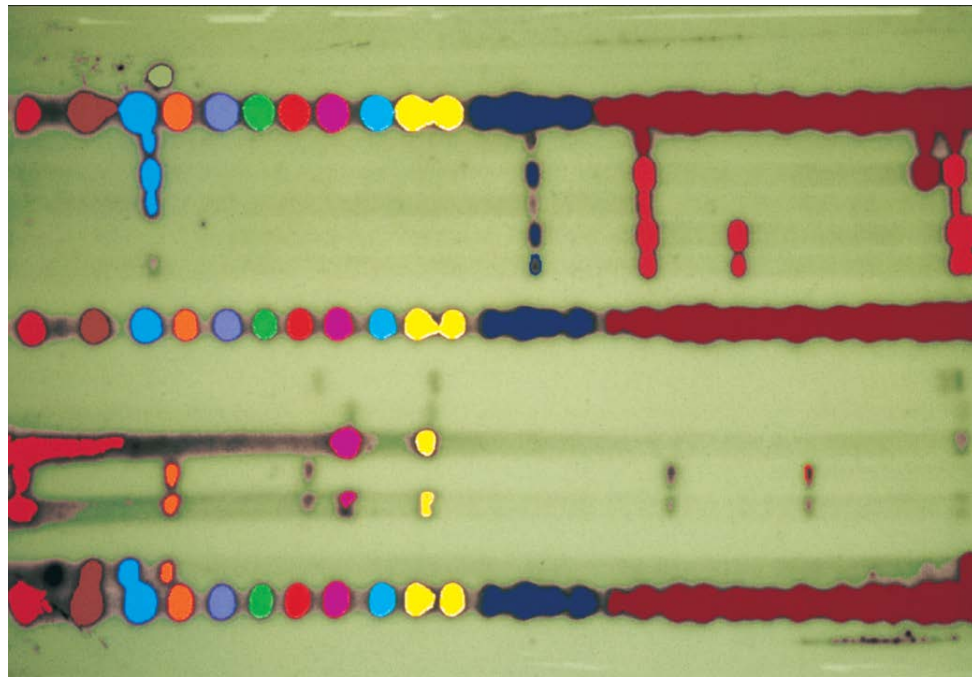


Κεφάλαιο 17

Εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA.

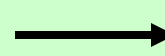


Αποτύπωμα DNA.

ΒΕΛΤΙΩΣΗ



ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ



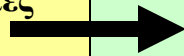
ΜΕΤΑΠΟΙΗΣΗ



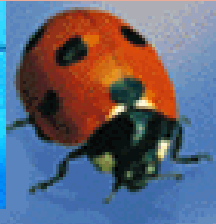
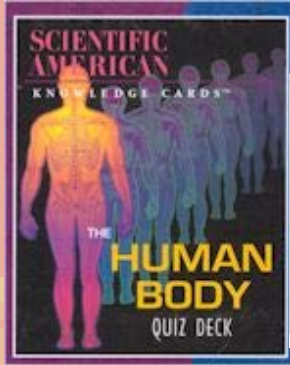
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ



- Βελτίωση απόδοσης και διατροφικής αξίας
- Προσαρμογή της αρχιτεκτονικής του φυτού σε παραγωγικές ανάγκες
- Αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες
- Αντοχή σε ζιζανιοκτόνα
- Μετασυλλεκτική διατήρηση
- Αντοχή στις καταπονήσεις
- Φυτά – Βιοαντιδραστήρες, μοριακή γεωργία.



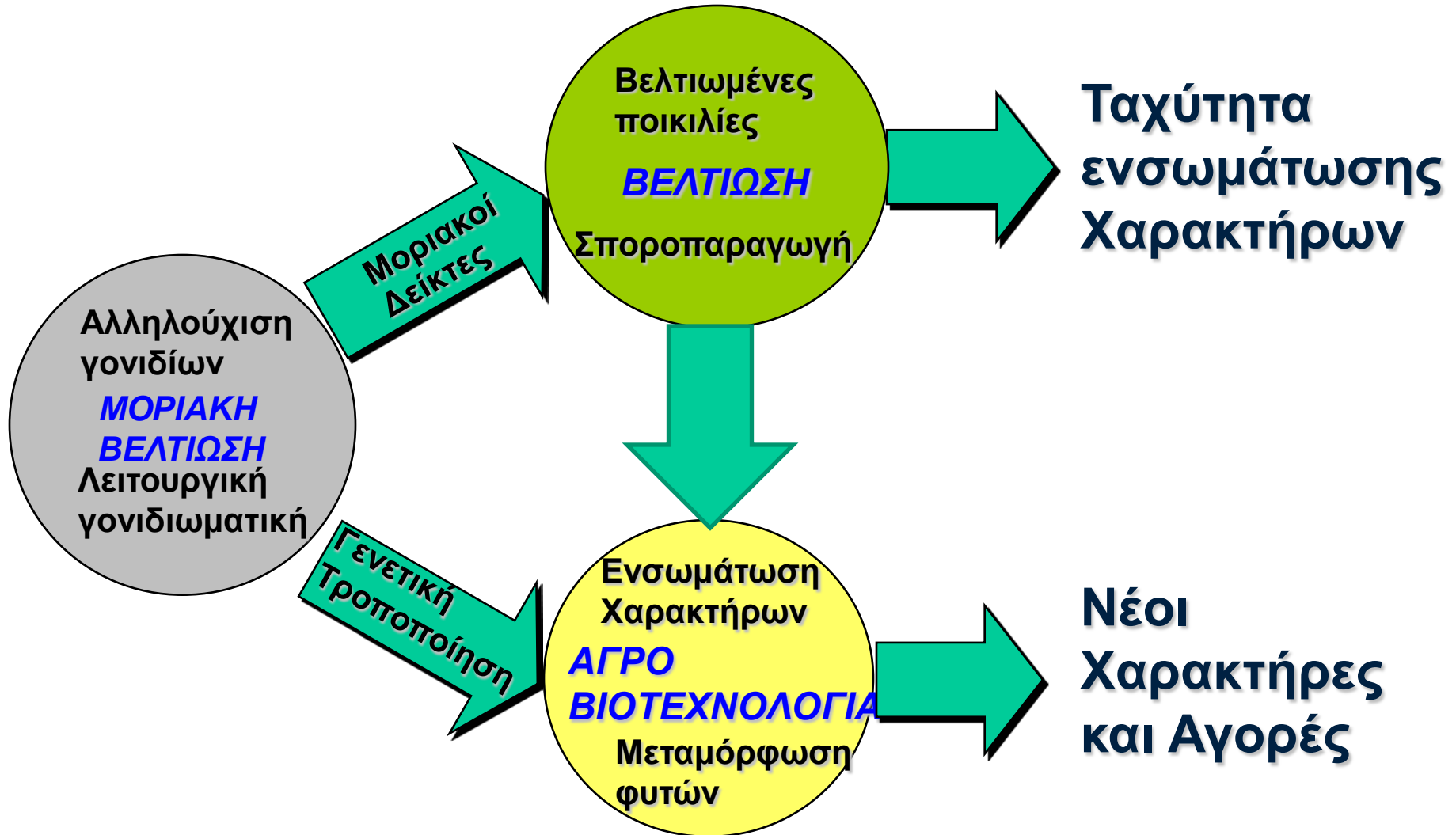
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΝΑΓΚΩΝ ΜΕ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



DNA

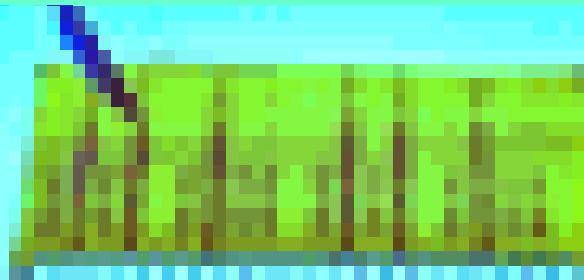
γονιδιωματική

Από τη γονιδιωματική στη βελτίωση φυτών



ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Μοριακός δείκτης είναι μια αλληλουχία DNA που ανιχνεύουμε με διάφορες τεχνικές και μπορεί να έχει παραλλακτικότητα σε διαφορετικά άτομα



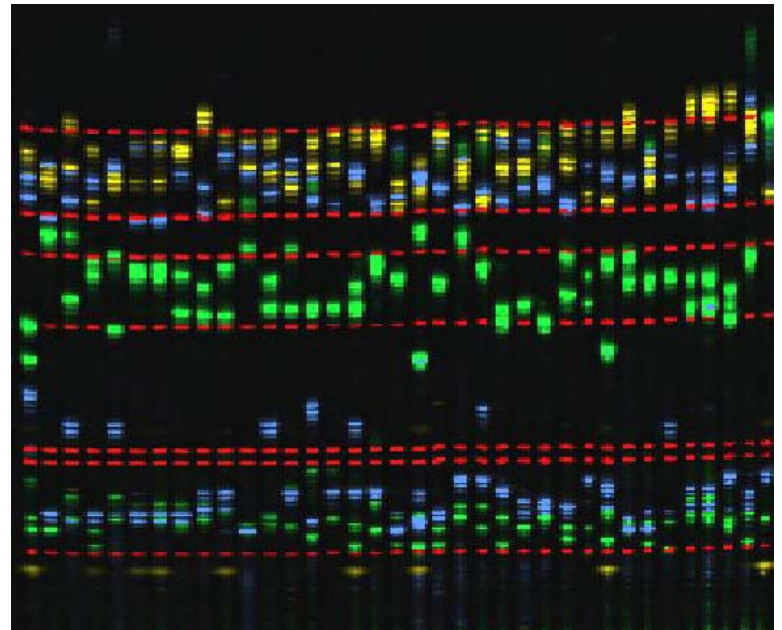
ΧΡΗΣΕΙΣ

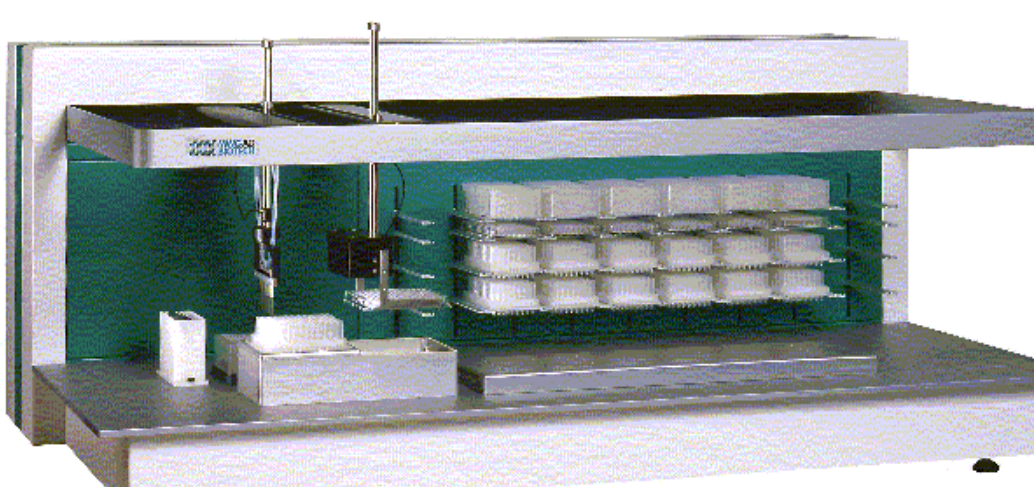
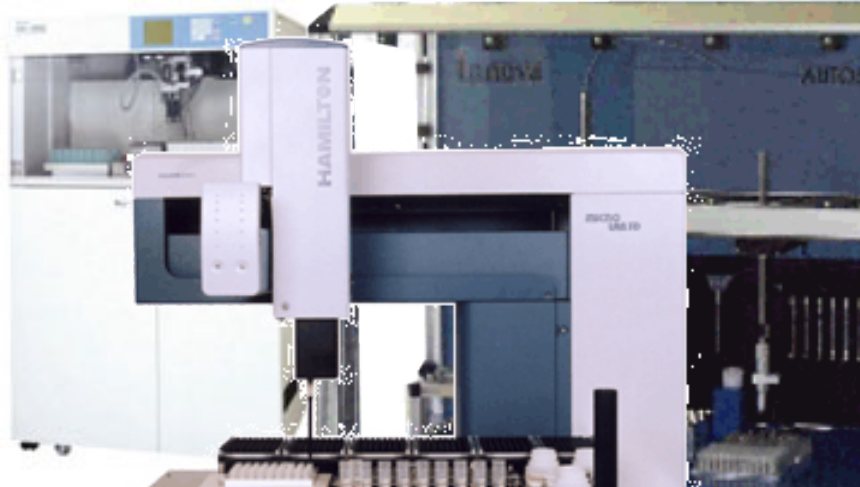
- Εκτίμηση γενετικής παραλλακτικότητας.
- Μοριακοί δείκτες συνδεδεμένοι με φαινοτυπικά γνωρίσματα μεγάλου ενδιαφέροντος.
 - Μοριακή Βελτίωση.
 - Χάρτες σύνδεσης.
 - Θέσεις Ποσοτικών χαρακτήρων(QTLs).
- Καταγωγή ατόμων.
- Γενετική αποτύπωση
 - Εφαρμογές σε πνευματικά δικαιώματα και πατέντες.
- Κατανόηση συστηματικών σχέσεων.

Επιλογή με τη χρήση μοριακών δεικτών

Marker assisted selection (MAS)

- Επιλογή γονέων
- Πρώιμη επιλογή
- Όταν η φαινοτυπική επιλογή είναι δύσκολη
- Αποφυγή χρονοβόρας και υψηλού κόστους επιλογής
- Εκμετάλλευση άγριων ειδών
- Ταυτόχρονη επιλογή
- Επιτάχυνση επαναδιασταύρωσης
- Αυτοματοποίηση





ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ

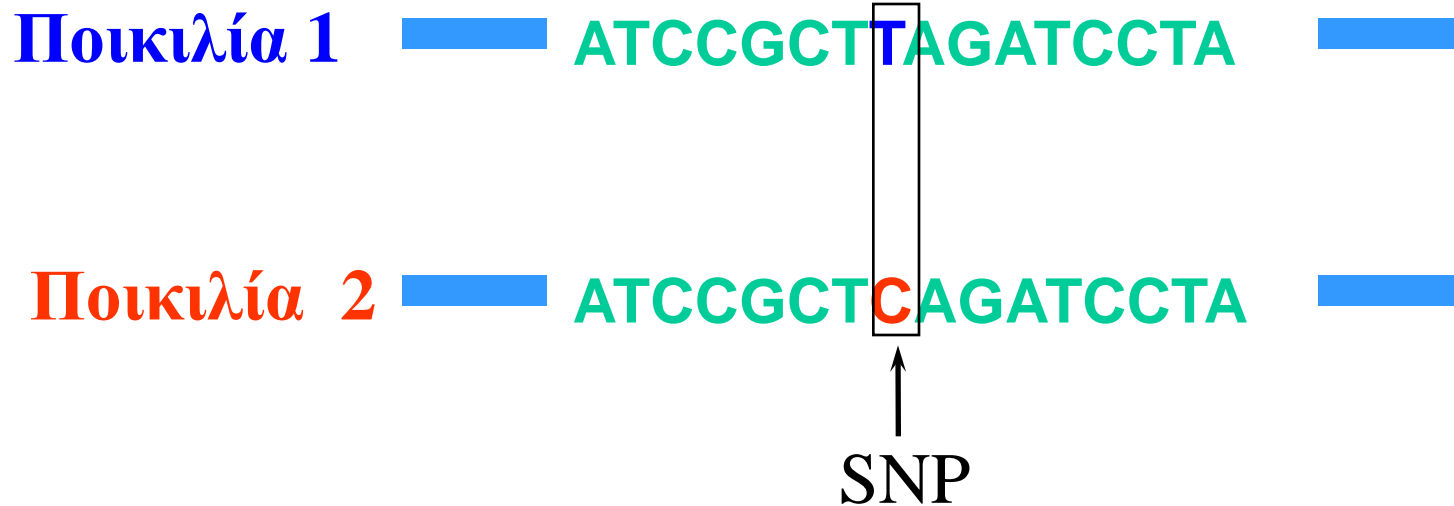


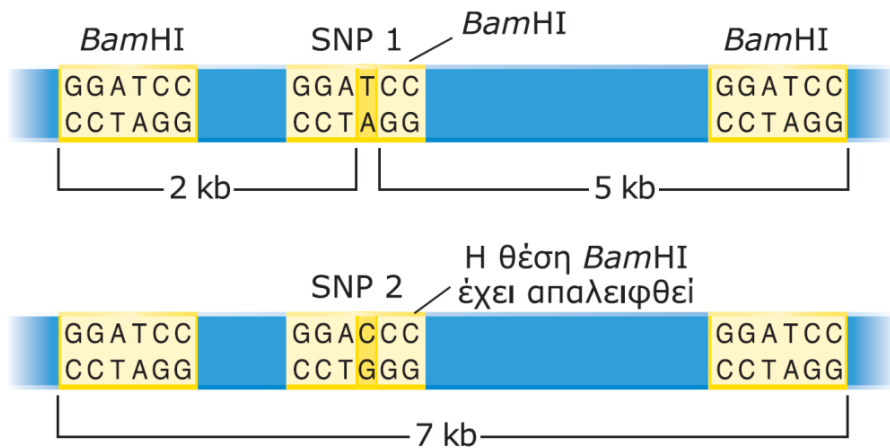
Είδη μοριακών δεικτών

Δείκτης	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Βασίζεται σε	υβριδισμό	PCR	PCR	PCR	PCR / αλληλούχιση
Βαθμός παραλλακτικότητας	υψηλός	υψηλός	υψηλός	πολύ υψηλός	πολύ υψηλός
Κληρονόμηση	συγκυρίαρχη	κυρίαρχη	κυρίαρχη /συγκυρίαρχη	συγκυρίαρχη	συγκυρίαρχη
Κόστος	υψηλό	χαμηλό	υψηλό	υψηλό	υψηλό
Επαναληψιμότητα	υψηλή	χαμηλή	υψηλή	υψηλή	υψηλή
Ανάλυση δεδομένων	εύκολη	εύκολη	δύσκολη	πολύ εύκολη	πολύ εύκολη

Τι είναι SNP genotyping

Αλληλουχία DNA

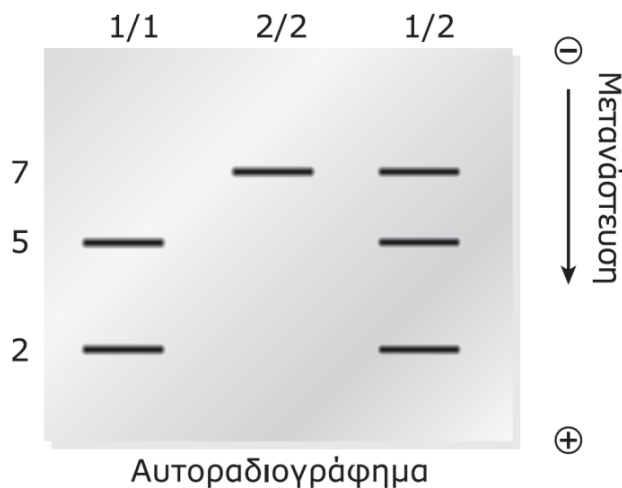




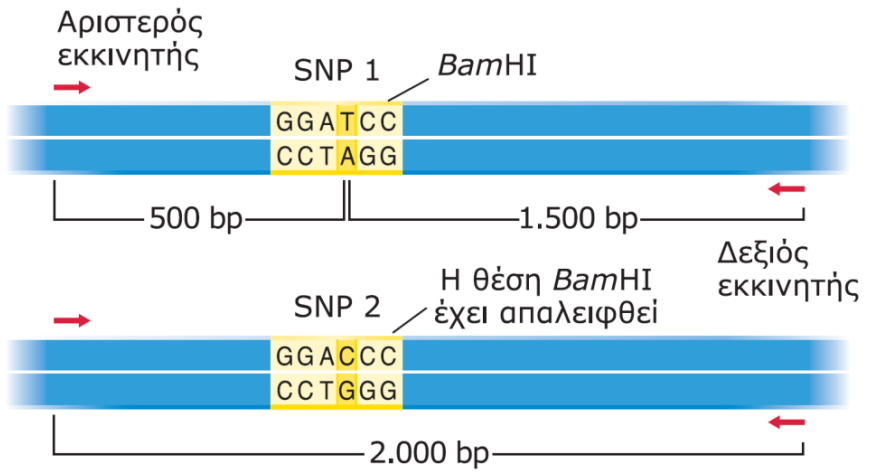
Ιχνηθέτης

Πέψη με *Bam*HI και ανάλυση με στύπωμα Southern

Γονότυποι

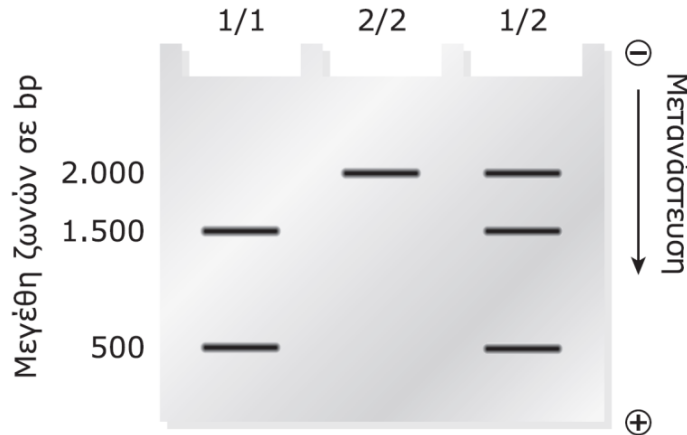


Ανάλυση SNP που επηρεάζουν θέσεις περιορισμού, με στύπωμα Southern. Ένα χρωμοσωμικό τμήμα μεγέθους 7 kb φέρει θέσεις *Bam*HI σε κάθε άκρο του. Το αλληλόμορφο SNP 1 (επάνω) έχει μια τρίτη θέση *Bam*HI, σε απόσταση 2 kb από το αριστερό άκρο. Στο αλληλόμορφο SNP 2 (κάτω) ένα ζεύγος βάσεων ΤΑ έχει αντικατασταθεί από ένα ζεύγος βάσεων CG, με αποτέλεσμα η τρίτη θέση *Bam*HI να έχει εξαλειφθεί. Προκειμένου να γονοτυπηθεί ο γενετικός αυτός τύπος, το DNA πέπτεται με *Bam*HI και ακολουθεί στύπωμα Southern και υβριδοποίηση με τον ιχνηθέτη που υποδεικνύεται. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται τα αναμενόμενα πρότυπα ζωνών στο αυτοραδιογράφημα για τους τρεις πιθανούς γονοτύπους.



Απομόνωση γονιδιωματικού DNA, PCR και πέψη με *Bam*HI

Γονότυποι

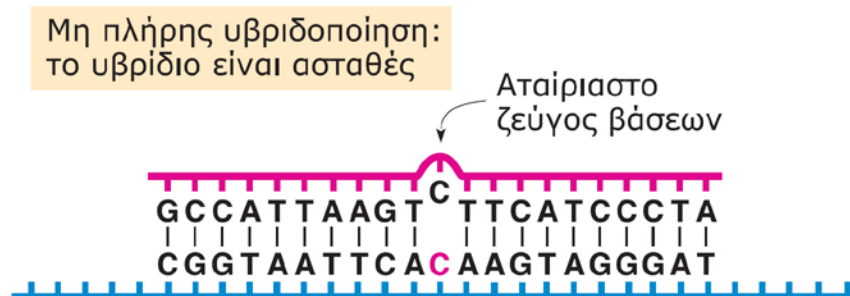
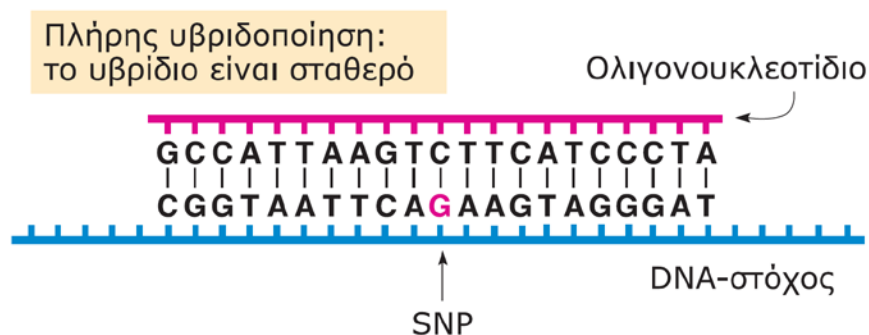


Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης

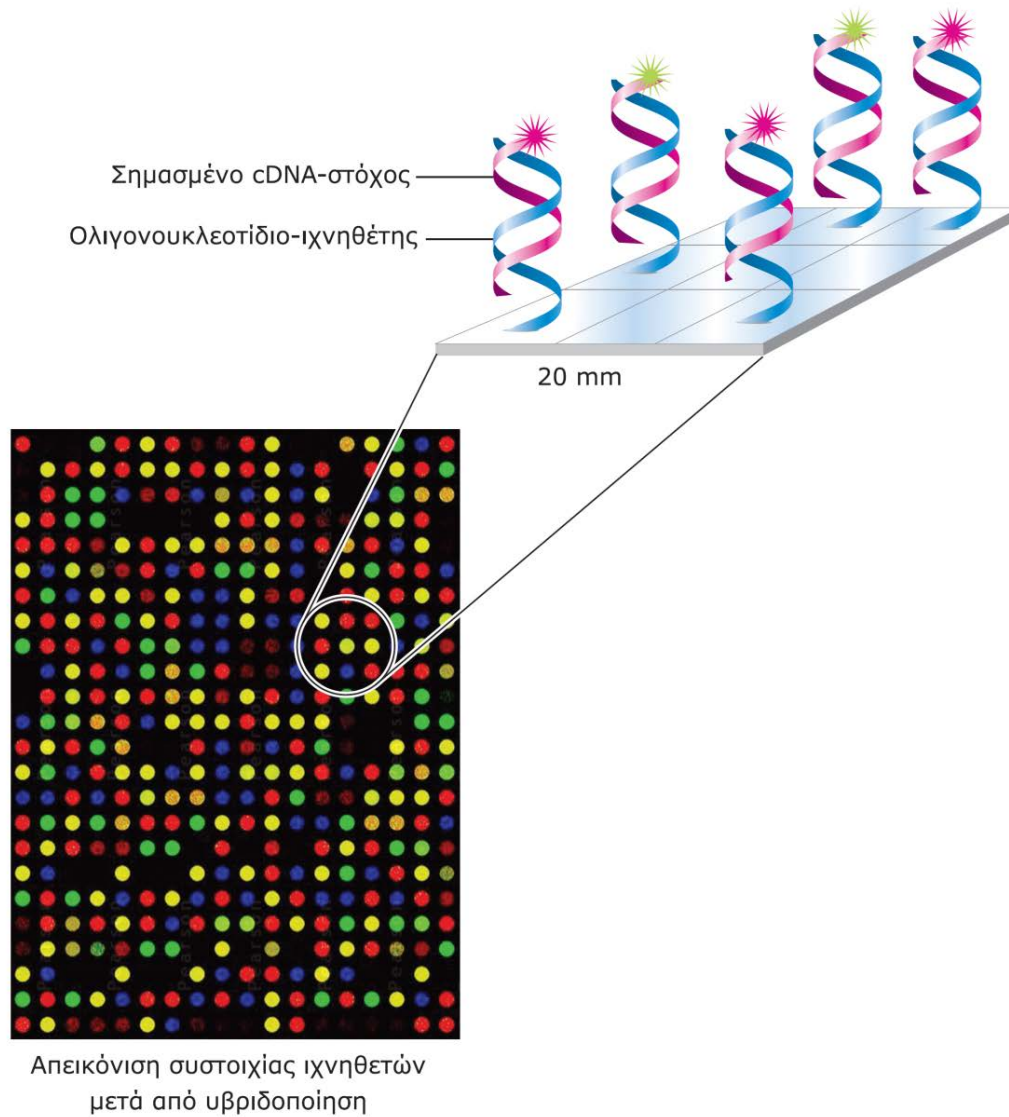
Ανάλυση SNP που επηρεάζουν θέσεις περιορισμού, με PCR.

Ένα χρωμοσωμικό τμήμα μεγέθους 2 kb φέρει έναν SNP σε απόσταση 500 bp από το αριστερό του άκρο. Στο αλληλόμορφο SNP 1 (επάνω) υπάρχει μια θέση *Bam*HI η οποία απουσιάζει από το αλληλόμορφο SNP 2 (κάτω), επειδή ένα ζεύγος βάσεων TA έχει αντικατασταθεί από ένα ζεύγος βάσεων CG. Προκειμένου να γονοτυπηθεί ο γενετικός αυτός τύπος, πραγματοποιείται PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που υποδεικνύονται με βέλη, ακολουθεί πέψη με *Bam*HI των προϊόντων της αντίδρασης και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται τα αναμενόμενα πρότυπα ζωνών στο πήκτωμα για τους τρεις πιθανούς γονοτύπους.

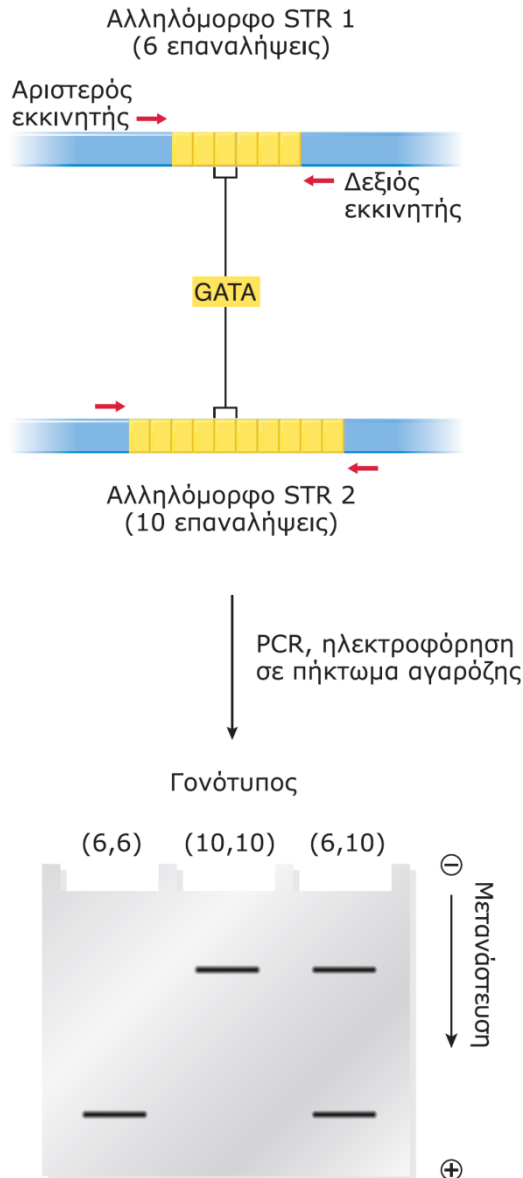
Γονοτύπηση ενός SNP μέσω υβριδοποίησης με ένα αλληλομορφοειδικό ολιγονουκλεοτίδιο. Ένα ολιγονουκλεοτίδιο απόλυτα συμπληρωματικό προς το πιο κοινό αλληλόμορφο υβριδοποιείται με το DNA-στόχο υπό συνθήκες που ευνοούν το ζευγάρισμα μόνο μεταξύ πλήρως συμπληρωματικών μορίων. Αν γίνει υβριδοποίηση, σημαίνει ότι το DNA-στόχος έχει το πιο κοινό αλληλόμορφο. Αν δε γίνει, σημαίνει ότι ανάμεσα στο DNA-στόχο και τον ιχνηθέτη υπάρχει ένα αταίριαστο ζεύγος βάσεων και επομένως το DNA-στόχος δε φέρει το πιο κοινό αλληλόμορφο.



Πείραμα στο οποίο χρησιμοποιείται μια μικροσυστοιχία DNA.



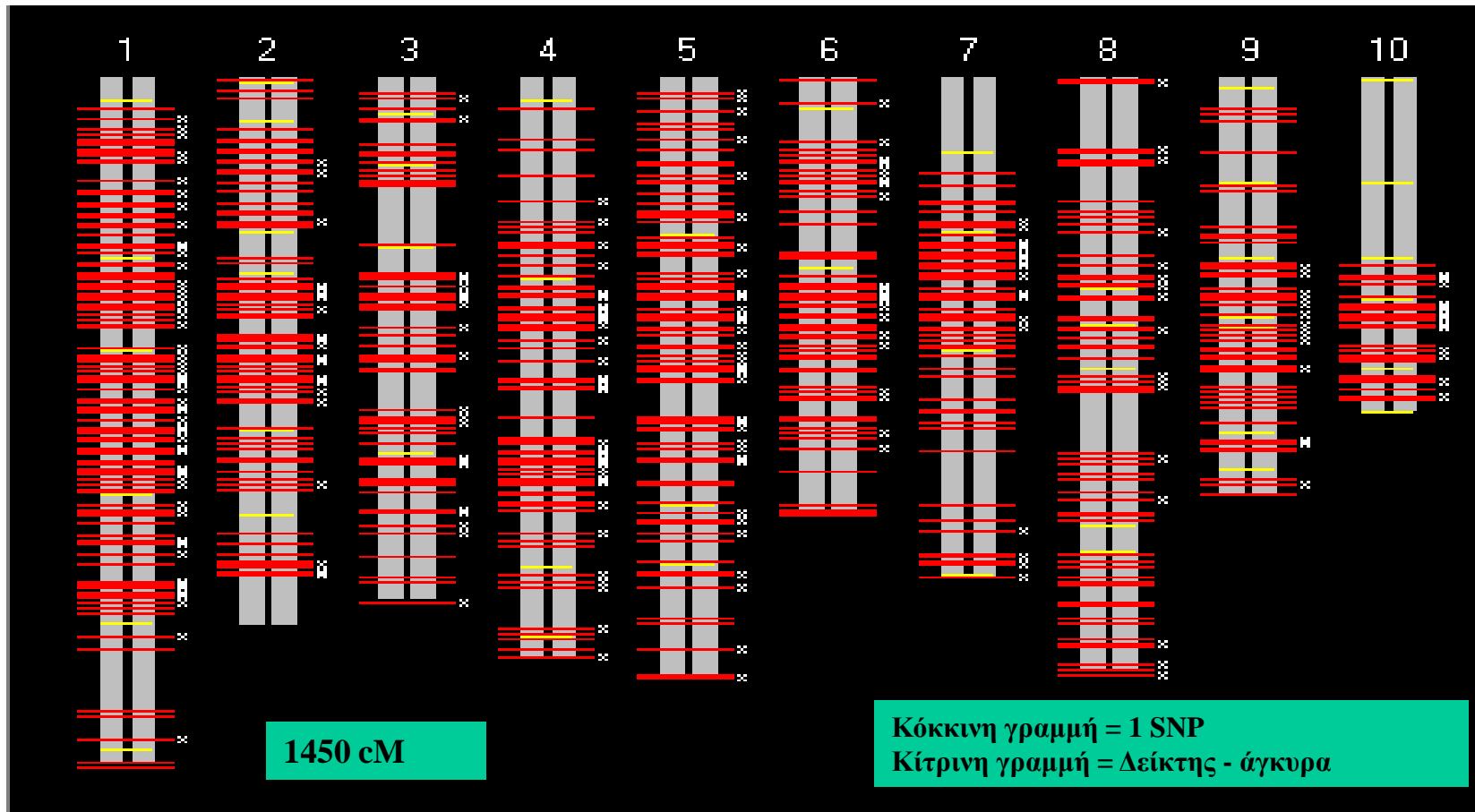
Αλληλόμορφα ενός γενετικού τύπου STR



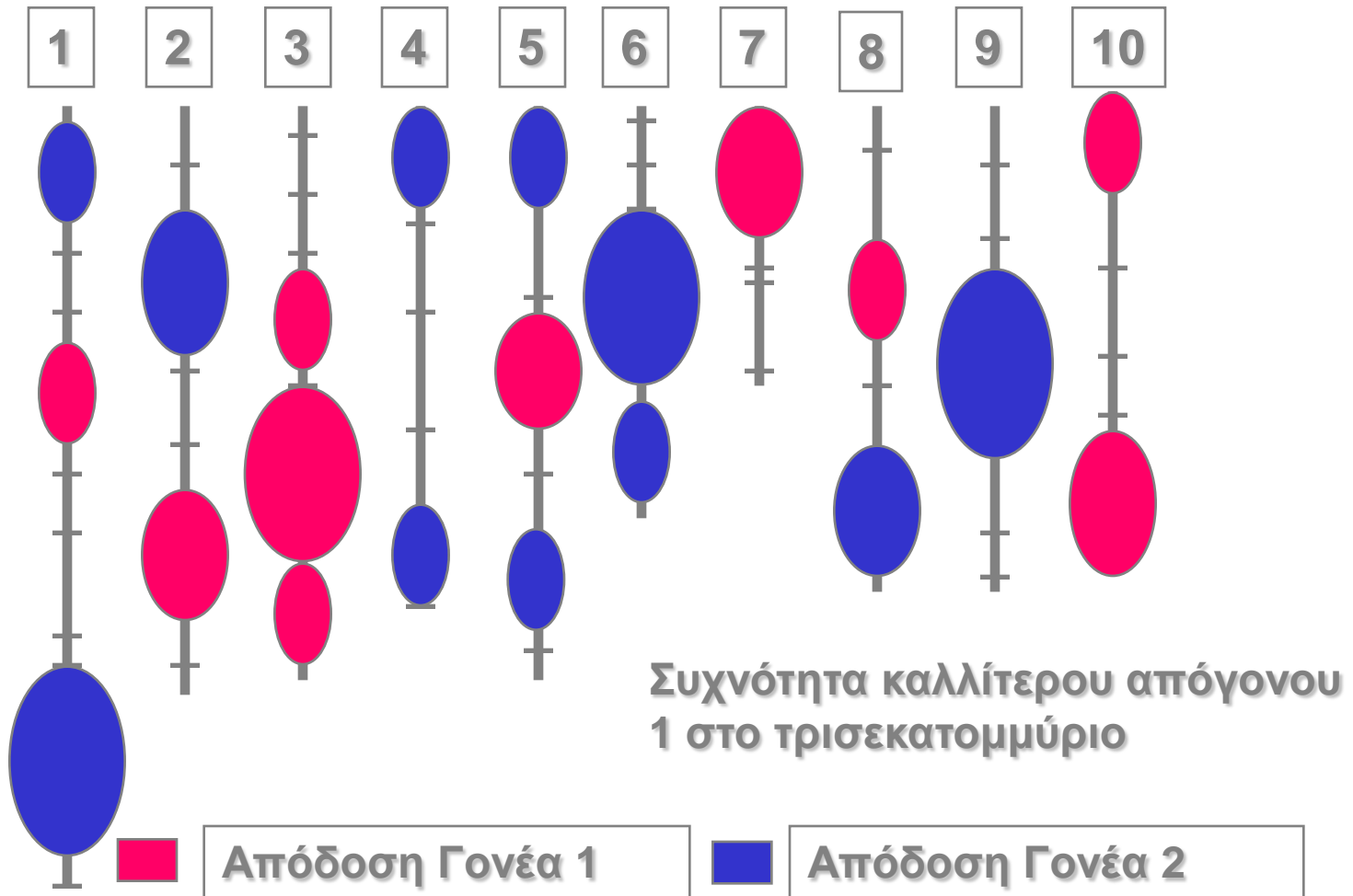
Γονοτύπηση με PCR ενός γενετικού τύπου STR.

Απομονώνεται γονιδιωματικό DNA και πραγματοποιείται PCR με εκκινητές που περιβάλλουν το γενετικό τόπο STR. Τα μεγέθη των προϊόντων της PCR προσδιορίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην εικόνα, το αλληλόμορφο STR 1 έχει 6 επαναλήψεις GATA, ενώ το αλληλόμορφο STR 2 έχει 10. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται τα αναμενόμενα πρότυπα ζωνών στο πήκτωμα για τους τρεις πιθανούς γονοτύπους: (6,6) [άτομο ομόζυγο ως προς το αλληλόμορφο με τις έξι επαναλήψεις], (10,10) και (6,10). Στην πραγματικότητα, η ποικιλομορφία ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων σε ένα γενετικό τόπο STR είναι συνήθως μεγάλη, υπάρχουν δηλαδή πολλά διαφορετικά αλληλόμορφα.

1500 SNP χαρτογραφημένα στο καλαμπόκι



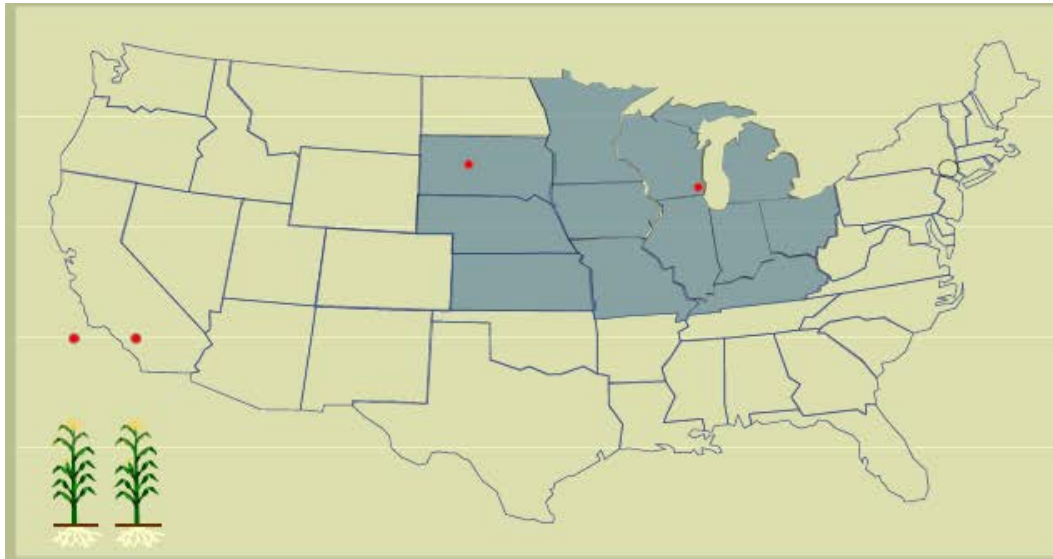
Επίδραση Γενωμικών Περιοχών στην Απόδοση Χαρτογράφηση QTL



ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΕΝΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟΥ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΕΤΑΙ ΑΠΟ 20 ΓΟΝΙΔΙΑ

**ΤΥΧΑΙΕΣ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ
1 ΣΕ 1 ΤΡΙΣΕΚΑΤΟΜΜΥΡΙΟ**

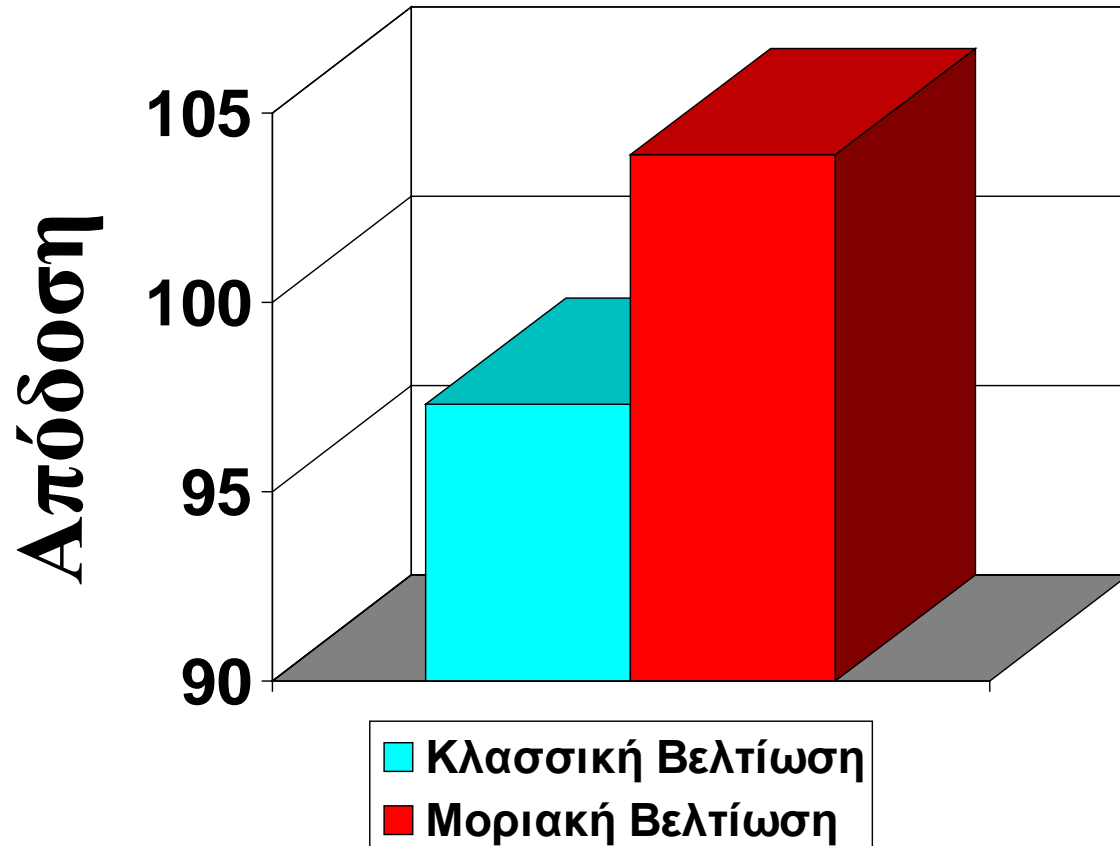
**MAS
1 ΣΕ 5**



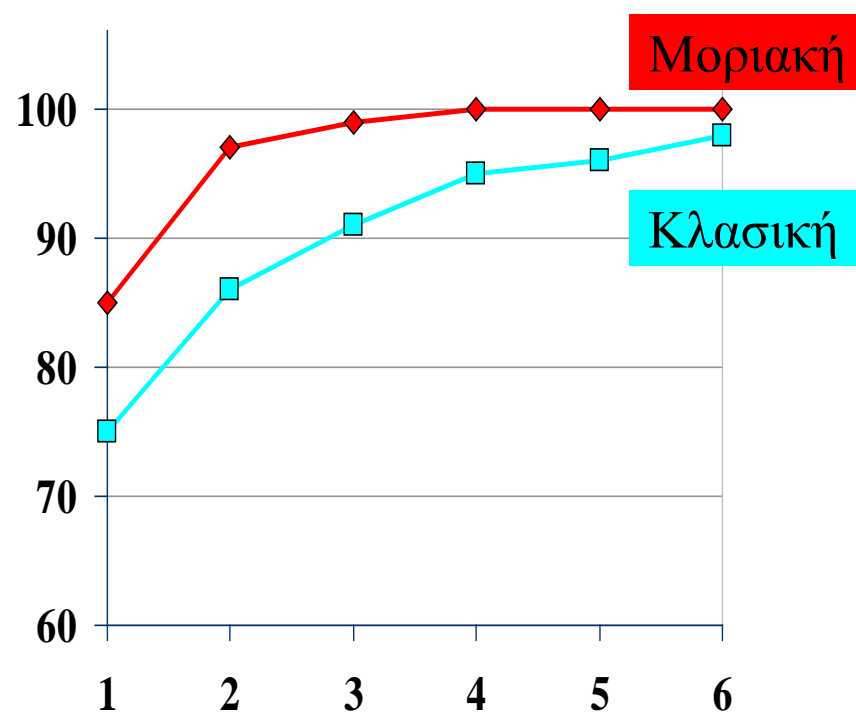
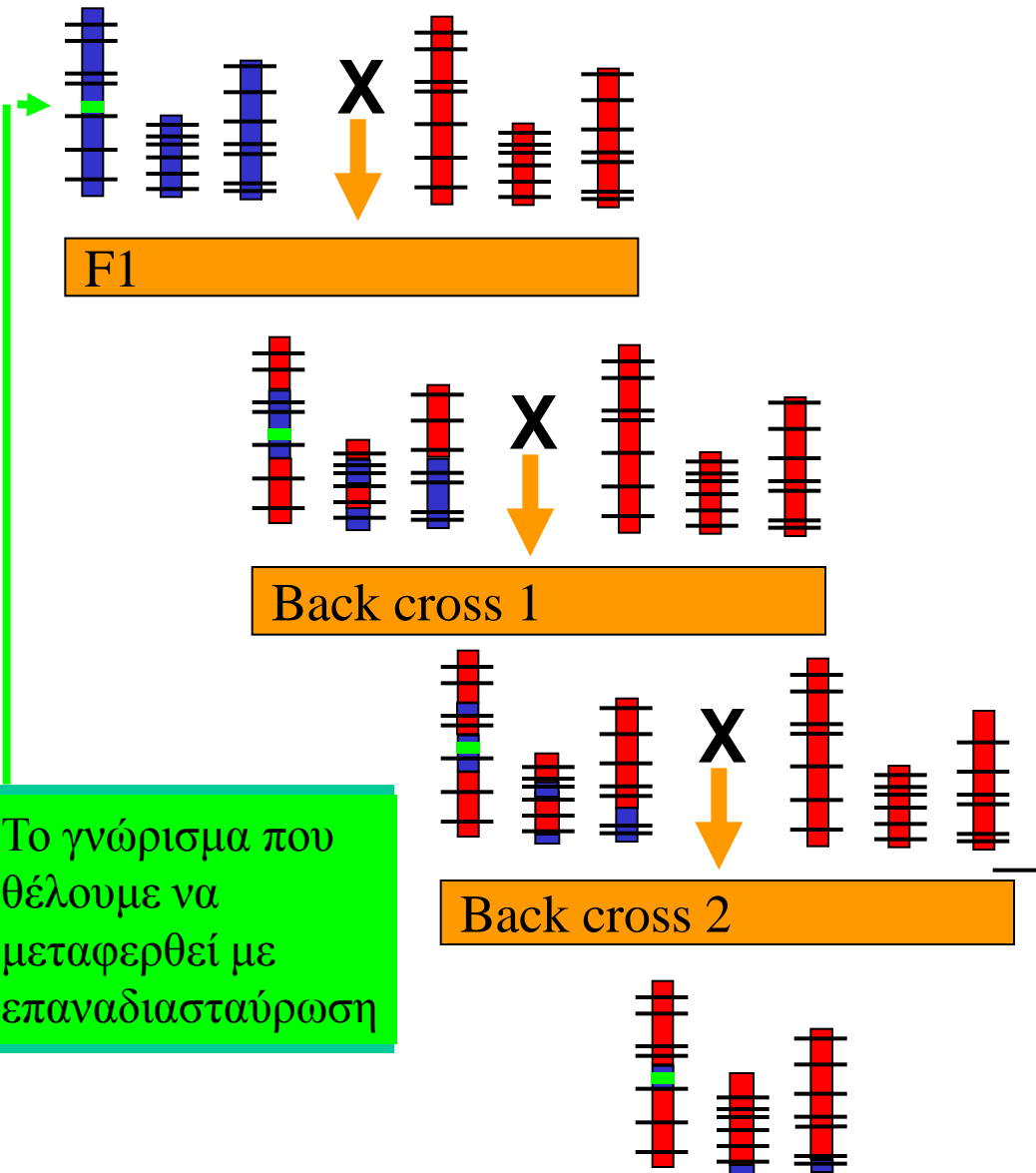
Μια εκτίμηση για τον αριθμό των φυτών καλαμποκιού που φύονται στη ζώνη καλαμποκιού των ΗΠΑ είναι κάτι παραπάνω από 2 τρισεκατομμύρια. Το να βρούμε τον 'ιδεώδη' γενετικό συνδυασμό, θα απαιτούσε να επιλέξουμε σε κάθε αγρό για να βρούμε 2-3 φυτά

Αυτό το πειραματικό τεμάχιο περιέχει 20 φυτά. Ελέγχοντας αυτά τα φυτά θα βρούμε 4 ιδεώδεις συνδυασμούς

Διπλασιασμός Αποτελεσματικότητας της Βελτίωσης



ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ



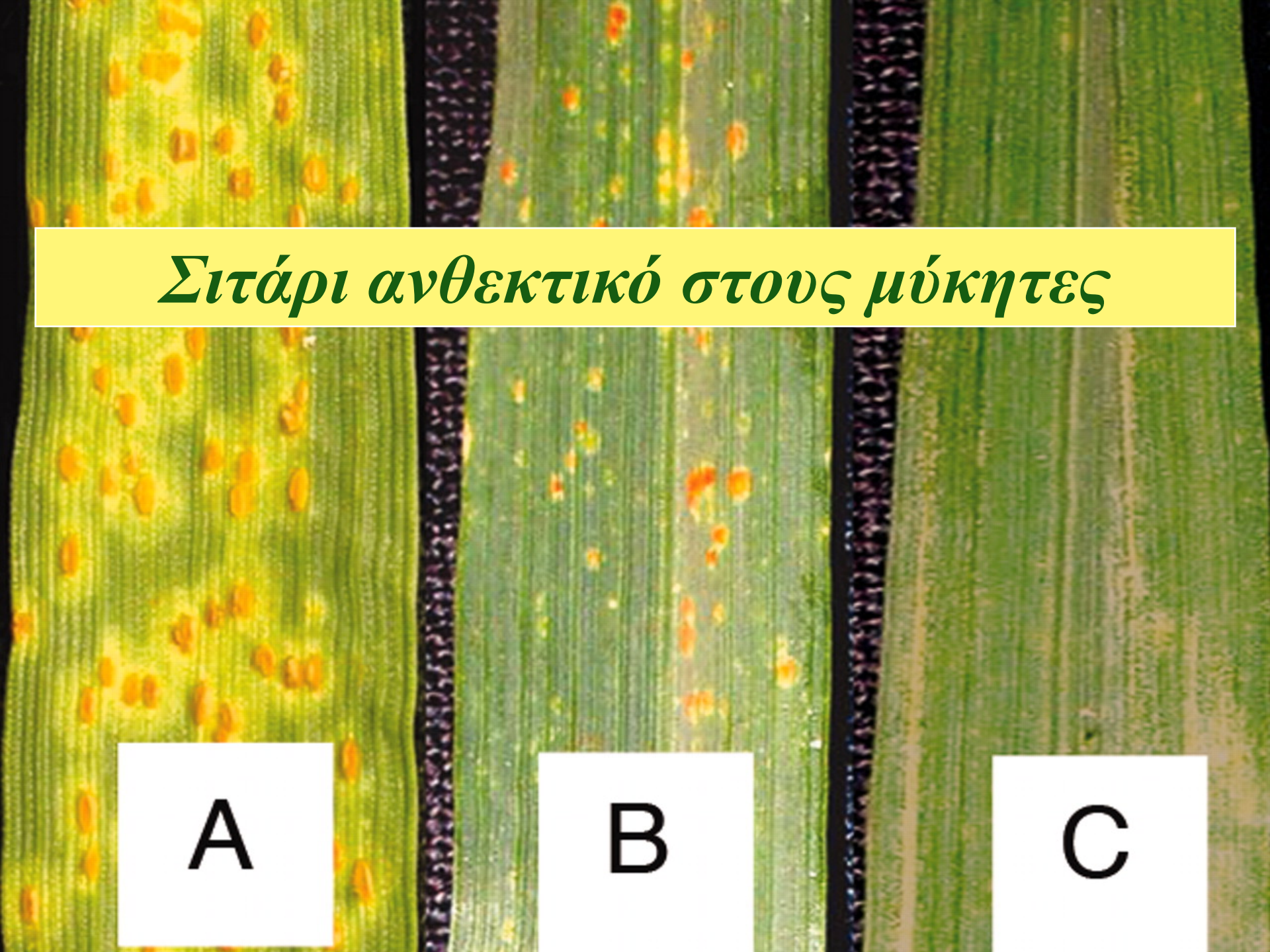
Το γνώρισμα που θέλουμε να μεταφερθεί με επαναδιασταύρωση

Σιτάρι ανθεκτικό στους μύκητες

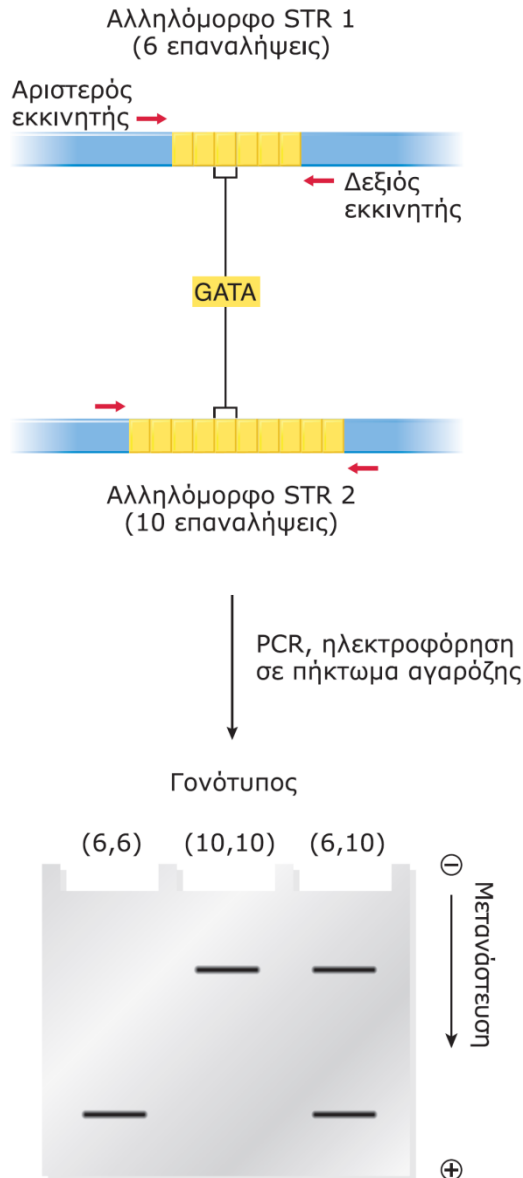
A

B

C



Αλληλόμορφα ενός γενετικού τύπου STR



Γονοτύπηση με PCR ενός γενετικού τύπου STR.

Απομονώνεται γονιδιωματικό DNA και πραγματοποιείται PCR με εκκινητές που περιβάλλουν το γενετικό τόπο STR. Τα μεγέθη των προϊόντων της PCR προσδιορίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην εικόνα, το αλληλόμορφο STR 1 έχει 6 επαναλήψεις GATA, ενώ το αλληλόμορφο STR 2 έχει 10. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται τα αναμενόμενα πρότυπα ζωνών στο πήκτωμα για τους τρεις πιθανούς γονοτύπους: (6,6) [άτομο ομόζυγο ως προς το αλληλόμορφο με τις έξι επαναλήψεις], (10,10) και (6,10). Στην πραγματικότητα, η ποικιλομορφία ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων σε ένα γενετικό τόπο STR είναι συνήθως μεγάλη, υπάρχουν δηλαδή πολλά διαφορετικά αλληλόμορφα.

γονέας 1



γονέας 2



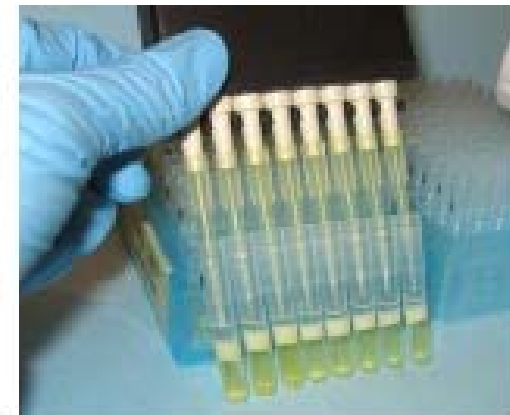
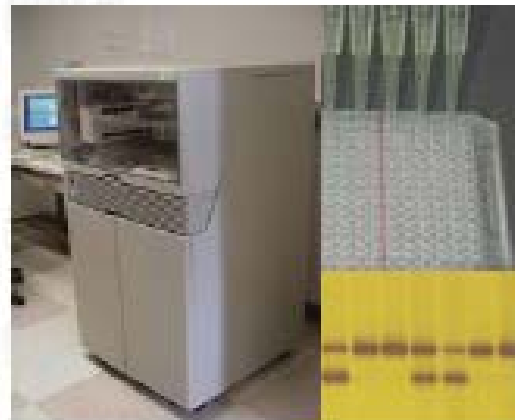
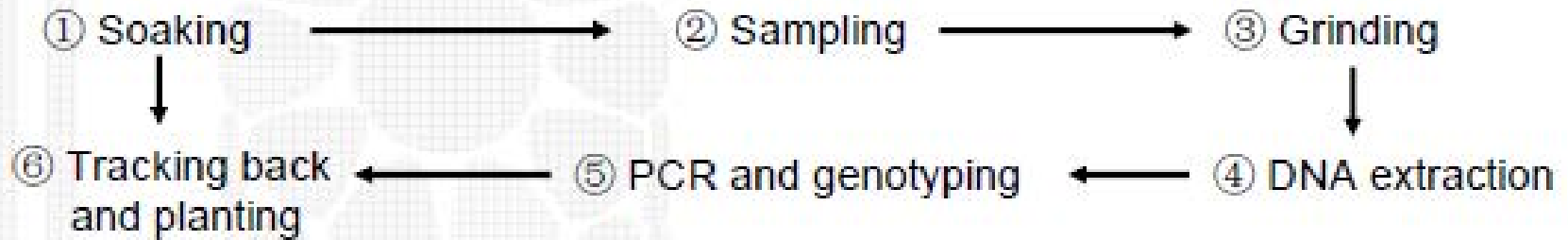
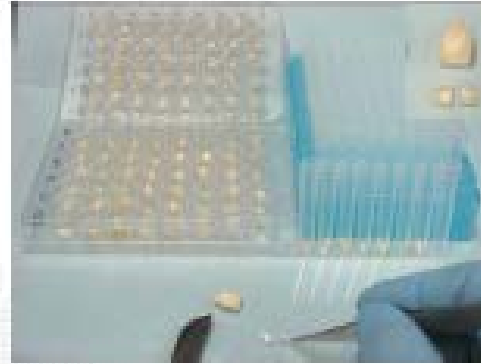
X



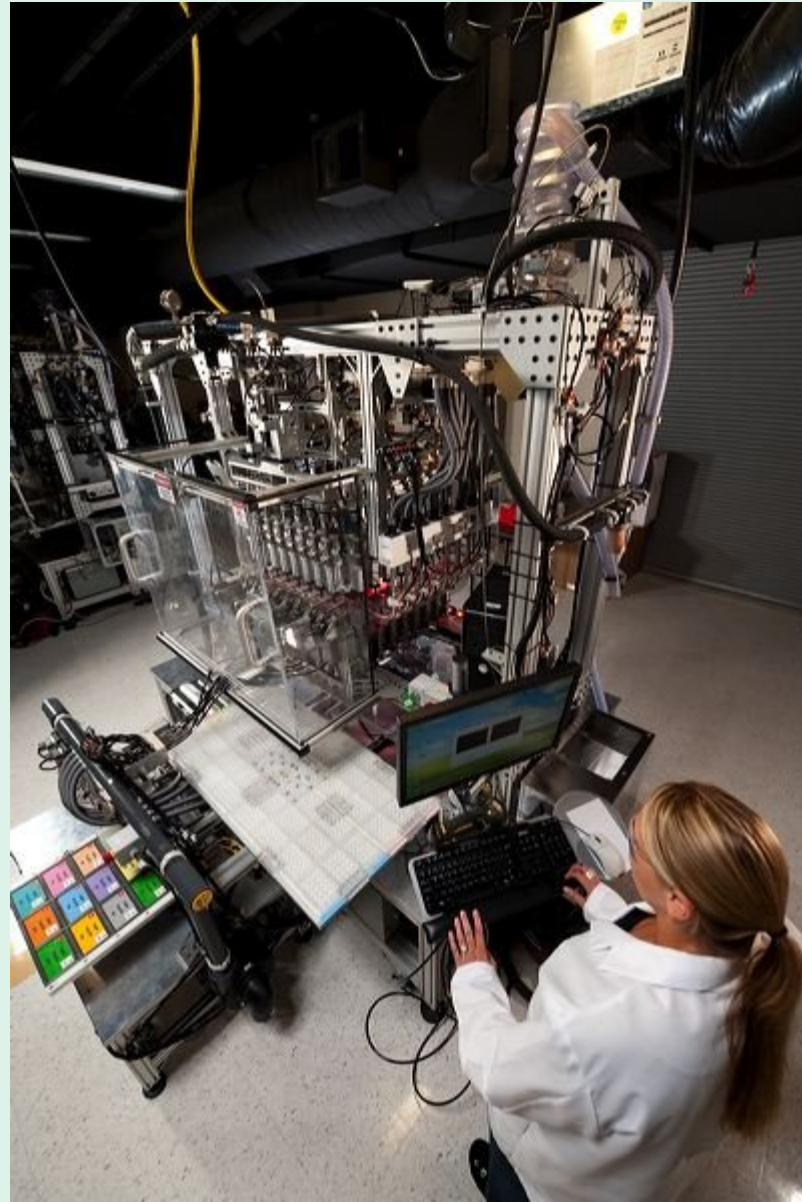
απόγονοι

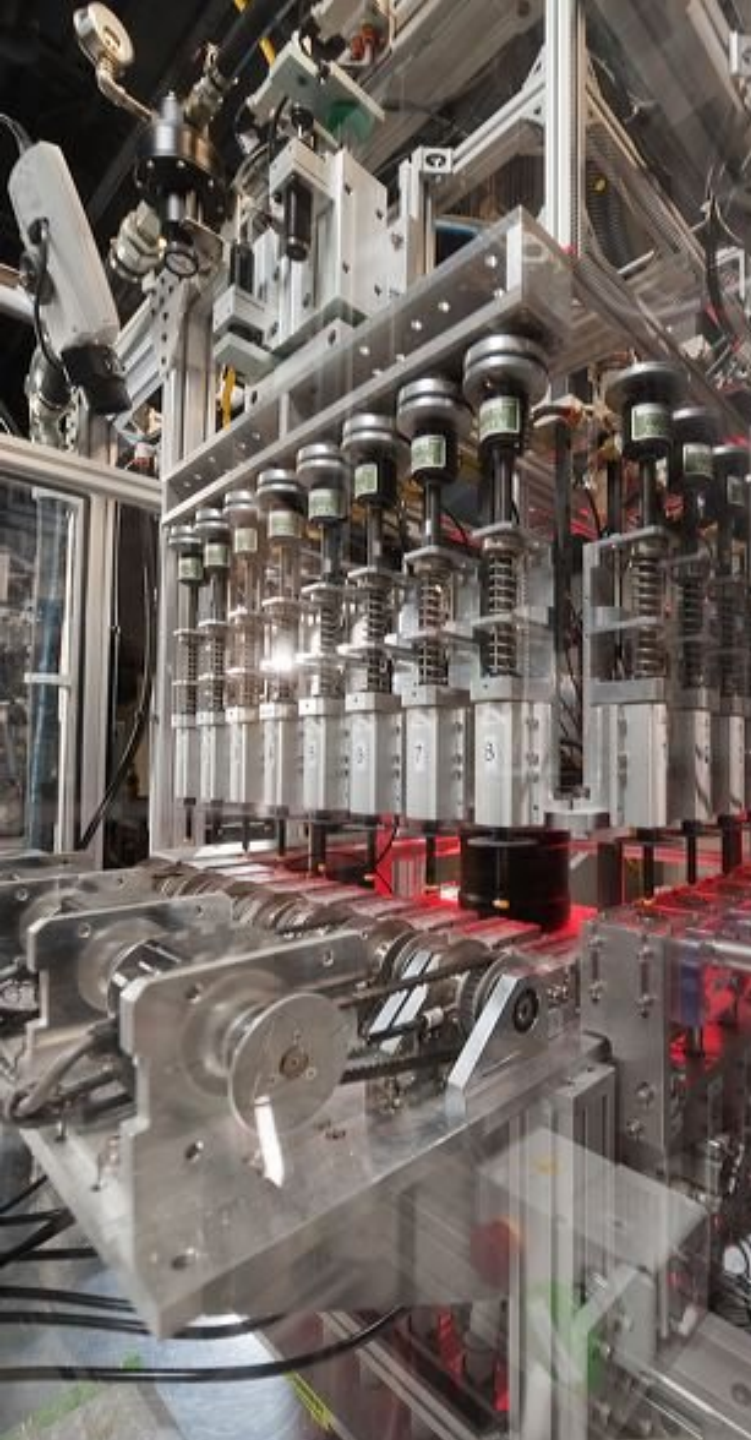


Αποτύπωση του γενοτύπου πριν τη σπορά

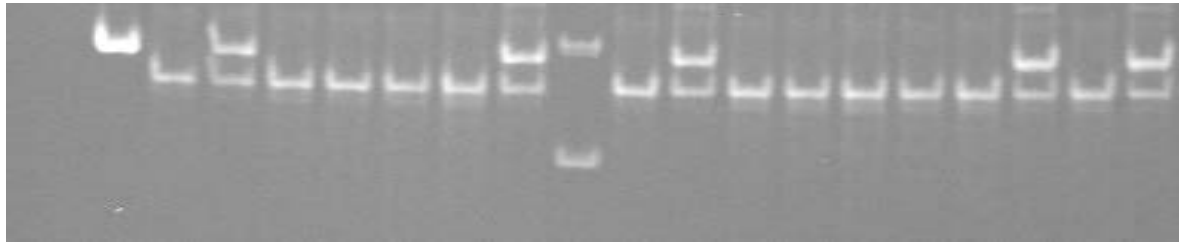


Monsanto's seed chipper





A B 1 2 3 4 5 6 M



Ηλεκτροφόρηση SSR πηκτή πολυακρυλαμίδης

A: γονέας 1,

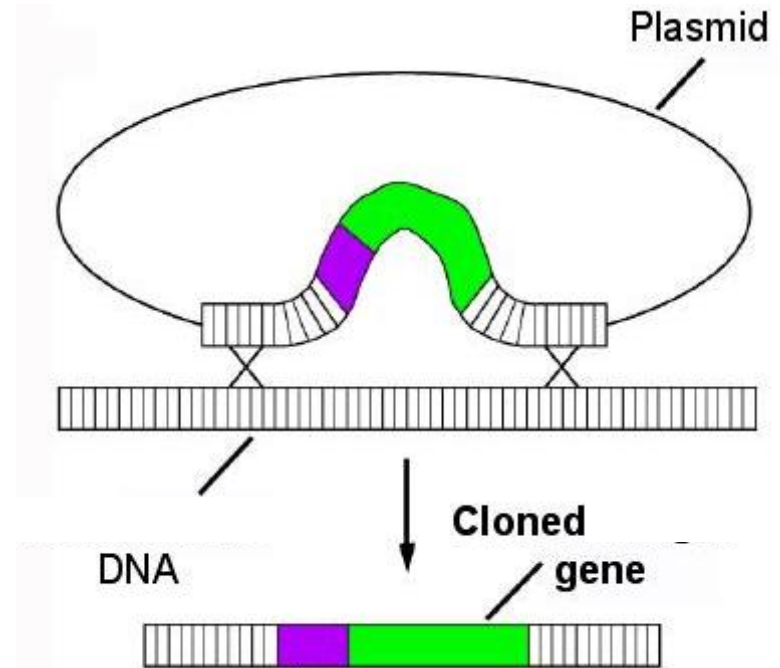
B: γονέας 2,

M: 250 bp δείκτης μοριακών βαρών

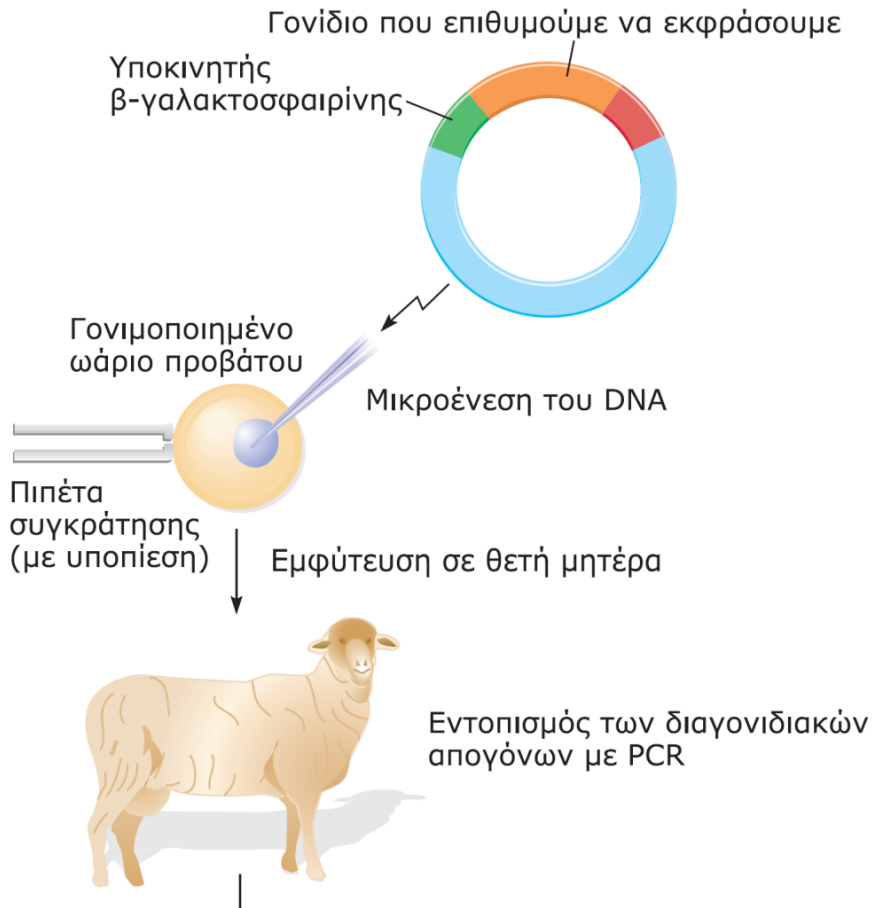
Υπόλοιπες σειρές: απόγονοι.

Γενετική τροποποίηση

- ΣΥΓΚΕΡΚΡΙΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ
- ΕΛΕΓΧΟΙ

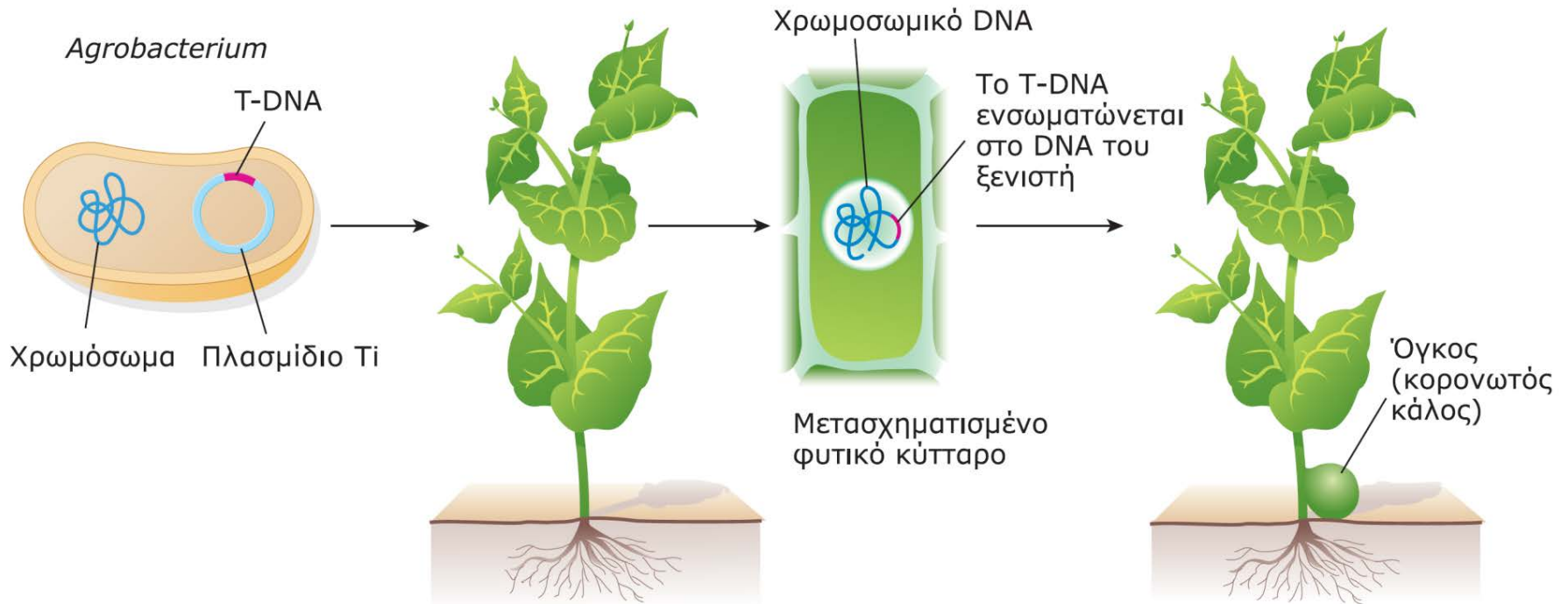


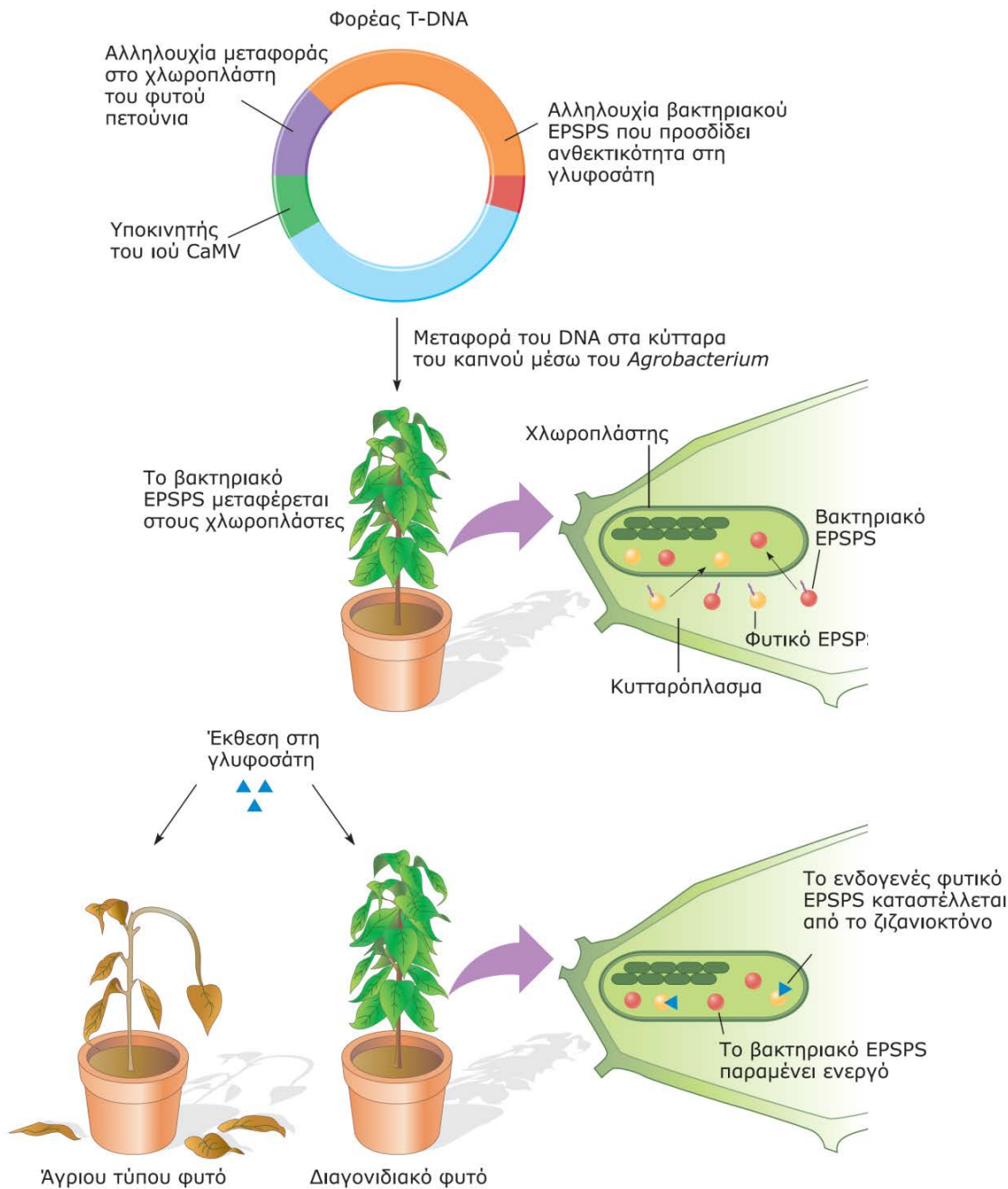
Παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε διαγονιδιακό θηλαστικό (στην περίπτωση αυτή ένα πρόβατο).



Σχηματισμός όγκων (κάλων) σε φυτά μέσω της μόλυνσής τους με ορισμένα είδη του βακτηρίου *Agrobacterium*.

Οι όγκοι επάγονται από το πλασμίδιο Ti του βακτηρίου. Μέρος του DNA του Ti (το T-DNA ή μετασχηματιστικό DNA) ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου.





Δημιουργία διαγονιδιακού φυτού καπνού, ανθεκτικού στο ζιζανιοκτόνο Roundup™ μέσω της εισαγωγής μιας τροποποιημένης μορφής του βακτηριακού γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS.

ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ (πρώτου κύκλου) ΓΤΦ

Αντοχή σε:
Ιώσεις.....



Ζιζανιοκτόνα....



Έντομα.....



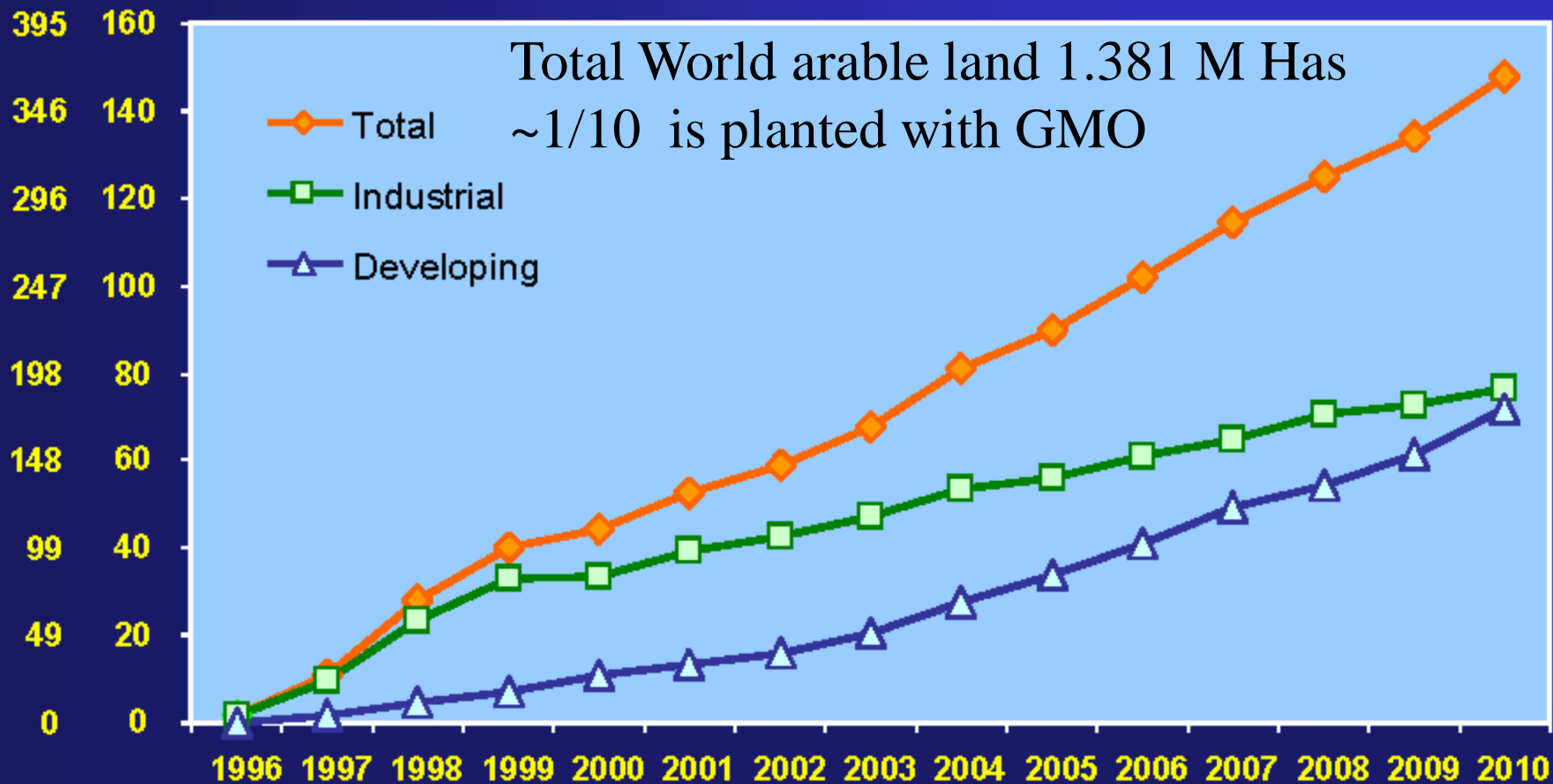
Μετασυλλεκτική
Διατήρηση.....



Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2010: Industrial and Developing Countries (M Has, M Acres)



M Acres

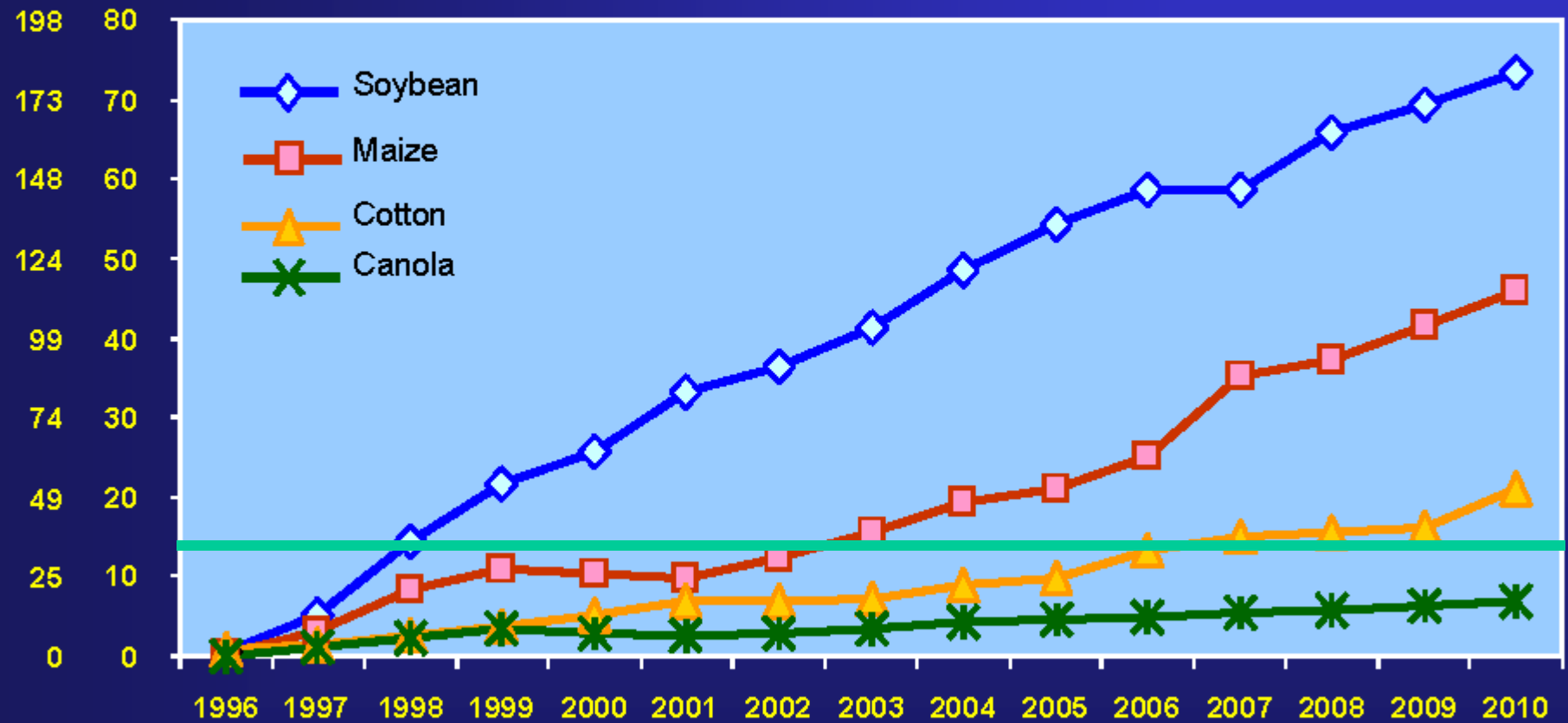


Source: Clive James, 2010

Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2010: By Crop (Million Hectares, Million Acres)



M Acres

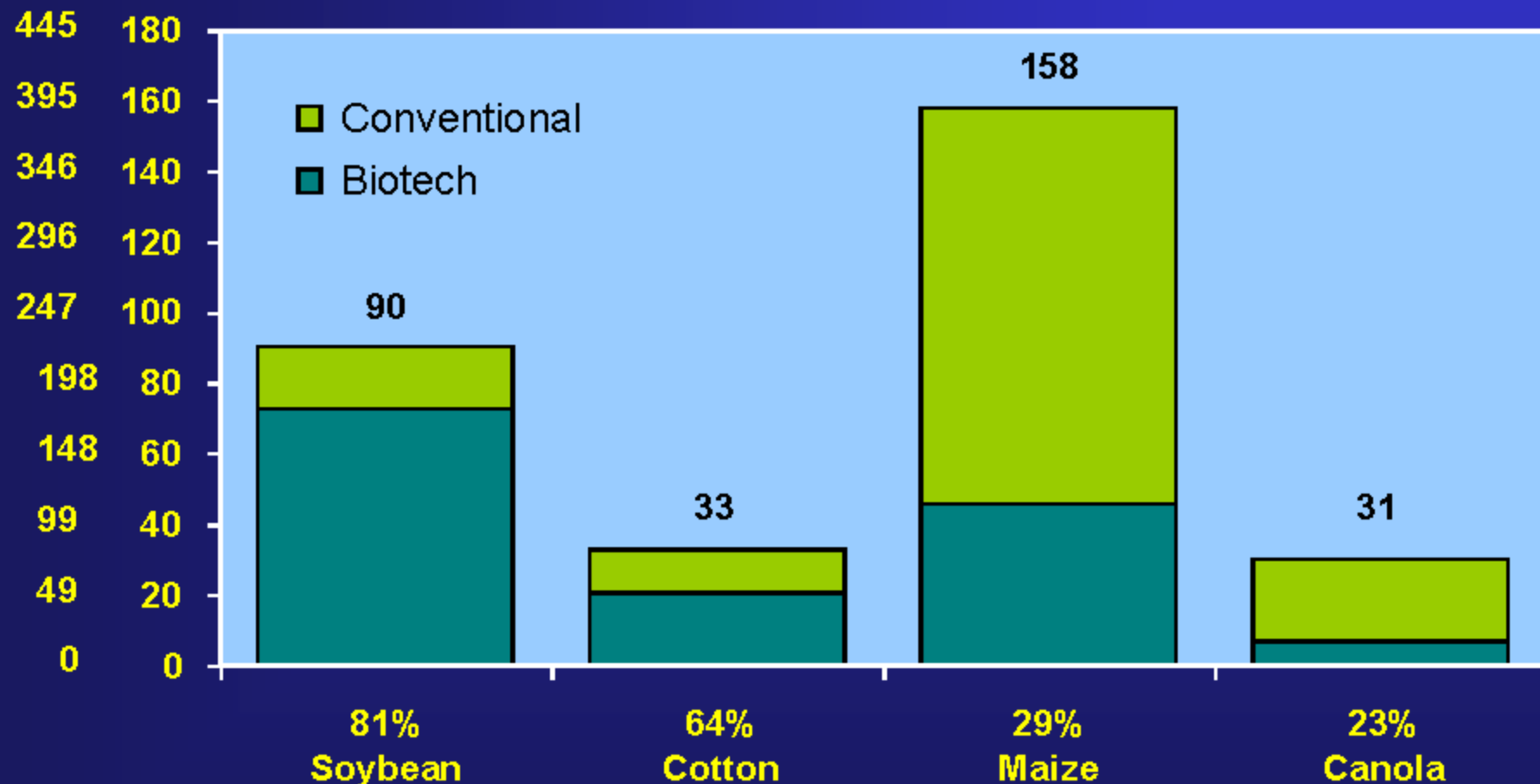


Source: Clive James, 2010

Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares, Million Acres), 2010

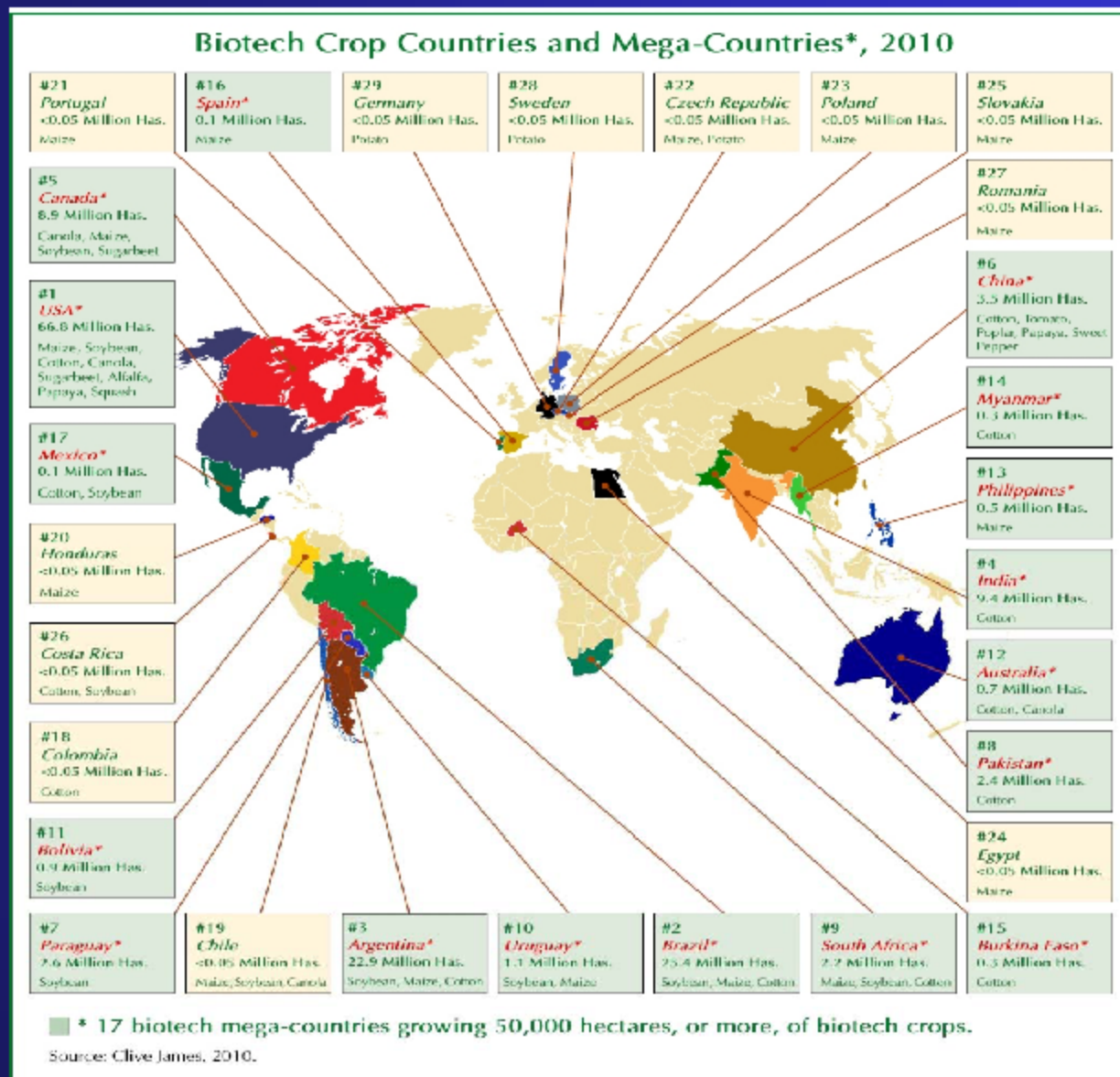


M Acres



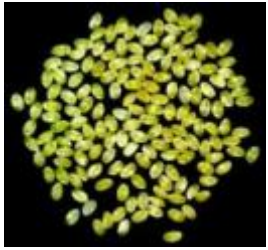
Source: Clive James, 2010

Biotech Crop Countries and Mega-Countries, 2010

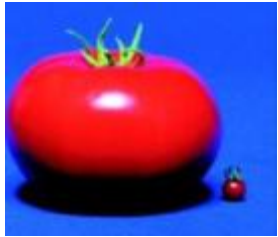


ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΤΦ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

- Μια σειρά νέων ΓΤΦ (δευτέρου κύκλου) που έχουν νέους βελτιωμένους χαρακτήρες άρχισαν να εμφανίζονται:



– Διατροφική αξία (χρυσό ρύζι, υψηλή περιεκτικότητα σε λυσίνη, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά κ.α.)



– Μορφολογικά χαρακτηριστικά και αρχιτεκτονική του φυτού

– Συγκέντρωση χαρακτήρων με διασταυρώσεις (αντοχή σε περισσότερα έντομα και ζιζανιοκτόνα στην ίδια ποικιλία)

– Αρρενοστεριότητα (αποφυγή διαφυγής γύρης)



Πατάτα με ανθεκτικότητα





*Μελιτζάνες ανθεκτικές
σε έντομα-Ινδία*

SOURCE: "1st GM eggplant soon to be commercially grown in RP", The Philippine Star, 1/21/07



***Λεκτίνη από το κρεμύδι εκφράζεται
στο σινάπι και περιορίζει τις αφίδες***



*Ιός με γονίδια
θανατηφόρα για τα
σκουλήκια*

SOURCE: Borovsky et al. 2006. Expression of Aedes trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: A potential larvicide. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103: 18963-18968.

Καλαμπόκι ανθεκτικό σε ιώσεις



SOURCE: Shepherd, D.N., Mangwende, T., Martin, D.P., Bezuidenhout, M., Kloppers, F.J., Carolissen, C.H., Monjane, A.L., Rybicki, E.P. and Thomson, J.A. 2007. Maize streak virus-resistant transgenic maize: a first for Africa. Plant Biotechnology Journal, online first (doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00279.x).

Κασσάβα ανθεκτική σε ιώσεις



SOURCE: "St. Louis center aims to fight poverty through biotechnology", Associated Press, 12/10/06.

*Παπάγια ανθεκτική
στις ιώσεις*





Σταφύλια ανθεκτικά σε ιώσεις

SOURCE: <http://www.democratandchronicle.com/apps/pbcs.dll/article?AID=/20080806/BUSINESS/808060336/1001>



*Αντοχή στον ιό της
δαμασκηνιάς*

SOURCE: Information Systems for Biotechnology, June 2006. APHIS petition (http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/04_26401p.pdf); image courtesy of <http://www.forestryimages.org>

The background of the slide is a collage of several slices of watermelon. The slices are cut into various shapes, including triangles and trapezoids, and are arranged in a scattered pattern. Each slice shows the bright red, juicy flesh of the watermelon, the dark green rind, and several black seeds. The lighting is bright, highlighting the texture of the fruit.

Υποκείμενα καρπουζιού ανθεκτικά σε ιώσεις

SOURCE: Park, S.M. et al. (2005) Plant Cell Reports DOI 10.1007/s00299-005-0946-8

Φεστούκα ανθεκτική σε ιώσεις

SOURCE: Dong, S., Shew, H.D., Tredway, L.P., Lu, J., Sivamani, E., Miller, E.S. and Qu, R. 2007. Expression of the bacteriophage T4 lysozyme gene in tall fescue confers resistance to gray leaf spot and brown patch diseases. Transgenic Research Online First DOI 10.1007/s11248-007-9073-3



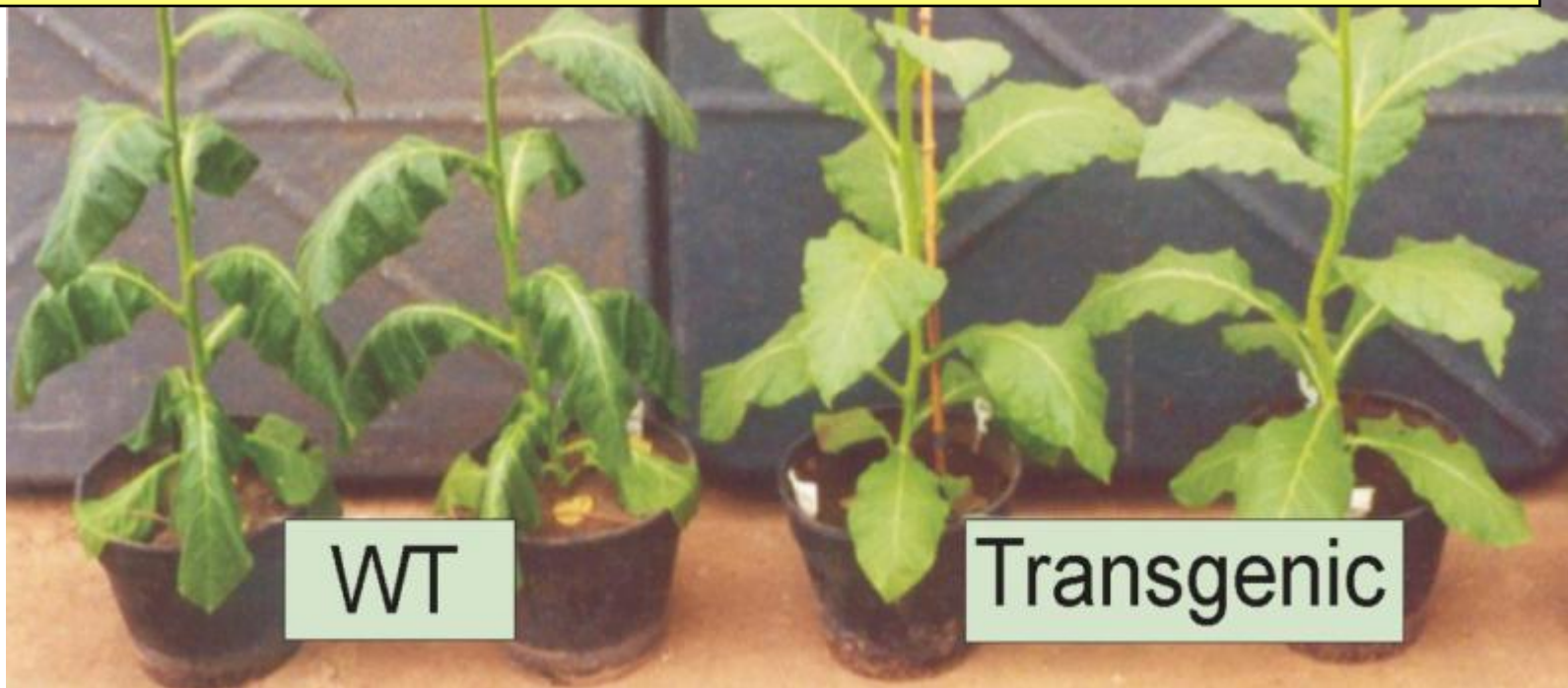
Μπανάνα ανθεκτική στους μύκητες

Αντοχή στην ξηρασία



SOURCE: Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S. and Blumwald, E. 2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 19631-19636.

Αντοχή στην ξηρασία με χρήση γονιδίου από φύκος



SOURCE: Zurbriggen, M., Tognetti, V.B., Valle, E.M. and Carrillo, N. 2007. Cyanobacterial flavodoxin provides multiple stresses tolerance. *ISB News Report*, September 2007, pp. 1-4.

http://www.isb.vt.edu/news/2007/news07_sep.htm#sep0701

Image courtesy of Dr. Néstor Carillo



Σακχαροκάλαμο ανθεκτικό στην ξηρασία

*SOURCE: "Limited release of GM sugarcane in AUSTRALIA", Crop Biotech Update, 5/22/09,
<http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/dir095>*

Γρασίδι με αντοχή σε ξηρασία-εχθρούς



*SOURCE: "Engineering a mow-less lawn", New York Times, 4/22/06
http://www.nytimes.com/2006/04/22/business/22offline.html?_r=1&oref=slogin*

Ντομάτα ανθεκτική στην αλατότητα



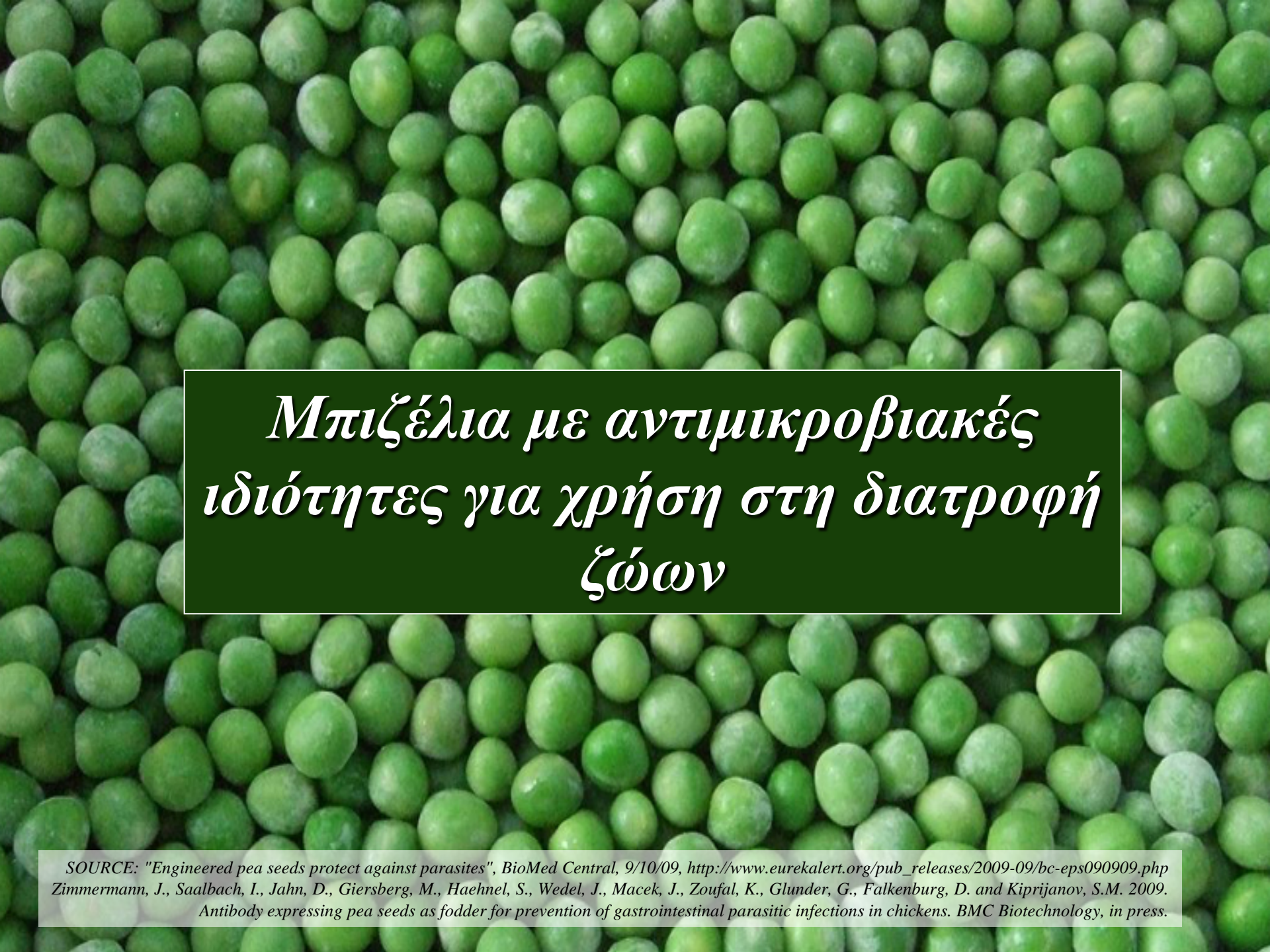
Engineered

Control



«Χρυσό ρύζι»

SOURCE: Tang, G., Qin, J., Dolnikowski, G.G., Russell, R.M. and Grusak, M.A. 2009. Golden Rice is an effective source of vitamin A. Am J Clin Nutr 89: 1–8.



*Μπιζέλια με αντιμικροβιακές
ιδιότητες για χρήση στη διατροφή
ζώων*

*SOURCE: "Engineered pea seeds protect against parasites", BioMed Central, 9/10/09, http://www.eurekalert.org/pub_releases/2009-09/bc-eps090909.php
Zimmermann, J., Saalbach, I., Jahn, D., Giersberg, M., Haehnel, S., Wedel, J., Macek, J., Zoufal, K., Glunder, G., Falkenburg, D. and Kiprijanov, S.M. 2009.
Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens. BMC Biotechnology, in press.*



Καρύδα με μεγαλύτερη διάρκεια



**Γαρύφαλλο
Moonshadow™
(διαρκεί περισσότερο)**



http://www.florigene.com/products/products.php?product_name=moonshadow




Μπλε τριαντάφυλλο

SOURCE: <http://www.japantimes.co.jp/cgi-bin/getarticle.pl5?nn20040701a2.htm>



***Κρεμμύδι χωρίς το
γονίδιο του ενζύμου
που προκαλεί δάκρυα***



*Λάδια από σόγια χωρίς
τρανς-λιπαρά*

SOURCE: "New oil with zero trans fat could revolutionize frying", *The Des Moines Register*, 4/14/09., http://www.usatoday.com/news/health/weightloss/2009-04-13-soybean-trans-fat_N.htm



*Καλαμπόκι με 169-φορές αυξημένη
προβιταμίνη Α, 6-φορές αυξημένη
βιταμίνη C και διπλασιασμό επιπέδων
φολικού*



SOURCE: Naqvi et al. 2009. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, doi: 10.1073/pnas.0901412106.



*Ντομάτες με υψηλή
περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών*

SOURCE: Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E.G.W.M., Hall, R.D., Bovy, A.G., Luo, J. and Martin, C. 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. Nature Biotechnology, online first (doi:10.1038/nbt.1506)

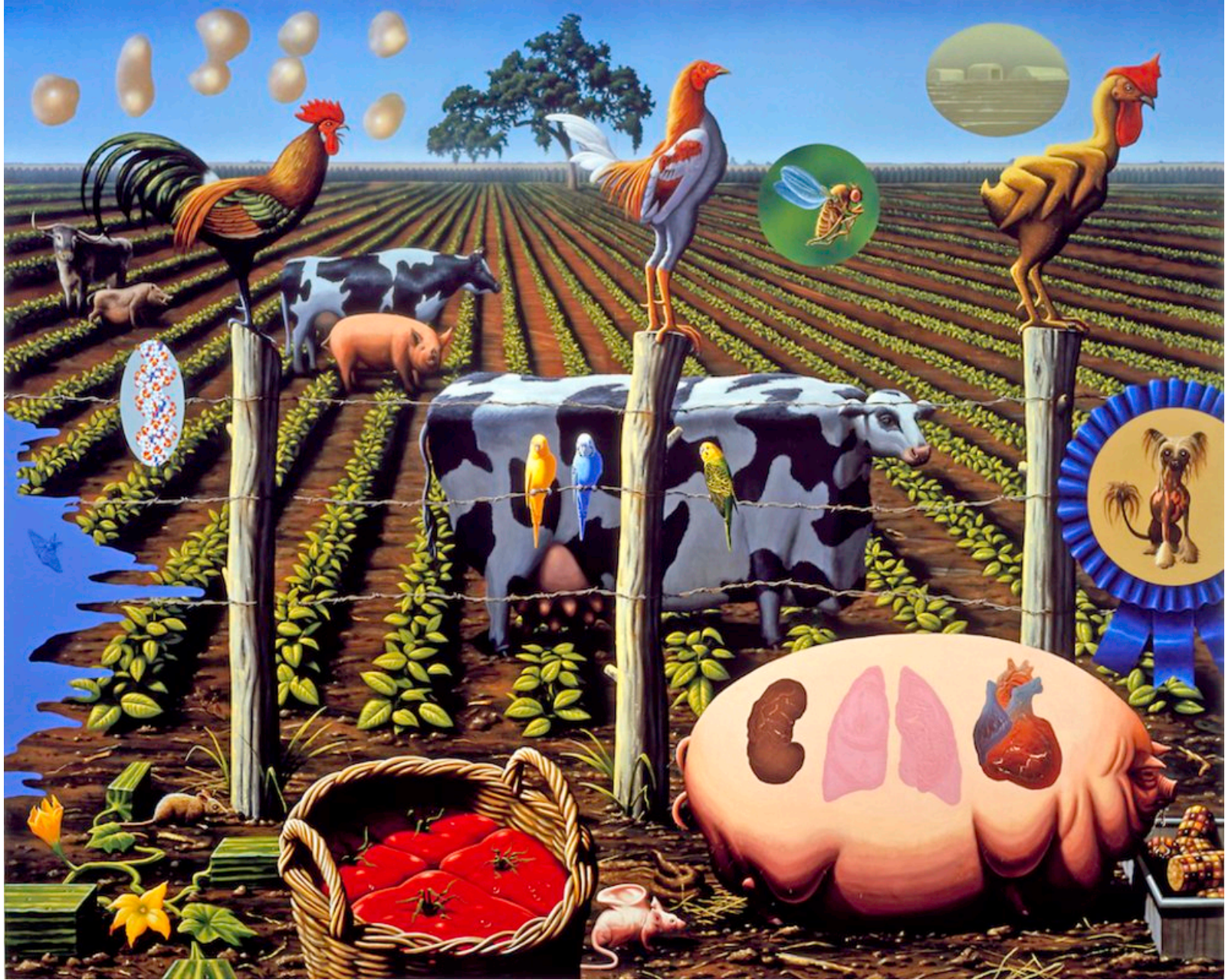


Άρωμα-χρώμα-γεύση

SOURCE: "Genetically enhancing the scent of flowers", SeedQuest, 10/6/08.

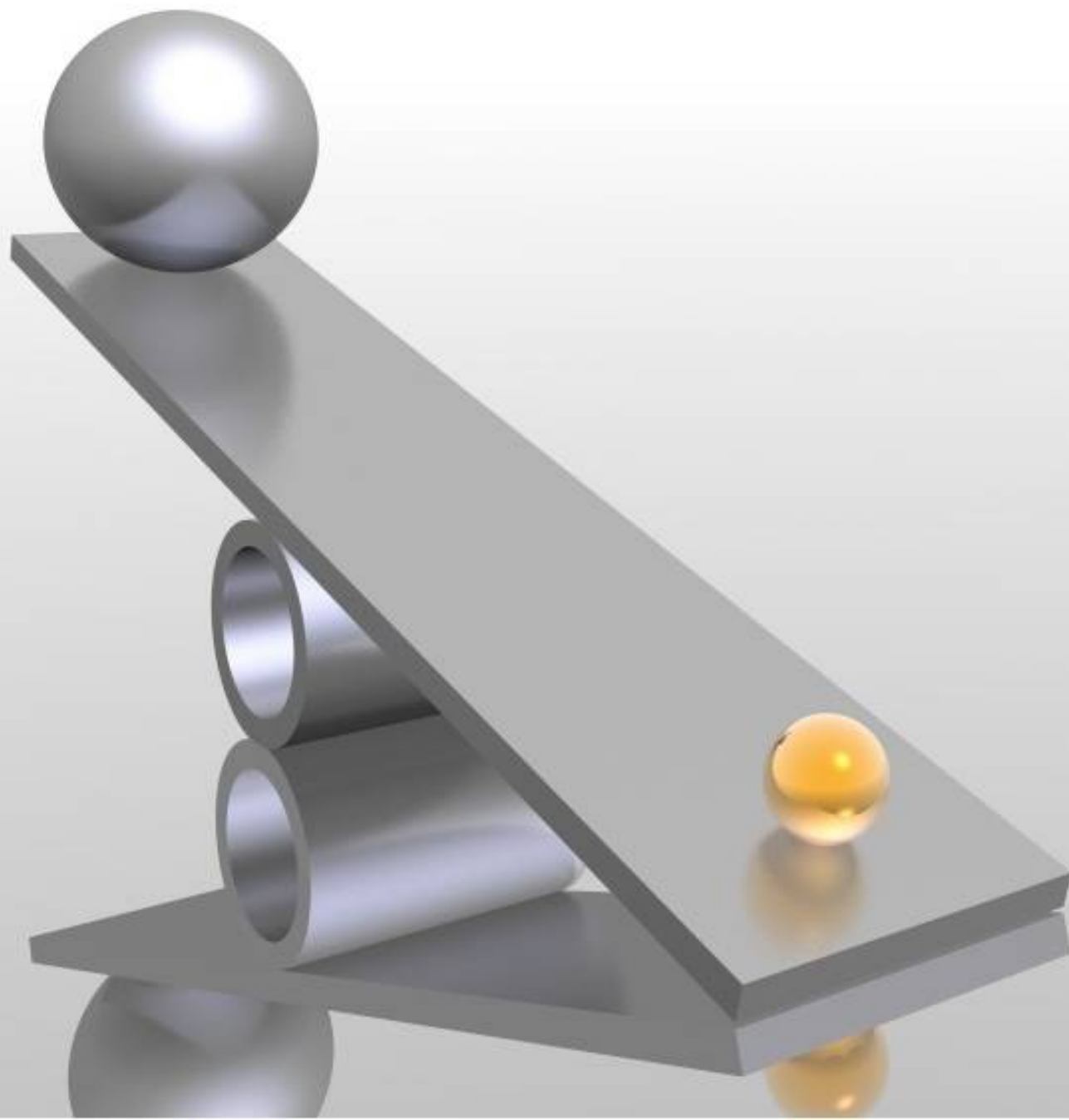
Η επόμενη γενιά ΓΤΦ

- **ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**
 - ✓ Αύξηση διατροφικής αξίας-προσαρμοσμένα τρόφιμα για ειδικές ανάγκες (διαβητικοί, αντιοξειδωτικά, ελείψεις ενζύμων κ.α.)
 - ✓ Απομάκρυνση αλλεργιογόνων από τρόφιμα
- **ΥΓΕΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**
 - ✓ Εμβόλια που παράγονται σε φυτά
 - ✓ Λειτουργικά τρόφιμα και phytoceuticals
- **ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΦΡΟΝΤΙΔΕΣ**
 - ✓ Αντοχή σε καταπονήσεις
- **ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**
 - ✓ Καθαρισμός του περιβάλλοντος (Phytoremediation)
- **ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ**
 - ✓ Πλαστικά και πολυμερή από φυτά
 - ✓ Βιοκαύσιμα
- **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ**



Alexis Rockman

The Farm, 2000



Λύσεις εφαρμόσιμες

