

## ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ (αρχές)

1-

Η Γενετική Βελτίωση Φυτών αναφέρεται σε καλλιεργούμενα είδη, αφορά αφενός τη γεωργική δραστηριότητα αφετέρου τον καταναλωτή που γίνεται αποδέκτης των προϊόντων της (άμεσα ή έμμεσα). Αν και αποτελεί βασικό κλάδο της γεωπονικής επιστήμης, σήμερα σημαντική συμβολή μπορεί να έχει ένας μοριακός βιολόγος/γενετιστής.

2

### Η ΕΝΝΟΙΑ & ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

Η βελτίωση φυτών είναι μια εφαρμοσμένη γενετική επιστήμη που αφορά τη βελτίωση σε καλλιεργούμενα είδη κληρονομούμενων γνωρισμάτων με καλλιεργητικό και χρηστικό ενδιαφέρον. Χειρίζεται τη βιοποικιλότητα ενός καλλιεργούμενου είδους με τεχνητή επιλογή παρεμβαίνοντας στη μεταβίβαση των γονιδίων από γενεά σε γενεά, ώστε να καταλήξει σε μεμονωμένους γονοτύπους (μονο-γονοτυπικές ποικιλίες) ή μίγμα γονοτύπων (πολυ-γονοτυπικές ποικιλίες) με επιθυμητά γνωρίσματα

3

Η ποικιλία αποτελώντας την απαρχή σε μια αλυσίδα δραστηριοτήτων, στόχος των βελτιωτών είναι να καταστήσουν με διάφορους τρόπους την εργασία του παραγωγού αλλά και της βιομηχανίας μεταποίησης ευκολότερη και πιο αποτελεσματική, ενώ ταυτόχρονα προσπαθεί να είναι φιλική προς το περιβάλλον. Μπορεί να τροποποιήσουν τη δομή του φυτού για να είναι ανθεκτικό στο πλάγιασμα διευκολύνοντας έτσι τη μηχανική συγκομιδή. Μπορεί να αναπτύξουν φυτά ανθεκτικά σε παθογόνα και εχθρούς έτσι ώστε ο αγρότης να μην χρειάζεται να χρησιμοποιήσει φυτοφάρμακα ή να χρησιμοποιεί μικρότερες ποσότητες τέτοιων χημικών ουσιών. Οι βελτιωτές μπορεί επίσης να αναπτύξουν ποικιλίες υψηλής απόδοσης έτσι ώστε ο αγρότης να επιτυγχάνει μεγαλύτερη παραγωγή για να καλύψει τη ζήτηση των καταναλωτών στην αγορά βελτιώνοντας παράλληλα το εισόδημά του. Ταυτόχρονα το παραγόμενο προϊόν πρέπει να είναι αναβαθμισμένο και ποιοτικά. Για παράδειγμα, η ποιότητα του καρπού της τομάτας καθορίζεται από την περιεκτικότητά της σε λυκοπένιο, μια κόκκινη χρωστική η οποία ανήκει στην κατηγορία των καροτενοειδών με αντιοξειδωτικές και ευεργετικές για καρδιακές παθήσεις ιδιότητες. Η βελτίωση φυτών μπορεί να δημιουργήσει καρπούς πλουσιότερους σε λυκοπένιο. Επίσης έχει προεκτάσεις και στη μεταποίηση. Για παράδειγμα, το άμυλο του καλαμποκιού και της πατάτας περιέχει δύο συστατικά, την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Άλλες βιομηχανίες χρειάζονται αμυλόζη άλλες αμυλοπηκτίνη, άρα κάθε φορά απαιτείται χημικός διαχωρισμός. Η βελτίωση μπορεί να δημιουργήσει ποικιλίες που περιέχουν το ένα ή το άλλο από τα δύο συστατικά.

4

Στην εικόνα απεικονίζεται το μέγεθος της ποικιλότητας σε διάφορα γνωρίσματα του πεπονιού, όπως το χρώμα της σάρκας, το μέγεθος, η υφή και το χρώμα του περιβλήματος.

Με τη βελτίωση επιδιώκεται σε ένα νέο πεπόνι (νέα ποικιλία) να συνδυάζονται επιθυμητά γνωρίσματα όπως αυτά εκφράζονται σε διαφορετικά πεπόνια. Για παράδειγμα, δεξιά πάνω στη διασταύρωση, το επιθυμητό γνώρισμα από το πρώτο πεπόνι είναι το χρώμα και οι ραβδώσεις στην επιφάνεια (ενδέχεται να είναι επιθυμητό γιατί συνδέεται με αντοχή σε κάποια ασθένεια ή γιατί έχει εμπορική αξία), ενώ από το δεύτερο ενδιαφέρει η σάρκα λόγω καλύτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (γεύση και άρωμα). Μετά από τη διασταύρωση, η επιλογή φαινοτύπων σε διαδοχικές γενεές οδηγεί στο επιδιωκόμενο επιθυμητό αποτέλεσμα.

5

Ως ποικιλία μπορεί να οριστεί μια ομάδα φυτών καλλιεργούμενου είδους με ορισμένους σταθερούς μορφολογικούς, φυσιολογικούς, χημικούς, κ.α χαρακτήρες, που κατά την αναπαραγωγή διατηρούνται και στους απογόνους (πχ η ύπαρξη ή όχι αγάνων στην ανθοταξία ποικιλιών σιταριού ή το χρώμα νήματος σε ποικιλίες βαμβακιού).

6

Οι ποικιλίες συνήθως είναι καθαρές σειρές ή υβρίδια. Και οι δύο αυτοί τύποι είναι γενετικά ομοιογενείς γιατί αποτελούνται από ένα γονότυπο. Η διαφορά τους έγκειται στο ότι οι καθαρές σειρές είναι ομοζύγωτες και για το λόγο αυτό εύκολα αναπαράγονται, ενώ ένα υβρίδιο προκύπτει από τη διασταύρωση δύο καθαρών σειρών και αυτό σημαίνει ότι για την αναπαραγωγή του είναι αναγκαίο πάντοτε να διασταυρώνονται οι δύο γονείς.

Λιγότερο διαδεδομένες είναι οι πολυ-γονοτυπικές ποικιλίες. Οι μονογονοτυπικές είναι διαδεδομένες για λόγους ομοιομορφίας και εμπορικότητας. Η κλιματική όμως αλλαγή φέρνει στο προσκήνιο τις πολυγονοτυπικές που στο μέλλον θα χρησιμοποιούνται περισσότερο.

7-10

Ιδιαίτερος σταθμός στη βελτίωση φυτών ήταν η «Πράσινη Επανάσταση». Στη δεκαετία του 1960 ο παγκόσμιος πληθυσμός ήταν τρία δισεκατομμύρια και υπήρχαν χώρες με έντονα επισιτιστικά προβλήματα. Διεθνές δίκτυο ερευνητών με επικεφαλής τον Norman Borlaug εστίασε στη δημιουργία ημι-νάνων ποικιλιών σιταριού, που ήταν ιδιαίτερα παραγωγικές, επιλύοντας το πρόβλημα του επισιτισμού. Στρατηγείο του Borlaug ήταν το διεθνές ινστιτούτο βελτίωσης καλαμποκιού και σιταριού (International Maize and Wheat Improvement Center) που εδρεύει στο Μεξικό με την επωνυμία CIMMYT (το ακρωνύμιο προέρχεται από την Ισπανική του ονομασία 'Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo'). Ο Borlaug ανακηρύχτηκε πατέρας της πράσινης επανάστασης που εκτιμάται ότι έσωσε περισσότερο από ένα δισεκατομμύριο ανθρώπους από την πείνα, ενώ για το επίτευγμα αυτό βραβεύτηκε το 1970 με Nobel Ειρήνης.

Το CIMMYT εξελίχθηκε και σήμερα αποτελεί τον μεγαλύτερο μη κερδοσκοπικό ερευνητικό και εκπαιδευτικό οργανισμό με διάφορα επιμέρους ινστιτούτα στην Αφρική, Λατινική Αμερική και Ασία, και κύρια αποστολή τη δημιουργία βελτιωμένων ποικιλιών σιταριού και καλαμποκιού με στόχο την επάρκεια και ασφάλεια τροφίμων σε αναπτυσσόμενες χώρες. Η επιτυχία του εγχειρήματος της «πράσινης επανάστασης», με ποικιλίες που καλλιεργήθηκαν σ' όλο τον κόσμο, έβαλε τη βάση για την παραπέρα ανάπτυξη της βελτίωσης φυτών ώστε σήμερα τα επίπεδα παραγωγικότητας του σιταριού να είναι κατά μέσο όρο τρεις φορές μεγαλύτερα. Ακόμη μεγαλύτερη ήταν η συμβολή της βελτίωσης στο καλαμπόκι, όπου με την επινοήση και καλλιέργεια των υβριδίων η μέση παραγωγικότητα ανά στρέμμα σήμερα είναι πάνω από πέντε φορές υψηλότερη συγκριτικά με τις αρχές του 20ου αιώνα.

11

Σήμερα, η βελτίωση φυτών γίνεται από δημόσιους και ιδιωτικούς φορείς. Επίσης, υπάρχουν διεθνή ερευνητικά δίκτυα που χρηματοδοτούνται από διάφορες χώρες. Ένα δίκτυο είναι το CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research), που αρχικά εστίασε στη βελτίωση των βασικών δημητριακών (ρύζι, σιτάρι και καλαμπόκι) και στη συνέχεια γενικά στη γεωργική έρευνα γενικότερα, συμπεριλαμβανομένης της βελτίωσης φυτών και σε άλλα είδη, πέραν των δημητριακών. Η έρευνα του δικτύου CGIAR στοχεύει στη μείωση της φτώχειας, στην αύξηση της επισιτιστικής ασφάλειας, στη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας και διατροφής και στη διασφάλιση της αειφόρου διαχείρισης των φυσικών πόρων. Το δίκτυο CGIAR χρηματοδοτούν διάφορες χώρες και ιδιωτικοί φορείς.

12

Στην Ευρώπη, ένας αριθμός Εθνικών Ιδρυμάτων (Ερευνητικά Ινστιτούτα ή Κέντρα και Πανεπιστήμια) συμμετέχουν στο δίκτυο EVA (European Evaluation Network). Από την Ελλάδα συμμετέχει ο ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ και η Αμερικάνικη Γεωργική Σχολή.

13-14

Παρά τον υπερ-διπλασιασμό του παγκόσμιου πληθυσμού σε σχέση με το 1960 (σήμερα είναι περίπου 7.850.000), τα επίπεδα παραγωγικότητας εξακολουθούν να είναι επαρκή χάρη στη βελτίωση φυτών.

Εκτιμάται ότι το 60% της αύξησης της παραγωγικότητας σε μείζονος σημασίας καλλιέργειες οφείλεται στη γενετική βελτίωση και τη δημιουργία καλύτερων ποικιλιών.

15

Όμως σύμφωνα με τις ήπιες προβλέψεις του ΟΗΕ (πορτοκαλί γραμμή που θεωρείται το πιθανότερο σενάριο), το 2050 ο πληθυσμός αναμένεται να είναι 9,5-10 δισ. κάτι που καθιστά αναγκαίο ακόμη μεγαλύτερη παραγωγή τροφίμων.

16

Όμως παρά την αυξητική τάση στις ποσότητες των παραγόμενων τροφίμων, μια μελέτη του 2008 για τα σιτηρά, δείχνει το ρυθμό αύξησης της παραγωγικότητας στα σιτηρά που καλλιεργούνται για καρπό να είναι 0,5% όταν η ετήσια αύξηση του πληθυσμού είναι 1,5%.

17

Στις τέσσερις μείζονος σημασίας καλλιέργειες (καλαμπόκι, ρύζι, σιτάρι και σόγια καλύπτουν περίπου 50-60% των ανθρώπινων αναγκών), ο τωρινός παγκόσμιος ρυθμός αύξησης της παραγωγικότητας (συνεχείς γραμμές) δεν είναι επαρκής σύμφωνα με τις προσδοκώμενες ανάγκες σε συνολικά τρόφιμα το 2050 (οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τον αναγκαίο ρυθμό αύξησης).

18

Για τους λόγους αυτούς εκφράζονται σοβαρές επιφυλάξεις και φόβοι για μια μελλοντική 'κρίση τροφίμων' (food crisis)

19

Έτσι σήμερα, η διεθνής επιστημονική κοινότητα έχει να διαχειριστεί μια τεράστια αντικρουόμενη πρόκληση. Από τη μια είναι η ανάγκη για αγρο-οικοσυστήματα περισσότερο παραγωγικά και από την άλλη συνθήκες περισσότερο αντίξοες λόγω της κλιματικής αλλαγής. Οι αντιξοότητες απορρέουν αφενός από το γεγονός ότι το περιβάλλον έχει γίνει περισσότερο απρόβλεπτο και παραλλάσσει και αφετέρου από τις αβιοτικές καταπονήσεις, όπως καύσωνας, ξηρασία, παγετός, που αναμένονται συχνότερα και εντονότερα. Καύσωνας και ξηρασία ήδη αποτελούν σοβαρά προβλήματα ακόμη και για τις βορειότερες Ευρωπαϊκές χώρες

20

Για τη βιωσιμότητα του κόσμου, αλλά και της ίδιας της γεωργικής δραστηριότητας, πρωταρχικής σημασίας είναι η διαθεσιμότητα σε ποιοτικό σπόρο σύγχρονων ποικιλιών με προσαρμοστικότητα σε ένα παραλλάσσει και συνεχώς εξελισσόμενο περιβάλλον.

21

Η ποικιλία στη γεωργία παραλληλίζεται με το θεμέλιο μιας οικοδομής στον κατασκευαστικό τομέα. Η βιωσιμότητα του κτιρίου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ποιότητα των θεμελίων. Όσο πολυτελής και αν είναι η κατασκευή, όσα χρήματα και αν επενδυθούν στην εμφάνιση και λειτουργικότητα του κτιρίου, αυτό θα καταρρεύσει στον πρώτο σεισμό αν στερείται καλών θεμελίων.

22

Αντίστοιχα, η έλλειψη κατάλληλων ποικιλιών καθιστά τη γεωργία ευάλωτη, όπως συνέβη με την περίπτωση του καλαμποκιού το 2012 στην Iowa και το 2018 στη Γερμανία λόγω ξηρασίας.

23

Ως εφαρμοσμένη γενετική επιστήμη, η βελτίωση φυτών είναι κλάδος που αναπτύχθηκε τον 20<sup>ο</sup> αιώνα. Σήμερα μπορεί να διακριθεί σε δύο επιστημονικούς τομείς που είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι. Για 10ετίες η προσέγγιση του γενετικού υλικού γίνεται έμμεσα, όπου οι γονότυποι επιλέγονται και αξιολογούνται από το φαινότυπο και αυτό συνιστά την κλασική βελτίωση. Καθώς η συντριπτική πλειοψηφία των γνωρισμάτων που επιδιώκει να βελτιώσει είναι πολυγονιδιακά (ποσοτικά) με σύνθετη κληρονομία, η έμμεση προσέγγιση αντιμετωπίζει ιδιαίτερες δυσκολίες ως προς την ακρίβεια εντοπισμού των καλύτερων γονοτύπων. Η πρόοδος της γενετικής με εφαλτήριο την αποσαφήνιση της μοριακής δομής του γενετικού υλικού και της τρισδιάστατης διπλής έλικας του DNA και η ταχύτατη ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και γενετικής, προσφέρει σήμερα πολύτιμα εργαστηριακά εργαλεία στη βελτίωση φυτών για ακριβέστερη επιλογή γονοτύπων. Οι δύο αυτοί κλάδοι καλούνται να συνυπάρξουν σε ένα πλαίσιο αμοιβαίας συνεργασίας και συνεισφοράς για ακόμη αποτελεσματικότερη βελτίωση φυτών.

24

## ΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ

25

Ο συνηθέστεροι μοριακοί δείκτες είναι μικρά τμήματα DNA που έχουν ομολογία με αντίστοιχα τμήματα των χρωμοσωμάτων στα φυτά. Αναφέρονται και ως δείκτες DNA και η βασική αρχή λειτουργίας τους δίνεται στην εικόνα. Οι μοριακοί δείκτες είναι λειτουργικοί αν το ομόλογό τους τμήμα συνδέεται με κάποιο τμήμα του φυτικού γενώματος, την περιοχή 'στόχος'. Η περιοχή 'στόχος' αφορά τα αλληλόμορφα σε μια γονιδιακή θέση ή ευρύτερο χρωμοσωμικό τμήμα που σχετίζεται με το επίμαχο γνώρισμα. Με άλλα λόγια, όταν το ομόλογο τμήμα βρίσκεται σε θέση παράπλευρη της περιοχής 'στόχος', δηλ. ο δείκτης είναι παράπλευρος.

26

Σε άλλες περιπτώσεις ο δείκτης είναι ενδογονιδιακός αποτελώντας μέρος της περιοχής 'στόχος' (b).

27

Η ανάλυση του γονιδιώματος δίνει τη δυνατότητα διερεύνησης της ύπαρξης της «επιθυμητής» θέσης. Αν η ανάλυση με το μοριακό δείκτη είναι θετική (πχ υβριδισμός) σημαίνει ότι υφίσταται η επιθυμητή χρωμοσωμική περιοχή λόγω σύνδεσης. Με σκανάρισμα του τεμαχισμένου γονιδιώματος με το μοριακό δείκτη ανιχνεύεται η επιθυμητή θέση. Ο μοριακός δείκτης σαρώνει το χρωμόσωμα και μόνο αν υπάρχει το ομόλογο τμήμα υβριδίζει με αυτό χάρη στους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων. Ο υβριδισμός γίνεται αντιληπτός με κατάλληλη σήμανση του μοριακού δείκτη και υποδηλώνει την παρουσία της περιοχής 'στόχος' όχι όμως την ακριβή της θέση. Επίσης, η λειτουργικότητα του μοριακού δείκτη εξαρτάται από τον πολυμορφισμό της περιοχής 'στόχος', δηλ. το επίπεδο των διαφορών μεταξύ διαφορετικών γονοτύπων. Χάρη στην ομολογία και τον υβριδισμό του δείκτη με την περιοχή 'στόχος', ανιχνεύονται διαφορές μεταξύ των γονοτύπων ενός πληθυσμού ή μιας διασπώμενης γενεάς.

28

Οι μοριακοί δείκτες για να αποτελεσματικοί στη βελτίωση φυτών απαιτείται να είναι πολυμορφικοί και ταυτόχρονα να υπάρχει πολυμορφία στην περιοχή 'στόχος'. Οι διάφορες μορφές της περιοχής 'στόχος' (πχ τα αλληλόμορφα γονίδια) να έχουν ευδιάκριτα χαρακτηριστικά ώστε να ανιχνεύονται εύκολα. Ο ιδανικός δείκτης που θεωρείται πολυμορφικός έχει την ικανότητα διάκρισης διαφορετικών γονοτύπων στο γενετικό υλικό που χειρίζεται η βελτίωση φυτών.

Να έχουν απλή κληρονομικότητα και εξειδικευμένη (όχι πλειοτροπική δράση). Η υψηλή εξειδίκευση των δεικτών ανάλογα με το είδος διευκολύνει τη χρήση τους στα βελτιωτικά προγράμματα των καλλιεργούμενων φυτών.

Να έχουν υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας (φαινότυπος που δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον) ώστε ο φαινοτυπικός πολυμορφισμός να είναι αποτέλεσμα γενετικών και όχι επίκτητων διαφορών. Επίσης, να επιδεικνύουν συγκυριαρχία ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός ετεροζύγωτων από ομοζύγους γονοτύπους και να μη ασκούν επιβλαβή επίδραση στο φαινότυπο.

Οι περιοχές που μπορεί να ανιχνεύσει ένας μοριακός δείκτης να μη είναι συγκεντρωμένες σε ορισμένες περιοχές αλλά διάσπαρτες και σχετικά ομοιόμορφα κατανεμημένες στο γονιδίωμα. Πρέπει να είναι εύκολη η ανίχνευση των γενετικών διαφορών και να υπάρχει αυτοματοποίηση της ανάλυσης των δεδομένων. Να υπάρχει υψηλή διαθεσιμότητα κατάλληλων δεικτών, χωρίς περιορισμό στη χρήση.

Κόστος χρήσης χαμηλό και οικονομικά αποδοτικό (ανταποδοτικό) επιτρέπει την αξιοποίηση των μοριακών δεικτών σε βελτιωτικά προγράμματα. Επίσης, η απλότητα της τεχνικής και ο απαιτούμενος χρόνος είναι κρίσιμοι παράγοντες. Υπόψη ότι, ορισμένες τεχνικές δεικτών απαιτούν μεγάλες ποσότητες και υψηλή ποιότητα DNA, που πρακτικά είναι δύσκολο να αποκτηθεί και αυξάνει το κόστος των διαδικασιών.

29

Σημαντικός παράγοντας αξιοπιστίας των μοριακών δεικτών είναι η γενετική απόσταση του μοριακού δείκτη (ομόλογου τμήματος) από την περιοχή 'στόχος'. Αυτό γιατί η απόσταση καθορίζει την πιθανότητα ανταλλαγής μεταξύ τους που δημιουργεί νεοσυνδυασμούς. Ο ένας νεοσυνδυασμός περιλαμβάνει την περιοχή 'στόχος' που όμως δεν είναι εντοπίσιμος από το δείκτη γιατί απουσιάζει το ομόλογό του τμήμα. Ο δεύτερος νεοσυνδυασμός έχει το ομόλογο του δείκτη τμήμα, άρα εντοπίζεται από τον μοριακό δείκτη όμως απουσιάζει η περιοχή 'στόχος'.

30

Η μονάδα της γενετικής απόστασης στη μοριακή γενετική είναι το cM (centimorgan), που είναι αντίστοιχη με τη μονάδα ανταλλαγής. Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συνδέονται στενά με τον στόχο, κατά προτίμηση μικρότερη από 5 cM. Στην εικόνα ο δείκτης A απέχει 5 cM από το στόχο, άρα η πιθανότητα ανασυνδυασμού και απομάκρυνσης του ομόλογου τμήματος είναι 5%. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει πιθανότητα 5% είτε η περιοχή 'στόχος' να διαφύγει του δείκτη A είτε να ανιχνευτεί αλλά να είναι προϊόν ανασυνδυασμού, συνεπώς η αξιοπιστία επιλογής μόνο με το δείκτη A είναι 95%. Αντίστοιχα η αξιοπιστία επιλογής του δείκτη B που απέχει 3 cM είναι 97%. Αν όμως χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα οι δύο αντίπλευροι δείκτες, για να διαφύγει η περιοχή 'στόχος' και των δύο δεικτών, πρέπει να γίνει διπλό χiasma και ανταλλαγή (τόσο μεταξύ στόχου και A όσο και μεταξύ στόχου και B). Η πιθανότητα όμως διπλού χiasματος είναι μόλις 0,0015 (0,05 x 0,03), δηλ. 0,15% και η αξιοπιστία επιλογής 99,85%. Προφανώς δεν τίθεται θέμα αξιοπιστίας αν ο δείκτης είναι ενδογονιδιακός.

Οι αρχές λειτουργίας των μοριακών δεικτών περιλαμβάνουν, διαδοχικά, την απομόνωση DNA, την πέψη του DNA (τεμαχισμό σε επιμέρους θραύσματα), την ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων και τον υβριδισμό κατά Southern.

Η απομόνωση αρχικά περιλαμβάνει το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) από τις άλλες κατηγορίες οργανικών ενώσεων. Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν την ιδιότητα να μη διαλύονται σε οργανικό διαλύτη (αιθανόλη, γλωφοφόρμιο, φαινόλη) ούτε να αποδιοργανώνονται με την παρουσία οργανικού διαλύτη. Η ιδιότητα αυτή καθιστά εύκολη την απομόνωσή τους από τα άλλα μεγαλομοριακά συστατικά του κυττάρου, δηλ. τις πρωτεΐνες, τους πολυσακχαρίτες και τα πολυλιπίδια. Μετά από εκχύλιση του κυτταρικού χυμού με οργανικό διαλύτη τα νουκλεϊκά οξέα επιπλέουν ενώ τα άλλα μακρομόρια κατακρημνίζονται. Στη συνέχεια, οι δύο κατηγορίες νουκλεϊκών οξέων, DNA και RNA, διαχωρίζονται μεταξύ τους με υπερφυγοκέντρηση χάρη στην τεράστια διαφοράς τους ως προς το μοριακό βάρος. Επίσης, ο διαχωρισμός DNA και RNA επιτυγχάνεται με τη χρήση χημικών μέσων ή ενζύμων που καταστρέφουν τη μια κατηγορία και όχι την άλλη. Ειδικά στην περίπτωση που στόχος είναι η απομόνωση του DNA, κάτι τέτοιο γίνεται εύκολα με παραμονή του παρασκευάσματος για 12 ώρες σε ισχυρά αλκαλικό διάλυμα NaOH. Αυτό γιατί σε μεγάλα pH ενώ το RNA υδρολύεται στα επιμέρους νουκλεοτίδια, το DNA παραμένει σταθερό. Η σταθερότητα του DNA σε μεγάλα pH οφείλεται στην παρουσία Η στον άνθρακα 2' της δεσοξυ-ριβόζης (στην αντίστοιχη θέση της ριβόζης των νουκλεοτιδίων του RNA βρίσκεται OH).

Ο άμεσος χειρισμός των μορίων DNA για μοριακές αναλύσεις είναι αδύνατος λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους. Απαιτείται κατάλληλος τεμαχισμός με εργαλεία που 'κόβουν' το DNA, όχι τυχαία, αλλά εξειδικευμένα σε συγκεκριμένες θέσεις. Εργαλεία με τέτοιες ιδιότητες είναι ειδικά ένζυμα που απομονώνονται από βακτήρια, ανήκουν στην κατηγορία 'ενδονουκλεάσες II' και ονομάζονται περιοριστικά ένζυμα (restriction enzymes or restriction endonucleases).

Στην εικόνα απεικονίζεται η δράση τριών περιοριστικών ενζύμων. Όταν ανακαλύπτεται ένα περιοριστικό ένζυμο ονοματίζεται με βάση το βακτήριο προέλευσης. Χρησιμοποιείται το πρώτο γράμμα του γένους και τα δύο πρώτα γράμματα του είδους. Επιπλέον, κάθε νέο περιοριστικό ένζυμο χαρακτηρίζεται με ένα αριθμό με λατινική μορφή, I, II, III, κλπ. Πχ το ένζυμο AluI είναι το πρώτο που απομονώθηκε από το βακτήριο *Arthrobacter luteus*. Αν μάλιστα προέρχεται από συγκεκριμένο στέλεχος τότε παρεμβάλλεται μεταξύ των τριών γραμμμάτων και του λατινικού αριθμού ένα γράμμα που υποδηλώνει το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, πχ το ένζυμο EcoRI, είναι το πρώτο που απομονώθηκε από το στέλεχος R του βακτηρίου *Echerichia coli*. Κάθε τέτοιο ένζυμο έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων στο DNA που ονομάζεται θέση περιορισμού (restriction site) μέσα στην οποία βρίσκεται το σημείο κοπής. Οι αλληλουχίες στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες της θέσης περιορισμού είναι παλίνδρομες γιατί δεν διαφέρουν όταν διαβάζονται στη ίδια κατεύθυνση, πχ GAATTC στην κατεύθυνση 5'→3' για τη θέση περιορισμού του EcoRI. Το ένζυμο διακόπτει τη συνέχεια (σπάει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς) ανάμεσα σε συγκεκριμένο ζευγάρι βάσεων της αλληλουχίας, δηλ. GA, GC και GG για τα ένζυμα EcoRI, AluI και BamHI, αντίστοιχα. Η εικόνα επίσης απεικονίζει το αποτέλεσμα χειρισμού ενός μορίου DNA με τα ένζυμα αυτά, δημιουργώντας επιμέρους θραύσματα DNA. Όταν η διαδοχή στο σημείο κοπής αφορά συμπληρωματικές βάσεις, όπως είναι η GC για AluI, η κοπή των συμπληρωματικών αλυσίδων γίνεται στο ίδιο ύψος και προκύπτουν τα λεγόμενα λεία άκρα. Διαφορετικά, η κοπή σε διαφορετικό ύψος για τις δύο αλυσίδες δημιουργεί τμήματα με προεξέχοντα άκρα. Τα λεία ονομάζονται και τυφλά άκρα, γιατί στο λείο άκρο μπορεί να συγκολληθεί οποιοδήποτε τμήμα με λείο άκρο. Αντίθετα, τα προεξέχοντα λέγονται και κολλώδη άκρα, καθώς σε προεξέχων άκρο μπορεί να συγκολληθεί μόνο τμήμα που έχει αντίστοιχο (συμπληρωματικό) προεξέχων άκρο.

Όταν ένα περιοριστικό ένζυμο κόβει το DNA σε όλες τις θέσεις αναγνώρισης προκαλεί τη λεγόμενη τέλεια πέψη του DNA. Υπάρχουν εφαρμογές που απαιτούν τη μερική πέψη, δηλ. την κοπή του

DNA σε ορισμένες από τις θέσεις αναγνώρισης. Μερική πέψη επιτυγχάνεται διαφοροποιώντας τις συνθήκες, όπως μειωμένη συγκέντρωση ενζύμου ή μικρότερος χρόνος έκθεσης στο ένζυμο ή χαμηλότερη θερμοκρασία που επιβραδύνει την αντίδραση κοπής του DNA, κλπ.

33

Σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαία η αναπαραγωγή θραυσμάτων DNA, όταν η ποσότητα είναι πολύ μικρή ή η ποιότητα δεν επιτρέπει τις απαραίτητες αναλύσεις. Για τη δημιουργία πολλών αντιγράφων ενός τμήματος DNA εφαρμόζονται επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αναπαραγωγής. Η τεχνική ονομάζεται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction) ή τεχνική PCR, την οποία εμπνεύστηκε ο Mullis (1990), που για το λόγο αυτό βραβεύτηκε με βραβείο Nobel. Προϋπόθεση είναι να είναι γνωστή η αλληλοδιαδοχή των βάσεων στα 3' άκρα των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων για το τμήμα που ενδιαφέρει (DNA στόχος) έτσι ώστε να παρασκευαστούν και να είναι διαθέσιμα αντίστοιχα πρωταρχικά τμήματα ολιγονουκλεοτιδίων, οι εκκινητές (primers) για τις συμπληρωματικές αλυσίδες. Οι εκκινητές και οι απαραίτητες για την αναπαραγωγή ενώσεις αναμιγνύονται στο δείγμα του DNA. Για να μετουσιωθεί το DNA (να σπάσουν οι δεσμοί H και να αποχωριστούν οι δύο αλυσίδες) το μίγμα θερμαίνεται στους 95°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται στους 55°C για 20 λεπτά, για να διευκολυνθεί ο υβριδισμός των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους βάσεις στις δυο αλυσίδες του DNA. Με τη καταλυτική δράση της DNA πολυμεράσης, τα ολιγονουκλεοτίδια των εκκινητών επιμηκύνονται με προσθήκη συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα από το αρχικό DNA να προκύπτουν δυο νέα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα σε κάθε κύκλο να διπλασιάζεται ο αριθμός των κλώνων του αρχικού τμήματος DNA και να αυξάνεται με γεωμετρική πρόοδο. Μετά από 20 κύκλους θα έχουν παραχθεί 1.048.576 ( $2^{20}$ ) κλώνοι του αρχικού DNA.

34

Η ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται σε πηχτή (gel) αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου για τον διαχωρισμό των θραυσμάτων που προκύπτουν μετά από το χειρισμό του DNA με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι τα θραύσματα DNA μετακινούνται όταν βρεθούν σε περιβάλλον ηλεκτρικού πεδίου. Με αφετηρία τον αρνητικό πόλο, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Η κινητικότητα του DNA εξαρτάται από το μέγεθός του, καθώς η διακριτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης είναι τόσο μεγάλη ώστε ακόμη και δύο θραύσματα DNA που διαφέρουν σε μήκος μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο μπορούν να διαχωριστούν. Συνεπώς, δύο θραύσματα που διαφέρουν έστω για ένα νουκλεοτίδιο έχουν διαφορετική κινητικότητα και σχηματίζουν διαφορετικές ζώνες, καθώς τα μικρότερα κομμάτια κινούνται γρηγορότερα και μακρύτερα. Αν το DNA από διαφορετικές πηγές (πχ δύο ποικιλίες) είναι ίδιο, ένα συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο θα αναγνωρίσει και θα διακόψει τις αλληλουχίες για τις οποίες είναι εξειδικευμένο (θέση περιορισμού) στα ίδια σημεία σε κάθε DNA. Συνεπώς, για κάθε DNA θα προκύψουν θραύσματα ίσου αριθμού και μεγέθους, με αποτέλεσμα η ηλεκτροφόρηση τους να δώσει ακριβώς τις ίδιες ζώνες (δεν προκύπτει πολυμορφισμός). Αν όμως το DNA είναι διαφορετικό, το περιοριστικό ένζυμο θα αναγνωρίσει διαφορετικές θέσεις περιορισμού και ο τεμαχισμός θα δώσει, είτε ίσο αριθμό ζωνών σε διαφορετικές θέσεις της ηλεκτροφόρησης είτε διαφορετικό αριθμό ζωνών, όπως ενδεικτικά απεικονίζεται στην εικόνα. Το DNA-3 τεμαχίζεται σε δύο σημεία και δίνει τρία επιμέρους θραύσματα και τρεις ζώνες. Επίσης, δίνει και το μικρότερο θραύσμα (3a) με τη μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από την οποία προκύπτει η πλέον απομακρυσμένη από τον αρνητικό πόλο ζώνη. Τα DNA-1 και DNA-2 έχουν μια αλλά διαφορετική θέση περιορισμού με αποτέλεσμα να διαφέρουν σε μήκος τα επιμέρους θραύσματα και να δίνουν διαφορετικές ζώνες.

35

Για τη επίδραση των ενζύμων περιορισμού στο DNA ενός είδους, ο ερευνητής αντλεί πληροφορίες από τον γενετικό χάρτη θέσεων περιορισμού (restriction map) κάθε χρωμοσώματος. Ο χάρτης θέσεων περιορισμού κατασκευάζεται με πέψη και ηλεκτροφόρηση. Για τον προσδιορισμό των θέσε-

ων περιορισμού ενός περιοριστικού ενζύμου, το DNA επισημαίνεται στα 5' άκρα του και εφαρμόζεται πλήρης και μερική πέψη. Ας θεωρήσουμε ότι το υποθετικό τμήμα DNA της εικόνας με 750 ζευγάρια βάσεων (bp) έχει τρεις θέσεις περιορισμού. Για τον προσδιορισμό τους, τα δυο 5' άκρα έχουν επισημαίνονται με ραδιενεργό φώσφορο ( $^{32}\text{P}$ ). Μετά από πλήρη πέψη του DNA με το περιοριστικό ένζυμο, η ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων που θα προκύψουν θα δώσει στην πηχτή τέσσερις ζώνες. Οι ζώνες αντιστοιχούν στα τμήματα των 200, 50, 400 και 100 bp. Οι ζώνες των 100 και 200 bp θα ακτινοβολούν που σημαίνει ότι προέρχονται από τα δυο άκρα του DNA. Δεν είναι γνωστή όμως η θέση των δυο άλλων θραυσμάτων που περιέχουν 50 και 400 ζευγάρια βάσεων. Για να προσδιοριστεί η ακριβής τους θέση ακολουθούν επαναλήψεις της διαδικασίας με μερική πέψη του DNA. Με κατάλληλες συνθήκες συγκέντρωσης του περιοριστικού ενζύμου, συγκέντρωσης γλυκερόλης, pH, και θερμοκρασίας, χειριζόμενοι πολλά κομμάτια DNA, προκύπτουν όλα τα δυνατά επιμέρους θραύσματα. Μια τέτοια εφαρμογή θα έχει σαν αποτέλεσμα κάποια τμήματα να κοπούν και στα τρία σημεία, άλλα μόνο στο 1ο σημείο, άλλα μόνο στο 2ο κ.ο.κ.. Άρα θα προκύψουν θραύσματα με διάφορα μήκη, 250 bp, 650 bp, 500 bp κλπ. και η ηλεκτροφόρηση βοηθά στον προσδιορισμό της θέσης των ενδιάμεσων τμημάτων. Από τη στιγμή που στην πηχτή με μερική πέψη προκύπτει ραδιενεργό τμήμα των 250 και όχι των 150 bp, σημαίνει ότι το τμήμα των 50 bp είναι παρακείμενο του τμήματος με 200 ζευγάρια βάσεων. Επίσης προκύπτει ραδιενεργό τμήμα των 500 και όχι των 600 bp, άρα το τμήμα των 400 bp είναι παρακείμενο του τμήματος με 100 ζευγάρια βάσεων. Επίσης, για την αποφυγή της μερικής πέψης, με την ίδια λογική η κατασκευή του γενετικού χάρτη μπορεί να γίνει με πλήρη πέψη του DNA με περισσότερα από ένα περιοριστικά ένζυμα, τόσο χωριστά για κάθε ένζυμο, όσο και με ταυτόχρονη εφαρμογή των ενζύμων. Τα σχετικά μεγέθη των ζωνών που θα προκύψουν με την ηλεκτροφόρηση δίνουν τη δυνατότητα προσέγγισης των θέσεων περιορισμού.

36

Ο υβριδισμός DNA αποσκοπεί στην ανίχνευση ενός τμήματος DNA (πχ της περιοχής 'στόχος') μέσω μοριακού δείκτη. Η πρώτη τεχνική υβριδισμού αναπτύχθηκε από τον Southern (1975) και ονομάζεται υβριδισμός ή μεταφορά ή στύπωμα DNA κατά Southern, ενώ ακολούθησαν και νεότερες τεχνικές. Τα κομμάτια του DNA που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται από την πηχτή σε ειδικές μεμβράνες σε αλκαλικές συνθήκες οπότε μετουσιώνονται (διαχωρίζονται οι συμπληρωματικές αλυσίδες) και δίνουν μονόκλινα τμήματα. Μια τέτοια μεμβράνη είναι το φίλτρο νιτροκυτταρίνης όπου το DNA σταθεροποιείται σε μονόκλινη μορφή. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει μεταξύ των άλλων (άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα) τον κατάλληλο ανιχνευτή. Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής (probe) είναι επισημασμένος (πχ με ραδιενεργό P) ώστε να γίνει ορατός σε περίπτωση υβριδισμού του με τμήμα DNA με το οποίο έχει ομολογία. Μόρια του ανιχνευτή υβριδίζουν και δημιουργούν δίκλινα τμήματα πάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Οι ζώνες που έχουν υβριδίσει ακτινοβολούν λόγω της επισήμανσης του ανιχνευτή και εντοπίζονται. Με συμπίεση των μεμβρανών σε ευαίσθητο στη ραδιενέργεια φωτογραφικό φιλμ, ανιχνεύεται η θέση του υβριδισμού. Στην εικόνα απεικονίζονται το σύνολο των σταδίων χειρισμού του DNA για την ανίχνευση της περιοχής 'στόχος'.

37

Μεταξύ των δημοφιλέστερων μοριακών δεικτών που έχουν εφαρμοστεί στη βελτίωση φυτών, είναι ο δείκτης πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP, restriction fragment length polymorphism). Επίσης δείκτες που βασίζονται στη τεχνική της PCR, όπως, ο δείκτης τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD, random amplified polymorphic DNA), ο δείκτης πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP, amplified fragment length polymorphism), ο μικροδορυφόρος (SSR, simple sequence repeat) και ο δείκτης πολυμορφισμού νουκλεοτιδίου (SNP, nucleotide polymorphism).



Ένα απλό παράδειγμα αξιοποίησης της RFLP τεχνικής για τον προσδιορισμό γενετικής παραλλακτικότητας δίνεται στην εικόνα της διαφάνειας. Οι μεταλλάξεις σε μια γονιδιακή θέση έχουν δημιουργήσει πέντε αλληλόμορφα (A – E). Σε σύγκριση με το αλληλόμορφο A που έχει τρεις θέσεις περιορισμού, ένθεση δημιούργησε μια επιπλέον θέση περιορισμού (αλληλόμορφο B), τροποποίηση βάσεων είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της θέσης 2 (αλληλόμορφο Γ), αφαίρεση βάσεων προκάλεσε ελάττωση της ζώνης 2-3 (αλληλόμορφο Δ), και προσθήκη βάσεων επιμήκυνε την ζώνη 1-2 (αλληλόμορφο E). Η μεταχείριση των γονιδιωμάτων από πέντε αντίστοιχες καθαρές σειρές με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει και κόβει στις θέσεις 1, 2, 3, 4, δίνει σωρεία θραυσμάτων DNA σε κάθε γονότυπο (b) και η σάρωση με το μοριακό δείκτη που υβριδίζει στην περιοχή 1-3 αποκαλύπτει τον πολυμορφισμό (c). Εάν επιδίωξη είναι η επιλογή ενός από τα αλληλόμορφα, πχ το Γ, αυτό εντοπίζεται από το γεγονός ότι δίνει μια συγκεκριμένη ζώνη. Επίσης παρόμοια ανάλυση από πληθυσμό με γενετική ετερογένεια, πχ μια διασπώμενη γενεά, προσδιορίζει με ακρίβεια τους γονοτύπους των φυτών από το συνδυασμό των ζωνών των αλληλομόρφων (d). Πχ ένα φυτό ομοζύγωτο για το αλληλόμορφο A εξακολουθεί να δίνει τις δύο αντίστοιχες ζώνες, ενώ φυτό ετεροζύγωτο AB δίνει τέσσερις ζώνες (μια κοινή από τα δύο αλληλόμορφα και τρεις διαφορετικές).

Η μεθοδολογία RFLP είναι απλή και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι ότι η αλληλουχία που χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής δεν χρειάζεται να είναι γνωστή. Αρκεί ένα γονιδιωματικός κλώνος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του πολυμορφισμού. Η ανάλυση RFLP απαιτεί μεγάλες ποσότητες DNA υψηλής ποιότητας, έχει χαμηλή απόδοση και είναι πολύ δύσκολο να αυτοματοποιηθεί. Οι δείκτες RFLP χρησιμοποιήθηκαν κυρίως τις δεκαετίες του 1980 και του 1990, αλλά πλέον η χρήση τους έχει περιοριστεί. Οι περισσότεροι βελτιωτές φυτών θεωρούν την τεχνική πολύ επίπονη που απαιτεί πολύ καθαρό DNA για να είναι σημαντική στη βελτίωση φυτών. Εντούτοις, εξακολουθεί να είναι βασική και κρίσιμη για διάφορους τύπους επιστημονικών μελετών.

Οι RAPD δείκτες βασίζονται σε τυχαίους, μικρούς εκκινητές (συνήθως περίπου 10 νουκλεοτιδίων). Ο εκκινητής υβριδίζεται με πολλές διαφορετικές περιοχές του DNA με τις οποίες έχει ομολογία. Οι εκκινητές επάγουν την αναπαραγωγή των περιοχών αυτών προς τις δύο κατευθύνσεις, μια αναπαραγωγή που ενισχύεται σε PCR. Τα προϊόντα της PCR (μέχρι 3 kb) διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηχτή αгарόζης. Ο πολυμορφισμός μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές των βάσεων της θέσης υβριδισμού που την καθιστούν μη αναγνωρίσιμη από τον εκκινητή. Επίσης, μπορεί να οφείλεται σε απάλειψη της θέσης υβριδισμού. Στις περιπτώσεις αυτές οι εκκινητές δεν υβριδίζουν με τη συγκεκριμένη θέση, συνεπώς το τμήμα δεν αναπαράγεται στην PCR και δεν προκύπτει αντίστοιχη ζώνη στην ηλεκτροφόρηση (περίπτωση B σε σχέση με την A). Σε άλλες περιπτώσεις, η θέση υβριδισμού διαφοροποιείται από προσθήκες ή ελλείματα DNA με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται η θέση της αντίστοιχης ζώνης (Γ σε σχέση με A).

Οι RAPD δείκτες αποκαλύπτουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και μπορούν να εμφανιστούν πολλές ζώνες με ένα εκκινητή δίνοντας τη δυνατότητα εκτίμησης πολλών γονιδιακών θέσεων με λίγους εκκινητές. Η χρήση τους είναι απλή, εύκολη, όχι χρονοβόρα και με μικρό κόστος. Ειδικότερα, έχουν διάφορα πλεονεκτήματα. Πρώτο, δεν είναι αναγκαία η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στους εκκινητές ή τις περιοχές υβριδισμού. Δεύτερο, η τεχνική δεν περιλαμβάνει μεταφορά του DNA σε μεμβράνες σταθεροποίησης, γι' αυτό είναι γρήγορη, απλή και αποτελεσματική. Τρίτο, απαιτούνται μικρές ποσότητες DNA (περίπου 10 ng ανά αντίδραση) και η τεχνική αυτοματοποιείται, ενώ αποκαλύπτονται υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού σε σχέση με την RFLP τεχνική. Τέταρτο, δεν είναι αναγκαία η δημιουργία δεικτών και οι εκκινητές δεν εξειδικεύονται ως προς το είδος. Εντούτοις, έχουν μικρή επαναληψιμότητα και αξιοπιστία, ανικανότητα ανίχνευσης των

αλληλομόρφων σε ετεροζύγωτους γονοτύπους, ενώ δεν είναι η πλέον κατάλληλη τεχνική για ανίχνευση μικρών γενετικών διαφορών.

40

Οι AFLP ουσιαστικά είναι RFLP δείκτες που ενισχύονται επιλεκτικά σε PCR. Η τεχνική βασίζεται σε ενίσχυση θραυσμάτων DNA που έχουν προκύψει από πλήρη διπλή πέψη, δηλ. από το χειρισμό με δύο περιοριστικά ένζυμα. Ένας AFLP εκκινητής (μήκος 17 – 21 νουκλεοτίδια) ενισχύει την αναπαραγωγή μόνο θραυσμάτων που έχουν προκύψει και από τα δύο ένζυμα και έχουν διαφορετικά άκρα. Η διαδικασία χειρισμού του γονιδιωματικού DNA, πριν την ηλεκτροφόρηση, περιλαμβάνει τρία βήματα:

1. Εφαρμόζεται πέψη του γονιδιωματικού DNA με δύο περιοριστικά ένζυμα, ένα που 'κόβει' σπάνια και ένα που 'κόβει' συχνότερα. Η συχνότητα κοπής εξαρτάται από τον αριθμό βάσεων στην αλληλουχία της θέσης περιορισμού. Για παράδειγμα, το EcoRI με θέση περιορισμού που έχει έξι βάσεις θεωρητικά 'κόβει' ανά 4.096 βάσεις. Αυτό γιατί η πιθανότητα η συγκεκριμένη αλληλουχία (5' GAATTC 3') να βρεθεί στο DNA είναι  $1/4^6$  ( $1/4 \cdot 096$  βάσεις). Αντίθετα το MseI, για οποίο η θέση περιορισμού έχει τέσσερις βάσεις (5' TTAA 3'), κόβει πολύ συχνότερα (ανά  $4^4 = 256$  βάσεις). Δηλαδή το MseI θα κόψει 16 φορές περισσότερες από το EcoRI.
2. Στα τμήματα που έχουν προκύψει από τη δράση και των δύο ενζύμων και έχουν αντίθετα άκρα, γίνεται λιγοποίηση με την προσθήκη ενός συμβατού προσαρμοστή που έχει βάσεις αντίστοιχες του προεξέχοντος άκρου. Στη συνέχεια θα ενισχυθούν μόνο τα λιγοποιημένα τμήματα.
3. Γίνεται ενίσχυση σε PCR για την αναπαραγωγή των λιγοποιημένων τμημάτων με εκκινητές εκατέρωθεν που είναι συμβατοί (ομόλογοι) για τους προσαρμοστές που έχουν προστεθεί. Οι εκκινητές φέρουν στο 3' άκρο επιλεκτικά νουκλεοτίδια ώστε να είναι συμβατοί.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για το διαχωρισμό των ενισχυμένων τμημάτων.

Οι προσαρμοστές σχεδιάζονται με τρόπο ώστε να καταργείται η θέση περιορισμού και να ενισχύονται όλα τα λιγοποιημένα τμήματα. Ένα τυπικό AFLP αποτύπωμα περιλαμβάνει 50-100 ενισχυμένα θραύσματα, από τα οποία ένα ποσοστό έως και 80% μπορεί να χρησιμεύσουν ως γενετικοί δείκτες. Γενικά, οι προσδιορισμοί AFLP μπορούν να διεξαχθούν χρησιμοποιώντας σχετικά μικρά δείγματα DNA (1-100 ng ανά άτομο). Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι ότι δεν απαιτούνται πληροφορίες αλληλουχίας και ένα σύνολο εκκινητών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαφορετικά είδη. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο όταν άλλοι δείκτες DNA είναι σπάνιοι. Ωστόσο, οι προσδιορισμοί AFLP έχουν ορισμένους περιορισμούς. Απαιτείται υψηλής ποιότητας DNA για την πλήρη πέψη των περιοριστικών ενζύμων. Η τεχνική είναι σχετικά πολύπλοκη, απαιτεί ιδιαίτερη εξειδίκευση, είναι χρονοβόρα και έχει μεγάλο κόστος. Οι εφαρμογές των δεικτών AFLP περιλαμβάνουν μελέτες βιοποικιλότητας, γονοτύπιση ατόμων, ταυτοποίηση στενά συνδεδεμένων δεικτών DNA, κατασκευή χαρτών δεικτών DNA, χαρτογράφηση γονιδίων, κ.α.

41

Οι SSR δείκτες, ονομάζονται και μικροδορυφόροι, είναι μικρές και συνεχείς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών. Οι επαναλήψεις δύο (GT)<sub>n</sub>, τριών (AAT)<sub>n</sub> ή τεσσάρων νουκλεοτιδίων (GATA)<sub>n</sub> είναι ευρέως διαδεδομένες, με περισσότερο συχνή την πρώτη (3' ... G-T-G-T-G-T-G-T... 5'). Ο αριθμός αντιγράφων (n) μιας επανάληψης ποικίλλει μεταξύ των ατόμων και αποτελεί πηγή πολυμορφισμού στα φυτά. Οι αλληλουχίες DNA που πλευρίζουν την περιοχή ενός μικροδορυφόρου είναι συνήθως σταθερές, οπότε κατάλληλοι εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των μικροδορυφόρων σε PCR και η ηλεκτροφόρηση αποκαλύπτει τον πολυμορφισμό τους. Ο δείκτης μπορεί να συνδέεται με ένα γονίδιο και διαφορετικοί αριθμοί της μικροδορυφορικής επανάληψης

να αποκαλύπτουν διαφορετικές μορφές του γονιδίου (πχ, συγκεκριμένος αριθμός επανάληψης να συνδέεται με μεταλλαγμένο αλληλόμορφο).

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των μικροδορυφόρων είναι το υψηλό επίπεδο ποικιλότητας που τους καθιστά πολύτιμους γενετικούς δείκτες. Οι μοναδικές αλληλουχίες που συνορεύουν με τους μικροδορυφόρους παρέχουν πρότυπα για συγκεκριμένους εκκινητές για την ενίσχυση των αλληλομόρφων SSR μέσω PCR. Οι δείκτες SSR χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη μεταβλητότητα, επαναληψιμότητα, συνκυρίαρχη φύση, εξειδίκευση της θέσης και τυχαία κατανομή σε όλο το γονιδίωμα στις περισσότερες περιπτώσεις. Τα πλεονεκτήματα των δεικτών SSR είναι ότι μπορούν να αναλυθούν εύκολα με PCR και να ανιχνευθούν εύκολα. Οι αναλύσεις SSR απαιτούν πολύ μικρά δείγματα DNA (~100 ng ανά άτομο), έχουν χαμηλό κόστος και μπορούν να αυτοματοποιηθούν. Ωστόσο, η τεχνική SSR απαιτεί πληροφορίες νουκλεοτιδίων για το σχεδιασμό εκκινητών, ενώ για αυτοματοποιημένες ανιχνεύσεις έχει υψηλό κόστος εκκίνησης. Οι δείκτες SSR έχουν ευρεία εφαρμογή στην κατασκευή χαρτών γενετικής σύνδεσης, στη χαρτογράφηση QTLs, ενώ έχουν αναπτυχθεί δείκτες SSR χρήσιμοι στη βελτίωση διάφορων φυτών. Για παράδειγμα, υπάρχουν πάνω από 35.000 δείκτες SSR που έχουν αναπτυχθεί και έχουν χαρτογραφηθεί στα 20 χρωμοσώματα της σόγιας, οι οποίοι είναι ελεύθερα διαθέσιμοι.

42

Η διαφορά σε ένα νουκλεοτίδιο μεταξύ δύο αλληλουχιών DNA συνιστά ένα SNP. Τα SNP προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις τύπου μετάπτωσης (πχ AT → GC) ή μεταστροφής βάσεων (πχ AT → TA) και αφαίρεσης ή προσθήκης βάσης. Τα SNP παρέχουν την απλούστερη μορφή μοριακών δεικτών γι' αυτό είναι οι πολυπληθέστεροι στα φυτά και η τυπική συχνότητά τους είναι ένα SNP ανά 100-300 βάσεις. Η παρουσία και κατανομή τους ποικίλλει μεταξύ των ειδών και εκτιμάται περίπου σε ένα SNP ανά 60 – 120 βάσεις στο καλαμπόκι, ανά 20 βάσεις σε ορισμένες περιοχές του σιταριού και ανά 1.000 βάσεις στον άνθρωπο. Η θέση των SNPs επίσης ποικίλλει και μπορεί να εμφανίζονται σε κωδικοποιητικές αλληλουχίες γονιδίων, μη κωδικοποιητικές περιοχές γονιδίων ή σε περιοχές μεταξύ γονιδιακών θέσεων. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι με τους δείκτες SNP για το διαχωρισμό αλληλομόρφων. Μια απλή μέθοδος για την ανίχνευση SNP είναι τύπου RFLP (SNPRFLP). Εάν ένα αλληλόμορφο περιέχει μια θέση αναγνώρισης για ένα ένζυμο περιορισμού ενώ το άλλο όχι, η πέψη των δύο αλληλόμορφων θα παράγει διαφορετικά σε μήκος θραύσματα. Η αλληλουχία που είναι διαθέσιμη σε ένα είδος καλλιέργειας με δείκτες SNP μπορεί να συγκριθεί με τα δεδομένα αλληλουχίας που είναι αποθηκευμένα στις κύριες βάσεις δεδομένων και να προσδιορίσει τα SNPs.

Τα SNP είναι συν-κυρίαρχοι δείκτες. Το γεγονός ότι υπάρχουν στην απλούστερη μορφή πολυμορφισμού σε συνδυασμό με τη σύνδεσή τους με γονίδια, τους καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικούς σε γενετικές μελέτες. Επιπλέον, τα SNP μπορούν πολύ εύκολα να αυτοματοποιηθούν και να ανιχνευθούν γρήγορα, με υψηλή απόδοση για την ανίχνευση πολυμορφισμού. Ως εκ τούτου, αναμένεται ότι τα SNP θα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για διάφορους σκοπούς, καθώς γίνονται διαθέσιμα για όλο και περισσότερα είδη (π.χ. ρύζι, σόγια, καλαμπόκι, κ.λπ.). Ωστόσο, το υψηλό κόστος για την εκκίνηση ή την ανάπτυξη δεικτών, το απαιτούμενο DNA υψηλής ποιότητας και οι υψηλές απαιτήσεις τεχνικού/εξοπλισμού περιορίζουν, σε κάποιο βαθμό, την εφαρμογή των δεικτών SNP στη γενετική ανάλυση των φυτών.

43

Ορισμένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των δεικτών DNA δίνονται συγκριτικά στον πίνακα. Τα πλεονεκτήματα ή τα μειονεκτήματα ενός συστήματος δεικτών σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τους σκοπούς της έρευνας, τους διαθέσιμους γενετικούς πόρους ή βάσεις δεδομένων, τον εξοπλισμό και τις εγκαταστάσεις, τη χρηματοδότηση και τους πόρους προσωπικού κ.λπ. Η επιλογή και η χρήση δεικτών DNA εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση για τους βελτιωτές φυτών. Ένας

βελτιωτής πρέπει να κάνει την κατάλληλη επιλογή που ανταποκρίνεται καλύτερα στις απαιτήσεις σύμφωνα με τις συνθήκες και τους πόρους που είναι διαθέσιμοι για το πρόγραμμα βελτίωσης.