



Från Mendel till modern genteknik

Genuttryck i ärtor



Den som först iakttog och beskrev ärftliga skillnader hos ärtor var Gregor Mendel (1822-1884). Med utgångspunkt i korsningsförsök med ärtor som Mendel odlade i klostret i Brno, nuvarande Tjeckien, där han levde som munk, kunde han visa de grundläggande principerna för nedärvning av egenskaper. Forskningsresultaten uppmärksammades inte under hans livstid och det dröjde till år 1900 innan tre forskare oberoende av varandra återupptäckte Mendels resultat. De klassiska försök med ärtor som Mendel genomförde kopplas i denna laboration till kunskaper i molekylärgenetik.

Uppgiften i denna laboration är att ta reda på hur yttre skillnader i utseende hos ärtor hänger samman med mikroskopiska och biokemiska skillnader. Din uppgift är också att försöka avgöra om gener som styr stärkelsebildningen har samband med genen som styr om ärtan är skrynklig eller slät.

Säkerhet

Var försiktig och använd skyddsglasögon då Fehlings lösning I och II används.

Material

- Märgärt och någon/några andra sorters ärtor (fröpåsar inköps med sortäktade ärtor, torkade gula ärtor avsedda för matlagning kan också användas.)
- Petriskålar
- Glukos
- Agar
- Lugols lösning
- Fehlings lösning I och II
- Bägare
- Våg
- Mortel
- Pincett, skalpell
- Mikroskop, objektglas, täckglas

Utförande

Två labbgrupper samarbetar. Den ena gruppen studerar släta ärtor, och den andra skrynkliga. Försök att synkronisera de olika labbmomenten så att ni kan jämföra med varandra under hela laborationen.



Torrsvikt och våtsvikt

Övergripande frågeställning: Hur kan man undersöka orsaken till att vissa ärtor är skrynkliga och vissa släta? Hur påverkas ärtornas utseende av vattenhalten?

1. Välj ut tio släta ärtor, väg dem och lägg dem i en liten bägare. Gör på motsvarande sätt med tio skrynkliga ärtor. Tillsätt lika volym vatten till båda bägarna så att ärtorna täcks. Låt stå i en till två dagar för att ärtorna ska hinna ta upp vatten.
2. Håll av vattnet. Placera ärtorna på pappershanddukar så att vätskan suggs upp.
3. Väg ärtorna igen och beräkna procentuell viktsökning. (Procentuell viktsökning beräknas som skillnaden i vikt mellan torra ärtor och våta ärtor dividerad med torrsvikten, multiplicerat med 100.)
4. Ta två ärtor av respektive sort och låt dem torka ut under en till två dagar. Jämför med ursprungliga ärtor av samma sort.

Test på sockerhalt

Lägg 10 ärtor av de olika slag som ska testas i vatten över natten. Mal ärtorna i mortel till en pasta. Väg upp lika mängd av de olika sorternas ärtpasta. Ta lika mycket ärtpasta som vatten i ett litet provrör. Skaka om, låt innehållet sedimentera och ta ut prov på övervätskan. Testa med Trommers prov.

Morfologiska skillnader mellan släta och skrynkliga ärtor

- Ta en ärtä och observera den i stereolupp. Notera dina observationer.
- Ta en blötlagd ärtä och ta bort fröskalet med hjälp av pincett. Identifiera grodden och hjärtbladen. Hos ärtä är det hjärtbladen som innehåller den energi och näring som ska försörja det groende fröet tills det fått gröna blad och kan få energi via fotosyntes.
- Skrapa loss celler från hjärtbladen, lägg dem på ett objektglas tillsammans med en droppe Lugols lösning. Titta i mikroskop och notera vad du ser. Titta på stärkelsekornens antal, form och storlek.
- Studera på samma sätt ärtor av olika slag och jämför.
-

Biokemiska skillnader mellan släta och skrynkliga ärtor

1. Lägg 5 torra ärtor i en mortel och mal dem till fint pulver.
2. Lägg över en sked av pulvret i ett provrör som till hälften fyllts med vatten. Skaka provröret och låt det stå 5-6 minuter.
3. Låt de fasta partiklarna i provröret sjunka till botten. (Centrifugera eventuellt.) Ta 3-5 ml av lösningen. Var försiktig så att du inte rör upp partiklarna som sedimenterat.
4. För över lösningen till en agarplatta med glukos (8g glukos+15g agar/l) och sprid ut den. Märk plattan så du vet om den innehåller släta eller skrynkliga ärtor och låt den stå 15-20 minuter. (Resultatet blir tydligare om agarplattan får stå i flera timmar.) Efter 15-20 minuter hålls överflödigt vätska bort från agarplattan och den torkas försiktigt med papper.
5. Pipettera 2-5 ml Lugols lösning (jodlösning) och sätt till varje agarplatta. Sprid ut lösningen jämnt över hela plattan. Stärkelsen kommer att färgas mörkt blå.
6. Studera plattorna och gradera dem efter hur starkt agarskiktet färgas av jodlösningen.



Resultat, utvärdering och fördjupningsuppgifter

1. Alla skillnader mellan stärkelsekornens utseende som visas i denna labb antas bero på en enda gen. Vilka skilda egenskaper ger de båda allelerna av denna gen?
2. Alla skillnader i skrynklighet som kan iakttas antas också bero på en enda gen. Vilka olika egenskaper ger de båda allelerna av denna gen upphov till?
3. Vilken typ av ärtor verkar vara bäst på att omvandla glukos till stärkelse?
4. Halten av olika enzymer varierar hos människor. Om du var en genetiker som ville bestämma den normala halten av ett speciellt hormon i matspjälkningen, vilka typer av människor skulle du genomföra undersökningen på? Hur många personer skulle ingå i undersökningen? Varför?
5. Enzymet papain finns i papaya och kiwi. Hur kan papain göra kött mörkt?
6. Ta reda på hur stärkelsesammansättningen är hos genmodifierad potatis som ska användas industriellt.
6. Designa ett experiment där du kan avgöra effekten av ljus eller av värme på enzymaktiviteten i ärtor. Ditt experiment ska omfatta en och endast en oberoende variabel (den som du varierar). Presentera din laboration med en frågeställning, en hypotes och en tabell som visar den oberoende variabeln, den beroende variabeln och kontroller. Gör en handledning för försöket med material och metodbeskrivning.)

Faktaruta: Skrynkliga eller släta ärtor

En ärftlig egenskap som kan iakttas hos ärtor är om de är skrynkliga eller släta. Mendel visade att denna skillnad i utseende var ärftlig och förklarade hur egenskaperna ärvs. Nu vet vi att ärtor blir skrynkliga beroende på att stärkelsesyntesen inte fungerar normalt. Den normala allelen av genen *rugosus* som ger släta ärtor har skadats genom att en transposon, en DNA-bit som kan förflytta sig i genomet, har hamnat inne i genen. Följden blir att ärtor med denna defekt blir skrynkliga. Allelen som ger skrynklighet är recessiv.

Upplagsnäringen i växter är stärkelse. Stärkelse består av molekyllängder av glukos som kan sättas samman till raka (amylos) eller grenade (amylopektin) kedjor. Det behövs enzymer både för att bygga upp stärkelse och för att bryta ner stärkelse. Fyra enzymer kontrollerar olika steg i stärkelsesyntesen hos växter. Enzym som åstadkommer grenade stärkelsekedjor (starch-branching enzym, SBE) finns i flera varianter. Att ärtor blir skrynkliga beror på att det enzym som normalt bildar grenade stärkelsekedjor är defekt. Det finns en omfattande forskning om hur bildning av stärkelse går till i växter eftersom det är så viktigt att exempelvis sädeslagen och andra frön som vi äter har den bästa stärkelsesammansättningen. Man har också tillverkat genmodifierad potatis med ett förändrat stärkelseinnehåll som inte är avsedd att äta utan ska användas som industripotatis.

Hos skrynkliga ärtor reduceras enzymaktiviteten för bildning av grenade stärkelsekedjor med 90%, och detta i sin tur leder till att synteshastigheten av stärkelse minskar med ca 50%. Dessutom ökar andelen amylos i stärkelsen från 30% till 70%. Detta påverkar både stärkelsekornens form och antal. Biokemiska undersökningar och mikroskopstudier visar varför ärtor blir släta eller skrynkliga. Stärkelse är lätt att påvisa med jod som indikator då stärkelsekornen kommer att synas som blåsvarta korn i mikroskop.

Referenser

Wisconsin Educational Communications Board and the University of Wisconsin. Peas in a pod. www.ecb.org/guides/pdf/CrackCode1.pdf

John Innes Centre. Genetically induced changes in starch granules from pea seeds. www.jic.ac.uk/STAFF/cliff-hedley/mutants.html