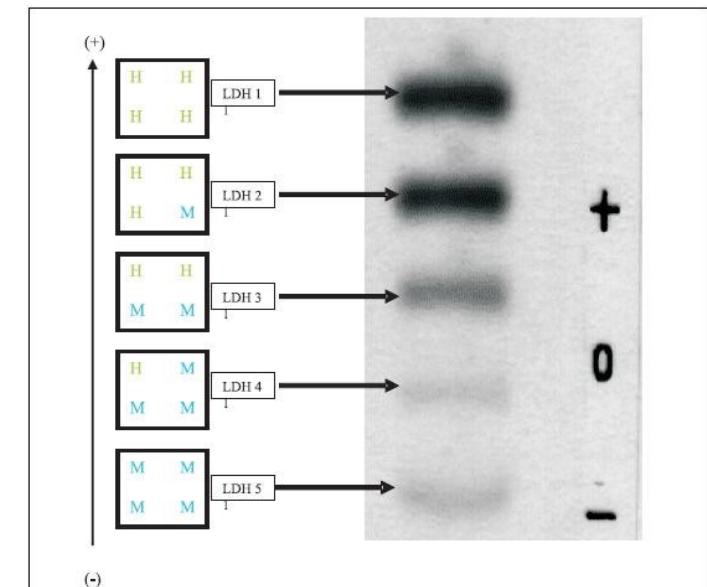


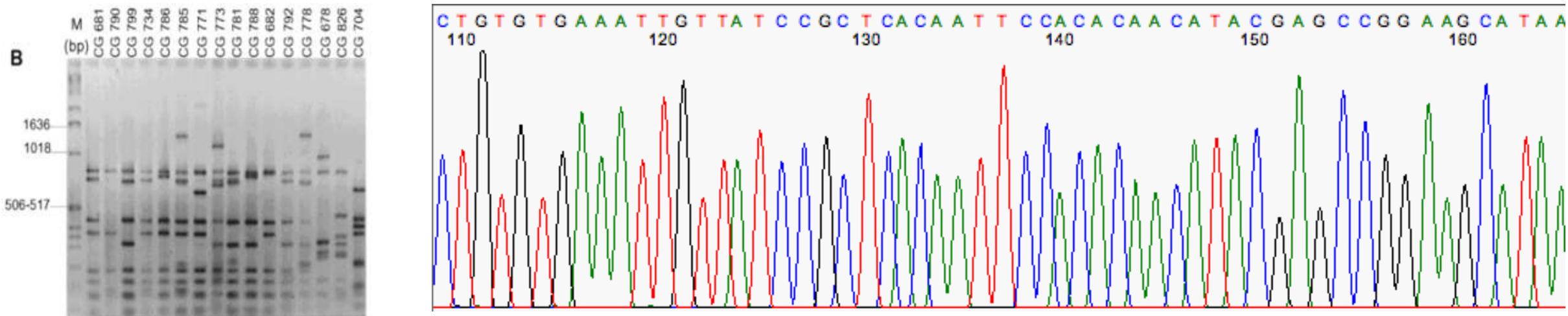
Figura 1. Patrón electroforético y composición de cada una de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa

Marcadores genéticos

Inicialmente usados en mejoramiento genético:

- Variación genética,
- Heredabilidad

Son biomoléculas o segmentos de éstas (DNA, RNA, Proteínas) con una ubicación física conocida en un cromosoma y que se pueden relacionar con un rasgo genético que modifiquen o no su fenotipo.



Un marcador ideal debe ser:

- Preferentemente neutral
- Altamente polimórfico con variación dentro y entre poblaciones, con el que se detecten variaciones en la secuencia del DNA, inversiones, delecciones, duplicaciones, en regiones codificantes y no codificantes
- Herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), con heredabilidad predecible
- Insensible a efectos ambientales
- Codominante
- Presentes en todos los organismos de estudio
- Independencia del estado de desarrollo del individuo
- Independencia del estado físico del individuo
- Independencia de las condiciones ambientales
- Facilidad de obtención
- Métodos de detección económicos
- Posibilidad de obtención en cualquier célula del organismo que contenga núcleo

Endonucleasas de Restricción

Enzimas que reconocen una secuencia específica en un doble cadena de DNA y cortan en un sitio específico

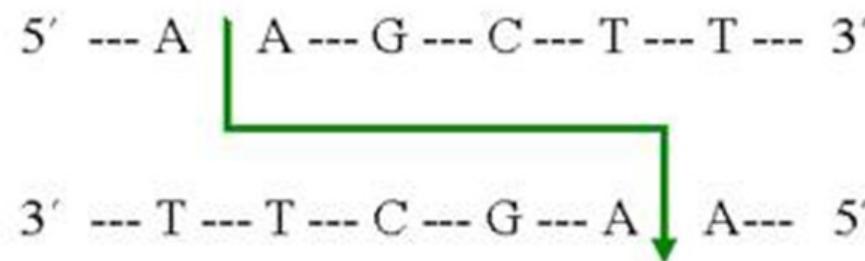
Características:

- Reconocen secuencias cortas de DNA de doble cadena (dcDNA)
- Cortan dentro de una molécula de dcDNA específica
- Generalmente reconocen secuencias palindrómicas (5'--3')
- Generan extremos **cohesivos o pegajosos**
- Generan extremos **romos o rasos**
- Cierta frecuencia de corte dependiendo del tipo de DNA
- Los fragmentos generados pueden utilizarse para generar mapas
- Tecnología del DNA recombinante
- NGS

Endonucleasas de Restricción

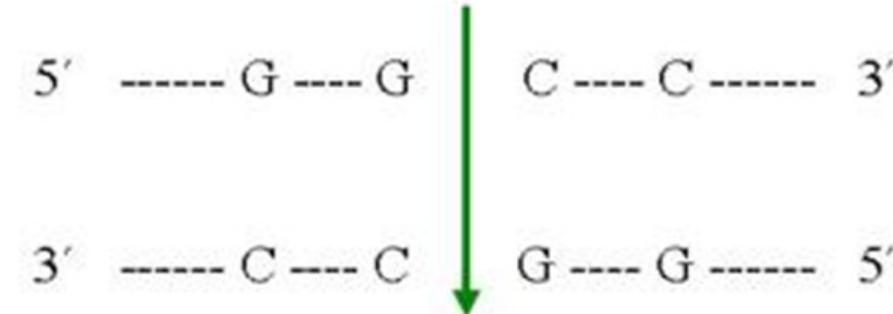
Enzimas que reconocen una secuencia específica en un doble cadena de DNA y cortan en un sitio específico

HindIII



Cohesivo

HaeIII

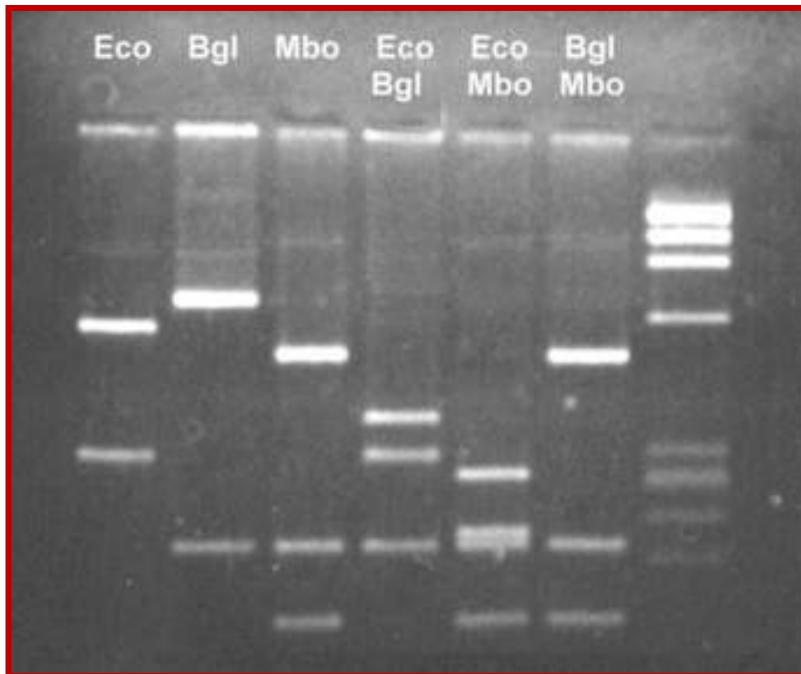


Romo

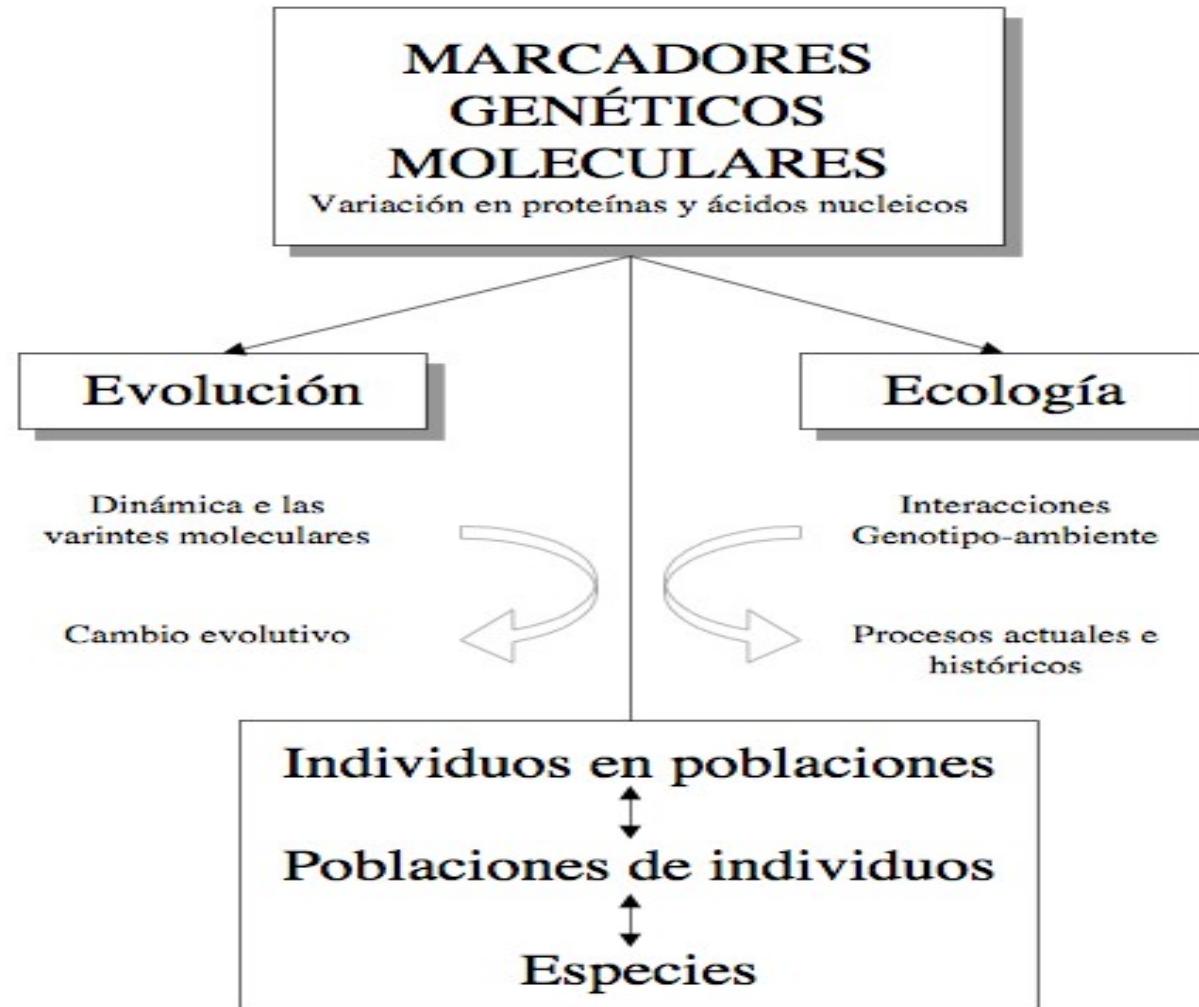
Enzyme	Source organism	Restriction site in double-stranded DNA
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5' ↓ m -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- 5' m ↑
EcoRII	<i>E. coli</i>	5' ↓ m -G-C-C-T-G-G-C- -C-G-G-A-C-C-G- 5' m ↑
HindII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' ↓ m -G-T-Py-Pu-A-C- -C-A-Pu-Py-T-G- 5' m ↑
HindIII	<i>H. influenzae</i>	5' ↓ m -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- 5' ↑m
HaeIII	<i>H. aegyptius</i>	5' ↓ m -G-G-C-C- -C-C-G-G- 5' ↑
HpaII	<i>H. parainfluenzae</i>	5' ↓ m -C-C-G-G- -G-G-C-C- 5' ↑
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	5' ↓ m -C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C- 5' ↑
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	5' ↓ m -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- 5' ↑
BamI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5' ↓ m -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- 5' ↑
BglII	<i>B. globiggi</i>	5' ↓ m -A-G-A-T-C-T- -T-C-T-A-G-A- 5' ↑

NOTE: An asterisk (*) is commonly used to indicate methylation sites, but an "m" is used here to prevent confusion with radioactive labeling.

Visualización de los fragmentos de restricción



Marcadores moleculares utilizados en estudios ecológicos y evolutivos



Marcadores moleculares utilizados en estudios ecológicos y evolutivos

Regiones utilizadas como marcadores moleculares

- DNA nuclear (nDNA)
- DNA de cloroplasto (cIDNA)
- DNA mitocondrial (mtDNA)
- DNA ribosomal (rDNA)

Utilizados en técnicas como

- Southern blot
- RFLP-PCR
- AFLPs
- Secuenciación
- Microarrreglos

Ventajas: capacidad para detectar polimorfismos en loci unicos y multiples; son de tipo dominate o codominante (Simpson, 1997).

Desventajas: estos análisis requieren generalmente de reactivos e infraestructura costosos.

Algunos de los marcadores moleculares más utilizados son:

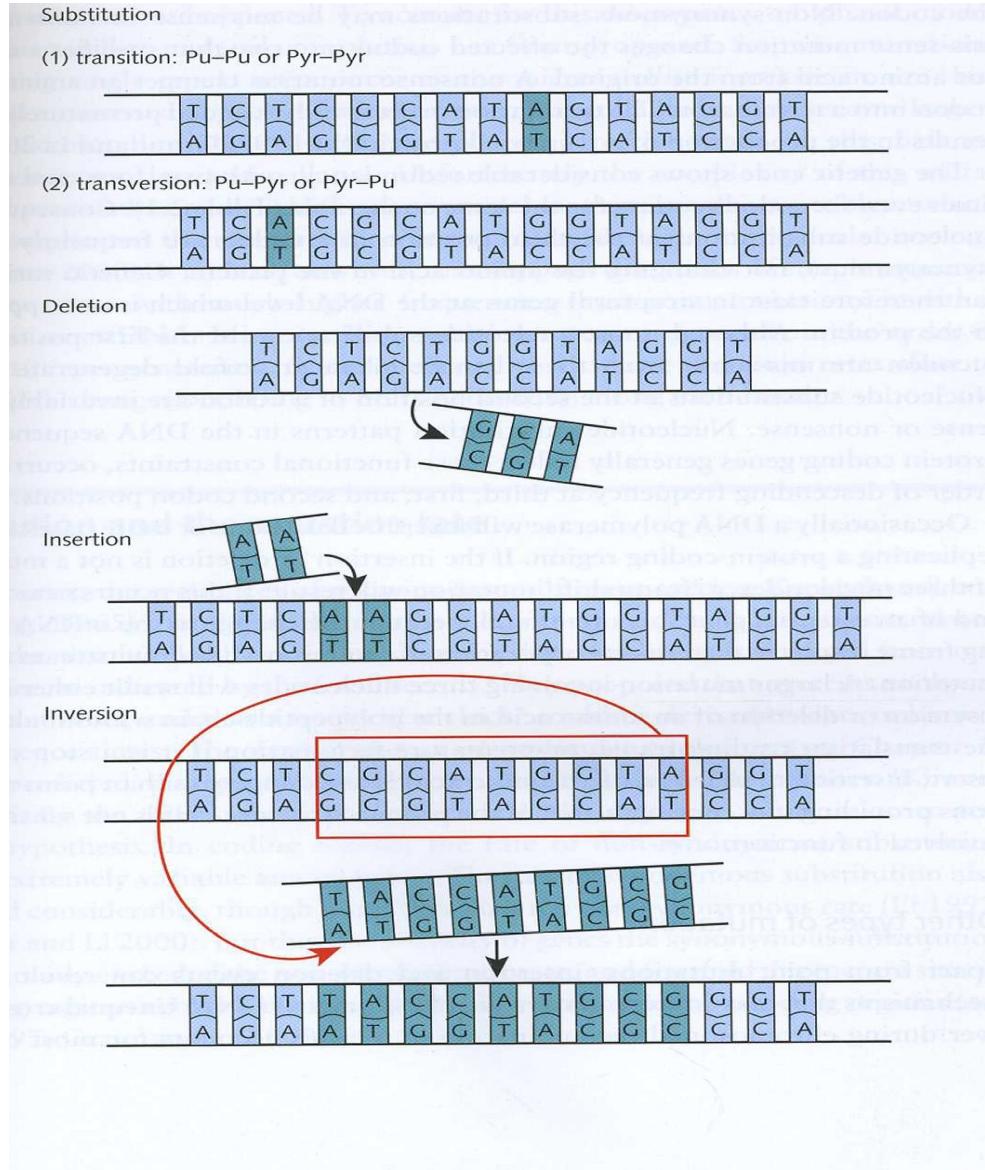
- **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism o Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción)
- **SSLP** (Simple sequence length polymorphism o Polimorfismo en la longitud de secuencias simples)
- **AFLP** (Amplified fragment length polymorphism o Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados)
- **RAPD** (Random amplification of polymorphic DNA o Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)
- **VNTR** (Variable number tandem repeat o Número variable de repeticiones en tandem. Minisatélite)
- **SSR** (Simple sequence repeat o Repetición de secuencia simple. Microsatélite)
- **STR** (Short tandem repeat o Repeticiones cortas en tandem. Microsatélite)
- **SNP** (Single nucleotide polymorphism o Polimorfismo de nucleótido simple)
- **SFP** (Single feature polymorphism o Polimorfismos de Característica Única)
- **TRAPs** (Target Region Amplification Polymorphism, en español Polimorfismos para la amplificación de regiones blanco)
- **DArT** (Diversity Arrays Technology, es español Tecnología de Vectores, o Matrices, de Diversidad)
- **RAD** (Restriction site associated DNA markers o marcadores de ADN asociados a sitios de restricción)

MUTACIÓN

Mutaciones

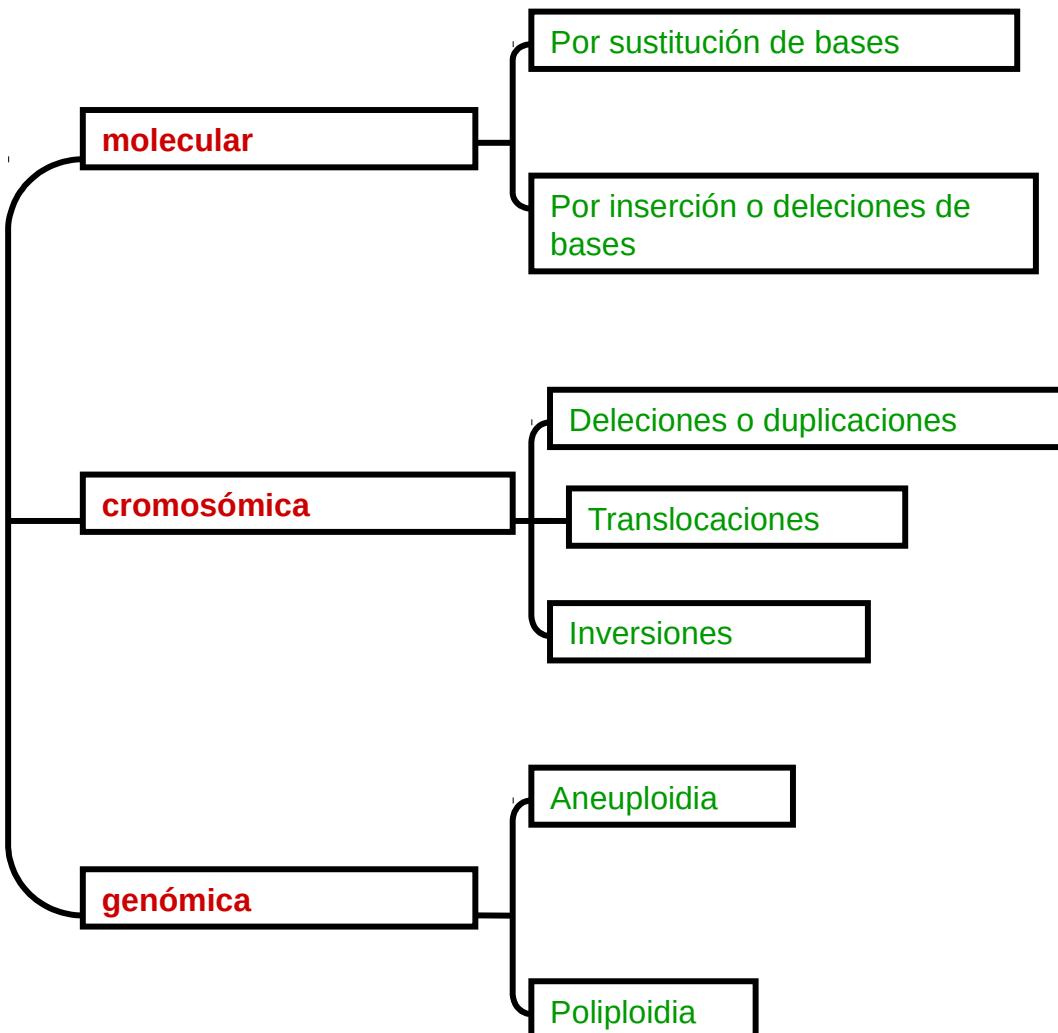
Alteraciones permanentes en el DNA.

Estos cambios pueden o no tener efectos; algunas ocasiones el organismo puede vivir y pasar ese cambio a su descendencia

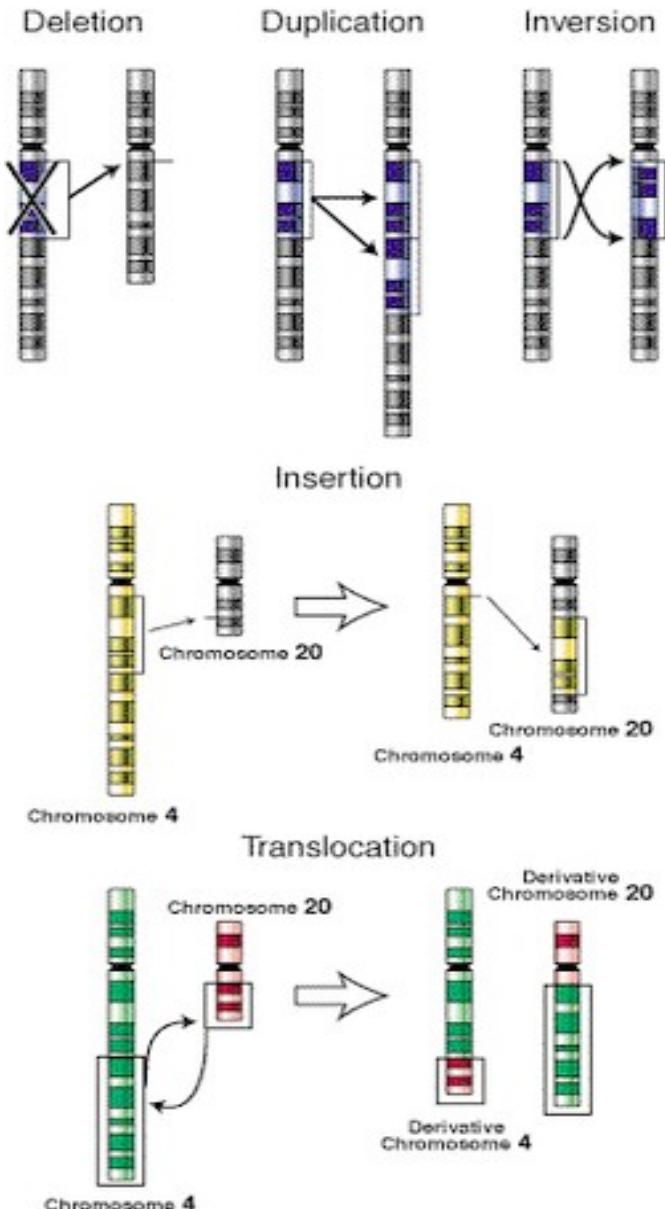


TIPOS DE MUTACIÓN

Mutaciones



Types of mutation

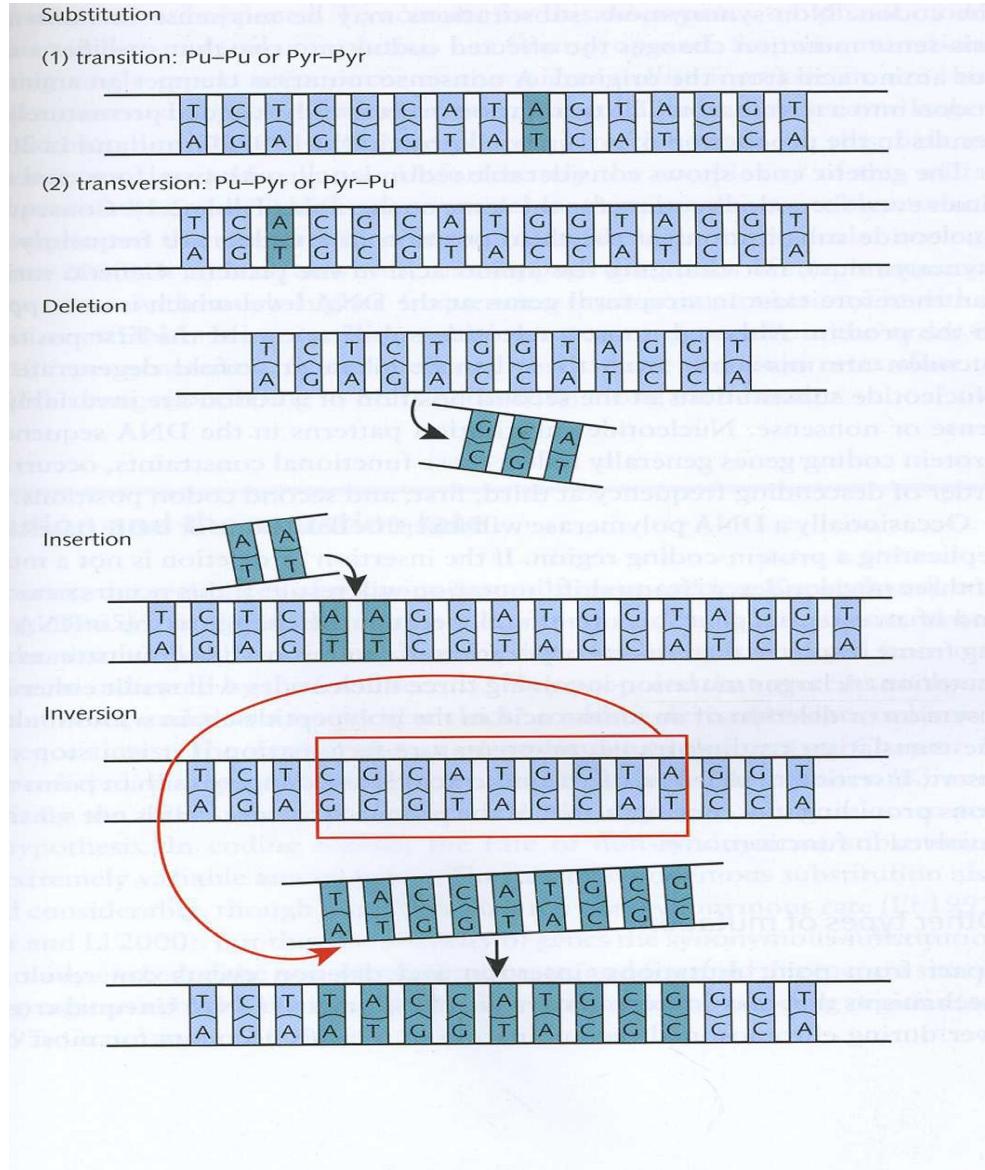


MUTACIÓN

Mutaciones

Alteraciones permanentes en el DNA.

Estos cambios pueden o no tener efectos; algunas ocasiones el organismo puede vivir y pasar ese cambio a su descendencia



Utilidad de marcadores moleculares en estudios evolutivos y ecológicos

Los marcadores moleculares DNA y RNA (proteínas) permiten :

- Establecer hipótesis de relaciones filogenéticas
- Comparar linajes
- Estimar variación dentro de poblaciones
- Probar hipótesis de adaptaciones ecológicas.
- Analizar proporciones de genes en poblaciones naturales

Marcadores moleculares utilizados en estudios ecológicos y evolutivos

PROTEINAS: Isoenzimas

DNA:

- DNA nuclear (nDNA) (regiones codificantes y no codificantes)
- DNA de cloroplasto (ctDNA reg codificantes y no codificantes)
- DNA mitocondrial (mtDNA reg codificantes y no codificantes)
- DNA ribosomal (rDNA)

TABLE
1.1

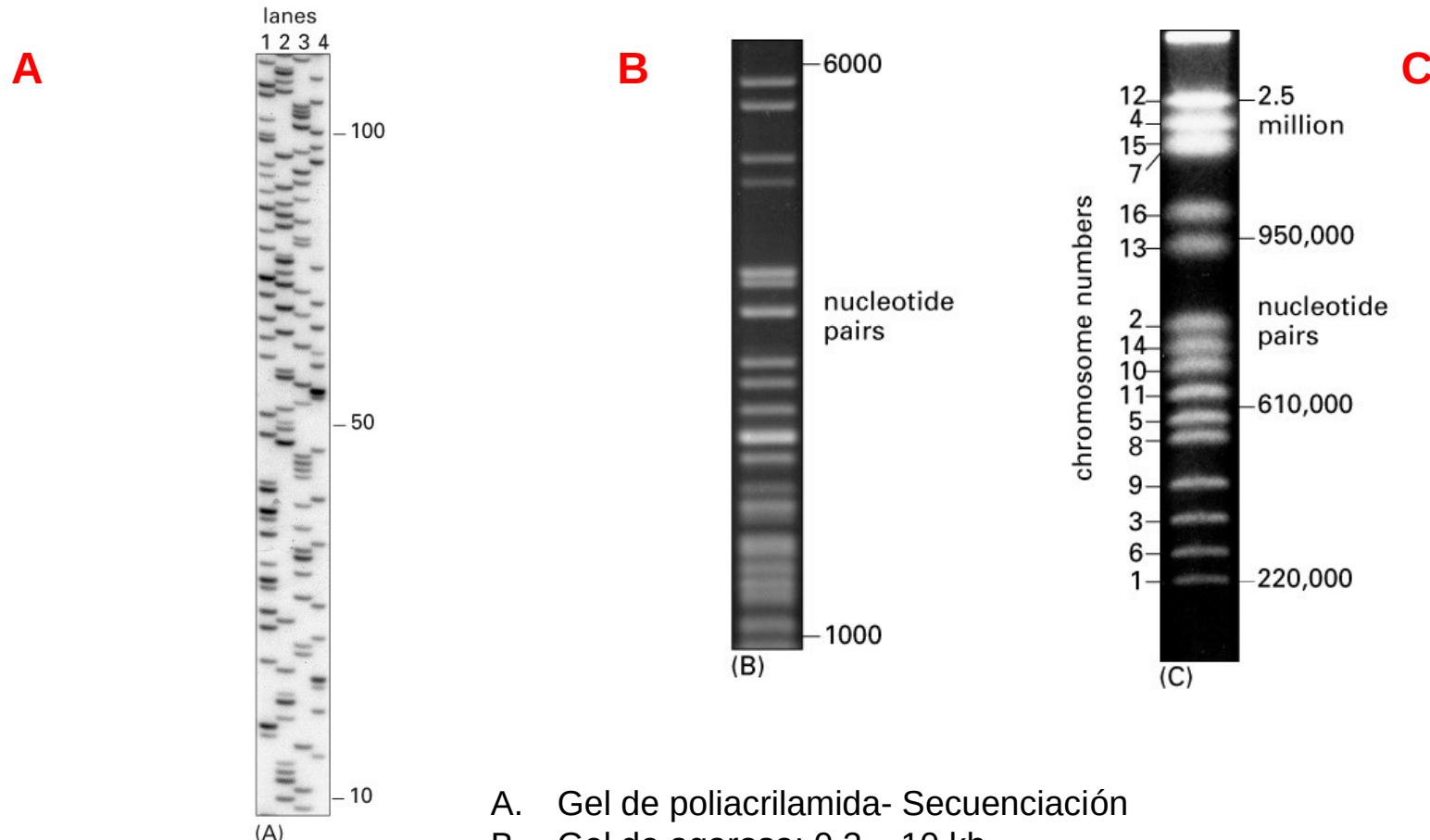
Main markers used in molecular ecology. The marker types are described in the subsequent sections below

	Single locus	Codominant	PCR assay	Overall variability
Mitochondrial and chloroplast DNA				
RFLP	Yes	Haplotypes	Yes	Low/medium
Sequence	Yes	Haplotypes	Yes	Low–high
Nuclear multilocus				
Minisatellite and microsatellite fingerprints	No	No	No	High
RAPD	No	No	Yes	High
AFLP	No	No	Yes	High
Ribosomal DNA ^a	No	No	Yes	Medium/high
Nuclear single locus				
Allozymes	Yes	Yes	No	Low/medium
Minisatellites	Yes	Yes	Not usual	High
Microsatellites	Yes	Yes	Yes	High
Sequence	Yes	Yes	Yes	Low–high

Notes: Codominant markers are those in which homozygotes and heterozygotes can be distinguished.
RFLP, restriction fragment length polymorphism; RAPD, randomly amplified polymorphic DNA; AFLP, amplified fragment length polymorphism.

^aMostly used in microbial molecular ecology.

Diferentes marcadores utilizados en análisis evolutivos y ecológicos

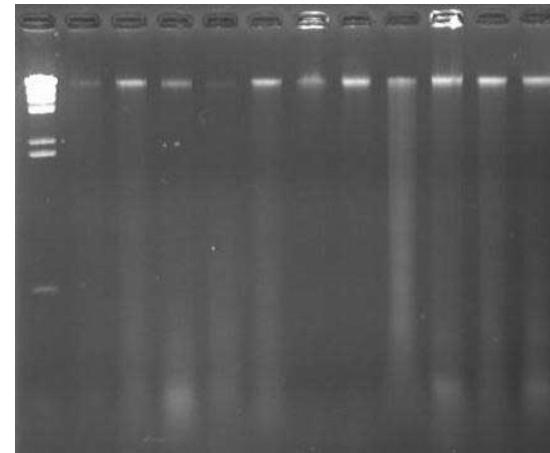


- A. Gel de poliacrilamida- Secuenciación
- B. Gel de agarosa: 0.3 – 10 kb
- C. Gel de agarosa: electroforesis en pulsos;
separación de moléculas muy grandes como cromosomas
completos (*S. cerevisiae*)

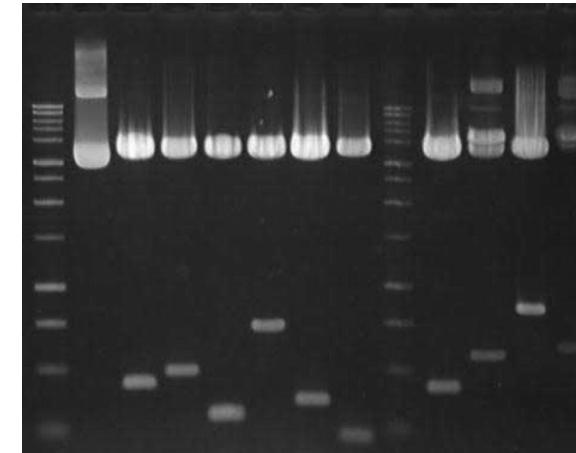
Diferentes marcadores utilizados en análisis evolutivos y ecológicos

Microsatélites

DNA



Amplificación por PCR



Microsatélite loci de
Paphiopedilum rothschildianum
(orquídea)

TGAACAAACACACACACACACACAC
ACAC TGTGTGTTGCCTTATTCA GTG
GTTTGTGTTGCCCTTGATCAGCTAAA
TCCACATTACCTAGGAAC TTATTAGAA
ATGAAAGTCCTGGACTCCACCCCCAG
ACACACTGAATCAGAAACTCTGGCGG
CTGGGGGAGGGTGGGGGGCAGTAAT
TTAATTGTGTTTAAAAAGCTCTCCAA
GTGATTCTGGCGATGCACATTATCTT
TAAAAACTCCCAATCCACTGATAAATG
TGTGTGTGTATGTGTGTGGTGT
GTGTGTTGCTCC

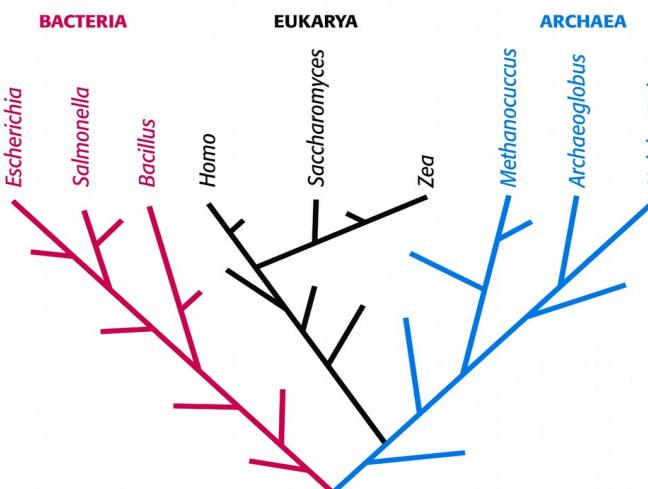
Análisis que se pueden realizar con marcadores moleculares

Caracteres universales

(A) Met - Lys - Arg - Ile - Ser - Thr - Thr - Ile - Thr - Thr - Thr - Ile - Thr - Ile - Thr - Thr -
5' AUG AAA CGC AUU AGC ACC ACC AUU ACC ACC ACC AUC ACC AUU ACC ACA 3'

(B) Met - Lys - His - Ile - Pro - Phe - Phe - Phe - Ala - Phe - Phe - Phe - Thr - Phe - Pro - Stop
5' AUG AAA CAC AUA CCG UUU UUC UUC GCA UUC UUU UUU ACC UUC CCC UGA 3'

(C) Met - Thr - Arg - Val - Gln - Phe - Lys - His - Pro - Asp -
5' AUG ACA CGC GUU CAA UUU AAA CAC CAC CAU CAU CAC CAU CAU CCU GAC 3'



Genomas extranucleares u organelares o DNA

Mitocondria : mtDNA

Cloroplasto : cpDNA

Teoría de endosimbiontes: ancestro eucariote invadido por procariote (fotosintético o no fotosintético)

Similitudes con procariotes actuales

Cloroplasto: Promotores, ribosomas

Mitocondria: Ribosomas (Agrobacteria, Rhizobacteria)

Movimiento de DNA de organelos a núcleo y vs.

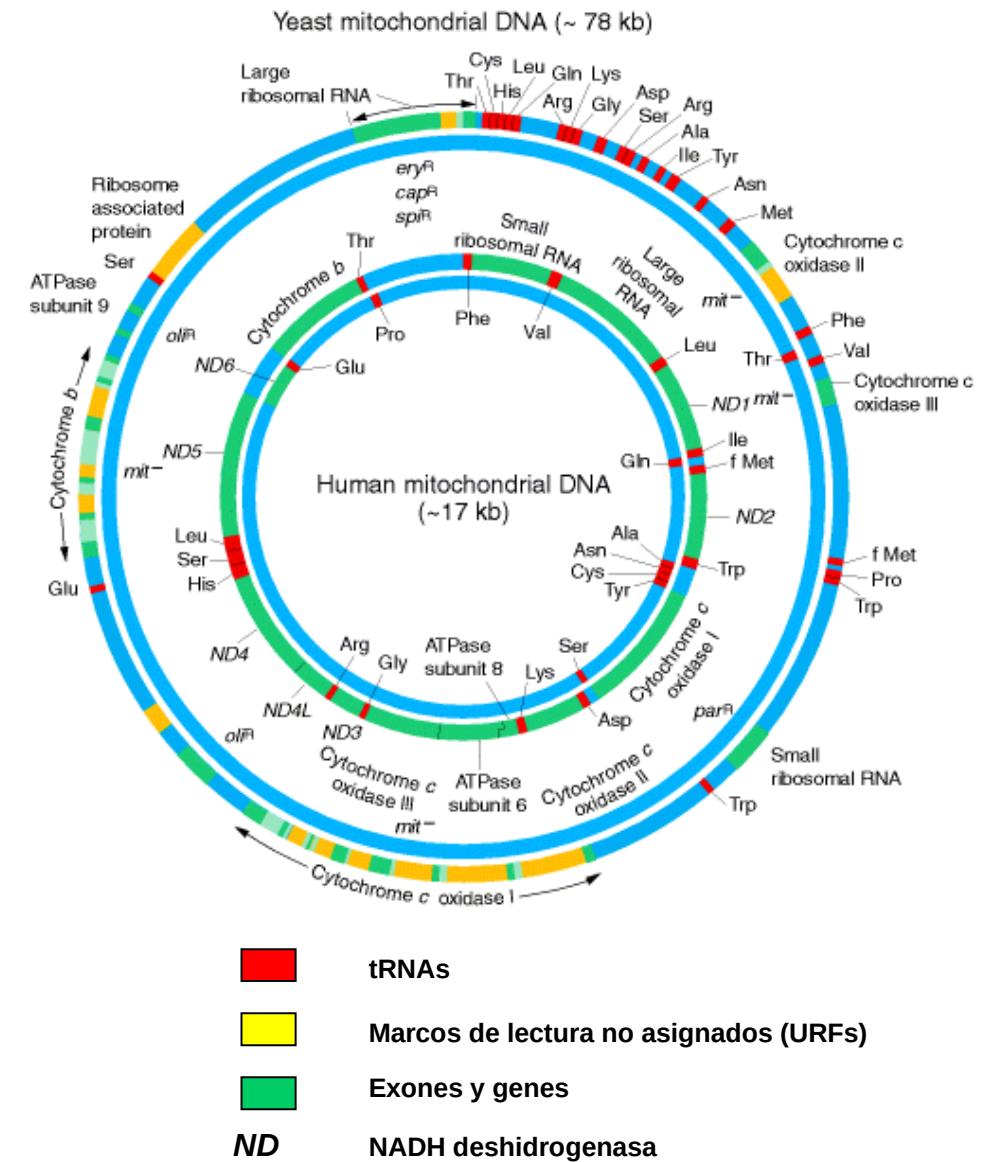
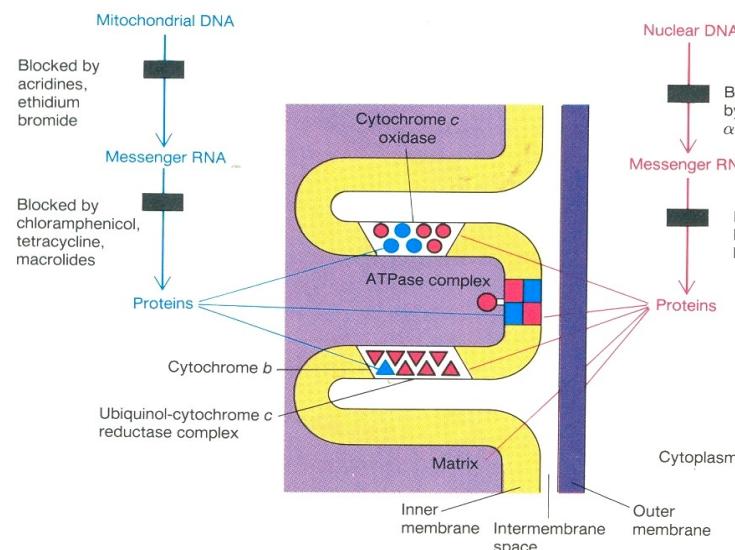
Genoma mitocondrial (mtDNA)

Molécula **circular** de tamaño variable (17 kb humano, 78 kb levadura).

Codifica:

genes para la síntesis proteica mitocondrial (tRNAs, rRNAs)

Genes para algunas proteínas asociadas a la cadena respiratoria y a la fosforilación oxidativa (COI, COX).

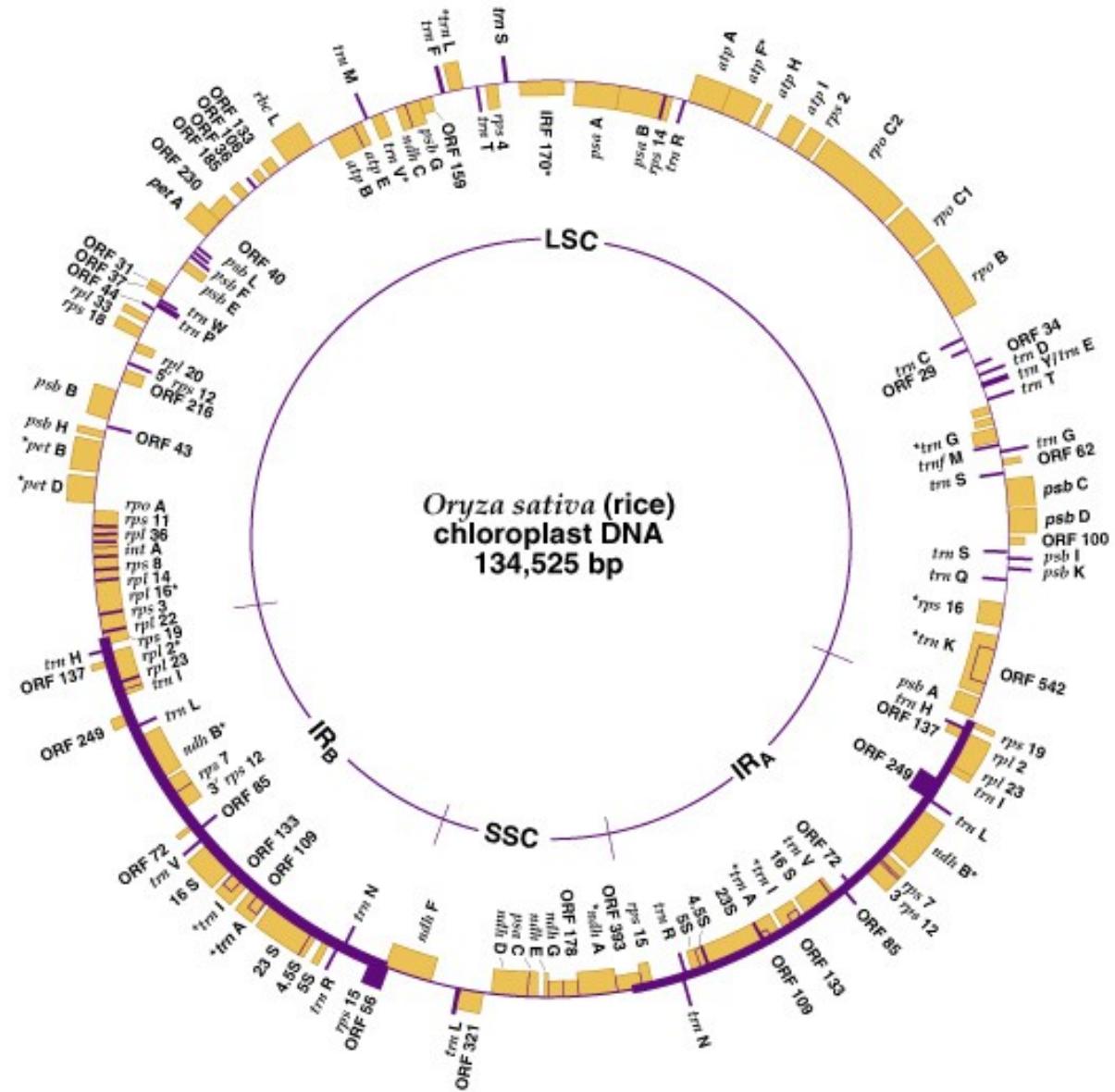


Genoma de cloroplasto (cpDNA)

Molécula circular (120-200 kb),
Una a cientos de copias/cel

Codifica para:

- ✓ subunidades de transcripción (cp RNA pol)
 - ✓ síntesis de proteínas (tRNA's, rRNAs).
 - ✓ genes para fotosíntesis y transporte electrónico.
 - ✓ Tienen espaciadores



Tipos de análisis que permiten realizar los marcadores moleculares :

- Estimación de sistemas de apareamiento dentro de una población
- Probar hipótesis de adaptaciones ecológicas.
- Elaboración de mapas genéticos que permitan revisar el número de genes involucrados en una característica
- Biología de la conservación
- Filogeografía.- variación genética dentro y entre spp cercanamente emparentadas
- Genómica, proteómica y demás omicas

Tipos de análisis que permiten realizar los marcadores moleculares :

- Estimación de la variación dentro de poblaciones
- Estimación de la estructura genética y poblacional (proporciones frecuencias alélicas y su distribucion en poblaciones naturales)
- Inferencia de los procesos evolutivos que actuan en poblaciones (eg. Deriva génica y Flujo; Directo-análisis de paternidad; Indirecto-FST)
- Establecimiento de hipótesis de relaciones filogenéticas
- Comparación de linajes

Las principales regiones de DNA repetitivo en el DNA

TABLE
2.3

Main classes of repetitive DNA found in eukaryotic genomes

DNA	Typical sequence length (bp)	Location
Satellites (> 10^6 repeats/genome)	5–100	Tandem arrays, scattered throughout the genome
Minisatellites (> 10^3 loci/genome)	20–300	Tandem arrays up to 5 kb in length, scattered throughout the genome
Microsatellites (> 10^4 loci/genome)	1–6	Tandem arrays up to a few 100 bp in length, scattered throughout the genome
Telomeres	4–8	Tandem arrays up to 1 kb in length, at the ends of each chromosome
SINEs (> 10^5 / genome)	100–300	Interspersed throughout the genome
LINEs (> 10^3 /genome)	1–5 k	Interspersed throughout the genome

Marcadores Moleculares

Los **microsatélites** o secuencias simples repetidas (SSR):

- Son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por todo el ADN.
- Estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips *et al.* 1995; Valadez y Kahl 2000)

Microsatélites

- Los microsatélites son SSR (Short Sequence Repeat) o STR (Short Tandem Repeat)
- Secuencias de ADN en las que un pequeño fragmento (cuyo tamaño va 1-6 nt) se repite de manera consecutiva (tandem).
- La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos los cuales se distinguen entre sí por la longitud total del fragmento.
- Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del DNA.
- Son marcadores neutros,
- Codominantes
- Alta tasa de mutación: muy polimórficos.
- Permiten hacer análisis con un gran número de individuos

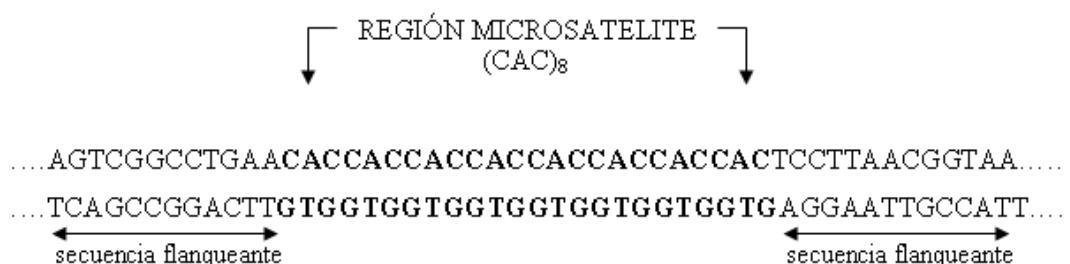
Microsatélites

Se **clasifican** de acuerdo al número de nucleótidos que posea el motivo de repetición como: mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótido.

La clasificación también incluye el patrón de orden de los motivos:

- * **Puro o perfecto:** Un solo motivo repetido n veces en serie. ej: (AC)9
- * **Puro interrumpido:** Un solo motivo repetido n veces, donde se intercalan nucleótidos entre las distintas repeticiones. ej: (CA)2AA(CA)12
- * **Compuestos:** Dos o más motivos repetidos en serie. ej: (GT)2(TG)10
- * **Compuestos interrumpidos:** Al menos uno de sus motivos presenta nucleótidos intercalados. ej: (CT)4(GT)2CTAT(GT)15
- * **Complejos:** Combinaciones entre cualquiera de las clases anteriores, sin ningún patrón de orden definido. ej: (ACC)8+TG+(GA)12+(TTA)5+GC+(TTA)4

Microsatélites



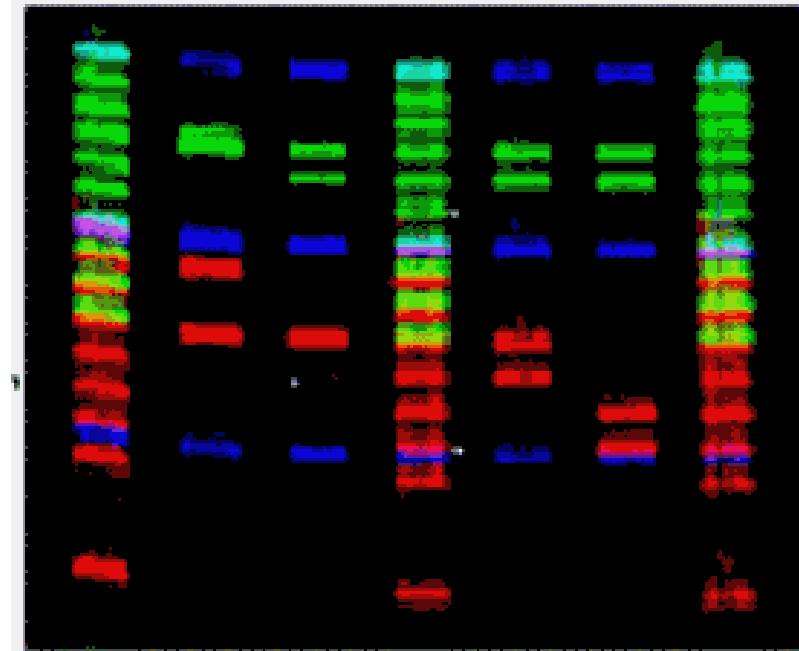
REGIÓN MICROSATÉLITE

Amplificación de los fragmentos

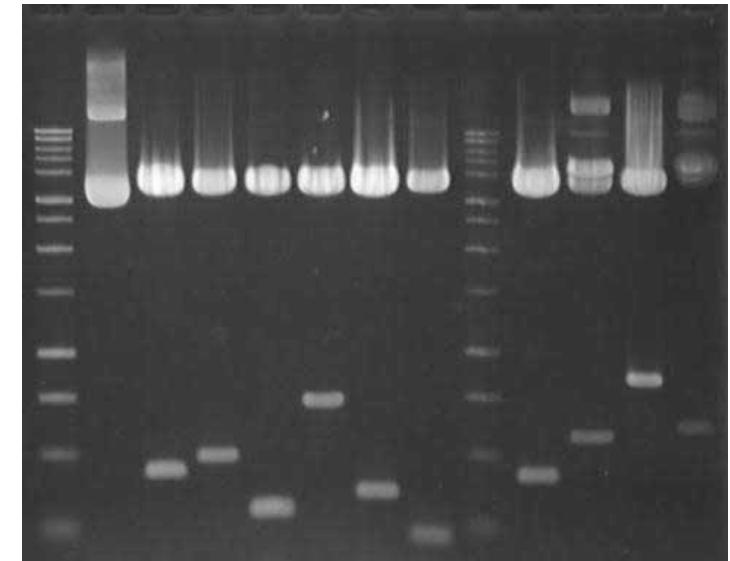
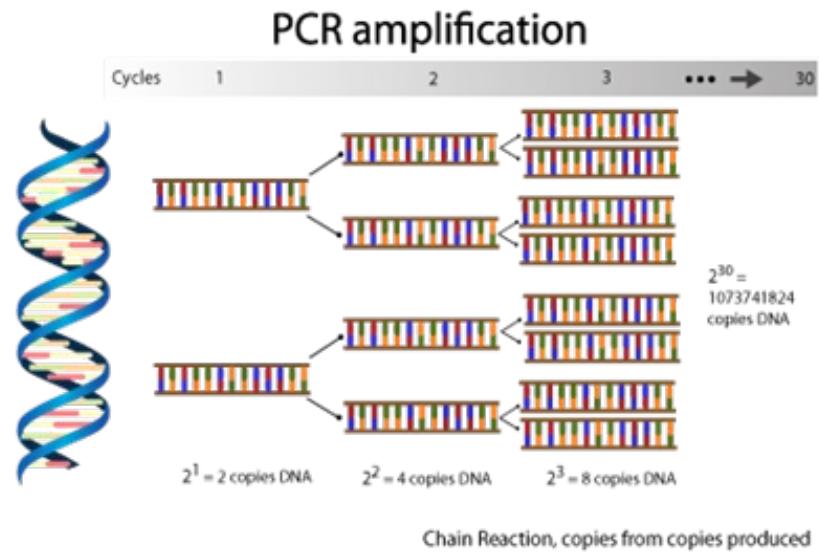
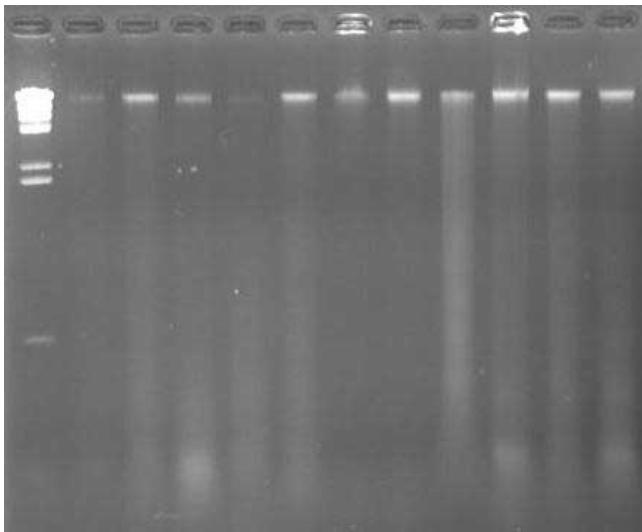
A horizontal line with four shorter horizontal dashes above it.

Separación de los fragmentos

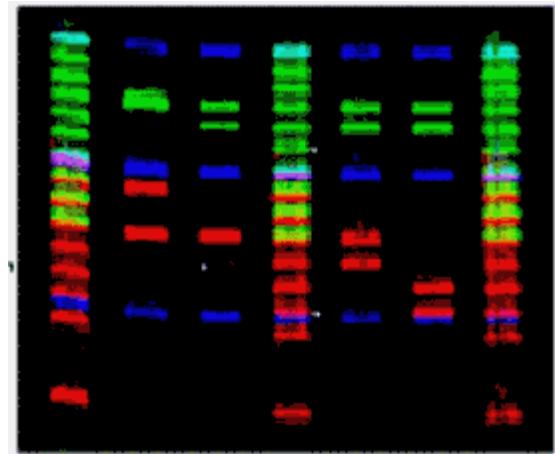
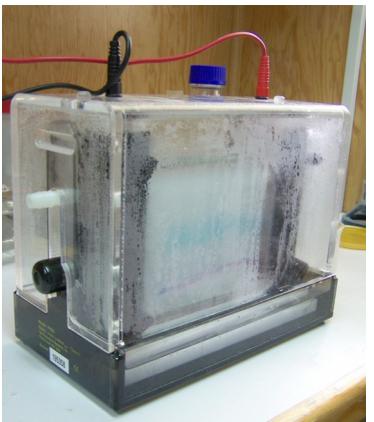
Campo eléctrico



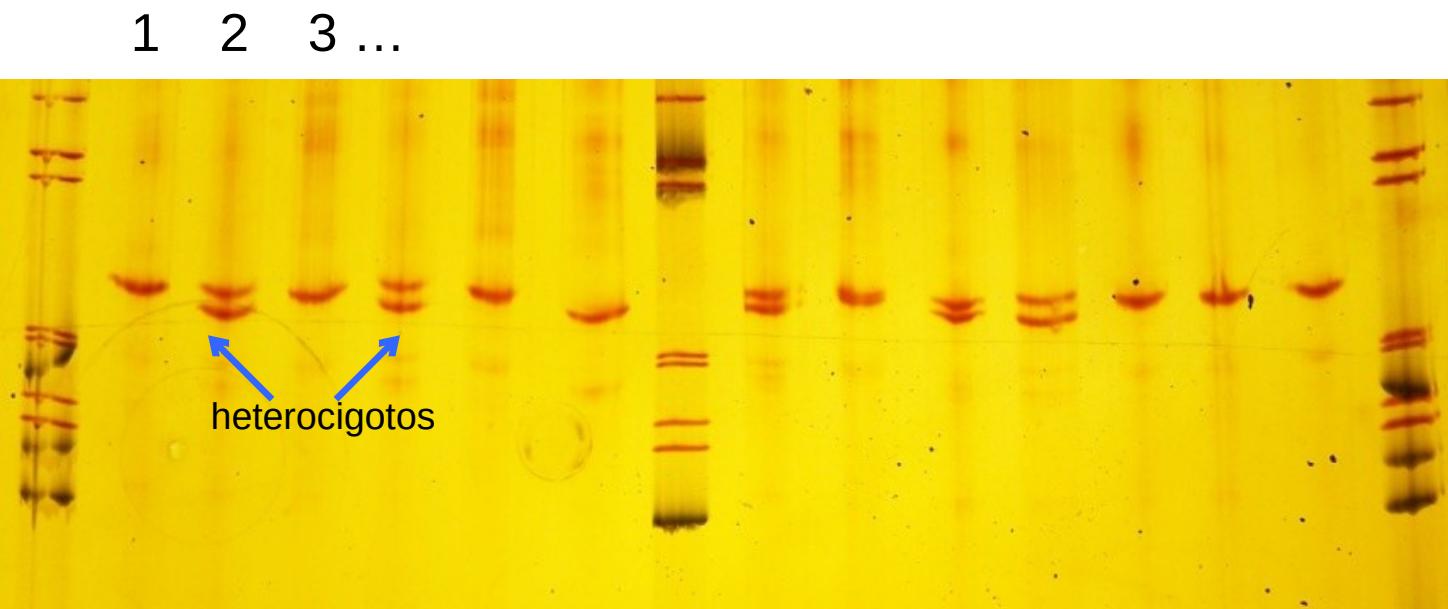
Obtención de Microsatélites



Microsatélites



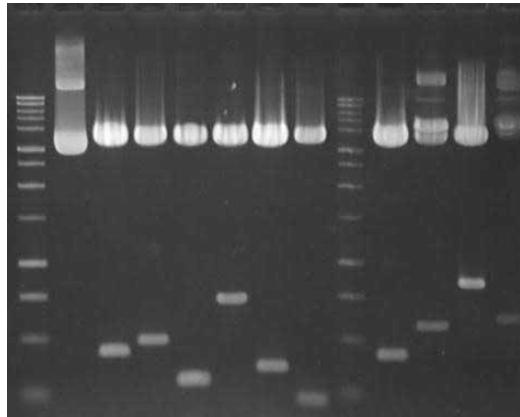
Electroforesis en acrilamida



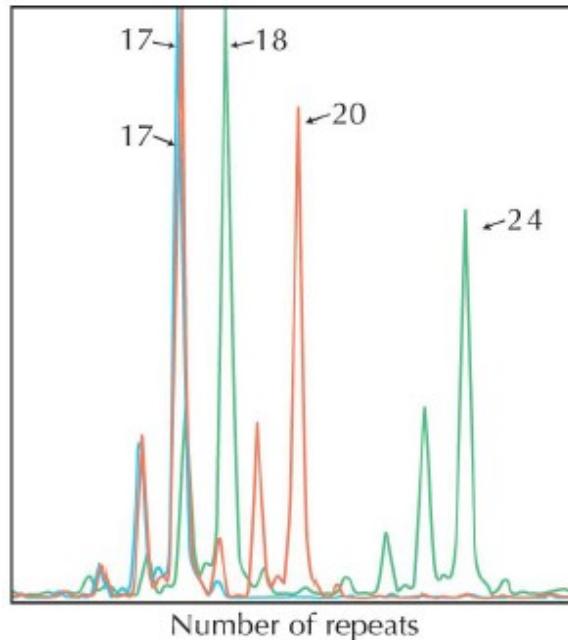
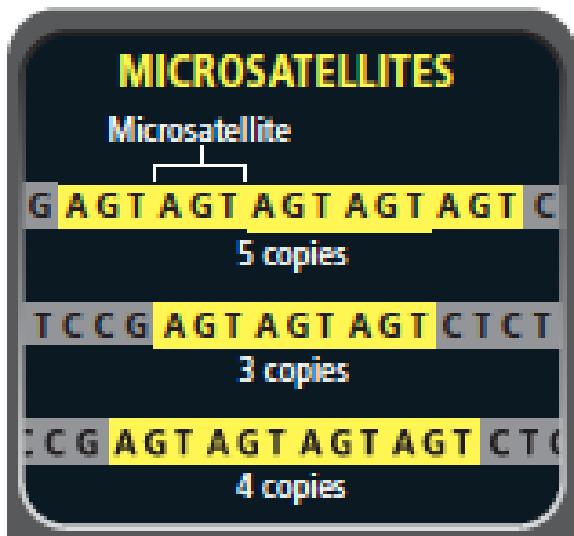
Mientras más heterocigos, mas diversa es una población

Microsatélites

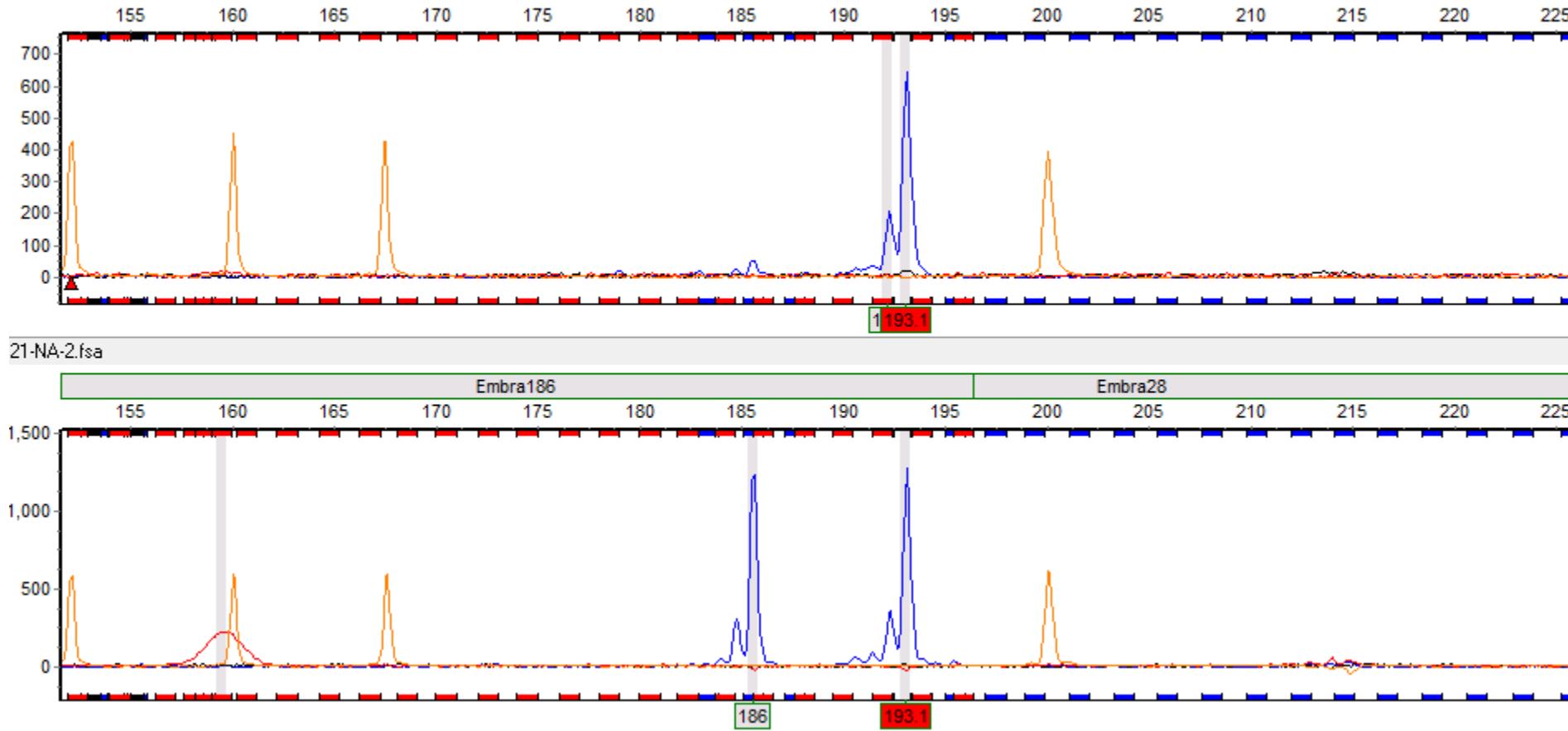
TGAACAAACACACACACACACACAC
ACAC TGTGTGTTGCCTTATTCA GTG
GTTTGTGTTGTCCTTGATCAGCTAAA
TCCACATTACCTAGGAACCTATTAGAA
ATGAAAGTCCTTGGACTCCACCCCCAG
ACACACTGAATCAGAAACTCTGGCGG
CTGGGGGAGGGTGGGGGGCAGTAAT
TTAATTGTGTTAAAAAGCTCTCCA
GTGATTCTGGCGATGCACATTATCTT
TAAAAACTCCCAATCCACTGATAAAATG
TGTGTGTGTATGTGTGTGGTGT
GTGTGTTGCTCC



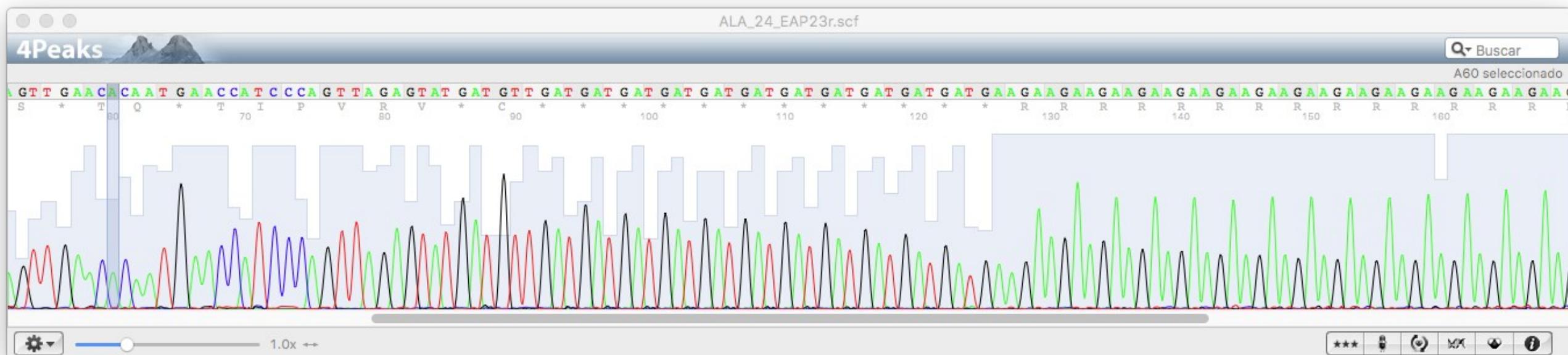
Microsatélite loci de
Paphiopedilum rothschildianum
(orquídea)



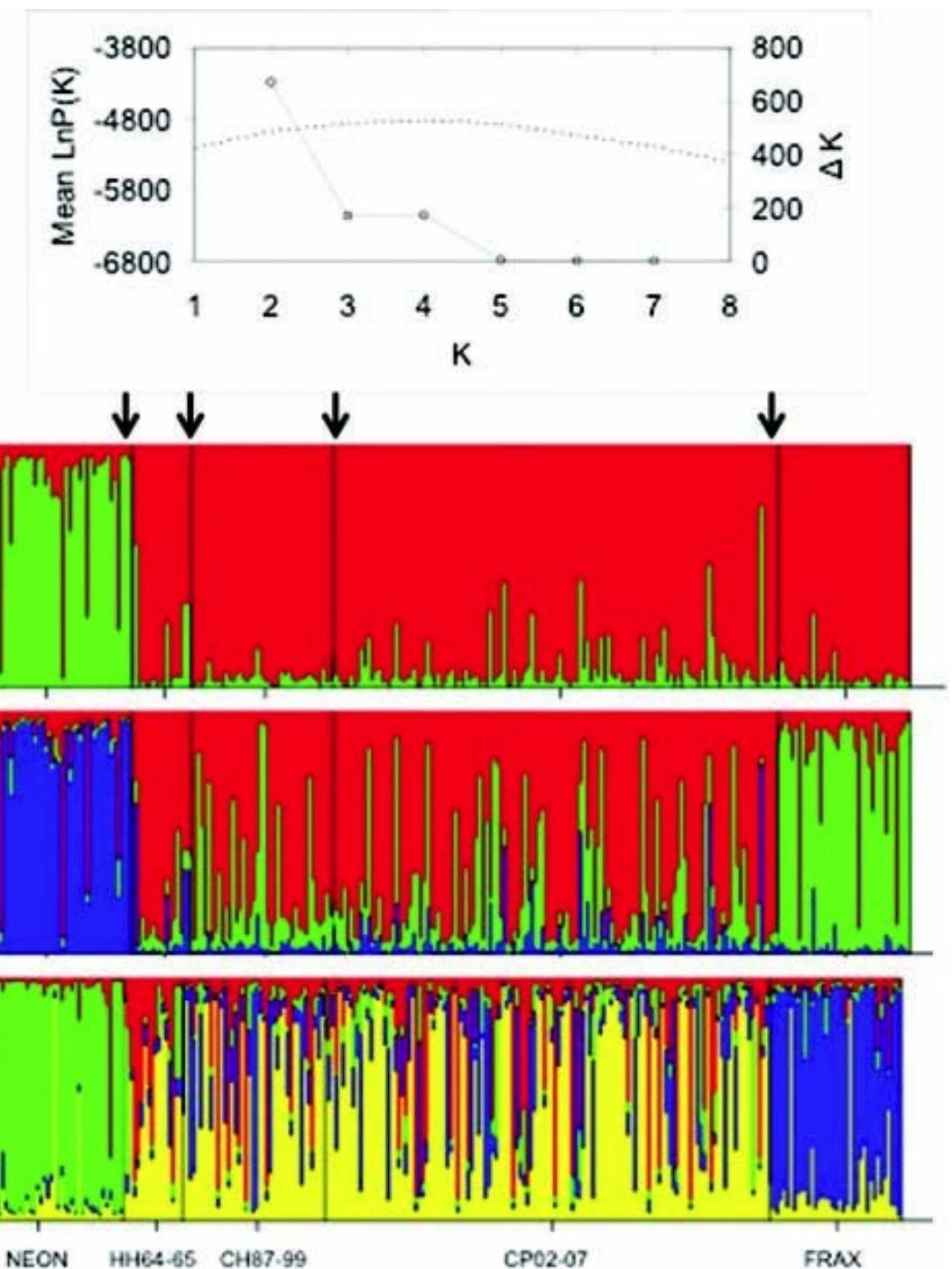
Primer 4536-Azul-



Secuencia de un microsatélite compuesto



Análisis poblacional (Estructura genética) a partir del uso de microsatélites



Análisis poblacional (Estructura genética) a partir del uso de microsatélites

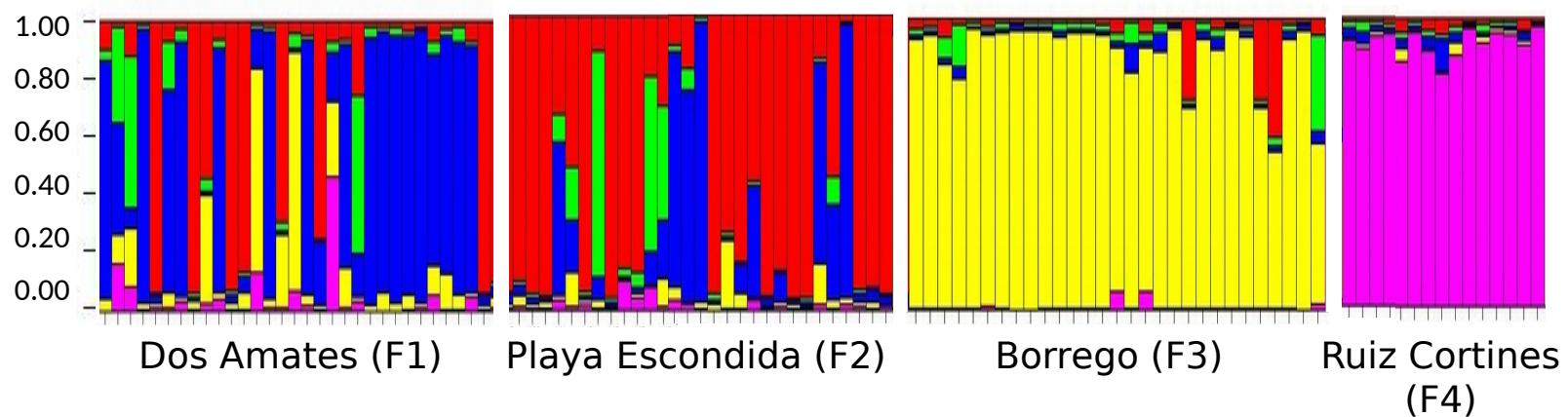
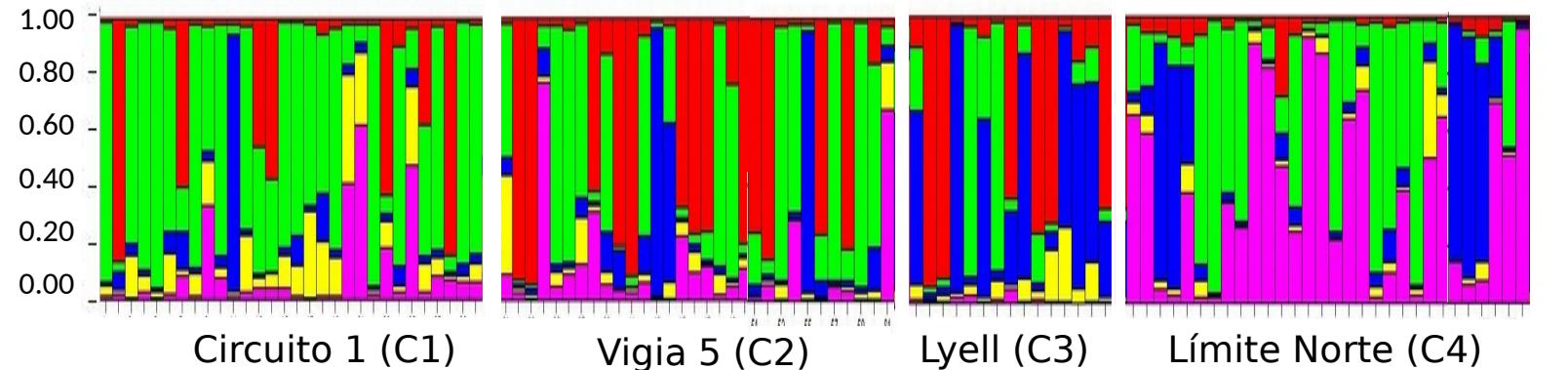


Tabla II. Parámetros estimativos de diversidad genética determinados en 12 loci microsatelitales en caballo Criollo chileno. (Genetic diversity parameters determined in 12 microsatellite loci analyzed in Chilean Creole horses).

Loci	Nº de alelos	Ho	He	CIP	PE	F _s	DE	P
VHL20	9	0,900	0,812	0,776	0,444	-0,112	0,004	0,945
HTG4	5	0,600	0,748	0,697	0,333	+0,192	0,004	0,071
AHT4	8	0,600	0,659	0,622	0,261	+0,110	0,019	0,244
HMS7	10	0,525	0,838	0,807	0,493	+0,341	0,000	0,001
HTG6	6	0,650	0,733	0,682	0,317	+0,107	0,011	0,093
AHT5	7	0,725	0,849	0,817	0,501	+0,149	0,004	0,048
HMS6	9	0,725	0,777	0,735	0,387	+0,176	0,001	0,007
ASB2	8	0,500	0,820	0,786	0,456	+0,407	0,000	0,000
HTG10	10	0,825	0,883	0,858	0,586	+0,093	0,014	0,154
HTG7	4	0,575	0,520	0,471	0,138	-0,099	0,005	0,063
HMS3	8	0,775	0,787	0,744	0,394	+0,053	0,015	0,241
HMS2	7	0,500	0,784	0,745	0,396	+0,332	0,000	0,000

Heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada (He), contenido de información polimórfica (CIP), probabilidad de exclusión (PE), deficiencia de heterocigotos (F_s), desviación estándar (DE) y valor P (P).

Programas para análisis con microsatélites y otros marcadores moleculares

Genética de Poblaciones

- Arlequin
- Genepop
- Fstat
- Popgen
- LAMARC
- TFPGA
- DNAsp

Secuencias:

- Sequencher
- Mega
- Geneious

¡GRACIAS!

rtapia@ecología.unam.mx