

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ

3.1. Εισαγωγή

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.

Μοριακές τεχνικές που αναπτύχθηκαν τις περασμένες δεκαετίες και κυρίως μετά την ανακάλυψη των **περιοριστικών ενζύμων** τη δεκαετία του 1970 και της **αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης** (polymerase chain reaction, **PCR**) στις αρχές της δεκαετίας του 1980, διέθεσαν σημαντικά εργαλεία για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων μεθόδων και στρατηγικών βελτίωσης των φυτών. Με την ενσωμάτωση αυτών των τεχνικών, η Μοριακή Βελτίωση, στην σύγχρονη μορφή της, συμπεριλαμβάνει δύο κύριες κατηγορίες εφαρμογών που θα δούμε αναλυτικά στο κεφάλαιο αυτό: τη χρήση **μοριακών δεικτών** στην υποβοήθηση της βελτιωτικής διαδικασίας και τη Γενετική Μηχανική για γενετική τροποποίηση των φυτών. Εφαρμογές όπως η χρήση μοριακών δεικτών στην **αξιολόγηση της γενοτυπικής παραλλακτικότητας**, στην **επιλογή γενοτύπων**, στην **επαναδιασταύρωση**, όπως επίσης και η χρήση **διαγονιδίων** για **γενετική τροποποίηση** έχουν ήδη ενσωματωθεί στη βελτιωτική πράξη, ενώ άλλες όπως η **επιλογή σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος** (genomewide selection) βρίσκονται σε φάση διερεύνησης.

Η κλασσική γενετική βελτίωση που περιγράφεται στα προηγούμενα κεφάλαια είχε αδιαμφισβήτητη αποτελεσματικότητα στην παραγωγή βελτιωμένων υψηλοαποδοτικών ποικιλιών που κατάφεραν τη μέγιστη αξιοποίηση των εισροών για αύξηση των αποδόσεων. Έτσι δημιουργήθηκαν εξαιρετικές (elite) ποικιλίες που ανταποκρίνονται στην ολοκληρωμένη διαχείριση των πόρων - κυρίως: νερό, λίπανση, καλλιεργητικές φροντίδες, φυτοπροστασία – με αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση των αποδόσεων στις καλλιέργειες, που έγινε γνωστή ως «πράσινη επανάσταση». Εκτιμάται ότι η αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργειών μετά τη δεκαετία του '60 οφείλεται κατά το ήμισυ στη συμ-

βολή της **πράσινης επανάστασης** και την αξιοποίηση των εισροών στη γεωργία ενώ το άλλο μισό στην **γενετική βελτίωση**, και μάλιστα με έναν αλληλένδετο τρόπο όπου η επιτυχία της μιας θα ήταν αδύνατη χωρίς την επιτυχία της άλλης. 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. 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. Στο κεφάλαιο αυτό θα περιγράψουμε τις αρχές και τις μεθόδους που χρησιμοποιούμε σήμερα στη μοριακή βελτίωση των φυτών καθώς και τις σημαντικότερες προοπτικές και εξελίξεις που διαφαίνονται για το μέλλον.

3.2. Οι κυριότερες νέες τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας με εφαρμογές στη Μοριακή Βελτίωση

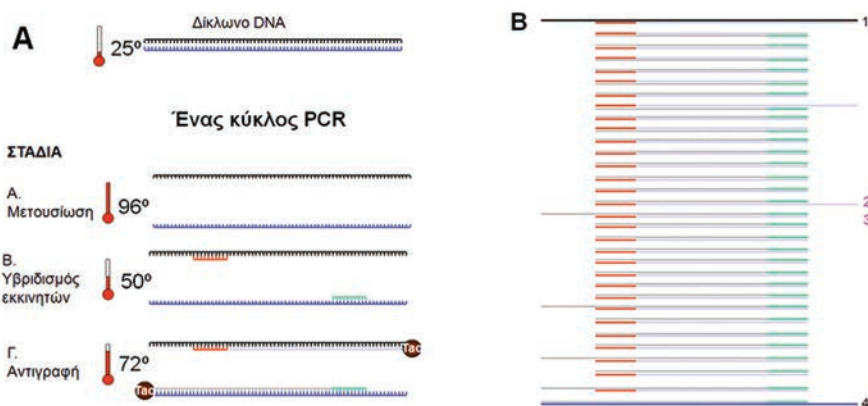
Πολυάριθμες ανακαλύψεις και τεχνολογικές εξελίξεις στο χειρισμό του γενετικού υλικού που έγιναν τις τελευταίες δεκαετίες έχουν σημαντικές εφαρμογές και προσφέρουν νέα εργαλεία για τη βελτίωση των φυτών. Στο πρώτο κεφάλαιο είδαμε μια σειρά από βασικές τεχνικές χειρισμού των νουκλεϊκών οξέων όπως η απομόνωση, η ηλεκτροφόρηση, η κοπή με ένζυμα, η μεταφορά σε μεμβράνη και ο υβριδισμός. Εδώ θα ακολουθήσει μια συνοπτική περιγραφή των πιο σημαντικών νεώτερων τεχνικών που έχουν δώσει μεγάλη ώθηση στην μοριακή ανάλυση των οργανισμών με σημαντικές εφαρμογές στη βελτίωση των φυτών.

3.2.1. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης επιτυγχάνει τον ενζυματικό πολλαπλασιασμό ενός κομματιού DNA. Η ανακάλυψη αυτής της τεχνικής έφερε επανάσταση στη μοριακή βιολογία καθώς επέτρεψε στους ερευνητές να μπορούν να αποκτούν εκατομμύρια αντίγραφα ενός DNA από μερικά αρχικά μόρια. Στην πιο απλή μορφή της, η τεχνική PCR χρησιμοποιεί ένα ένζυμο πολυμερισμού του DNA που μπορεί να αναγνωρίζει έναν εκκινητή και

να συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Έτσι ένα κομμάτι DNA-στόχου μπορεί να πολλαπλασιαστεί όταν στα άκρα του υβριδίζουν δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που είναι συμπληρωματικοί με την αλληλουχία των άκρων στις αντίθετες αλυσίδες του στόχου. Με επανάληψη της αντίδρασης 30-40 φορές το DNA-στόχος πολλαπλασιάζεται εκθετικά και η ποσότητά του μπορεί να φτάσει από μερικά πικογραμμάρια σε μερικά μικρογραμμάρια (αύξηση της ποσότητας κατά 2 τάξεις μεγέθους). Κάθε μια αντίδραση αποτελεί έναν κύκλο της PCR και έχει τρία βασικά στάδια: **α)** τη **μετουσίωση** του DNA με θέρμανση (περίπου στους 95°C) ώστε να ξεχωρίσουν οι δυο αλυσίδες του; **β)** τον **υβριδισμό** των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονές αλυσίδες του DNA σε μια χαμηλότερη θερμοκρασία (περίπου 50-60°C) για να σχηματιστεί μια δομή διπλής έλικας όπου μπορεί η πολυμεράση να προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' ελεύθερο άκρο του εκκινητή; και **γ)** την **αντιγραφή** της αλυσίδας (στους 72°C) με τη χρήση μιας ειδικής θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης. Η επανάληψη αυτού του κύκλου συνεπάγεται την εκθετική αύξηση των αντιγράφων κάθε στόχου, δηλαδή από ένα μόριο-στόχο μετά τον πρώτο κύκλο έχουμε 2 μόρια, μετά τον δεύτερο 4 (2^2), μετά τον τρίτο 16 (2^3), και τελικά μετά από n κύκλους παίρνουμε 2^n μόρια του αρχικού DNA-στόχου (Εικόνα 33).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικούς σωλήνες ή σε πλάκες πολλαπλών αντιδράσεων (96 ή 384) και πολύ μικρό όγκο (10-100 μ l) με ένα ειδικό μηχάνημα που επιτυγχάνει ταχύτατη εναλλαγή των θερμοκρασιών και



Εικόνα 33: Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Α. Ένας κύκλος με τα τρία στάδια της PCR. Β. Μετά από 5 κύκλους υπάρχουν 32 διπλές αλυσίδες από τις οποίες οι 24 (75%) έχουν το ίδιο μέγεθος. Οι αλυσίδες 1 και 4 είναι αυτές του αρχικού δίκλωνου μορίου DNA ενώ οι 2 και 3 είναι τα αντίγραφα που σχηματίστηκαν στον πρώτο κύκλο.

ονομάζεται **θερμοκυκλοποιητής**. Στην αντίδραση εκτός από DNA και ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές περιέχονται η πολυμεράση και τα 4 νουκλεοτίδια που απαρτίζουν το DNA.

3.2.2. Η αλληλούχιση

Ο καθορισμού της σειράς διαδοχής (αλληλουχίας) των νουκλεοτιδίων στο DNA ονομάζεται αλληλούχιση (sequencing). Με το ξεκίνημα της δεκαετίας του 70 δύο διαφορετικά εργαστήρια, πρότειναν μεθόδους, που πράγματι, αυτό που μέχρι πρότινος θεωρείτο σχεδόν αδύνατο, έγινε πραγματικότητα. Ενώ π.χ. ως τότε μια ολόκληρη ομάδα ερευνητών ξόδεψε σχεδόν μια δεκαετία για να βρει την αλληλουχία των 45 νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν ένα μικρό γονίδιο, χάρη στην ύπαρξη αυτών των μεθόδων η ίδια δουλειά ολοκληρώνεται σε λίγη ώρα. Με τη χρήση των μεθόδων αυτών έγινε δυνατή η αλληλούχιση ολόκληρων των γονιδιομάτων πολλών οργανισμών με προεξέχουσα την αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιόματος το 2000. Σήμερα είναι γνωστή η αλληλουχία εκατοντάδων γονιδιωμάτων από όλους ανεξάρτητα τους οργανισμούς. Παράλληλα έχουν αναπτυχθεί νέες μεθοδολογίες αλληλούχισης που συλλογικά αναφέρονται σαν αλληλούχιση της επόμενης γενιάς (next generation sequencing) που επιτυγχάνουν με τη βοήθεια βιοπληροφορικών εργαλείων την αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων σε μια βδομάδα. Η πρόοδος στον τομέα αυτό έρχεται με την αλληλούχιση τρίτης γενιάς (third generation sequencing) που είναι ακόμα σε πειραματικό στάδιο και υπόσχεται την αλληλούχιση ενός γονιδιόματος σε μια μέρα με κόστος κάτω από 1000 \$. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό η πρόοδος στον τομέα αυτό θα έχει σοβαρές επιπτώσεις στις βιοιατρικές επιστήμες με ιδιαίτερη έμφαση στην υγεία αλλά και τη γεωργία και τη βελτίωση των φυτών. Ο βελτιωτής πλέον θα μπορεί να προσδιορίζει όλες τις γενετικές διαφορές σημαντικών γενοτύπων και να αποδίδει διαφορές σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στα αντίστοιχα γονίδια που τα ελέγχουν. Με τον τρόπο αυτό η βελτίωση των φυτών μπορεί να περάσει σε μια νέα εποχή όπου το έργο του βελτιωτή θα είναι όλο και περισσότερο ο σχεδιασμός γενοτύπων παρά η επιλογή φαινοτύπων.

Η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στο μόριο ενός γονιδίου, μας έδωσε τη δυνατότητα σύνθεσης γονιδίων με τεχνητά πλέον μέσα, στο εργαστήριο. Σήμερα υπάρχουν Μηχανές Γονιδίων που μπορούν να συνθέσουν ένα γονίδιο αρκεί να εφοδιάζονται με νουκλεοτίδια και να προγραμματίζονται με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η δυνατότητα αυτή έφερε σημαντικές εξελίξεις στον τρόπο διεξαγωγής της έρευνας στις βιολογικές επιστήμες αφού επέτρεψε

να διατυπωθούν ερωτήματα σχετικά με τα ελάχιστα γονίδια που απαιτούνται για τη λειτουργία ενός οργανισμού και τη δυνατότητα κατασκευής συνθετικής ζωής από ανόργανα υλικά στο εργαστήριο. Ένα πολύ σημαντικό βήμα στην κατεύθυνση αυτή έγινε το Μάιο του 2010 όταν μια ομάδα ερευνητών υπό την καθοδήγηση των J. Craig Venter (αλληλούχιση ανθρωπίνου γονιδιόματος) του Hamilton O. Smith (τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1978 για την ανακάλυψη των περιοριστικών ενζύμων), και του μικροβιολόγου Clyde A. Hutchison III, μετά από μια επική προσπάθεια που ξεκίνησε το 1995 με την αλληλούχιση του γονιδιόματος του βακτηρίου *Mycoplasma genitalium*, κατάφεραν να συνθέσουν και να συναρμολογήσουν στο εργαστήριο ένα τεχνητό χρωμόσωμο που περιείχε 1.080.000 ζεύγη βάσεων του συγγενούς βακτηρίου *M. mycoides* και να τα εισάγουν σε ένα κύτταρο ενός άλλου συγγενούς βακτηρίου *M. capricolum* του οποίου το DNA είχε αφαιρεθεί. Το νέο αυτό βακτήριο που έφερε τα χαρακτηριστικά του δότη-γονιδιόματος *M. mycoides* και με κάποια υπερβολή ομολογουμένως θεωρήθηκε παράδειγμα «συνθετικής ή τεχνητής ζωής» ονομάστηκε *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 και είναι ο πρώτος αυτοαναπαραγόμενος οργανισμός του οποίου ολόκληρο το DNA έχει συντεθεί από μηχανές γονιδίων στο εργαστήριο. Η επιτυχία αυτή ανοίγει το δρόμο για τη σύνθεση νέων γενότυπων μικροοργανισμών που μπορεί να επιτελούν ιδιαίτερο έργο (π.χ. σύνθεση υδρογονανθράκων από ανόργανα υλικά) και στο απώτερο μέλλον πιθανόν να οδηγήσει και στην τροποποίηση μεγάλου μέρους του γονιδιόματος καλλιεργούμενων φυτών στο εργαστήριο, με σκοπό τη βελτίωσή τους.

3.2.3. Η κλωνοποίηση γονιδίων

Κλωνοποίηση είναι η διαδικασία δημιουργίας ακριβών αντιγράφων από ένα πρότυπο που μπορεί να είναι ένα μόριο (DNA ή RNA), ένα γονίδιο, ένα κύτταρο, ή ακόμη και ένας πολυκύτταρος οργανισμός. Η κλωνοποίηση γονιδίων που είναι γνωστή και σαν τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τέσσερα στάδια:

α) Στο πρώτο στάδιο απομονώνεται το DNA του οργανισμού που μας ενδιαφέρει και κατεργάζεται με περιοριστικά ένζυμα ώστε να κοπεί σε πολλά κομμάτια. Επίσης με τα ίδια ένζυμα κατεργάζονται οι φορείς κλωνοποίησης μέσα στους οποίους θα ενσωματωθούν τα κομμάτια αυτά. Οι πιο απλοί φορείς κλωνοποίησης είναι τα πλασμίδια (μικρά κυκλικά μόρια DNA που μπορούν να αναπαράγονται ανεξάρτητα μέσα σε βακτήρια).

β) Τα πλασμίδια αυτά ενσωματώνουν από ένα κομμάτι DNA και με τη

βοήθεια ενός ειδικού ενζύμου, της DNA λιγάσης, καταλύεται η ομοιολογική σύνδεση του κομματιού DNA του οργανισμού και του πλασμιδίου. Με αυτό τον τρόπο παράγονται ανασυνδυσασμένα πλασμίδια, κυκλικά δηλαδή μόρια DNA, καθένα από τα οποία περιέχει κάποιο κομμάτι από το DNA του οργανισμού. Εκτός αυτών, ορισμένα πλασμίδια επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση, χωρίς να προσλάβουν DNA του οργανισμού.

γ) Στο τρίτο στάδιο τα πλασμίδια εισάγονται σε βακτηριακά κύτταρα με τη διαδικασία του μετασχηματισμού. Όσα πλασμίδια κατάφεραν είτε να ενσωματώσουν ένα κομμάτι ξένο DNA, είτε να ξαναενώσουν τα κομμένα άκρα τους (έγιναν με άλλα λόγια ξανά κυκλικά μόρια) έχουν την ικανότητα να περάσουν μέσα από μικρές τρύπες των μεμβρανών ειδικά προετοιμασμένων βακτηριακών κυττάρων. Συνήθως κάθε βακτηριακό κύτταρο μπορεί να μετασχηματισθεί από ένα μόνο πλασμίδιο. Έτσι κάθε βακτήριο που μετασχηματίστηκε από ανασυνδυσασμένο πλασμίδιο θα περιέχει ένα κομμάτι DNA οργανισμού.

δ) Στο τέταρτο στάδιο διαχωρίζονται τα βακτήρια που περιέχουν ανασυνδυσασμένα πλασμίδια, από αυτά που απλά ξαναέκλεισαν το σημείο τομής που δημιούργησαν τα περιοριστικά ένζυμα. Κριτήριο διαχωρισμού αποτελεί συνήθως η αντοχή των βακτηρίων σε κάποιο αντιβιοτικό. Έτσι μετά από επίστρωση των βακτηρίων σε ένα στερεό θρεπτικό μέσο επιλογής (που περιέχει δηλαδή το κατάλληλο αντιβιοτικό) μεγαλώνουν μόνο αποικίες που περιέχουν τα ανασυνδυσασμένα πλασμίδια.

Το σύνολο των ανασυνδυσασμένων βακτηρίων που περιέχει το σύνολο των κλωνοποιημένων τμημάτων του οργανισμού ονομάζεται **βιβλιοθήκη** του γενετικού υλικού του συγκεκριμένου οργανισμού. Τα πλασμίδια μέσα στα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν, αλλά και υπό συγκεκριμένες συνθήκες να εκφράσουν τις γενετικές πληροφορίες που περιέχουν τα τμήματα DNA που έχουν κλωνοποιηθεί σ' αυτά. Με τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων που περιέχουν τα πλασμίδια, γίνεται πολλαπλασιασμός και των πλασμιδίων και συνεπώς του DNA του οργανισμού που ενσωμάτωσαν. Τέλος, από τη βιβλιοθήκη μπορεί να επιλεγεί (με κατάλληλες μεθόδους σάρωσης) ο συγκεκριμένος βακτηριακός κλώνος που περιέχει το τμήμα DNA που επιθυμεί ο ερευνητής.

3.3. Οι Μοριακοί Δείκτες στη Βελτίωση

3.3.1. Γενετικοί δείκτες

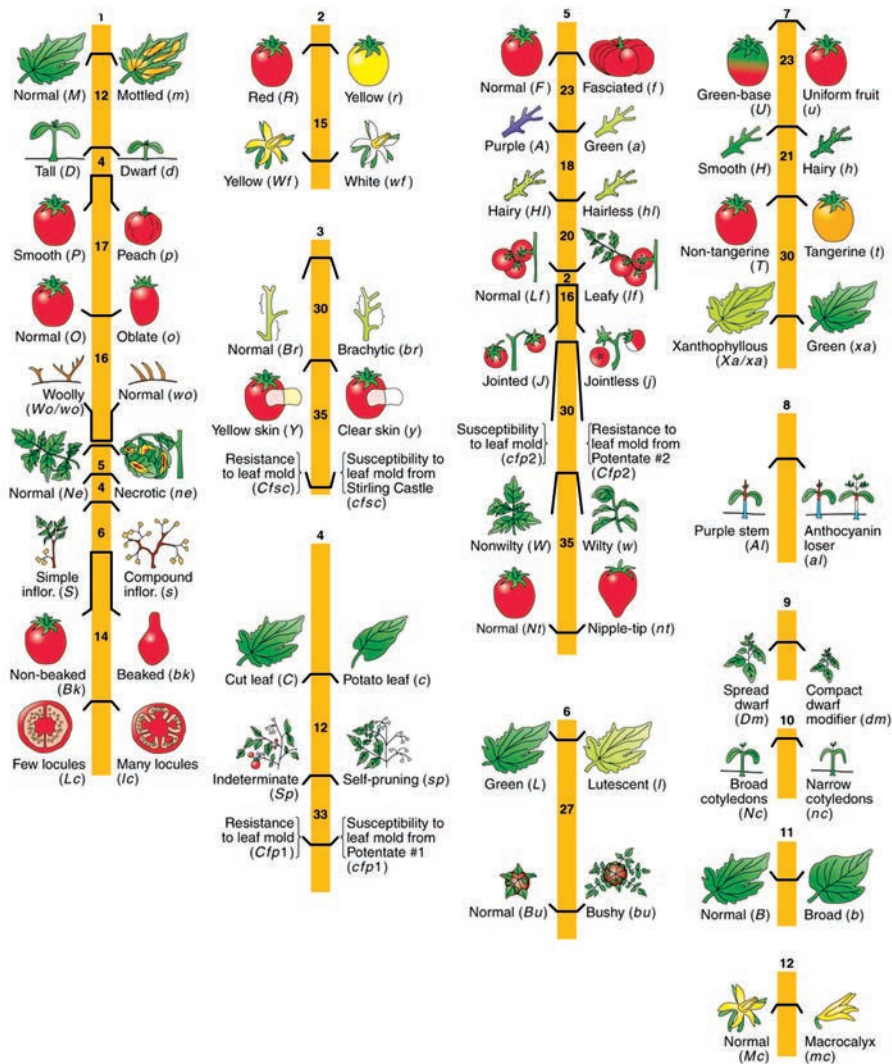
Γενετικός δείκτης είναι απλά ένα ορόσημο (σημείο που επισημαίνει) μιας θέσης στο χρωμόσωμα, που χρησιμεύει για να προσδιορίζονται θέσεις άλλων γονιδίων που μας ενδιαφέρουν, όταν κατασκευάζεται ένας γενετικός χάρτης σύνδεσης. Στην αρχική της ανάπτυξη η επιστήμη της Γενετικής βασίστηκε σε **μορφολογικούς δείκτες** όπως το χρώμα και υφή του σπόρου στο μπιζέλι ή το χρώμα των ματιών στη μύγα του ξυδιού *Drosophila*.

Οι διαφορές ανάμεσα σε άτομα για το κάθε χαρακτηριστικό αποδίδονταν σε διαφορές στα αλληλόμορφα γονίδια που ελέγχουν το χαρακτηριστικό τα οποία αποτελούσαν γονίδια-δείκτες. Καθώς αρχικά οι επιστήμονες μπορούσαν να αναλύσουν μόνο μορφολογικά χαρακτηριστικά που έδιναν διακριτούς φαινότυπους, αναπτύχθηκαν μια σειρά μορφολογικοί δείκτες και η χαρτογράφηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τα μορφολογικά αυτά χαρακτηριστικά έδωσε και τους πρώτους γενετικούς χάρτες όπου συγκεκριμένες περιοχές των χρωμοσωμάτων επισημαίνονταν από την παρουσία του γονιδίου-δείκτη.

Ένας τέτοιος χάρτης που κατασκευάστηκε με τη χαρτογράφηση μορφολογικών δεικτών με κλασσικές μεθόδους ελέγχου σύνδεσης των χαρακτήρων στα 12 χρωμοσώματα της ντομάτας το 1952 φαίνεται στην Εικόνα 34.

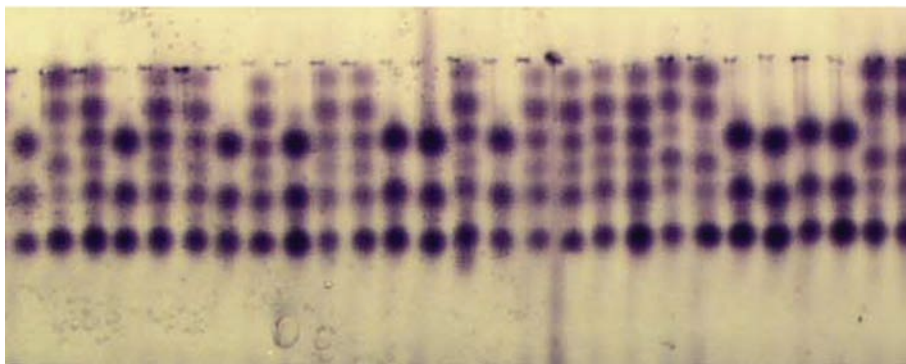
Με την πάροδο του χρόνου και την ανάπτυξη βιοχημικών τεχνικών, αναλύσεων και αντιδραστηρίων, έγινε δυνατή η αναγνώριση διαφορών σε βιοχημικό επίπεδο. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι οι τύποι του αίματος στον άνθρωπο καθώς και τα ισοένζυμα διαφόρων ενζύμων στα ζώα και τα φυτά. Τα ισοένζυμα είναι δομικές παραλλαγές ενός ενζύμου που ενώ διαφέρουν στη σύστασή τους σε αμινοξέα με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικές ιδιότητες όπως μοριακό βάρος ή μετακίνηση σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, έχουν την ίδια καταλυτική δραστητικότητα. Η ισοενζυμική ανάλυση μπορεί να διαχωρίσει σε ηλεκτροφόρηση τις διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου που κωδικοποιούνται τόσο από αλληλόμορφα γονίδια και λέγονται **αλλοένζυμα**, όσο και από μη-αλληλόμορφα γονίδια που λέγονται **ισοένζυμα**. Ωστόσο, ο όρος ισοένζυμα χρησιμοποιείται για ευκολία για να προσδιορίσει και τις δύο κατηγορίες.

Άτομα ενός πληθυσμού που φέρουν διαφορετικά αλληλόμορφα που κωδικοποιούν ένα ενζυμικό σύστημα, θα παράγουν πολυπεπτίδια με διαφορές στη σύστασή τους σε αμινοξέα και οι διαφορές αυτές θα είναι ανιχνεύσιμες στο



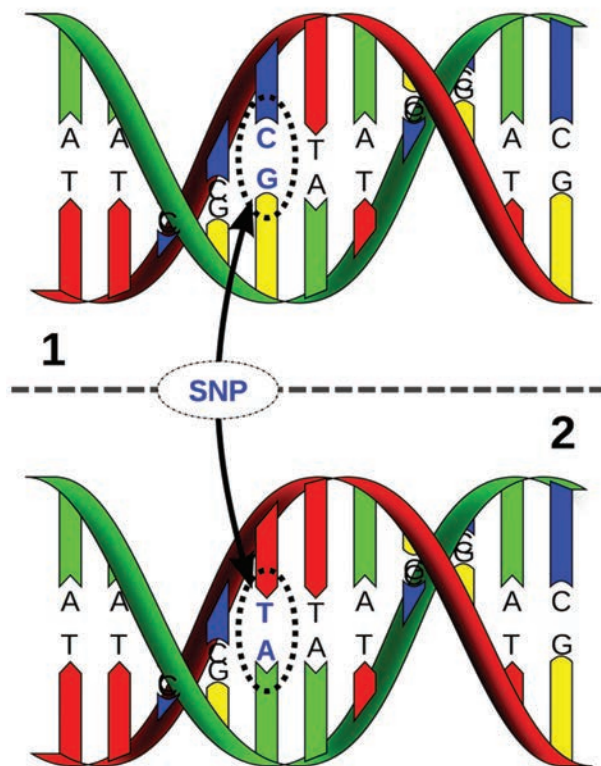
Εικόνα 34: Ένας χάρτης σύνδεσης της τομάτας του 1952. Κάθε θέση(locus) συνοδεύεται στα πλάγια με εικόνες του κανονικού (άγριου τύπου) φαινότυπου και παραλλαγών του. Οι αποστάσεις μεταξύ των θέσεων δίνονται σε μονάδες χάρτη (map units). Από το βιβλίο “An Introduction to Genetic Analysis 8th Edition, by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

ηλεκτροφορητικό πρότυπο σαν διαφορετικές ζώνες που μεταναστεύει κάθε ισοένζυμο. Ένα τέτοιο παράδειγμα φαίνεται στην Εικόνα 35.



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

Όπως και στην περίπτωση των μορφολογικών δεικτών, τα ισοένζυμα αποτελούν τους **βιοχημικούς δείκτες**. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτούς τους δείκτες μπορούν να χαρτογραφηθούν και να χρησιμεύσουν για τη χαρτογράφηση άλλων γονιδίων. Η χρήση των ισοενζύμων σαν δείκτες είναι περιορισμένη κυρίως επειδή και ο αριθμός των ισοενζυμικών συστημάτων που μπορεί να διακρίνουμε στα φυτά είναι μικρός και περιορίζεται από τον αριθμό των ενζύμων που μπορεί να βαφούν για αναγνώριση σε πηκτή αμύλου ή ακρυλαμίδης. Ωστόσο η έννοια του γενετικού δείκτη δεν περιορίζεται σε γονίδια που κωδικοποιούν αναγνωρίσιμα μορφολογικά ή βιοχημικά χαρακτηριστικά καθώς δεν είναι η λειτουργία των γονιδίων που μας ενδιαφέρει αλλά η **παραλλακτικότητα της δομής του DNA** που αντικατοπτρίζει τη διαφορά των ατόμων σε έναν πληθυσμό. Ο γενετικός δείκτης μπορεί έτσι να είναι μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA ανεξάρτητα με το αν κωδικοποιεί ή όχι κάποιο προϊόν, όπου τα διαφορετικά άτομα έχουν διαφορές στην αλληλουχία τους. Στην περίπτωση αυτή ο δείκτης λέγεται **μοριακός δείκτης**. Μοριακός δείκτης μπορεί να είναι ένα ολόκληρο γονίδιο ή μια μικρή αλληλουχία όπως ένας μικροδορυφόρος (μικρή γραμμική επανάληψη ενός ολιγονουκλεοτιδίου) ή τόσο μικρός όσο ένα μόνο νουκλεοτίδιο που διαφέρει ανάμεσα σε δυο αλληλόμορφα γονίδια σε μια αντίστοιχη περιοχή. Στην περίπτωση αυτή ο γενετικός δείκτης λέγεται **μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός** (single nucleotide polymorphism, SNP) και αποτελεί την μικρότερη πολυμορφική μονάδα που μπορεί να χαρακτηριστεί σαν μοριακός δείκτης. Ένα παράδειγμα μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού βλέπουμε στην Εικόνα 36.



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

Μετά από αυτή την εισαγωγή μπορούμε να ορίσουμε ότι **γενετικός δείκτης είναι μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA** με γνωστή θέση πάνω στο χρωμόσωμο 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.

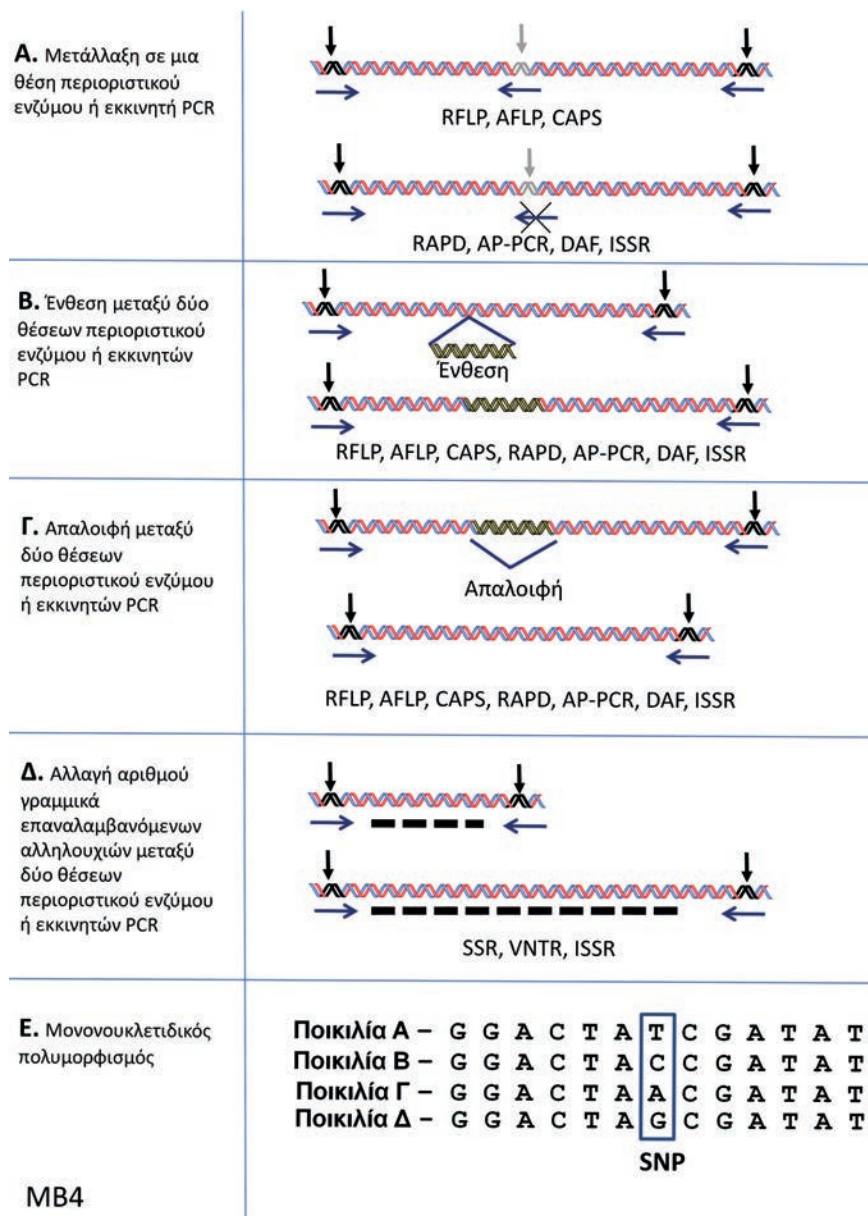
Οι γενετικοί δείκτες για να είναι **χρήσιμοι στη γενετική ανάλυση**, δηλαδή να μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση διαφορετικών ατόμων ή με άλλα λόγια διαφορετικών γενότυπων πρέπει να ικανοποιούν τα εξής **κριτήρια**: **1.** να είναι πολυμορφικοί, **2.** να κληρονομούνται συγκυρίαρχα (ώστε τα ετεροζύγωτα άτομα να ξεχωρίζουν από τα ομοζύγωτα), **3.** τα χαρακτηριστικά του κάθε αλληλόμορφου να είναι ευδιάκριτα (ώστε τα διαφορετικά αλληλό-

μορφα να αναγνωρίζονται εύκολα), **4.** να κατανέμονται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το γονιδίωμα, **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).

3.3.2. Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες άρχισαν να αναπτύσσονται από τη δεκαετία του 1980 και έκτοτε μια τεράστια ποικιλία δεικτών έχει επινοηθεί για τη διευκόλυνση της γενετικής ανάλυσης. 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**. Νεώτερες τεχνικές εξελίξεις επέτρεψαν ανάπτυξη συστημάτων μοριακών δεικτών που στηρίζονται στην **αλληλούχιση** συγκεκριμένων περιοχών ενώ δείκτες που στηρίζονται στην τεχνολογία των **μικρο-συστοιχιών** ανιχνεύουν πολυμορφισμούς σε επίπεδο γονιδιώματος χωρίς να απαιτείται προηγούμενη γνώση συγκεκριμένων αλληλουχιών. Οι περισσότεροι δείκτες που εφαρμόζονται σήμερα στη βελτίωση των φυτών βασίζονται στον **πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας με PCR**.

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν επίσης να κατηγοριοποιηθούν με βάση το είδος των μοριακών διαφορών που ανιχνεύουν σε μια αλληλουχία, σε αυτούς που βασίζονται: **1.** στην ανίχνευση μεταλλάξεων στη θέση πρόσδεσης των εκκινητών της PCR ή των θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων, **2.** στην ένθεση ή την απαλοιφή μιας αλληλουχίας μεταξύ των εκκινητών ή των θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων, **3.** στην αλλαγή του αριθμού γραμμικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μεταξύ δύο εκκινητών ή των θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων, ή τέλος **4.** στην ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών. Μια κατηγοριοποίηση των μοριακών δεικτών ανάλογα με τη μοριακή τους βάση φαίνεται στην Εικόνα 37. Οι περισσότεροι μοριακοί δείκτες ανήκουν στην κατηγορία των **ανώνυμων DNA δεικτών** που ανιχνεύουν γενικά **ουδέτερη** παραλλακτικότητα. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία ή



MB4

Εικόνα 37: Η μοριακή βάση των κυριότερων μοριακών δεικτών. Τα μέρη Α-Ε δείχνουν τους διαφορετικούς τρόπους που οι δείκτες DNA ανιχνεύουν πολυμορφισμούς. Οι θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων σημειώνονται με κάθετα βέλη πάνω ενώ οι θέσεις εκκινητών με πλάγια βέλη κάτω από την γραμμή που υποδηλώνει μια αλυσίδα DNA. Οι διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Σημειωμένες με Χ είναι θέσεις όπου μια μετάλλαξη έχει απαλείψει μια θέση αναγνώρισης ενζύμου ή εκκινητή. Οι συντομογραφίες των μοριακών δεικτών επεξηγούνται στο κείμενο.

απουσία του δείκτη μπορεί να προσδιορίσει μόνο τη διαφορά των ατόμων και όχι να επηρεάσει τη διαφορά στην εκδήλωση του γνωρίσματος που μας ενδιαφέρει. Επίσης είναι σημαντικό οι μοριακοί δείκτες, ανεξάρτητα από την τεχνική που τους ανιχνεύουμε, να είναι **απεριόριστοι** σε αριθμό ώστε να μπορεί να **καλύπτουν πυκνά** όλο το γονιδίωμα, και να ανιχνεύονται **σταθερά και εύκολα** σε υλικά που προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς, όργανα, αναπτυξιακά στάδια ή περιβάλλοντα. Με βάση τα γενετικά τους χαρακτηριστικά οι δείκτες μπορεί να ανιχνεύουν: **1.** μονή θέση, πολλαπλά συγκυρίαρχα αλληλομόρφα, με παραδείγματα τους RFLPs και τους μικροδορυφόρους. **2.** Πολλαπλές θέσεις, απλά κυρίαρχα αλληλόμορφα, με κύρια παραδείγματα τους AFLPs και τους RAPDs. Παρακάτω θα δούμε πιο αναλυτικά τους κυριότερους μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιούνται στη βελτίωση των φυτών.

Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA (RFLP)

Το πρώτο σύστημα μοριακών δεικτών που αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1970, οι δείκτες RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), βασίστηκε σε δυο τεχνικές που μόλις είχαν επινοηθεί: την κατεργασία με περιοριστικά ένζυμα και τον υβριδισμό. Αυτοί είναι και οι μόνοι δείκτες που εφαρμόστηκαν βασισμένοι στον υβριδισμό και ανιχνεύουν κυρίως μεταλλάξεις σε θέσεις κοπής περιοριστικών ενζύμων και ένθεση ή απαλοιφή μιας αλληλουχίας μεταξύ δύο θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων. Συνοπτικά η μεθοδολογία περιλαμβάνει την κοπή του συνολικού μεγαλομοριακού DNA των κυττάρων ενός ιστού (π.χ. φύλλο) με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός πληθυσμού μικρότερων μορίων DNA που διαχωρίζονται σύμφωνα με το μήκος τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Παρά το γεγονός ότι τα μόρια αυτά είναι ορατά αν βαφτούν με βρωμιούχο αιθίδιο, δεν είναι ευδιάκριτες οι διαφορές τους καθώς υπάρχει μεγάλος αριθμός μορίων με συνεχή κατανομή μήκους, από λίγες δεκάδες μέχρι και πάνω από δέκα χιλιάδες βάσεις, που εμφανίζονται σαν συνεχόμενη φωτεινή περιοχή (smear) στην πηκτή, που ενδεχομένως να περιέχει και κάποιες ευδιάκριτες ζώνες συγκεκριμένων μεγεθών που παράγονται από την πέψη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Αυτή η πληροφορία δεν επαρκεί για τη διαπίστωση αν δυο διαφορετικά άτομα ενός πληθυσμού παρουσιάζουν πολυμορφισμό στην κοπή του συνόλου του DNA τους με ένα ένζυμο. Έτσι επινοήθηκε μια τεχνική ανίχνευσης διαφορών συγκεκριμένων αλληλουχιών που προέρχονται από την κατεργασία με περιοριστικά ένζυμα. Για την ανίχνευση τέτοιων διαφορών χρησιμοποιούμε την τεχνική του υβριδισμού με έναν ιχνηλάτη που δεν είναι τίποτα άλλο παρά

ένα κλωνοποιημένο κομμάτι DNA του ίδιου οργανισμού, και διαπιστώνεται αν υπάρχει πολυμορφισμός για το συγκεκριμένο κομμάτι που είναι ομόλογο με τον ιχνηλάτη. Τα διαχωρισμένα τμήματα DNA της ηλεκτροφόρησης μεταφέρονται με Νότια μεταφορά (NORTHERN) σε μια μεμβράνη όπου μετουσιώνονται και σταθεροποιούνται. Ο ιχνηλάτης επισημαίνεται με φθορίζουσες ή ραδιενεργές ουσίες, μετουσιώνεται και αυτός, και υβριδίζει με τις συμπληρωματικές του αλυσίδες που είναι σταθεροποιημένες στη μεμβράνη. Ανάλογα με την παρουσία ή απουσία αντίστοιχων θέσεων κοπής με το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήσαμε, θα δούμε τα ίδια ή διαφορετικά επισημασμένα μόρια στα διάφορα γενετικά υλικά που εξετάζουμε. Επίσης διαφορές μπορεί να οφείλονται σε προσθήκη/απαλοιφή βάσεων μεταξύ αλληλόμορφων διαφορετικών γενότυπων. Οι δείκτες RFLP κληρονομούνται με συγκυρίαρχο τρόπο και μπορεί να είναι απερίοριστοι σε αριθμό. Επίσης η αλληλουχία του κάθε ιχνηλάτη-δείκτη δεν χρειάζεται να είναι γνωστή. Αποτελούν το πρώτο σύστημα μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκε στη βελτίωση των φυτών, αλλά μετά την ανακάλυψη της PCR η χρήση δεικτών RFLP είναι περιορισμένη κυρίως εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας συνολικού DNA που απαιτείται για κοπή με περιοριστικά ένζυμα, της δυσκολίας στην εφαρμογή των τεχνικών ανίχνευσής τους και του σημαντικού κόστους τους.

Τυχαίο Ενίσχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD)

Η ανίχνευση δεικτών RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ήταν η πρώτη εφαρμογή αξιοποίησης της PCR για την ανίχνευση γενετικής παραλλακτικότητας σε επίπεδο DNA. Το σύστημα αυτό βασίζεται στη χρήση ενός μόνο μικρού εκκινητή (συνήθως 10 νουκλεοτιδίων) με τυχαία αλληλουχία, για την ενίσχυση με PCR τυχαίων τμημάτων του DNA των ατόμων ενός πληθυσμού. Για να πολλαπλασιαστεί ένα τμήμα με έναν εκκινητή, θα πρέπει ο εκκινητής αυτός να βρει μια συμπληρωματική αλληλουχία και στα δυο άκρα του τμήματος αυτού αλλά με αντίθετες διευθύνσεις (δηλαδή στο ένα άκρο στη μια αλυσίδα του DNA και στο άλλο άκρο στην άλλη). Όταν η περιοχή ανάμεσα στα σημεία υβριδισμού-πρόσδεσης του εκκινητή είναι από 100 έως 3000 βάσεις παράγονται μόρια πολλαπλασιασμένου DNA που εμφανίζονται σαν διακριτές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση. Ο πολυμορφισμός μεταξύ των διαφορετικών ατόμων που εμφανίζεται σαν διαφορά στο πρότυπο ζωνών της ηλεκτροφόρησης μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές στη θέση πρόσδεσης του εκκινητή, με αποτέλεσμα αποτυχία πολλαπλασιασμού του τμήματος και εμφάνισης της ζώνης, και σε προσθήκη/απαλοιφή βάσεων στο ενδιάμεσο των πολλαπλασιασμένων τμημάτων, που οδηγεί στη διαφοροποίηση του μήκους

της αλληλουχίας που ενισχύεται. Σε κάθε αντίδραση μπορεί να ενισχύονται περισσότερες από μια ζώνες, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να αναλύονται περισσότερα του ενός αλληλόμορφα. Οι δείκτες RAPD συμπεριφέρονται σαν κυρίαρχοι χαρακτήρες, που σημαίνει ότι ένα αλληλόμορφο που ενισχύεται εμφανίζεται σαν μια ζώνη τόσο σε ομόζυγη όσο και σε ετερόζυγη κατάσταση, ενώ το αλληλόμορφο που δεν ενισχύεται δεν μπορεί να ανιχνευθεί. Για το λόγο αυτό η τεχνική είναι λιγότερο αποτελεσματική σε σχήματα βελτίωσης με γενεαλογική επιλογή όπου είναι απαραίτητο να αναγνωρίζονται ετεροζύγωτα άτομα μεταξύ των απογόνων. Ένα ακόμη πρόβλημα των δεικτών αυτών είναι η ευαισθησία της PCR σε αλλαγή συνθηκών της αντίδρασης με αποτέλεσμα να μην έχει καλή επαναληψιμότητα, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται σε διαφορετικά εργαστήρια. Ωστόσο, η μεθοδολογία των δεικτών RAPD είναι πολύ γρήγορη και απλή ενώ απαιτεί ελάχιστες ποσότητες DNA και το κόστος είναι χαμηλό, οπότε μπορεί να εφαρμοστεί στην ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων δίνοντας σημαντική πληροφορία για πολυμορφισμούς χωρίς να χρειάζεται προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας των διαφορετικών αλληλόμορφων.

Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων (AFLP)

Το σύστημα δεικτών AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) βασίζεται στον πολυμορφισμό των τμημάτων κοπής του συνολικού DNA με περιοριστικά ένζυμα, όπως και οι δείκτες RFLP, με τη διαφορά ότι η αναγνώριση των τμημάτων αυτών δεν γίνεται με υβριδισμό αλλά με PCR. Η τεχνική χρησιμοποιεί προσαρμοστές (adapters) που συνδέονται με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση με τα άκρα των τμημάτων που προκύπτουν από κατεργασία με δύο συνήθως περιοριστικά ένζυμα, που το ένα αναγνωρίζει θέσεις 4 και το άλλο θέσεις 6 βάσεων. Κατόπιν γίνεται αντίδραση PCR με μήτρα τα τμήματα αυτά και εκκινητές που είναι συμπληρωματικοί με την αλληλουχία των προσαρμοστών. Τα προϊόντα της αντίδρασης επισημαίνονται με ραδιενεργά ή φθορίζοντα νουκλεοτίδια και οπτικοποιούνται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμίδης. Η τεχνική παράγει μεγάλη πυκνότητα δεικτών αφού στην ηλεκτροφόρηση ξεχωρίζουν 50-100 ζώνες που καθεμιά αντιστοιχεί σε έναν AFLP δείκτη (που επισημαίνει τη θέση ενός αλληλομόρφου). Έτσι η τεχνική έχει το πλεονέκτημα να ανιχνεύει μεγάλο αριθμό δεικτών σε μια αντίδραση χωρίς προαπαιτούμενη γνώση της αλληλουχίας ή τη χρήση ιχνηλάτη. Επίσης είναι λιγότερο ευαίσθητη από τα RAPDs σε διακυμάνσεις των συνθηκών της PCR με αποτέλεσμα να έχει καλλίτερη επαναληψιμότητα, είναι όμως τεχνικά πιο απαιτητική. Οι δείκτες που ανιχνεύονται είναι όπως και οι RAPDs κυρίαρχοι και μονοαλληλικοί (το ένα αλληλόμορφο ανιχνεύεται ενώ το άλλο

όχι). Ο μεγάλος όγκος πληροφοριών που προκύπτει με μια μόνο αντίδραση PCR στο σύστημα δεικτών AFLP έκανε τους δείκτες αυτούς πολύ δημοφιλείς σε μελέτες ανάλυσης της βιοποικιλότητας, ανάλυσης παραλλακτικότητας σε συλλογές τραπεζών γενετικού υλικού, και στη γενετική χαρτογράφηση.

Μικροδορυφόροι (microsatellites) ή Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες (SSR) και Απλές Γραμμικές Επαναλήψεις (STR)

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν πολλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο DNA τους. Τέτοιες μικρές επαναλήψεις αλληλουχιών 2-5 νουκλεοτιδίων που επαναλαμβάνονται 5-100 φορές έχουν ονομαστεί με πολλά διαφορετικά ονόματα όπως μικροδορυφόροι, απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple Sequence Repeats, SSR), απλές γραμμικές επαναλήψεις (Simple Tandem Repeats, STR), γραμμικές επαναλήψεις ποικίλων νουκλεοτιδίων (Variable Nucleotide Tandem Repeats, VNTR), και αποτελούν εξαιρετική πηγή γενετικών δεικτών καθώς παρουσιάζουν υψηλή παραλλακτικότητα ως προς τον αριθμό επαναλήψεων σε πολλούς οργανισμούς. Έτσι, για παράδειγμα, μια αλληλουχία ενός δινουκλεοτιδίου AG μπορεί να επαναλαμβάνεται 20 φορές σε συγκεκριμένη θέση στο DNA ενός αλληλομόρφου ενώ στο άλλο αλληλόμορφο 30 φορές. Η ανίχνευση αυτών των διαφορών μπορεί να γίνει εύκολα με PCR αν ενισχύσουμε την περιοχή των επαναλήψεων χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές ομόλογους με αλληλουχίες εκατέρωθεν της επανάληψης. Τότε, υποθέτοντας ότι αλληλουχία της περιοχής είναι η ίδια στα δυο αλληλόμορφα και ότι η μόνη διαφορά οφείλεται στον αριθμό επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου, τα ενισχυμένα τμήματα θα έχουν διαφορά μήκους 20 νουκλεοτίδια που είναι εύκολο να ανιχνευθεί σε μια ειδική πηκτή αгарόζης υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Βέβαια και κάθε προσθήκη/απαλοιφή νουκλεοτιδίων που μπορεί να έχει συμβεί ανάμεσα στις θέσεις των εκκινητών μπορεί να ανιχνευθεί σαν παραλλακτικότητα. Η τεχνική δίνει απλούς συγκυρίαρχους δείκτες, μιας γονιδιακής θέσης, με μεγάλη παραλλακτικότητα και υψηλή επαναληψιμότητα, αλλά απαιτεί προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας της περιοχής για σχεδιασμό εκκινητών. Αυτό είναι σημαντικό εγχείρημα και αποτελεί μειονέκτημα της τεχνικής όταν εφαρμόζεται σε οργανισμούς που δεν έχουν αλληλοκληθεί. Σήμερα όμως, καθώς τα γονιδιώματα πολλών σημαντικών καλλιεργούμενων φυτών είναι γνωστά, έχουν αναπτυχθεί βιοπληροφορικές μεθοδολογίες ανίχνευσης επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και σχεδιασμού εκκινητών που διευκολύνουν σημαντικά την χρήση τους στην ανάλυση της γενετικής παραλλακτικότητας και τη βελτίωση των φυτών αυτών.

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP)

Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) είναι η θέση ενός ζευγαριού βάσεων σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία που διαφέρει από το ένα άτομο στο άλλο. Αυτή η παραλλακτικότητα συχνά εντοπίζεται σε γονίδια, γεγονός που κάνει τους δείκτες SNP πολύ χρήσιμους στην επισήμανση γονιδίων υπεύθυνων για ασθένειες, με αποτέλεσμα την ευρύτατη χρήση τους στην ιατρική. Οι δείκτες SNP είναι οι απλούστεροι συγκυρίαρχοι δείκτες που μπορεί να επισημάνουν διαφορές σε γονίδια και ο αριθμός τους είναι απεριόριστος. Ωστόσο, η ανίχνευσή τους γίνεται κυρίως με αλληλούχιση που είναι δύσκολη και ακριβή τεχνική, κάνοντας προς το παρόν τη χρήση SNP απαγορευτική για εφαρμογές ρουτίνας.

3.3.3. Εφαρμογές των μοριακών δεικτών

Οι μοριακοί δείκτες είναι πολύτιμα εργαλεία της γενετικής ανάλυσης με πολλές εφαρμογές που εκτείνονται από τον εντοπισμό συγκεκριμένων γονιδίων μέχρι την καθεαυτή βελτίωση των φυτών με χρήση δεικτών. Ιδιαίτερα σήμερα, όπου μια πληθώρα γονιδιωμάτων πολλών οργανισμών έχει αλληλουχηθεί και η πληροφορία αυτή είναι διαθέσιμη σε βάσεις δεδομένων, οι μοριακοί δείκτες αποδεικνύουν την χρησιμότητά τους στην απλούστευση της γονιδιοματικής ανάλυσης για τον **εντοπισμό γονιδίων** και την **δημιουργία γενετικών χαρτών υψηλής πυκνότητας**. Αυτά τα σημαντικά εργαλεία έχουν άμεση εφαρμογή στη βελτίωση των φυτών καθώς επιτρέπουν πιο εύκολη και αξιόπιστη επιλογή γενότυπων και στα τρία σημαντικά βήματα της βελτίωσης, δηλαδή τη **δημιουργία γενετικής παραλλακτικότητας**, την επιλογή των κατάλληλων γονέων για τη δημιουργία του αρχικού πληθυσμού που θα εφαρμοστεί η επιλογή, και τέλος την **επιλογή των υπέρτερων γενότυπων** στον πληθυσμό επιλογής. Επίσης άλλες σημαντικές εφαρμογές των μοριακών δεικτών αφορούν τη **φυλογενετική ανάλυση** που άνοιξε νέους ορίζοντες στην εξελικτική. Τις πιο σημαντικές από αυτές τις εφαρμογές θα αναλύσουμε στη συνέχεια του κεφαλαίου αυτού.

Μοριακή χαρτογράφηση

Η χαρτογράφηση είναι μια διαδικασία εύρεσης της σειράς των γονιδίων που συνδέονται πάνω σε μια ομάδα σύνδεσης και των αποστάσεων μεταξύ τους. Όταν το γονιδίωμα ενός οργανισμού ερευνάται για πρώτη φορά δεν υπάρχει κάποιος χάρτης των γονιδίων του. Η διαδικασία της χαρτογράφησης ξεκινά με την προσπάθεια εύρεσης συνδεδεμένων γονιδίων. Για την κατα-

νόηση της χαρτογράφησης πρέπει να θυμηθούμε τις έννοιες του γενετικού διαχωρισμού (segregation) και ανασυνδυασμού (recombination) αλληλομόρφων. Για διευκόλυνση του αναγνώστη θα γίνει σύντομη περιγραφή των εννοιών αυτών για απλούς Μενδελικούς χαρακτήρες που εμφανίζουν πλήρη κυριαρχία.

Διαχωρισμός και ανασυνδυασμός

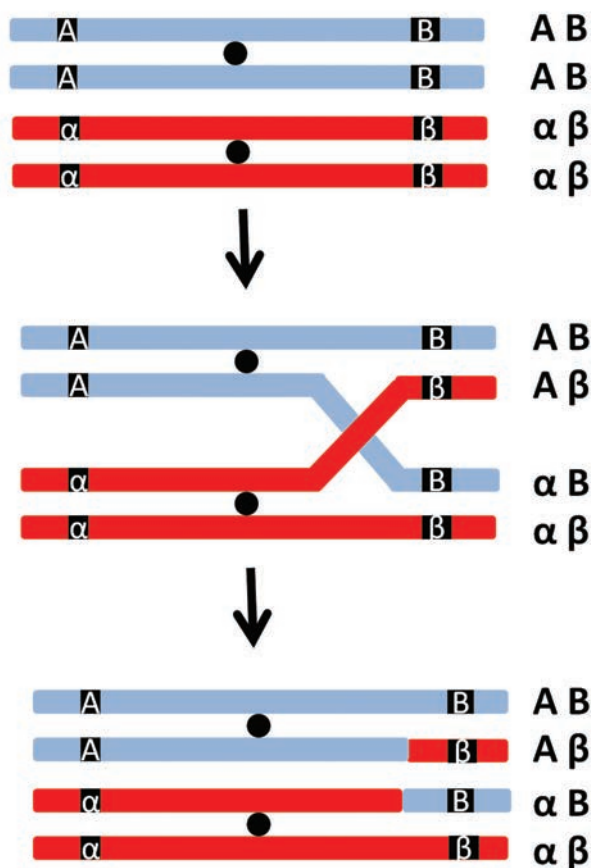
Ας υποθέσουμε ότι ένας χαρακτήρας ελέγχεται από τα αλληλόμορφα Α (κυρίαρχο) και α (υποτελής) σε μια θέση Α/α και ένας άλλος χαρακτήρας ελέγχεται από τα αλληλόμορφα Β (κυρίαρχο) και β (υποτελής) σε μια ξεχωριστή θέση Β/β. Τότε ένα διπλοειδές ομοζύγωτο άτομο με κυρίαρχα γονίδια και στις δυο θέσεις και γενότυπο ΑΑΒΒ θα έχει μόνο γαμέτες Α για τη μία θέση και μόνο Β για την άλλη, ενώ ένα διπλοειδές ομοζύγωτο άτομο με υποτελή γονίδια και στις δυο θέσεις με γενότυπο ααββ θα έχει γαμέτες α και β, αντίστοιχα. Ένα ετεροζύγωτο άτομο για την θέση Α/α θα έχει γενότυπο Αα και θα δώσει γαμέτες που εξαιτίας του διαχωρισμού των αλληλομόρφων στην μείωση, οι μισοί θα είναι Α και οι άλλοι μισοί α. Παρόμοια αν το ίδιο άτομο είναι ετεροζύγωτο και για την άλλη θέση τότε οι γαμέτες του θα είναι μισοί-μισοί Β και β αντίστοιχα. Αν διασταυρώσουμε ένα ομοζύγωτο άτομο με κυρίαρχα γονίδια και στις δυο θέσεις (Γ1: ΑΑΒΒ) με ένα ομοζύγωτο άτομο με υποτελή γονίδια και στις δυο θέσεις (Γ2: ααββ) οι απόγονοι (F1) θα έχουν γενότυπο ΑαΒβ καθώς ο Γ1 έχει μόνο γαμέτες ΑΒ και ο Γ2 μόνο αβ. Στη συνέχεια κάνουμε την **διασταύρωση ελέγχου** ή **κριτική διασταύρωση** της F1 με τον διπλά υποτελή γονέα Γ2: (F1)ΑαΒβ x (Γ2)ααββ

Ο γονέας F1 εξαιτίας του διαχωρισμού των αλληλομόρφων στη μείωση θα δώσει γαμέτες 4 ειδών (ΑΒ, Αβ, αΒ, αβ) ενώ ο Γ2 μόνο ενός είδους (αβ). Ο φαινότυπος των απογόνων της κριτικής διασταύρωσης θα φανερώνει τον φαινότυπο των γαμετών.

Γαμέτες	Γενότυπος	Φαινότυπος
ΑΒ αβ	ΑαΒβ	Πατρικός (κυρίαρχος)
Αβ αβ	Ααββ	Ανασυνδυασμένος
αΒ αβ	ααΒβ	Ανασυνδυασμένος
αβ αβ	ααββ	Πατρικός (υποτελής)

Εάν οι θέσεις Α/α και Β/β είναι **ασύνδετες** (δηλαδή βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα) τότε τα διαφορετικά αλληλόμορφα του ετεροζύγωτου ατόμου ΑαΒβ θα υποστούν στη μείωση **ανεξάρτητο διαχωρισμό** και θα δώ-

σουν τους τέσσερεις πιθανούς συνδυασμούς γαμετών AB, Ab, aB, ab σε ίση αναλογία (25%) και οι ανασυνδυασμένοι φαινότυποι θα παρουσιαστούν στο 50% των απογόνων. Στην αντίθετη περίπτωση που οι θέσεις A/a και B/b είναι **συνδεδεμένες** (δηλαδή βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμο) οι ανασυνδυασμοί θα προκύψουν μόνον εφόσον συμβεί **διασκελισμός (crossing-over)** κατά τη μείωση ανάμεσα στις ομόλογες χρωματίδες των δυο διαφορετικών (που προέρχονται από τον καθένα γονέα του ετεροζύγωτου ατόμου) ομόλογων χρωμοσωμάτων και ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων ώστε να σχηματιστούν **νεοσυνδυασμοί** (Εικόνα 38), αλλά κατά κανόνα η συχνότητα των ανασυνδυ-



Εικόνα 38: Γενετικός ανασυνδυασμός που προκύπτει στη μείωση από έναν διασκελισμό μεταξύ μη-αδελφών χρωματίδων που επισημαίνονται με διαφορετικό χρώμα. Ο γενότυπος στα μειωτικά προϊόντα σημειώνεται στα πλάγια. Παρατηρούμε ότι προκύπτουν γαμέτες πατρικού τύπου (AB και αβ) και νεοσυνδυασμοί (Aβ και αB).

ασμένων φαινοτύπων στους απογόνους θα είναι μικρότερη του 50%. Γιατί συμβαίνει αυτό; Επειδή η ανταλλαγή συμβαίνει στο στάδιο της παχυταινίας στη μείωση, όταν τα χρωμοσώματα είναι διπλασιασμένα, αλλά παίρνουν μέρος μόνο δυο από τις τέσσερις χρωματίδες των ομολόγων χρωμοσωμάτων που προέρχονται μία από τον κάθε γονέα του ατόμου. Έτσι το μέγιστο ποσοστό ανταλλαγής των συνδεδεμένων γονιδίων μπορεί να φτάσει θεωρητικά το 50% και μόνον στην περίπτωση που τα συνδεδεμένα γονίδια είναι αρκετά μακριά (π.χ. στα άκρα του χρωμοσώμου) έτσι ώστε να υπάρχει τουλάχιστον ένας διασκελισμός ή χιάσμα ανάμεσά τους. Το ποσοστό αυτό μειώνεται όταν τα γονίδια είναι κοντά και οι πιθανότητες σχηματισμού χιάσματος ανάμεσά τους είναι μικρότερες. Το ποσοστό των ανασυνδυασμένων φαινοτύπων σε μια κριτική διασταύρωση είναι ένα μέτρο της συχνότητας σχηματισμού χιασμάτων και ανασυνδυασμένων γαμετών.

Αυτό αποτελεί μια εκτίμηση της απόστασης δύο γονιδίων πάνω σε ένα χρωμόσωμο, με την προϋπόθεση ότι η πιθανότητα σχηματισμού χιάσματος είναι ανάλογη της απόστασης δυο θέσεων.

Γενετική χαρτογράφηση

Η συχνότητα ανασυνδυασμού για ένα ζευγάρι συνδεδεμένων γονιδίων σε ένα διασπώμενο πληθυσμό διασταύρωσης ελέγχου βρίσκεται με τον τύπο:

$$\text{Συχνότητα ανασυνδυασμού} = \frac{\text{αριθμός ανασυνδυασμένων ατόμων}}{\text{αριθμός απογόνων διασταύρωσης ελέγχου}} \times 100$$

Η συχνότητα ανασυνδυασμού χρησιμοποιείται σαν εκτίμηση της απόστασης των δύο γονιδίων με τη μορφή χαρτογραφικών μονάδων, όπου μία **χαρτογραφική μονάδα** (1 mu, map unit) ορίζεται ως η απόσταση μέσα στην οποία συμβαίνει ανταλλαγή με συχνότητα 1%. Οι χαρτογραφικές μονάδες ονομάζονται και **centimorgan (cM)** προς τιμήν του γενετιστή Thomas Hunt Morgan που στο εργαστήριό του επινοήθηκε από τον φοιτητή του Alfred Sturtevant, αυτή η μέθοδος χαρτογράφησης. Η χαρτογράφηση γονιδίων με βάση τις συχνότητες ανασυνδυασμού ονομάζεται **γενετική χαρτογράφηση** και τα γονίδια απεικονίζονται σαν σημεία πάνω στα χρωμοσώματα σε καθορισμένη σειρά και θέση. Η απεικόνιση αυτή αποτελεί το **γενετικό χάρτη σύνδεσης** ενός οργανισμού. Οι αποστάσεις των γονιδίων σε έναν χάρτη σύνδεσης που εκτιμώνται με αυτόν τον τρόπο μπορεί να μην είναι πάντα ακριβείς. Αυτό συμβαίνει επειδή ανάμεσα σε συνδεδεμένα γονίδια μπορεί να συμβούν περισσότεροι του ενός διασκελισμοί. Όταν συμβαίνει μόνο ένας

απλός διασκελισμός υπάρχει μια άμεση γραμμική συσχέτιση της χαρτογραφικής απόστασης και της συχνότητας ανασυνδυασμού. Στην πράξη όμως αυτό συμβαίνει για στενά συνδεδεμένα γονίδια και αποστάσεις που βασίζονται σε συχνότητες ανασυνδυασμού μικρότερες του 7%. Όταν η απόσταση είναι μεγαλύτερη η πιθανότητα περισσότερων του ενός διασκελισμών αυξάνεται και η σχέση χαρτογραφικής απόστασης και συχνότητας ανασυνδυασμού δεν είναι πλέον γραμμική. Όταν ανάμεσα στα δυο γονίδια που χαρτογραφούνται συμβούν διασκελισμοί ζυγού αριθμού ο ανασυνδυασμός αναιρείται ενώ όταν συμβούν διασκελισμοί μονού αριθμού τότε ο ανασυνδυασμός διατηρείται. Για το λόγο αυτό η απόσταση που υπολογίζεται για τα ακραία γονίδια μιας σειράς τριών γονιδίων μπορεί να είναι διαφορετική από το άθροισμα των αποστάσεων των ακραίων με το μεσαίο γονίδιο. Για την κατασκευή γενετικών χαρτών μεγάλης ακριβείας χρειάζεται ταυτόχρονη χαρτογράφηση μεγάλου αριθμού γονιδιακών θέσεων ώστε η απόσταση γειτονικών θέσεων να είναι μικρότερη των 7 mu. Επίσης πρέπει να συνεκτιμηθεί ότι πολλές φορές οι διασκελισμοί δεν συμβαίνουν με την ίδια συχνότητα παντού αλλά εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές των χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα οι θέσεις των γονιδίων πάνω στο γενετικό χάρτη να μην αντικατοπτρίζουν τις πραγματικές αποστάσεις των γονιδίων.

Φυσική χαρτογράφηση

Ένας εναλλακτικός τρόπος χαρτογράφησης χωρίς την μεσολάβηση διασταυρώσεων και υπολογισμού ανασυνδυασμένων γενότυπων είναι η χρήση μοριακών εργαλείων για τον εντοπισμό των γονιδίων και της απόστασής τους στα χρωμοσώματα ενός οργανισμού. Αυτή η διαδικασία **φυσικής χαρτογράφησης** έγινε δυνατή μόνο με χρήση προηγμένων μεθόδων της μοριακής βιολογίας καθώς η απόσταση μεταξύ δύο γονιδίων υπολογίζεται από την πραγματική ή φυσική αλληλουχία βάσεων που χωρίζει τα δυο γονίδια και εκφράζεται σε αριθμό ζευγών βάσεων (bp, base pairs). Στη φυσική χαρτογράφηση χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις, χωρίς να αποκλείεται η συνδυασμένη χρήση διαφορετικών προσεγγίσεων. Στην πιο κοινή προσέγγιση αρχικά κατασκευάζονται βιβλιοθήκες του γονιδιώματος ενός οργανισμού σε τεχνητά χρωμοσώματα βακτηρίων (BAC) ή ζύμης (YAC) για να ενσωματωθούν μεγάλα τμήματα DNA. Κάθε κλώνος στις βιβλιοθήκες αυτές χαρακτηρίζεται με κοπή με περιοριστικά ένζυμα και αναλύεται για εντοπισμό μοναδικών θέσεων που δεν βρίσκονται κάπου αλλού στο γονιδίωμα. Αυτές οι θέσεις που ονομάζονται και θέσεις επισημασμένες με μια αλληλουχία (STS, Sequence-Tagged Sites) χρησιμεύουν

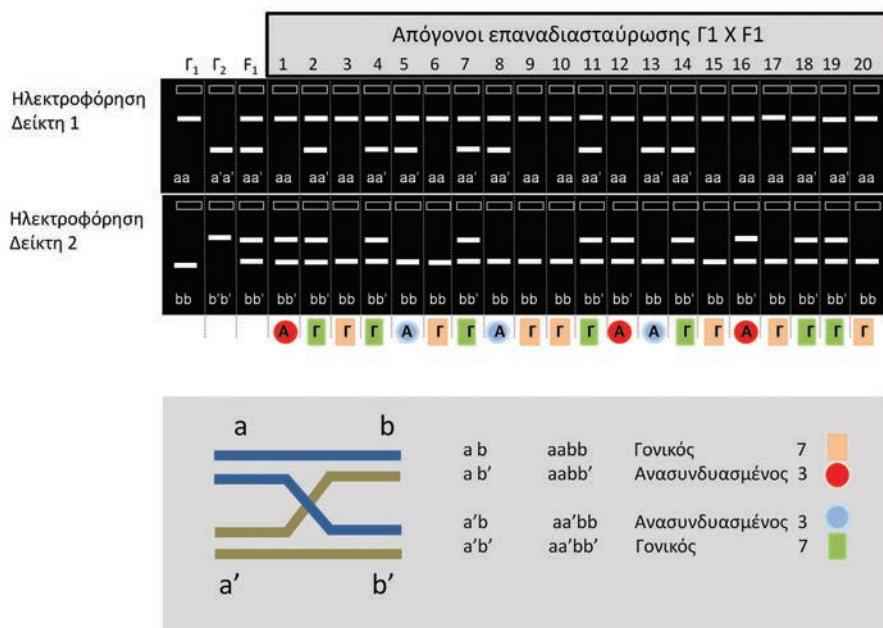
σαν εξειδικευμένα ορόσημα (landmarks) για τον κάθε κλώνο. Τέλος γίνεται μια κατάταξη των γειτονικών κλώνων με ανάλυση των επικαλύψεών τους ώστε να κατανέμονται στα διαφορετικά χρωμοσώματα. Σε περιπτώσεις που είναι δύσκολη η αντιστοίχιση κάποιου κλώνου με ένα χρωμόσωμο μπορεί να χρησιμοποιηθούν τεχνικές υβριδισμού του κλώνου με το χρωμόσωμο και ανίχνευσής του *in situ*. Κατόπιν σε κάθε κλώνο εντοπίζονται θέσεις μοριακών δεικτών που πιθανόν να είναι γνωστοί για κάποιο οργανισμό ώστε να χρησιμεύσουν σαν άγκυρες που θα συνδέσουν τον φυσικό με το γενετικό χάρτη. Επίσης κάθε κλώνος μπορεί να χρησιμεύσει για σκοπούς αλληλούχισης και η ύπαρξη ενός φυσικού χάρτη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση αυτή. Όπως γίνεται αντιληπτό οι φυσικοί χάρτες εξελίχθηκαν από μια κατάταξη κλώνων τμημάτων DNA σε συγκεκριμένη φυσική σειρά (που μπορεί να χρησιμοποιηθούν μόνο από ερευνητές που έχουν το ίδιο σύνολο κλώνων) σε ένα σύνολο από ορόσημα των χρωμοσωμάτων που βασίζονται σε μοναδικές αλληλουχίες (και μπορεί να μοιράζονται ερευνητές σε όλον τον κόσμο).

Η πιο εξελιγμένη μορφή χάρτη εμπεριέχει την αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος, αλλά δεν περιορίζεται στην απλή γνώση της σειράς των βάσεων μιας αλληλουχίας. Ένας ολοκληρωμένος φυσικός/γενετικός χάρτης ενός αλληλουχημένου γονιδιώματος αποτελείται από την επεξεργασμένη πλήρη αλληλουχία ενός οργανισμού όπου εκτός από τη σειρά των βάσεων του DNA έχουν ενσωματωθεί πληροφορίες για την θέση γονιδίων, μοριακών δεικτών, άλλων συστατικών του γονιδιώματος όπως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, μεταθετά στοιχεία κ.ο.κ.

Γενετικοί χάρτες υψηλής πυκνότητας με χρήση μοριακών δεικτών

Η εύρεση της απόστασης δυο γονιδίων είναι η απλούστερη μορφή χαρτογράφησης που μπορεί να συμβεί. Ωστόσο, η κατασκευή ενός γενετικού χάρτη με βάση χαρτογράφηση ζευγαριών γονιδίων μορφολογικών χαρακτήρων δεν είναι αποτελεσματική ιδιαίτερα για μεγάλα γονιδιώματα. Χρειάζεται λοιπόν η χρήση πιο πολύπλοκων μεθόδων μαζικής χαρτογράφησης χιλιάδων θέσεων για πυκνή κάλυψη ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Τέτοιες μέθοδοι που στηρίζονται στη χρήση μοριακών δεικτών για την ταυτόχρονη χαρτογράφηση χιλιάδων θέσεων έχουν επινοηθεί και εφαρμόστηκαν στην κατασκευή πυκνών ή κορεσμένων γενετικών χαρτών σε πολλούς οργανισμούς. Στην πράξη οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στην ίδια αρχή που περιγράψαμε για ένα ζευγάρι αλληλομόρφων γονιδίων με τον υπολογισμό της συχνότητας ανασυνδυασμού, μόνο που εδώ εμπλέκονται εκατοντάδες ή και χιλιάδες

γενετικοί τόποι ενώ τα αλληλόμορφα καθορίζονται με τη χρήση μεθόδων ανίχνευσής τους με μοριακές τεχνικές. Επίσης χρειάζεται ένας πληθυσμός χαρτογράφησης όπου οι γονείς θα έχουν όσο το δυνατό μεγαλύτερο πολυμορφισμό στις θέσεις των μοριακών δεικτών. Τέτοιοι πληθυσμοί μπορεί να είναι F2 που προέρχεται από διασταύρωση γενετικά ανόμοιων γονέων ή μια σειρά από ανασυνδυασμένες καθαρές σειρές. Κάθε θέση ανιχνεύεται με τον κατάλληλο μοριακό δείκτη και τα αποτελέσματα των γονικών τύπων και των ανασυνδυασμένων τύπων υπολογίζονται για κάθε ζευγάρι δεικτών που μπορεί να σχηματιστεί (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Χαρτογράφηση με χρήση δεικτών SSR και μεθοδολογία επαναδιασταύρωσης. Ο πληθυσμός χαρτογράφησης αποτελείται από τους γονείς (Γ1, Γ2), την F1 και τους 20 απογόνους επαναδιασταύρωσης. Τα αλληλόμορφα SSR δύο διαφορετικών θέσεων αναγνωρίζονται με ηλεκτροφόρηση με βάση τη διαφορετική κινητικότητα σε πηκτή αгарόξης και τα προϊόντα ανασυνδυασμών είναι γενότυποι που έχουν τρεις ζώνες συνολικά και στις δυο ηλεκτροφορήσεις. Όλοι οι γενότυποι επισημαίνονται στο κάτω μέρος της κάθε γραμμής ηλεκτροφόρησης. Το κάτω μέρος της Εικόνας δείχνει τον τρόπο δημιουργίας ανασυνδυασμών με διασκελισμό και τους γενότυπους που προκύπτουν. Από τον αριθμό ανασυνδυασμένων γενότυπων υπολογίζεται η συχνότητα ανασυνδυασμού στο 30% (6 ανασυνδυασμοί στους 20 απογόνους της επαναδιασταύρωσης). Αυτό σημαίνει ότι τα δυο γονίδια είναι συνδεδεμένα και έχουν απόσταση 30 cM.

Όπως είναι αντιληπτό, όταν αναλύονται εκατοντάδες μοριακοί δείκτες η ανάλυση είναι επίπονη εργασία και για το λόγο αυτό υπάρχουν ειδικά λογισμικά που αναλύουν τις συχνότητες ανασυνδυασμού όλων των δεικτών ανά δύο ή σε μικρότερες ή μεγαλύτερες ομάδες και κατασκευάζουν το χάρτη. Ένα παράδειγμα είναι το MAPMAKER που χρησιμοποιείται ευρύτατα (5.386 αναφορές στη βάση δεδομένων SCOPUS το Δεκέμβριο του 2010) από το 1987 που διατέθηκε στην επιστημονική κοινότητα. Με τις τεχνικές της γενετικής και της φυσικής χαρτογράφησης, καθώς και με την ολοκλήρωση ή εξέλιξη προγραμμάτων αλληλούχισης, έχουν κατασκευαστεί κορεσμένοι γενετικοί χάρτες σε πολλά φυτικά είδη και η πληροφορία είναι διαθέσιμη στους ερευνητές και τους βελτιωτές στο διαδίκτυο. Για παράδειγμα ένας τέτοιος γενετικός χάρτης του καλαμποκιού με τη θέση 5.829 δεικτών που βασίζονται σε γονίδια είναι διαθέσιμος στη διεύθυνση <http://maize-mapping.plantgenomics.iastate.edu/method.html> (επιβεβαιωμένη διεύθυνση το Δεκέμβριο του 2010).

Βέβαια η πιο ολοκληρωμένη πληροφορία για τη δομή και την οργάνωση ενός γονιδιώματος αποκτάται με την πλήρη αλληλούχισή του και καθώς όλο και περισσότεροι οργανισμοί αλληλουχούνται σχετικά εύκολα στις μέρες μας, η κατασκευή ενός γενετικού χάρτη φαίνεται σε πρώτη ματιά περιττή. Ωστόσο, η ύπαρξη ενός γενετικού χάρτη μπορεί να βοηθήσει την αλληλούχιση ενός γονιδιώματος. Εάν γίνεται τυχαία αλληλούχιση κλώνων από μια βιβλιοθήκη BAC (όπως για παράδειγμα ήταν μια από τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος) τότε η γνώση της σειράς των κλώνων στα χρωμοσώματα κάνει πιο εύκολο τον προσδιορισμό της θέσης των αλληλουχιών που διαβάζονται. Ένας δεύτερος λόγος είναι ότι ακόμη και μετά την αλληλούχιση, η απλή γνώση της σειράς των βάσεων στο DNA ενός οργανισμού δεν βοηθά στην κατανόηση της λειτουργίας του γονιδιώματος. Τα ορόσημα με τη μορφή πληροφορίας για τη θέση των γονιδίων, μοριακών δεικτών, μοναδικών αλληλουχιών, μεταθετών στοιχείων και των άλλων χαρακτηριστικών του γενετικού υλικού που είναι στοιχεία του γενετικού/φυσικού χάρτη είναι αυτά που βοηθούν στην διάδοση της πληροφορίας και την κατανόηση της δομής και της λειτουργίας του γονιδιώματος του οργανισμού.

Χαρτογράφηση θέσεων ποσοτικών χαρακτήρων (QTL mapping)

Η κατασκευή ενός κορεσμένου γενετικού χάρτη και η αναγνώριση της θέσης γενετικών δεικτών που καλύπτουν πυκνά τα χρωμοσώματα ενός οργανισμού είναι μια επίπονη προσπάθεια αλλά αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στα χέρια του μοριακού βελτιωτή. Μια από τις σημαντικές χρήσεις των γενετικών

χαρτών είναι η χαρτογράφηση θέσεων ποσοτικών χαρακτήρων. Με τον όρο **ποσοτικός χαρακτήρας** υποδηλώνεται ένα χαρακτηριστικό που παρουσιάζει συνεχή παραλλακτικότητα και συνήθως ελέγχεται από μεγάλο αριθμό γονιδίων που είναι γνωστά σαν **πολυγονίδια** ή **θέσεις ποσοτικών χαρακτήρων** – που θα συντομογραφούμε **QTL** από τα αρχικά του όρου Quantitative Trait Locus στην αγγλική. Οι θέσεις QTL είναι γενετικοί παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για ένα σημαντικό ποσοστό της παρατηρούμενης φαινοτυπικής παραλλακτικότητας ενός ποσοτικού γνώρισματος. Το QTL είναι παρόμοιο με το γονίδιο με τη μόνη διαφορά ότι είναι μέρος μιας ευρύτερης περιοχής του χρωμοσώμου που επισημαίνεται από ένα δείκτη και μπορεί να περιέχει περισσότερα του ενός γονίδια. Η χαρτογράφηση QTL συνεπάγεται την ανάλυση της συσχέτισης της τιμής ενός παρατηρούμενου γνώρισματος με τη παρουσία ή απουσία ενός αλληλόμορφου κάποιου δείκτη που έχει προηγουμένως χαρτογραφηθεί (είναι γνωστή η θέση του σ' ένα γενετικό χάρτη σύνδεσης). Όταν η συσχέτιση αυτή είναι σημαντική, δηλαδή όταν το συγκεκριμένο αλληλόμορφο του δείκτη παρουσιάζεται πιο συχνά σε άτομα που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή του ποσοτικού χαρακτηριστικού, τότε ο δείκτης αυτός θεωρείται ότι αναγνωρίζει μια περιοχή που ελέγχει το συγκεκριμένο ποσοτικό γνώρισμα ή με άλλα λόγια είναι ένας δείκτης συνδεδεμένος με μια περιοχή QTL. Το σημαντικό για τη βελτίωση των φυτών είναι ότι με τον καθορισμό του αλληλομόρφου του δείκτη QTL που συσχετίζεται με την επιθυμητή τιμή του ποσοτικού γνώρισματος, μπορούν να αναγνωρίζονται τα φυτά που διαθέτουν τον επιθυμητό ποσοτικό χαρακτήρα με βάση το γενότυπο αντί το φαινότυπο.

Οι θέσεις QTL έχουν χρησιμοποιηθεί για μεγάλο διάστημα από τους βελτιωτές σαν στατιστικές παράμετροι για να εξηγήσουν την συμπεριφορά των χαρακτήρων, αλλά με την χρήση των μοριακών δεικτών έχουν αποκτήσει μοριακή οντότητα αφού απομονώνονται και κλωνοποιούνται σαν τμήματα DNA, αλληλουχούνται και αναλύονται για την διευκρίνιση της φύσης και των ιδιοτήτων τους. Στη πορεία μένει ακόμα να γίνει κατανοητό αν είναι δομικά ή ρυθμιστικά γονίδια, ποια είναι η ακριβής φύση της παραλλακτικότητάς τους, ποια είναι η ακριβής γονιδιωματική τους θέση και ποιες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ QTL που έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη βελτίωση των φυτών.

Η χαρτογράφηση QTL έχει κύριο στόχο την αναγνώριση περιοχών του γονιδιώματος που ελέγχουν τον ποσοτικό χαρακτήρα που μας ενδιαφέρει. Επιπρόσθετα η ανάλυση έχει στόχο να διευκρινίσει **α)** τι ποσοστό της παραλλακτικότητας του γνώρισματος οφείλεται στο συγκεκριμένο QTL; **β)** ποιο αλληλόμορφο του δείκτη σχετίζεται με το επιθυμητό αποτέλεσμα; **γ)** ποια είναι η δράση του γονιδίου που σχετίζεται με το γνώρισμα (κυρίαρχη

ή αθροιστική). Η βασική προσέγγιση για τη χαρτογράφηση των QTL είναι η ανάλυση της συσχέτισης της γενετικής παραλλακτικότητας ενός ποσοτικού χαρακτηριστικού με την παραλλακτικότητα μιας γονιδιωματικής περιοχής που αναγνωρίζεται από έναν μοριακό δείκτη. Όμως αυτό δεν είναι εύκολο. Όπως είδαμε παραπάνω, η χαρτογράφηση θέσεων απλών Μενδελικών (ή αλλιώς ποιοτικών) χαρακτηριστικών γίνεται με την εύρεση της απόστασής τους από την τιμή της συχνότητας ανασυνδυασμού, καθώς υπάρχει μια πλήρης αντιστοιχία του γενότυπου με τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Στην περίπτωση των ποσοτικών χαρακτήρων, όμως, ο φαινότυπος είναι το αποτέλεσμα της δράσης πολλών γονιδίων και επιπρόσθετα των επιδράσεων του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει μια πλήρης αντιστοιχία του φαινότυπου με το γενότυπο. Συνεπώς η φαινοτυπική παραλλακτικότητα του ποσοτικού γνωρίσματος αντιστοιχεί μόνο μερικά στη γενοτυπική παραλλακτικότητα και χρειάζεται η χρήση επιπρόσθετων **στατιστικών εργαλείων** για την εκτίμηση των επιπτώσεων του γενότυπου στη σχέση κάθε συνδυασμού δείκτη-QTL. Η επιτυχία της αναγνώρισης δεικτών που επισημαίνουν QTL εξαρτάται από τρεις σημαντικές παραμέτρους: **1.** την όσο το δυνατό ακριβέστερη μέτρηση του φαινότυπου; **2.** την ύπαρξη κορεσμένου γενετικού χάρτη και πολυμορφικών δεικτών, και **3.** τη γενετική δομή του πληθυσμού χαρτογράφησης.

Η ακρίβεια στην καταγραφή του φαινότυπου αποσκοπεί στην ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων του περιβάλλοντος και στην όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αιτιώδη σχέση γενότυπου και φαινότυπου. Η δυνατότητα αναγνώρισης QTL εξαρτάται σημαντικά από τη δομή του πληθυσμού χαρτογράφησης. Οι πληθυσμοί που χρησιμοποιούνται πιο συχνά από τους βελτιωτές προέρχονται από διασταύρωση δυο καθαρών σειρών που έχουν σημαντική παραλλακτικότητα για τους δείκτες που θα χρησιμοποιηθούν. Από τις διασταυρώσεις αυτές προκύπτει μια F1 που μπορεί να αυτογονιμοποιηθεί για να δώσει έναν διασπώμενο F2 πληθυσμό, να γίνουν επαναδιασταυρώσεις ή να δημιουργηθούν ανασυνδυασμένες καθαρές σειρές. Επειδή απαιτείται ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) μεταξύ του δείκτη και του γονιδίου (QTL) που ελέγχει τον χαρακτήρα, οι F2 πληθυσμοί όπου παρατηρείται η ισχυρότερη ανισορροπία σύνδεσης είναι τα πιο κατάλληλα υλικά για χαρτογράφηση QTL. Δυο είναι οι βασικοί τύποι ανάλυσης για τον καθορισμό της σχέσης μεταξύ των γενότυπων των δεικτών και της μέσης τιμής των χαρακτήρων τους: η **ανάλυση μονού δείκτη (single marker analysis)** και η **χαρτογράφηση μεσοδιαστημάτων (interval mapping)**. Στην ανάλυση μονού δείκτη οι γενότυποι κάθε δείκτη κατατάσσονται σε γενοτυπικές κλάσεις και συγκρίνονται οι τιμές του χαρακτήρα μεταξύ των κλάσεων με στατιστική ανάλυση που μπορεί

να είναι απλό t-test, ANOVA, γραμμική συσχέτιση και εκτίμηση της μέγιστης πιθανότητας. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ απλή στην εφαρμογή αλλά έχει σημαντικά μειονεκτήματα καθώς η δύναμη της αναγνώρισης μειώνεται όσο αυξάνεται η απόσταση του δείκτη από το QTL, δεν αναγνωρίζεται αν ο δείκτης αφορά ένα ή περισσότερα QTL, και δεν καθορίζεται από ποια πλευρά του δείκτη είναι το QTL. Η μέθοδος της χαρτογράφησης μεσοδιαστημάτων βασίζεται στην υπόθεση ότι κάθε QTL βρίσκεται ανάμεσα σε δυο συνδεδεμένους δείκτες. Ο γενότυπος για κάθε θέση-στόχο (το μεσοδιάστημα) ελέγχεται για το βαθμό συσχέτισής του με τον υπό έλεγχο χαρακτήρα με ανάλυση πολλών σημείων μεταξύ ζευγαριών γειτονικών δεικτών. Η παρουσία ενός υποθετικού QTL καθορίζεται όταν μια τιμή LOD (log of odds) ξεπερνά ένα κατώφλι. Η στατιστική ανάλυση διευκολύνεται με ένα κατάλληλο λογισμικό χαρτογράφησης QTL. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι αδυνατεί να συμπεριλάβει την εκτίμηση της επίπτωσης θέσεων άλλων QTL. Για το λόγο αυτό έχουν προταθεί μέθοδοι για ταυτόχρονη χαρτογράφηση πολλαπλών QTL όπως η σύνθετη χαρτογράφηση μεσοδιαστημάτων (composite interval mapping) και η χαρτογράφηση πολλαπλών μεσοδιαστημάτων (multiple interval mapping).

Χαρτογράφηση συσχετίσεων (Association mapping)

Η γενετική συσχέτιση (genetic association) είναι η εμφάνιση, **ταυτόχρονα**, σε έναν πληθυσμό, δύο ή περισσότερων χαρακτηριστικών **πιο συχνά** απ' ό τι αναμένεται τυχαία. Αυτό μπορεί να αφορά φαινότυπους (π.χ. χρώμα άνθους – ύψος φυτού), φαινότυπο και γενετικό πολυμορφισμό (π.χ. μέγεθος σπόρου – ένα SNP), ή δύο γενετικούς πολυμορφισμούς. Συσχέτιση μεταξύ δύο γενετικών πολυμορφισμών μπορεί να υπάρχει όταν τα αλληλόμορφα τους βρίσκονται σε κοντινή θέση πάνω στο ίδιο χρωμόσωμο, είναι δηλαδή σε κατάσταση γενετικής σύνδεσης (genetic linkage). Μια άλλη μορφή γενετικής συσχέτισης που ονομάζεται ανισορροπία σύνδεσης αφορά αλληλόμορφα σε δύο ή περισσότερες θέσεις που δεν βρίσκονται αναγκαστικά στο ίδιο χρωμόσωμο αλλά έχουν μια μη-τυχαία σχέση μεταξύ τους. Αυτή η συσχέτιση δεν είναι ίδια με τη σύνδεση, αλλά περιγράφει μια κατάσταση στην οποία ορισμένοι συνδυασμοί μεταξύ κάποιων αλληλόμορφων ή γενετικών δεικτών προκύπτουν λιγότερο ή περισσότερο συχνά σε έναν πληθυσμό, από ό, τι αναμένεται από έναν τυχαίο σχηματισμό απλοτύπων με βάση τις συχνότητες των αλληλομόρφων τους. Συχνά η διάκριση των εννοιών της γενετικής σύνδεσης και της ανισορροπίας σύνδεσης προκαλεί σύγχυση επειδή η στενή σύνδεση μπορεί να προκαλέσει υψηλά επίπεδα ανισορροπίας σύνδεσης. Έτσι αν δυο

μεταλλάξεις κάποιων τυχαίων βάσεων συμβούν σε απόσταση μερικών νουκλεοτιδίων μεταξύ τους, θα υπόκεινται με την πάροδο του χρόνου στην ίδια πίεση επιλογής (selection) και εκτροπής (drift). Καθώς ο ανασυνδυασμός μεταξύ δυο γειτονικών βάσεων είναι πολύ σπάνιος, η παρουσία αυτών των δύο SNP θα παρουσιάζει υψηλή συσχέτιση και η στενή τους σύνδεση θα προκαλεί μεγάλη ανισορροπία σύνδεσης. Αντίθετα SNP σε διαφορετικά χρωμοσώματα εξαιτίας του ανεξάρτητου διαχωρισμού θα παρουσιάζουν μικρή συσχέτιση ή επίπεδο ανισορροπίας σύνδεσης.

Μελέτες γενετικής συσχέτισης γίνονται για να εξακριβωθεί εάν μια γενετική παραλλαγή συσχετίζεται με μια ασθένεια ή ένα γνώρισμα: εάν υπάρχει συσχέτιση, ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο, γενότυπος ή απλότυπος ενός πολυμορφισμού ή πολυμορφισμών, θα εμφανίζεται πιο συχνά από ό, τι αναμένεται τυχαία σε αυτά τα άτομα που έχουν το γνώρισμα. Έτσι όταν η μεταβίβαση ενός αλληλομόρφου (π.χ. Α από τη θέση Α/α) συμβαίνει ταυτόχρονα με τη μεταβίβαση ενός άλλου αλληλομόρφου (π.χ. β της θέσης Β/β) σε άτομα που εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (π.χ. προδιάθεση για κάποια ασθένεια) τότε τα αλληλόμορφα Α και β βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης και σε γενετική συσχέτιση με το χαρακτηριστικό.

Η χαρτογράφηση συσχετίσεων είναι μια σχετικά νέα προσέγγιση ανάλυσης σύνθετων χαρακτηριστικών που βασίζεται στην καθιέρωση αιτιωδών σχέσεων μεταξύ γενότυπων και φαινότυπων σε φυσικούς ή βελτιωμένους πληθυσμούς. Η χρήση νέων τεχνικών αναλύσεων μεγάλης κλίμακας, που επιτρέπουν σε μια ανάλυση τη γονοτύπιση χιλιάδων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), έχει ενισχύσει την εφαρμογή αυτής της προσέγγισης τόσο στην έρευνα ζωικών όσο και φυτικών οργανισμών. Η μεθοδολογία έλκει την καταγωγή της από την ανθρώπινη γενετική, όπου κυρίως χρησιμοποιείται για την αναγνώριση γονιδίων που σχετίζονται με ασθένειες, αλλά πλέον η γενετική συσχετίσεων χρησιμοποιείται ευρέως στη βελτίωση, ιδίως σε μη-εξημερωμένους οργανισμούς όπως τα δασικά δένδρα. Το κύριο πλεονέκτημα της χαρτογράφησης συσχετίσεων σε σύγκριση με άλλες κοινές προσεγγίσεις (π.χ. χαρτογράφηση QTL) είναι ότι οι πολλές γενιές των ανασυνδυασμών που έλαβαν χώρα σε φυσικούς πληθυσμούς συντέιναν στο να έχει επέλθει μια στενή διασύνδεση των αιτιωδών πολυμορφισμών με γειτονικές γενωμικές περιοχές ώστε να διευκολύνεται ο εντοπισμός των πολυμορφισμών που σχετίζονται με ποσοτικά γνωρίσματα, αποφεύγοντας τα μεγάλα τμήματα συνδεδεμένων γονιδίων που συχνά προκύπτουν σε βελτιωτικούς πληθυσμούς μετά λίγες (2-3) γενιές διασταυρώσεων και δεν είναι εύκολο να ανασυνδυαστούν.

3.4. Βελτίωση με τη χρήση γενετικών δεικτών (Marker Assisted Selection, MAS)

Η ανάπτυξη μοριακών δεικτών με βάση πολυμορφισμούς του DNA άλλαξε ριζικά τους κλάδους της γενετικής και της βελτίωσης των φυτών. Ενώ υπάρχουν πολλές εφαρμογές των μοριακών δεικτών στη βελτίωση, η πιο ελπιδοφόρα για ανάπτυξη νέων ποικιλιών ονομάζεται **επιλογή υποβοηθούμενη από δείκτες** ή απλά **επιλογή με χρήση δεικτών**. Για διευκόλυνση του αναγνώστη θα αναφερόμαστε στη μέθοδο αυτή στο κείμενο με τα αρχικά **MAS** του όρου **Marker Assisted Selection** που χρησιμοποιείται στην αγγλική. Η MAS στηρίζεται στη χρήση των μοριακών δεικτών που είναι στενά συνδεδεμένοι με χρωμοσωμικές θέσεις-στόχους που ελέγχουν τους χαρακτήρες που μας ενδιαφέρει να βελτιώσουμε, για να υποκαταστήσει ή να υποβοηθήσει τη φαινοτυπική επιλογή. Με τον καθορισμό των αλληλόμορφων που επισημαίνουν οι μοριακοί δείκτες, μπορούν να αναγνωρίζονται φυτά που διαθέτουν ιδιαίτερα γονίδια ή **θέσεις ποσοτικών χαρακτήρων (QTL)** με βάση το γενότυπο αντί το φαινότυπο. Στόχος του κεφαλαίου αυτού είναι να αναλυθούν έννοιες της θεωρίας και της πρακτικής της MAS, να περιγραφούν σχήματα MAS στη βελτίωση των φυτών, να αναφερθούν οι τάσεις σχετικά με την τρέχουσα έρευνα στη βελτίωση με MAS και να συζητηθούν προβλήματα σχετικά με την εφαρμογή της MAS στη βελτίωση των φυτών.

3.4.1. Τα πλεονεκτήματα της επιλογής με τη χρήση δεικτών

Η επιλογή με δείκτες μπορεί να αυξήσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα και να συντομεύσει τον απαιτούμενο χρόνο της βελτίωσης σε σύγκριση με τη συμβατική βελτίωση. Τα βασικά πλεονεκτήματα της MAS σε σύγκριση με τη συμβατική φαινοτυπική επιλογή είναι:

1. Απλούστερη σε σύγκριση με τη φαινοτυπική επιλογή
2. Επιλογή μπορεί να πραγματοποιείται σε στάδιο φυταρίου
3. Επιλογή ατομικών φυτών με υψηλή κληρονομικότητα.
4. Αυτοματοποίηση

Τα πλεονεκτήματα αυτά μπορεί να μεταφραστούν σε (1) μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και (2) συντόμευση του χρόνου παραγωγής ποικιλιών στα προγράμματα βελτίωσης. Για παράδειγμα, εξοικονόμηση χρόνου και εργασίας ενδέχεται να προκύψει από την υποκατάσταση της δύσκολης ή χρονοβόρας επιλογής στον αγρό (που πρέπει να πραγματοποιηθεί σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους του έτους ή σε συγκεκριμένες θέσεις ή είναι τεχνικώς περίπλοκη) με επιλογή με μοριακούς δείκτες στο εργαστήριο. Επιπλέον, η επιλογή με βάση

δείκτες DNA μπορεί να είναι πιο αξιόπιστη λόγω της επιρροής των περιβαλλοντικών παραγόντων στις δοκιμές στο χωράφι. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η χρήση μοριακών δεικτών μπορεί να συμφέρει οικονομικά περισσότερο από τον έλεγχο για το γνώρισμα που μας ενδιαφέρει, ιδιαίτερα όταν ο έλεγχος απαιτεί εξειδικευμένες εργαστηριακές αναλύσεις. Ένα άλλο πλεονέκτημα από τη χρήση MAS είναι ότι μπορεί να μειωθεί ο συνολικός αριθμός των γενότυπων που θα πρέπει να δοκιμαστεί στο χωράφι. Δεδομένου ότι πολλοί γενότυποι μπορεί να απορριφθούν σε μια πρώιμη γενεά με τη MAS, είναι δυνατή μια πιο αποτελεσματική σχεδίαση του βελτιωτικού προγράμματος.

Η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της επιλογής για τα επιθυμητά γνωρίσματα μπορεί να επιτρέψει την γρήγορη ενσωμάτωση ορισμένων χαρακτηριστικών, δεδομένου ότι συγκεκριμένοι γενότυποι μπορεί να αναγνωρίζονται και να επιλέγονται πιο εύκολα. Επιπλέον, δείκτες συγκεκριμένου γενετικού υποβάθρου μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν για την επιτάχυνση της ανάκτησης του επαναλαμβανόμενου γονέα κατά τη διάρκεια της επαναδιασταύρωσης.

3.4.2. Σημασία της χαρτογράφησης QTL για MAS

Ο προσδιορισμός των υπεύθυνων γονιδίων και των θέσεων ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs) καθώς και ιχνηθετών (δεικτών) DNA που συνδέονται με αυτά επιτυγχάνεται μέσω πειραμάτων χαρτογράφησης QTL. Η χαρτογράφηση QTL αντιπροσωπεύει έτσι το θεμέλιο της ανάπτυξης δεικτών για MAS. Παλαιότερα, ήταν γενικά αποδεκτό ότι οι δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν άμεσα σε MAS. Ωστόσο, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβεια της χαρτογράφησης QTL όπως το μέγεθος και ο τύπος του πληθυσμού, το επίπεδο της επαναληψιμότητας των φαινοτυπικών δεδομένων, περιβαλλοντικές επιπτώσεις και σφάλματα γενοτυπικής ανάλυσης. Οι παράγοντες αυτοί είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για πιο σύνθετα ποσοτικά γνωρίσματα που συνδέονται με πολλά QTLs που το καθένα έχει σχετικά μικρές επιπτώσεις (π.χ. αντοχή στην ξηρασία, απόδοση). Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει ευρέως αποδεκτό ότι επιβεβαίωση, επικύρωση και επανέλεγχος των δεικτών είναι βήματα που μπορεί να απαιτούνται μετά την χαρτογράφηση των QTL και πριν από την αξιοποίησή τους στην MAS. Αυτά τα βήματα ενδέχεται να περιλαμβάνουν:

Μετατροπή δείκτη: μπορεί να απαιτείται αλλαγή του συστήματος δεικτών (π.χ. SSR αντί για RFLP) ώστε η μέθοδος να είναι τεχνικά απλούστερη για τη MAS ή έτσι ώστε η αξιοπιστία να βελτιώνεται.

Επιβεβαίωση QTL: έλεγχος της ακρίβειας των αποτελεσμάτων από την πρωταρχική χαρτογράφηση QTL

Επικύρωση QTL: αναφέρεται γενικά στην επαλήθευση ότι μια θέση QTL είναι αποτελεσματική σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα

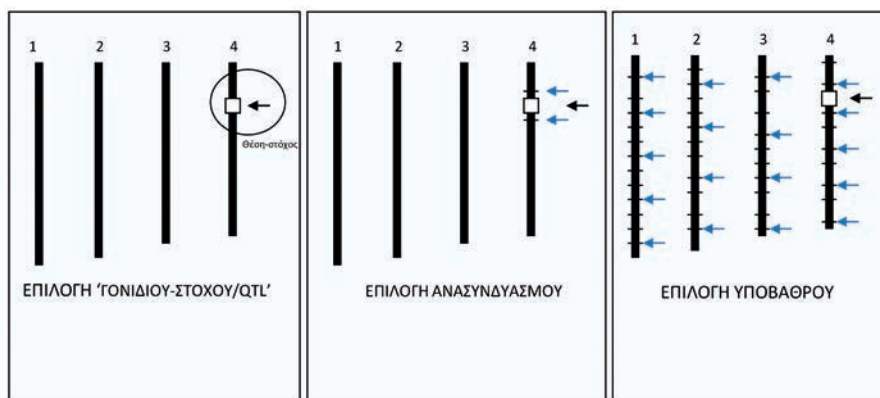
Επικύρωση δείκτη: δοκιμή του επίπεδου πολυμορφισμού περισσότερων στενά συνδεδεμένων δεικτών στην στενή περιοχή (περίπου 5-10 cM) της θέσης που ελέγχει το γνώρισμα και επίσης δοκιμές της αξιοπιστίας των δεικτών στην πρόβλεψη του φαινότυπου.

3.4.3. Σχήματα MAS που εφαρμόζονται στη βελτίωση

Οι μοριακοί δείκτες εφαρμόζονται από τους βελτιωτές σε διάφορα βελτιωτικά σχήματα για να επιταχύνουν τη βελτίωση, να επιβεβαιώσουν ή να αναγνωρίσουν τη γενεαλογία, για να χαρακτηρίσουν γενετικό υλικό και για να εκτιμήσουν τη γενετική παραλλακτικότητα. Τα πιο επιτυχημένα σχήματα αφορούν βελτίωση για απλά χαρακτηριστικά (π.χ. αντοχή σε κάποια ασθένεια) που έχουν σημαντική οικονομική σημασία και η ταχύτητα βελτίωσης αυξάνει το κέρδος. Οι πιο σημαντικές εφαρμογές αφορούν την επαναδιασταύρωση, την ενσωμάτωση πολλαπλών γονιδίων και την πρόωμη επιλογή.

Επαναδιασταύρωση υποβοηθούμενη από δείκτες

Υπάρχουν τρία επίπεδα της επιλογής στα οποία μπορεί να εφαρμοστούν δείκτες στην επαναδιασταύρωση (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Τα τρία επίπεδα επιλογής με χρήση μοριακών δεικτών κατά την επαναδιασταύρωση. Για την επιλογή του στόχου ένας δείκτης είναι αρκετός ενώ για την επιλογή του ανασυνδυασμού χρειάζονται και δυο πλευρικοί δείκτες από τον γονέα που προσφέρει το γενετικό υπόβαθρο (επαναλαμβανόμενος γονέας). Η επιλογή υπόβαθρου απαιτεί πυκνή κάλυψη των χρωμοσωμάτων του επαναλαμβανόμενου γονέα.

Στο πρώτο επίπεδο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείκτες για την επιλογή του γνωρίσματος-στόχου. Αυτό μπορεί να είναι χρήσιμο για γνωρίσματα που απαιτούν διαδικασίες επίπονης φαινοτυπικής επιλογής (π.χ. εργαστηριακός έλεγχος) ή βασίζονται σε υποτελή αλληλόμορφα.

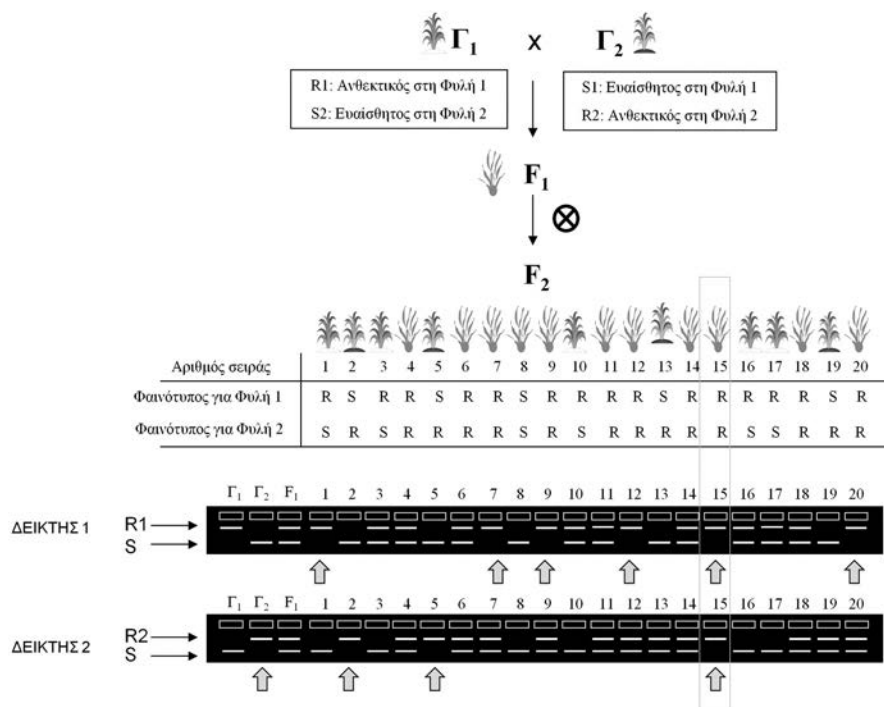
Κατόπιν, το δεύτερο επίπεδο επιλογής περιλαμβάνει την επιλογή απογόνων επαναδιασταύρωσης όπου το γονίδιο-στόχος του δότη και στενά συνδεδεμένοι δείκτες του επαναλαμβανόμενου γονέα επιλέγονται μαζί προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η συμμετοχή στενά συνδεδεμένων ανεπιθύμητων γονιδίων του δότη (linkage drag). Τέλος σε ένα τρίτο επίπεδο συμμετοχής δεικτών στην επαναδιασταύρωση, οι απόγονοι της επαναδιασταύρωσης που ήδη έχουν επιλεγεί για την ενσωμάτωση του γνωρίσματος που μεταφέρουμε από το δότη, επιλέγονται με χρήση δεικτών για το υπόβαθρο του υπόλοιπου γονιδιώματος ώστε να ανήκει στον επαναλαμβανόμενο γονέα. Με άλλα λόγια, χρησιμοποιούνται δείκτες για επιλογή εναντίον του γονιδιώματος του δότη, οπότε μπορεί να επιταχυνθεί η ανάκτηση του γονιδιώματος του επαναλαμβανόμενου γονέα. Με συμβατική επαναδιασταύρωση, απαιτούνται τουλάχιστον πέντε έως έξι γενεές για πλήρη ανάκτηση του επαναλαμβανόμενου γονέα. Δεδομένα από μελέτες προσομοίωσης αλλά και πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τουλάχιστον δύο, αλλά ενδεχομένως τρεις ή ακόμη και τέσσερες γενιές επαναδιασταύρωσης μπορεί να εξοικονομηθούν με τη χρήση δεικτών.

Ενσωμάτωση πολλαπλών γονιδίων (gene stacking or pyramiding)

Η ενσωμάτωση πολλαπλών γονιδίων είναι η διαδικασία ταυτόχρονης επιλογής πολλών γονιδίων/QTLs μαζί σε έναν ενιαίο γενότυπο.

Αυτό είναι δυνατό και μέσω της συμβατικής βελτίωσης, αλλά ιδιαίτερα δύσκολο ή αδύνατο σε πρώιμες γενεές. Με χρήση συμβατικών μεθόδων φαινοτυπικής επιλογής, μεμονωμένα φυτά πρέπει να ελέγχονται φαινοτυπικά για όλα τα γνωρίσματα σε μια δοκιμή. Επομένως, είναι πολύ δύσκολο να αξιολογηθούν φυτά από ορισμένους τύπους πληθυσμού (π.χ. F2 που εξαιτίας της ετεροζυγωτίας μπορεί να καλύπτονται ανεπιθύμητα αλληλόμορφα) ή γνωρίσματα που απαιτούν χρήση μεθόδων καταστροφικών για το φυτό (π.χ. ξερίζωμα). Οι δείκτες DNA μπορεί να διευκολύνουν την επιλογή επειδή δεν απαιτούν καταστροφή του φυτού για δειγματοληψία και δείκτες για πολλαπλά γνωρίσματα μπορεί να δοκιμάζονται ταυτόχρονα χρησιμοποιώντας ένα δείγμα DNA χωρίς ανάγκη ανάλυσης του φαινότυπου. Η πιο διαδεδομένη εφαρμογή δεικτών για ενσωμάτωση πολλών γονιδίων υπήρξε για το συνδυασμό πολλαπλών γονιδίων αντοχής σε μια ασθένεια (π.χ. γονίδια αντοχής σε

διάφορες φυλές ενός μύκητα) σε μια ποικιλία προκειμένου η αντίσταση στην ασθένεια να έχει διάρκεια (Εικόνα 41).

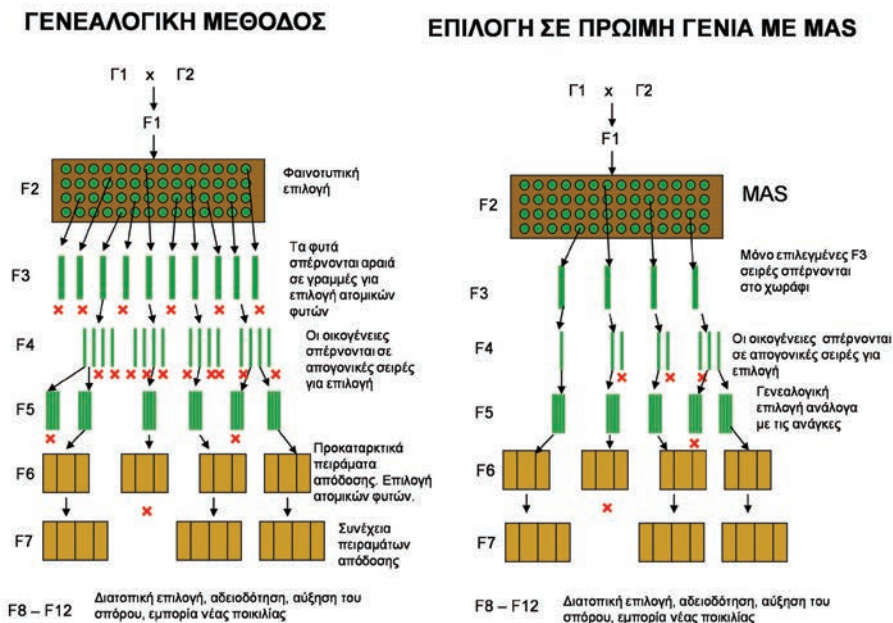


Εικόνα 41: Ταυτόχρονη επιλογή δυο γονιδίων αντίστασης σε ασθένεια με χρήση μοριακών δεικτών. Παρατηρείστε ότι ομοζύγωτοι γενότυποι μπορεί να αναγνωριστούν από την F2 γενεά.

Επιλογή σε πρώιμη γενιά

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης δεικτών στη βελτίωση των φυτών είναι η δυνατότητα επιλογής σε μια πρώιμη γενιά (ιδιαίτερα F2 ή F3).

Το κυριότερο πλεονέκτημα είναι ότι πολλά φυτά με ανεπιθύμητους συνδυασμούς γονιδίων, ειδικά αυτά που στερούνται σημαντικά γονίδια αντοχής σε ασθένειες, μπορούν πολύ εύκολα να απορριφθούν (Εικόνα 42). Αυτό έχει σημαντικές συνέπειες στα μεταγενέστερα στάδια του προγράμματος βελτίωσης επειδή η αξιολόγηση άλλων σημαντικών γνωρισμάτων μπορεί να σχεδιαστεί πιο αποτελεσματικά και φτηνά για λιγότερες σειρές (ιδίως όσον αφορά αυτές που θα δοκιμαστούν στο χωράφι).



Εικόνα 42: Επιλογή σε πρώιμη γενιά με χρήση δεικτών σε σύγκριση με μια γενεαλογική μέθοδο. Παρατηρείστε ότι πολλές σειρές μπορεί να απορριφτούν σε πρώιμη γενιά, γεγονός που επιτρέπει την αξιολόγηση λιγότερων σειρών στις επόμενες γενιές.

3.4.4. Τρέχοντα εμπόδια για την υιοθέτηση της MAS

Παρά τα οφέλη που προκύπτουν από την εφαρμογή της, υπάρχουν σημαντικά εμπόδια για την άμεση υιοθέτηση της MAS στη βελτίωση. Αυτή τη στιγμή, ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια για εφαρμογή της MAS σε δημόσια χρηματοδοτούμενα βελτιωτικά προγράμματα είναι το απαγορευτικά υψηλό κόστος. Μέχρι σήμερα υπάρχει ένας μικρός αριθμός αναφορών σύγκρισης των οικονομικών δεδομένων εφαρμογής της MAS έναντι των μεθόδων συμβατικής βελτίωσης στη βιβλιογραφία, και τα πορίσματα είναι αντιφατικά. Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη δυο σημαντικοί παράγοντες για την ανάλυση του κόστους: **1.** ένα εργαστήριο ανάλυσης μοριακών δεικτών χρειάζεται δαπανηρό εξοπλισμό (που μάλιστα χρειάζεται συχνή ανανέωση με την ανάπτυξη νέων μεθόδων) και ακριβά αναλώσιμα για τη λειτουργία του, και **2.** υπάρχει ένα μεγάλο αρχικό κόστος στην ανάπτυξη των δεικτών που σπανίως αναφέρεται. Για παράδειγμα, η επαναδιασταύρωση με χρήση δεικτών θα ήταν πιο ακριβή σε σύγκριση με το συμβατικό τρόπο βελτίωσης τουλάχιστον βραχυπρόθεσμα. Ωστόσο η εξοικονόμηση χρόνου θα μπορούσε

να οδηγήσει σε μια ποικιλία πολύ πιο γρήγορα, γεγονός που θα μπορούσε να μεταφραστεί σε μεγαλύτερη κέρδη μεσοπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που ακόμη παρεμποδίζει την επιτυχή εφαρμογή μοριακών δεικτών στην ανάπτυξη εξαιρετικών ποικιλιών είναι η χαμηλή αξιοπιστία των δεικτών για την πρόβλεψη του φαινότυπου. Αυτό οφείλεται συχνά στην μικρή αξιοπιστία της πρωτογενούς μελέτης χαρτογράφησης QTL. Ακόμα και QTLs που εντοπίζονται με υψηλή βαθμολογία και εξηγούν ένα μεγάλο ποσοστό της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας, μπορεί να επηρεαστούν από μεροληπτική δειγματοληψία (ιδιαίτερα σε μικρούς πληθυσμούς), και ως εκ τούτου, ενδέχεται να μην είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη MAS. Επιπλέον, η επίδραση μιας θέσης QTL μπορεί να εξαρτηθεί από το γενετικό υπόβαθρο. Έτσι μια θέση που χαρτογραφείται σαν σημαντικό QTL για ένα συγκεκριμένο γνώρισμα σε έναν πληθυσμό που προέρχεται από τη διασταύρωση δυο γονέων, των Α και Β, μπορεί να μην έχει σημαντική επίδραση για το ίδιο γνώρισμα σε έναν πληθυσμό δυο άλλων γονέων Γ και Δ. Αυτό τονίζει τη σημασία των δοκιμών που πρέπει να γίνονται για τις επιπτώσεις των QTL και την επιβεβαίωση της αξιοπιστίας των δεικτών πριν την εφαρμογή τους σε ένα πρόγραμμα βελτίωσης MAS.

Τέλος ένας πολύ σημαντικός παράγοντας αφορά την επιμόρφωση του ανθρώπινου δυναμικού που καλείται να εφαρμόσει τη MAS. Καθώς η μοριακή βελτίωση είναι εξόχως διεπιστημονικός κλάδος, το επίπεδο συνεννόησης μεταξύ μοριακών γενετιστών και βελτιωτών (και επιστημόνων από άλλους κλάδους) που προσπαθούν συλλογικά να εφαρμόσουν τη MAS μπορεί να μην είναι αρκετό ώστε να εξασφαλίζεται η αποτελεσματική εφαρμογή μεθόδων μοριακών δεικτών για την ανάπτυξη νέων ποικιλιών. Αυτό τονίζει τη σημασία που έχουν κατάλληλα σχεδιασμένα μεταπτυχιακά προγράμματα σπουδών για να επιτυγχάνεται ένα σημαντικό επίπεδο γνώσης και κατανόησης των πολλών πεδίων που απαιτούνται για την ολοκληρωμένη εφαρμογή της σύγχρονης μοριακής βελτίωσης από τους νέους επιστήμονες που σκοπεύουν να ασχοληθούν με τη βελτίωση των φυτών.

3.4.5. Το μέλλον της MAS στη βελτίωση

Τα σημαντικά εμπόδια που αναφέρθηκαν έχουν δράσει ανασταλτικά στην εφαρμογή της MAS σε ερευνητικά ιδρύματα του δημόσιου τομέα, όπου η χρηματοδότηση δεν μπορεί να καλύψει τις σημαντικές επενδύσεις που απαιτούνται τόσο για εξοπλισμό, όσο και για προκαταρκτικές μελέτες αναγνώρισης και χαρτογράφησης δεικτών/QTLs. Αυτό δεν αποτελεί εξίσου πρόβλημα στον ιδιωτικό

τομέα και ήδη οι μεγαλύτερες πολυεθνικές εταιρείες που παράγουν βελτιωμένο πολλαπλασιαστικό υλικό έχουν αναγνωρίσει τη σημασία της MAS και έχουν προχωρήσει σε σημαντικές επενδύσεις την τελευταία δεκαετία. Αποτέλεσμα είναι ότι νέες ποικιλίες που προέρχονται από επιλογή στο εργαστήριο με MAS έχουν ήδη κυκλοφορήσει από όλες τις μεγάλες σποροπαραγωγικές εταιρείες για τα σημαντικότερα φυτά μεγάλης καλλιέργειας όπως το καλαμπόκι, η σόγια και το βαμβάκι, ενώ η έρευνα που διεξάγεται στις εταιρείες αυτές παραμένει στην αποκλειστική κυριότητα τους. Η μεγάλη πρόκληση συνεπώς για τους βελτιωτές των δημόσιων ιδρυμάτων και ινστιτούτων 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 του δημόσιου τομέα, ώστε να διασφαλιστεί ο αποτελεσματικός δημόσιος έλεγχος στον κρίσιμο τομέα της επάρκειας τροφίμων, παγκοσμίως. Μέτρα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μια μεγαλύτερης έκτασης εφαρμογή της MAS σε βελτιωτικά ιδρύματα στον δημόσιο τομέα περιλαμβάνουν:

- δημιουργία σύγχρονων εγκαταστάσεων για χρήση δεικτών σε γενοτυπικές αναλύσεις και κατάρτιση του προσωπικού των ινστιτούτων που είναι επιφορτισμένα με τη βελτίωση
- διαθέσιμα δεδομένα (που συνεχώς θα αυξάνονται) σχετικά με γονίδια/QTLs υπεύθυνα για τον έλεγχο χαρακτηριστικών και προσδιορισμός των δεικτών που συνδέονται με αυτά σε όλα τα φυτά
- ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών για τη χρήση δεικτών στην βελτίωση
- εγκατάσταση και χρήση δημόσιων βάσεων δεδομένων για QTL/δείκτες και ανάπτυξη κατάλληλου λογισμικού και βιοπληροφορικών μεθόδων για τη διαχείριση και ανάλυση δεδομένων που προέρχονται από την εφαρμογή τους.
- διαθέσιμοι πόροι για τη δημιουργία νέων δεικτών από δεδομένα αλληλούχισης του γονιδιώματος και έρευνας της λειτουργικής γονιδιωματικής στα καλλιεργούμενα φυτά.

Είναι επίσης κρίσιμο οι μελλοντικές προσπάθειες να βασίζονται σε διδάγματα του παρελθόντος από επιτυχίες και (ιδίως) αποτυχίες χρήσης MAS. Η περαιτέρω βελτιστοποίηση των μεθόδων γενοτυπικής ανάλυσης με δείκτες κυρίως όσον αφορά τη σχέση κόστους/αποτελεσματικότητας και ένα υψηλότερο επίπεδο κατανόησης μεταξύ μοριακών και συμβατικών βελτιωτών (ιδίως στο σχεδιασμό αποτελεσματικών και αποδοτικών στρατηγικών) αντιπροσωπεύουν τις άμεσες προκλήσεις για τη μεγαλύτερη εφαρμογή μεθόδων MAS στη βελτίωση στο εγγύς μέλλον.