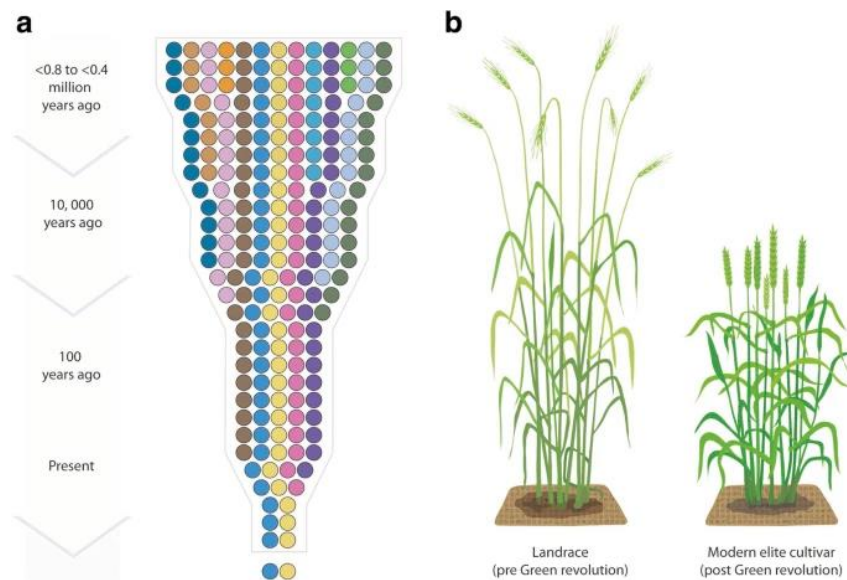


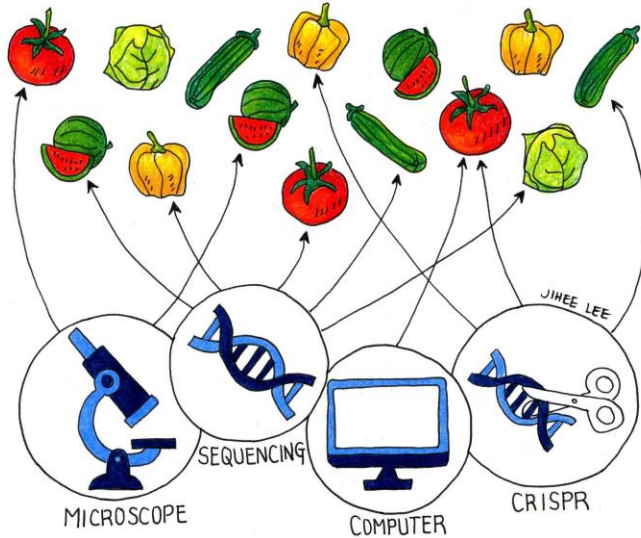
Μοριακοί δείκτες

Βελτίωση μέχρι τώρα!

- Η επιτυχία της κλασσικής βελτίωσης στηρίχτηκε κυρίως στις εξελίξεις της επιστήμης της γενετικής τον προηγούμενο αιώνα και στην ενσωμάτωση των γνώσεων και των μεθοδολογιών της ποσοτικής και της πληθυσμιακής γενετικής



Βελτίωση με νέα μέσα



- Η μεγάλη πρόκληση συνεπώς για τους επιστήμονες που ασχολούνται σήμερα με την έρευνα και τις εφαρμογές της βελτίωσης των φυτών είναι να μεταφραστεί και να ενσωματωθεί η νέα γνώση από τη γονιδιωματική και τη μοριακή βιολογία στα κατάλληλα εργαλεία και μεθοδολογίες για τη χρήση τους σε προγράμματα βελτίωσης φυτών, ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητά της και να ανταποκριθεί με την παραγωγή κατάλληλων ποικιλιών που να διασφαλίσουν την επάρκεια τροφίμων, παγκοσμίως

Μοριακή βελτίωση

- Ο όρος «Μοριακή Βελτίωση» χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα διεπιστημονικό πεδίο της σύγχρονης βελτίωσης των φυτών που συνδυάζει τεχνικές και μεθόδους της Μοριακής Βιολογίας με συμβατικές βελτιωτικές μεθοδολογίες, για την παραγωγή νέων βελτιωμένων ποικιλιών.

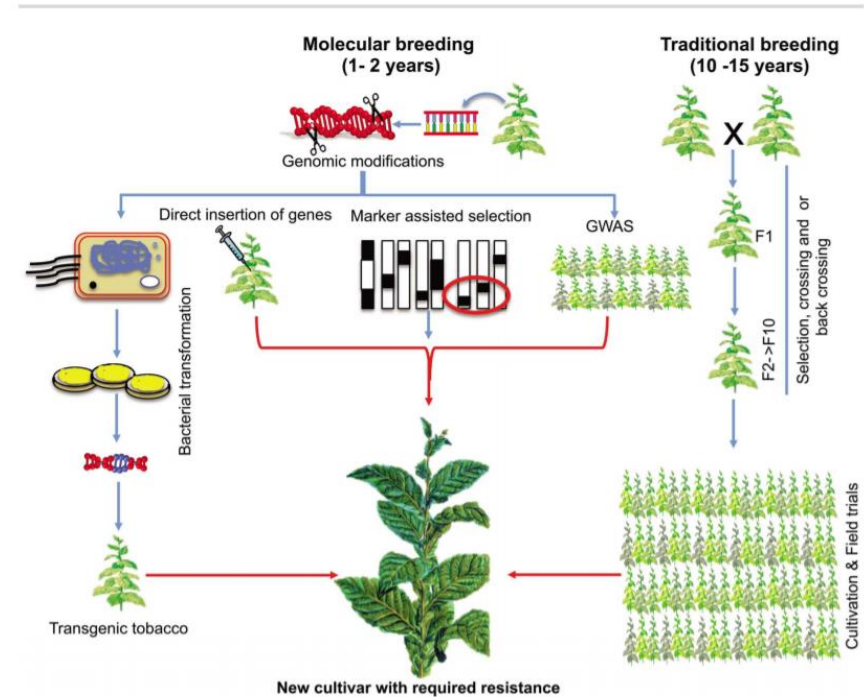


Figure 10. A comparative summary of traditional and molecular breeding in tobacco, citing distinctive stages and methods utilized for generating disease-resistant cultivars. In Figure, 'Genomic modifications' represent all types of alterations/additions/deletions/substitutions carried out in the genome of tobacco plant. For example, epigenetic silencing, gene knockdown, mutagenesis, gene editing techniques and reverse breeding, etc.

Οι κυριότερες τεχνικές της μοριακής βιολογίας με εφαρμογές στη βελτίωση



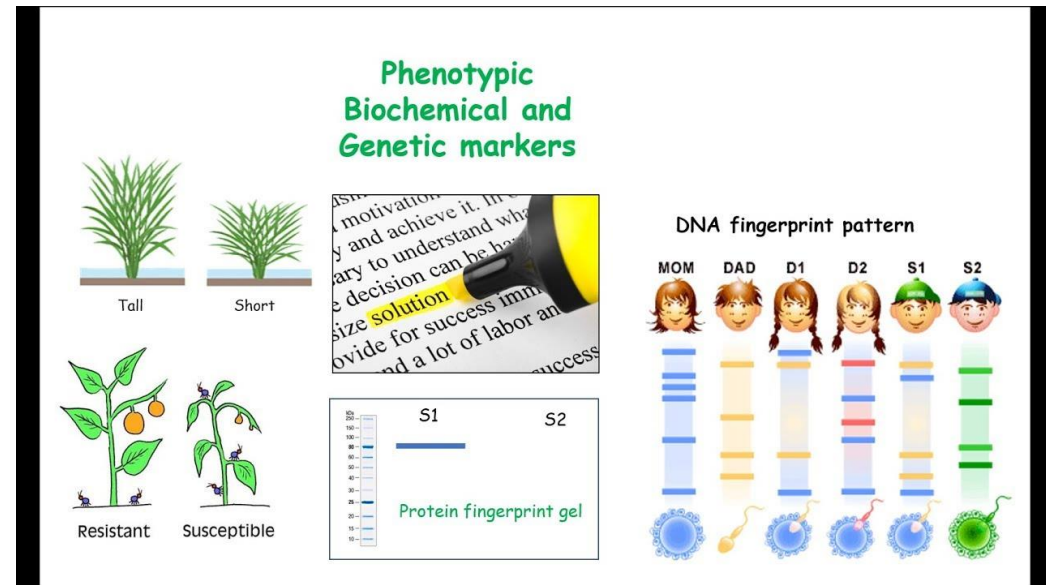
PCR

Αλληλούχιση

Κλωνοποίηση
γονιδίων

Ορισμός

- Μετά από αυτή την εισαγωγή μπορούμε να ορίσουμε ότι γενετικός δείκτης είναι **μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA με γνωστή θέση** πάνω στο χρωμόσωμα που **μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ατόμων σε έναν πληθυσμό**. Μπορεί να περιγραφεί σαν μια παραλλακτικότητα (που προέρχεται από μετάλλαξη ή αλλαγή σε μια θέση στο γονιδίωμα) η οποία μπορεί να ανιχνεύεται με κάποια τεχνική, είτε έμμεσα από τις διαφορές σε μορφολογικά ή βιοχημικά χαρακτηριστικά που επιφέρουν οι διάφορες μορφές της ή άμεσα με μοριακές τεχνικές όπως είναι η αλληλούχιση.



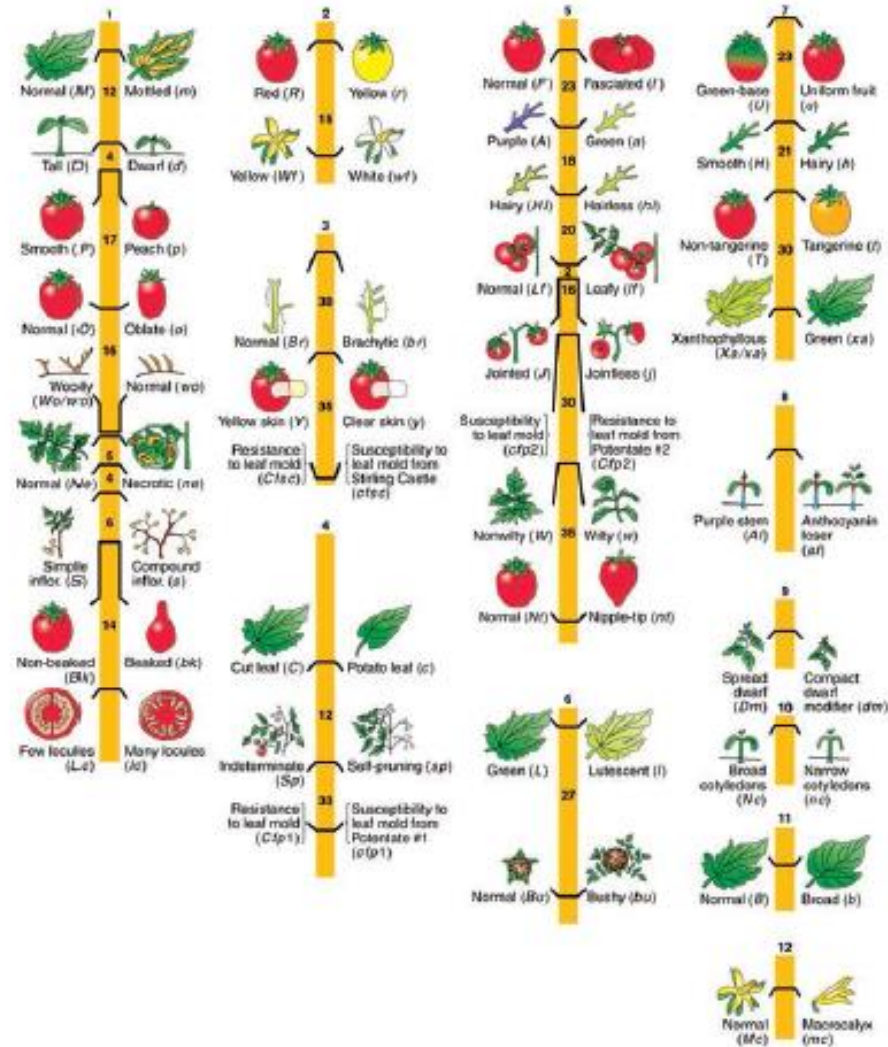
- **Τι είναι οι γενετικοί δείκτες?**
- Ένας δείκτης, στο πλαίσιο αυτό, είναι ένα αναγνωριστικό στοιχείο (μερικές φορές ονομάζεται "ετικέτα") μιας συγκεκριμένης πτυχής του φαινοτύπου ή / και του γονότυπου/ η κληρονομήση του μπορεί εύκολα να εντοπιστεί από γενιά σε γενιά.
- Οι Δείκτες μπορεί να είναι: **Μορφολογικοί**: φαινοτυπική μεταβολή η οποία είναι βαθμολογίσιμη στη βάση των ατομικών φυτών (π.χ. άνθηση) .
- **Βιοχημικοί** : παραλλαγές στο μέγεθος ή στο καθαρό φορτίο μιας πρωτεΐνης (π.χ. τα ισοένζυμα) ή στη χημική σύνθεση ενός μεταβολίτη (π.χ. σάκχαρα)
- **Μοριακοί**: παραλλαγές στην αλληλουχία DNA (π.χ. μικροδορυφόροι)



Image: CGIAR

In these beans, seed colour, shape and size could all be useful as morphological markers.

Μορφολογικοί δείκτες

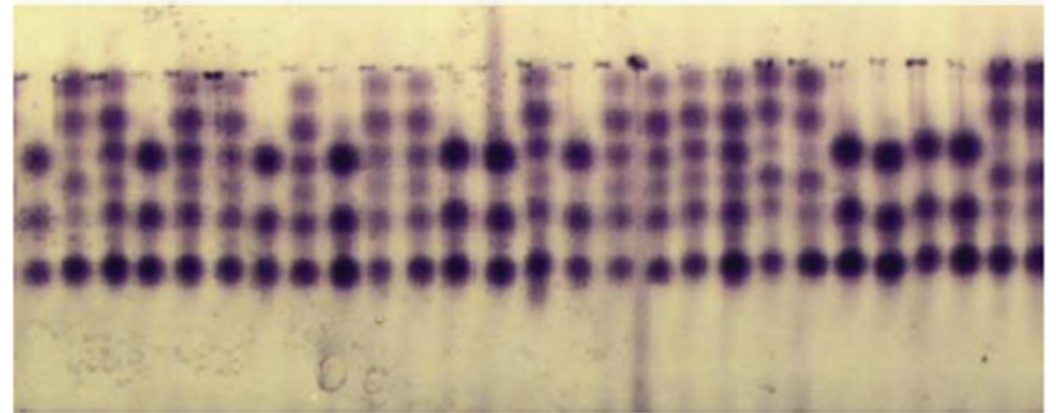


Εικόνα 34: Ένας χάρτης σύνδεσης της τομάτας του 1952. Κάθε θέση(locus) συνοδεύεται στα πλάγια με εικόνες του κανονικού (άγριου τύπου) φαινότυπου και παραλλαγών του. Οι αποστάσεις μεταξύ των θέσεων δίνονται σε μονάδες χάρτη (map units). Από το βιβλίο "An Introduction to Genetic Analysis 8th Edition, by Anthony J. F. Griffiths, Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, and William M. Gelbart.

Αλλοενζυμο-Ισοενζυμο

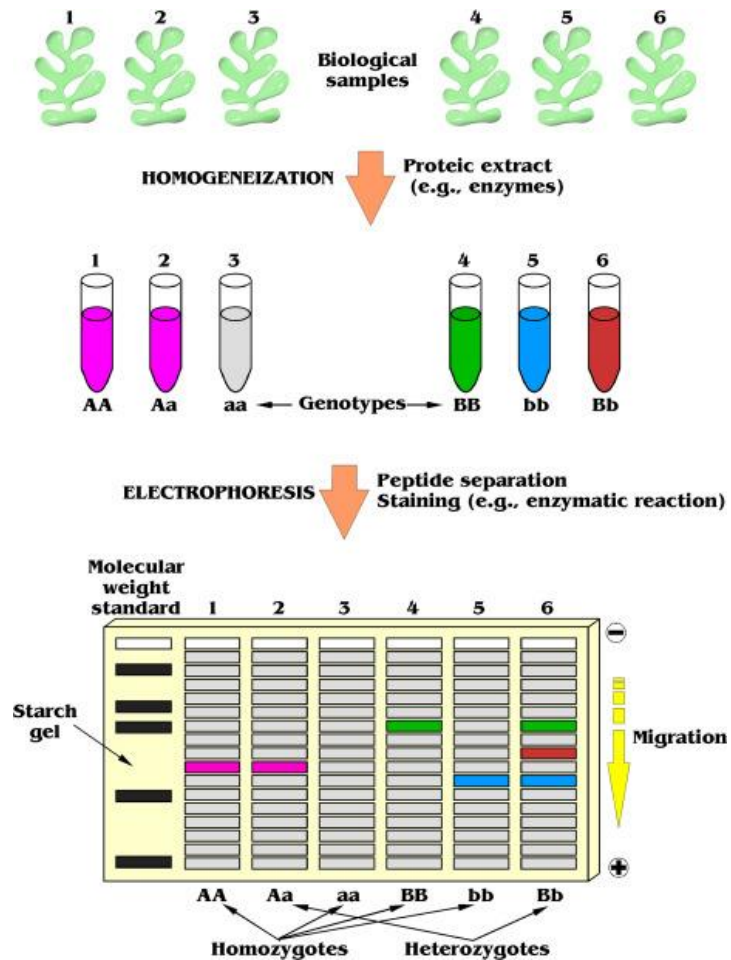
- Ο όρος **αλλοένζυμο (allozyme)** προορίζεται για τα ένζυμα που προέρχονται από αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου.

. Τα **ισοένζυμα** (αποτελούν πολλαπλές μορφές ενός ενζύμου, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το υπόστρωμα στο οποίο δρουν, τη μέγιστη δραστηριότητα, ή τις ρυθμιστικές τους ιδιότητες. Ο όρος αναφέρεται σε ενζυμικούς πολυμορφισμούς που προκύπτουν από διαφορετικούς γενετικούς τύπους.



Εικόνα 35: Ισοενζυμική παραλλακτικότητα διαφορετικών γενοτύπων σε ηλεκτροφόρηση αμύλου. Κάθε ζώνη αντιστοιχεί σε ένα ισοένζυμο.

Χαρακτηριστικά μοριακών δεικτών



- Οι γενετικοί δείκτες για να είναι χρήσιμοι στη γενετική ανάλυση, δηλαδή να μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση διαφορετικών ατόμων ή με άλλα λόγια διαφορετικών γενότυπων πρέπει να ικανοποιούν τα εξής κριτήρια:
- να είναι πολυμορφικοί,
- να κληρονομούνται συγκυρίαρχα (ώστε τα ετεροζύγωτα άτομα να ξεχωρίζουν από τα ομοζύγωτα)
- τα χαρακτηριστικά του κάθε αλληλόμορφου να είναι ευδιάκριτα (ώστε τα διαφορετικά αλληλόμορφα να αναγνωρίζονται εύκολα),
- να κατανέμονται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το γονιδίωμα,

Συνεχεια..

5. να είναι ουδέτεροι
(χωρίς πλειοτροπικές
επιδράσεις),

6. να ανιχνεύονται εύκολα
(ώστε η διαδικασία της
ανάλυσης να μπορεί να
αυτοματοποιηθεί),

7. το κόστος ανάπτυξης και
ανάλυσης να είναι χαμηλό,
και τέλος

8. να παρουσιάζουν καλή
επαναληψιμότητα (ώστε τα
δεδομένα της ανάλυσης σε
διαφορετικά εργαστήρια
να ταυτίζονται).

Genetic linkage (Γενετική σύνδεση)

- Όταν 2 γενετικοί τόποι ή αλληλόμορφα γονιδίων βρίσκονται φυσικά πλησίον μεταξύ τους σε ένα χρωμόσωμα, είναι πιθανότερο να κληρονομηθούν μαζί. Εξετάζοντας πόσο συχνά κληρονομούνται μαζί και όχι ξεχωριστά ανάμεσα σε ένα σύνολο απογόνων από μια διασταύρωση, μπορούμε να υπολογίσουμε πόσο στενά συνδέονται μεταξύ τους.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

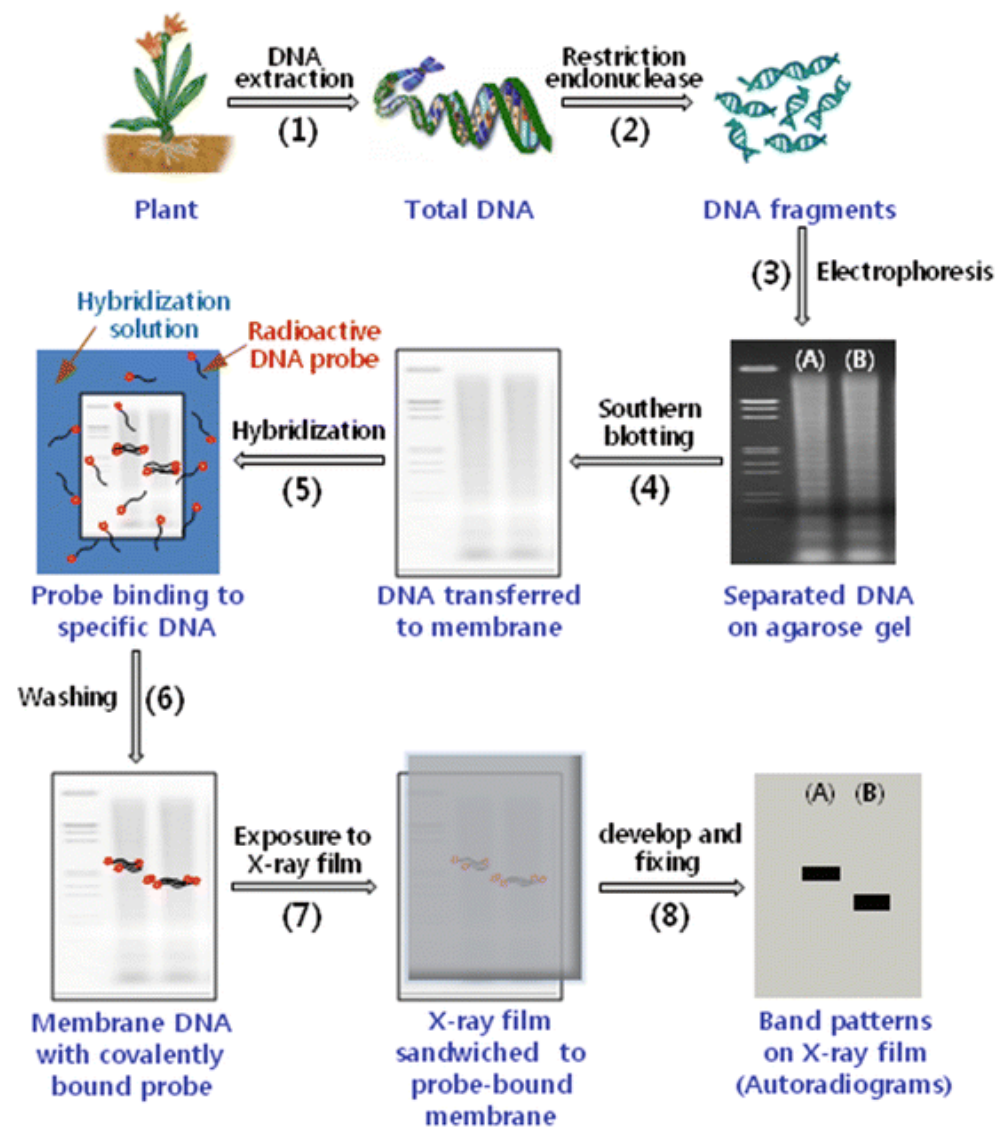
Γενική αρχή της μεθόδου:



Η ανάλυση του γονιδιώματος δίνει τη δυνατότητα διερεύνησης της ύπαρξης τη επιθυμητής θέσης. Αν η ανάλυση με τον μοριακό δείκτη είναι θετική (πχ υβριδισμός) σημαίνει ότι υφίσταται η επιθυμητή χρωμοσωμική περιοχή λόγω σύνδεσης.

Μοριακοί δείκτες

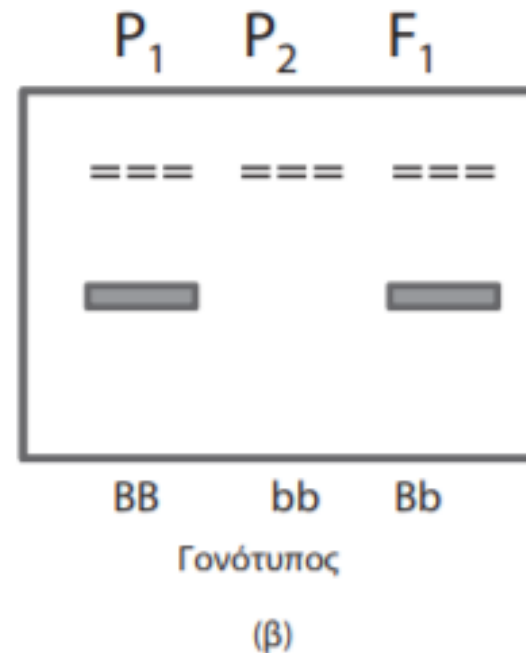
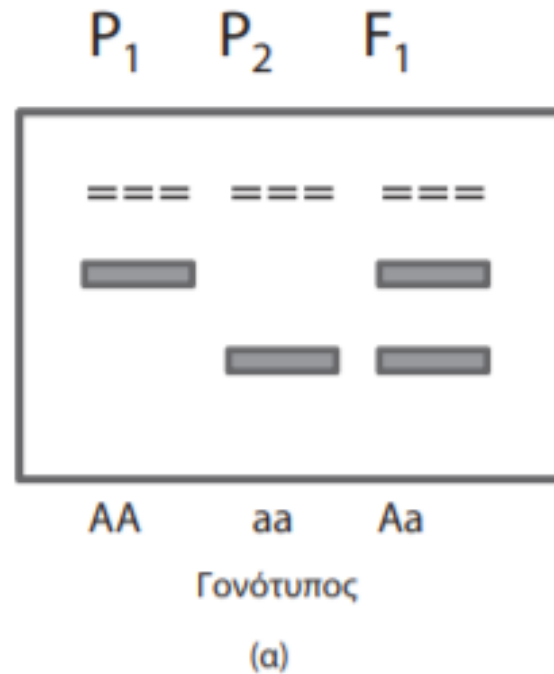
- Η βάση της ανάπτυξης μοριακών δεικτών είναι οι διαφορές στην αλληλουχία του DNA μεταξύ αλληλόμορφων γονιδίων και ο μεγάλος αριθμός κατηγοριών τους οφείλεται στις διάφορες τεχνικές με τις οποίες είναι δυνατή η ανίχνευση αυτών των διαφορών, ενώ συνεχώς νέες τεχνικές επιτρέπουν την ανάπτυξη νέων δεικτών κάθε χρόνο. Οι κύριες τεχνικές ανίχνευσης μοριακών πολυμορφισμών μπορεί να διαχωριστούν σε αυτές που βασίζονται στον **υβριδισμό** των νουκλεϊκών οξέων και σε αυτές που βασίζονται στον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας με **PCR**.



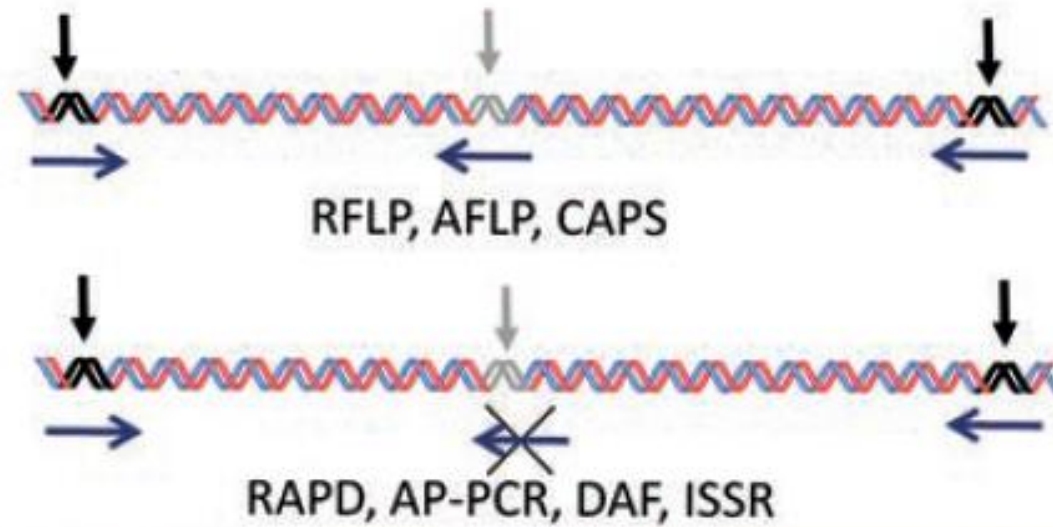
Χρήση των γενετικών δεικτών στη βελτίωση φυτών

- Απόκτηση καλύτερης κατανόησης των βελτιωτικών υλικών και του συστήματος βελτίωσης
- Ταχεία ενσωμάτωση των απλώς κληρονομούμενων γνωρισμάτων
- Έλεγχος στις πρώιμες γενεές.
- Μη συμβατική επίλυση προβλημάτων
- Η διάρκεια ζωής των νέων ποικιλιών μπορεί να παραταθεί μέσω της τεχνικής της πυραμιδοποίησης γονιδίων (gene pyramiding)

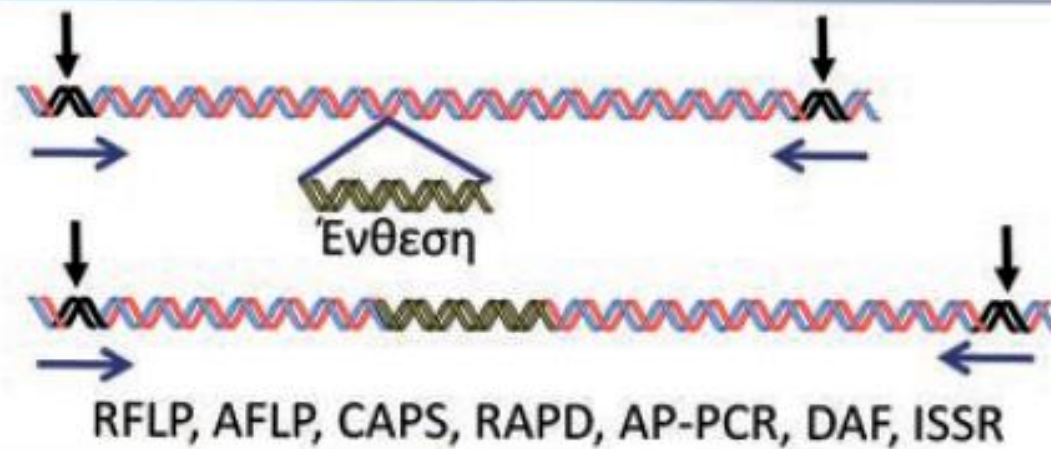
Οι δείκτες μπορεί να είναι (α) συγκυρίαρχοι ή (β) κυρίαρχοι, με τους πρώτους να παρουσιάζουν έναν ετεροζυγώτη και με τις δύο ζώνες.

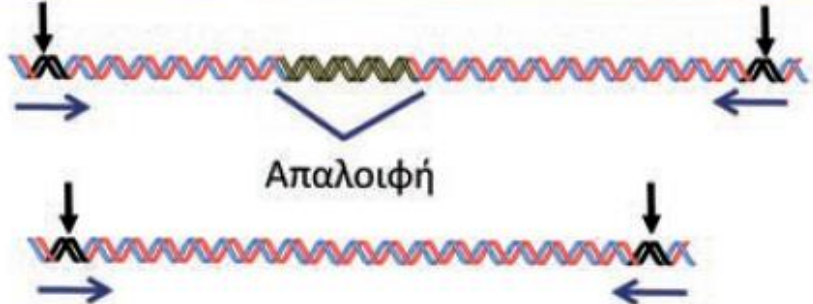
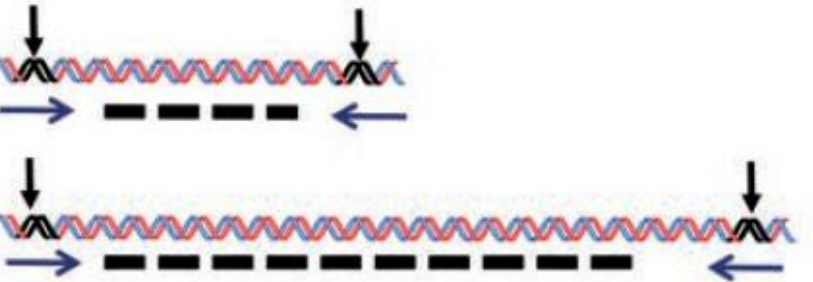


A. Μετάλλαξη σε μια θέση περιοριστικού ενζύμου ή εκκινήτη PCR



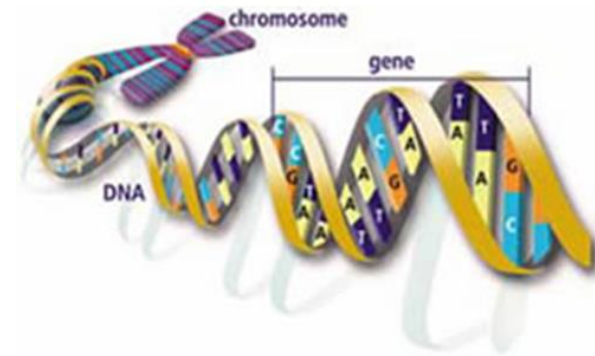
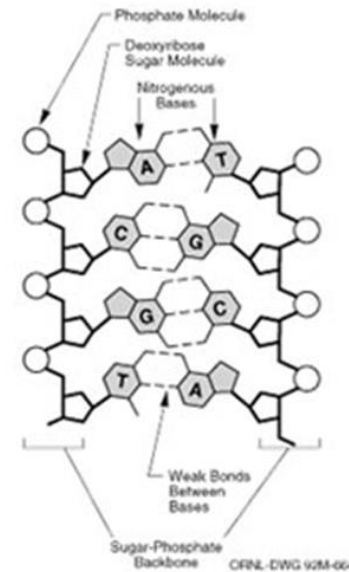
B. Ένθεση μεταξύ δύο θέσεων περιοριστικού ενζύμου ή εκκινήτων PCR



<p>Γ. Απαλοιφή μεταξύ δύο θέσεων περιοριστικού ενζύμου ή εκκινητών PCR</p>	<p>RFLP, AFLP, CAPS, RAPD, AP-PCR, DAF, ISSR</p>  <p>RFLP, AFLP, CAPS, RAPD, AP-PCR, DAF, ISSR</p>
<p>Δ. Αλλαγή αριθμού γραμμικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μεταξύ δύο θέσεων περιοριστικού ενζύμου ή εκκινητών PCR</p>	 <p>SSR, VNTR, ISSR</p>
<p>Ε. Μονονουκλετιδικός πολυμορφισμός</p>	<p>Ποικιλία Α – G G A C T A T C G A T A T Ποικιλία Β – G G A C T A C C G A T A T Ποικιλία Γ – G G A C T A A C G A T A T Ποικιλία Δ – G G A C T A G C G A T A T</p> <p style="text-align: center;">SNP</p>

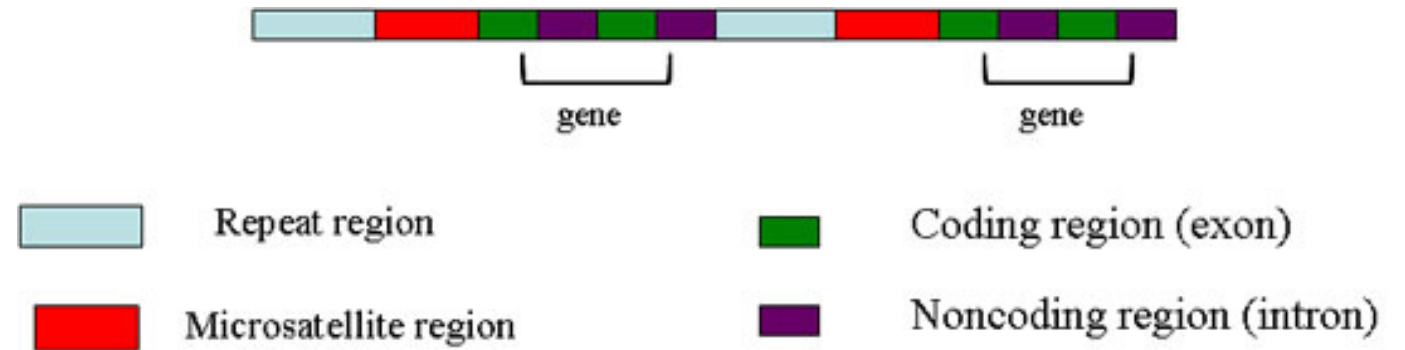
Καταλαβαίνοντας του μοριακούς δείκτες....

- Για να είμαστε σε θέση να επιλέγουμε και να χρησιμοποιούμε κατάλληλα δείκτες στην βελτίωση, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε πώς σχεδιάζονται αυτοί οι δείκτες και πώς μπορούν να προσδιορίσουν συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος.
- Οι βασικές έννοιες για την κατανόηση περιλαμβάνουν:
- τη βασική δομή του DNA
- την αντίδραση αλυσίδας πολυμεράσης (PCR)
- την οργάνωση της αλληλουχίας DNA



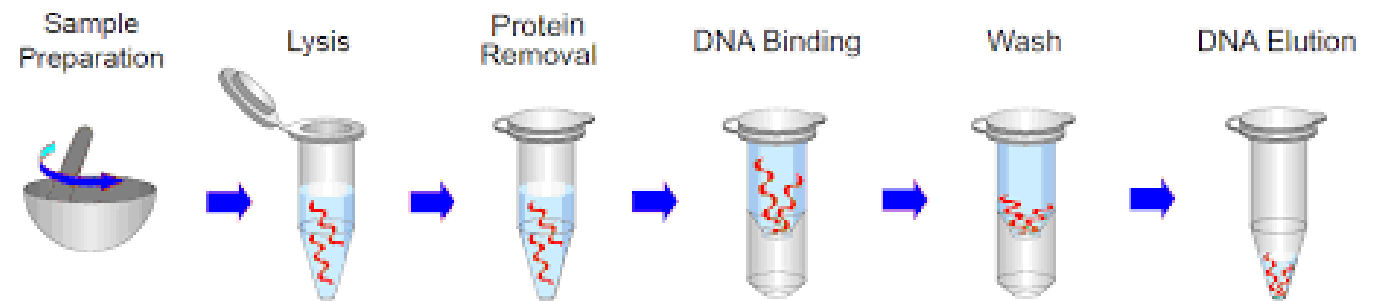
Οργάνωση γονιδιώματος

Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι μόνο ένα μέρος (μερικές φορές ένα πολύ μικρό μέρος!) της αλληλουχίας DNA αποτελείται από γονίδια. Το υπόλοιπο είναι μη κωδικοποιούμενη αλληλουχία, που περιλαμβάνει πολλές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, μικροδορυφόρους και μεταθετά στοιχεία. Σε ορισμένα είδη, το μέρος του γονιδιώματος μπορεί να είναι <10% του συνόλου DNA.

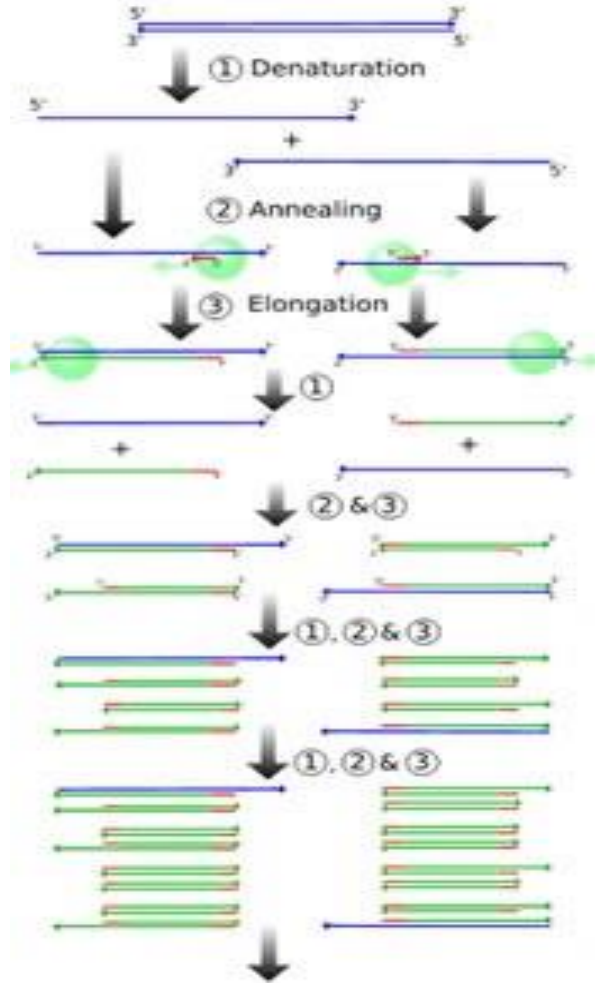


Extraction of DNA (Εξαγωγή DNA)

- Η απόκτηση DNA επαρκούς ποιότητας και ποσότητας αποτελεί σημαντικό ζήτημα για το ΜΑΒ. Μερικοί δείκτες χρειάζονται σχετικά μεγάλες ποσότητες DNA υψηλής ποιότητας, άλλοι λειτουργούν καλά με μικρές ποσότητες DNA. Η απαιτούμενη ποιότητα και ποσότητα DNA πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν αποφασίζεται ποιο δείκτης και ποιο πρωτόκολλο εξαγωγής DNA θα χρησιμοποιηθεί.



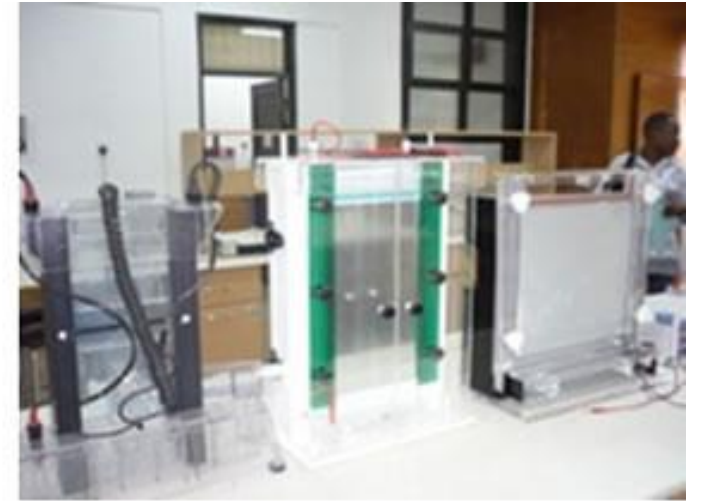
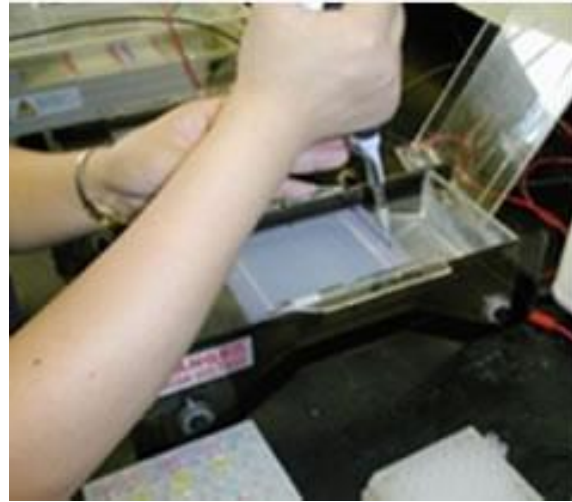
PCR



- Η συντριπτική πλειονότητα των μοριακών δεικτών βασίζεται στη χρήση PCR (Mullis et al. 1986).
- Αυτή η διαδικασία μιμείται τον φυσικό τρόπο με τον οποίο το κύτταρο αναπαράγει το DNA του. Παρέχει έναν γρήγορο, φθινό τρόπο δημιουργίας μεγάλου αριθμού (εκατομμυρίων) αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA.
- Ένα δείγμα DNA (το "πρότυπο"-η εκμαγείο) αναμιγνύεται με DNA πολυμεράση και μικρές στοχευμένες αλληλουχίες εκκίνησης ("εκκίνητές") (βλ. Επόμενη διαφάνεια). Στη συνέχεια, η πλήρωση ενός θερμικού κύκλου οδηγεί στην παραγωγή ενός αντιγράφου του τμήματος της αλληλουχίας DNA προτύπου μεταξύ των δύο εκκίνητών. Η επανάληψη του κύκλου πολλές φορές επιτρέπει στα νέα αντίγραφα να λειτουργούν ως εκμαγεία στον επόμενο γύρο, με αποτέλεσμα μια εκθετική αύξηση του αριθμού αντιγράφων της ακολουθίας- στόχου

Σημασία της PCR στην MAB (Marker Assisted Breeding)

Οι περισσότερες πλατφόρμες μοριακών δεικτών περιλαμβάνουν ένα σύστημα οπτικοποίησης όπως η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης που απαιτεί ελάχιστη ποσότητα DNA για να είναι ορατή. Επομένως, η PCR είναι σημαντική όχι μόνο για την αναγνώριση συγκεκριμένων περιοχών του DNA (όπως με συγκεκριμένους εκκινητές, που συζητούνται στην επόμενη διαφάνεια) αλλά και για τη δημιουργία αρκετών αντιγράφων (ενίσχυση) του τμήματος ενδιαφέροντος έτσι ώστε να μπορεί να φανεί σε ένα σύστημα οπτικοποίησης.



Μοριακοί δείκτες που σχεδιάζονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (STS)

- Αυτός είναι ένας γενικός όρος για δείκτες που αναπτύσσονται με εκκινητές ειδικούς για συγκεκριμένη αλληλουχία, συνήθως για μια συγκεκριμένη περιοχή γονιδιώματος ή τύπο περιοχής. Προφανώς είναι απαραίτητη κάποια γνώση της ακολουθίας DNA, αλλά σε πολλές περιπτώσεις αυτό είναι ήδη διαθέσιμο στο κοινό. Εάν βρείτε την ακολουθία ενός γονιδίου που σας ενδιαφέρει στο διαδίκτυο ή σε μια δημοσίευση, θα μπορούσατε να σχεδιάσετε εκκινητές ειδικά για αυτήν την ακολουθία και να προσπαθήσετε να ενισχύσετε την ακολουθία στο δικό σας φυτό
- Για παράδειγμα, μια αναζήτηση της βάσης δεδομένων NCBI * για τον όρο "αντοχή στο σάπισμα του σπόρου ρυζιού" έχει ως αποτέλεσμα πολλές αλληλουχίες, μία εκ των οποίων είναι ένα γονίδιο μήκους 3458 ζευγών βάσεων (bp), τα πρώτα ~ 500 από τα οποία φαίνονται παρακάτω.
- Είτε χειροκίνητα είτε χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα λογισμικού σχεδιασμού εκκινητών, θα μπορούσαν να αναπτυχθούν εκκινητές που θα ενισχύσουν ένα τμήμα αυτού του γονιδίου από γονιδιωματικό DNA ρυζιού.

```
1  aggacacgga  aattctcagc  aggttcgcgc  ttgatctgaa  ctgtctgtgg  ctcatactct
61  cttgtgcttg  caacagctga  aagttgcagt  gagaagtaca  gagaacaaga  tggagttggt
121  ggtaggtgct  tccgaagcca  ccatgaaatc  tctcttgggc  aagctgggca  atcttctagc
181  ccaggagtat  gctctcatca  gcggtatccg  tggtgacatc  cagtacatca  atgacgagct
241  tgccagcatg  caggccttcc  tccgtgatct  cagcaacgtg  ccagagggtc  acagtcatgg
301  ccaccggatg  aaggactgga  tgaagcagat  ccgagacatc  gcctatgatg  ttgaggactg
361  tatcgatgac  ttgcccacc  gcctccctca  ggattccatc  agcgatgcca  aatggctcct
421  cctactcaca  aaaatctatg  aactatggac  atgggtggcca  cgtcgtgtga  ttgcttccaa
481  cattgcccaa  ctcaagggtac  gggcacaaca  gatcgcagat  cgacgtagta  gatacggagt
```


Εκκινητές

- Μικρές αλληλουχίες DNA (συνήθως 10-30 ζευγών βάσεων μήκους) που βοηθούν στην έναρξη της διαδικασίας σύνθεσης και επίσης προσδιορίζουν ακριβώς ποιες περιοχές του DNA θα ενισχυθούν.
- Ο σχεδιασμός των αλληλουχιών εκκινητών εκμεταλλεύεται την ιδιότητα συμπληρωματικότητας του μορίου DNA.
- DNA template:
- **GCACTTAGCGTAATCGATCTAATGGCATGTGTACGATGCCGTA**
- Primer sequence:
- **CGTGAATCGCATTAGCTA**
-
-

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

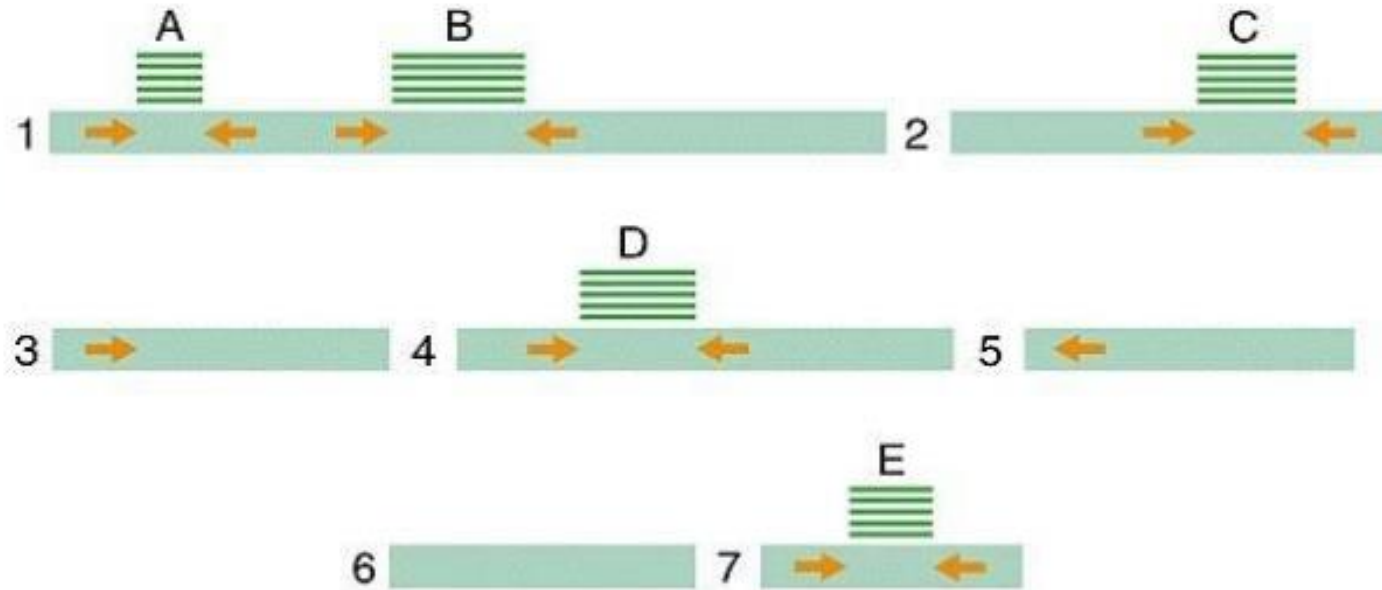
Μέθοδος RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

Βασίζεται στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών με τη χρήση **τυχαίων εκκινητών** (συνήθως 10μερή), σε PCR, οπότε οι περιοχές στις οποίες υβριδίζεται ο δείκτης πολλαπλασιάζονται.



Ο πολυμορφισμός μεταξύ φυτών εκδηλώνεται με τις διαφορές του προτύπου των ζωνών DNA στην ηλεκτροφόρηση και μπορεί να οφείλεται

1. Σε αλλαγές της θέσης υβριδισμού που την καθιστούν μη αναγνωρίσιμη από τον **εκκινητή**
2. Απάλειψη της θέσης υβριδισμού
3. Προσθήκες ή ελλείψεις τμημάτων DNA

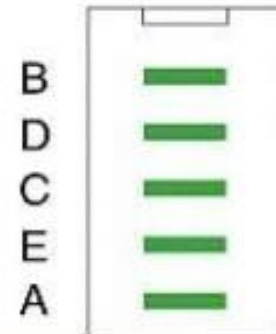
RAPDs



Key

-  PCR primer sequence location and orientation
-  Amplified PCR products
- 1-7 Chromosomes

Electrophoresis of PCR products

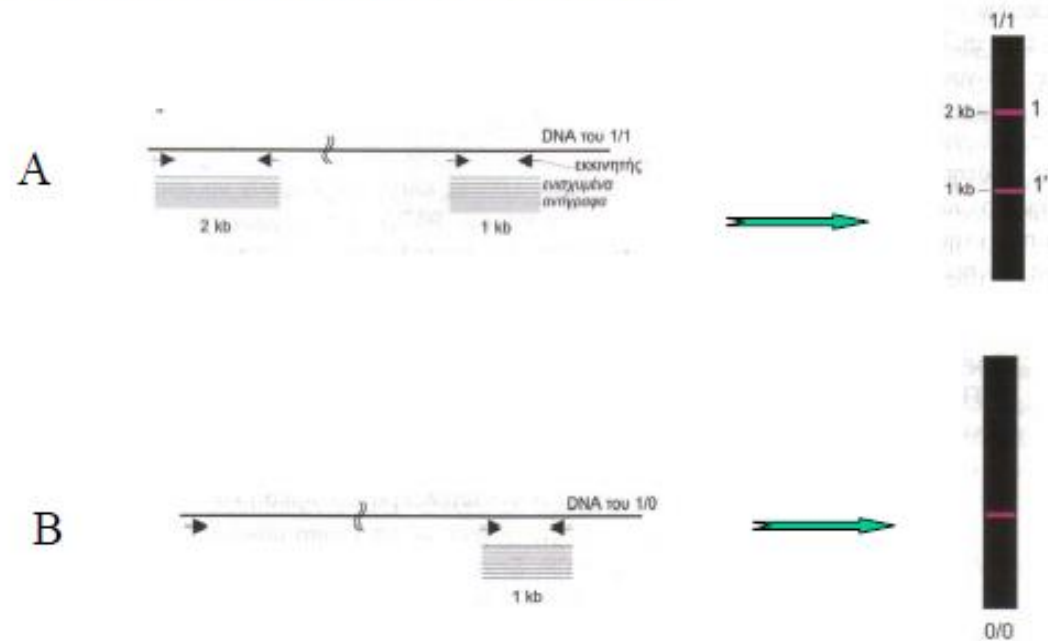


RAPD

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

Μέθοδος RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

1. Ταυτοποίηση γενετικών υλικών



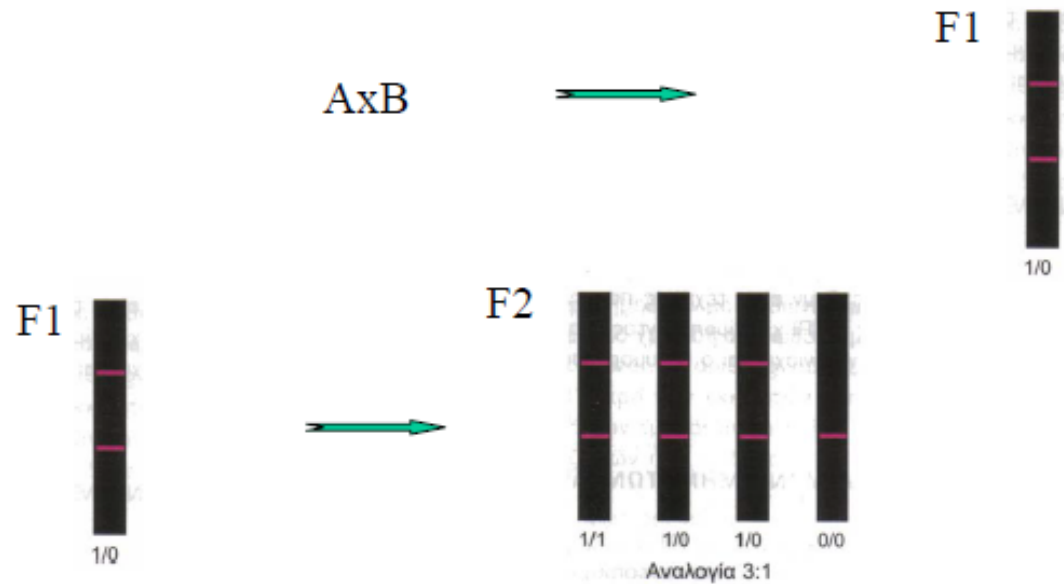
Εικ. 9.2

Η εμφάνιση της ζώνης 1 έστω ότι συνδέεται με την επιθυμητή προς επιλογή περιοχή

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

Μέθοδος RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

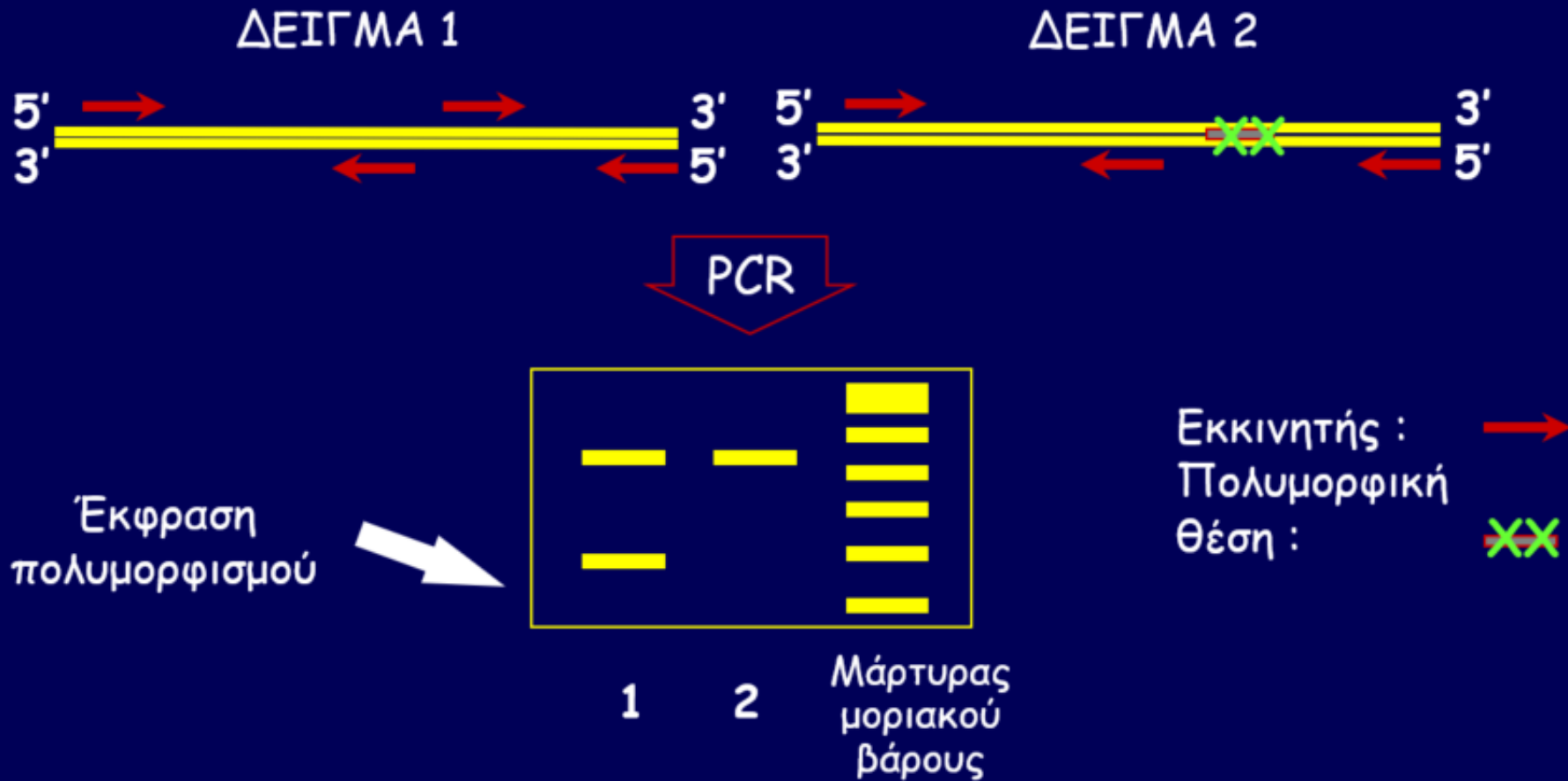
2. Επιλογή



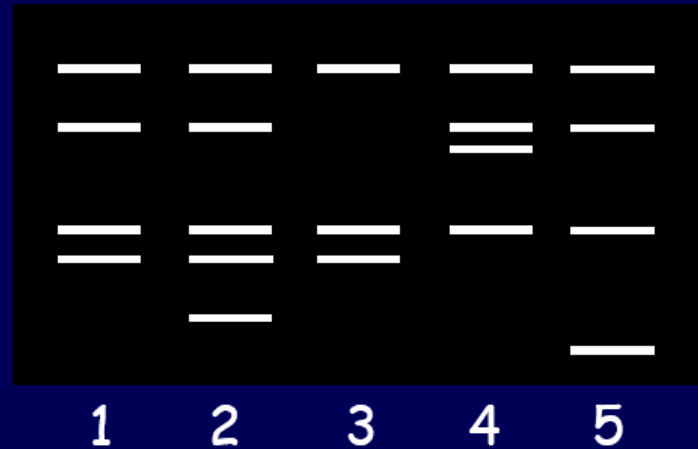
Εικ. 9.2

Η διασταύρωση των απογόνων της F2 με τον αρχικό γονέα A διευκολύνει στην ταυτοποίηση και επιλογή των ομοζύγων 1/1, γιατί δεν θα προκύψει διάσπαση.

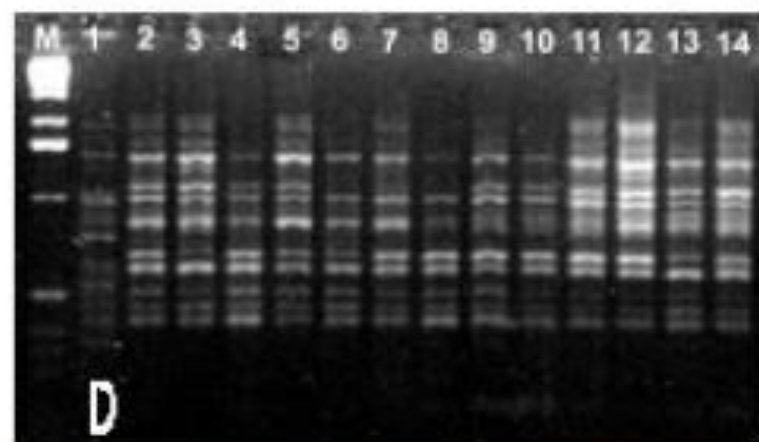
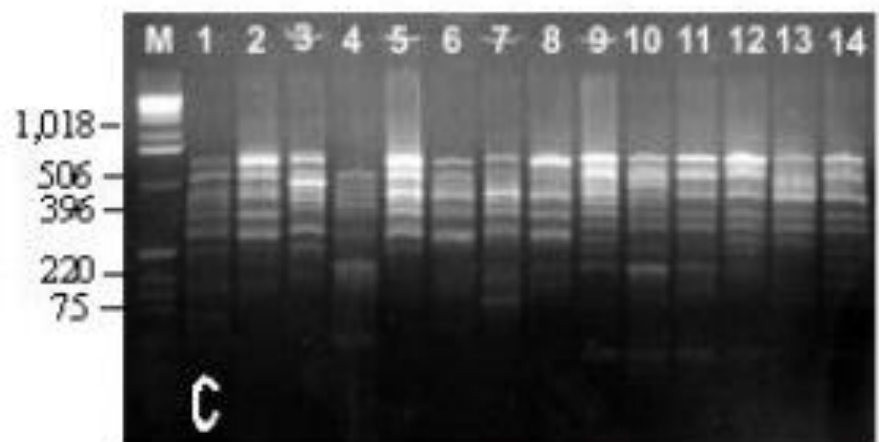
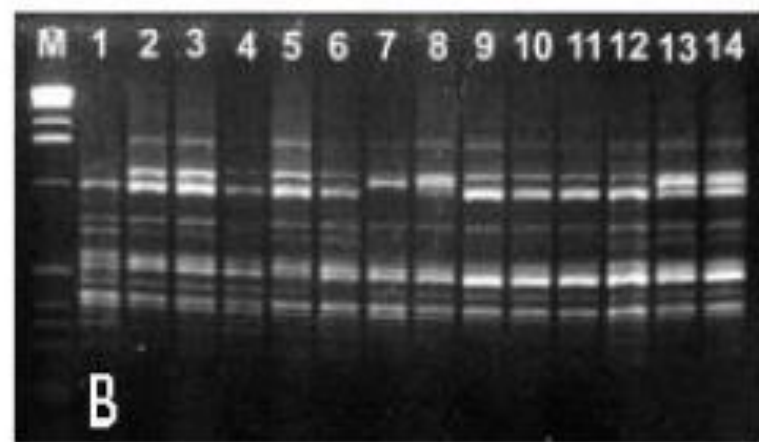
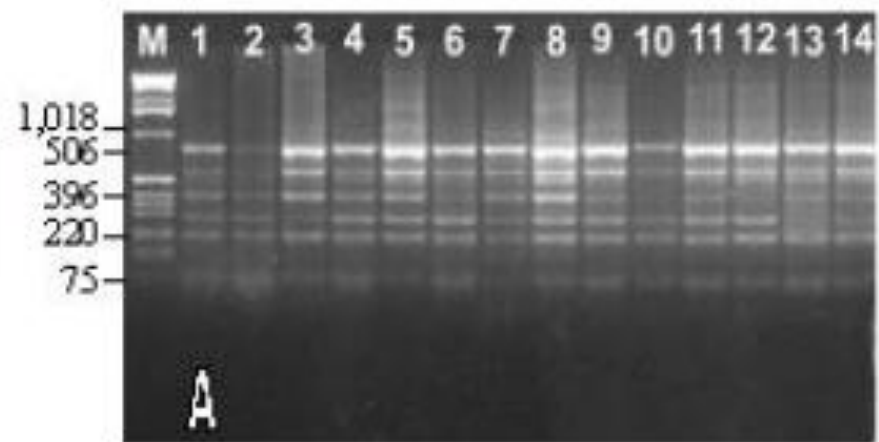
Σχηματική παράσταση πολυμορφισμού τύπου RAPD

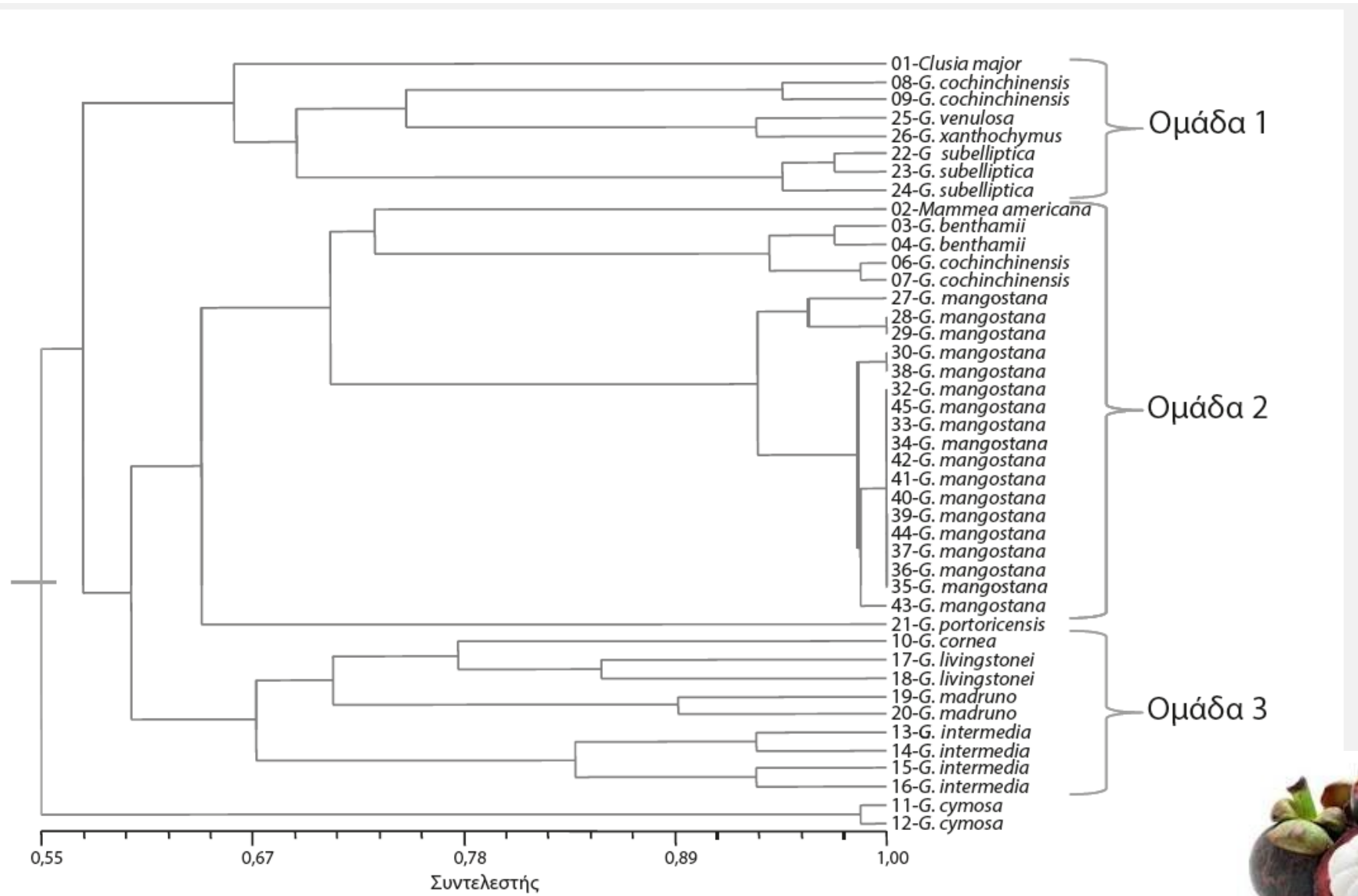


Ερμηνεία αποτελεσμάτων ανάλυσης RAPD



1. Γονότυπος άγριου τύπου (wild type)
2. Μεταλλαγμένος γονότυπος με νέο σημείο προσκόλλησης του εκκινητή
3. Μεταλλαγμένος γονότυπος με ένα λιγότερο σημείο προσκόλλησης του εκκινητή
4. Ένθεση νέου τμήματος DNA μεταξύ δύο σημείων προσκόλλησης του εκκινητή
5. Απαλοιφή τμήματος DNA μεταξύ δύο σημείων προσκόλλησης του εκκινητή





20.8.4 Δείκτες αποτυπώματος ενίσχυσης DNA (DAF)

- Η δημιουργία δεικτών αποτυπώματος ενίσχυσης DNA (DNA amplification fingerprinting-DAF) αποτελεί μια παραλλαγή της μεθοδολογίας RAPD. Με τη μέθοδο αυτή παράγεται μεγαλύτερη παραλλακτικότητα από τους δείκτες RAPD επειδή χρησιμοποιούνται πολύ μικροί (5-8 βάσεις) τυχαίοι εκκινητές. Εξαιτίας της μεγάλης ικανότητας παραγωγής πολυμορφισμών, η DAF είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται όταν τα φυτά έχουν στενή γενετική συγγένεια (π.χ. χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ ποικιλιών GM που διαφέρουν μόνο ως προς τα διαγονίδια).

Μινιδορυφορος

- Ένας μινιδορυφόρος είναι ένα κομμάτι DNA αποτελούμενο από διαφορετικές επαναλήψεις μιας βασικής αλληλουχίας βάσεων (π.χ. GGGCAGGAN_NG), όπου το N μπορεί να είναι οποιαδήποτε βάση), με το μήκος της βασικής αλληλουχίας να ποικίλλει μεταξύ 10 και 60 bp και ενίοτε να υπερβαίνει τα 100 bp.

Μικροδορυφοροι

- **Μικροδορυφόροι (microsatellites) ή απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (simple sequence repeats-SSR)**
- Οι μικροδορυφόροι αποτελούν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA αλλά μικρότερων μοτίβων σε σύγκριση με τους μινιδορυφόρους. Οι επαναλήψεις μπορούν να αφορούν δι-, τρι- ή τετρανουκλεοτίδια [π.χ. GT, GAC, GACA, ή γενικά επαναλήψεις (CA)_n όπου το n ποικίλλει μεταξύ των αλληλομόρφων] στο πυρηνικό γονιδίωμα.

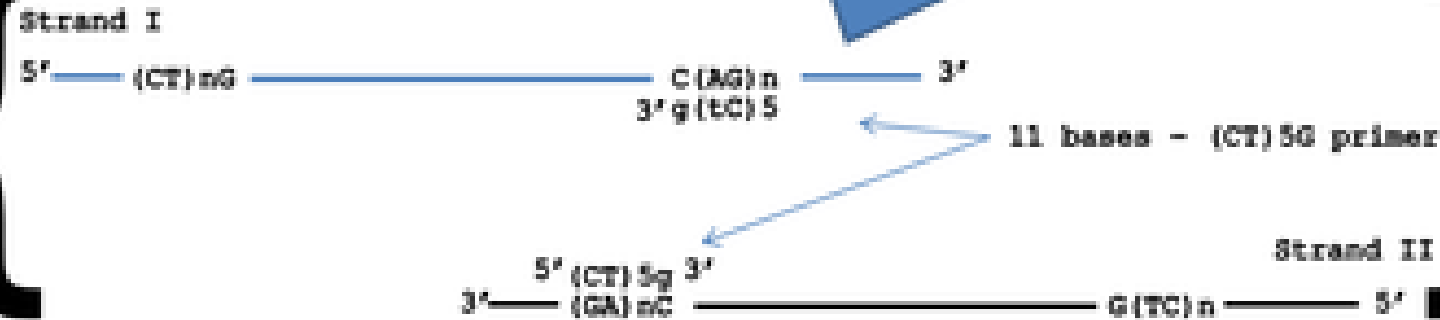
ISSR

- Όπως υποδηλώνει το όνομα αυτών των δεικτών, η ενδομικροδορυφορική παραλλακτικότητα (**inter simple sequence repeats-ISSR**) προκύπτει σε περιοχές του γονιδιώματος που απαντούν μεταξύ των μικροδορυφόρων.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση υβριδίζονται είτε στο 5' είτε στο 3' άκρο μιας επαναλαμβανόμενης περιοχής και στη συνέχεια ενισχύουν την περιοχή μεταξύ δύο γειτονικών μικροδορυφόρων.
- Πρόκειται για το αντίθετο των SSR που χρησιμοποιούν εκκινητές στη γειτονική περιοχή των μικροδορυφόρων. Η ποικιλότητα των αλληλουχιών των ISSR είναι μικρότερη από αυτή των SSR

(A) Double strand DNA:



(B) PCR
amplification
of Genomic
DNA using
a single
5'-(CT)5G-3'
Primer



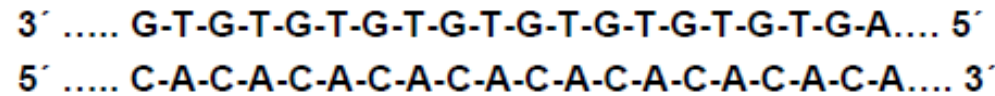
(C) PCR Amplification
product of locus (5-6)
(ISSR marker)



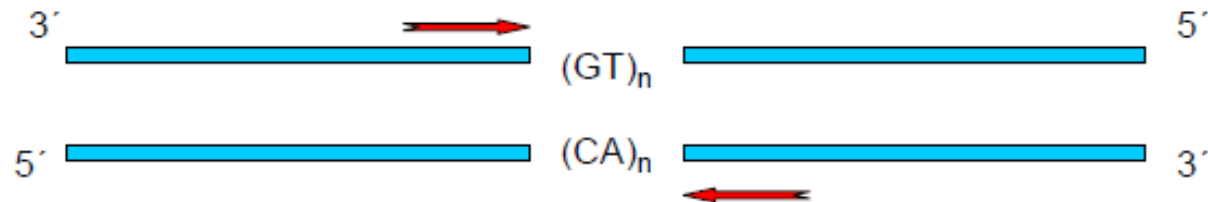
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

Μέθοδος με μικροδορυφόρους (Single sequence repeats-SSR)

Βασίζεται στην ταυτοποίηση με μοριακούς δείκτες μικρών συνεχών επαναλήψεων απλών αλληλουχιών 2, 3 ή 4 νουκλεοτιδίων. Η πλέον συχνή μορφή είναι η επανάληψη της αλληλουχίας GT/CA:

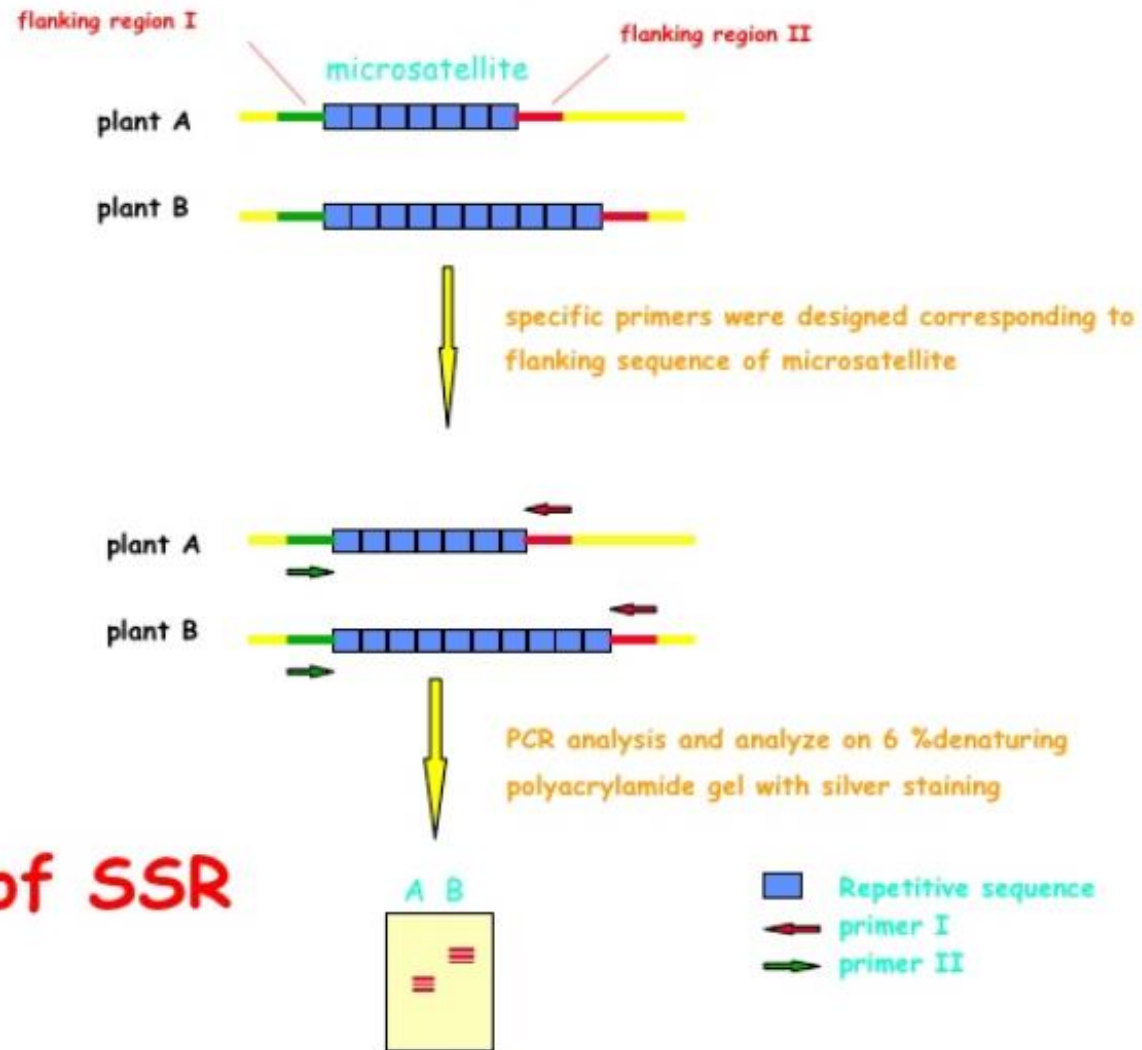


Κατάλληλοι εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των τμημάτων αυτών σε PCR, και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση αποκαλύπτει τον πολυμορφισμό των τμημάτων αυτών.



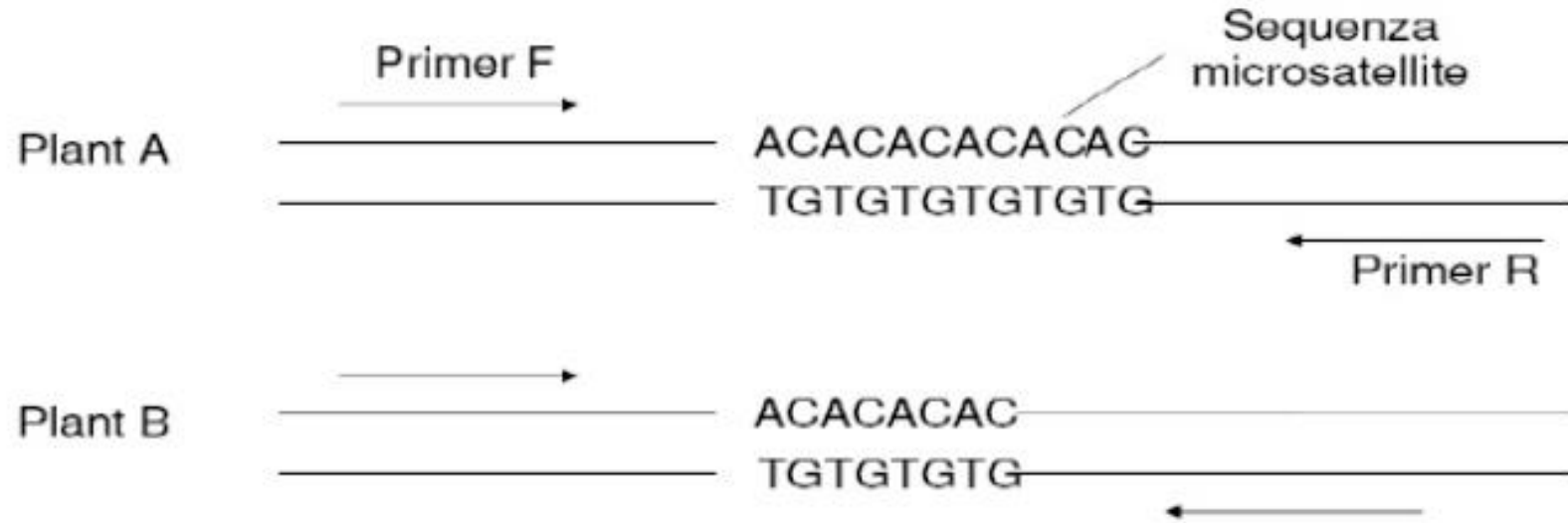
SSRs

vide

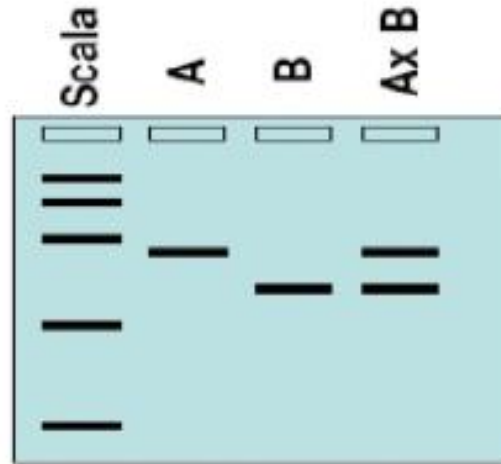


Schematic of SSR assay

106



Direzione di elettroforesi ↓



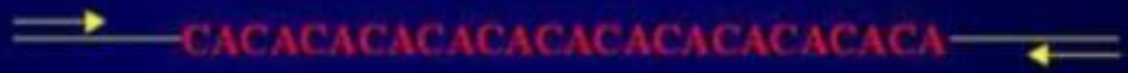
Alleles

dinucleotide repeat

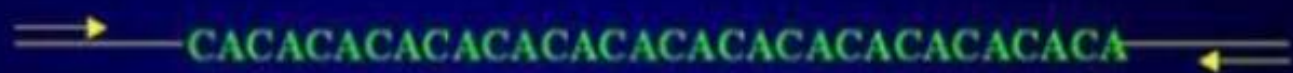
#1



#2

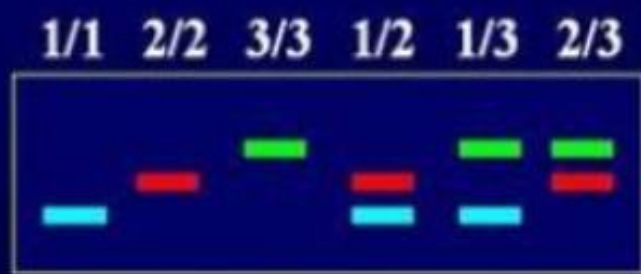


#3



- ▶ Forward primer
- ◀— Reverse primer
- Flanking sequence

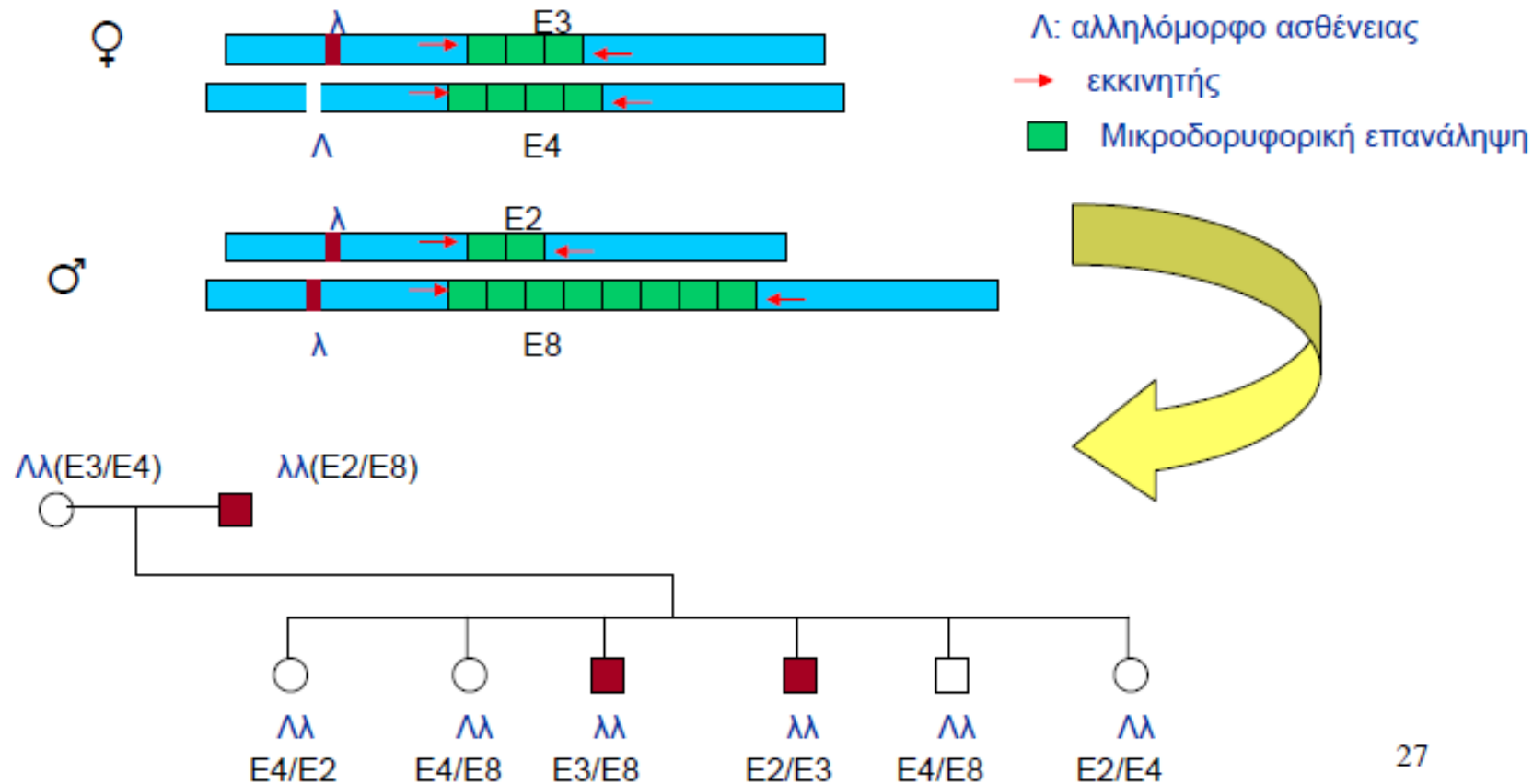
Genotypes



ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

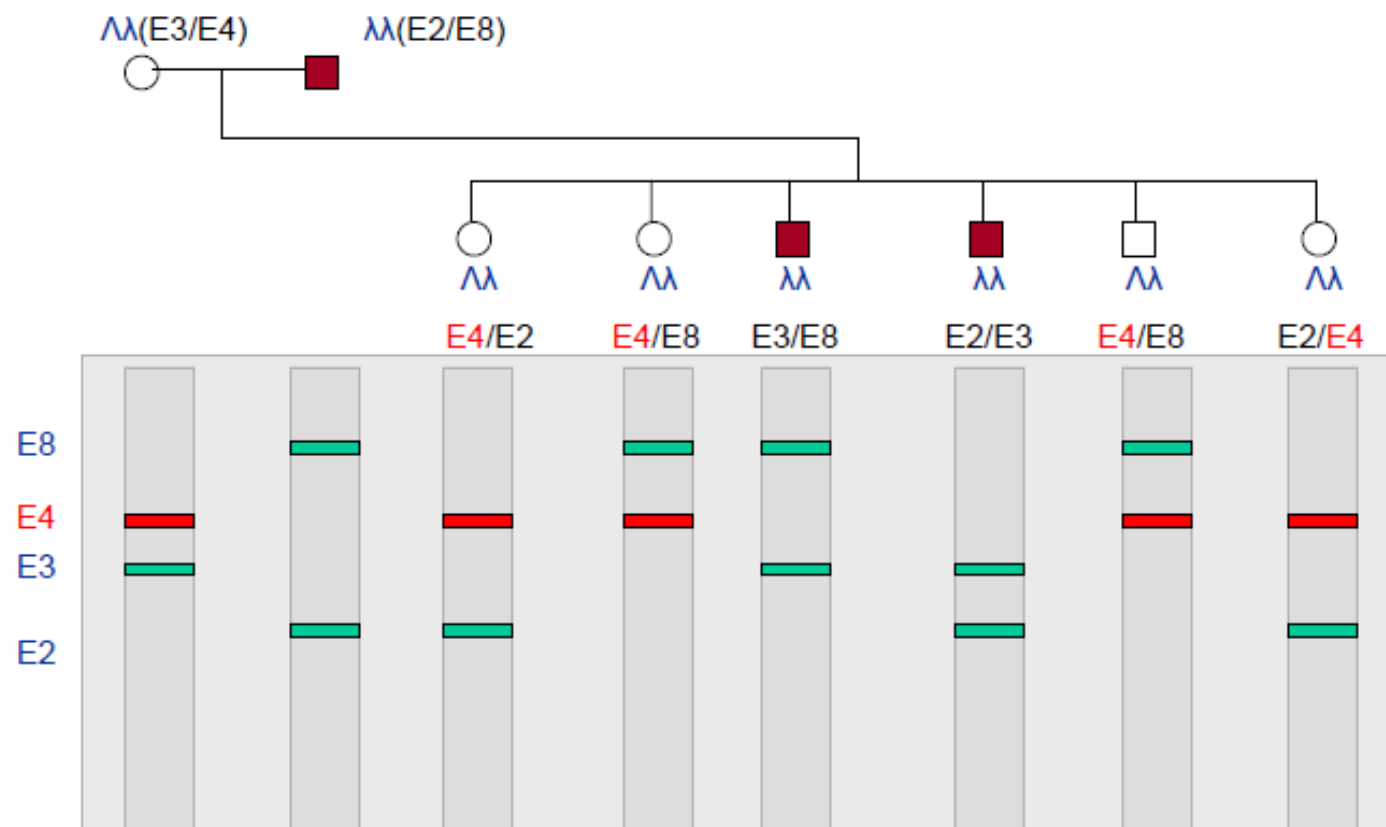
Μέθοδος με μικροδορυφόρους (Single sequence repeats-SSR)

Ανίχνευση ενός γονιδίου (Λ) υπεύθυνου για μια ασθένεια στενά συνδεδεμένου με τέτοιες επαναλήψεις:



ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

Μέθοδος με μικροδορυφόρους (Single sequence repeats-SSR)



σε όλα τα ασθενή παιδιά βρέθηκε η επανάληψη E4 που είναι συνδεδεμένη με την αρρώστια

Μέθοδος AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά από πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού.

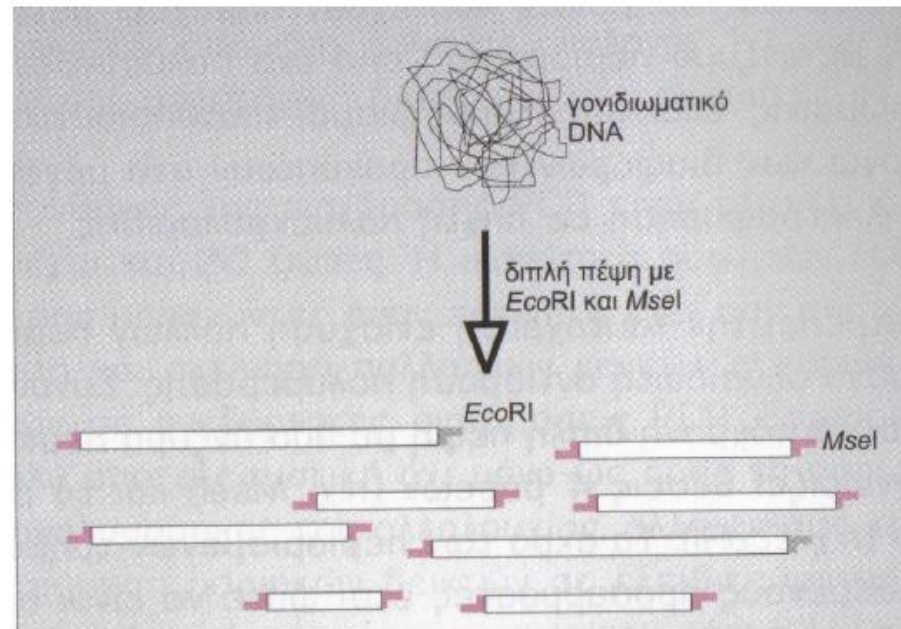
Ο πολυμορφισμός μεταξύ φυτών εκδηλώνεται με τις διαφορές του προτύπου των ζωνών DNA στην ηλεκτροφόρηση και μπορεί να οφείλεται

1. Σε διαφορές των θέσεων αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού (όπως στα RFLPs)
2. Σε αλλαγές των βάσεων λόγω μεταλλάξεων κοντά στις θέσεις αναγνώρισης
3. Προσθήκες ή ελλείψεις στα τμήματα DNA που ενισχύονται

Μέθοδος AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Τεχνική

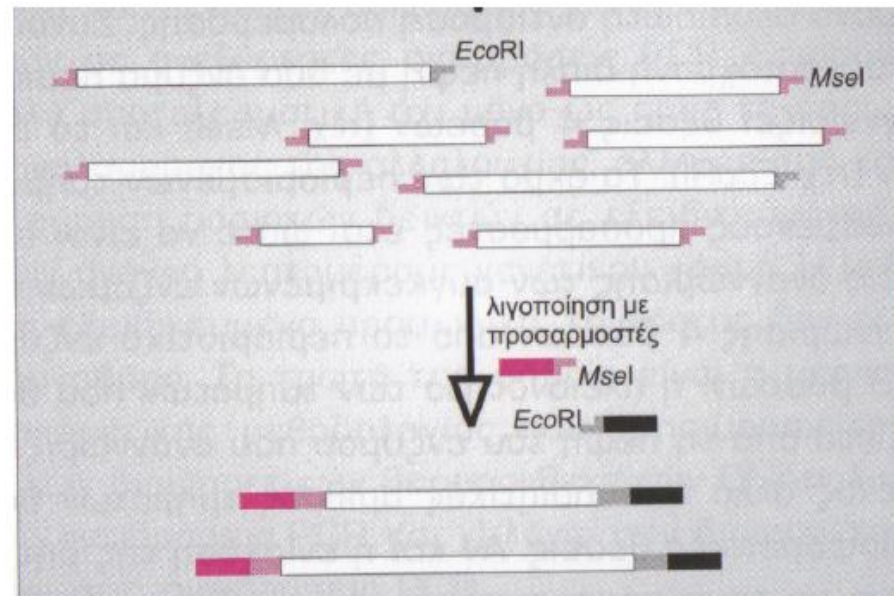
1. Πέψη γονιδιωματικού DNA με δύο ένζυμα περιορισμού 6 και 4 βάσεων



Μέθοδος AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Τεχνική

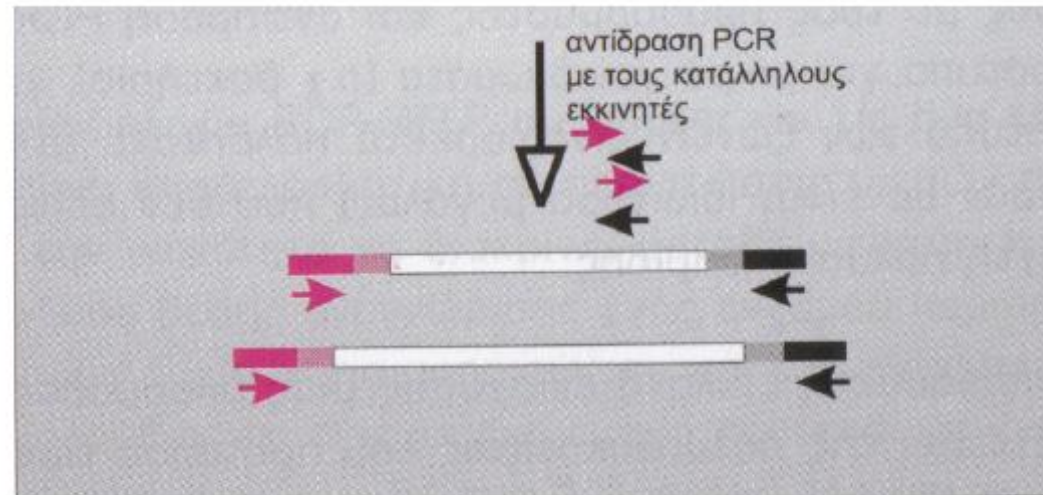
2. Λιγοποίηση αντίθετων άκρων με προσαρμοστές συμβατών για τα άκρα περιορισμού



Μέθοδος AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Τεχνική

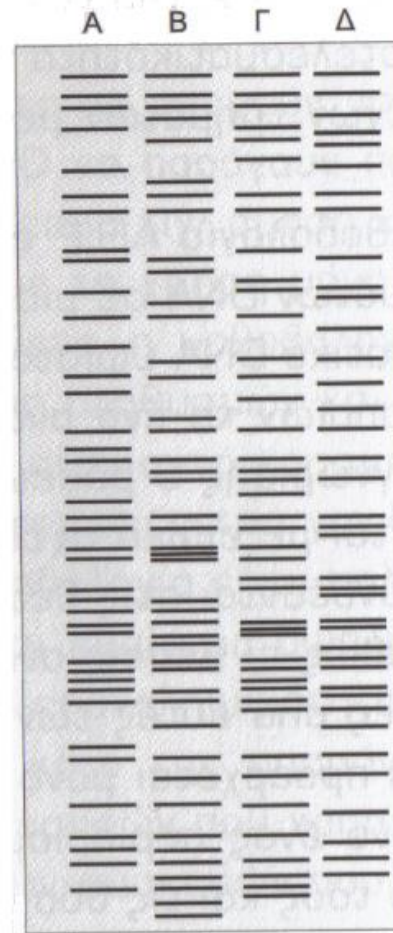
3. Ενίσχυση σε PCR μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν τα δύο διαφορετικά άκρα με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων οι οποίοι φέρουν στο 3' άκρο «επιλεκτικά νουκλεοτίδια»



Μέθοδος AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Τεχνική

4. Διαχωρισμός ενισχυμένων τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηχτή πολυακρυλαμίδης



Ενισχυμένες περιοχές χαρακτηρισμένης αλληλουχίας (SCAR) και θέσεις αναγνωρίσιμης αλληλουχίας (STS)

- Οι δείκτες ενισχυμένων περιοχών χαρακτηρισμένης αλληλουχίας (sequence characterized amplified region-SCAR) και οι δείκτες θέσεων αναγνωρίσιμης αλληλουχίας ή θέσεων με ετικέτα αλληλουχίας (sequence tagged site-STS) προέρχονται από δείκτες βασιζόμενους στην PCR με αλληλούχηση των άκρων των θραυσμάτων για την ανάπτυξη εκκινητών μεγαλύτερου μήκους (περίπου 22-24 bp). Έχουν υψηλότερη επαναληψιμότητα ή αναπαραγωγιμότητα από τους RAPD. Οι εκκινητές για δείκτες SCAR σχεδιάζονται από την αλληλούχηση των άκρων των θραυσμάτων RAPD, ενώ για δείκτες STS από την αλληλούχηση των άκρων των δεικτών RFLP. Οι SCAR είναι συνήθως κυρίαρχοι δείκτες.

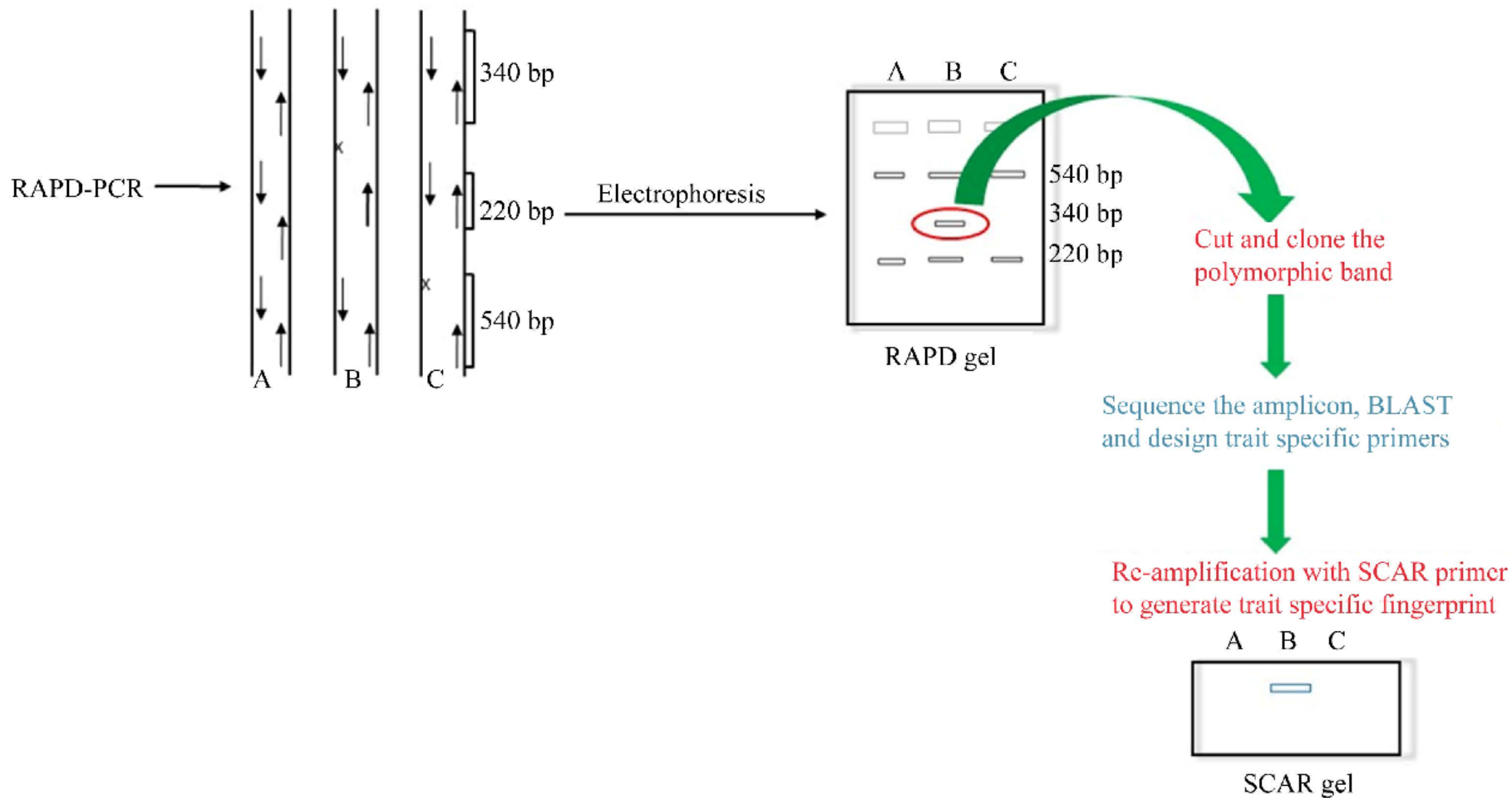
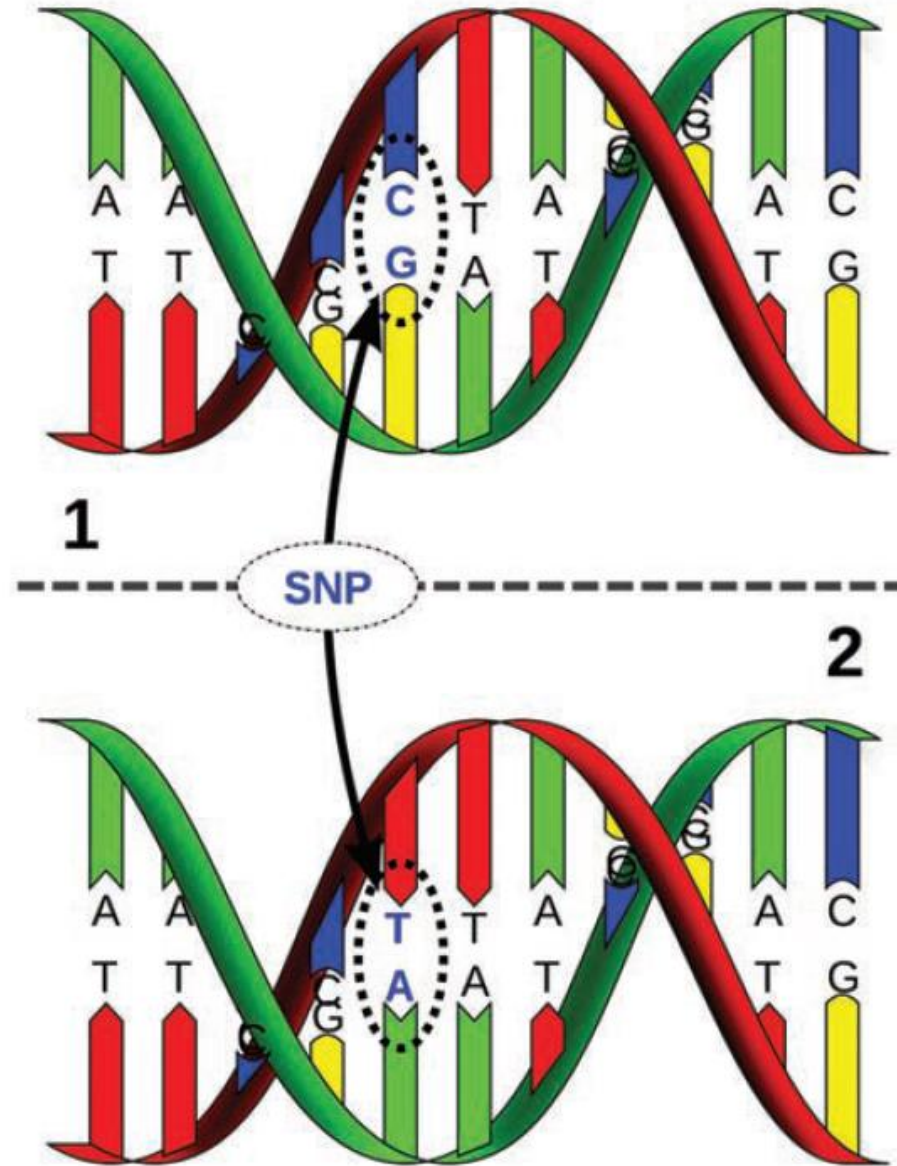


Figure 1. SCAR marker development (direct method) [25].

SNP δεικτες

- Ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός είναι μια θέση ενός ζεύγους βάσεων του γονιδιώματος η οποία διαφέρει μεταξύ των ατόμων. Οι SNP είναι οι πιο άφθονοι και ευρέως κατανεμημένοι μοριακοί δείκτες του γονιδιώματος. Η παρουσία τους και η κατανομή τους ποικίλλει μεταξύ των ειδών και εκτιμάται περίπου σε έναν SNP ανά 60-120 bp στο καλαμπόκι, έναν SNP ανά 20 bp σε ορισμένες περιοχές του σιταριού και έναν SNP ανά 1000 bp στον άνθρωπο.



Εικόνα 36: Ένα παράδειγμα μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού όπου το ζευγάρι βάσεων C:G στην αλυσίδα 1 έχει μετατραπεί σε T:A στην αλυσίδα 2.

Επιθυμητές ιδιότητες μοριακών δεικτων

- Υψηλός βαθμός πολυμορφισμού.
- •• Υψηλή συχνότητα εμφάνισης στο γονιδίωμα (αφθονία).
- •• Τυχαία κατανομή στο γονιδίωμα.
- •• Επιλεκτική ουδετερότητα.
- •• Συγκυρίαρχη κληρονόμηση.
- •• Χαμηλός ρυθμός μετάλλαξης.
- •• Χαμηλό κόστος χρήσης

ΣΥΝΕΧΕΙΑ..

- Εύκολη και γρήγορη απομόνωση (ευκολία ανάλυσης).
- •• Υψηλή επαναληψιμότητα.
- •• Χαμηλό συστηματικό σφάλμα διακρίβωσης.
- •• Επιδεκτικότητα σε αυτοματισμό (εφαρμογές μεγάλης κλίμακας).
- •• Δυνατότητα αποθήκευσης μεγάλου όγκου δεδομένων.
- •• Ευκολία συγκρίσεων με διασταυρωμένες μελέτες.
- •• Εύκολη διαχείριση πληροφοριών.

► Πίνακας 20.1 Μια σύγκριση των διαφορετικών μοριακών δεικτών.

Δείκτης	Γενετικός έλεγχος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αλλοένζυμο	Συγκυρίαρχος	<ul style="list-style-type: none"> – Χαμηλό κόστος ανάλυσης – Καθολικά πρωτόκολλα – Άμεση επισκόπηση της παραλλακτικότητας του DNA <i>per se</i> 	<ul style="list-style-type: none"> – Χαμηλός αριθμός δεικτών – Απαιτούνται φρέσκα/κατεψυγμένα δείγματα – Ορισμένοι γενετικοί τόποι εμφανίζουν ασταθείς πρωτεΐνες – Άνιση κατανομή στους γενετικούς χάρτες
RFLP	Συγκυρίαρχος	<ul style="list-style-type: none"> – Ευκολία βαθμολόγησης – Η αλληλουχία που χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής δεν χρειάζεται να είναι γνωστή – Μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ των πληθυσμών 	<ul style="list-style-type: none"> – Απαιτούνται μεγάλες ποσότητες DNA – Μεγάλο κόστος – Χαμηλή απόδοση – Επίπονη τεχνική – Χαμηλός βαθμός πολυμορφισμού
RAPD	Κυρίαρχος	<ul style="list-style-type: none"> – Μικρό κόστος – Απαιτείται μικρή ποσότητα DNA – Γρήγορη και εύκολη χρήση – Μεγάλος αριθμός ζωνών 	<ul style="list-style-type: none"> – Χαμηλή αναπαραγωγικότητα – Δυσκολία αυτοματισμού – Χαμηλή ικανότητα μεταφοράς – Δυσκολία ανάλυσης

Μικροδορυφόροι	Συγκυρίαρχος	<ul style="list-style-type: none"> - Εύκολη απομόνωση - Μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων - Ικανότητα μεταφοράς μεταξύ των πληθυσμών - Ικανότητα μετατροπής σε δείκτες ενός γενετικού τόπου 	<ul style="list-style-type: none"> - Χρονοβόρα προετοιμασία του εκκινητή - Δυσκολία αυτοματισμού - Υψηλός ρυθμός μετάλλαξης
AFLP	Κυρίαρχος	<ul style="list-style-type: none"> - Αξιοπιστία - Υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού - Πολλαπλοί γενετικοί τόποι 	<ul style="list-style-type: none"> - Απαιτούνται μεγάλες ποσότητες DNA - Πολύπλοκη μεθοδολογία
SNP	Συγκυρίαρχος	<ul style="list-style-type: none"> - Αφθονία - Χαμηλός ρυθμός μετάλλαξης - Ευκολία αυτοματισμού - Εύκολη σύγκριση με διασταυρούμενες μελέτες 	<ul style="list-style-type: none"> - Χρονοβόρα τεχνική - Μεγάλο κόστος - Χαμηλή περιεκτικότητα πληροφοριών σε έναν SNP - Συστηματικό σφάλμα στην εξακρίβωση

Μοριακή βελτίωση

- **Μοριακή βελτίωση είναι η εφαρμογή βιοτεχνολογικών εργαλείων στη βελτίωση των καλλιεργειών.** Αποτελώντας μία δοκιμασμένη μέθοδο της βελτίωσης φυτών, η μοριακή βελτίωση είναι καλύτερο να θεωρείται όχι τόσο ως μία μεμονωμένη προσέγγιση βελτίωσης όπως η μαζική βελτίωση ή η βελτίωση με αναδιασταύρωση αλλά περισσότερο ως μία συλλογή εργαλείων και προσπαθειών για τη βελτίωση των φαινοτύπων των γνωρισμάτων μέσω του άμεσου χειρισμού του γονοτύπου στο επίπεδο του DNA.

Εργαλεία μοριακής βελτίωσης

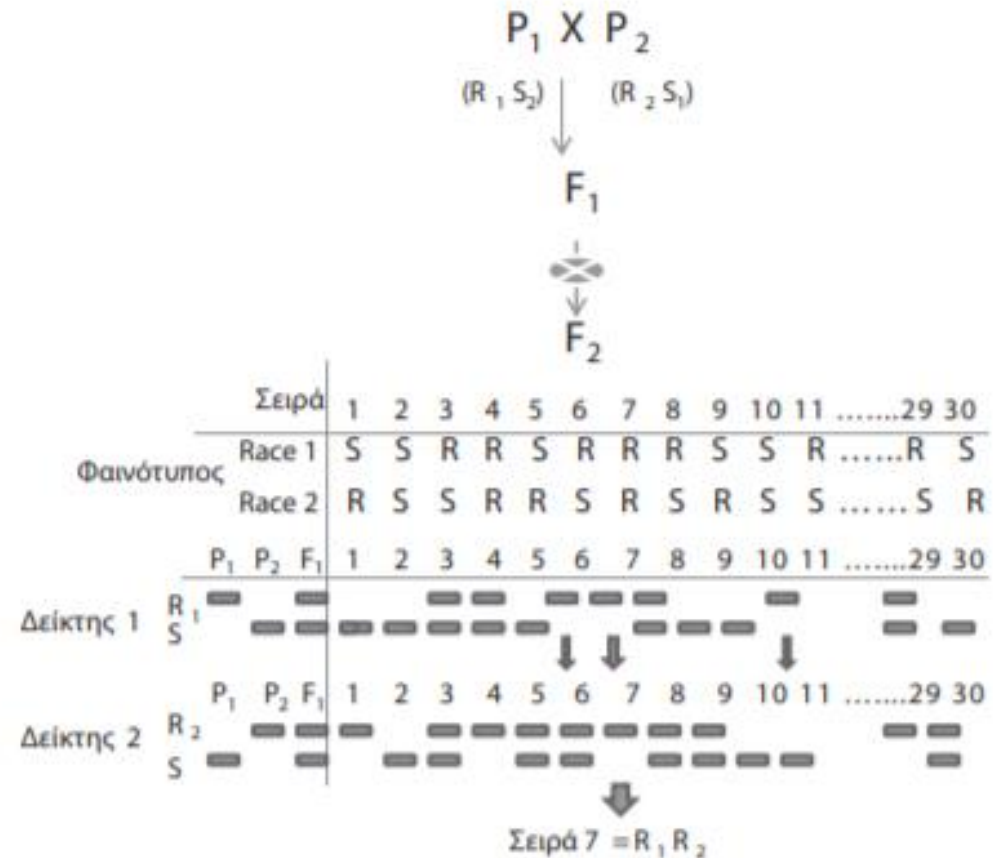
- Στα εργαλεία περιλαμβάνονται **η γονιδιωματική ανάλυση**, **η λειτουργική γονιδιωματική**, **η πρωτεομική** και **η δημιουργία μεταβολικών προφίλ**. Μία από τις πιο εξειδικευμένες προσεγγίσεις μοριακής βελτίωσης είναι η χρήση μοριακών δεικτών, ιδιαίτερα δεικτών DNA, για τη βελτίωση των καλλιεργειών. Η προσέγγιση αυτή ονομάζεται επιλογή με τη χρήση δεικτών (marker assisted selection-MAS).

3 Πλεονεκτήματα της MAS έναντι των συμβατικών πρωτοκόλλων βελτίωσης

- Διάκριση μεταξύ ετερόζυγων και ομόζυγων γονοτύπων
- Διάκριση σε πρώιμη γενεά
- Εύκολη διαλογή
- Μειωμένος χώρος για διαλογή

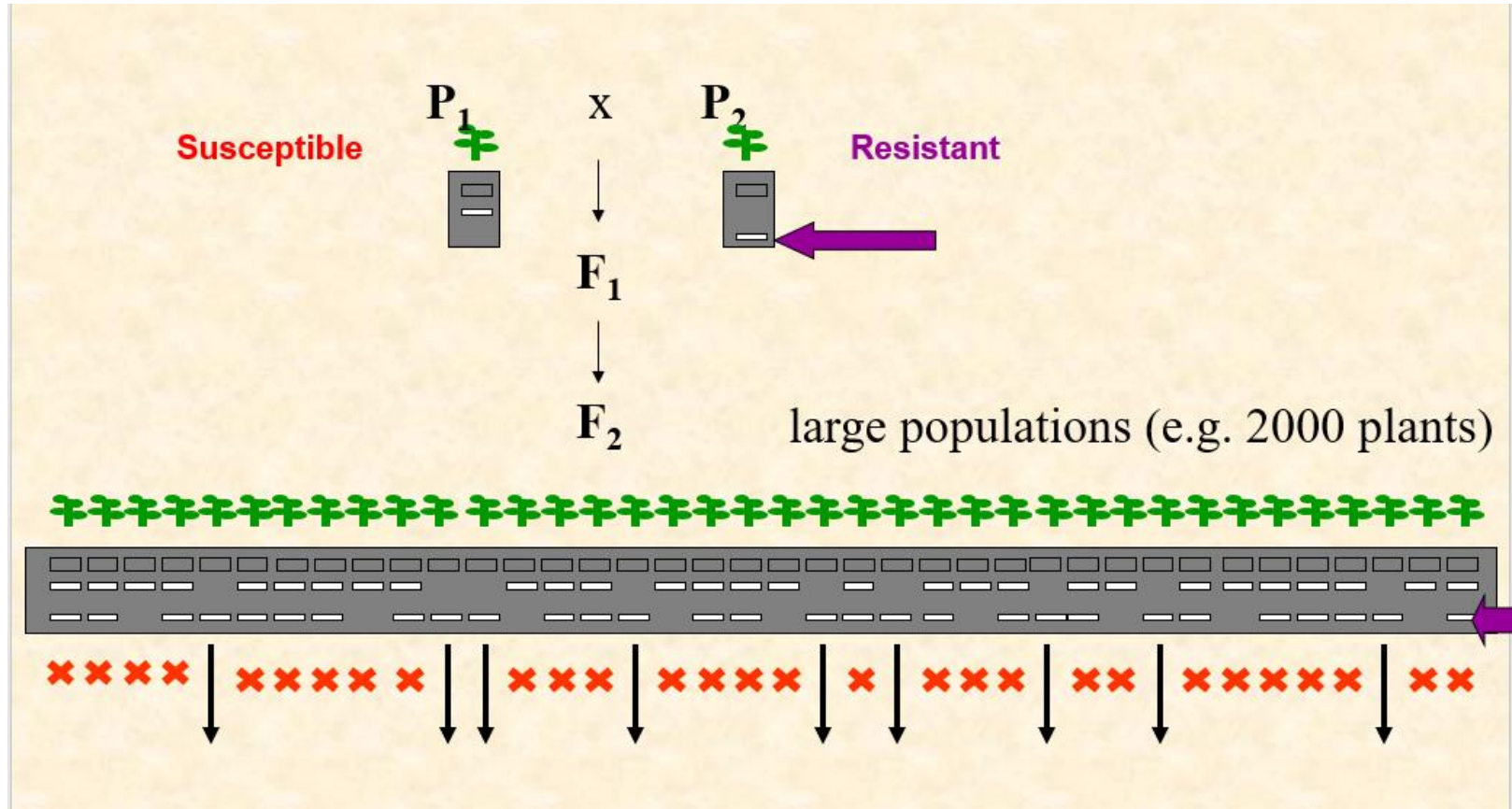
Εφαρμογές- Πυραμιδοποίηση γονιδίων

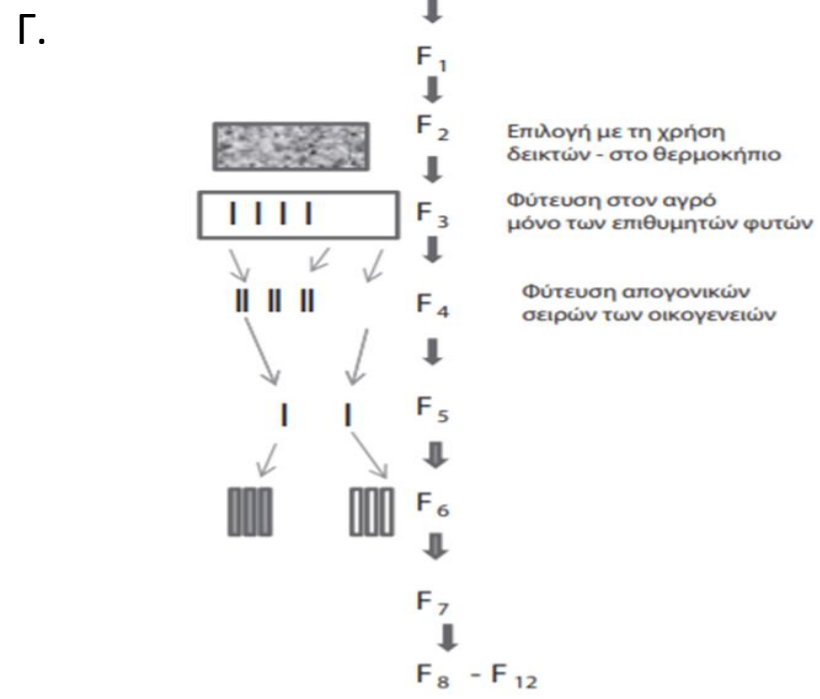
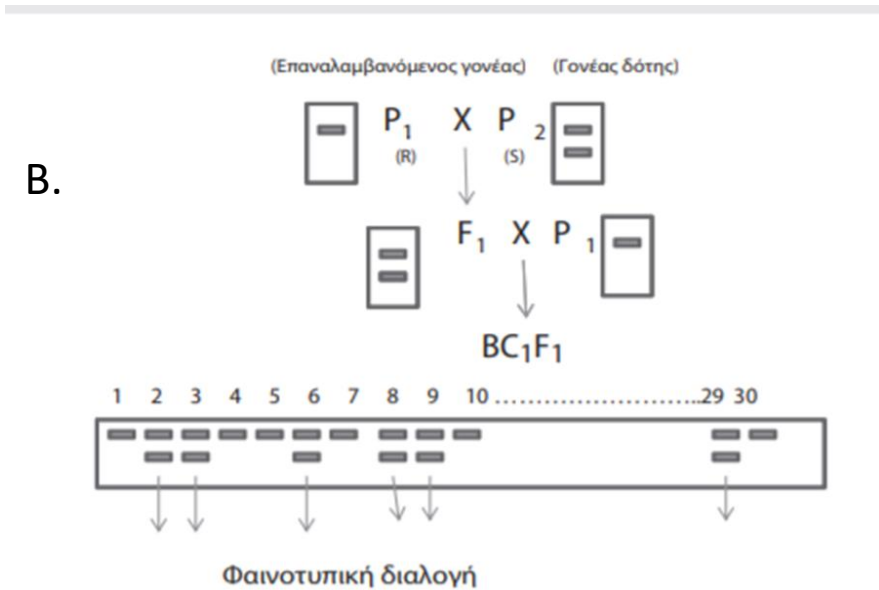
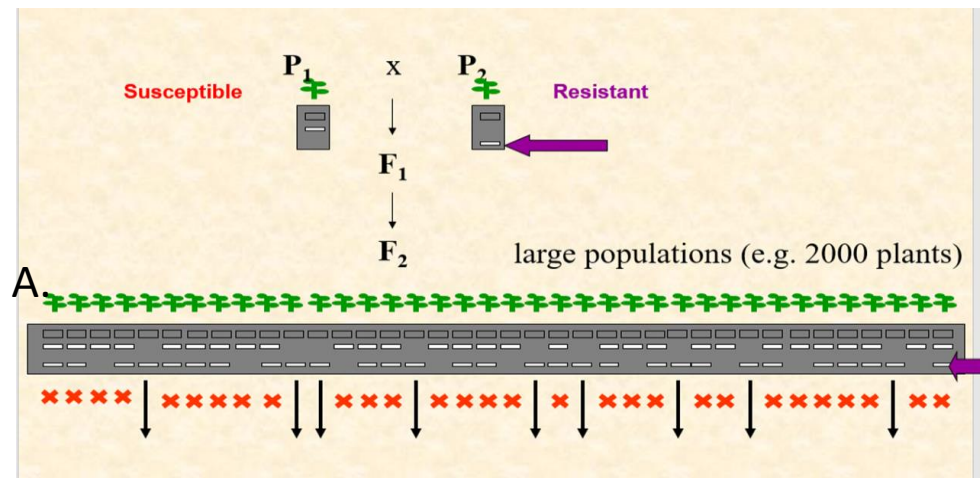
- Είναι η ιδέα της μεταφοράς αρκετών γονιδίων ενός είδους σε έναν μοναδικό γονότυπο.



Εικόνα 22.3 Χρήση δεικτών στην πυραμίδα γονιδίων.

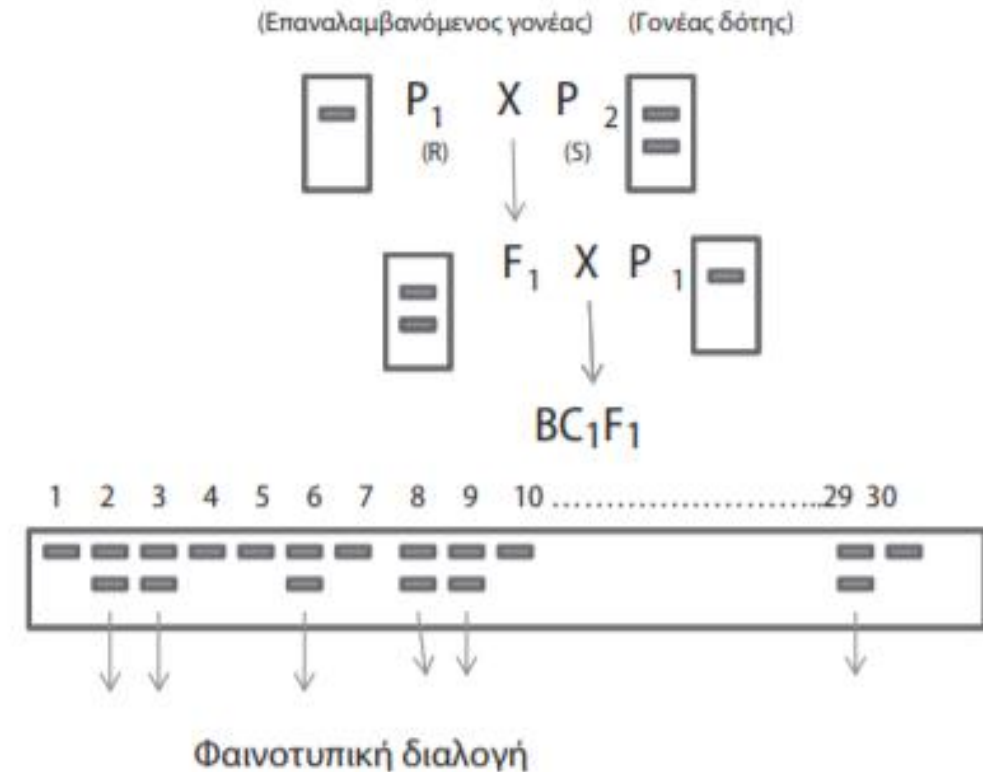
Επιλογή σε πρώιμη γενεά με τη χρήση δεικτών



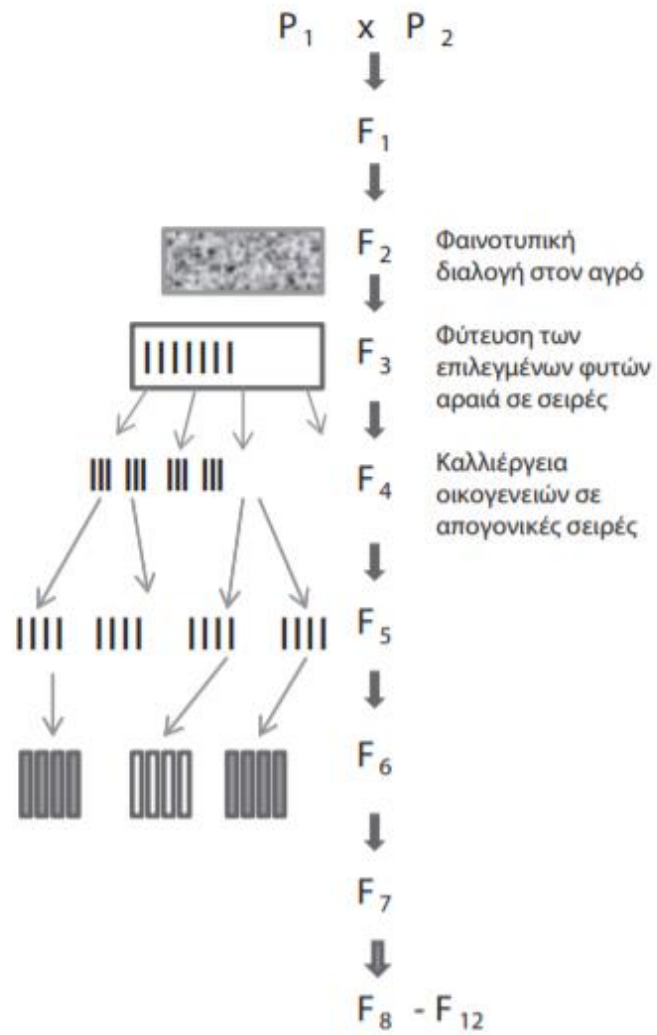


Αναδιασταύρωση

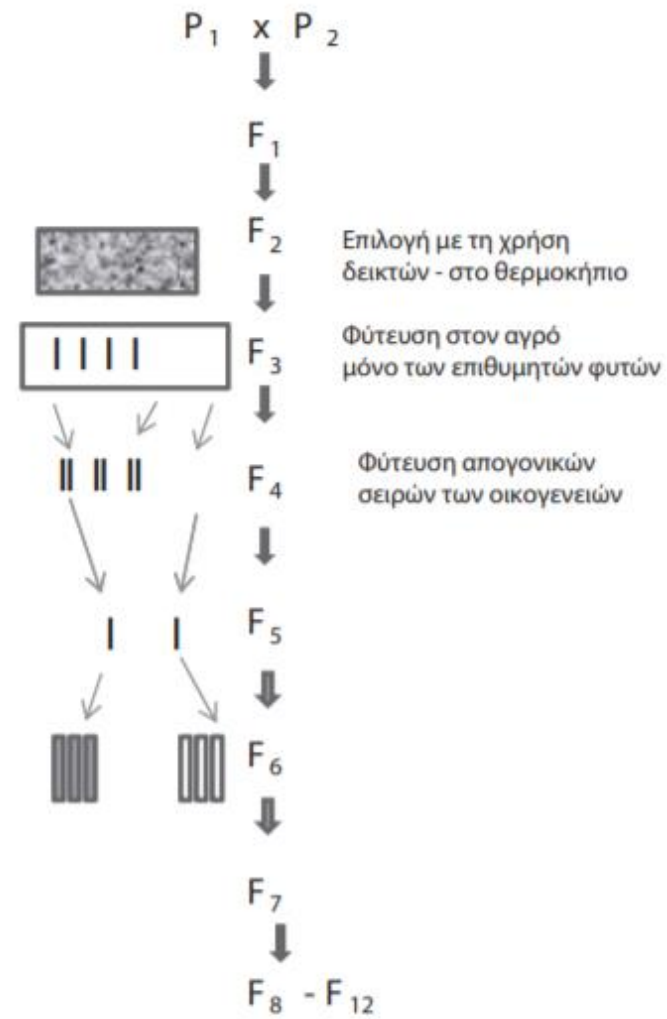
Η MAS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διευκόλυνση της αναδιασταύρωσης όταν εμπλέκονται υπολειπόμενα γονίδια ή όταν τα μεταφερόμενα πολλαπλά γονίδια μπορούν να καλύψουν επιστατικά τις αμοιβαίες επιδράσεις τους (π.χ. όταν ενσωματώνονται πολλαπλά γονίδια ανθεκτικότητας έναντι των ασθενειών). Η MAS είναι επίσης χρήσιμη όταν το πειραματικό περιβάλλον δεν είναι ιδανικό για την έκφραση του γνωρίσματος στόχου (π.χ. βελτίωση για ασθένειες) ή όταν οι φαινοτυπικές μελέτες είναι επίπονες και δαπανηρές (π.χ. για τα γνωρίσματα ποιότητας)



► **Εικόνα 22.2** Η χρήση της αναδιασταύρωσης στην επιλογή με τη βοήθεια δεικτών.



(α) Γενεαλογική βελτίωση χωρίς MAS



(β) Γενεαλογική βελτίωση με MAS