
Μεθοδολογία της Μοριακής Γενετικής Φυτών



ΑΜΒΦ - Κ. Χαρολαμπίδης



Μεθοδολογία στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών

1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Μοριακή και Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής

Μοριακή/Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών & Διασταυρώσεις

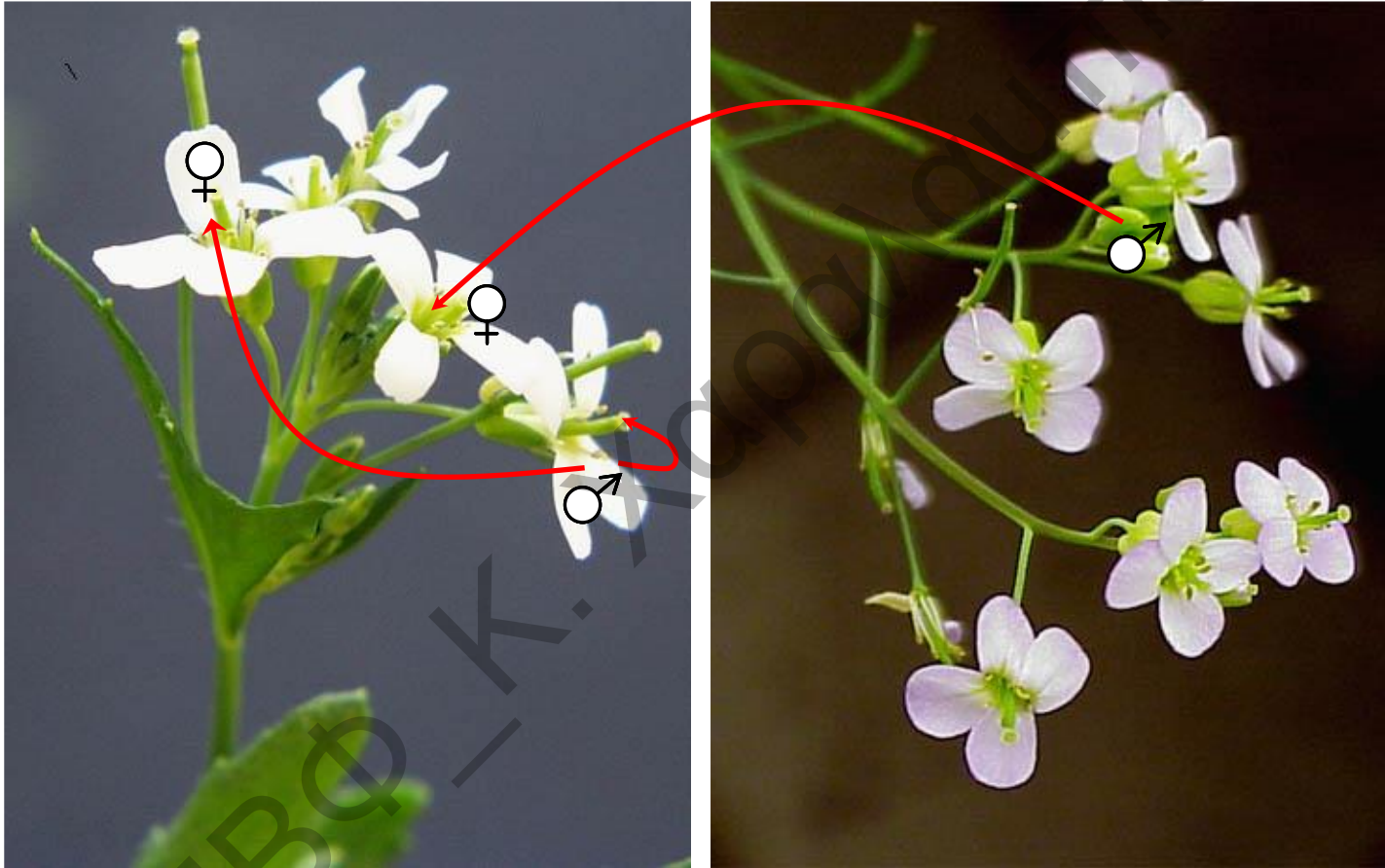
Η ανάλυση των απογόνων και η πραγματοποίηση γενετικών διασταυρώσεων είναι απαραίτητες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί καταρχήν εάν ο φαινότυπος που μελετάται ακολουθεί ή δεν ακολουθεί τους νόμους του Mendel

Κατ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται επίσης:

- Ο καθορισμός του είδους της μετάλλαξης (π.χ. υποτελής ή επικρατής)
- Επιβεβαίωση ένθεσης T-DNA και καθορισμός ομοζυγωτίας/ετεροζυγωτίας
- Ο «καθαρισμός» (clean up) του φαινότυπου μίας μετάλλαξης
- Ο καθορισμός του αριθμού των μεταλλάξεων ενός φαινότυπου
- Ο καθορισμός του τύπου της μετάλλαξης (πυρηνικό/πλαστιδιακό γονίδιο)
- Η πραγματοποίηση πειραμάτων συμπληρωματικότητας μεταξύ σειρών

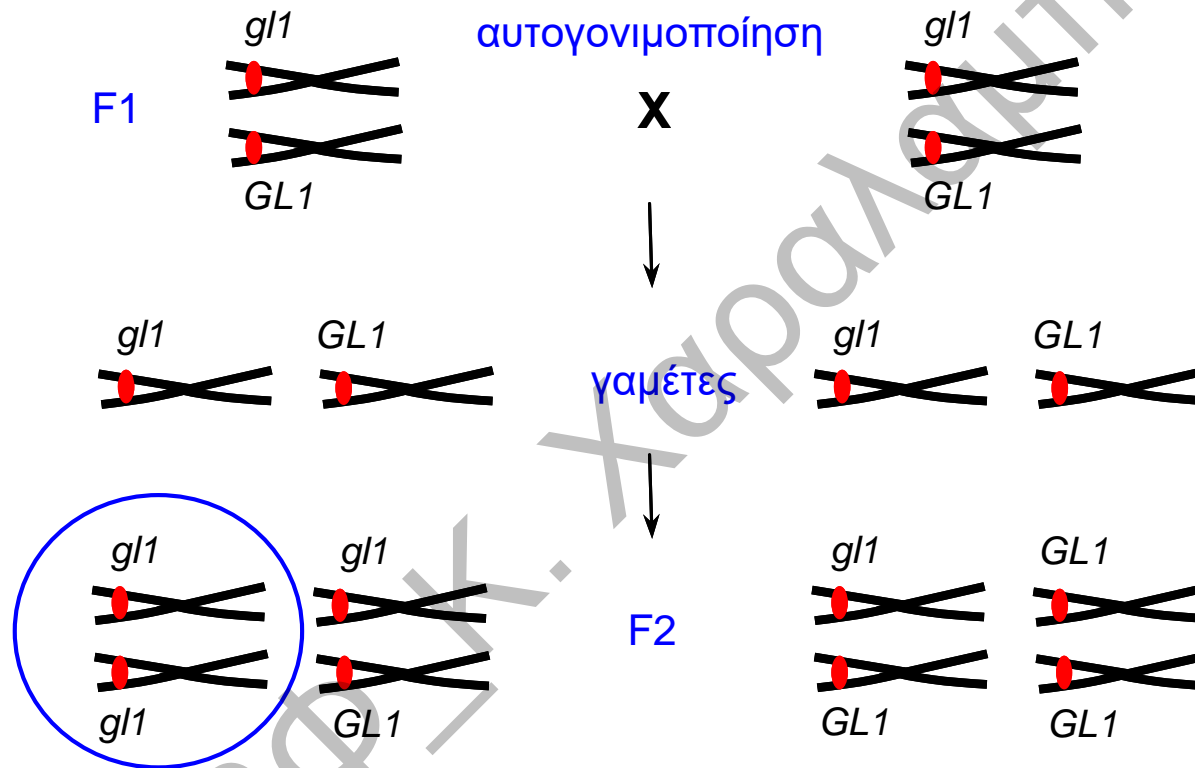


Γενετικές διασταυρώσεις (αυτό και σταύρο-γονιμοποίηση)



Αρχική ανάλυση διάσχισης του φαινότυπου...

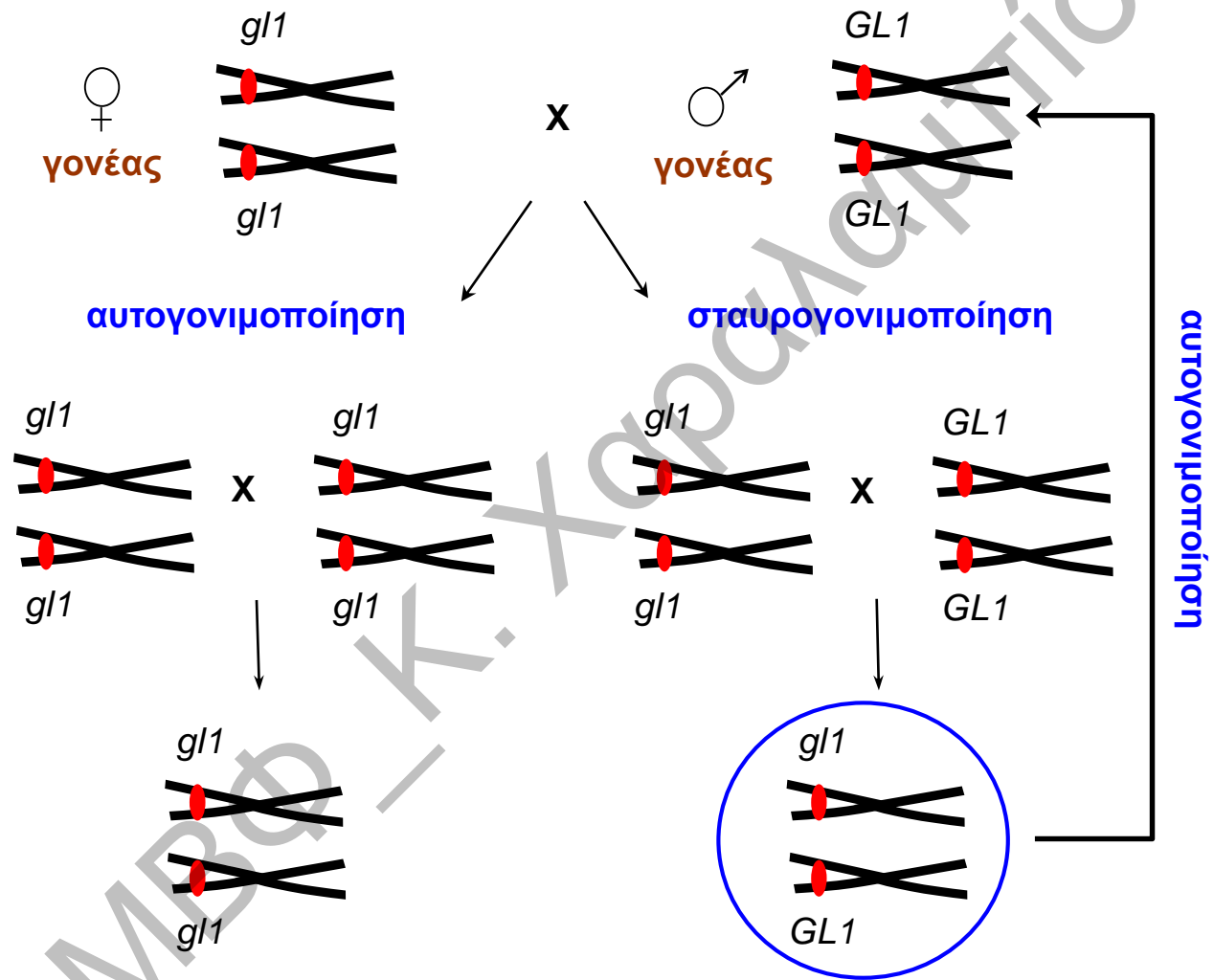
...απόκτηση ομόζυγων σειρών για σταύρο-γονιμοποίηση



Επιλογή των ομόζυγων απογόνων της F1 για την πραγματοποίηση διασταυρώσεων



Διασταυρώσεις (διαχωρισμός αυτο- και σταυρογονιμοποίησης)



Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών & Διασταυρώσεις

Η ανάλυση των απογόνων και η πραγματοποίηση γενετικών διασταυρώσεων είναι απαραίτητες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί καταρχήν εάν ο φαινότυπος που μελετάται ακολουθεί ή δεν ακολουθεί τους νόμους του Mendel

Κατ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται επίσης:

- Ο καθορισμός του είδους της μετάλλαξης (π.χ. υποτελής ή επικρατής)
- Επιβεβαίωση ένθεσης T-DNA και καθορισμός ομοζυγωτίας/ετεροζυγωτίας
- Ο «καθαρισμός» (clean up) του φαινότυπου μίας μετάλλαξης
- Ο καθορισμός του αριθμού των μεταλλάξεων ενός φαινότυπου
- Ο καθορισμός του τύπου της μετάλλαξης (πυρηνικό/πλαστιδιακό γονίδιο)
- Η πραγματοποίηση πειραμάτων συμπληρωματικότητας μεταξύ σειρών



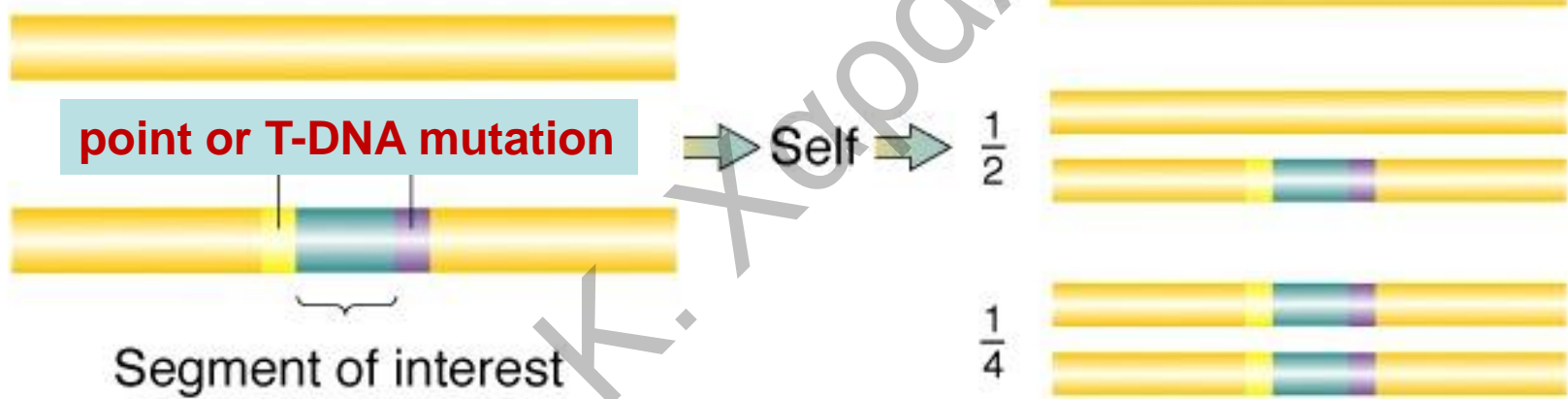
Διάσχιση της μετάλλαξης/ένθεσης στα M1 και M2 φυτά

M1 progeny

M2 progeny

Chromosome pair
in transgenic plant

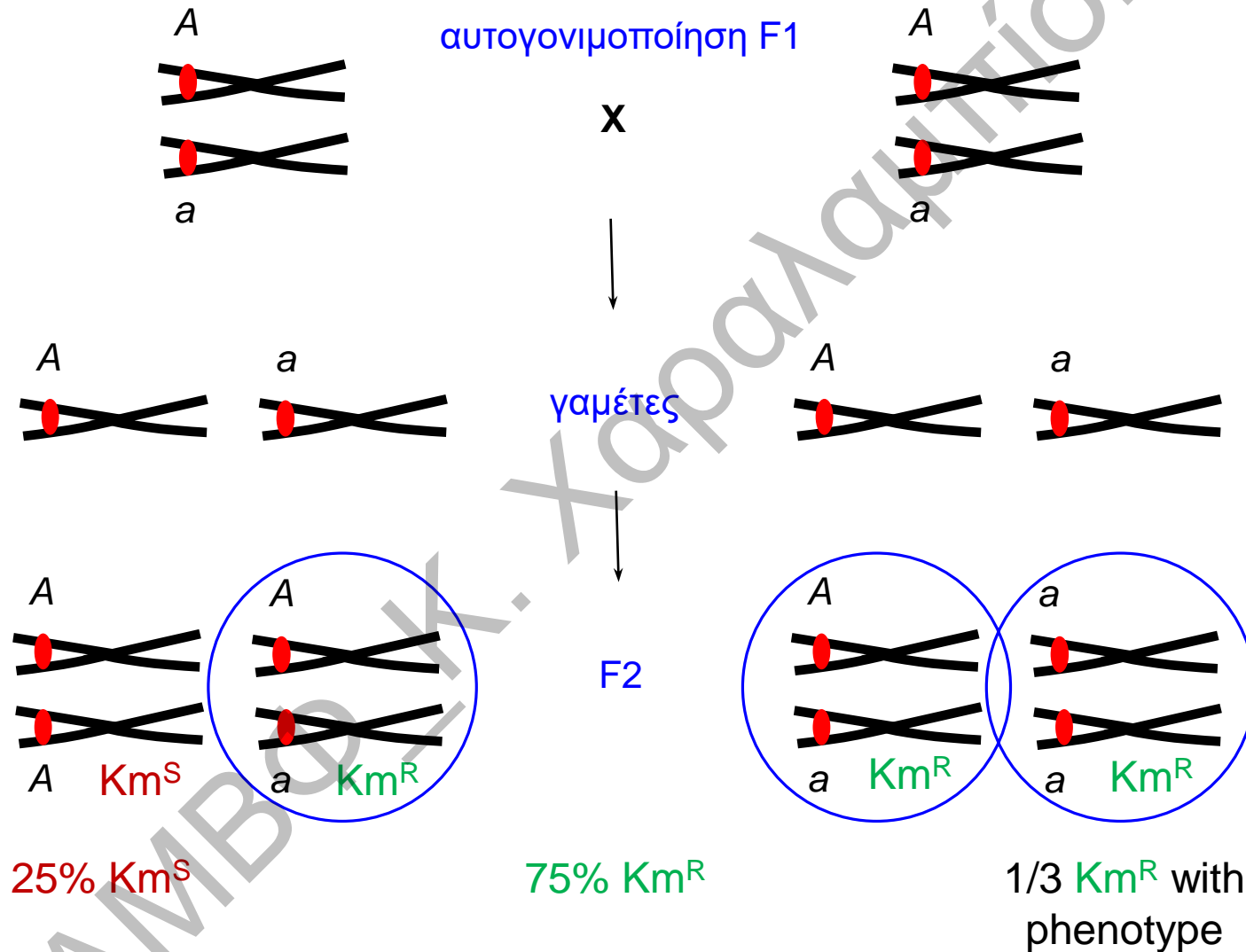
Progeny



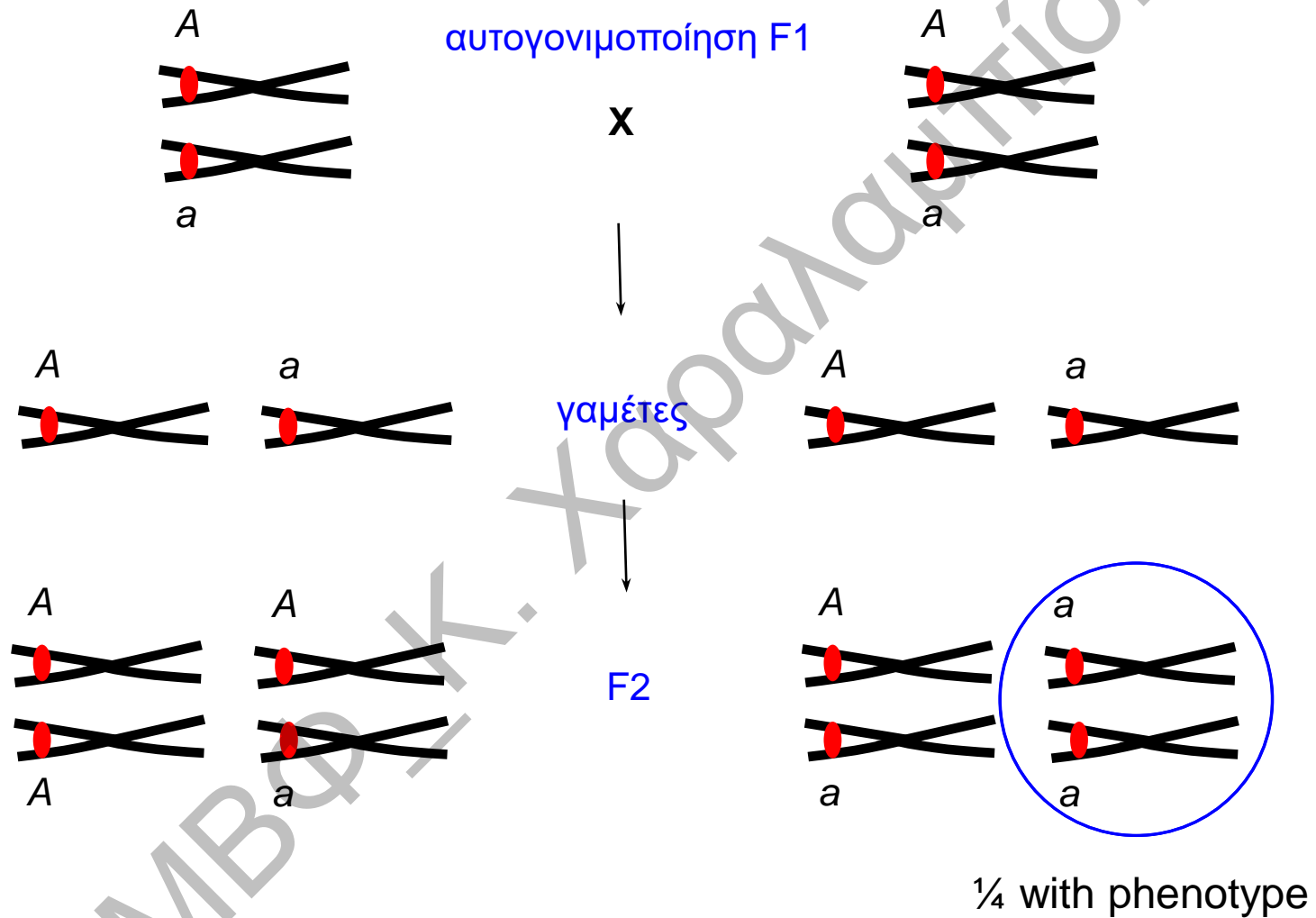
- Ετερόζυγα φυτά (όσον αφορά το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο)
- Ημίζυγα (όσον αφορά το διαγονίδιο)



Ο καθορισμός του είδους της μετάλλαξης (T-DNA/Km^R)



Ο καθορισμός του είδους της μετάλλαξης (σημειακή/EMS)



Ορισμένες απλές αναλογίες με βάση το είδος της μετάλλαξης

- 1) Υποτελής αλληλόμορφο γονίδιο = 3:1 (1Aα : 2Aα : 1αα)
- 2) Επικρατές αλληλόμορφο γονίδιο = 1:3 (1Aα : 2Aα : 1αα)
- 3) Ημικυρίαρχα αλληλόμορφα γονίδια = 1:2:1 (1Aα : 2Aα : 1αα)
- 4) Δύο μη συνδεδεμένα υποτελή γονίδια = 1:16
- 5) Ένα υποτελής και ένα ασύνδετο επικρατές = 3:16
- 6) Δύο μη συνδεδεμένα επικρατή γονίδια = 9:16

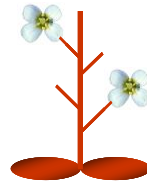


Επιβεβαίωση T-DNA ένθεσης (όταν η «σειρά» έχει αποκτηθεί από «τράπεζα»)

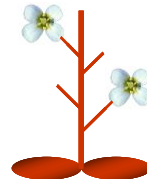
Γονίδιο στόχος (YFG)



TCGAGCGACATGACATGATCA
GCATCGATCGACTAGCATCGA
TGAGCATGCACGATACGTAGA
CTACGATCGATTATATGCACG
GCAGCAGATCAGCACATGCAC
GATACGTAGACTACGATCGAT
TATATGCACGGCAGCAGATCA
GCACAGATAGATCGATCGATT
ATATGCACGGCAATGCGCAGT



YFG X1



Σημείο ένθεσης στο γονίδιο X



Μεταλλαγμένο στέλεχος X1

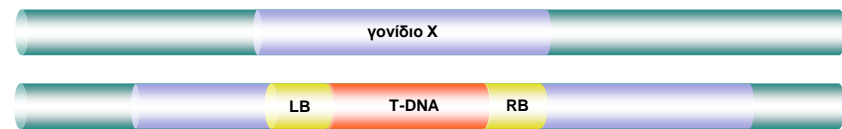
Σημείο ένθεσης στο γονίδιο X



Μεταλλαγμένο στέλεχος X2

PCR «σάρωση» φυτών
F1/F2 γενιάς

Ημίζυγο άτομο με ένθεση σε ένα από τα δύο ομόλογα χρωμοσώματα



← LB1

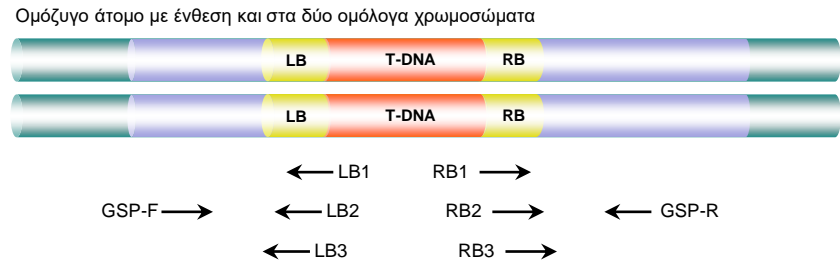
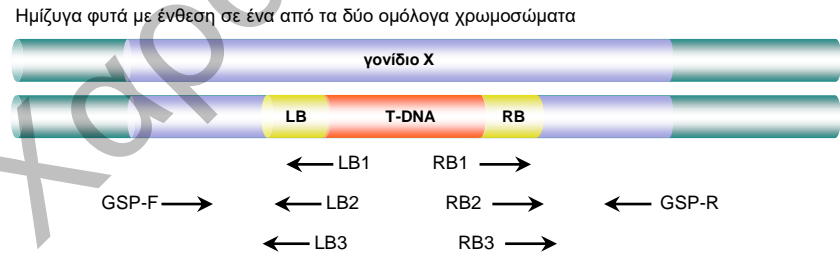
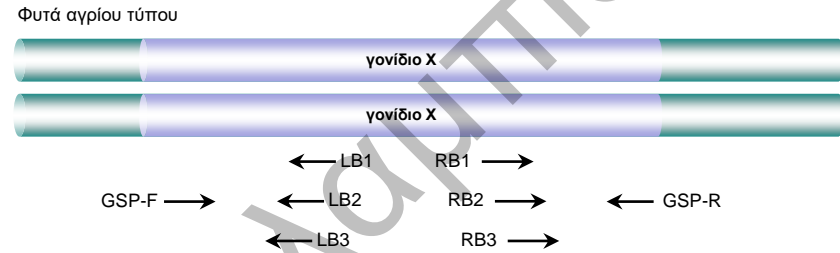
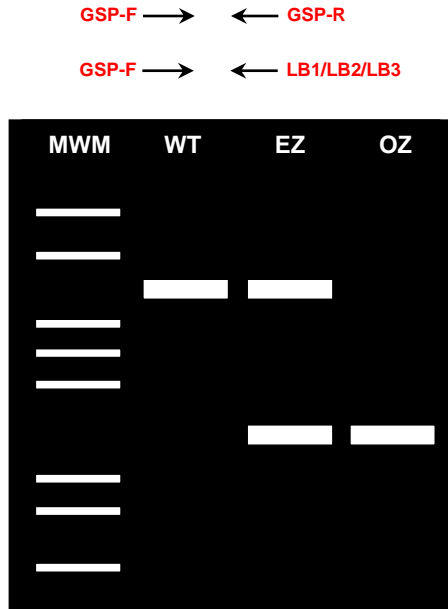
GSP-F →

← LB2

← LB3



Καθορισμός ομόζυγων/ετερόζυγων T-DNA μεταλλαγμάτων



Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών & Διασταυρώσεις

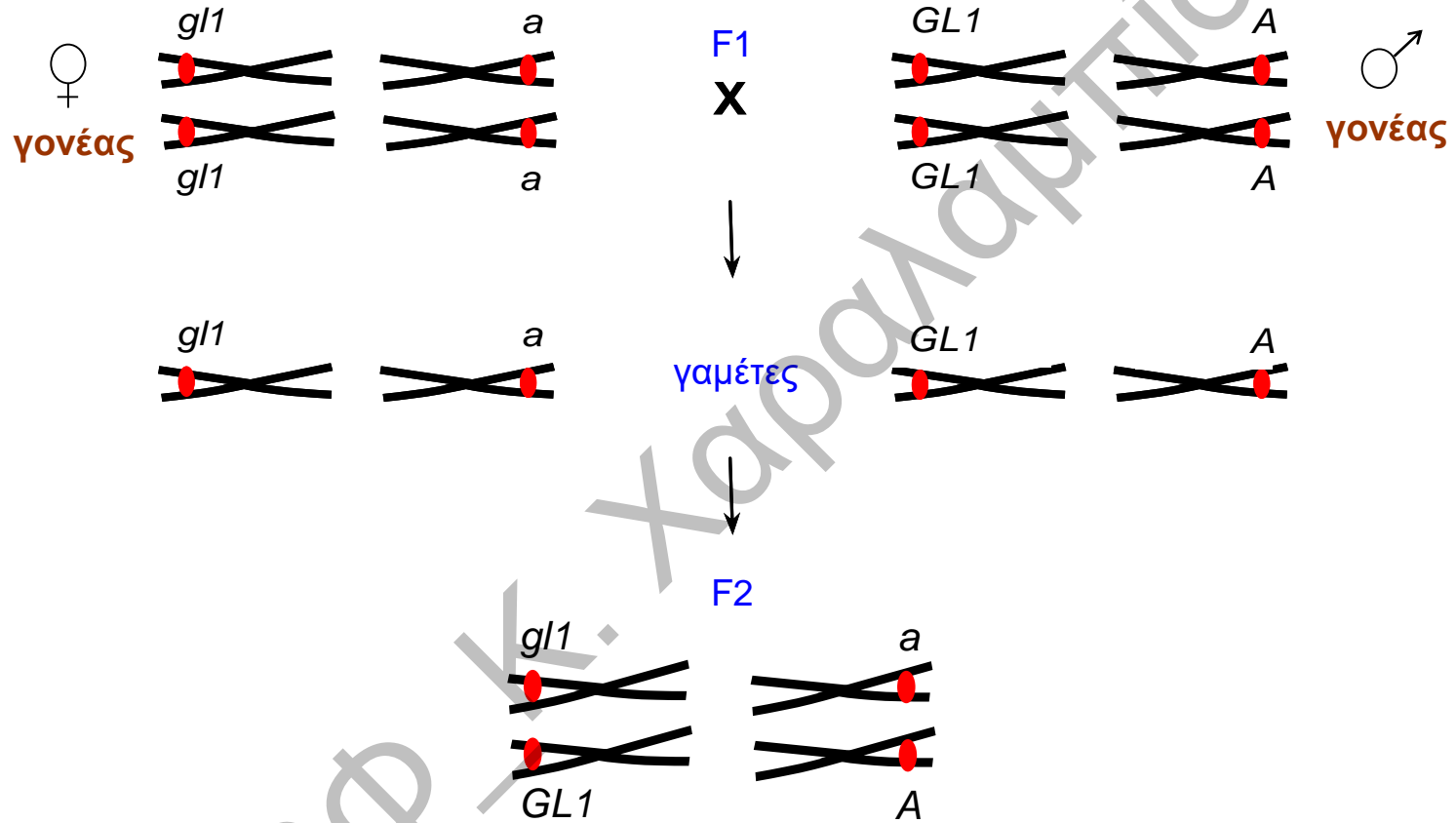
Η ανάλυση με PCR των απογόνων και η πραγματοποίηση γενετικών διασταυρώσεων είναι απαραίτητες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί καταρχήν εάν ο φαινότυπος που μελετάται ακολουθεί ή δεν ακολουθεί τους νόμους του Mendel

Κατ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται επίσης:

- Ο καθορισμός του είδους της μετάλλαξης (π.χ. υποτελής ή επικρατής)
- Επιβεβαίωση ένθεσης T-DNA και καθορισμός ομοζυγωτίας/ετεροζυγωτίας
- Ο «καθαρισμός» (clean up) του φαινότυπου μίας μετάλλαξης
- Ο καθορισμός του αριθμού των μεταλλάξεων ενός φαινότυπου
- Ο καθορισμός του τύπου της μετάλλαξης (πυρηνικό/πλαστιδιακό γονίδιο)
- Η πραγματοποίηση πειραμάτων συμπληρωματικότητας μεταξύ σειρών



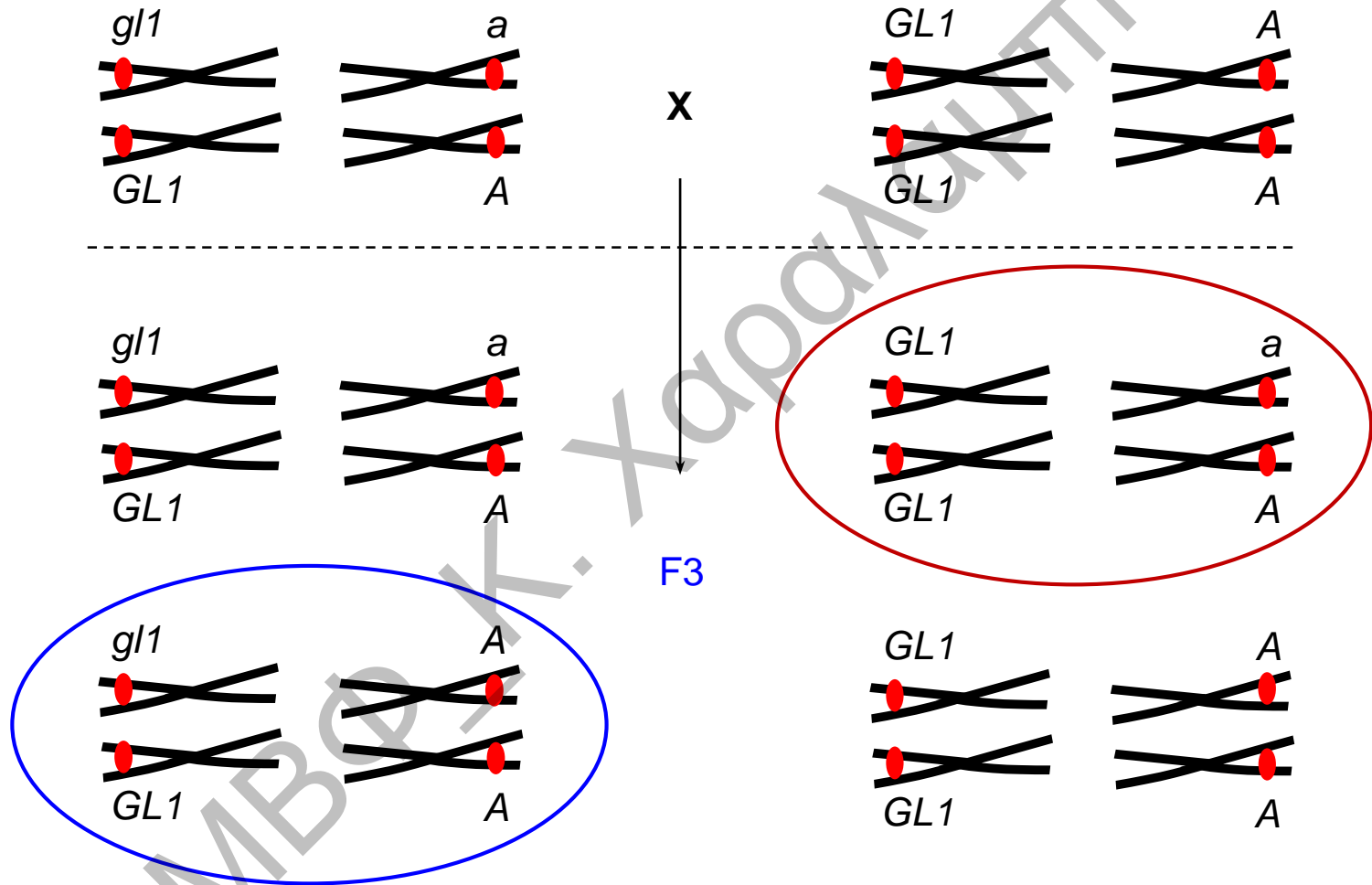
«Καθαρισμός» (clean up) του φαινότυπου



Το 50% των χρωμοσωμάτων είναι απαλλαγμένο από τη δευτερογενή μετάλλαξη στους απογόνους της F2 γενιάς



«Καθαρισμός» (clean up) του φαινότυπου μίας μετάλλαξης



«Καθαρισμός» (clean up) του φαινότυπου μίας μετάλλαξης

- Κάθε φορά που το μεταλλαγμένο στέλεχος επαναδιασταυρώνεται με ένα φυτό αγρίου τύπου το 50% του γονιδιώματος του αντικαθίσταται από άγριου τύπου γονίδια
- Η πιθανότητα διατήρησης μίας μη συνδεδεμένης δευτερογενούς μετάλλαξης μετά από n αριθμό επαναδιασταυρώσεων είναι $(1/2)^n$
- Η πιθανότητα για παράδειγμα διατήρησης μίας δευτερογενούς μετάλλαξης, μαζί με την υπό μελέτη μετάλλαξη, μετά από τέσσερις γενιές είναι 0.062 (0.5^4). Ο επιθυμητός φαινότυπος έχει δηλαδή "καθαριστεί" σε ποσοστό 94%



Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών & Διασταυρώσεις

Η ανάλυση με PCR των απογόνων και η πραγματοποίηση γενετικών διασταυρώσεων είναι απαραίτητες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί καταρχήν εάν ο φαινότυπος που μελετάται ακολουθεί ή δεν ακολουθεί τους νόμους του Mendel

Κατ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται επίσης:

- Ο καθορισμός του είδους της μετάλλαξης (π.χ. υποτελής ή επικρατής)
- Επιβεβαίωση ένθεσης T-DNA και καθορισμός ομοζυγωτίας/ετεροζυγωτίας
- Ο «καθαρισμός» (clean up) του φαινότυπου μίας μετάλλαξης
- Ο καθορισμός του αριθμού των μεταλλάξεων ενός φαινότυπου
- Ο καθορισμός του τύπου της μετάλλαξης (πυρηνικό/πλαστιδιακό γονίδιο)
- Η πραγματοποίηση πειραμάτων συμπληρωματικότητας μεταξύ σειρών



Παλίνδρομες διασταυρώσεις



Ο καθορισμός του τύπου της μετάλλαξης (πυρηνική/κυτταροπλασματική)

Διασταύρωση 1

♀ Φυσιολογικό (αγρίου τύπου) x ♂ Μεταλλαγμένο

(AA)

(aa)



?

Διασταύρωση 2

♀ Μεταλλαγμένο x ♂ Φυσιολογικό (αγρίου τύπου)

(aa)

(AA)



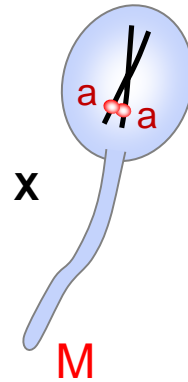
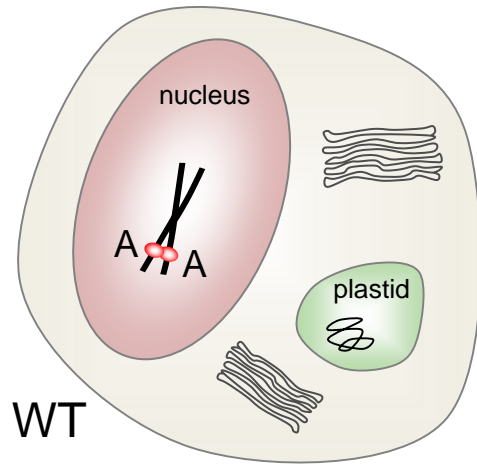
?

- A) Όλοι οι απόγονοι αγρίου τύπου → πυρηνικό υποτελές γονίδιο (Aa)
- B) Όλοι οι απόγονοι μεταλλαγμένοι → πυρηνικό επικρατές γονίδιο (Aa)
- Γ) Απόγονοι διασταύρωσης 1 αγρίου τύπου }
Απόγονοι διασταύρωσης 2 μεταλλαγμένοι } → μιτοχονδριακό/πλαστιδιακό ή μητρικός παράγοντας

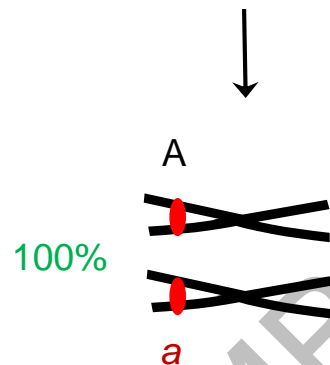
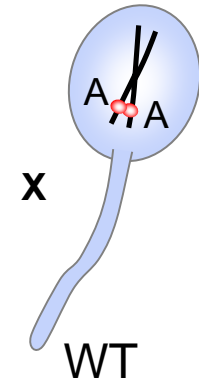
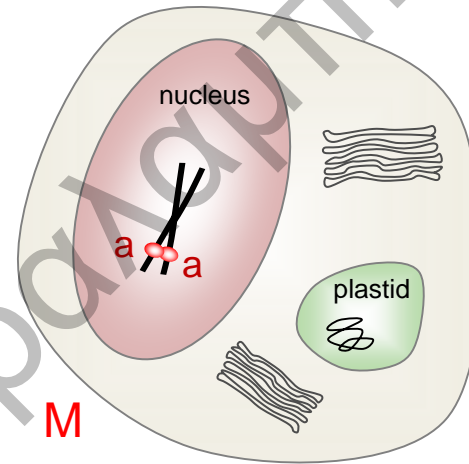


Εάν ο φαινότυπος οφείλεται στο πυρηνικό γονίδιο *a* (υποτελής)...

Διασταύρωση 1

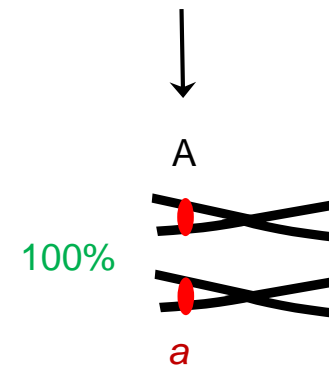


Διασταύρωση 2



Όλοι οι απόγονοι
είναι αγρίου τύπου

A) Όλοι οι απόγονοι αγρίου τύπου

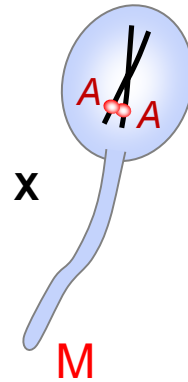
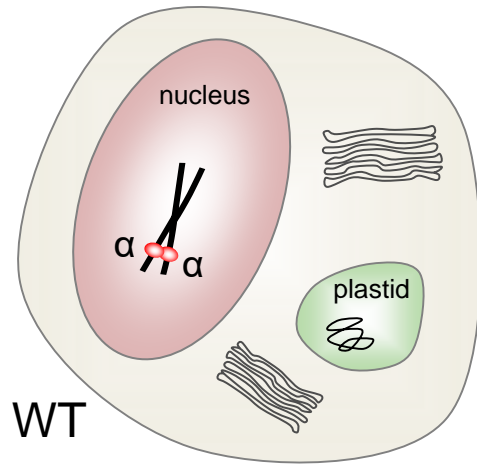


πυρηνικό υποτελής γονίδιο

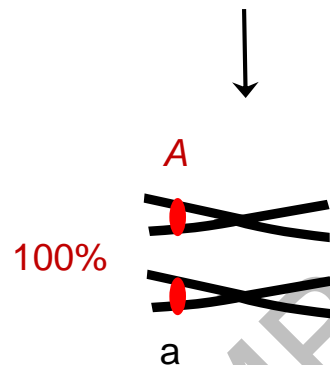
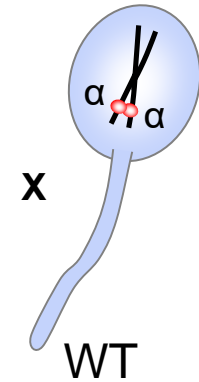
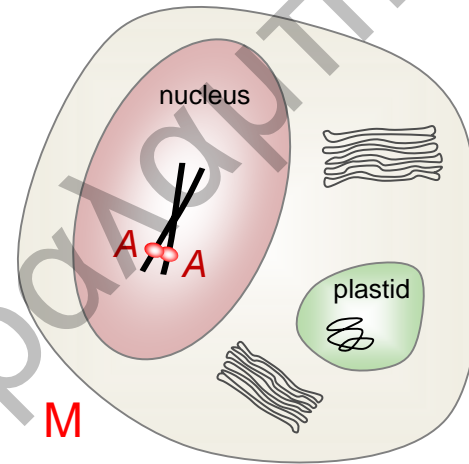


Εάν ο φαινότυπος οφείλεται στο πυρηνικό γονίδιο A (επικρατές)...

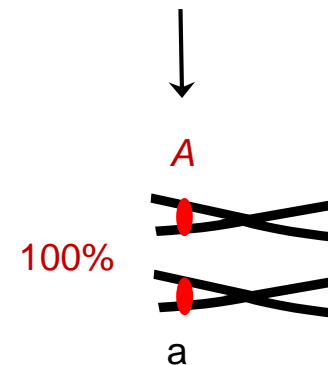
Διασταύρωση 1



Διασταύρωση 2



Όλοι οι απόγονοι
είναι μεταλλαγμένοι

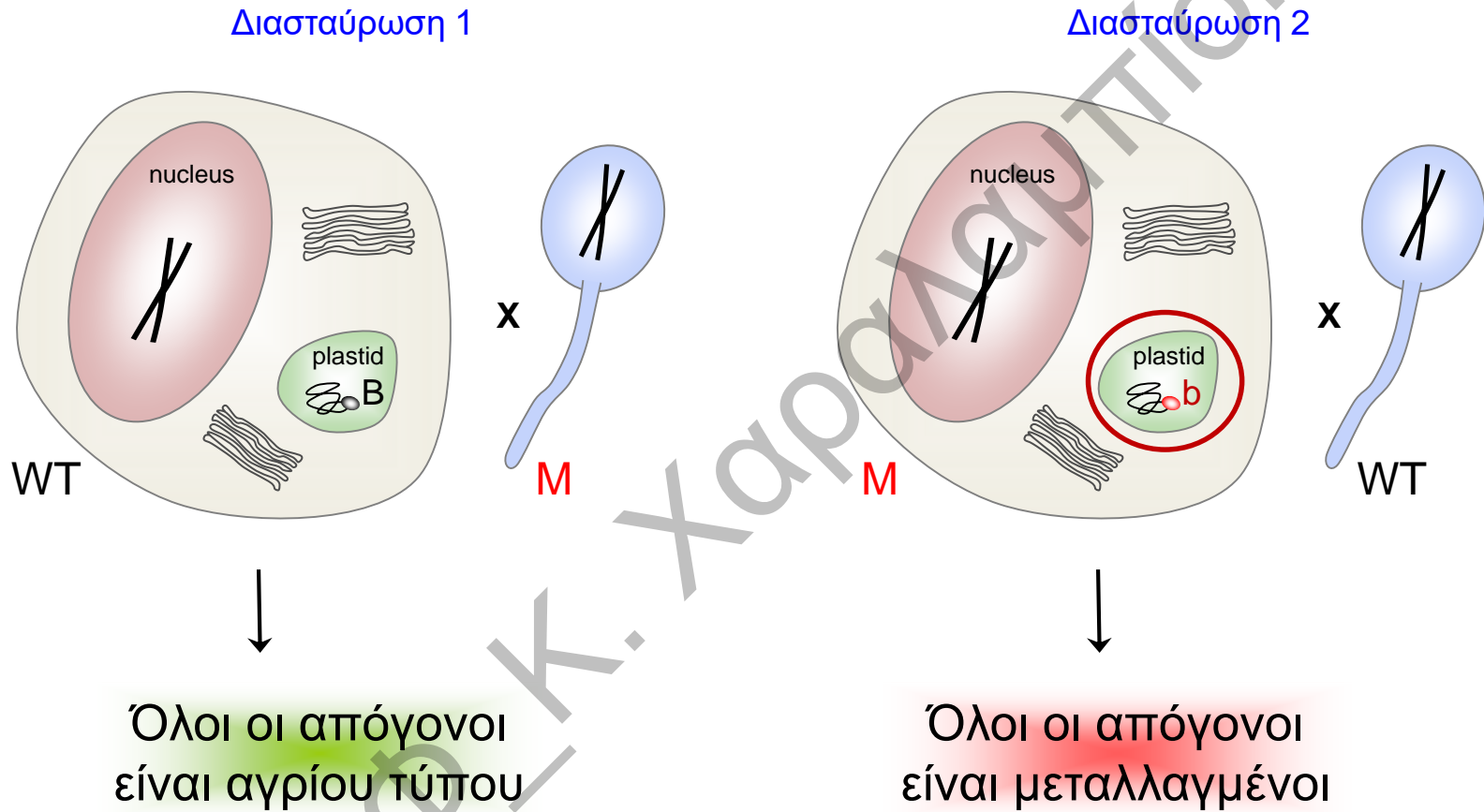


B) Όλοι οι απόγονοι μεταλλαγμένοι

πυρηνικό επικρατές γονίδιο



Εάν το γονίδιο είναι πλαστιδιακό...



Γ) Απόγονοι διασταύρωσης 1 αγρίου τύπου } → μιτοχονδριακό/πλαστιδιακό
Απόγονοι διασταύρωσης 2 μεταλλαγμένοι } ή μητρικός παράγοντας



Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών & Διασταυρώσεις

Η ανάλυση με PCR των απογόνων και η πραγματοποίηση γενετικών διασταυρώσεων είναι απαραίτητες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί καταρχήν εάν ο φαινότυπος που μελετάται ακολουθεί ή δεν ακολουθεί τους νόμους του Mendel

Κατ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται επίσης:

- Ο καθορισμός του είδους της μετάλλαξης (π.χ. υποτελής ή επικρατής)
- Επιβεβαίωση ένθεσης T-DNA και καθορισμός ομοζυγωτίας/ετεροζυγωτίας
- Ο «καθαρισμός» (clean up) του φαινότυπου μίας μετάλλαξης
- Ο καθορισμός του αριθμού των μεταλλάξεων ενός φαινότυπου
- Ο καθορισμός του τύπου της μετάλλαξης (πυρηνικό/πλαστιδιακό γονίδιο)
- Η πραγματοποίηση πειραμάτων συμπληρωματικότητας μεταξύ σειρών



Έλεγχος συμπληρωματικότητας

Χρησιμοποιείται για να αποδειχθεί:



- Εάν δύο υποτελείς μεταλλάξεις που προκαλούν τον ίδιο φαινότυπο είναι αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου ή διαφορετικά γονίδια (**EMS mutations**)
- Εάν ένας παρατηρούμενος φαινότυπος οφείλεται στη μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου (**known T-DNA or EMS mutation**)

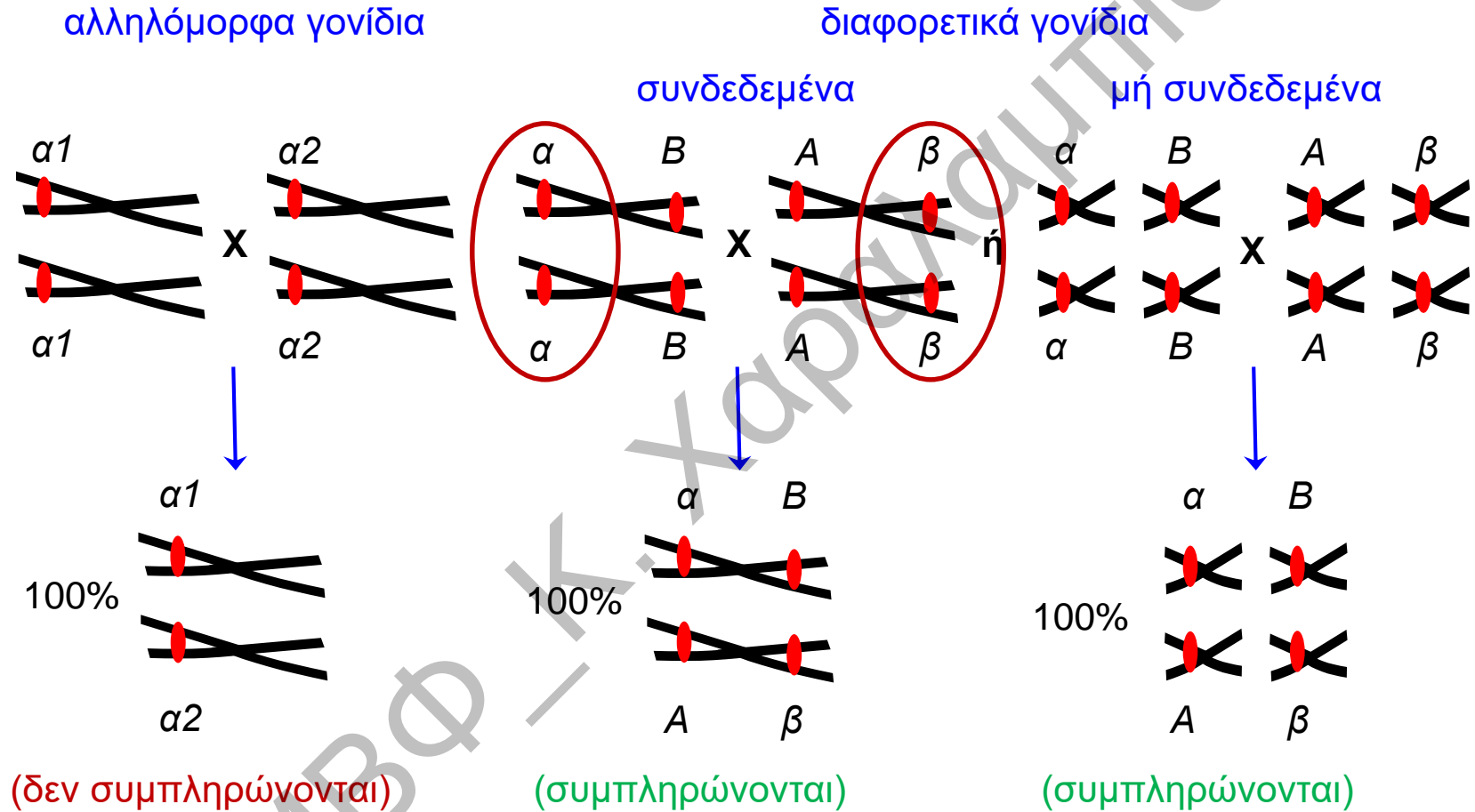
Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί:



- Όταν τα δύο γονίδια βρίσκονται στο ίδιο μονοπάτι και ο φαινότυπος εκδηλώνεται μόνο με την συνδυαστική μετάλλαξη και των δύο γονιδίων.
- Στην περίπτωση επικρατών αλληλομόρφων.



Διασταυρώσεις για έλεγχο συμπληρωματικότητας (EMS mutations)



Έλεγχος συμπληρωματικότητας

Χρησιμοποιείται για να αποδειχθεί:



- Εάν δύο υποτελείς μεταλλάξεις που προκαλούν τον ίδιο φαινότυπο είναι αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου ή διαφορετικά γονίδια (**EMS mutations**)
- Εάν ένας παρατηρούμενος φαινότυπος οφείλεται στη μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου (**known T-DNA or EMS mutation**)

Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί:



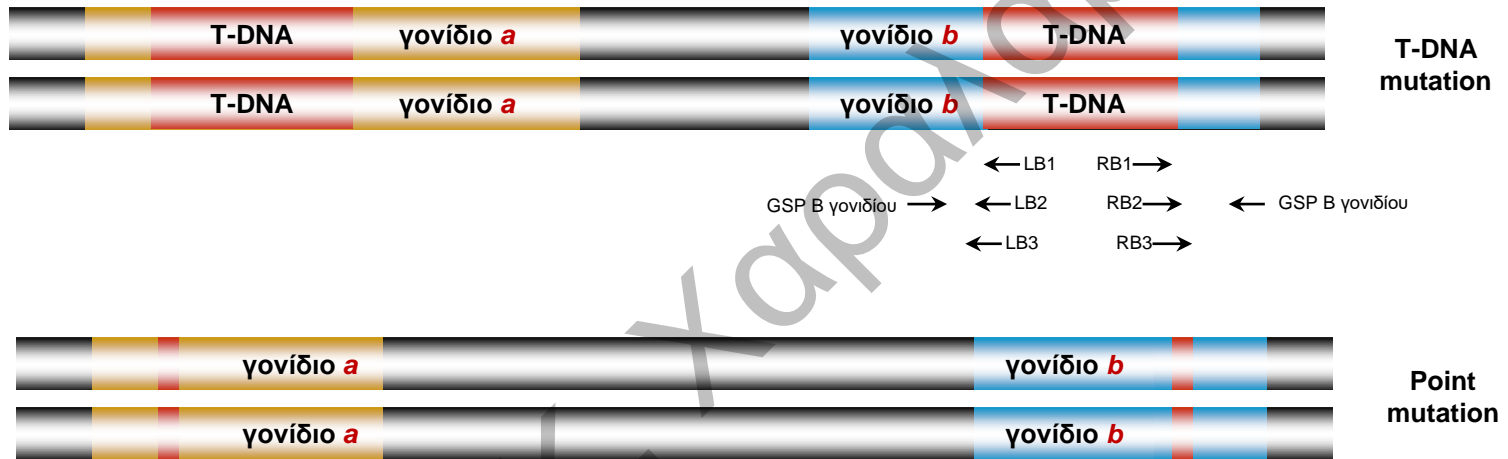
- Όταν τα δύο γονίδια βρίσκονται στο ίδιο μονοπάτι και ο φαινότυπος εκδηλώνεται μόνο με την συνδυαστική μετάλλαξη και των δύο γονιδίων.
- Στην περίπτωση επικρατών αλληλομόρφων.



Σύνδεση του παρατηρούμενου φαινότυπου με ένα γονίδιο

(known T-DNA or EMS mutation)

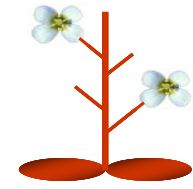
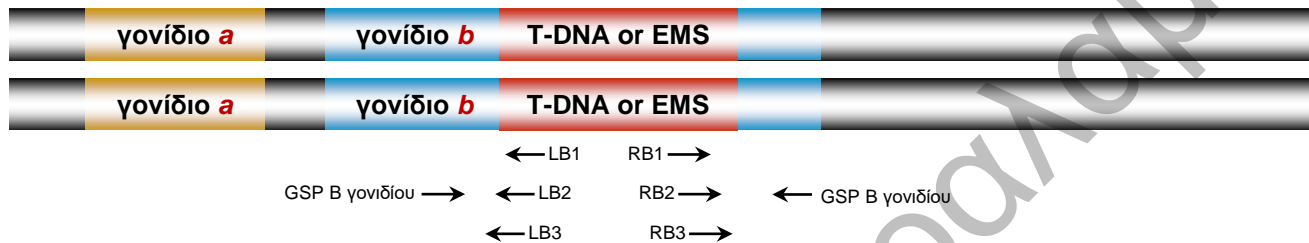
Εάν έχω περισσότερες από μία ενθέσεις ή μεταλλάξεις ?



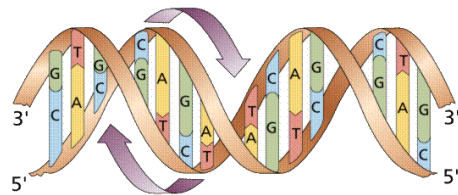
Σύνδεση του παρατηρούμενου φαινότυπου με ένα γονίδιο

(known T-DNA or EMS mutation)

Εάν ο φαινότυπος οφείλεται σε μετάλλαξη ενός μόνο γονιδίου (B - *bb*)



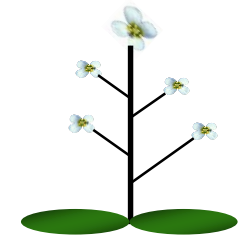
Mutant *b*



PCR

αγρίου τύπου γονίδιο B

Συμπλήρωση του φαινότυπου *b*



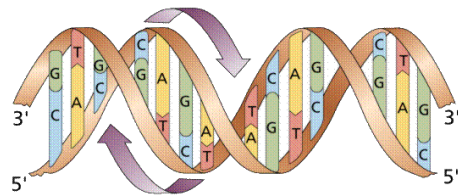
Wild type B



Σύνδεση του παρατηρούμενου φαινότυπου με ένα γονίδιο

(known T-DNA or EMS mutation)

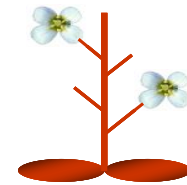
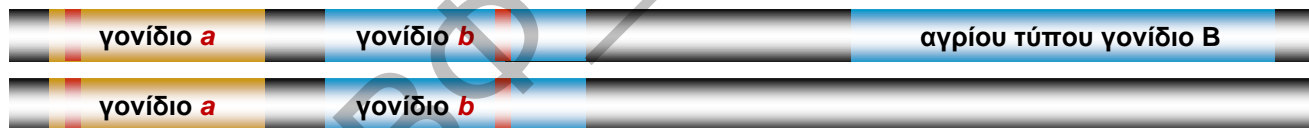
Εάν ο φαινότυπος οφείλεται σε μετάλλαξη ενός μόνο γονιδίου (A - aa)



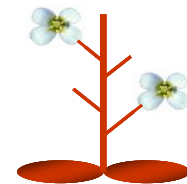
PCR

αγρίου τύπου γονίδιο B

Μη συμπλήρωση του φαινότυπου a



Mutant a

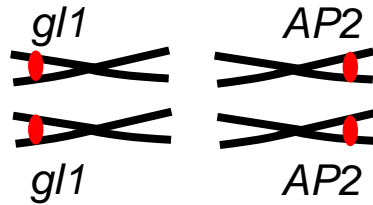


Mutant a

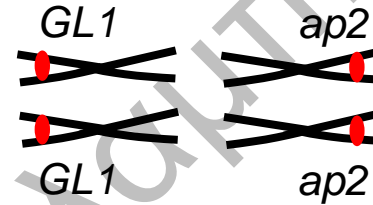


Δημιουργία και αναγνώριση διπλών μεταλλαγμάτων

φαινότυπος απουσία τριχιδίων

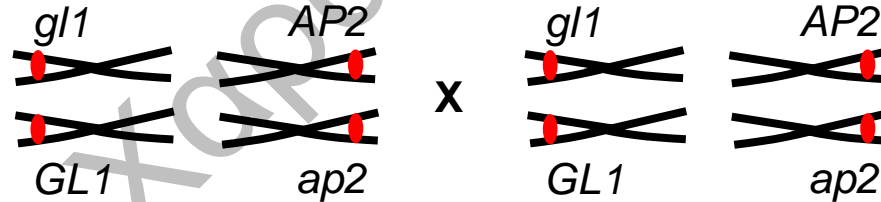


φαινότυπος απουσία πετάλων



X

F1



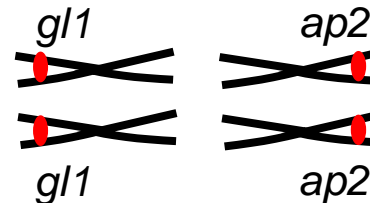
F2

1. Διασταυρώσεις μεταξύ απλών μεταλλαγμάτων

Πιθανότητα p μη εύρεσης ενός διπλού μεταλλάγματος = $(15/16)^n$.
Εάν $n=47$ τότε $p=(15/16)^{47}=0.05=5\%$

διάσχιση 9:3:3:1 από τους οποίους 1/16 των απογόνων είναι διπλά μεταλλάγματα

2. Με γονιδιακή αποσιώπηση

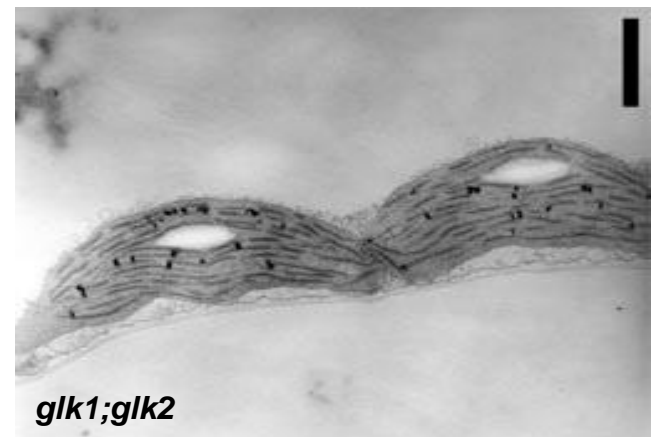
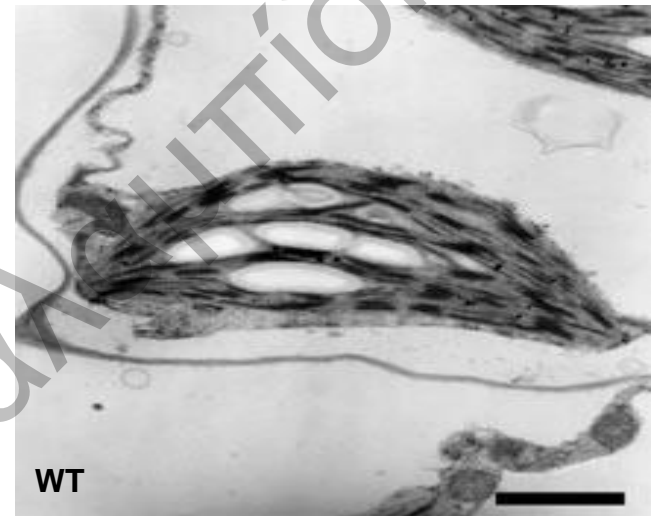


F3



Δημιουργία και αναγνώριση διπλών μεταλλαγμάτων

glk1;glk2 double mutant have defects in chloroplast biogenesis
(<http://dps.plants.ox.ac.uk/langdalelab/GLK.html>)

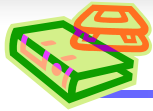


Μεθοδολογία στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών

1. Πρότυπα μοντέλα στη μελέτη ανάπτυξης των φυτών
2. Μέθοδοι μετασχηματισμού και μεταλλαξιγένεσης
3. Απόκτηση μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis*
4. Γενετική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
5. Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών
6. Απομόνωση του γονιδίου που σχετίζεται με μία μετάλλαξη
7. Τρόποι μελέτης της έκφρασης και λειτουργίας ενός γονιδίου
8. Παραδείγματα μελετών μοριακής γενετικής



END OF PART II



Thanks for your attention

ΑΜΒΦ - Κ. Χαραλαμπίδης