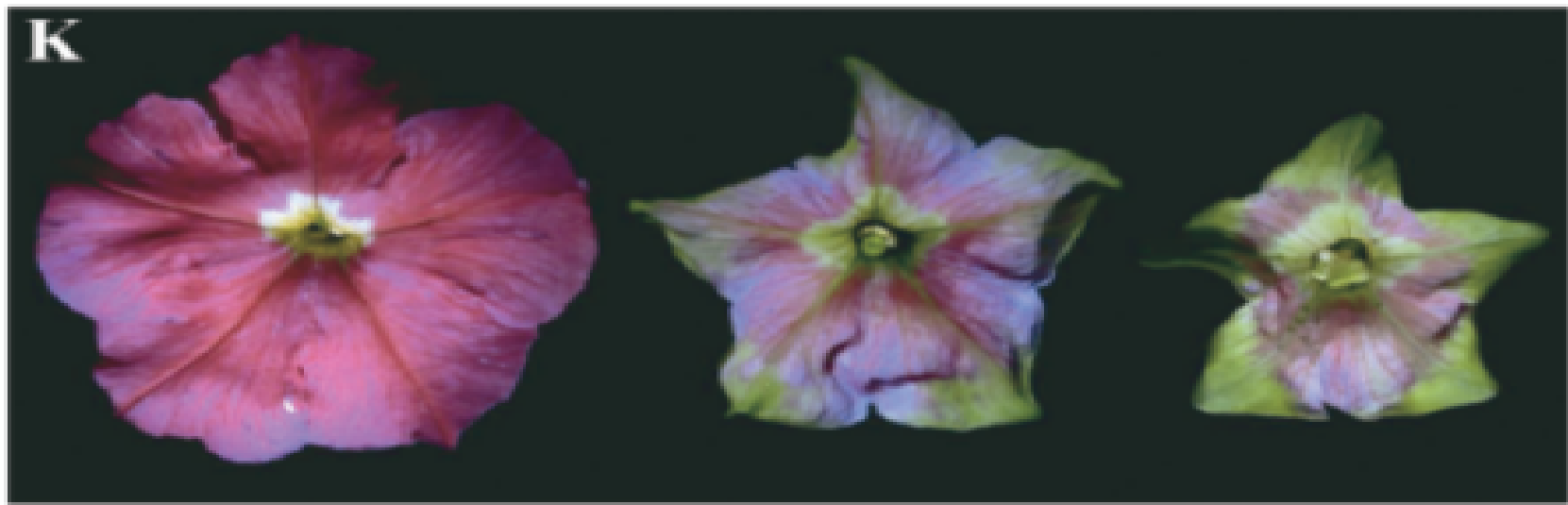


Métodos para inducir mutagénesis en plantas



Claudia Stange
Curso Biología Molecular
Enero 2012

METODOS PARA INDUCIR MUTAGÉNESIS EN PLANTAS

Genética clásica:

Del fenotipo (natural o inducido) al gen

Genética Reversa:

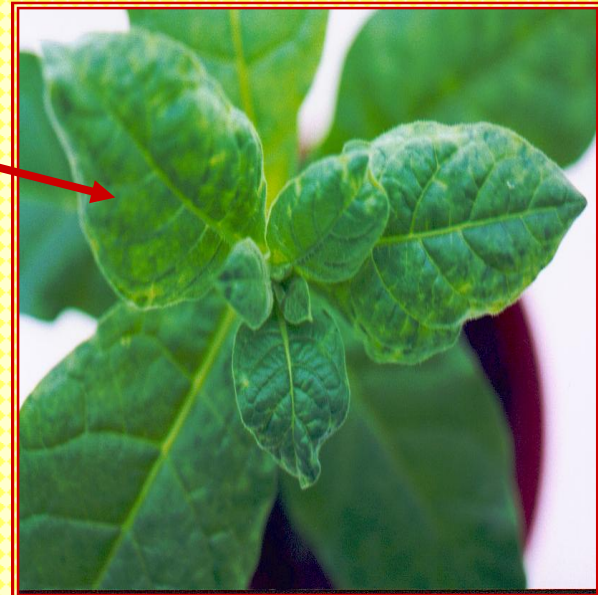
Mutación de un gen y observar fenotipo

GENÉTICA CLÁSICA



TABACO Xanthi NN

TMVU1



TABACO Xanthi nn

¿POR QUÉ ESTA PLANTA NO SE ENFERMA FRENTE A UN VIRUS Y LA OTRA SÍ?

IDENTIFICAR EL O LOS GENES INVOLUCRADOS

GENÉTICA CLÁSICA

CRUZAMIENTO DE LINEAS CON DISTINTOS FENOTIPOS

MARCADORES MOLECULARES: microsatelites, SSLP, CAPS

CLONAJE POSICIONAL

MAPA GÉNICO

IDENTIFICACIÓN DEL GEN

CRUZAMIENTO DE LINEAS CON DISTINTOS FENOTIPOS

S: CARÁCTER DE RESISTENCIA

s: CARÁCTER DE SENSIBILIDAD

N: Otra Característica alélica

F1: Recombination

son1 (*L. esculentum*)



X

L. pennellii



F1



F1 gametes

parental



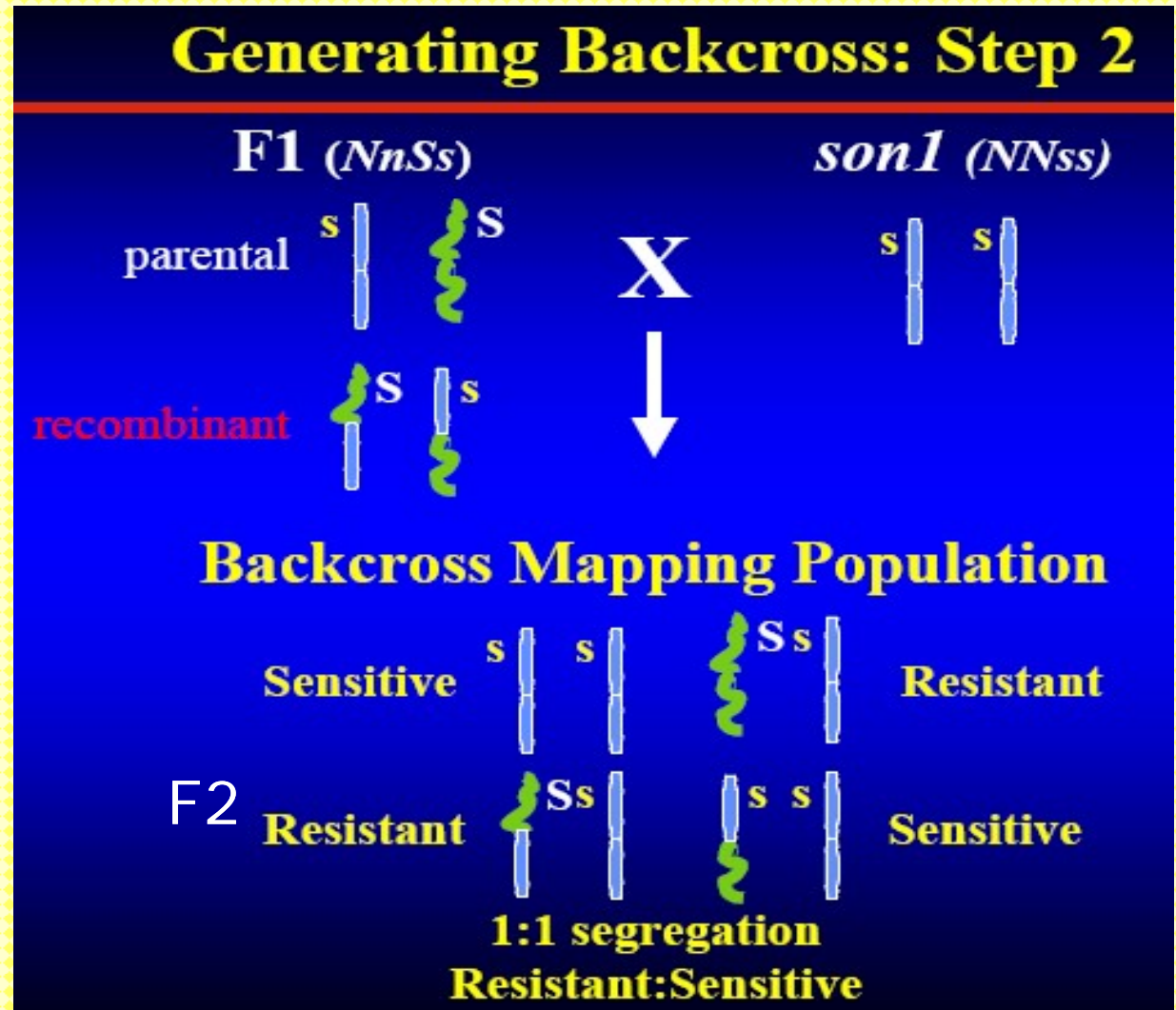
recombinant



CRUZAMIENTO DE LINEAS CON DISTINTOS FENOTIPOS

RETROCRUCE DE F1 CON LÍNEA PARENTAL SENSIBLE
(O RESISTENTE)

Se realiza análisis con marcadores moleculares a parentales y líneas segregantes



MARCADORES MOLECULARES

Hibridación tipo Southern

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

PCR: STS (Sequence-Tagged Site)

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

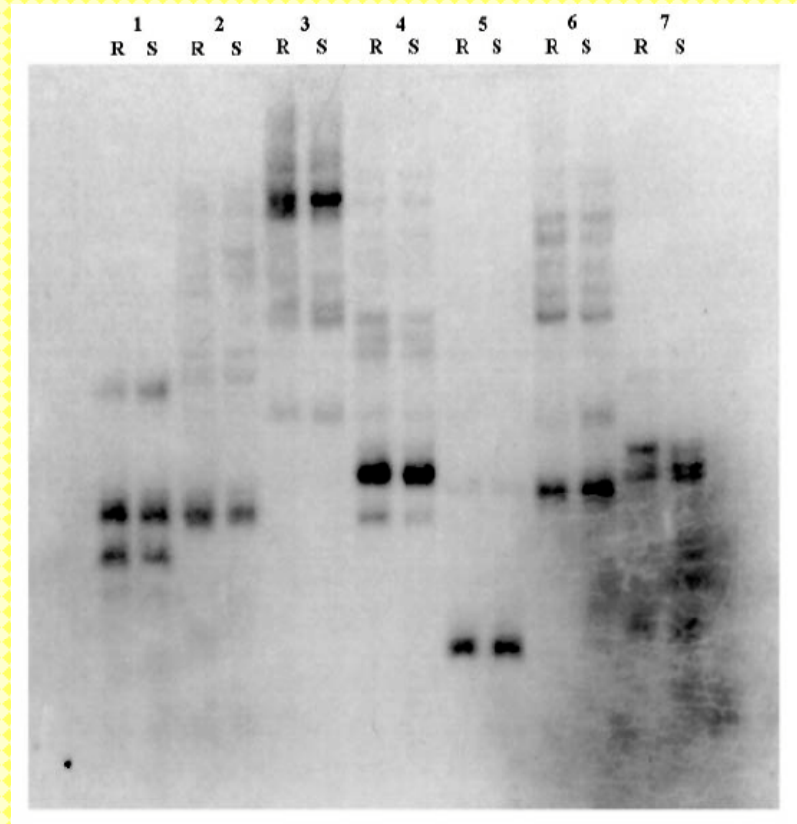
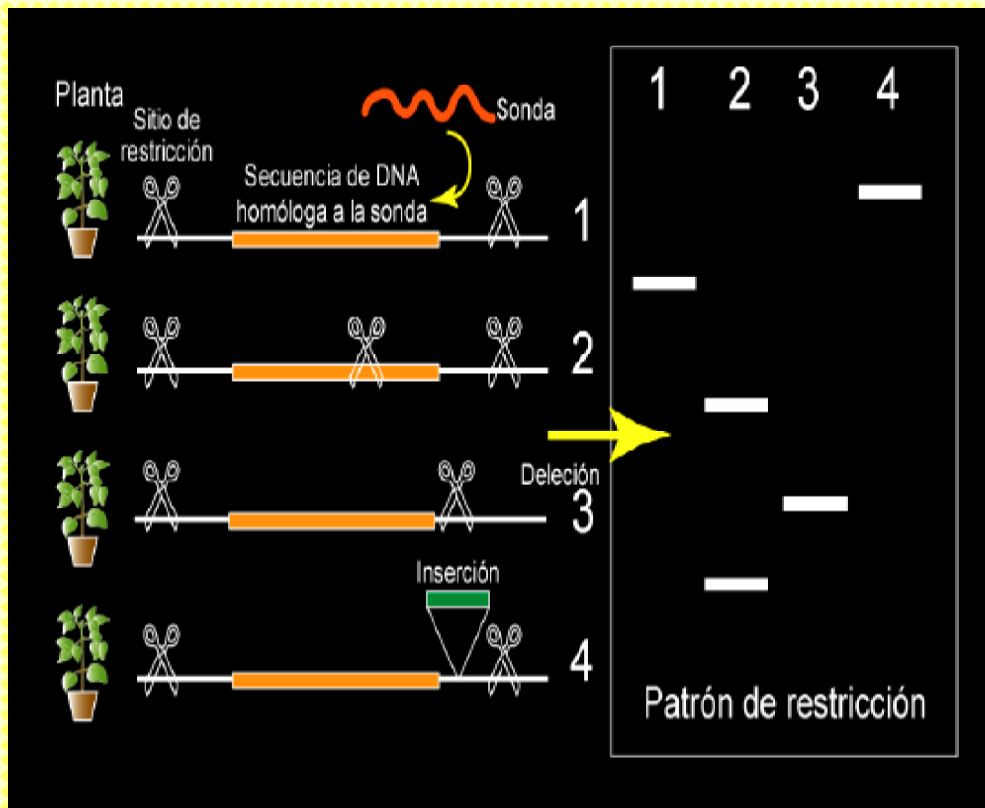
SCAR: Sequence Characterized Amplified Region

CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences.

Muestra restricciones polimórficas dada por la digestion de PCR.

SSLP: Simple Sequence Length Polymorphism , muestra variabilidad en secuencias cortas repetidas.

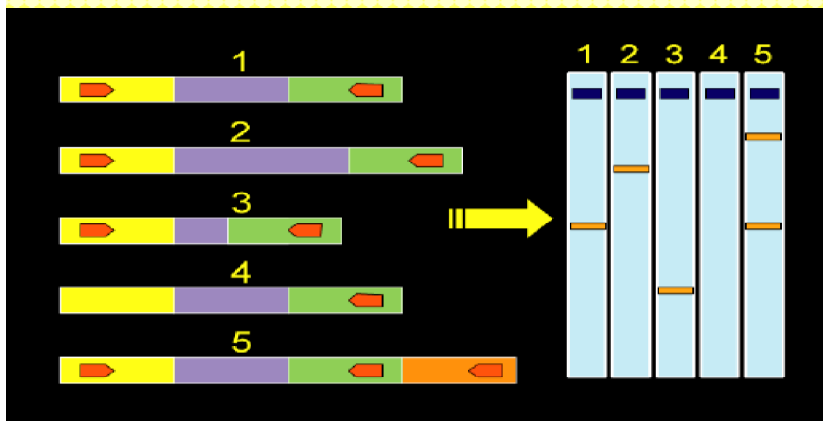
Marcadores RFLP



Ventajas: Uso de sondas heterólogas, reproducibles, codominantes.

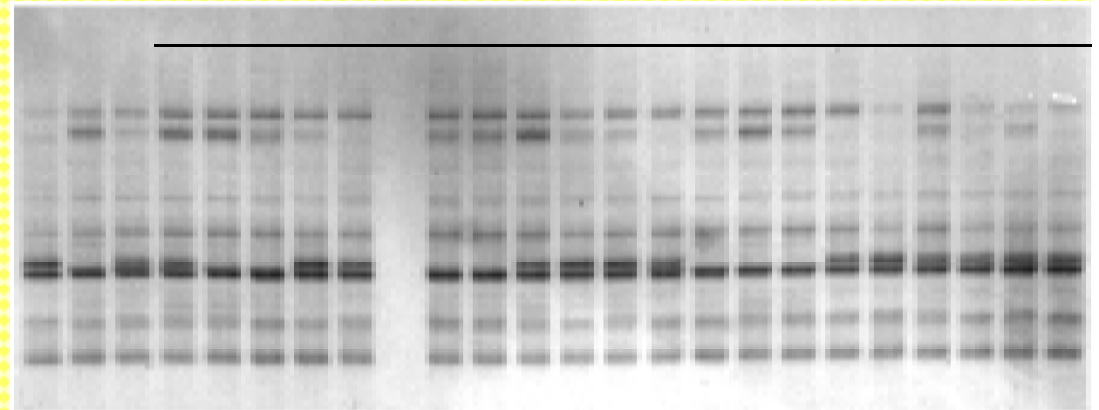
Desventajas: Bajo nivel de polimorfismo, requiere disponer de sondas conocidas, uso de radiactividad, alta cantidad DNA, laborioso y lento

Un único oligonucleótido de 10 bases, al azar, GC
Más polimórfico que RFLP
Múltiples bandas.
No se requiere conocimiento previo del genoma
Marcadores moleculares dominantes
Una banda no necesariamente es un único fragmento
Baja Reproducibilidad



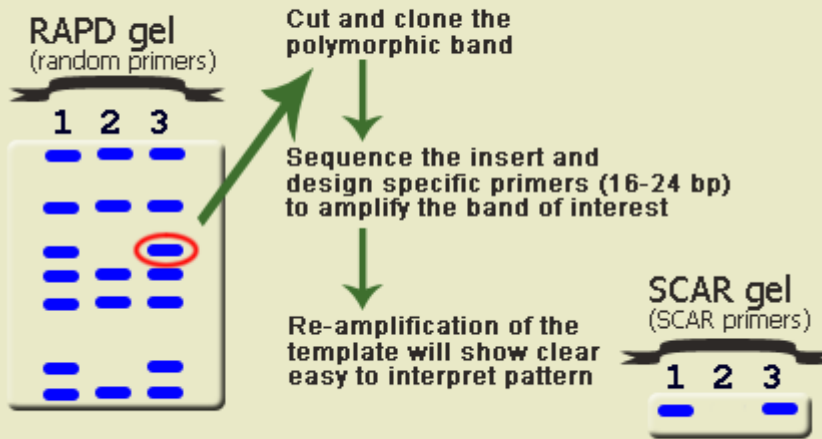
ISB2F1

F2



RAPD de Sorgho para segregación de carácter de resistencia a brotado precosecha. DNAs de IS, B2 (parentales), F1 y F2 amplificados con el primer OP H02. Eduardo Hepp

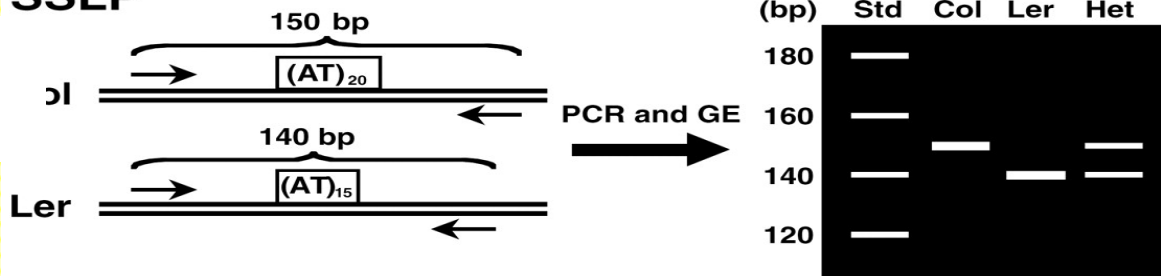
SCAR procedure



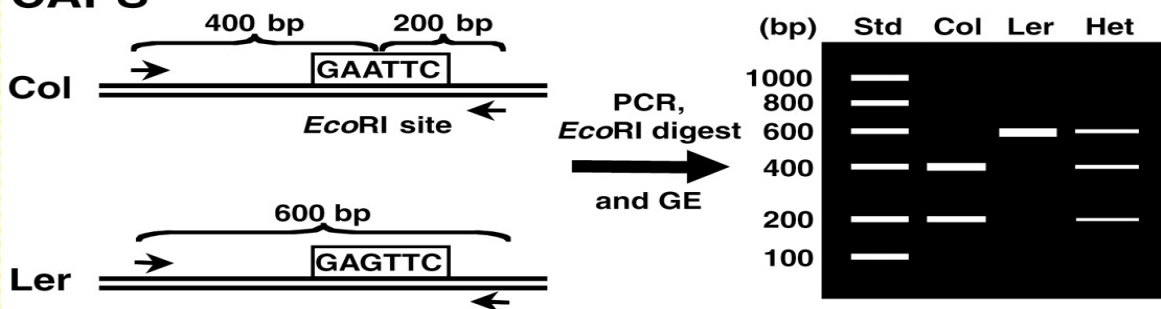
Permiten establecer mapas en los cromosomas

Permiten establecer marcadores asociados a la característica estudiada

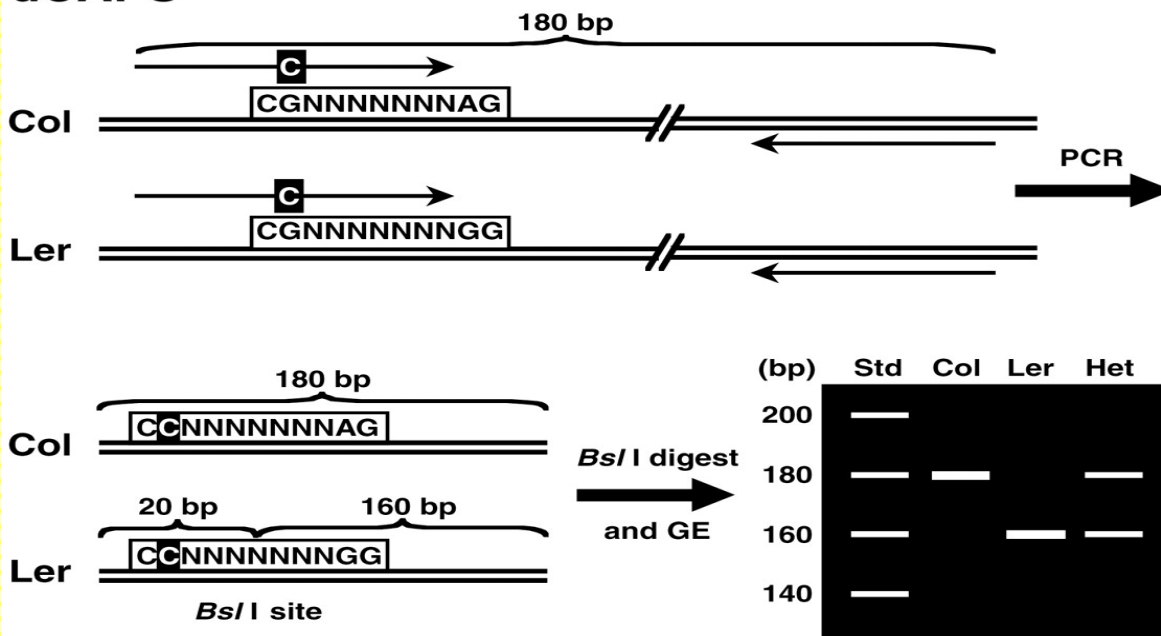
SSLP



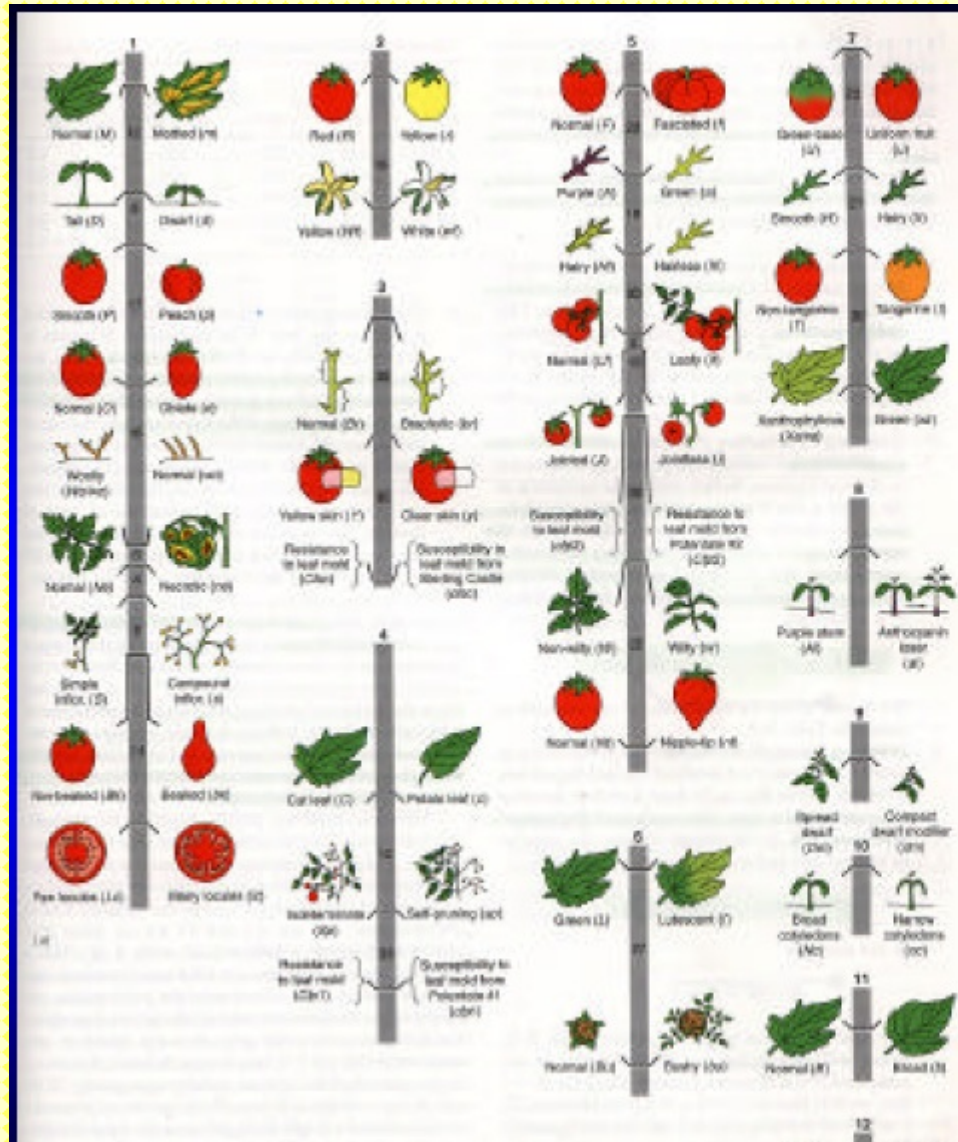
CAPS



dCAPS



CLONAJE POSICIONAL



Tomato Linkage Map 1952

Mapa de ligamiento, muestra los grupos de ligamiento.

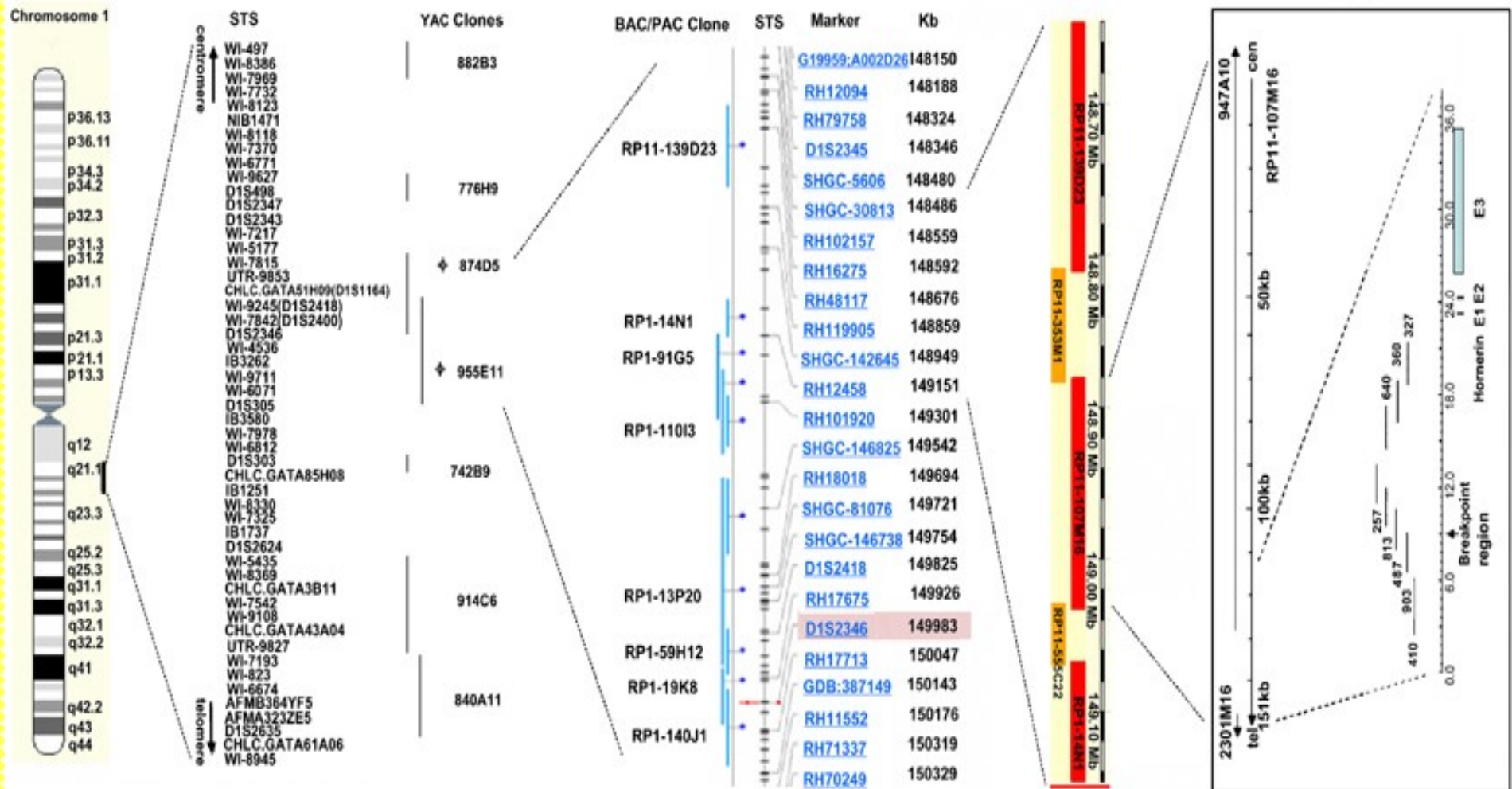
Cada locus está delimitado indicando el fenotipo que I identificó al locus

A la izq: locus normal, derecha: variante.

Los nuevos loci que se Encuentran se mapean relativo a los ya existentes.

CLONAJE POSICIONAL

Mmolec. STS, Clones YAC, Clones BAC



Se identifica el gen responsable de la característica

IDENTIFICACIÓN DEL GEN ?

Una vez encontrado el "posible" gen:

Ensayos de complementación

Análisis molecular de genes candidatos

Problemas:

Carácter controlado por varios genes...dominancia, semidominancia.

Regiones genómicas con bajo nivel de recombinación

Poca cantidad de secuencias repetidas

GENÉTICA REVERSA

HERRAMIENTAS

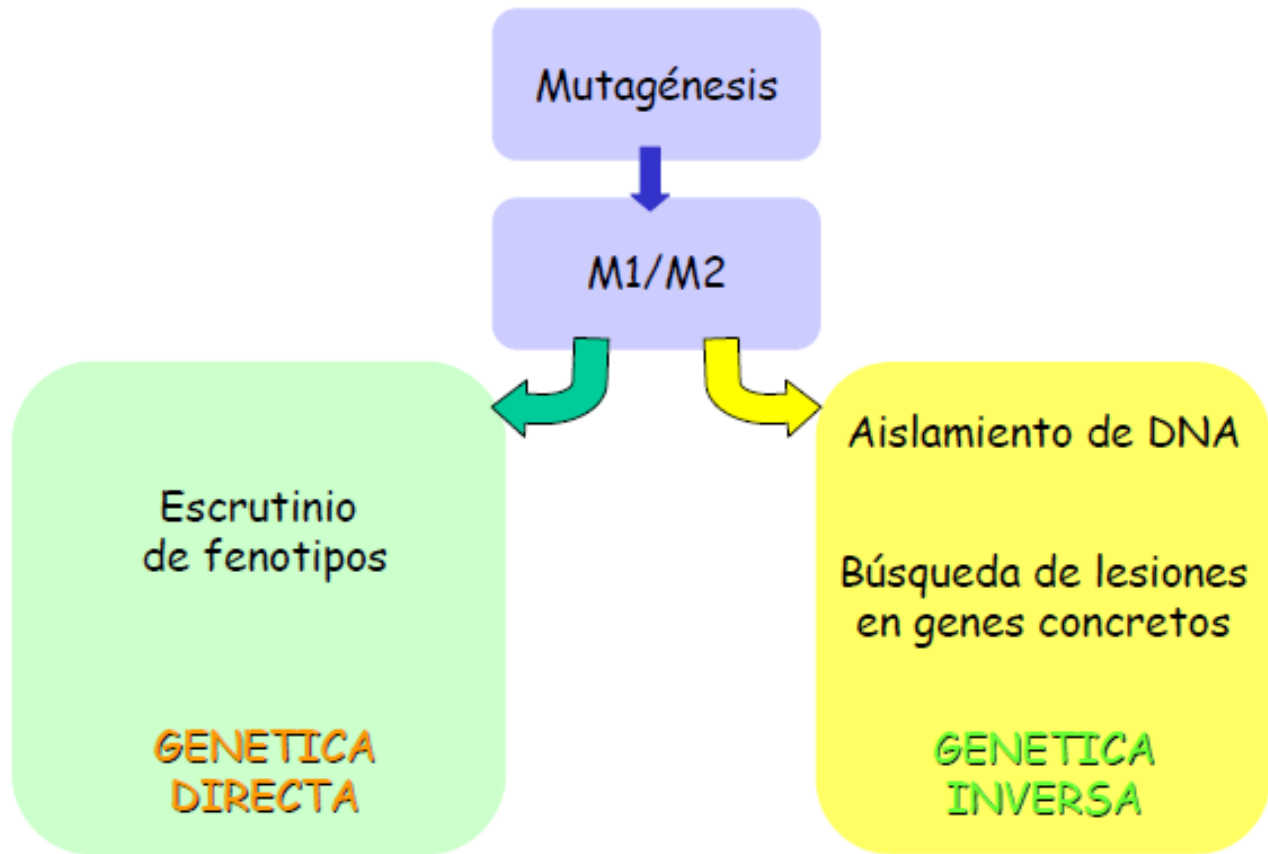
MUTAGÉNESIS: **Knock out**

- T-DNA
 - TRANSPOSONES
 - GEN TRAP
 - EMS = **MUTACION PUNTUAL**
 - NEUTRONES = **DELECIÓN**
- } **INSERCIONAL**

SILENCIAMIENTO GÉNICO: **Knock down**

- ANTI SENTIDO
- VIGS

1. Colecciones de mutantes



GENÉTICA REVERSA

MUTAGENESIS INSERCIONAL

Transposones Retrotransposón de maíz
(En/Spm, Ac/Ds y Mu).

Facilidad en la generación de grandes colecciones

Posibilidad de reversión

Inestables

T-DNA

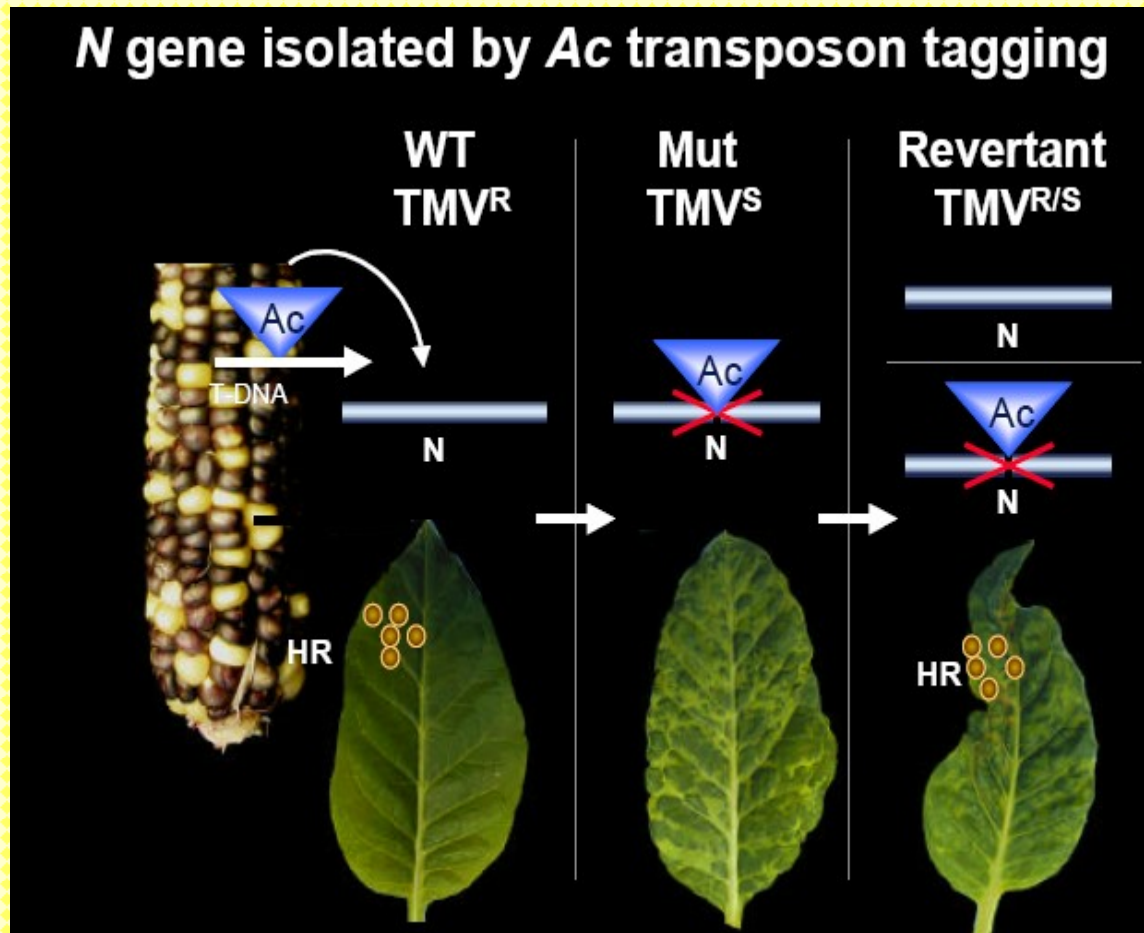
Menor número de copias

Mayor estabilidad

Sin preferencias por el sitio de inserción

Necesidad de transgénesis

MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: TRANSPOSONES

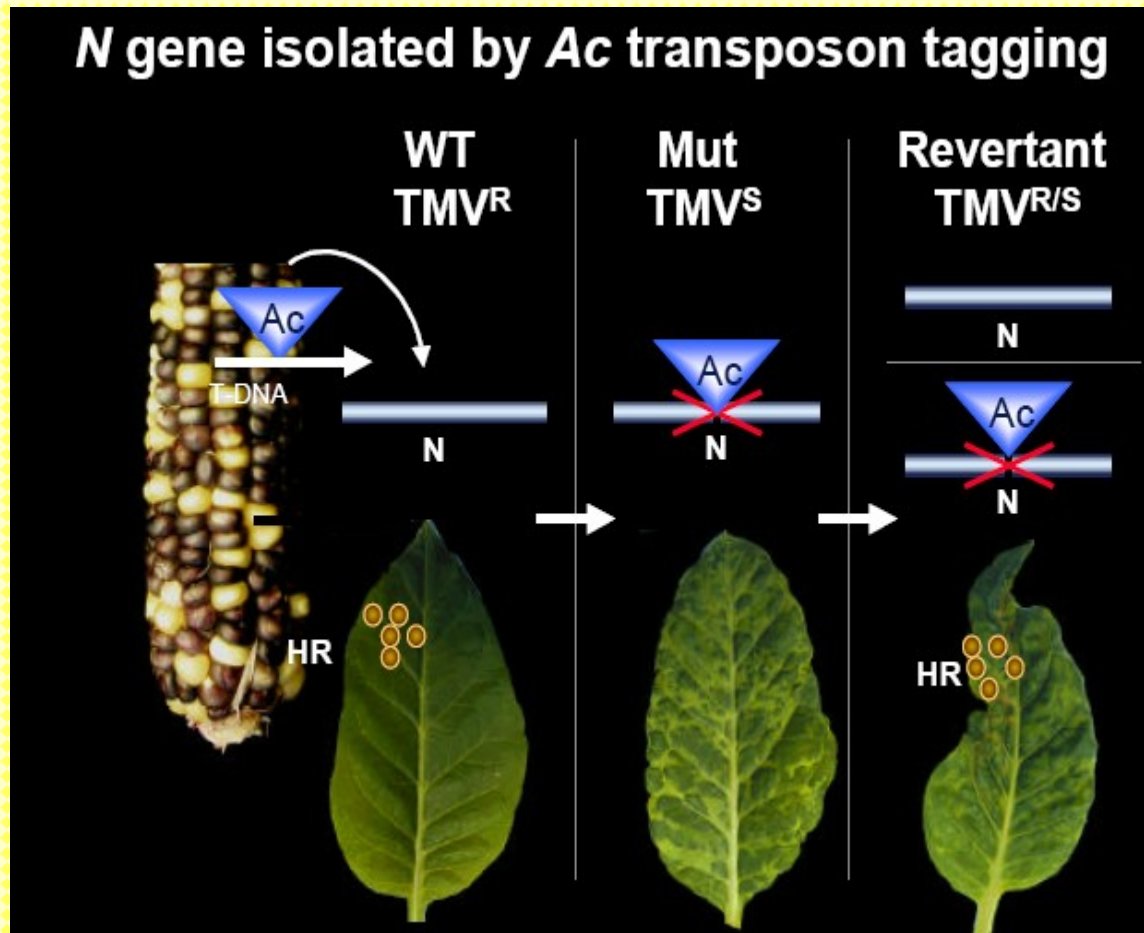


Al conocer la secuencia del transposón Ac, permite la identificación por PCR de la secuencia interrumpida, pero son inestables...

MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: TRANSPOSONES



MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: TRANSPOSONES



Caracterización:
Complementación
en plantas
sensibles a TMV
que no poseen gen
N.

MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: T-DNA

Banco de mutantes de arroz mediante el T-DNA.

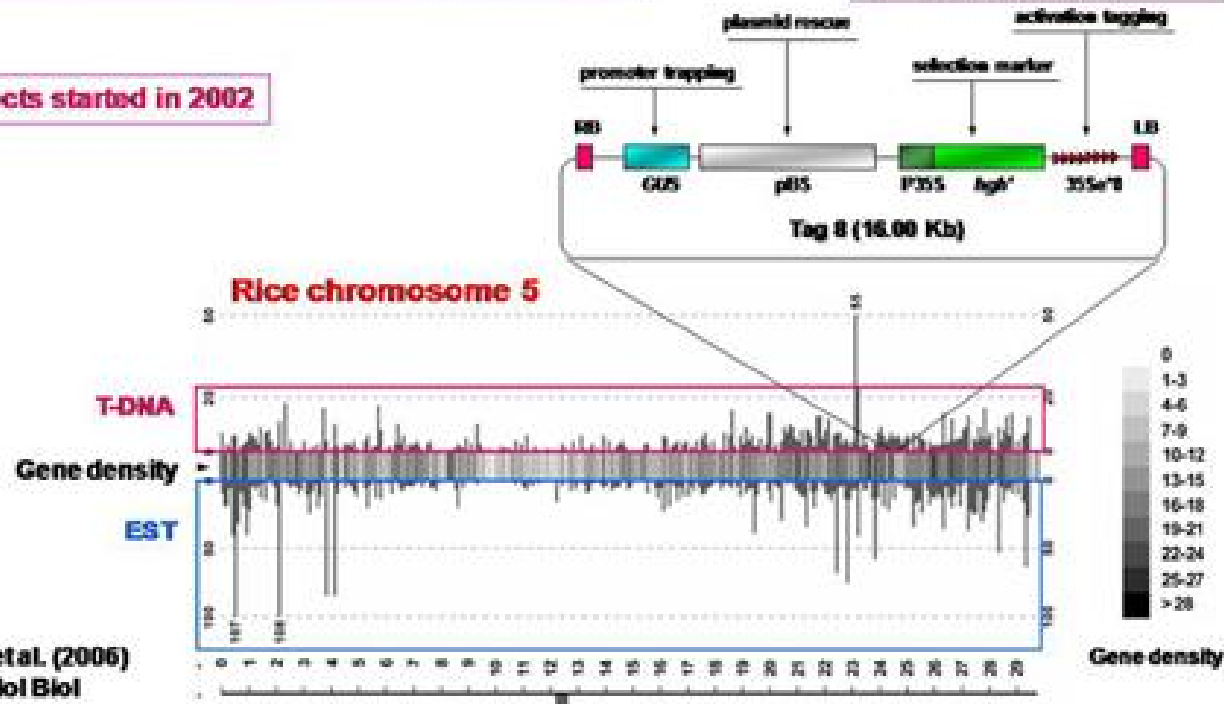
The rice gene activation/knockout mutant library generated in Taiwan

Population: 60,000 T-DNA tagged gene activation/knockout lines
Database: 20,000 flanking sequence tags + mutant phenotypes

Projects started in 2002

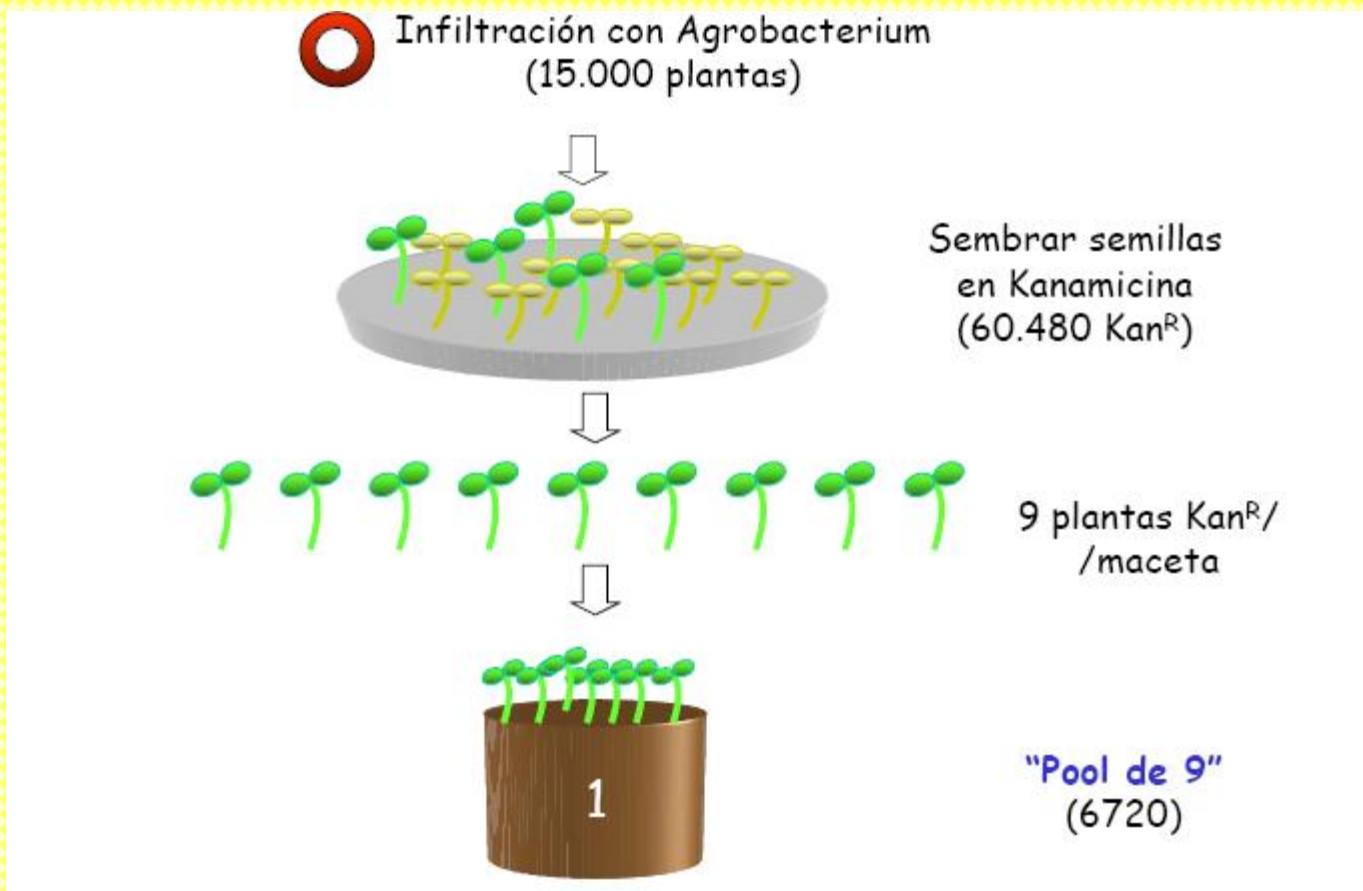
Multiple-function T-DNA for

- Gene knockout
- Gene activation
- Promoter gene trapping
- Plasmid rescue

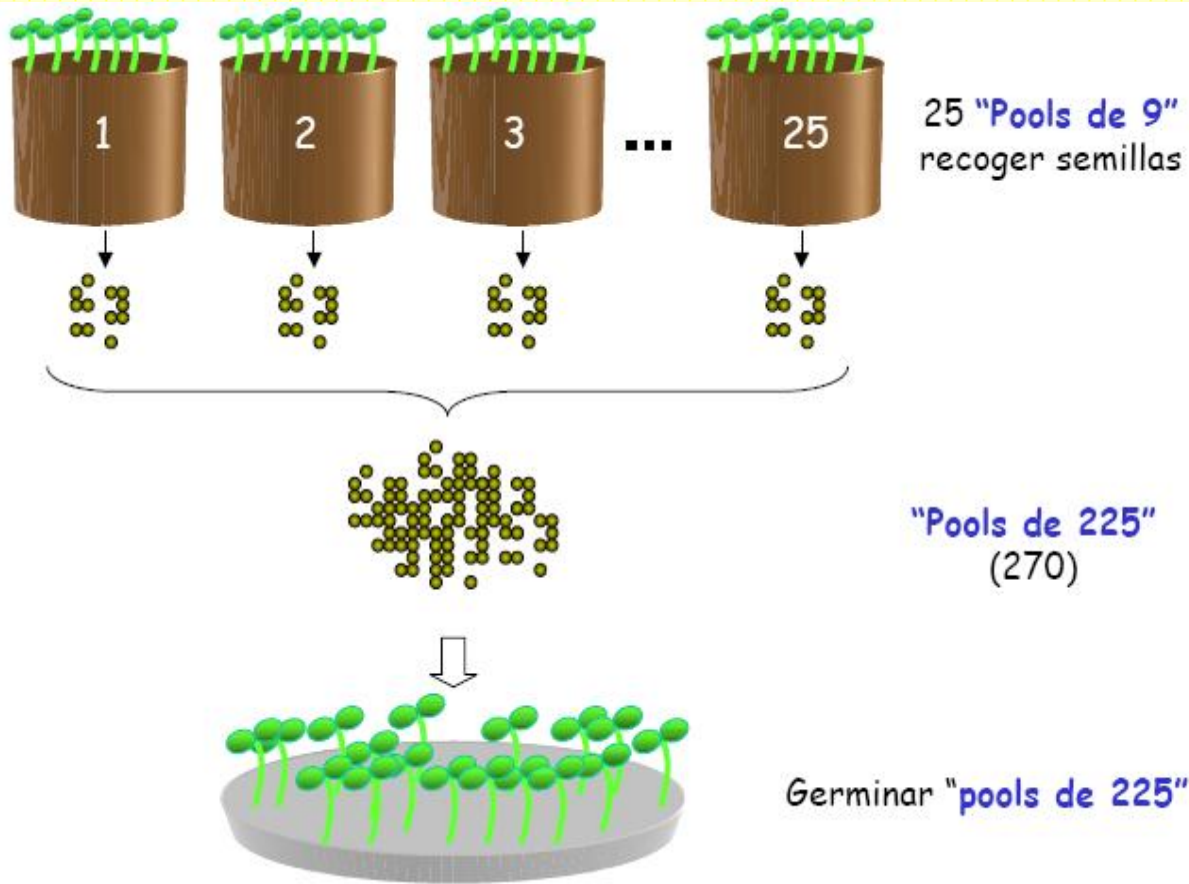


MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: TRANSPOSONES o T-DNA

¿Como identificar una mutación... en un gen específico entre los 25.500 genes en el genoma de Arabidopsis y en un conjunto de 100.000 plantas con mutaciones distribuidas al azar?



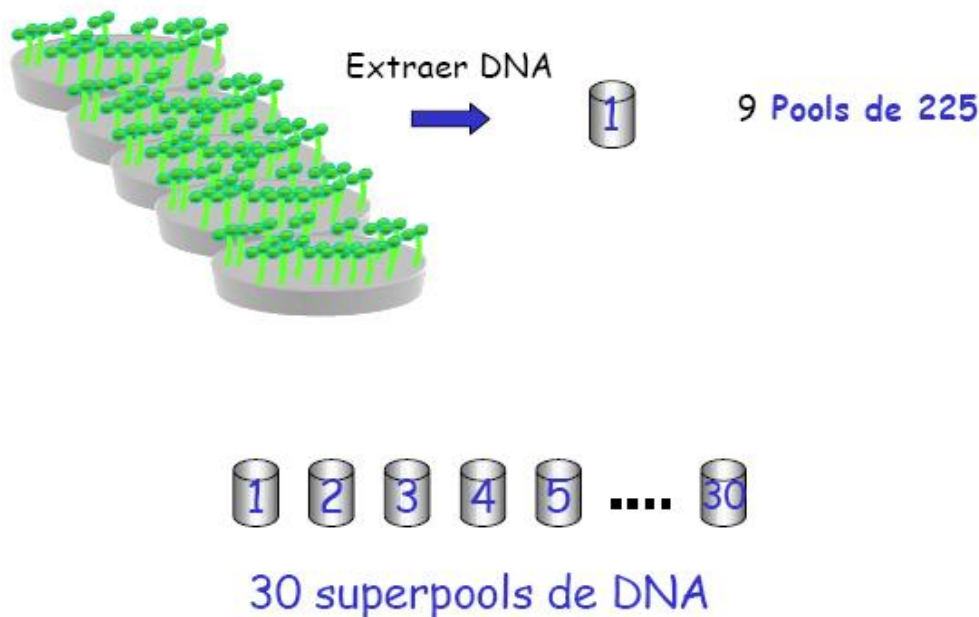
MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: TRANSPOSONES o T-DNA



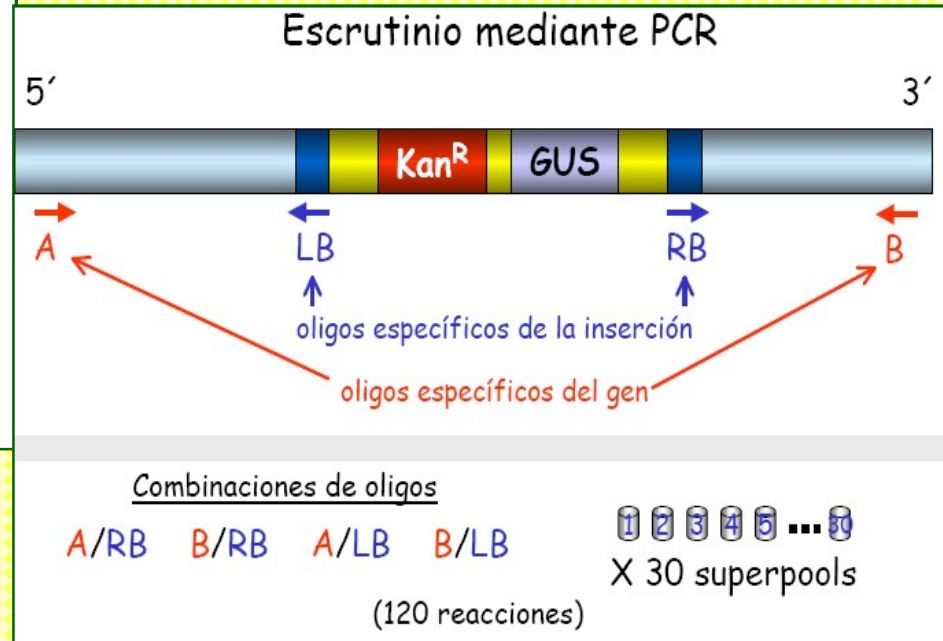
9 plantas en cada Mini pool se agrupan en grupos de 25 pools $9 \times 25 = 225$en total son 60750 plantas, entonces hay 270 pools de 225 (9×25)

Los 270 pools se agrupan en 30 super pools de 9 pools c/u ($9 \times 9 \times 25$)

MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: TRANSPOSONES o T-DNA

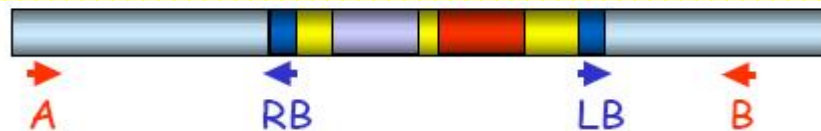


Extraer DNA a los 30 superpools
(con muestras de todas las plantas)



Combinación de partidores para
realizar el análisis molecular

MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: TRANSPOSONES o T-DNA



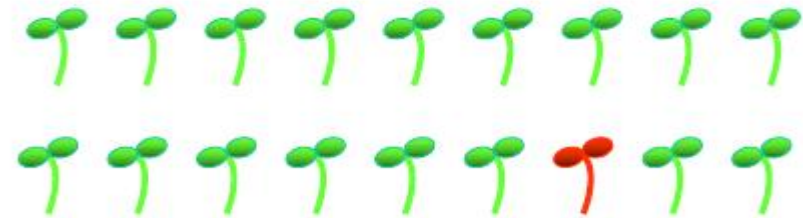
A/RB B/RB A/LB B/LB



4 Superpool #4

Pool de 9 # 3

↓ Sembrar



PCR con
A/RB B/RB A/LB B/LB
Hasta identificar individuo

Super pool 4 tiene 9 pools de (25x9) plantas.

Ahora analizar cual de esos 9 pools tiene la planta mutante, luego identificar que pool de 9x25 sigue con la marca hasta identificar aquella mutante del gen de interés.

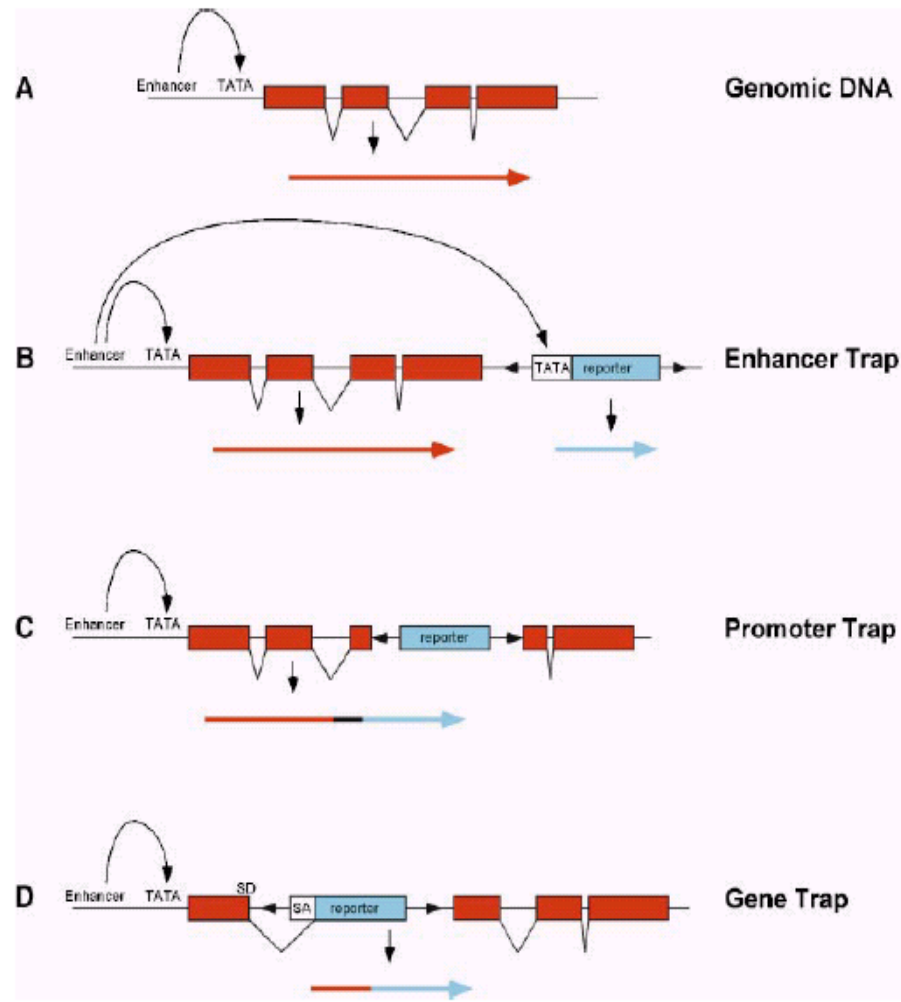
Esta se deja semillar y de las plantas homocigotas se vuelve a realizar el estudio

MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: TRANSPOSONES o T-DNA

Inconvenientes mutagenesis insercional

- No se puede estudiar la falta de función de genes duplicados en tándem
- Requiere un número bastante grande de líneas para conseguir la saturación
- Sólo se puede llevar a cabo en especies transformables o con transposones internos

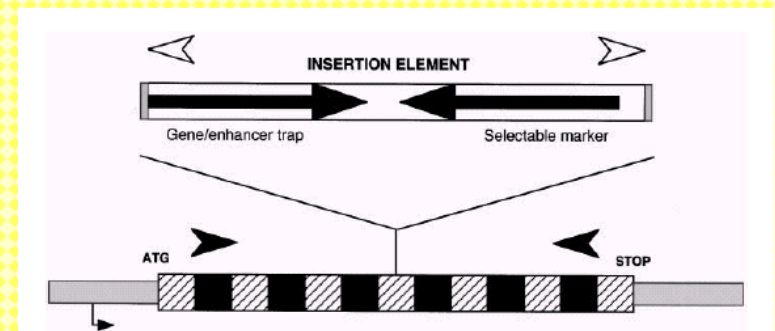
MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: GEN-TRAP



En rojo, gen de interés
En celeste gen reportero GUS,
GFP, YFP

Se evalúa al transformar al azar
Si la inserción ocurrió:
B: cercano a un enhancer de un
genX

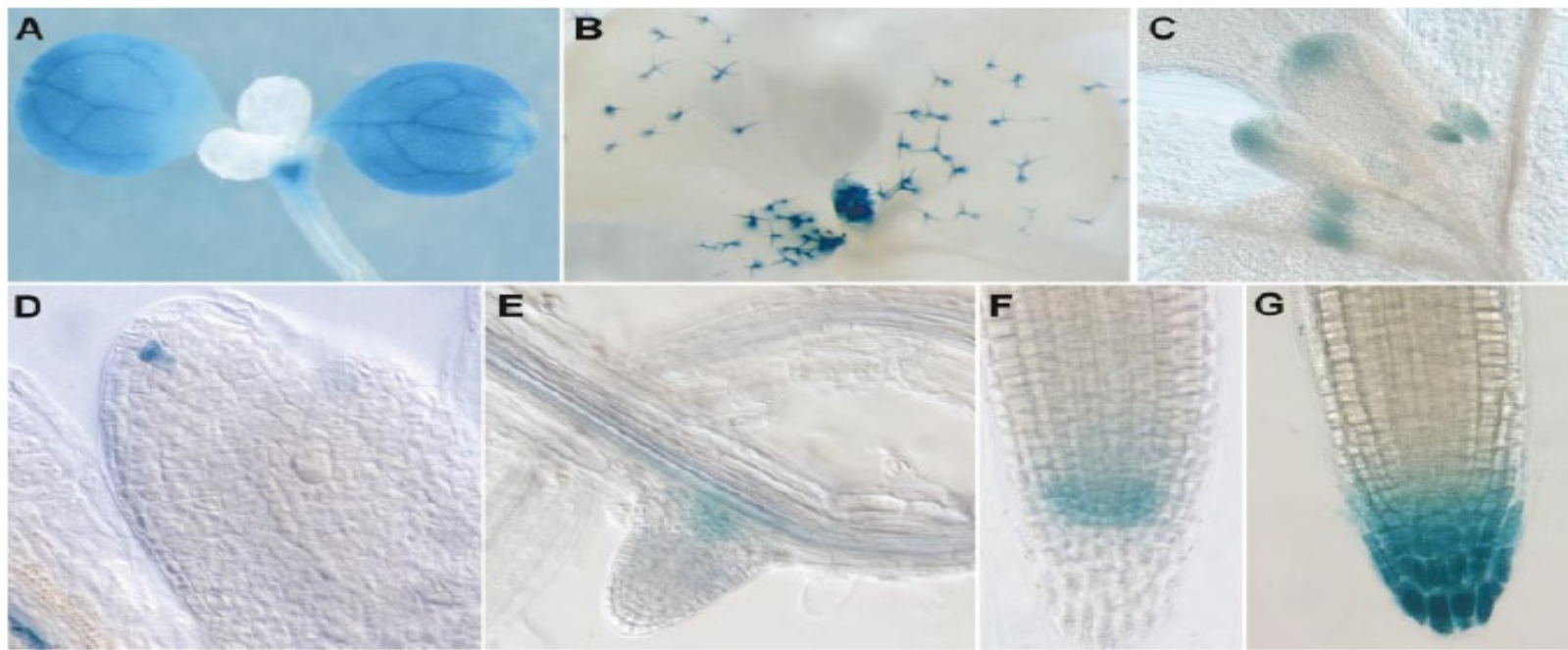
C y D: dentro de un gen X,
obteniéndose una proteína trunca
fusionada a GUS.



MUTAGÉNESIS INSERCIONAL: GEN-TRAP

El gen es identificado sin necesidad de un fenotipo mutante, lo cual es útil para Genes redundantes y Genes activos en distintos estadios de desarrollo .

La función génica puede caracterizarse en base a resultados de actividad del gen reportero.



GENÉTICA REVERSA

HERRAMIENTAS

MUTAGÉNESIS:

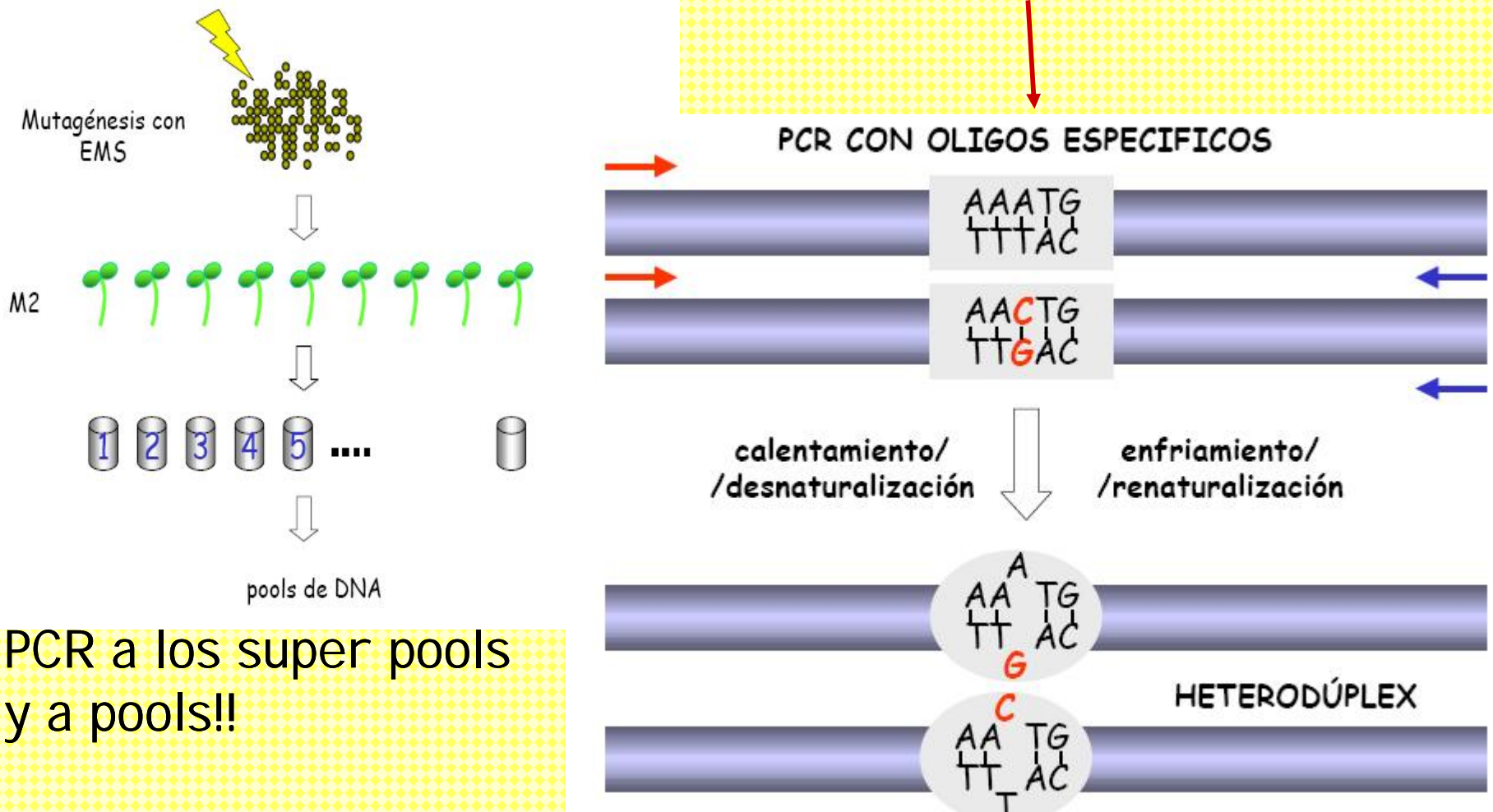
- T-DNA
 - TRANSPOSONES
 - GEN TRAP
- } **INSERCIONAL**
- EMS = **MUTACION PUNTUAL**
 - NEUTRONES = **DELECIÓN**

SILENCIAMIENTO GÉNICO

- ANTI SENTIDO
- VIGS

MUTACIÓN PUNTUAL: EMS

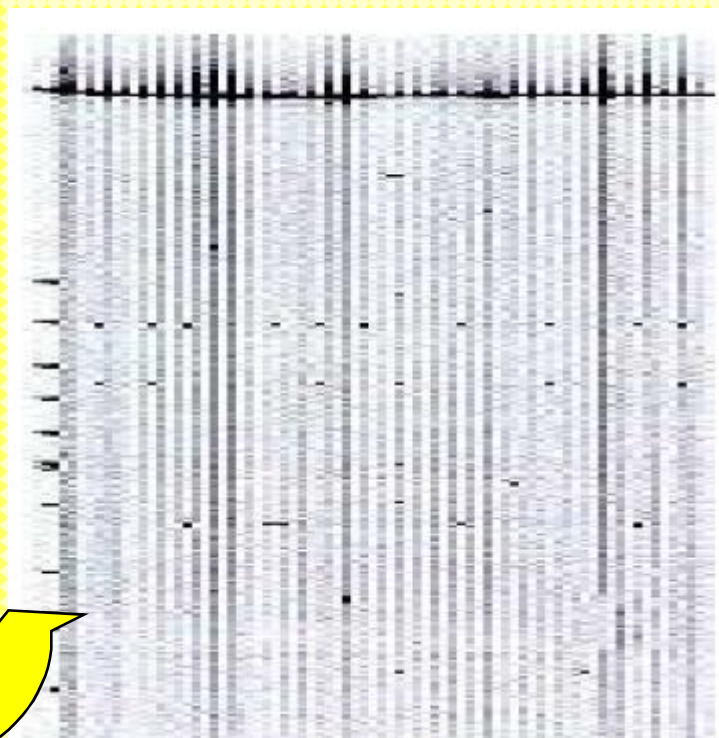
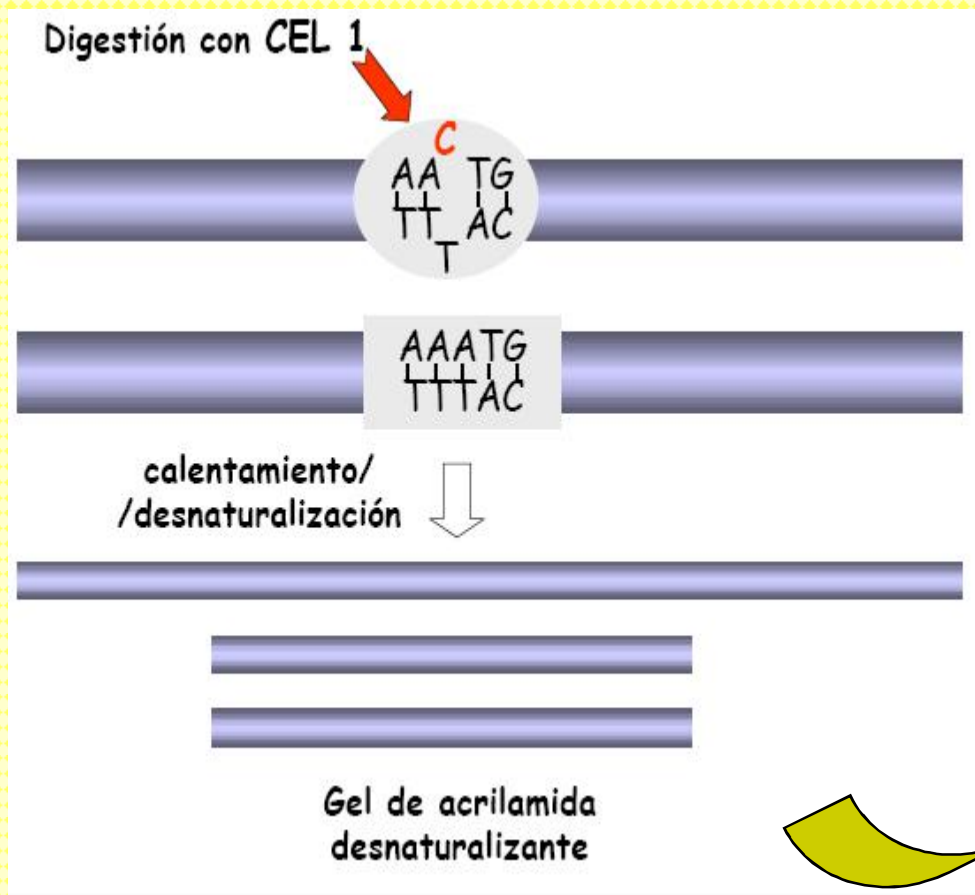
TILLING: Targeting Induced Local Lesions IN Genomes



PCR a los super pools
y a pools!!

MUTACIÓN PUNTUAL: EMS

TILLING: Targeting Induced Local Lesions IN Genomes



Identificación del pool.....
Y así se llega al gen

GENÉTICA REVERSA

HERRAMIENTAS

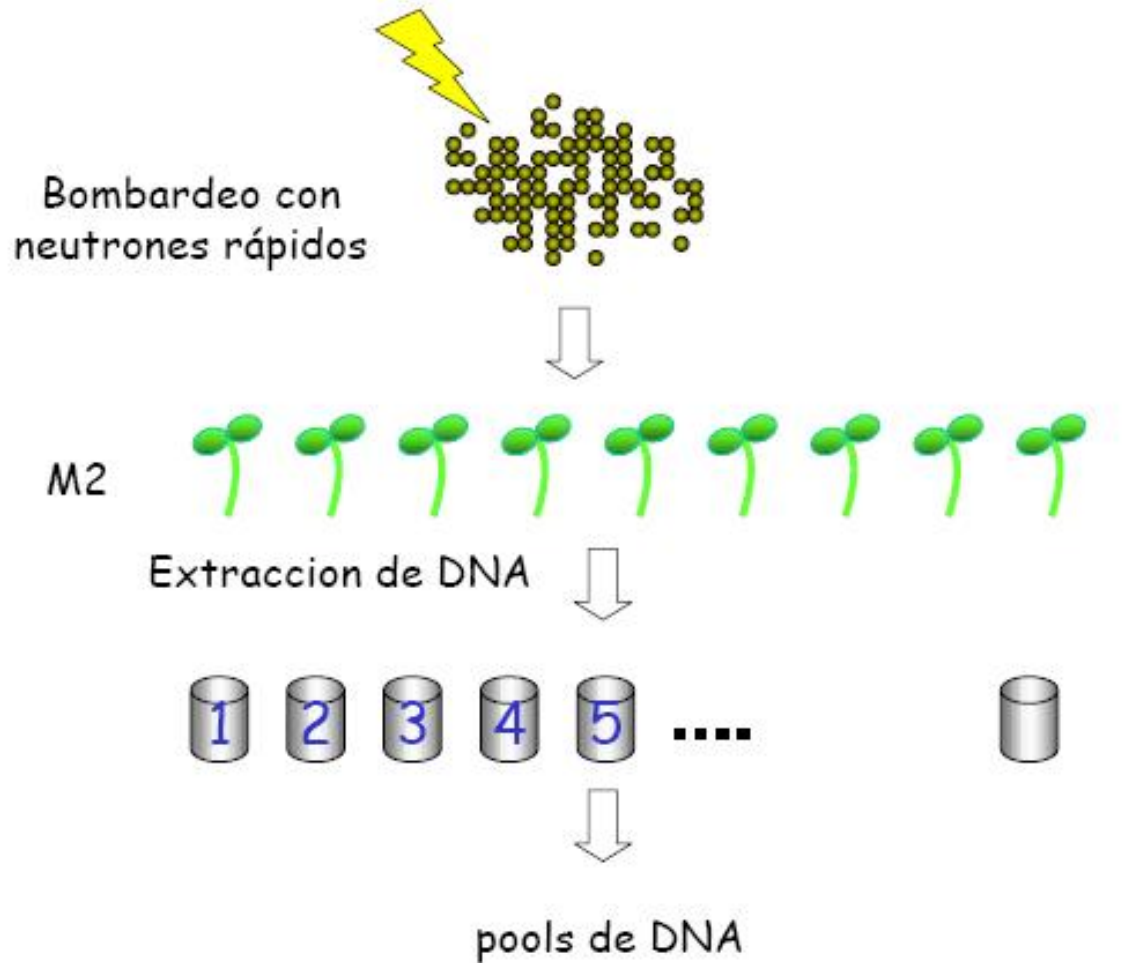
MUTAGÉNESIS:

- T-DNA
 - TRANSPOSONES
 - GEN TRAP
 - EMS = **MUTACION PUNTUAL**
 - NEUTRONES = DELECIÓN**
- } **INSERCIONAL**

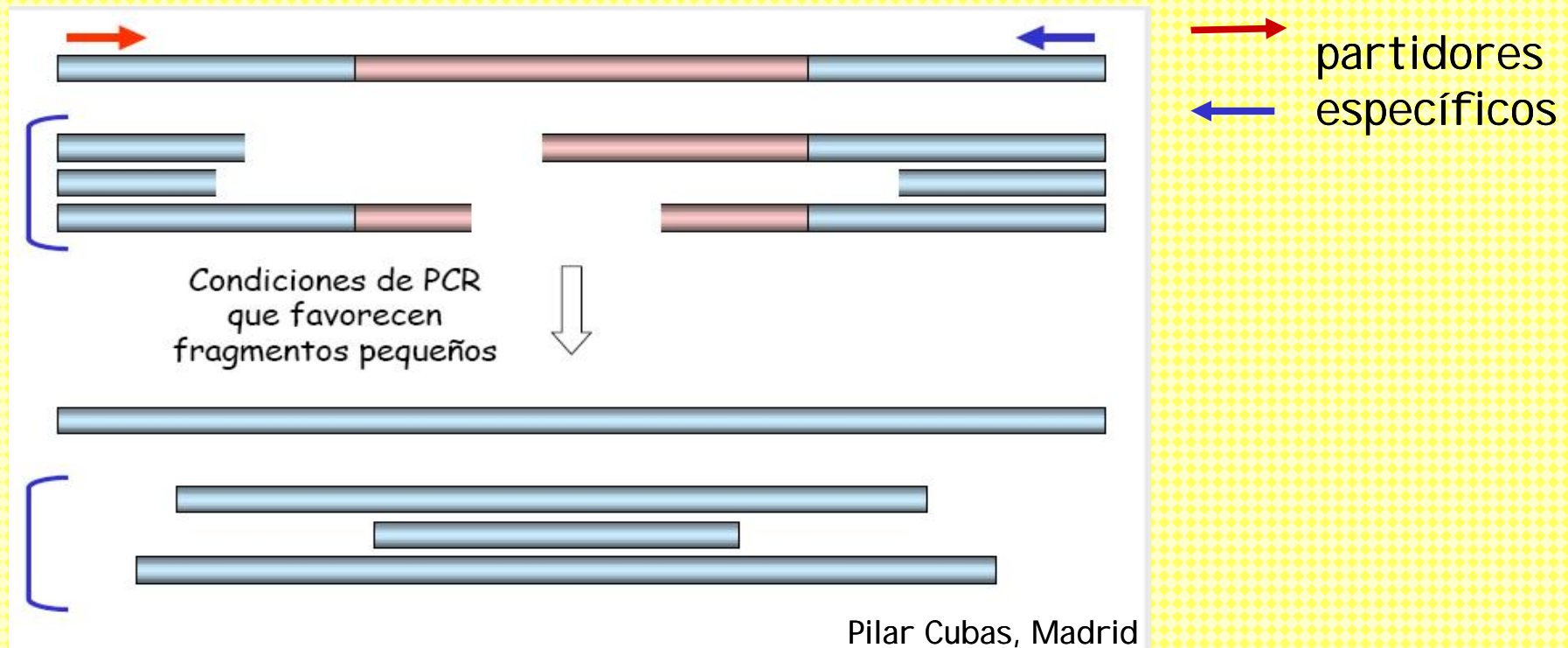
SILENCIAMIENTO GÉNICO

- ANTI SENTIDO
- VIGS

DELECIÓN: MUTAGÉNESIS POR NEUTRONES



DELECIÓN: MUTAGÉNESIS POR NEUTRONES



Ventajas:

Posibilidad de analizar genes ubicados en tandem, no requiere transformación por lo que es útil en especies no transformables, genera nuevas variedades.

Desventajas: si la mutación abarca uno de los oligos. Resultados difieren entre especies

GENÉTICA REVERSA

HERRAMIENTAS

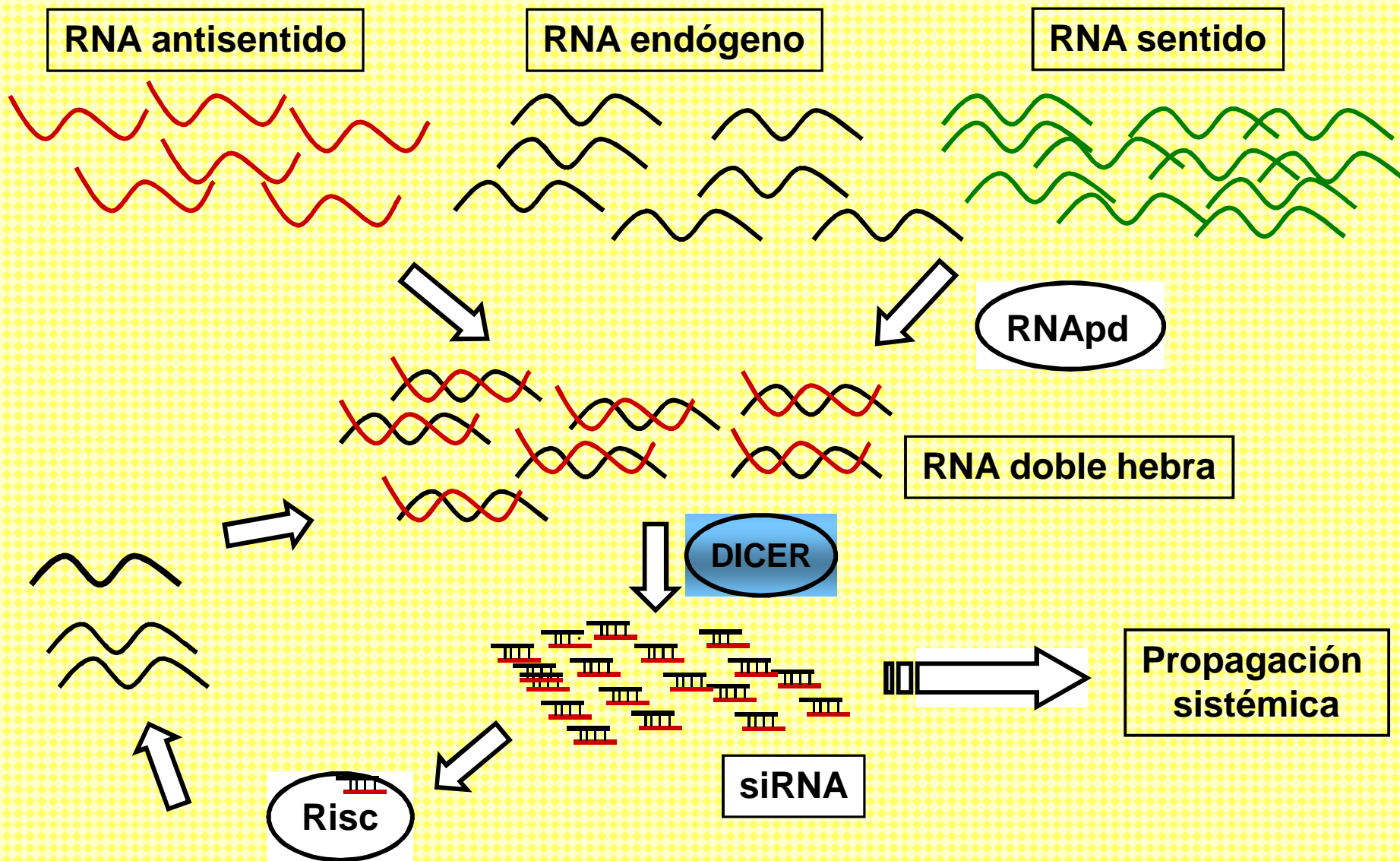
MUTAGÉNESIS:

- T-DNA
 - TRANSPOSONES
 - GEN TRAP
 - EMS = **MUTACION PUNTUAL**
 - NEUTRONES = **DELECIÓN**
- } **INSERCIONAL**

SILENCIAMIENTO GÉNICO (SG)

- ANTI SENTIDO**
- VIGS

Mecanismo SGPT



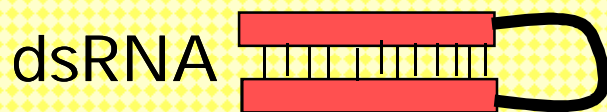
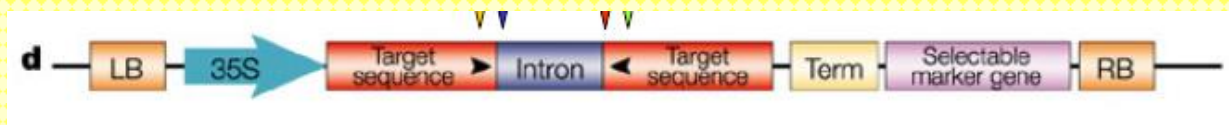
Mecanismo SGPT

- Fenómeno en el cual RNA de doble hebra (dsRNA) induce SGPT.
- Silenciamiento Secuencia-específico. > 81% de identidad nucleotídica. Es sistémico: se propaga a toda la planta.
- Cosupresión y antisentido
- Correspondería a un mecanismo de defensa contra Virus y Transposones. (¿Respuesta inmune innata?)

Mecanismo SGPT

Se transforman plantas con la secuencia del gen en estudio

Vector que posee un fragmento del gen de interés en sentido y en antisentido induce SG por la formación directa de dsRNA, y por ende el siRNA



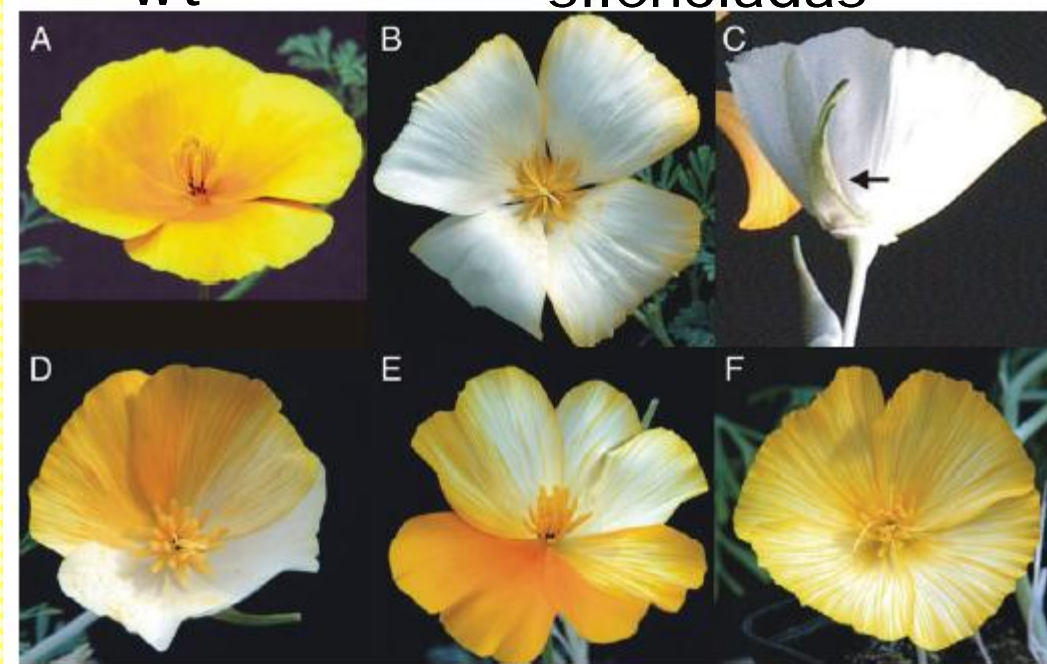
Si RNA
sistémicamente.

.....Pero se pueden obtener diferentes grados de acuerdo a la eficiencia y a la expresión del antisentido

Mecanismo SG

wt

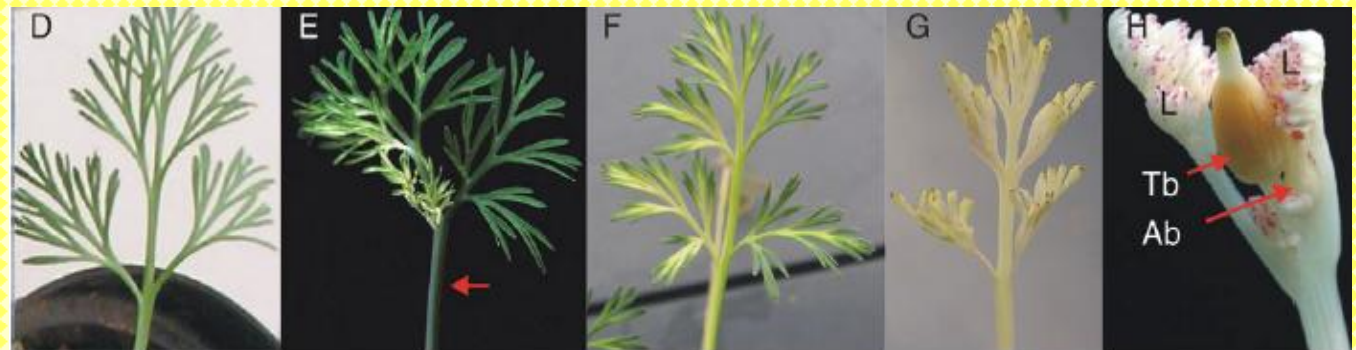
silenciadas



Silenciamiento en eschscholzia del gen de fitoeno desaturasa (pds) involucrado en la síntesis de carotenoides. Las plantas quedan albinas (fotosensibles) de acuerdo al grado de SG ya que el gen interfiere en tolerancia a luz

FLORES

HOJAS

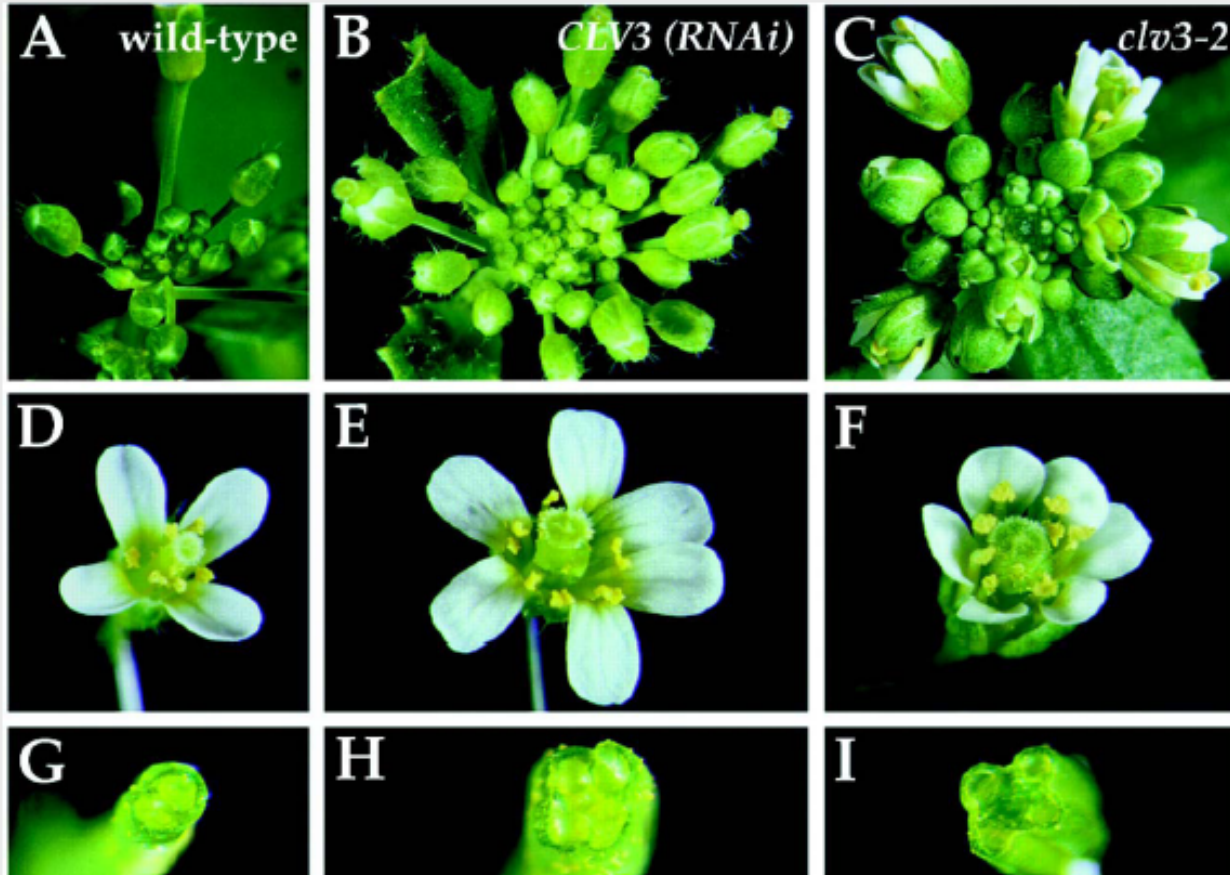


Wege et al, 2007

Effects of *EcPDS* VIGS on the vegetative parts and inflorescences of *eschscholzia* plants. (A) non-treated plant, (B) treated plant showing necrosis in several leaves (red arrows). However, this plant escapes silencing by producing newly expanding, non silenced leaf (red arrow) emerging from a fully silenced shoot. (D) Untreated leaf. (E) Partially silenced leaf blade emerging from

SGPT para identificar la función de genes

2. Silenciamiento génico

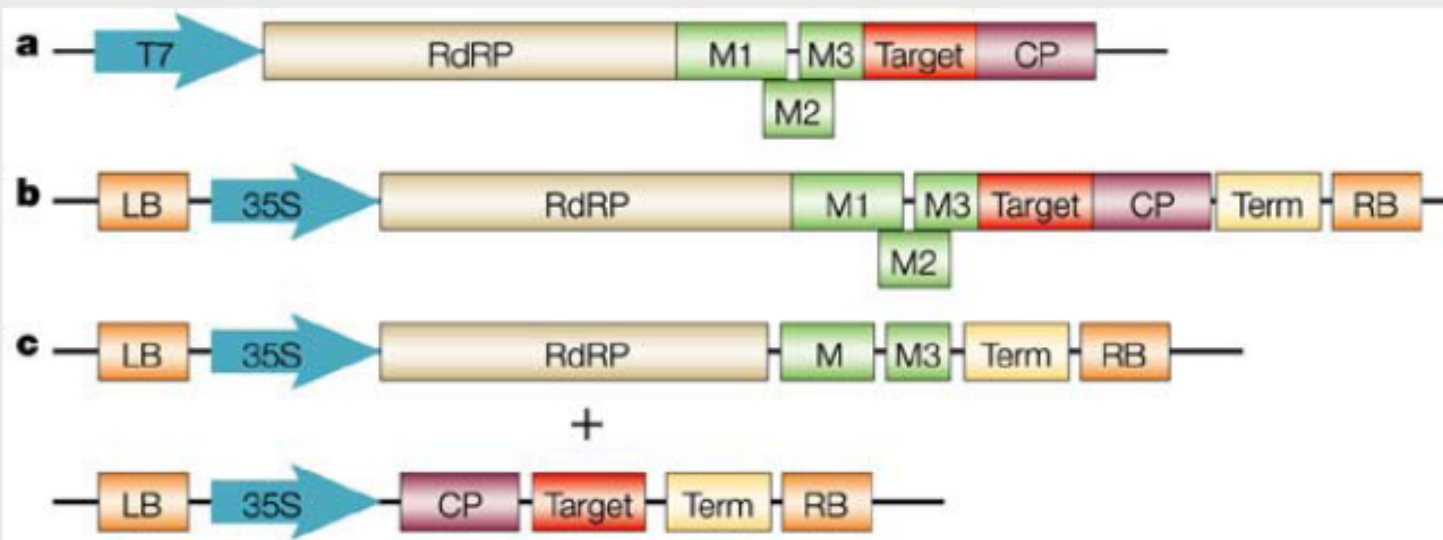


Chuang and Meyerowitz (2000) PNAS 97: 4985-4990

SGPT para identificar la función de genes

2. Silenciamiento génico

PTGS Inducido por Virus (VIGS)



Nature reviews (2003) 4:29-38