

Szemelvények a növénygenetikából

Tematika

- A növénygenetika mérföldkövei
- Növényi modellszervezetek
- Növényi mutánsok és előállításuk
- Génazonosítás
- Növények transzgenezise

Fontosabb mérföldkövek a növénygenetikában I.

- 1866 – G. Mendel közzé teszi tanulmányát az „öröklődés törvényszerűségeiről” - *Versuche über Pflanzen-Hybriden*
- 1900 - Hugo De Vries, Carl Correns, Erich van Tschernak újra felfedezi a Mendel törvényeket
- 1923 - RC Punnett – szagos bükkönyön végzett kísérletek eredményei támogatják az öröklés kromoszóma elméletét (a mendeli gének a kromoszómákon helyezkednek el)
- 1930 - B. McClintock citológiai azonosítja a genetikai rekombinációt a meiózis során megfigyelhető átkereszteződésekben
- 1931 - B. McClintock és H. Creighton kimutatja a kromoszómák átkereszteződése és egyes tulajdonságok rekombinálódása közötti kapcsolatot
- 1931 - B. McClintock: a kukorica első genetikai térképe (PNAS 17:485-491, 1931)
- 1935 - W. Stanley izolálja a dohány mozaik vírust (TMV), Nobel-díj 1946
- 1938 - B. McClintock: a centromer és a telomerek szerepe a genetikai információ megőrzésében
- 1944 - B. McClintock: transzpozonok felfedezése kukoricában; Nobel-díj 1983
- 1951 - O. Vogel: törpeséget meghatározó gén bevitele nemesített búzafajtába; „Green Revolution”
- 1964 - M. Edelman: *Euglena* kloroplaszt DNS izolálása
- 1970 - N. Borlaug: Nobel-békedíj; a „Green Revolution” atyja, nagy termőképességű mexikói búzafajták létrehozása
- 1976 - növényi genomok DNS reasszociációs vizsgálata
- 1977 - Mary-Dell Chilton, Marc Van Montagu és Robert Fraley kimutatja, hogy az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS-e integrálódik a gazdanövény kromoszómájába
- 1979 - a növényi génklónozás kezdete; búza rDNS génje
- 1983 - Ti plazmid alapú vektorral transzformált dohány, az első géntechnológiai módszerrel előállított stabil transzformáns növény

Fontosabb mérföldkövek a növénygenetikában II.

- 1984 - *Arabidopsis thaliana* mint modellnövény
- 1986 - teljes kloroplaszt genomok (*Marchantia polymorpha* és *Nicotiana tabacum*) szekvencia meghatározása
- 1986 - GUS riporter rendszer kifejlesztése növényekben
- 1988 - első rovar rezisztens kukorica („Bt corn”) létrehozása
- 1989 - Flavr Savr paradicsom
- 1990 - Arabidopsis Genom projekt indulása
- 1990 - a géncsendesítés jelenségének felismerése; a transz gének csendesíthetik az endogén géneket
- 1994 - az első rezisztencia gén klónozása paradicsomból
- 1999 - a géncsendesítésben szerepet játszó siRNS-ek azonosítása
- 2000 - TILLING reverz genetikai rendszer kifejlesztése
- 2000 - a teljes *A. thaliana* genom szekvencia
- 2000 → kiterjedt genomszekvenálások
- 2001 - „Arany rizs”
- 2004 - rizs genomszekvencia
- 2009 - TALE (transcription activator-like effector)-ok felfedezése
- 2010 → Zn-finger nukleázok, TALEN és CRISPR/Cas technológia alkalmazása növényekben gének célzott szerkesztésére

(Növény)genetika

- A genetikai célja:
 - Az öröklődés törvényszerűségeinek feltárása
 - A vizsgálatok középpontjában a gének és termékeik vizsgálata áll.
 - Molekuláris
 - Sejt
 - Organizmus
 - Populáció
 - Evolúciós szintű vizsgálatok
- Főbb vizsgálati témák:
 - Genomok és gének szerkezete.
 - A gének/tulajdonságok öröklődésének menete.
 - [A génekben hordozott információtartalom kifejeződésének vizsgálata \(funkció\) – mol. és sejtbiológia](#)
 - A genetikai anyag megváltozása hogyan eredményezte a biológiai diverzitást.

A gének funkcionális vizsgálata

- Klasszikus megközelítés - „Forward genetika”

Mutánsok vizsgálata - a megjelenő fenotíusból (funkcióvesztés vagy változás) következtetünk, hogy milyen folyamatban vesz részt a gén

- Fenotípusosan megjelenő mutáns azonosítása
- Az öröklődés menetének meghatározása ill. egyéb mutánsokkal történő kölcsönhatás
- A mutációt szenvedett gén azonosítása
- A fenotípus és a biokémiai funkció összevetése

- Fordított („reverse”) genetika

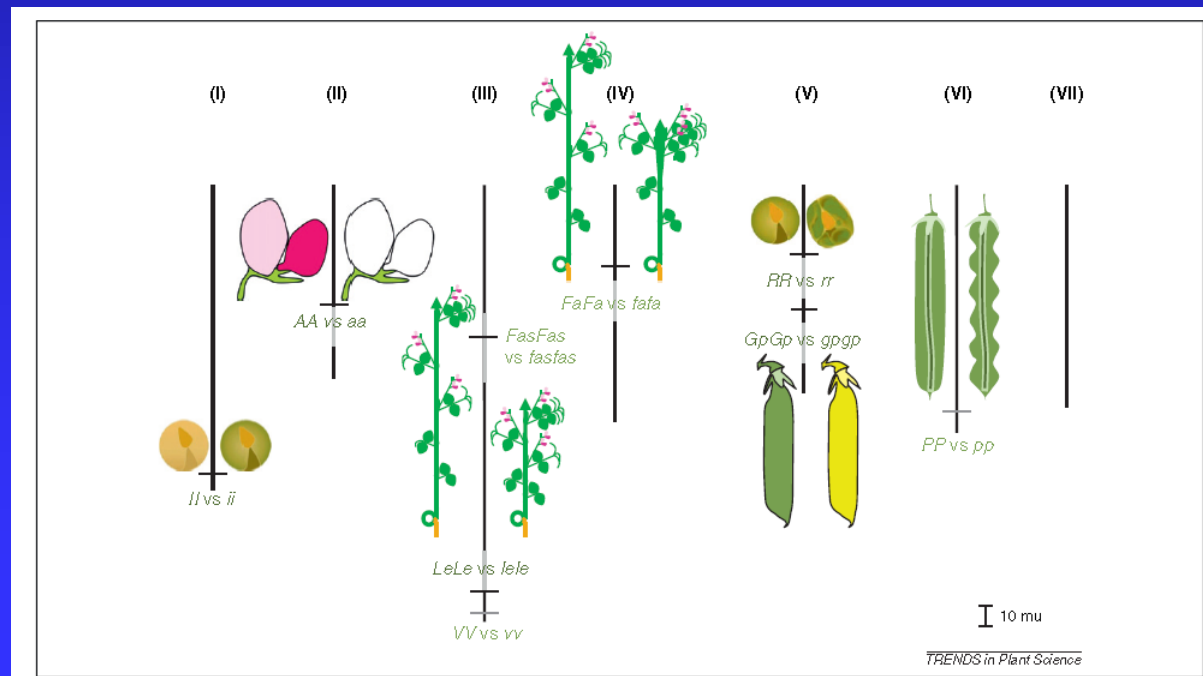
- Először azonosítjuk a gént.
- Azonosítjuk, vagy elkészítjük annak mutáns változatát.
- A fenotípus vizsgálatából következtetünk a biológiai funkcióra.
- A genomszekvencia teljes vagy részleges ismerete szükséges.

A gének funkcionális vizsgálata – modellszervezetek

- Genetikai modellszervezetek
 - a vizsgálni kívánt folyamat tanulmányozásra leginkább alkalmas organizmus
 - segítik a biológiai folyamatok megértését a többi, gyakran nehezebben tanulmányozható élőlényben
 - közös leszármazási vonal, anyagcsere utak konzerváltsága, valamint a hasonló genomszerveződés segít ebben
 - rövid életciklus, viszonylag egyszerűbb genomszerveződés, kísérleti manipulálhatóság
 - pl. lambda, T4 fágok, *E. coli*, élesztő, *C. elegans*, ecetmuslica, zebradánió, egér, stb.
- Növényi modellszervezetek: borsó, dohány, kukorica, *Arabidopsis thaliana*, rizs, stb.

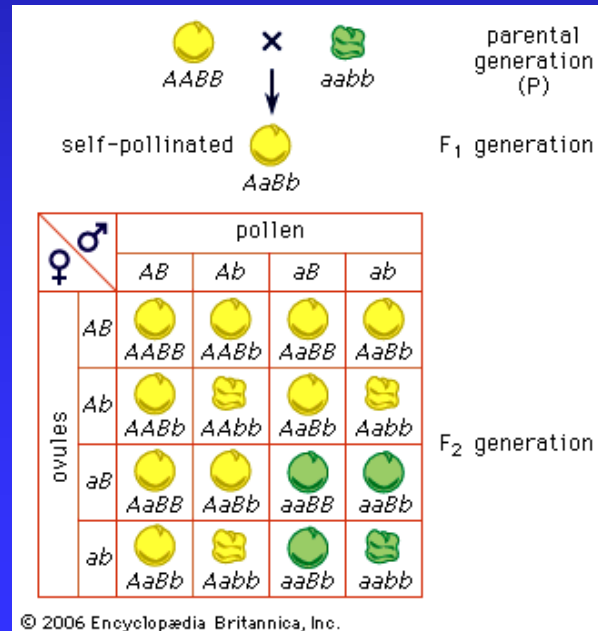
Mendel lókuszai

Lókusz/tulajdonság	LG	Mutáció	Gén
<i>A</i> - virágszín/magszín II	<i>G-A</i> csere (splice site)		TF
<i>LE</i> - szárhossz	III	<i>G-A</i> csere (mis. mut.)	enzim
<i>I</i> - sziklevel színe	I	6 bp inszerció	regulátor
<i>R</i> - magforma	V	0,8 kb inszerció	enzim
<i>GP</i> - hüvely színe	V	?	?
<i>FA</i> vagy <i>FAS?</i> - virág pozíció	IV v III	?	?
<i>V</i> vagy <i>P</i> - hüvely formája	III v VII	?	?



Genetikai térképezés elméleti alapjai 1.

- a keresztezés során mindig adott tulajdonságok öröklődését vizsgáljuk
 - egy karakter esetén: monohibrid
 - két karakter esetén: dihibrid keresztezés
- **mendeli genetika** - tiszta vonalak használata
 - a heterozigóták allélpárjai elválnak egymástól (szegregálás)
 - gaméták szabad kombinálódása

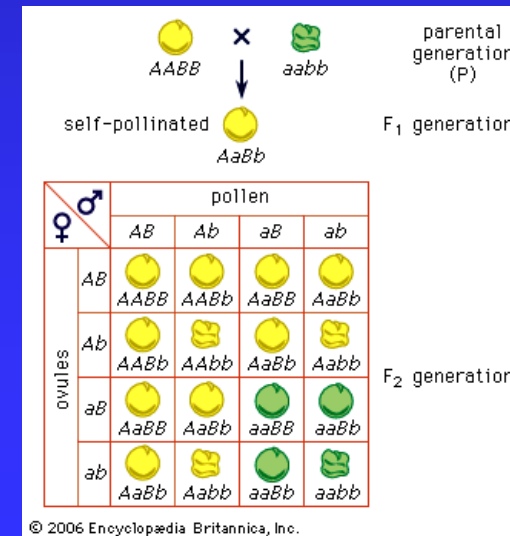


Genetikai térképezés elméleti alapjai 2.

Mendel kísérleteiből levonható legfontosabb következtetések:

- F1 generáció **uniformitása**
- **gamétatisztaság** elve: egy ivarsejt az adott tulajdonságpárból csak az egyik tulajdonságot hordozza
- a **reciprocitás** elve: az első utódnemzedék tulajdonságai függetlenek attól, hogy a tulajdonságot az apai vagy az anyai vonal hordozta
- a **szegregáció** elve: a második utódnemzedékben mindegyik szülő tulajdonságai megjelennek
- a **független kombináció** elve: két vagy több tulajdonság egymástól függetlenül kombinálódik

(ez persze csak a független kromoszómán, vagy ugyanazon kromoszómán egymástól távol elhelyezkedő tulajdonságokra igaz)



Arabidopsis thaliana (lúdfű) genom projekt

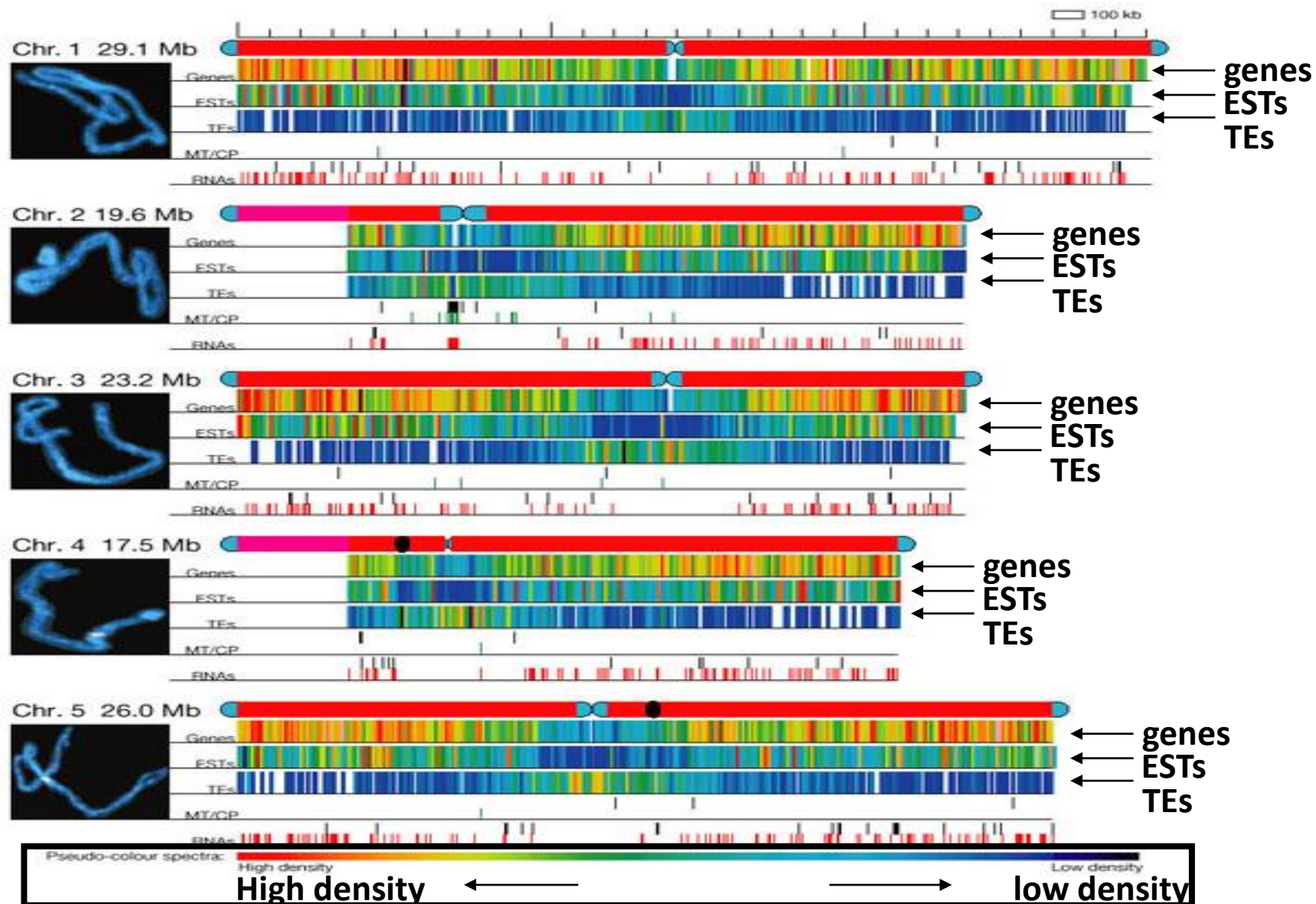


- kistermetű (20-25 cm), kétszikű gyomnövény (Európa, Ázsia, ÉNy Afrika)
- életsiklusa 6 hét (csírázástól magérésig); genomméret 125 Mb
- Johannes Thal (-> *thaliana*), (*Pilosella siliquosa*) XVI szd. Harz-hegység
- F. Laibach javasolta először modell növénynek 1943; ($2n=10$)
- Rédei György (1921-2008); U. Missouri, 1957-ben kezdett el foglalkozni komolyabban *Arabidopsis*-szal; nem volt elismert kezdetben (1969 NSF támogatás felfüggesztése) – mutációs vizsgálatok alapján a *A. thaliana* gének számát 27 813-nak becsülte
- Marteen Korneef – Wageningen University, 1976 (részletes genetikai térkép 1983)
- 1990 - genom projekt indulása
- 1996 - Arabidopsis Genome Initiative (BAC-by-BAC)
- 2000 – genomszekvencia kész
 nagy szegmentális duplikációk
- 2001 - NSF2010 Program – gének funkciójának azonosítása
- 2008 - 1001 genom projekt – SNP; (HAPMAP, teljes genomváltozatok) – 1001 *Arabidopsis* változat szekvenálása - 88 már elérhető (2010), befejezést 2012-re ígérték

www.arabidopsis.org (pl. At1g01480)

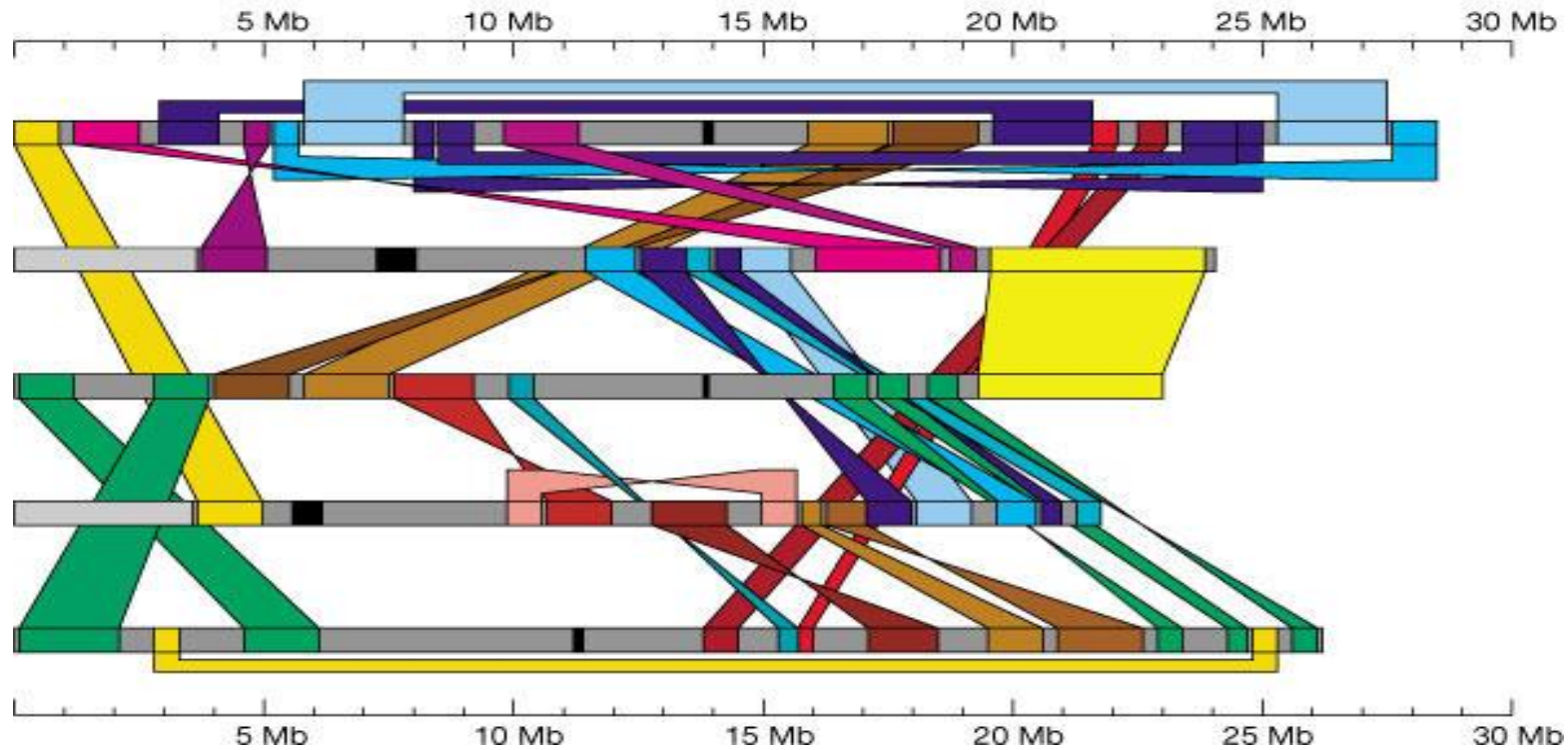
www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/

Az *Arabidopsis* genom - 125 Mbp



Arabidopsis egy ősi tetraploid genom

hasonlóan a növények többségéhez



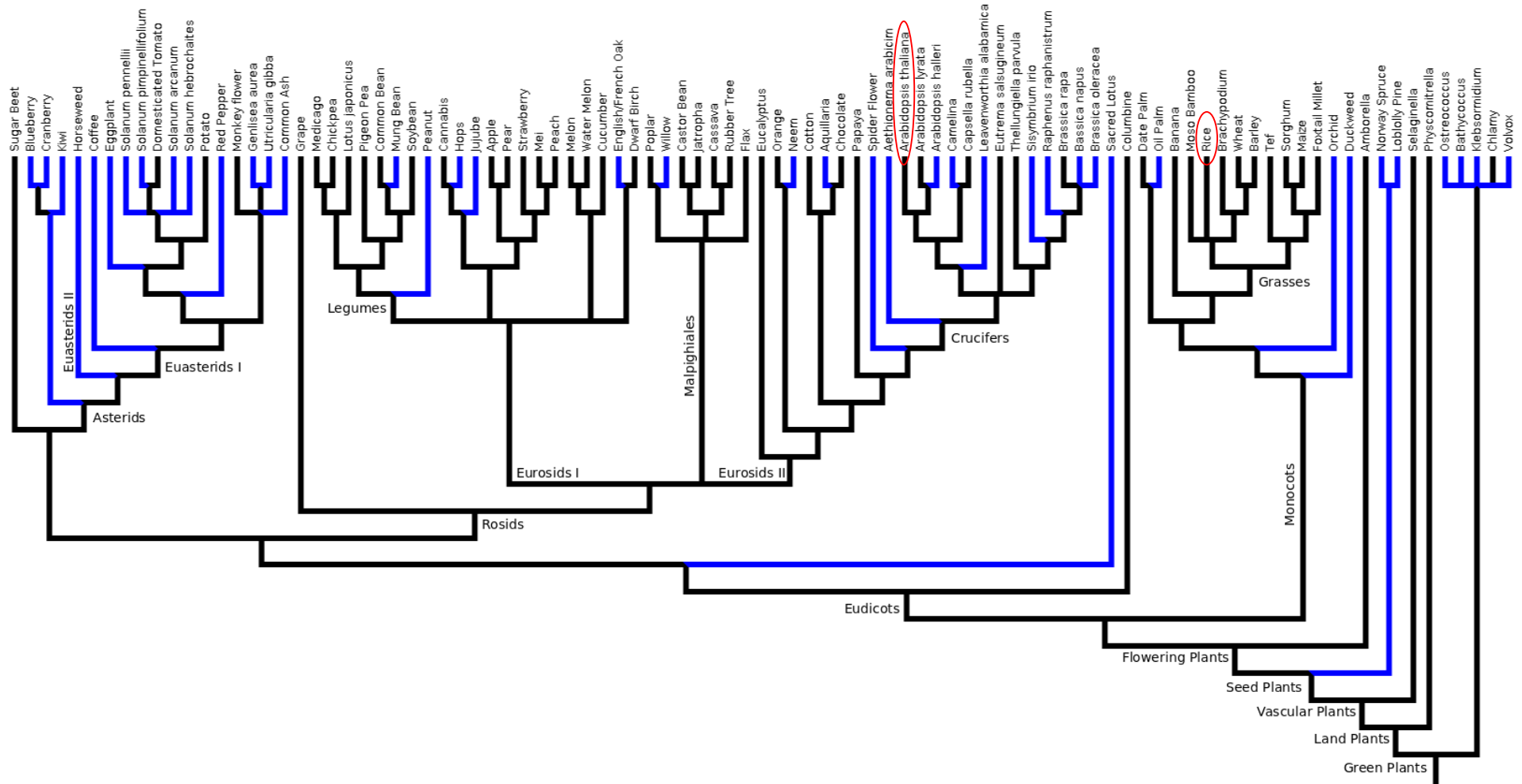
- A genom 60 % of (67.9 Mb) duplikálódott kromoszómarégiókból áll
- A poliploidizáció jelentősen hozzájárult a genom formálódásához és fontos szerepet játszott a növények evolúciójában
- A növények kb. 30-80%-a poliploid

Rizs genom projekt



- egyszikű, diploid ($2n=24$), kis genomméret a fűfélék között (389 Mb)
- a rizs a kukoricát követően második a termelt mennyiséget tekintve
- 1997 - International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) - *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare (ragadós, rövidszemű rizs)
- 2002 chr1 és 4
- 2003 chr10
- 2004 teljes genom szekvencia - 370 Mb
- 37 544 gén modell (2,859 nem mutat hasonlóságot *Arabidopsis* génekhez)
- *Oryza sativa indica* (hosszúszemű) genomszekvencia meghatározása szintén befejeződött
(5 genomszekvencia, köztük vadfajoké is ismert)

További növényi genomszekvenálási projektek I.



fekete: publikált szekvenancia
 kék: a közelmúltban meghatározott genomszekvenancia
 (törzsfák ágainak hossza nem arányos az elválás idejével)

További modell növények

- *Chlamydomonas* - egysejtű modell szervezet, amelynek fejlődése kb. 1 milliárd éve vált el a szárazföldi növényektől
 - flagellum – a növények és az állatok közös őstől; 112 Mb, ~ 17700 gén (2007)
- *Physcomitrella patens*: moha (virág és szállítószövet hiánya); 480 Mb (2008),
36 000 gén modell
- csipkeharaszt (*Selaginella moellendorffii*): virág hiánya (2011)
egyik legkisebb szekvenált növényi genom (~110 Mb)
- Paradicsom: 950 Mb, 2n=24; 35000 gén, nyers genom szekvencia (2012);
- *Nicotiana benthamiana*: vírus és baktérium fertőzések fő vizsgálati növénye, 2n=38, ~ 3 GB
- *Medicago truncatula*: 8 kromoszóma, verzió 3.5 (2010), ~450 Mb becsült, szekv.: 240 Mb kromoszómákhoz kapcsolódó, 17 Mb nem kapcsolódó
- *Brachypodium*: búza, árpa, zab és rozs modell növénye; a Földközi-tenger vidékén és a Közel-Keleten honos évelő fűféle, 2n, 4n és 6n, 272 Mbp (Nature, 2010), 5 kromoszóma

Gének funkciójának vizsgálata

- Biokémiai és Genetikai megközelítés
 - Forward genetika
 - Természetben előforduló mutánsok, ökotípusok vizsgálata – DNS polimorfizmusok
 - Indukált mutációk
 - Fizikai mutagének (pl. UV, FN, γ -besugárzás (Co)) – általában nagyobb genetikai átrendeződést eredményez
 - Kémia mutagének (pl. EMS) – pontmutáció (általában G-A tranzíció)
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - Mutáns screen
 - Génazonosítás (térképezésen alapuló génizolálás, microarray- alapú génazonosítás, „gene-tagging”)
 - Reverz genetika
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - TILLING
 - Növényi transzgenézis (Agrobacterium transzformáció)

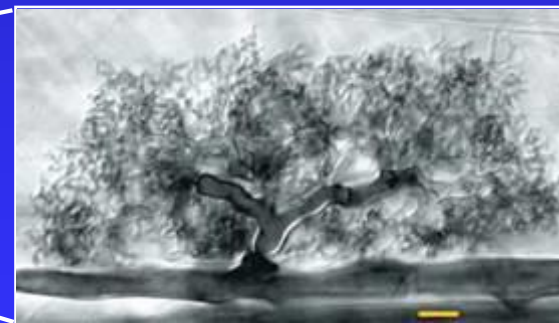
Gének funkciójának vizsgálata

- Biokémiai és Genetikai megközelítés a szimbiotikus nitrogénkötés vizsgálatában
 - Forward genetika
 - Természetben előforduló mutánsok, ökotípusok vizsgálata – DNS polimorfizmusok
 - Indukált mutációk
 - Fizikai mutagének (pl. UV, FN, γ -besugárzás (Co)) – általában nagyobb genetikai átrendeződést eredményez
 - Kémia mutagének (pl. EMS) – pontmutáció (általában G-A tranzíció)
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - Mutáns screen
 - Génazonosítás (térképezésen alapuló génizolálás, microarray- alapú génazonosítás, „gene-tagging”)
 - Reverz genetika
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - TILLING
 - Növényi transzgenézis (Agrobacterium transzformáció)

Symbiotic interactions of legumes

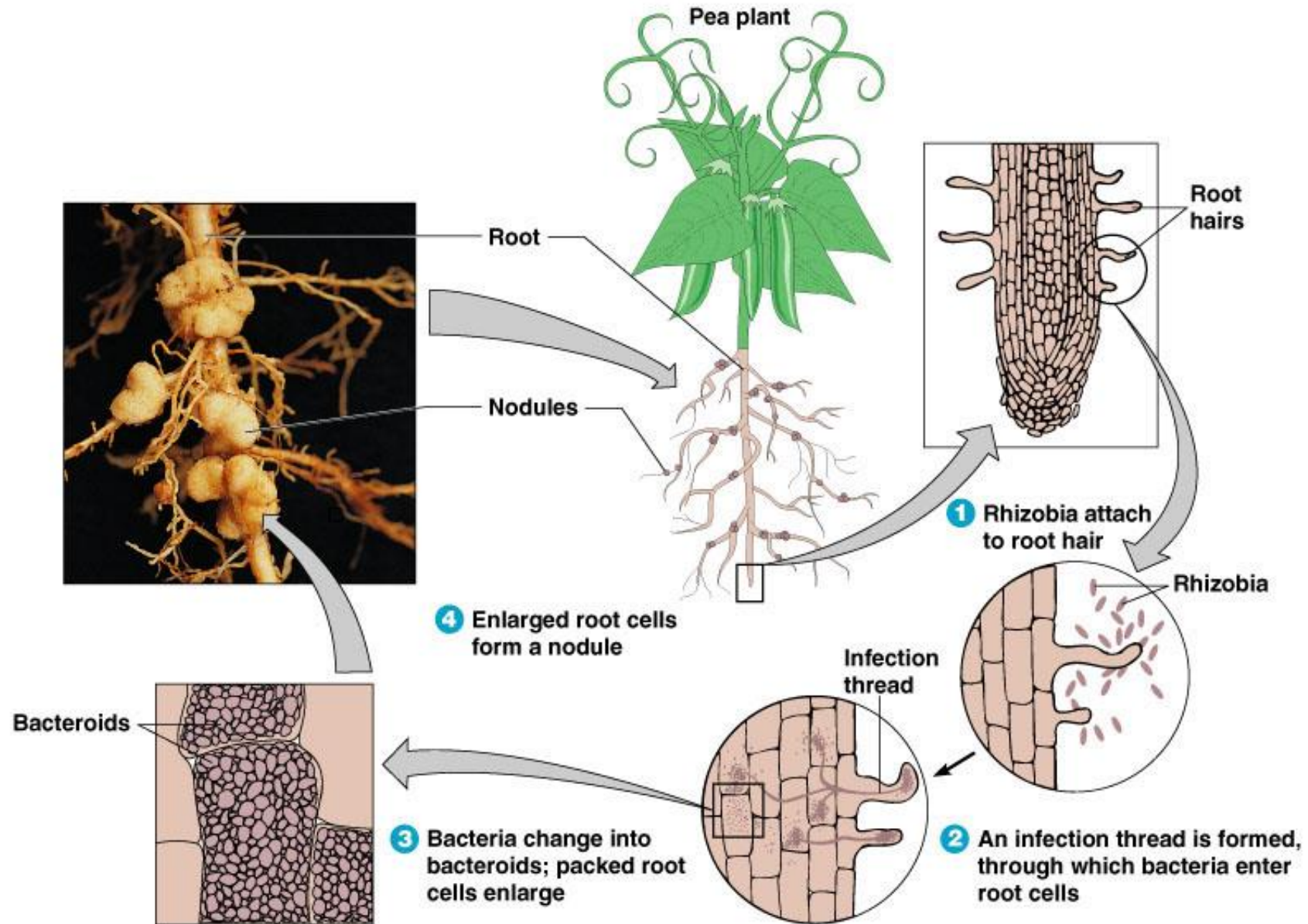


nitrogen acquisition

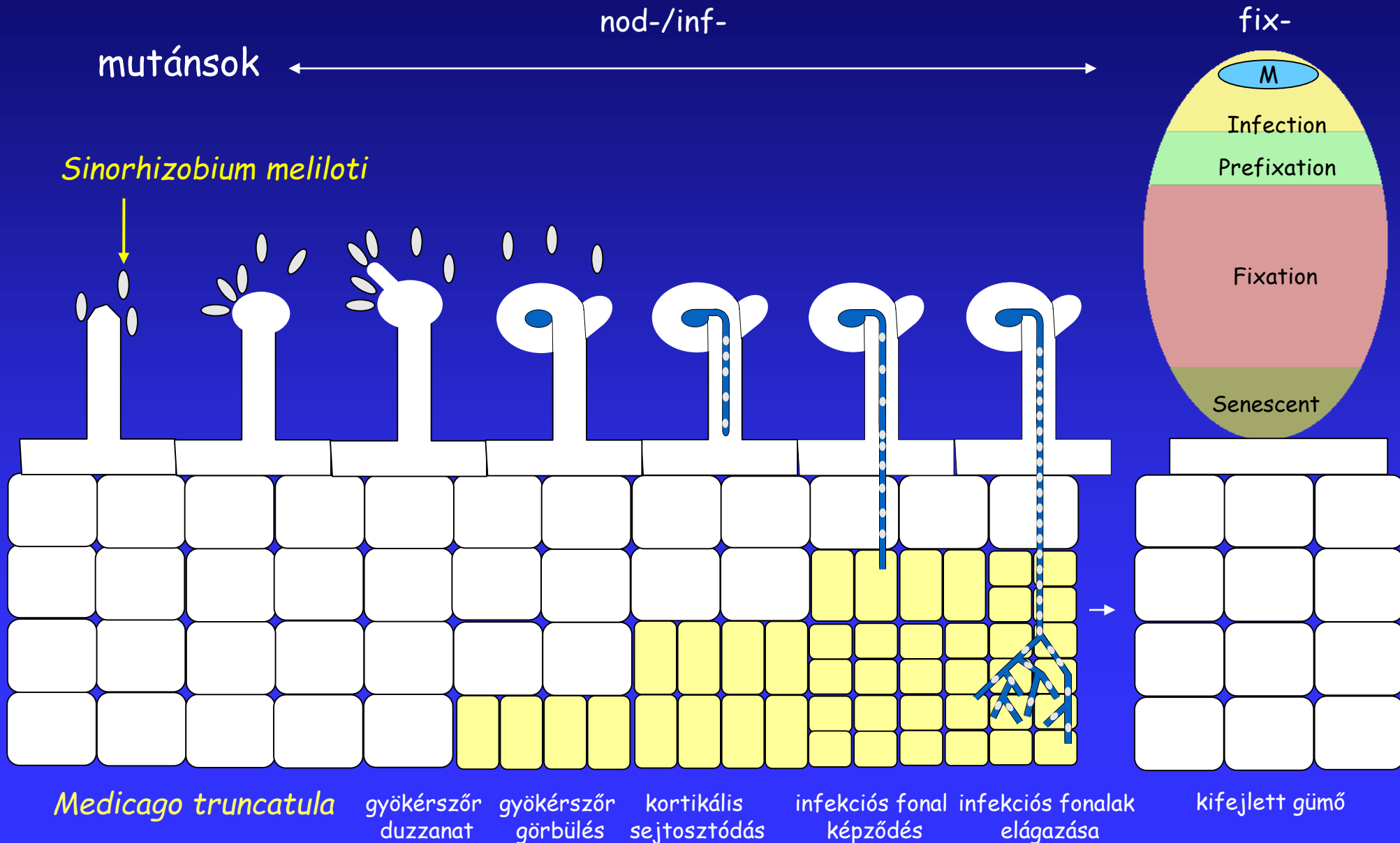


phosphorus acquisition

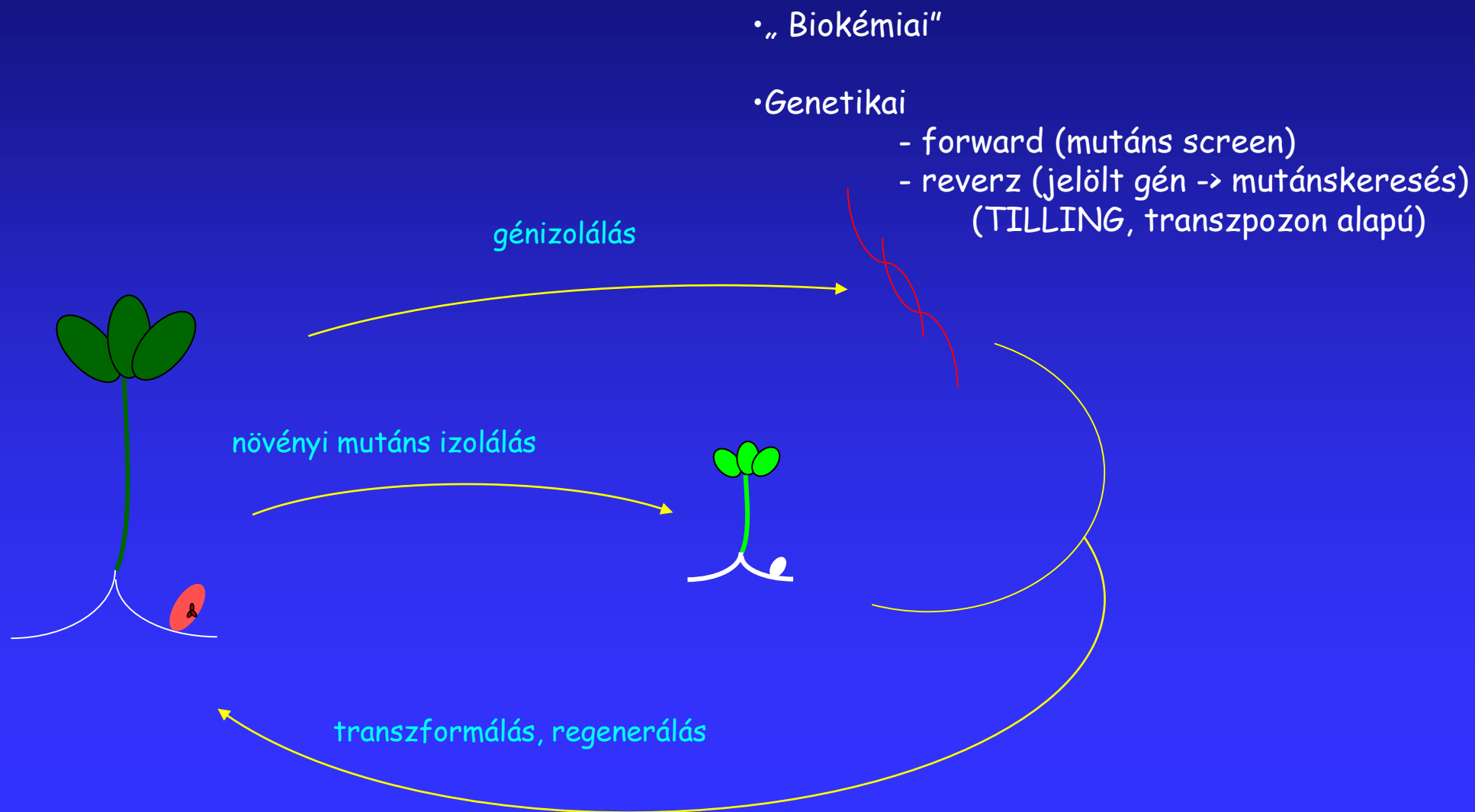
Rhizobium indukálta gyökérgümők kialakulása



A szimbiotikus gümő kialakulása



Szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő növényi gének azonosítása



Gümőspecifikus gének izolálása és jellemzése

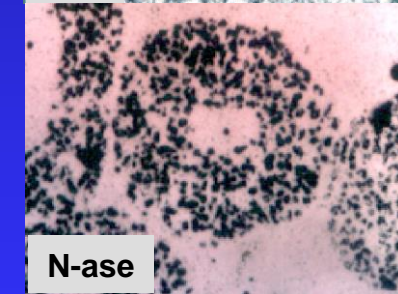
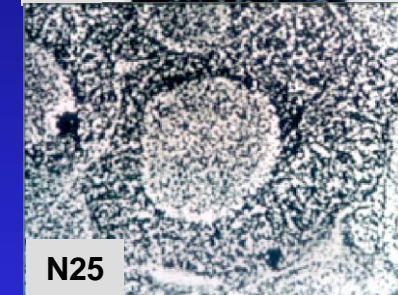
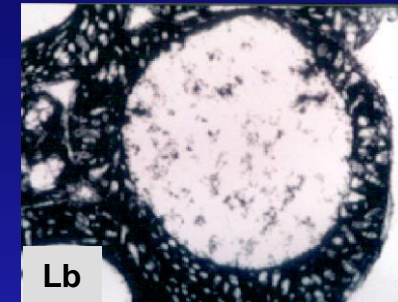
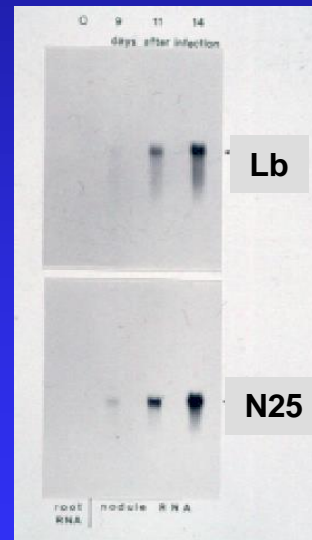
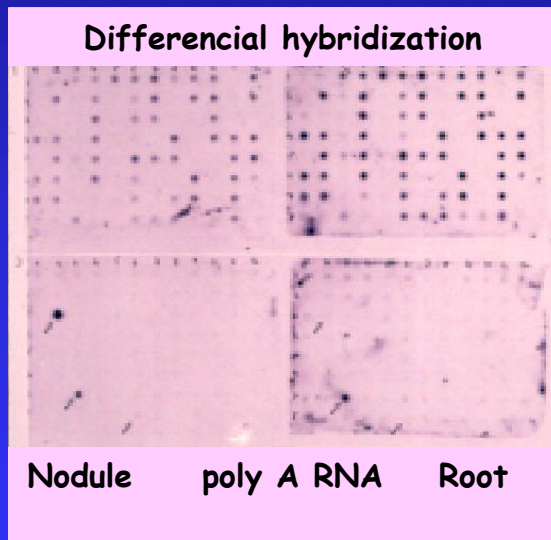


- cDNA könyvtár
- differenciál hibridizáció
- genomi könyvtár
- DNS szekvenálás
- szekvencia analízis
- promóter analízis, expresszió
- fehérje kimutatás
- sejten belüli lokalizáció
- funkció

Gümőspecifikus gének izolálása: NOD25

Gén illetve géntermék jellemzése

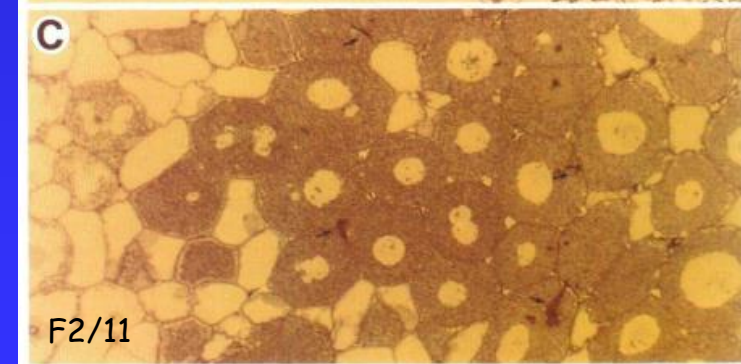
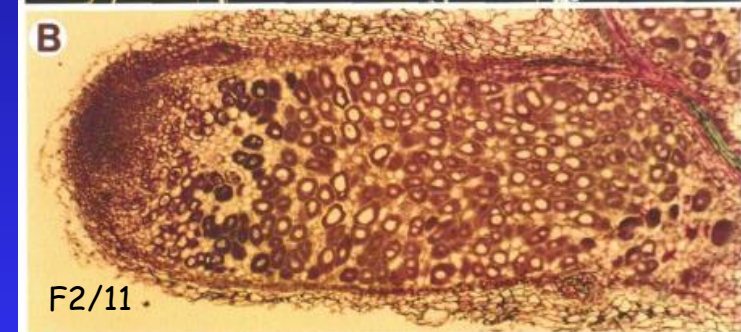
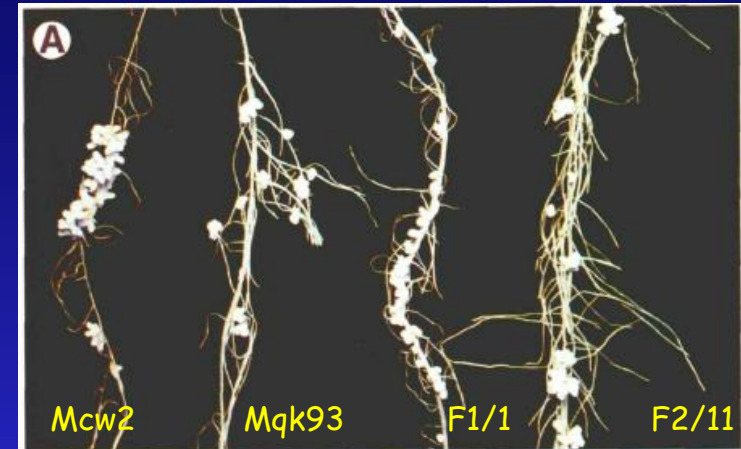
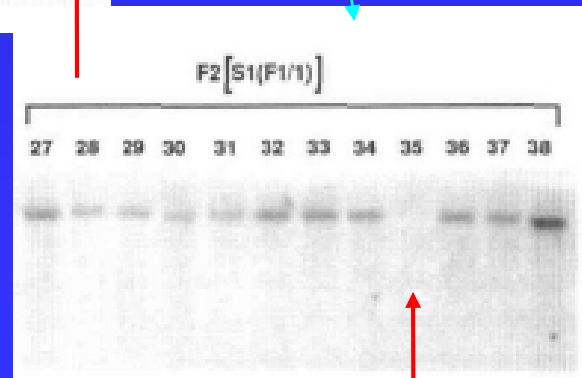
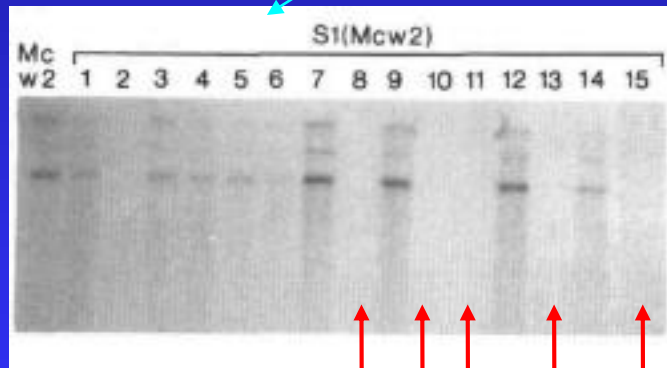
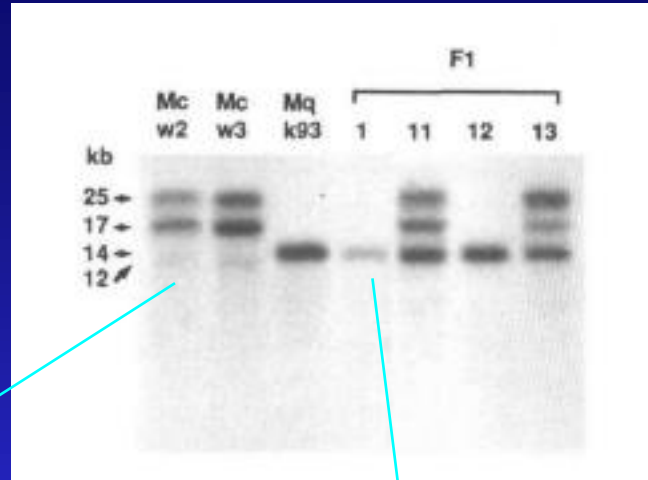
Kiss et al., 1990



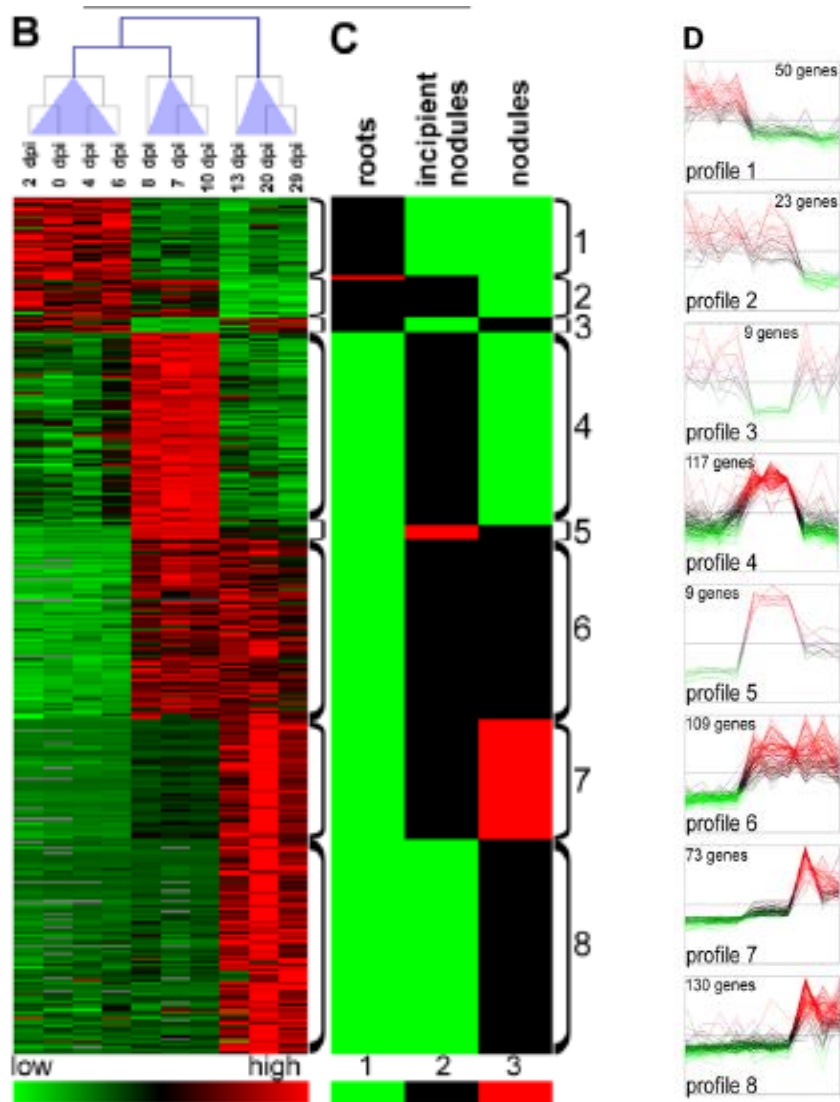
Mi a NOD25 szerepe? Elengedhetetlen vagy nélkülözhető?

ENOD12 génben deléciós növények szimbiotikus fenotípusa

ENOD12 gén - korai nodulin (1-2 órás indukció)



M. truncatula gümő transzkriptom analízise



akár több száz, a nitrogénkötő gümő kialakulásának különböző időpontjában indukálódó vagy represszálódó gént lehet azonosítani

~ 2400 Unigene set

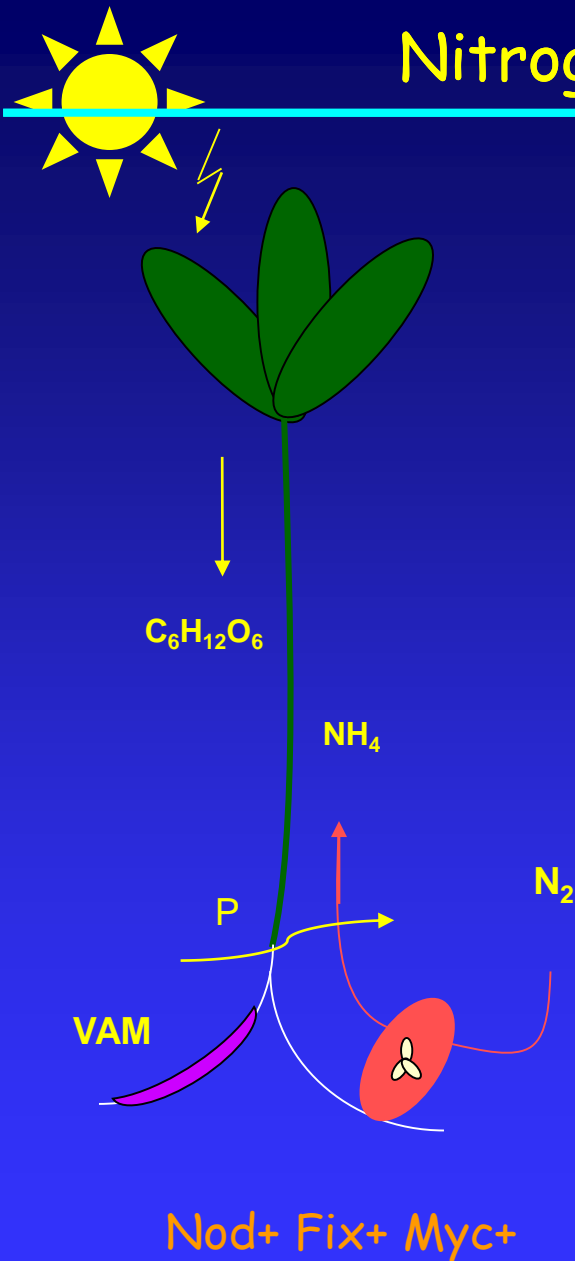
Biokémiai megközelítés problémája

- Gümőspecifikus génizolálás (rekombináns DNS technika)
- Nincs funkció sem a *NOD25*-re, sem az *ENOD12*-re!
- Nincs szimbiotikus fenotípusa az *Mtenod12* gént nem tartalmazó növényeknek
- Stratégia váltás szükséges. Mi lehet a célravezető?
- Mutáns fenotípus vizsgálata és a mutációt szenvedett azonosítása.

Gének funkciójának vizsgálata

- Biokémiai és Genetikai megközelítés
 - Forward genetika
 - Természetben előforduló mutánsok, ökotípusok vizsgálata – DNS polimorfizmusok
 - Indukált mutációk
 - Fizikai mutagének (pl. UV, FN, γ -besugárzás (Co)) – általában nagyobb genetikai átrendeződést eredményez
 - Kémia mutagének (pl. EMS) – pontmutáció (általában G-A tranzíció)
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - Mutáns screen
 - Génazonosítás (térképezésen alapuló génizolálás, microarray- alapú génazonosítás, „gene-tagging”)
 - Reverz genetika
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - TILLING
 - Növényi transzgenézis (Agrobacterium transzformáció)

Nitrogénkötő szimbiotikus kapcsolat



mutációk

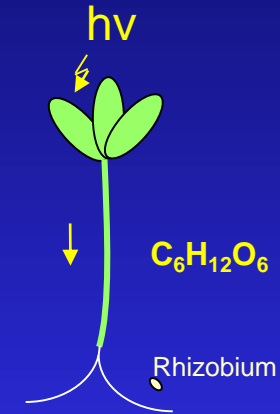


Ms-MN1008

Mt dmi1, dmi2, dmi3, nsp2, nfp, lin, ipd3, stb.

Ps sym10; Ps sym19, stb.

Lj sym1; Lj sym2; sym5, stb.



Nod- Myc-/+

Nod+ Fix- Myc-/+

cél: a szimbiotikus nitrogénkötés biológiai folyamatának megismerése

Szimbiotikus mutánsok azonosítása

fertőzés rhizobiummal



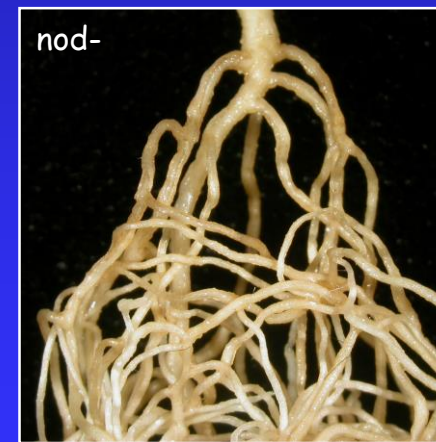
4 - 7 hét növesztés



makroszkópikus és mikroszkópikus vizsgálat

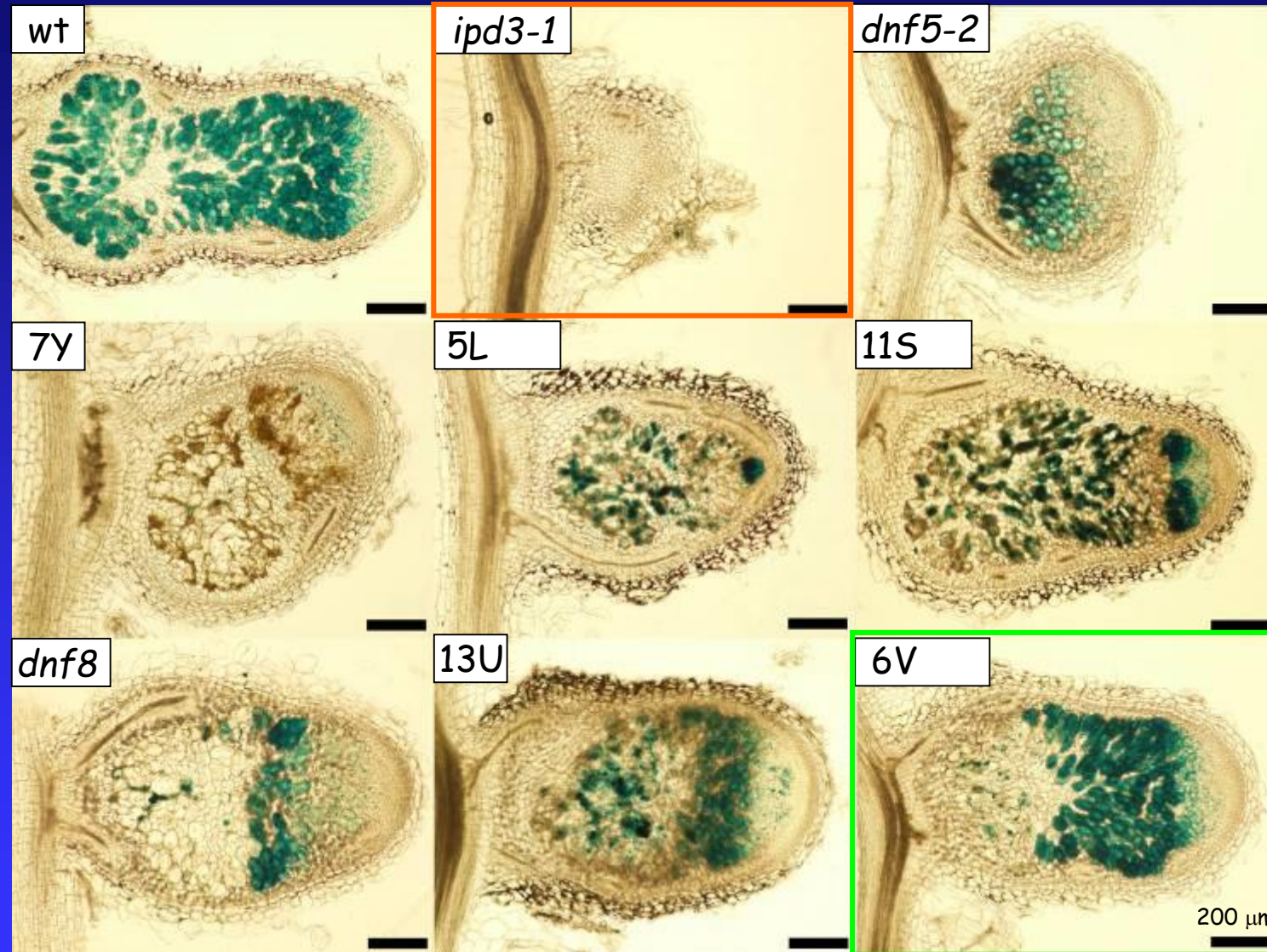


gümőzési mutánsok



Mutáns azonosítás: 40,000 neutron besugárzással vagy EMS kezeléssel mutagenizált *M. truncatula* növény vizsgálata

Nodulation phenotype of the ineffective *M. truncatula* mutants I.



S. meliloti 1021
LacZ , 21 dpi

mutants
5L and 11S
are allelic

200 μm

Gének funkciójának vizsgálata

- Biokémiai és Genetikai megközelítés
 - Forward genetika
 - Természetben előforduló mutánsok, ökotípusok vizsgálata – DNS polimorfizmusok
 - Indukált mutációk
 - Fizikai mutagének (pl. UV, FN, γ -besugárzás (Co)) – általában nagyobb genetikai átrendeződést eredményez
 - Kémia mutagének (pl. EMS) – pontmutáció (általában G-A tranzíció)
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - Mutáns screen
 - Génazonosítás (térképezésen alapuló génizolálás, microarray- alapú génazonosítás, „gene-tagging”)
 - Reverz genetika
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - TILLING
 - Növényi transzgenézis (Agrobacterium transzformáció)

Gének azonosítása mutánsok segítségével

- Hogyan lehet azonosítani egy komplex szerveződésű genomból egy mutációt szenvedett gént?

» Arabidopsis	125 Mb/1C	~25 000 gén
» rizs	430 Mb/1C	~ 50 000 gén
» humán	3400 Mbp/1C	30 000 - 35 000 gén
» búza	16000Mbp/1C	~ 25 000 gén
» gyapot	2,200 Mb/1C	50 000 - 80 000 gén
» <i>Medicago truncatula</i>	450 Mbp/1C	~ 30 000 gén
- Genetikai térképezésen alapuló génizolálás
 - pillangósvirágúak genetikai és genomikai eszköztára, modell szervezetek
- Microarray alapú módszerek
- Inszerciós határoló szekvenciák segítségével
- Genetikai térképezésen alapuló génizolálás menete:
 - térképező populáció létrehozása, genotipizálás
 - Mutáns fenotípus térképhelyének meghatározása
 - Kromoszómaséta, jelölt gének kereése
 - A mutáció azonosítása, a gén klónozása
 - Genetikai komplementáció
 - összehasonlító géntérképezés

Genetikai térképezés

- szülők kiválasztása
- keresztezéssel F1 nemzedék előállítása
- önbeporzással F2 populáció előállítása
- egyedek genotipizálása a különböző markerekre
- a markerek szegregálásának vizsgálata
- kapcsoltság kiszámítása
- térképkészítés

Melyik növényt válasszuk?

Relevant properties of the *Medicago* species

Name	<i>M. sativa</i> (Ms)	<i>Ms ssp. coerulea</i>	<i>Ms ssp. quasifalcata</i>	<i>M. truncatula</i> (Mt)
Agricultural use	main forage crop	no (?)	no (?)	forage crop
Relationship	<i>M. sativa</i> complex	<i>M. sativa</i> complex	<i>M. sativa</i> complex	distinct
Ploidy level	2n=4x=32	2n=2x=16	2n=2x=16	2n=2x=16
Haploid chrom. No.	16	8	8	8
DNA cont. (Mbp)/hap. gen.	> 2000	~ 750	~ 750	~ 500
Life cycle	perennial	perennial	perennial	annual
Crossing	outcrossing	outcrossing	outcrossing	selfing
Self crossing	10%	10%	10%	>> 99 %
Genetic configuration	heterozygous	heterozygous	heterozygous	homozygous
Hybrids	yes	yes	yes	yes (between ssp.)
DNA polymorphism	high	high	high	high enough
DNA transformation	yes	yes	yes	yes
Flowers	blue	blue	yellow	yellow

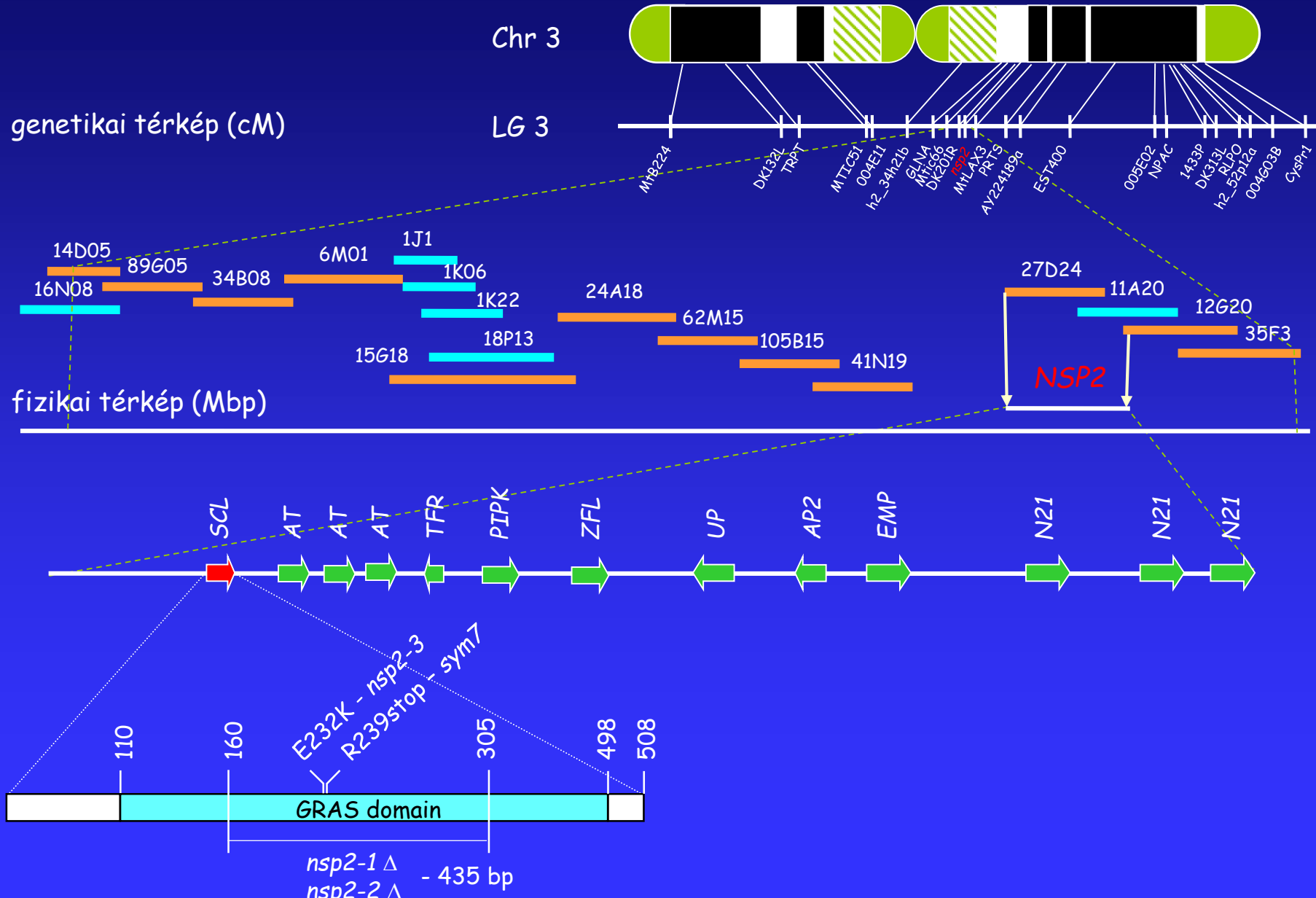
Model legume *Medicago truncatula*



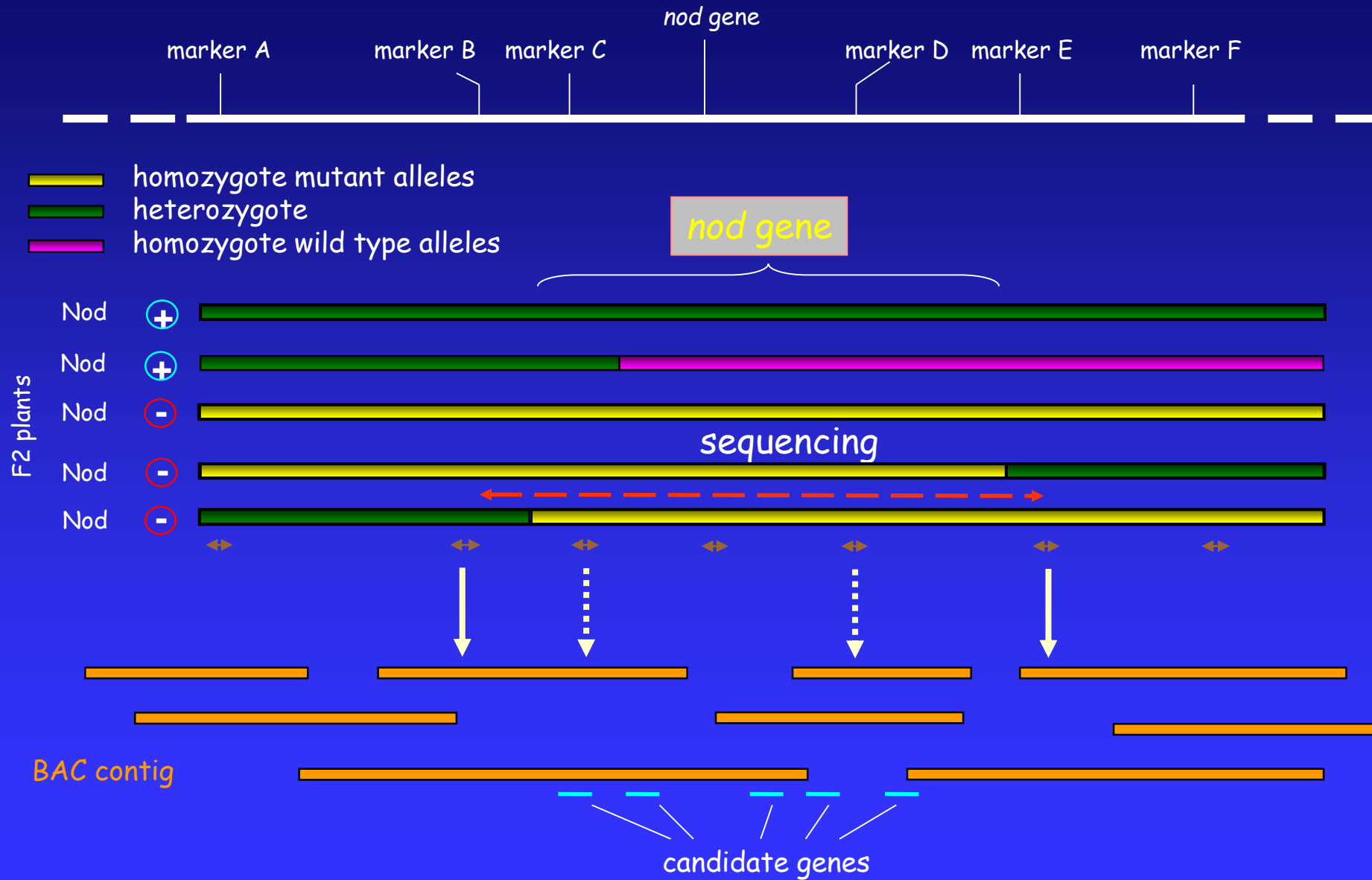
- Annual species closely related to alfalfa and other temperate legumes (pea, lentil, clover, faba bean, chickpea)
- Autogamous
- small, diploid genome (~ 550 Mbp), self-pollinator, short generation time
- Numerous ecotypes
- transformation protocols developed
- tools and resources have been developed:
 - genetic, cytogenetic and physical maps
 - large collection of ESTs
 - tools for transcriptome, proteome and metabolome analysis (Affymetrix microarray)
- genome sequencing in progress (~ 90% of the euchromatic region is finished)



Az MtNSP2 gén térképezésén alapuló izolálása

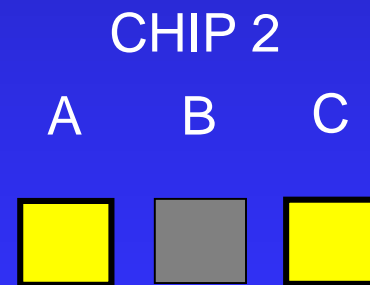
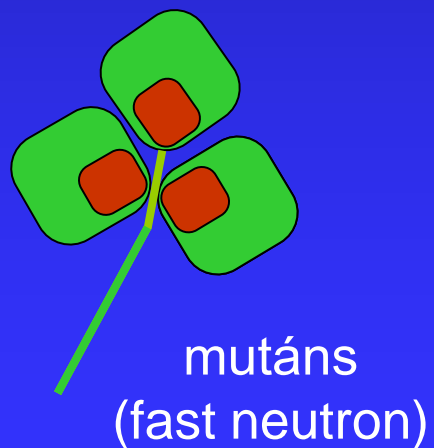
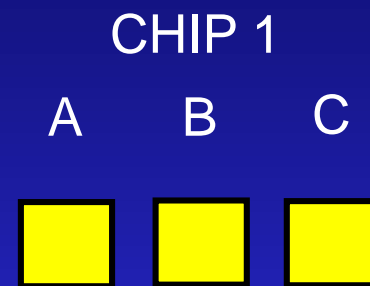
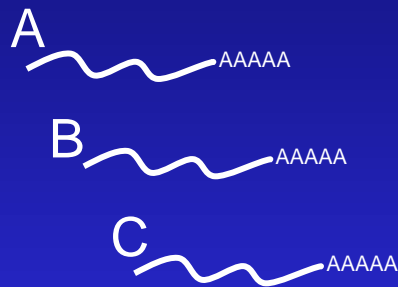
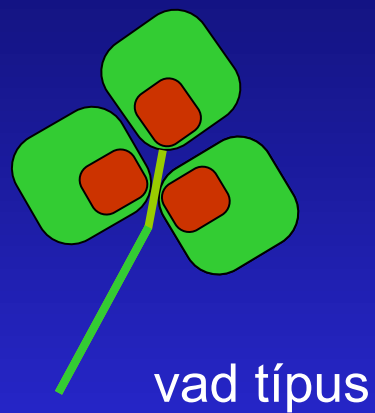


Génklónozás - térképezésen alapuló génizolálás stratégiája



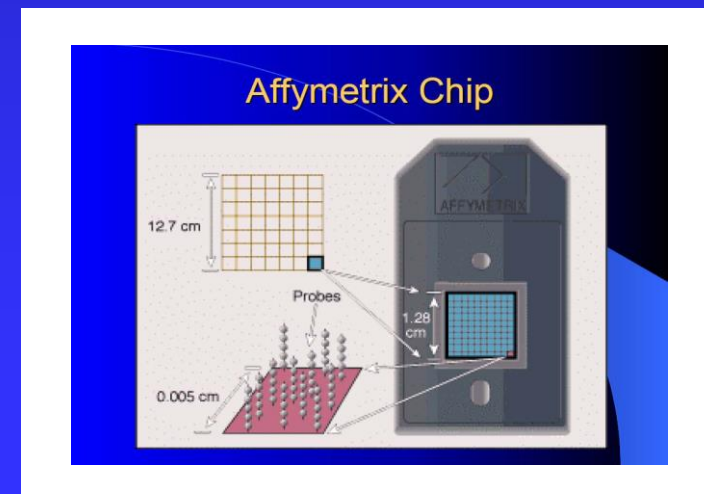
Deléciók genetikai térképezése 1.

Transzkripció mintázat alapján történő klónozás (Affymetrix gene chip)

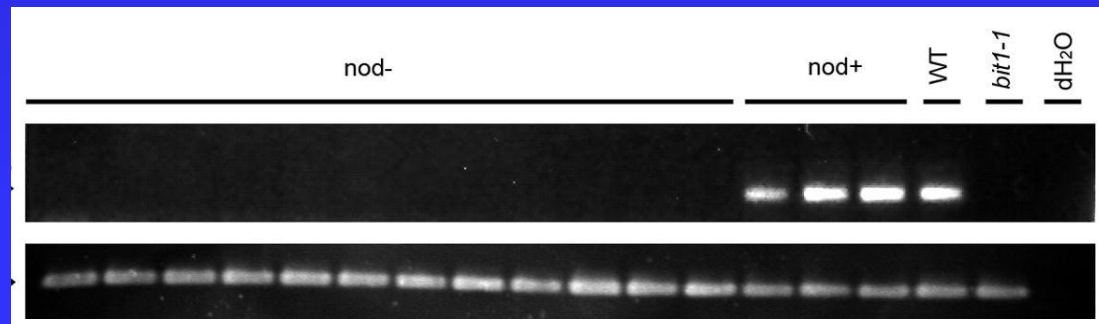
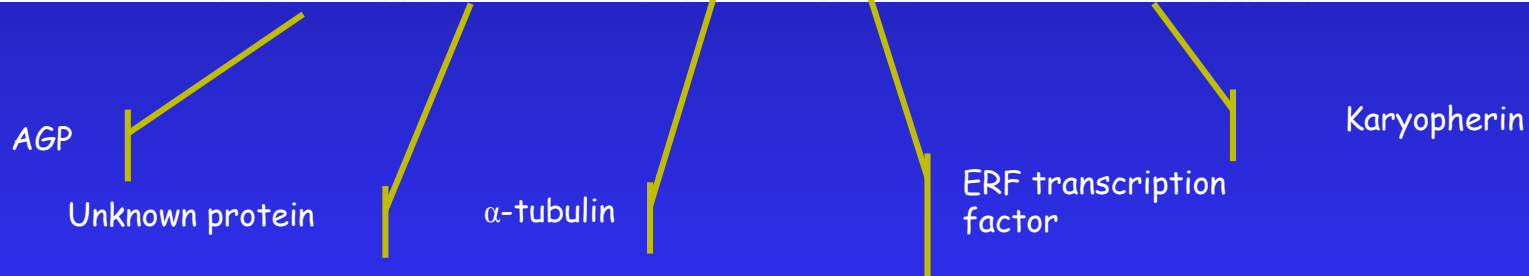
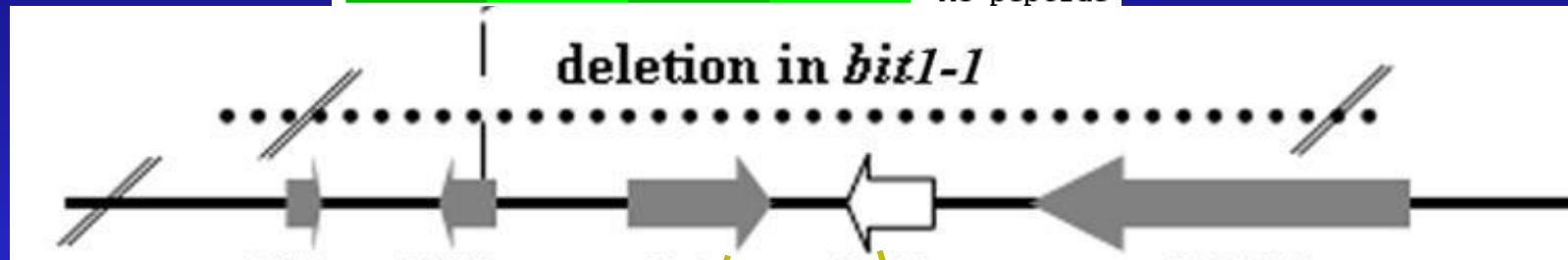
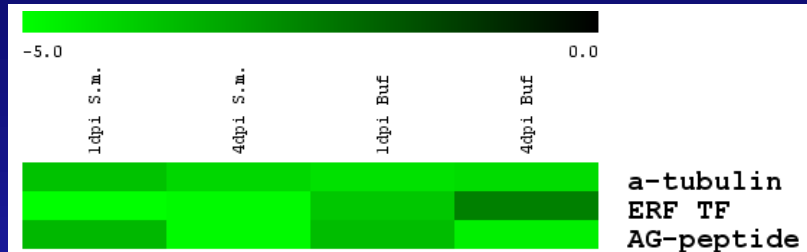


Transzkripció mintázat alapján történő klónozás (Affymetrix gene chip)

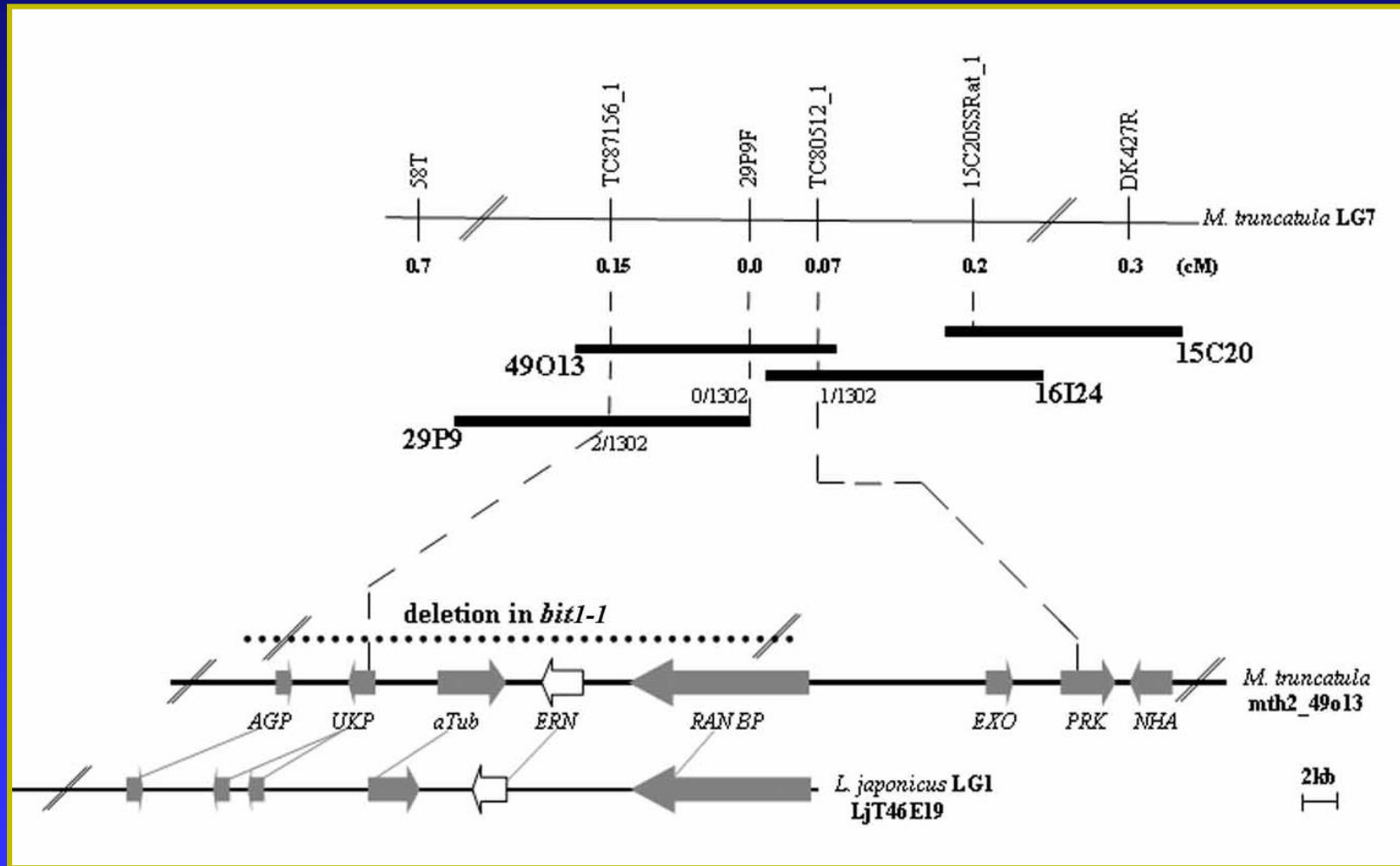
- minden egyes gént 16-20 szintetizált próbapár képvisel
- egy-egy próbapár egy tökéletesen párosodó (PM) és egy „mismatch”-et (MM) tartalmazó oligonukleotidból áll
- egy vizsgált génre a PM és a MM oligonukleotidok jelerősségei közötti átlagos különbségek adják az eredményt
- a Medicago Affymetrix gene chip 61 200 probe set („gént”) tartalmaz
 - 32 167 *M. truncatula* EST/mRNA
 - további 18 733 prediktált gént
 - 1 896 lucerna (*M. sativa*) EST
 - 8 305 *Sinorhizobium meliloti* gént ill. prediktált gén



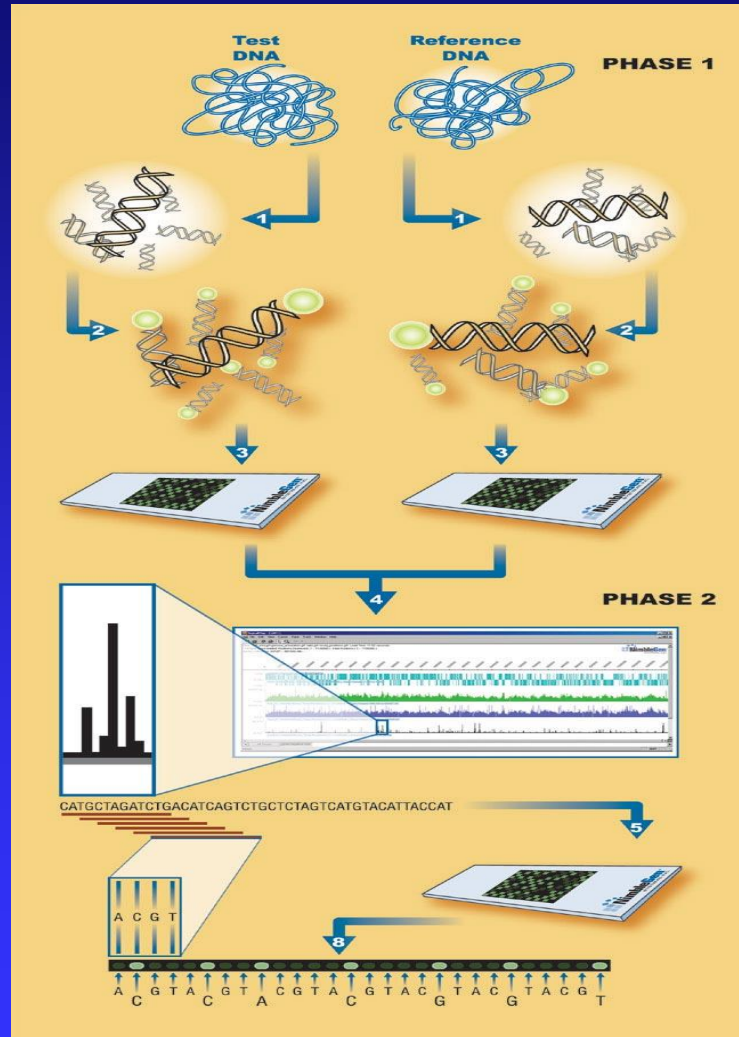
Az *MtERN1* (*bit1-1* mutáns) gén transzkripció mintázat alapján történő azonosítása



Az *MtERN1* (*pdl* mutáns) gén térképezésén alapuló klónozása



Deléciók genetikai térképezése 2. Oligonucleotide Array Comparative Genomic Hybridization (oaCGH)



CGS - Comparative Genome Sequencing

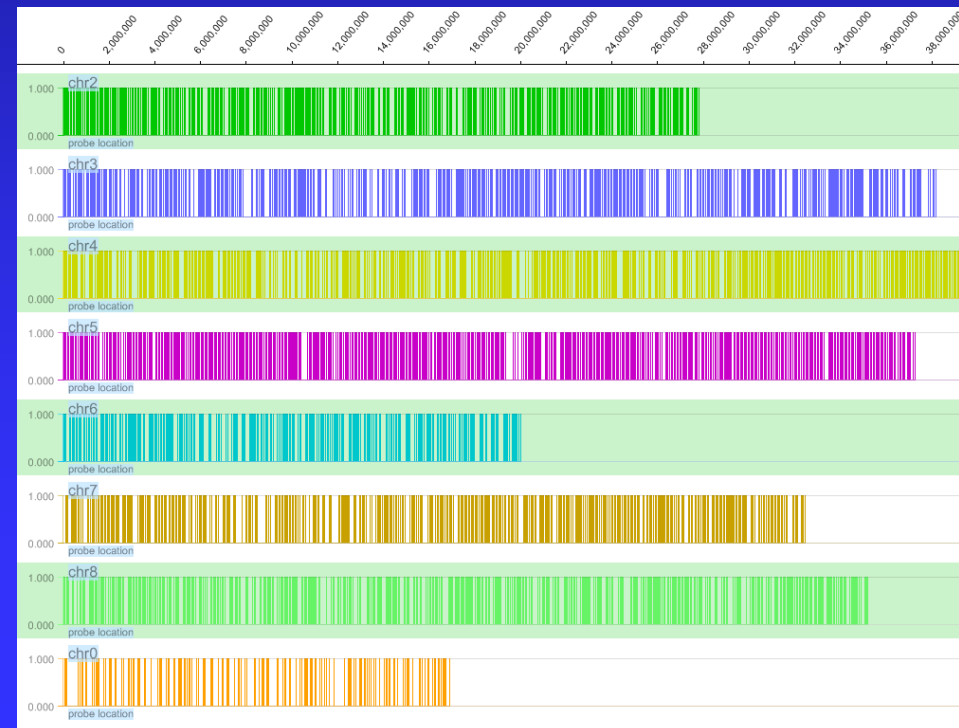
Medicago truncatula - Oligonukleotidok

- exon 150bp
- intron/utr 300bp
- unigenes ≥ 1000 bp 300bp

Deléciók kimutatása

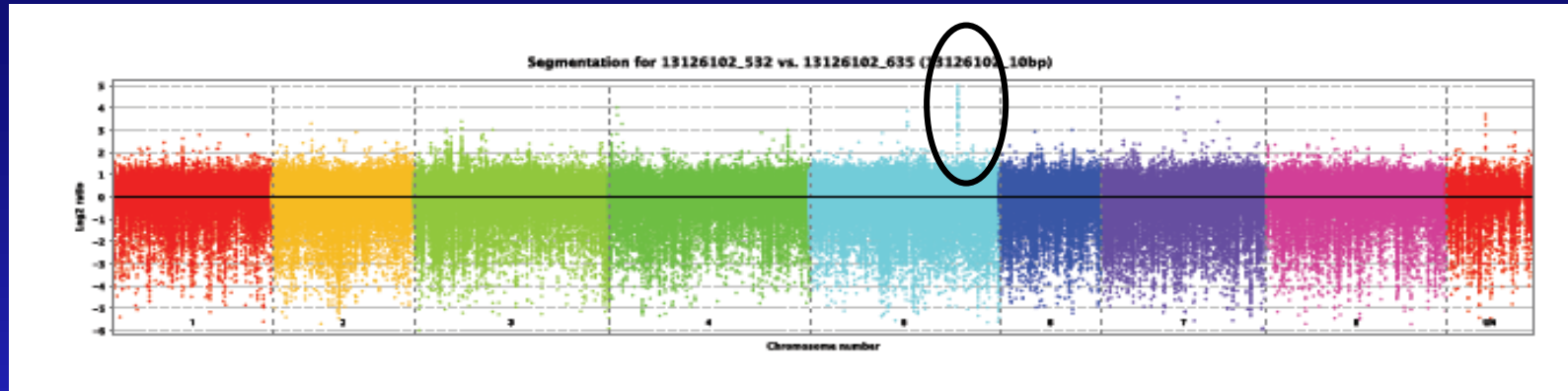
Egy és több kópiás amplifikáció kimutatása

Transzlokáció kimutatása

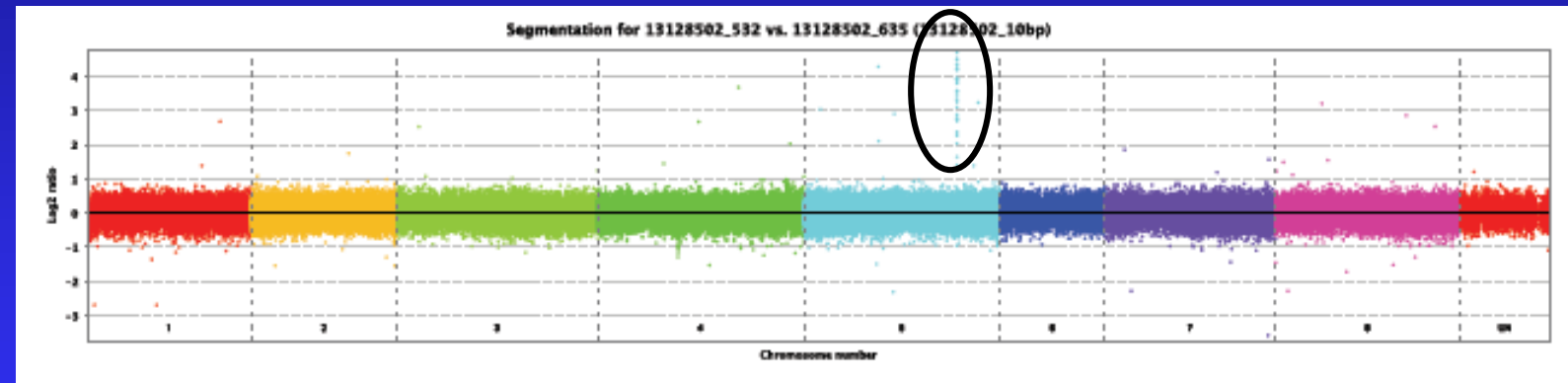


CGH vizsgálat *M. truncatula* növényeken

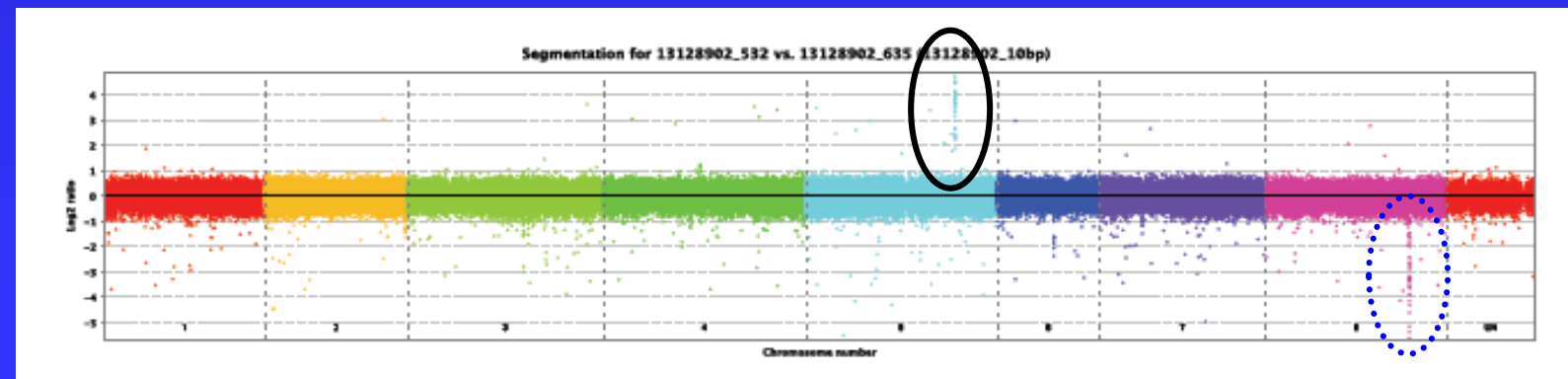
R108



PIN2



FNB#4



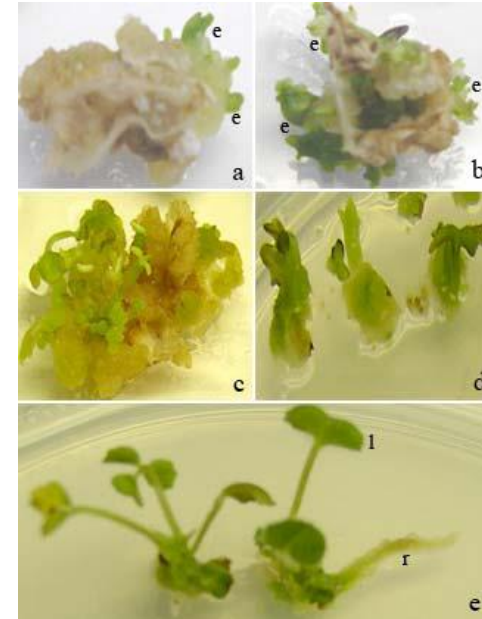
Inszerációs mutagenézis *Medicago truncatula*-ban I.

- *Tnt1* - aktív *M. truncatula* ssp. *tricycla* R108 és ssp. *truncatula* (Jemalong) vonalakban (d'Erfurth et al. 2003)

- **Tnt1 inszerció**



- 5,3 kb copia-like LTR elem
- in vitro szövetkultúrában indukálódik („copy and paste”)
- *Tnt1* stabil a regenerált T0, majd a T1 generációban
- *Tnt1* 3:1 arányban szegregál a T1 generációban
- nem helyspecifikus, „random” beépülés
- stabilan öröklődik
- 4-40 kópia (átlagosan 25-30)
- „forward és reverse” screen (90%-osan sikeres reverse screen; J. Wen, Noble F.)

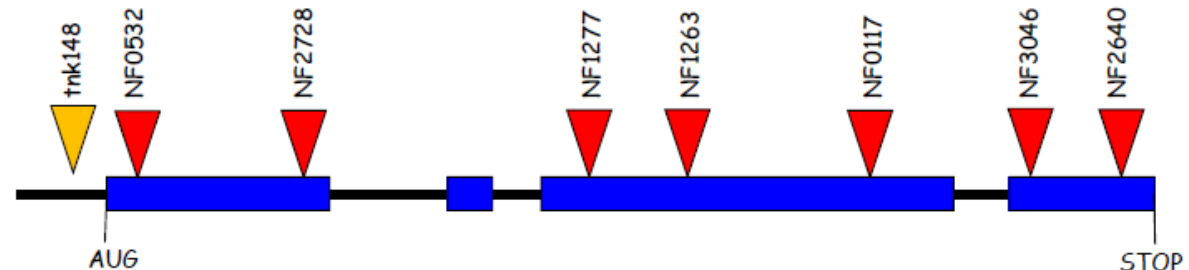


P. Ratet

(Tadege et al., 2008; 2009)

- ***NIN::Tnt1* mutánsok**

- *Ljnin* (nod-) mutáns már ismert volt (Schauser és mtsa. 1999)
- *Medicago* mutáns - Marsh et al. 2007
- számos *nin* allélt sikerült azonosítani



Approach and strategy



- The tobacco retrotransposon *Tnt1* is active in *M. truncatula* (D'Erfurth et al. Plant J. 2003)
- tissue culture mobilizes *Tnt1* transposons
- average of 20 insertions per plant
- *Tnt1* is stable in regenerated (T0) plants and in the progeny (T1)
- *Tnt1* insertions segregate independently and follow Mendelian segregation ratio
- *Tnt1* inserts randomly in the *M. truncatula* genome but it inserts preferentially in genes (Tadege et al. Plant J. 2008)

Tnt1 is an efficient tool for insertion mutagenesis and can be used forward and reverse genetic screening



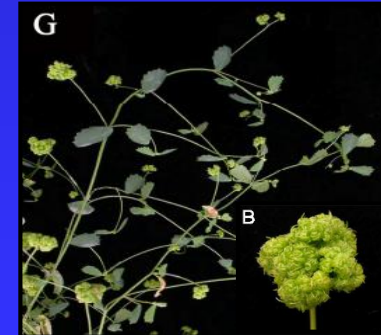
wild type



Mtpim (*Ap1*)



MtUFO



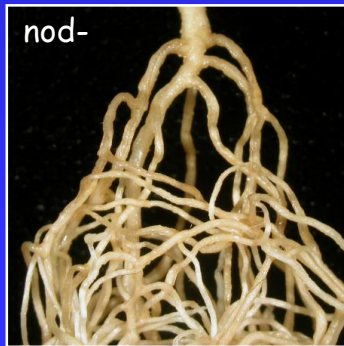
Sgl1 (*LFY*)

Insertion mutants to study *M. truncatula*/*S. meliloti* symbiosis and root architecture

- inoculation of the Tnt1 insertion lines with rhizobia
- macroscopic and microscopic analysis (nodule morphology and zonation; differentiation of bacteria)
- characterization of mutants based on expression profile of symbiosis or lateral root development specific genes (real time PCR)



wt
symbiotic mutants



compact root architecture (cra)

less lateral roots (llr)

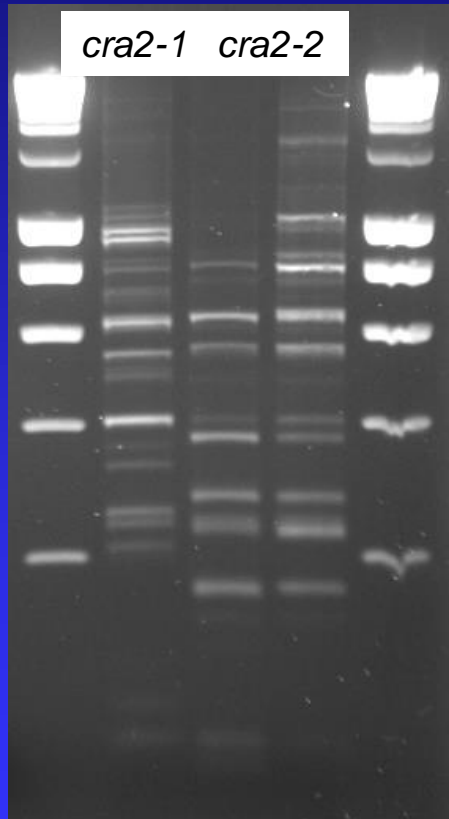
(Noble Foundation Ardmore, USA)

cra shows *nod*+/- phenotype

(0-3 nodules compared to wt (> 13 nodules))



transposon display



Strategy

- 1) Backcrosses
- 2) Amplification of *Tnt1* borders and generation of FSTs
- 3) Segregation analysis
- 4) Identification of alleles in *Medicago* and/or other legumes (e.g. pea) based on:
 - synteny between legumes
 - crossings between *Medicago* mutants from various collections
 - based on FST collection generated at the Noble foundation (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/>)

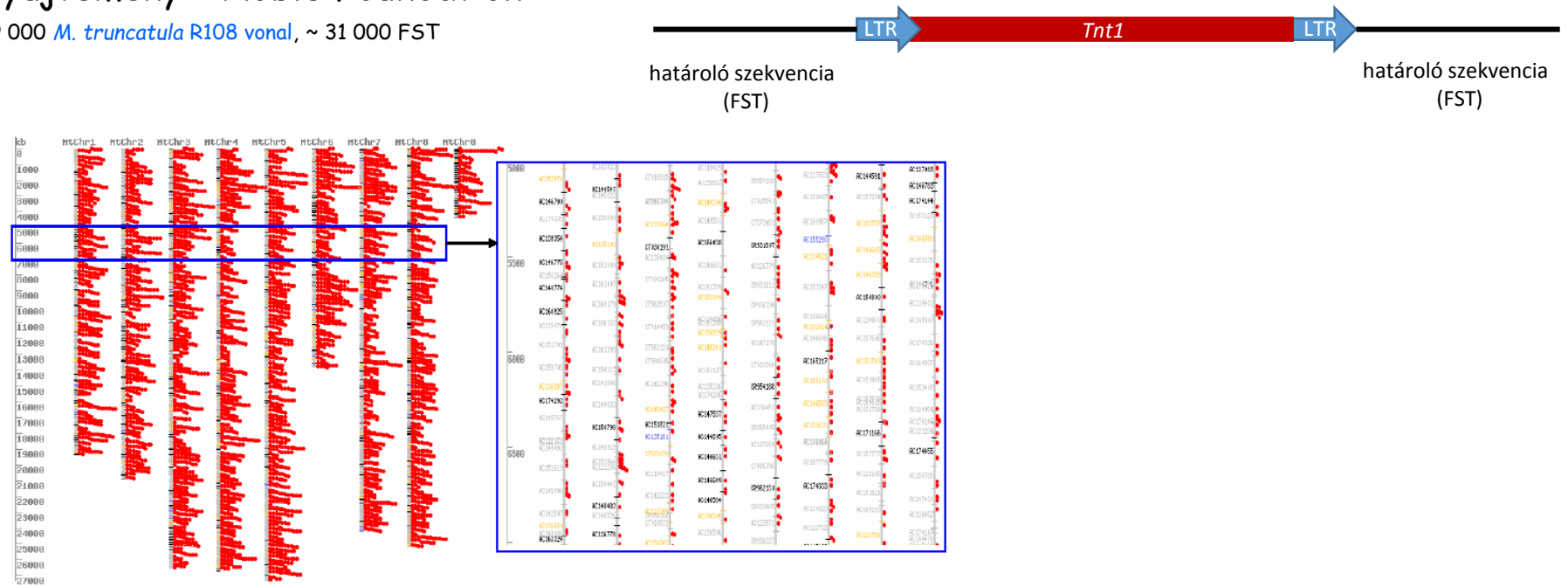
Gének funkciójának vizsgálata

- Biokémiai és Genetikai megközelítés
 - Forward genetika
 - Természetben előforduló mutánsok, ökotípusok vizsgálata – DNS polimorfizmusok
 - Indukált mutációk
 - Fizikai mutagének (pl. UV, FN, γ -besugárzás (Co)) – általában nagyobb genetikai átrendeződést eredményez
 - Kémia mutagének (pl. EMS) – pontmutáció (általában G-A tranzíció)
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - Mutáns screen
 - Génazonosítás (térképezésen alapuló génizolálás, microarray- alapú génazonosítás, „gene-tagging”)
 - Reverz genetika
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - TILLING
 - Növényi transzgenézis (Agrobacterium transzformáció)

Inszerációs mutagenézis *Medicago truncatula*-ban

- mutánsgyűjtemény - Noble Foundation

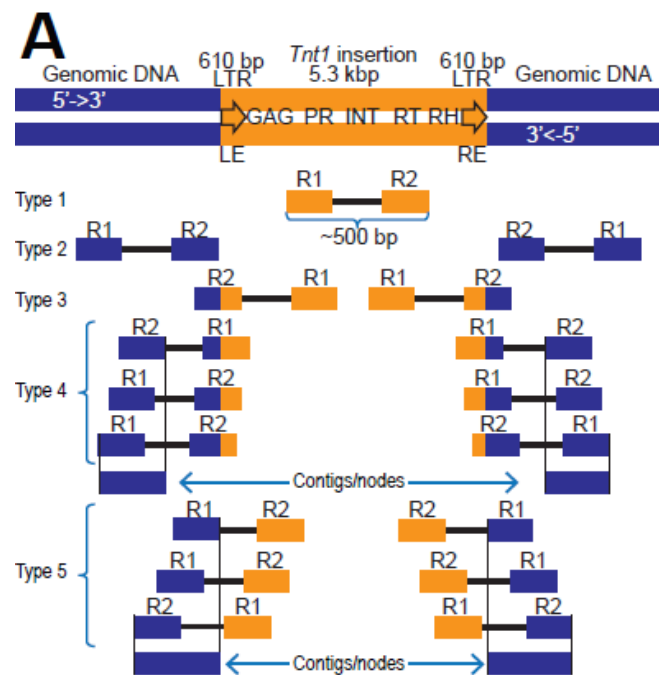
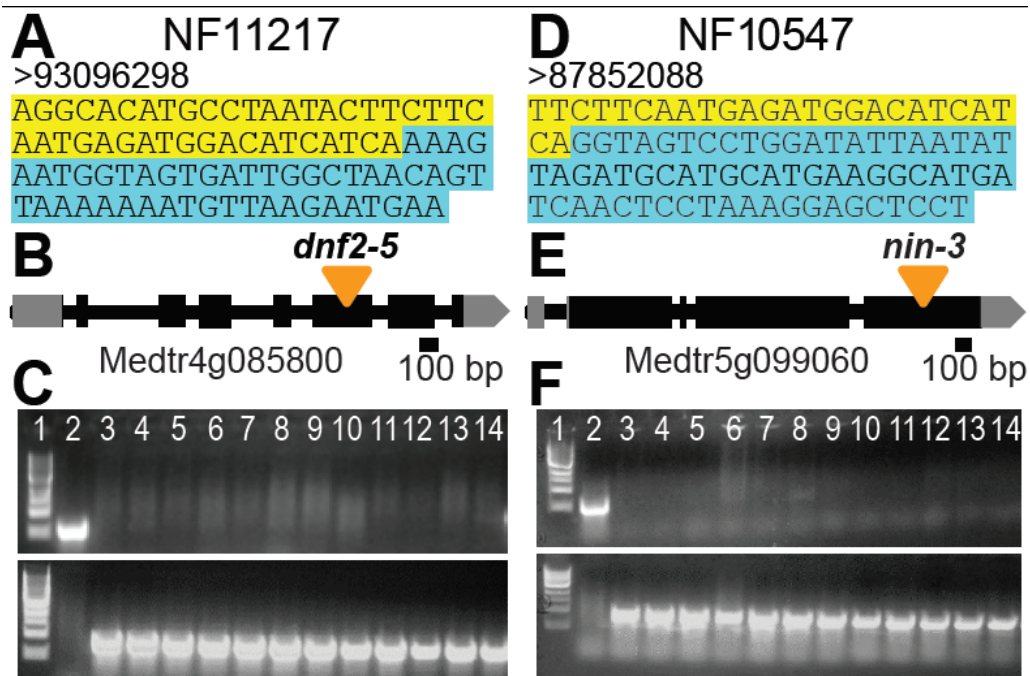
kb. 19 000 *M. truncatula* R108 vonal, ~ 31 000 FST



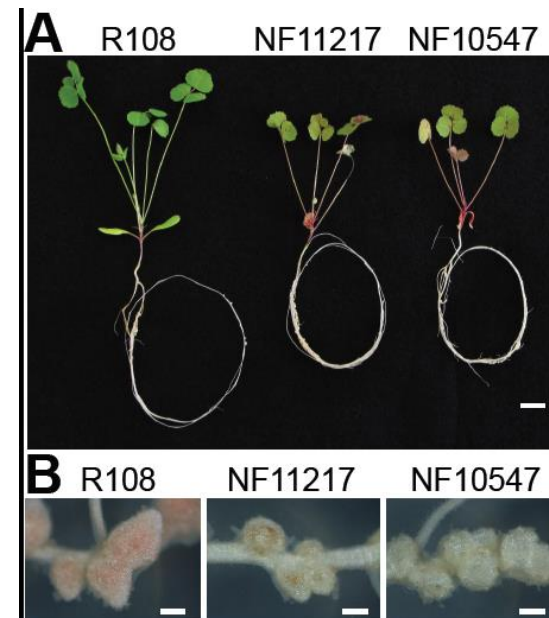
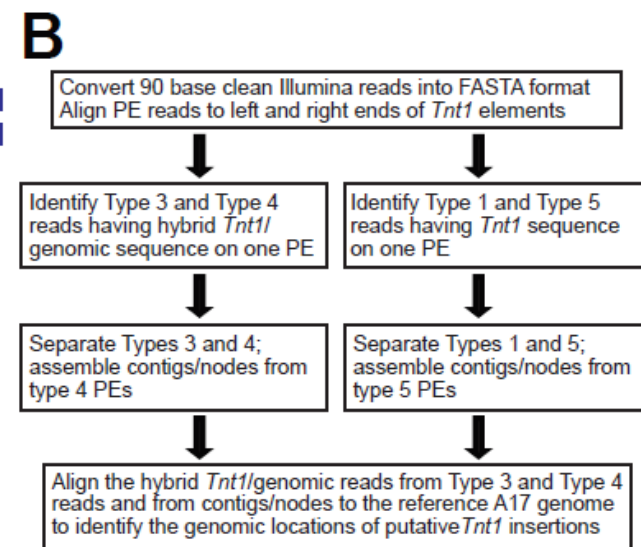
- MERE retroelement (alacsony kópiaszámú; Rakoczevic et al. 2009)

M. truncatula inszerciós mutánsok reverse genetikai használata

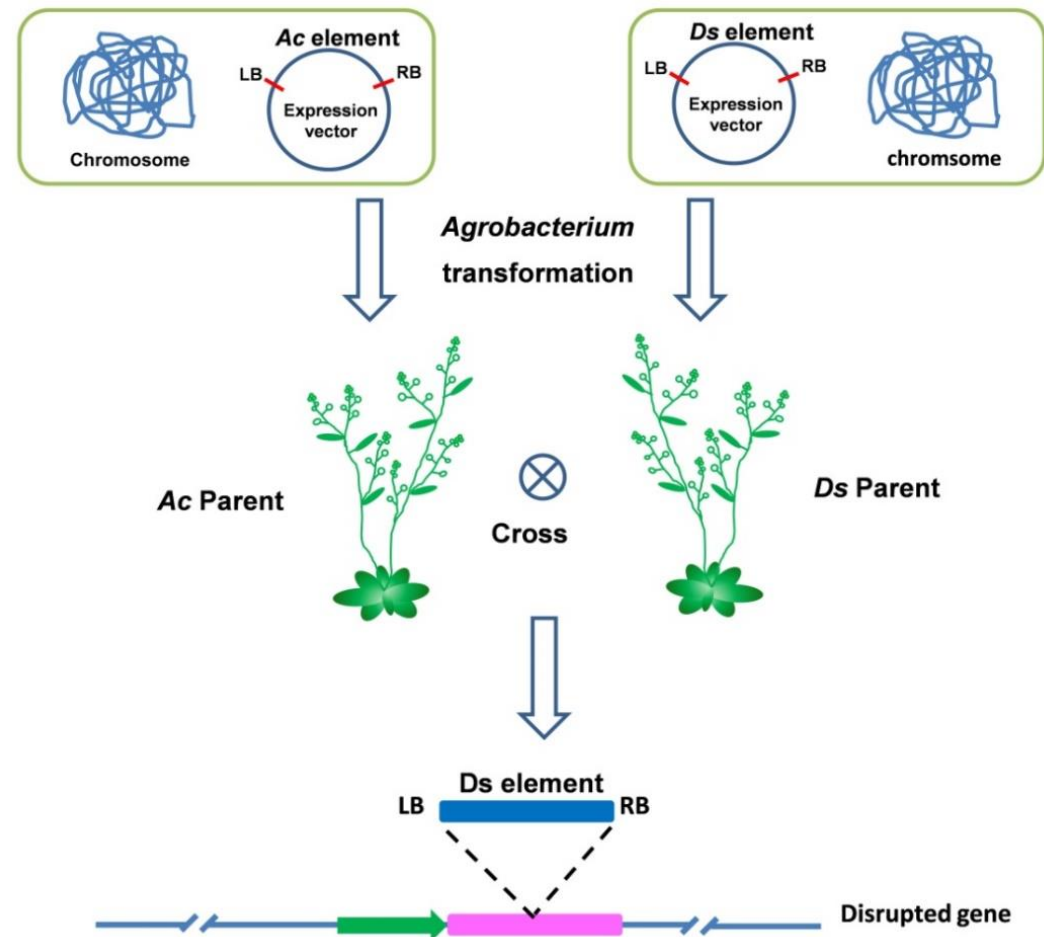
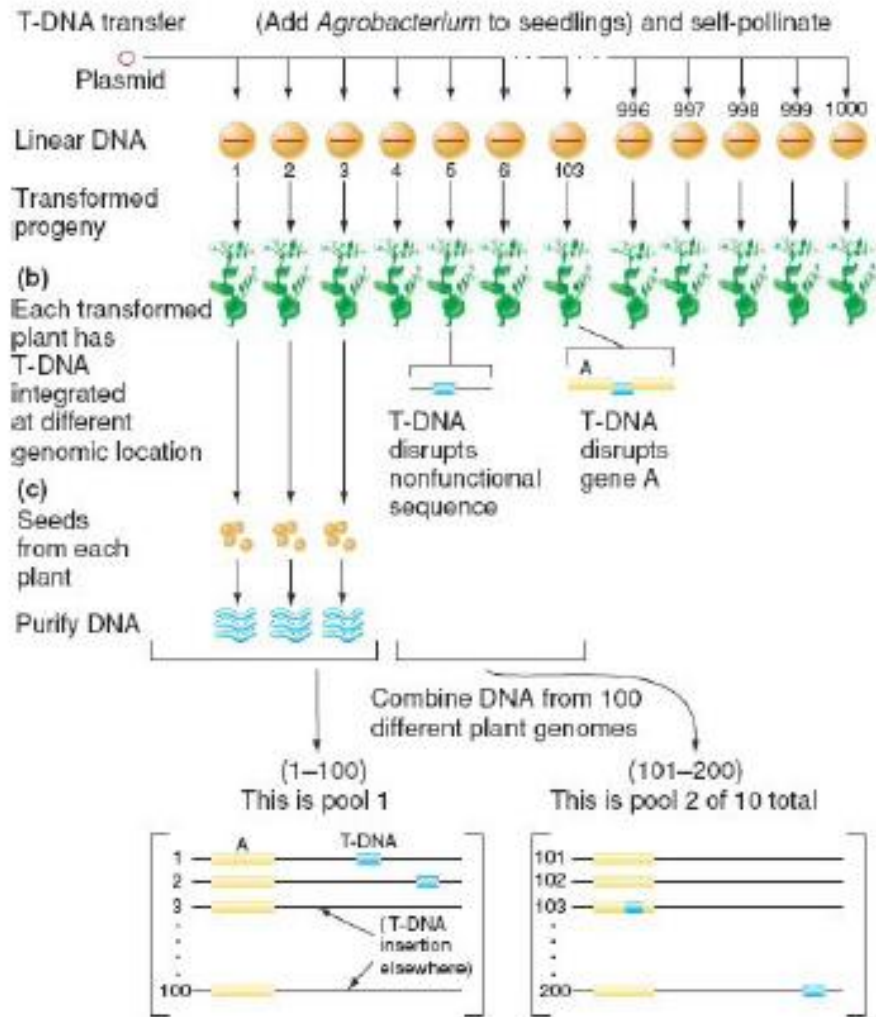
- Feltétele
 - Inszerciót tartalmazó növények gyűjteménye
 - nagy mennyiségű határoló szekvencia ismerete
 - TAIL-PCR
 - NGS
 - Ko-szegregációs vizsgálatok



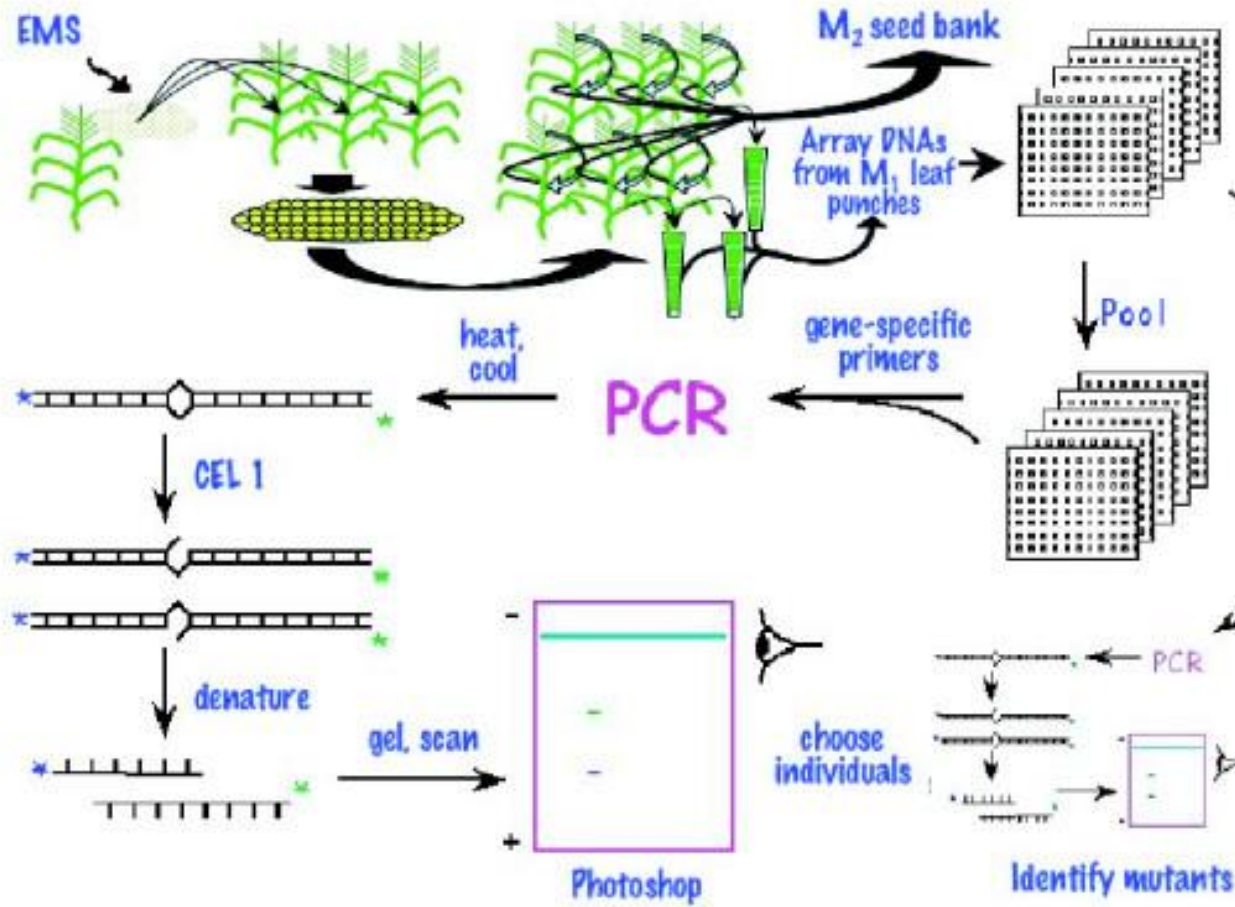
Veerappan et al.



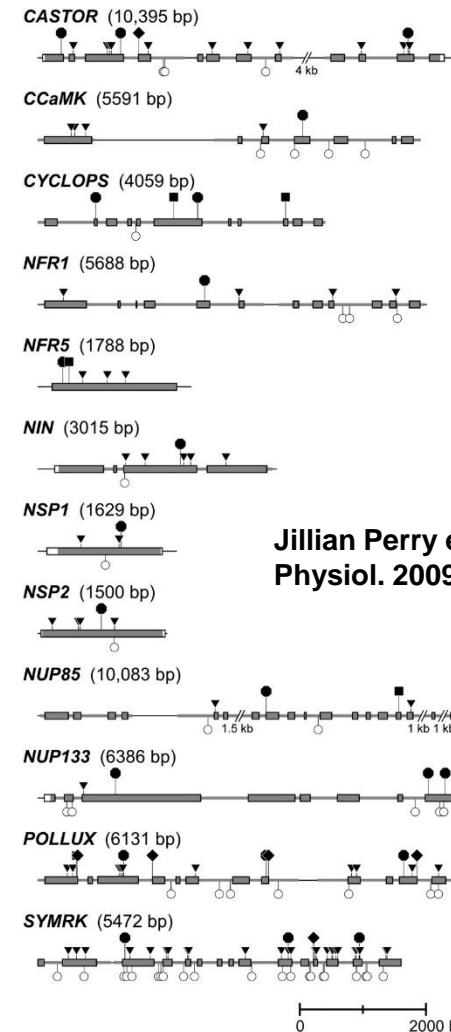
Inszerációs mutánsok előállításának további módszerei



TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes)

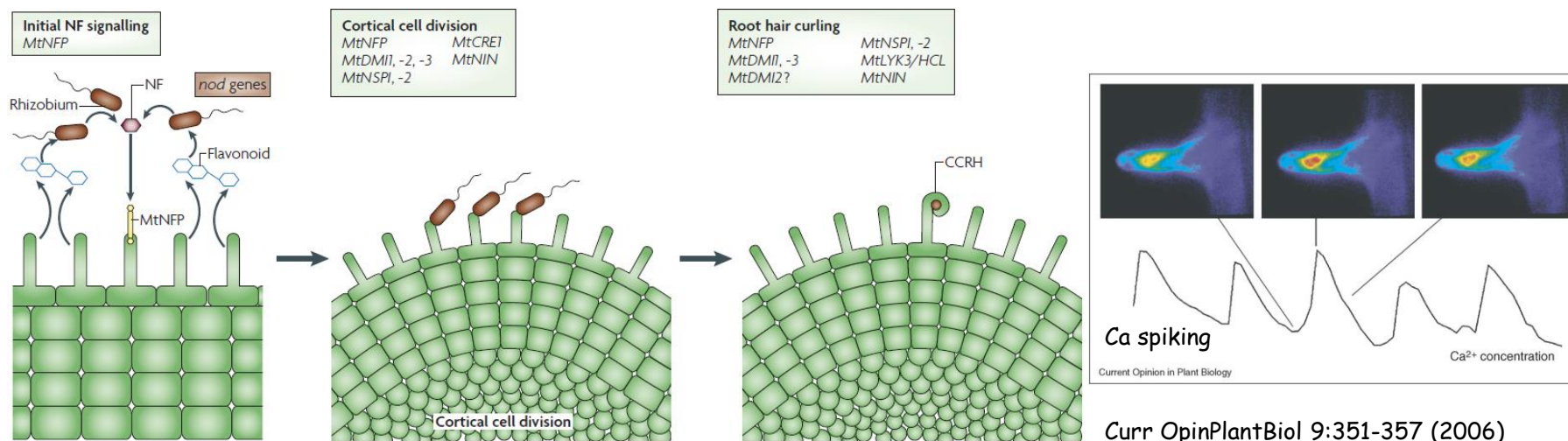


TILLING módszerrel azonosított nodulációs gének mutáns alléljai



Jillian Perry et al. *Plant Physiol.* 2009;151:1281-1291

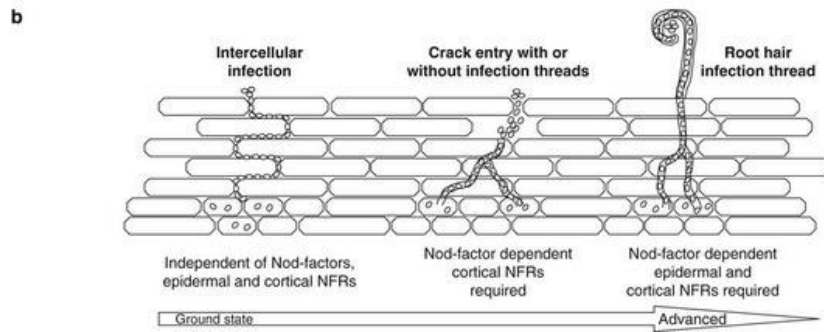
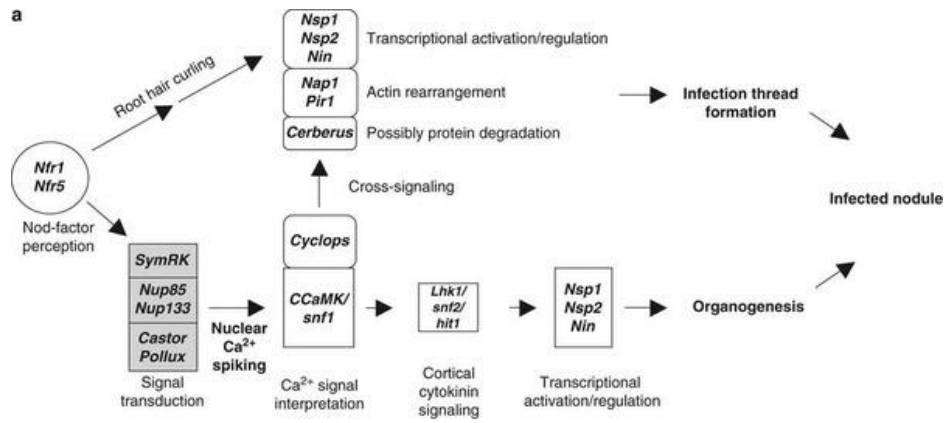
A *S. meliloti* és a *M. truncatula* közötti korai jelcserében résztvevő gének azonosítása



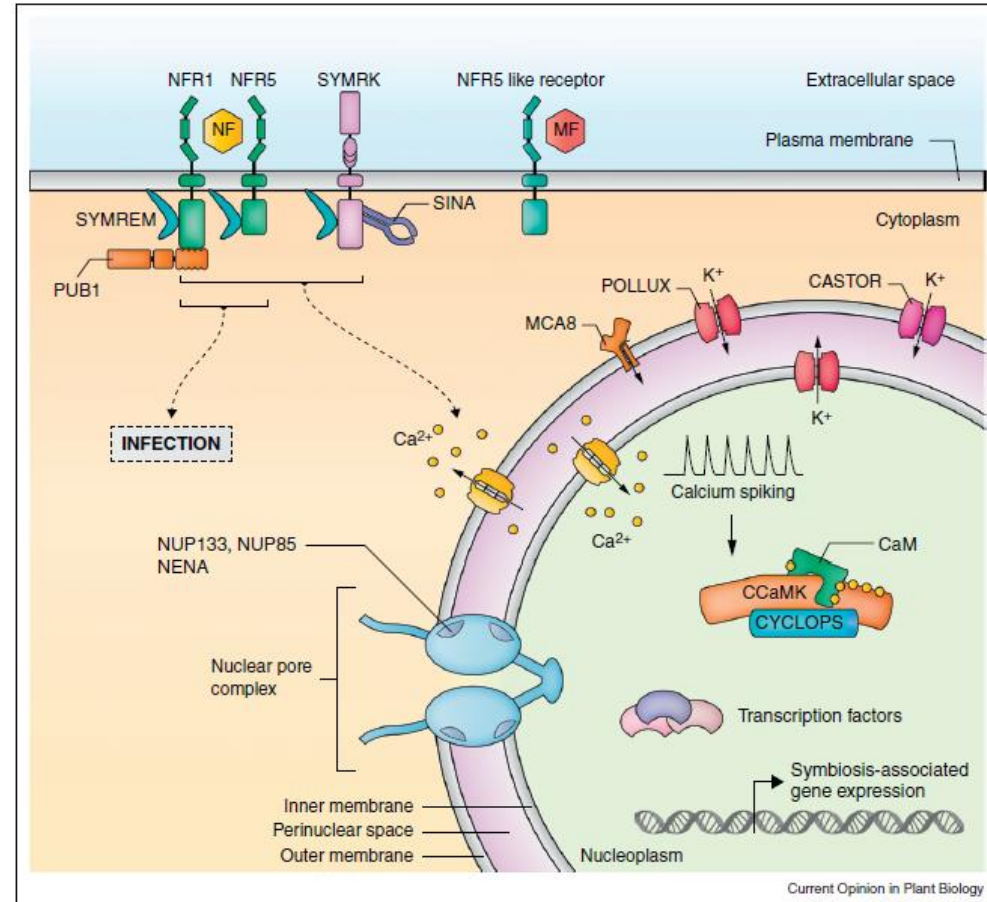
NatRevMicrob 5:619-633 (2007)

Mutant	Symbol name	Symbiotic phenotype	Mutant phenotype	Gene product
<i>dmi1</i>	doesn't make infections 1	Nod-; Myc-	defective in nodulin gene expression, root hair deformation, Ca spiking,	predicted ion channel protein
<i>dmi2</i>	doesn't make infections 2	Nod-; Myc-	defective in nodulin gene expression, root hair deformation, Ca spiking,	LRR-type RLK
<i>dmi3</i>	doesn't make infections 3	Nod-; Myc-	defective in nodulin gene expression, root hair deformation, Shows NF induced calcium spiking	CCaMK
<i>nfp</i>	Nod factor perception	Nod-; My+	defective in nodulin gene expression, root hair deformation, Ca spiking, NF induced Ca flux.	LysM RK
<i>nsp1</i>	nodulation signaling pathway 1	Nod-; Myc+	defective in Nod factor induction of gene expression, root hair deformation, cortical cell division and bacterial infection. Shows NF induced calcium spiking	GRAS-type TF
<i>nsp2</i>	nodulation signaling pathway 2	Nod-; Myc+	defective in Nod factor induction of gene expression, root hair deformation, cortical cell division and bacterial infection. Shows NF induced calcium spiking	GRAS-type TF

A szimbiotikus szignál utak a modellnövényekben



NatRevMicrob 5:619-633 (2007)



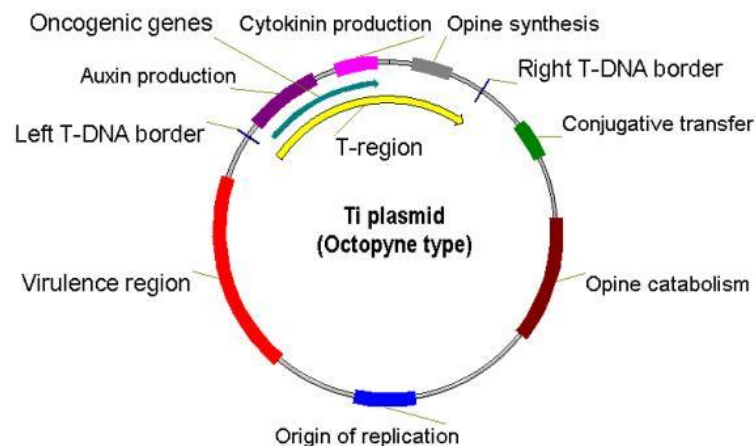
Martin Parniske

Gének funkciójának vizsgálata

- Biokémiai és Genetikai megközelítés
 - Forward genetika
 - Természetben előforduló mutánsok, ökotípusok vizsgálata – DNS polimorfizmusok
 - Indukált mutációk
 - Fizikai mutagének (pl. UV, FN, γ -besugárzás (Co)) – általában nagyobb genetikai átrendeződést eredményez
 - Kémia mutagének (pl. EMS) – pontmutáció (általában G-A tranzíció)
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - Mutáns screen
 - Génazonosítás (térképezésen alapuló génizolálás, microarray- alapú génazonosítás, „gene-tagging”)
 - Reverz genetika
 - Inszerciós mutagenézis (T-DNS, transzpozon)
 - TILLING
 - Növényi transzgenézis (Agrobacterium transzformáció)

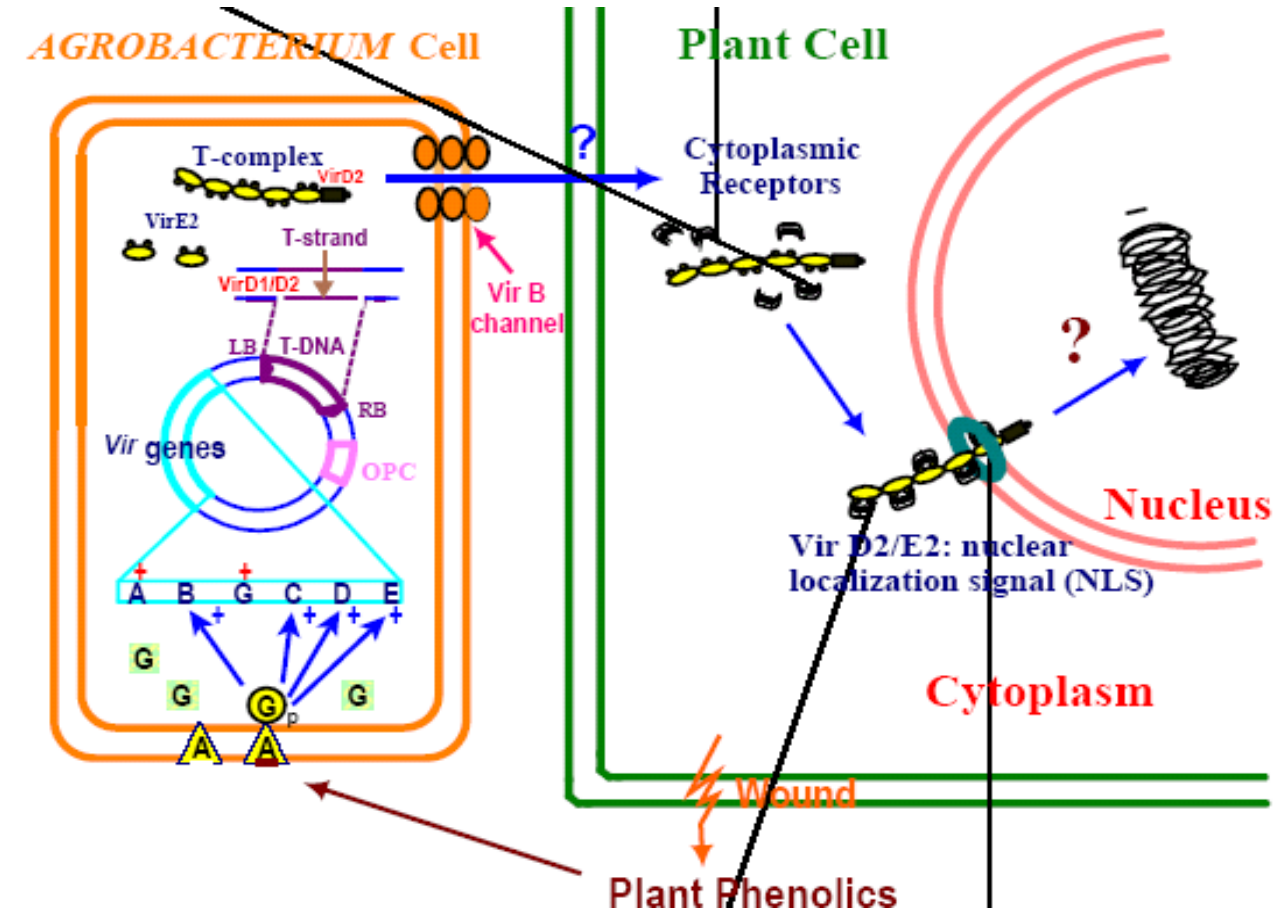
Agrobacterium által előidézett növénytranszformáció

- Gram- negatív talajbaktérium
- Sebzési helyeken keresztül fertőz
- Az egyszikűek kivételével a legtöbb növényt képesek fertőzni
- Folyamatos sejtburjánzás → Tumorképződés (gyökérgolyva – *A. tumefaciens*) vagy másodlagos gyökérvégképződés (*A. rhizogenes*)
- Egy transzportrendszer segítségével a baktérium transzformálja a fertőzött növényt (HGT)



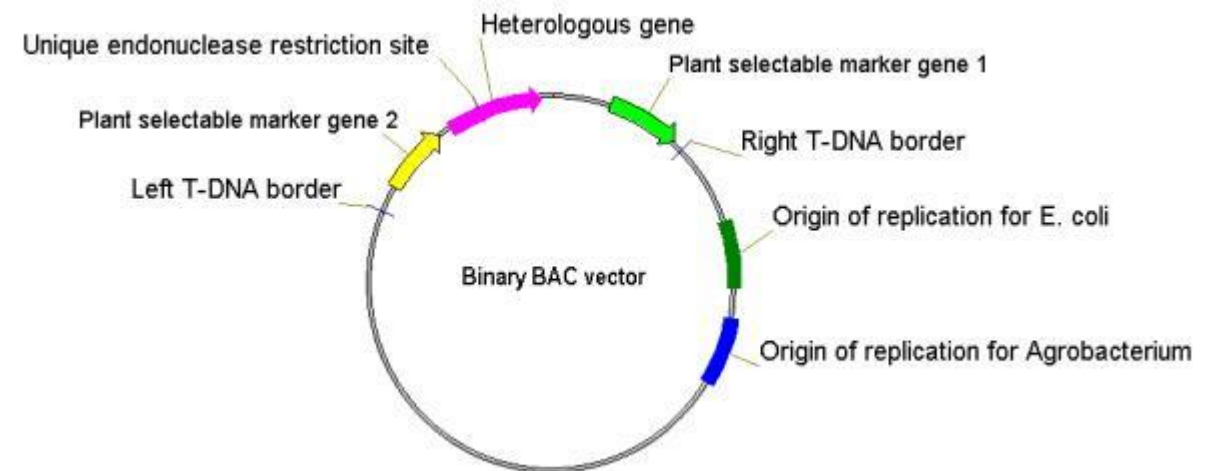
Agrobacterium T-DNS átvitele

- Bakteriális eredetű gének jutnak át a növényi genomba
- Az átjuttatott gének Ti/Ri plazmidon (> 200 kb) találhatóak, onnan vágódnak ki
- Egy transzportrendszer segítségével a baktérium transzformálja a fertőzött növényt
- Baktérium gének (T-DNS) épülnek be a növényi genomba (Vir gének), ahol konstitutívan expresszálódnak és anyagcsere változásokat idéznek elő (onkogének)



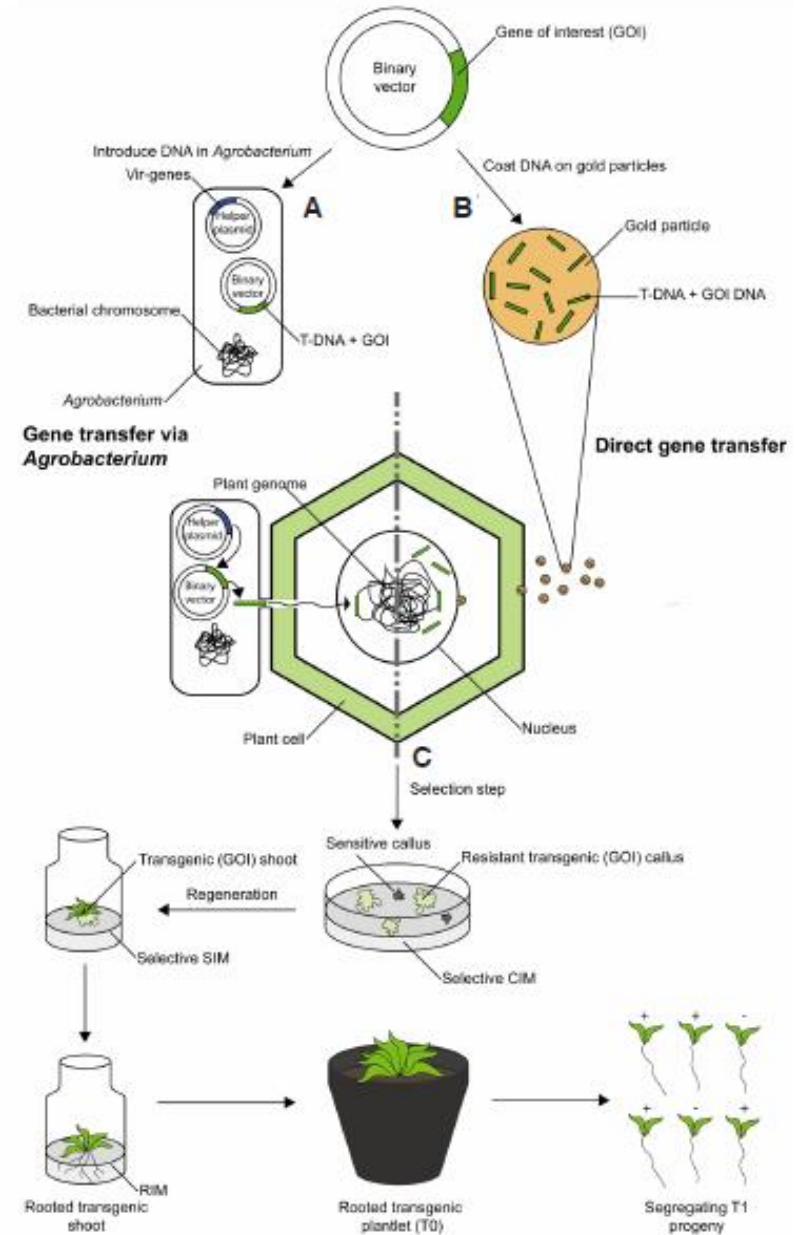
Transzformáció Agrobacterium segítségével I.

- Az Agrobacterium természetes génevktorként használhatók
- Transzformáció Ti plazmid alapú bináris vektorokkal
 - **bináris plazmid** (hormon és *Vir* gének nélkül, Cambia, Gateway, stb.)
 - Bevinni kívánt gén/szekvencia (T-DNS – LR/RB)
 - Promóter
 - konstitutív expressziót biztosító natív vagy idegen pl. *CaMV35S*, *Ubi1*, *Act1*
 - indukálható (pl. SA, tetraciklin, szteroid, sebzés, stb.)
 - szövetspecifikus (endospermium, levél, stb.)
 - Terminációs szekvencia (pl. T35S)
 - Szelekciós marker
 - Baktériumban (*E. coli*, *Agrobacterium*)
 - Növényben
 - Antibiotikum (hyg, amp) rezisztencia
 - Herbicid (foszotricin)
 - Fluoreszcens (GFP, mCherry)
 - Enzimatis reakció (GUS-festés)
- **helper Ti plazmid** (T-DNS nélkül *Vir* gének)

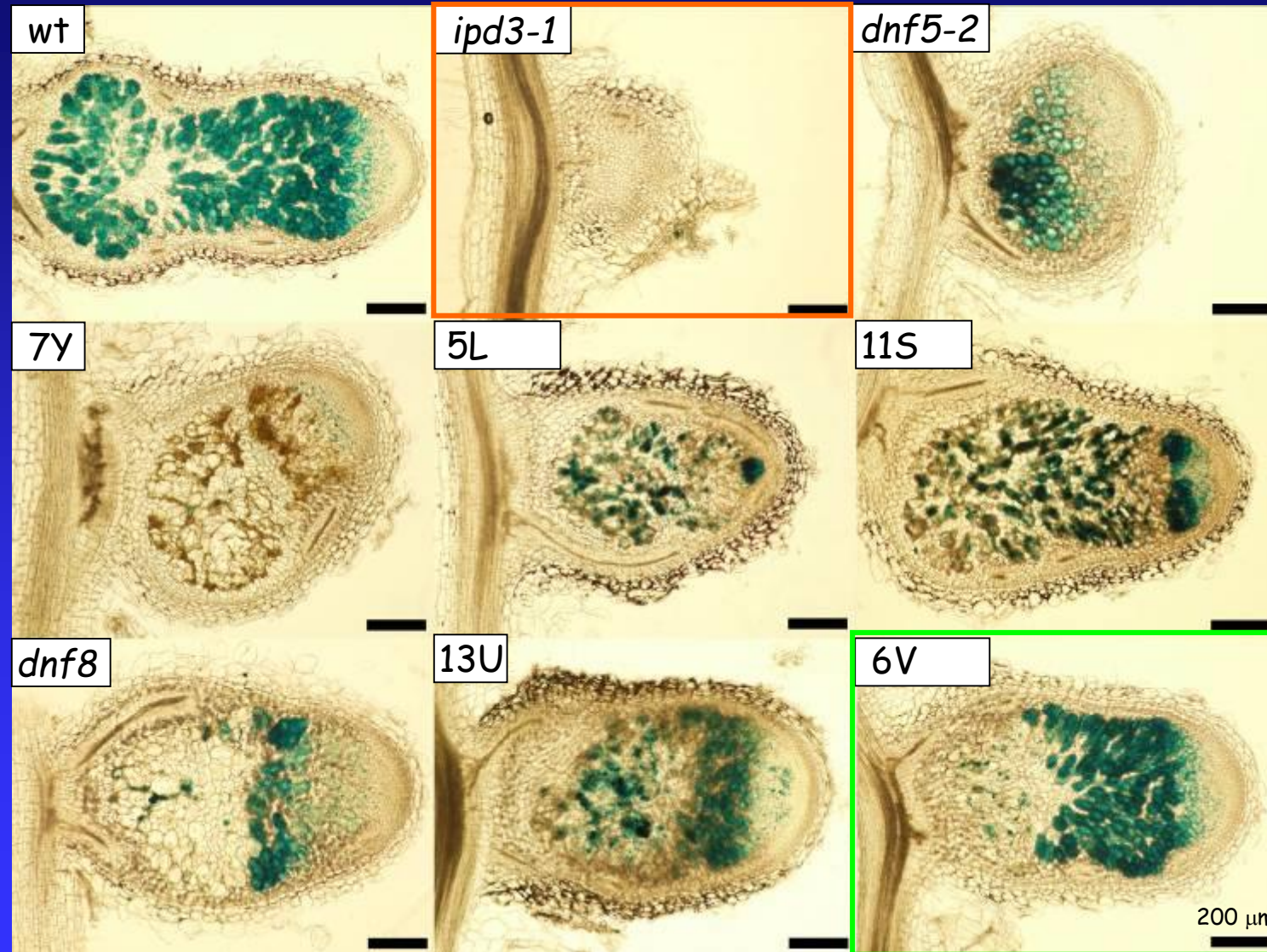


Transzformáció Agrobacterium segítségével II.

- Transzformáció (indirekt és direkt módszerek: infiltráció, együtt tenyésztés, biolisztikus módszer, PEG, stb.; protoplaszt vagy szövet/növény transzformálása)
- Véletlenszerű beépülés
- Integrálódást követően mendeli öröklődés
- Felhasználási lehetőségek
 - Gének expressziós vizsgálata
 - Géntermék vizsgálata
 - Genetikai komplementáció
 - Egyéb gének kifejeztetése (GMO)
 - Ellenállóság kialakítása
 - Mennyiségi és minőségi javítás



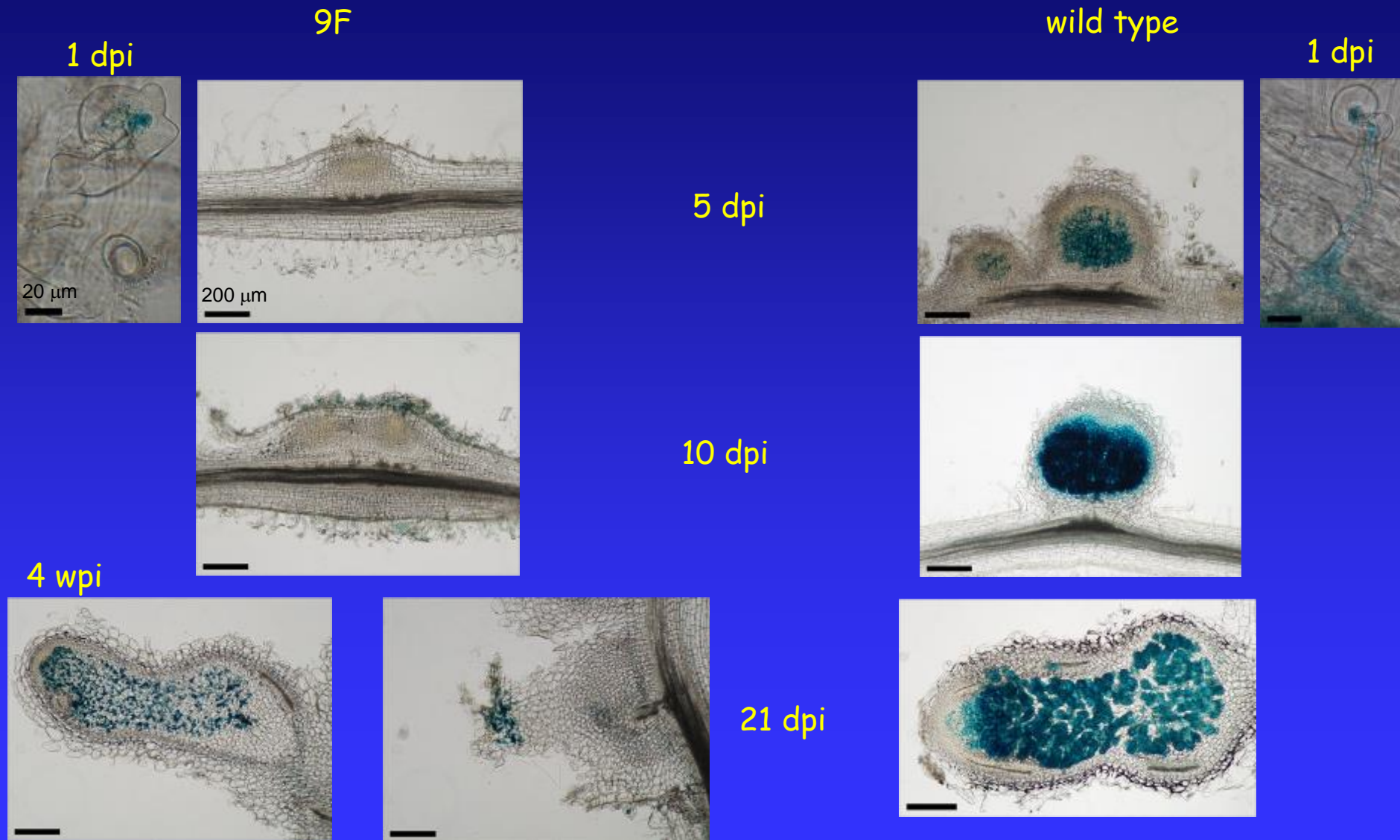
Nodulation phenotype of the ineffective *M. truncatula* mutants I.



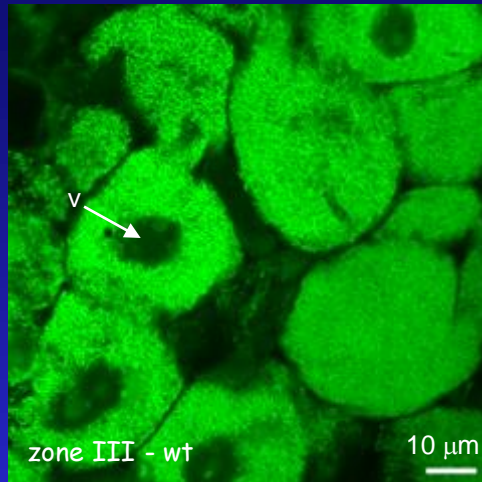
S. meliloti 1021
LacZ , 21 dpi

mutants
5L and 11S
are allelic

Kinetics of nodule development in 9F and wild type plants

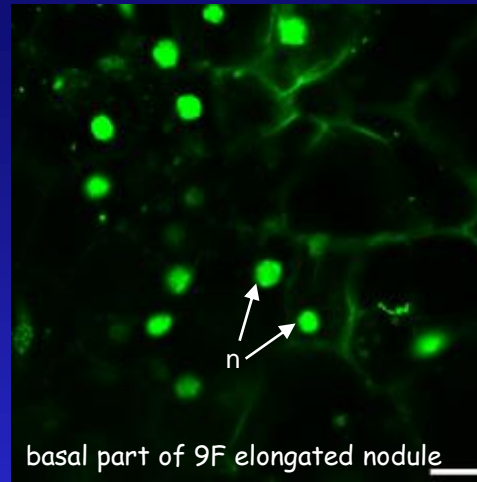


Bacterial invasion of nodules is impaired in 9F

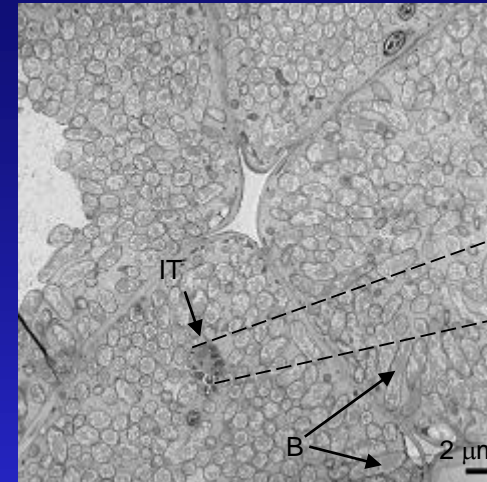


zone III - wt

10 μm



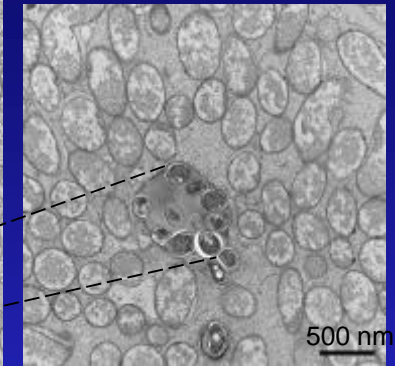
basal part of 9F elongated nodule



IT

B

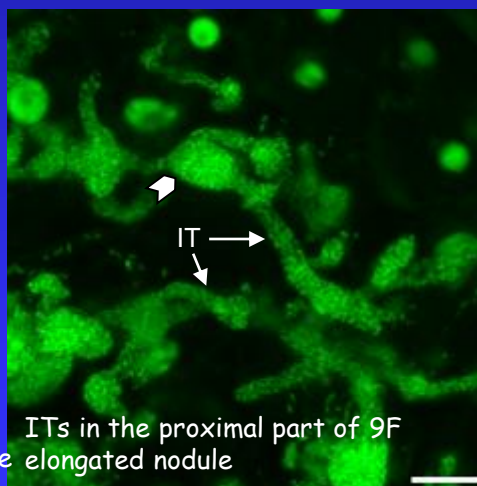
2 μm



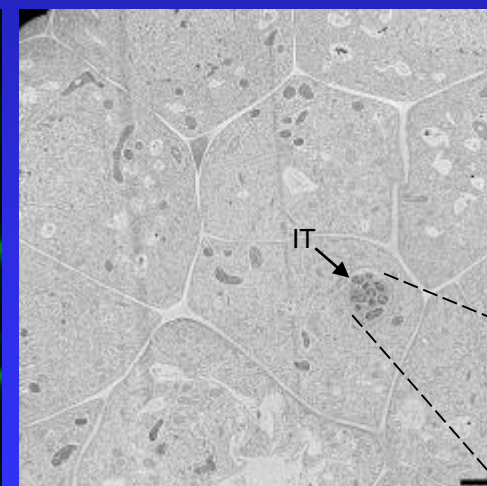
500 nm



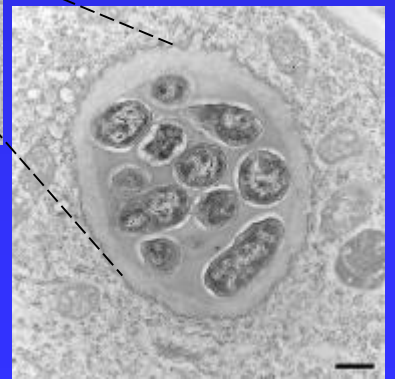
boundary of the extended invasion zone and the basal region of 9F elongated nodule



ITs in the proximal part of 9F elongated nodule

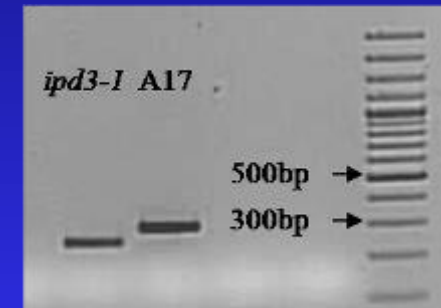
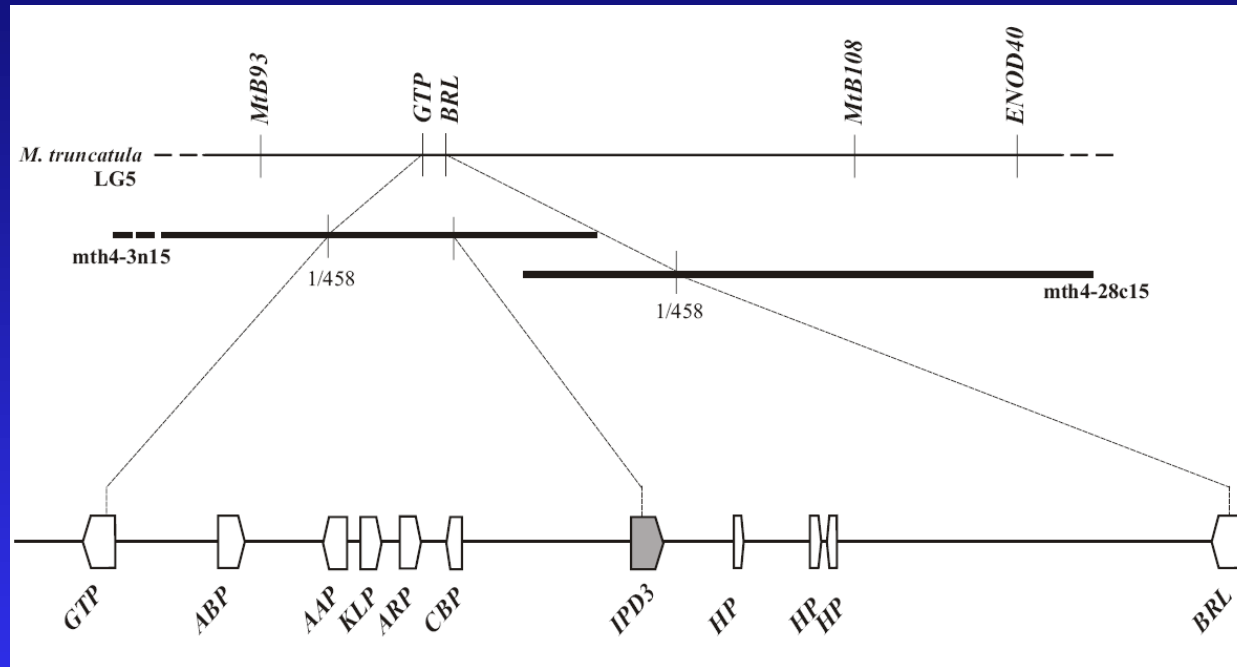


IT



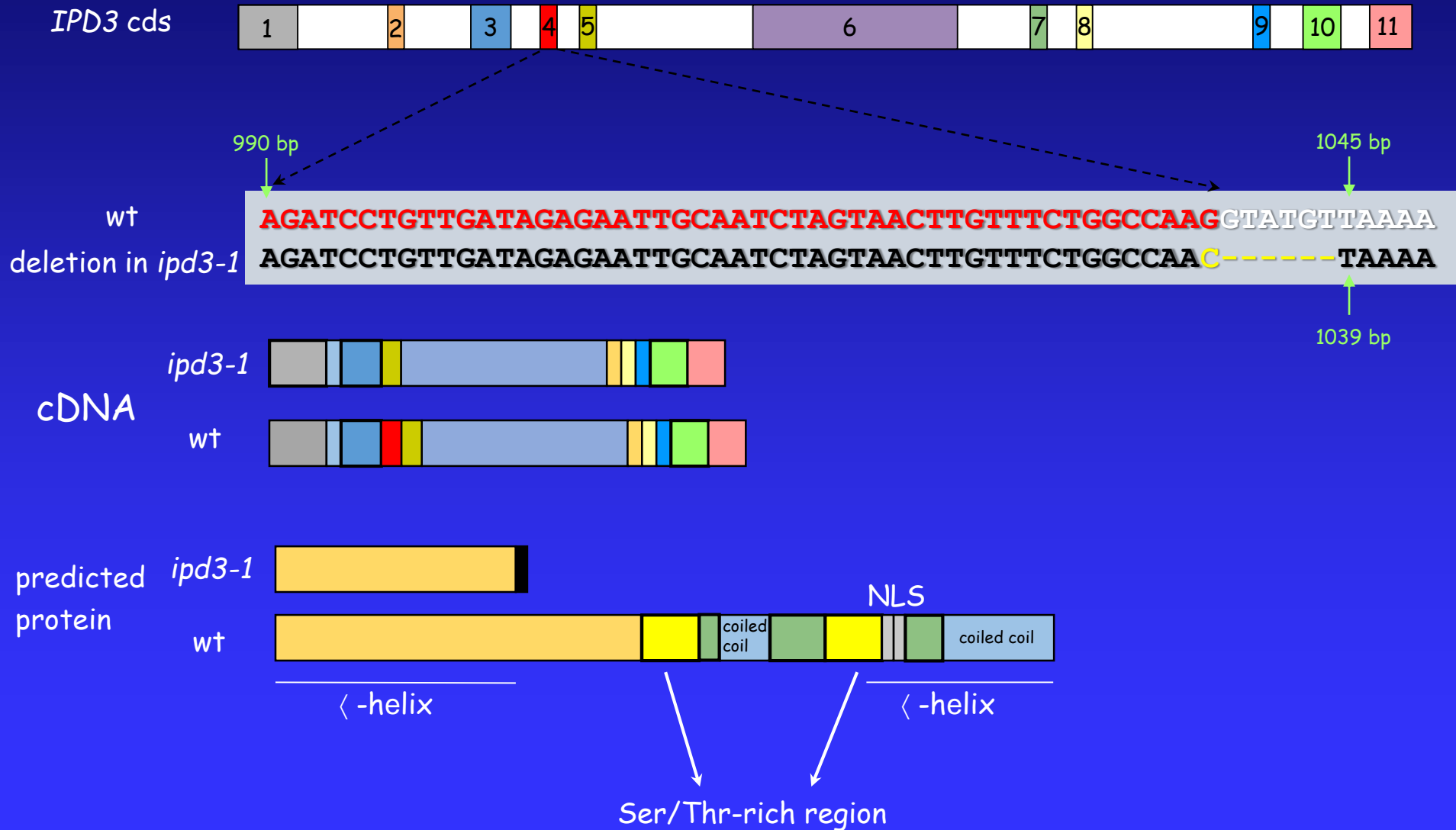
—

IPD3 gene is impaired in 9F

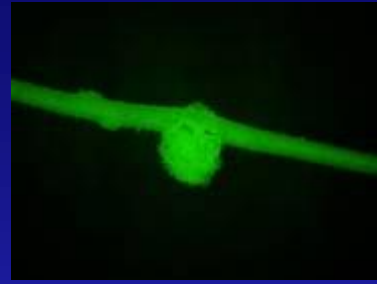


IPD3 - Interacting Protein of DMI3 (Messinese et al. 2007)

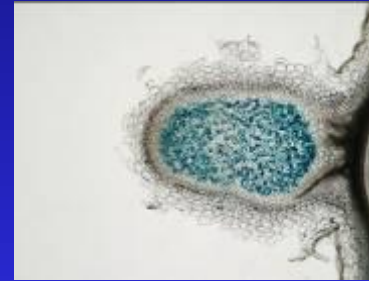
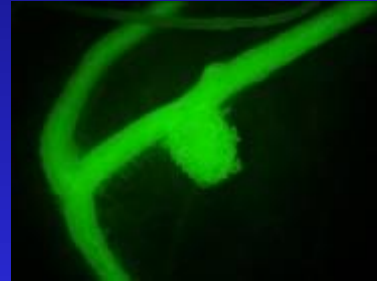
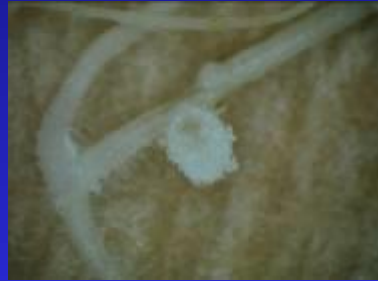
Mutation in *ipd3-1*



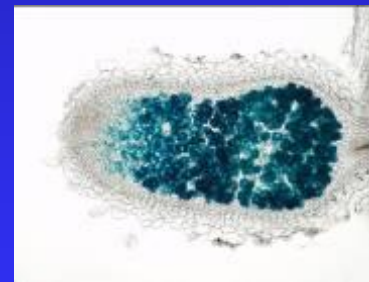
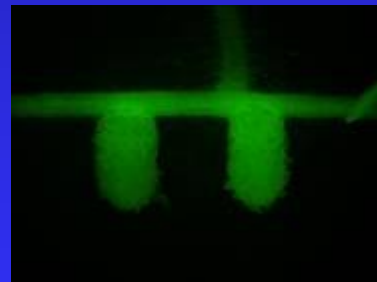
IPD3 and CYCLOPS restore the nodulation phenotype of *ipd3-1*



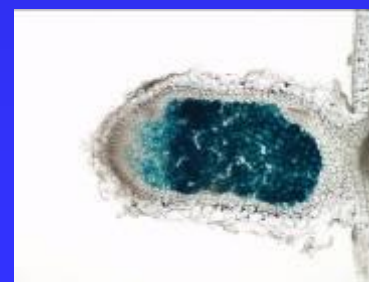
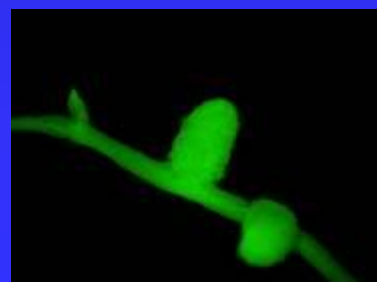
empty vector



35S::IPD3



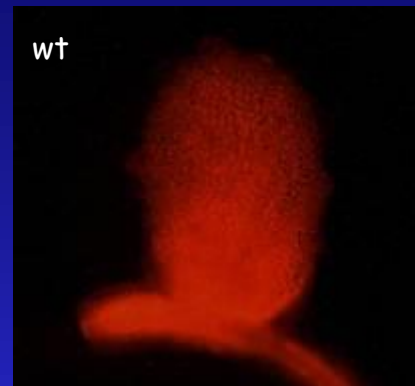
prMtIPD3::IPD3



prLjCYCLOPS::CYCLOPS

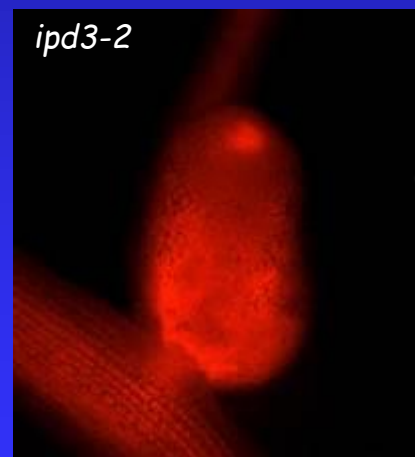
A. rhizogenes transformation

IPD3 restores the nodulation phenotype of *ipd3-2*



empty vector

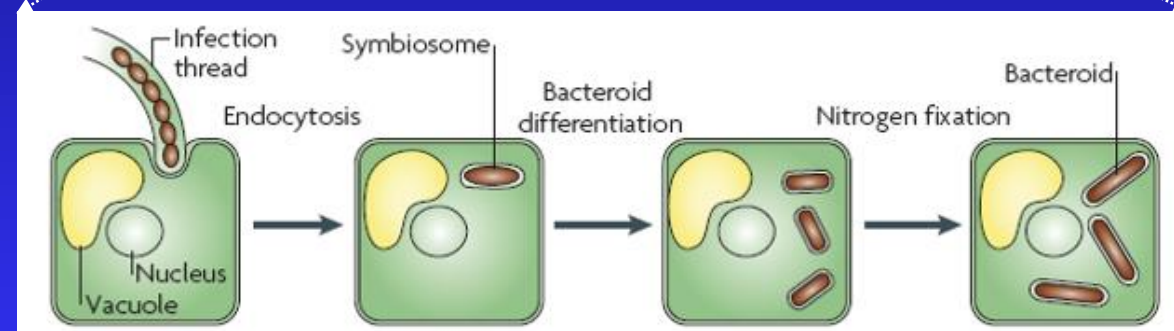
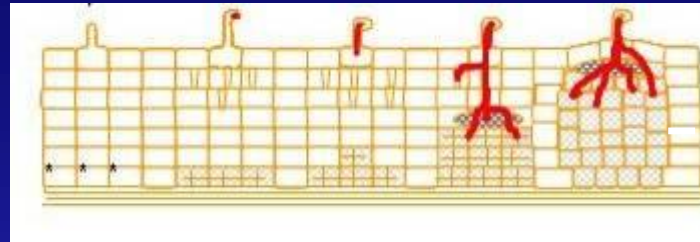
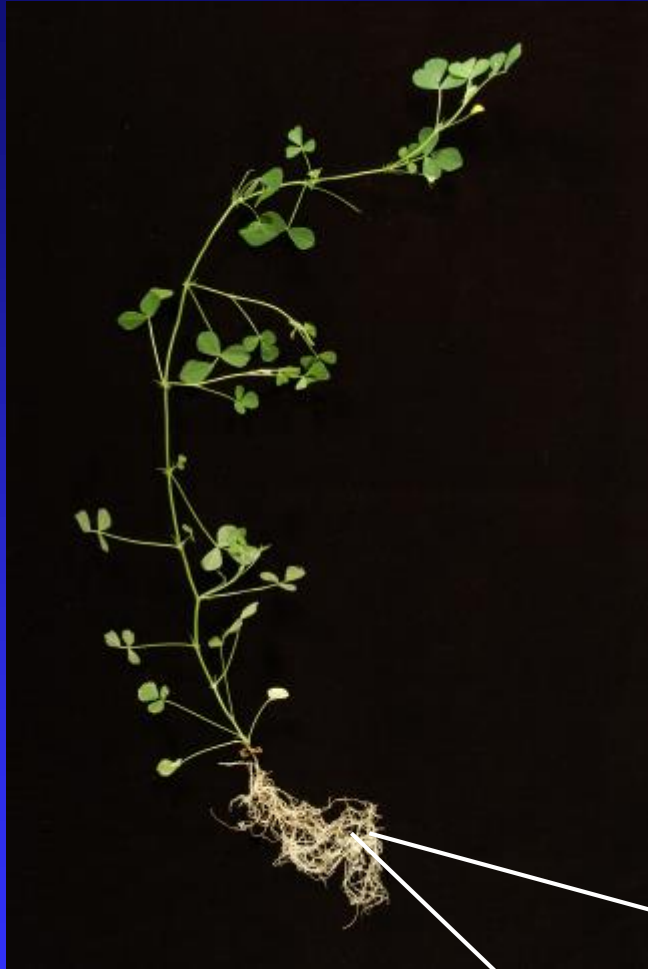
S. meliloti CSB357 *nifH::uidA*



prMtIPD3::IPD3

A. rhizogenes transformation

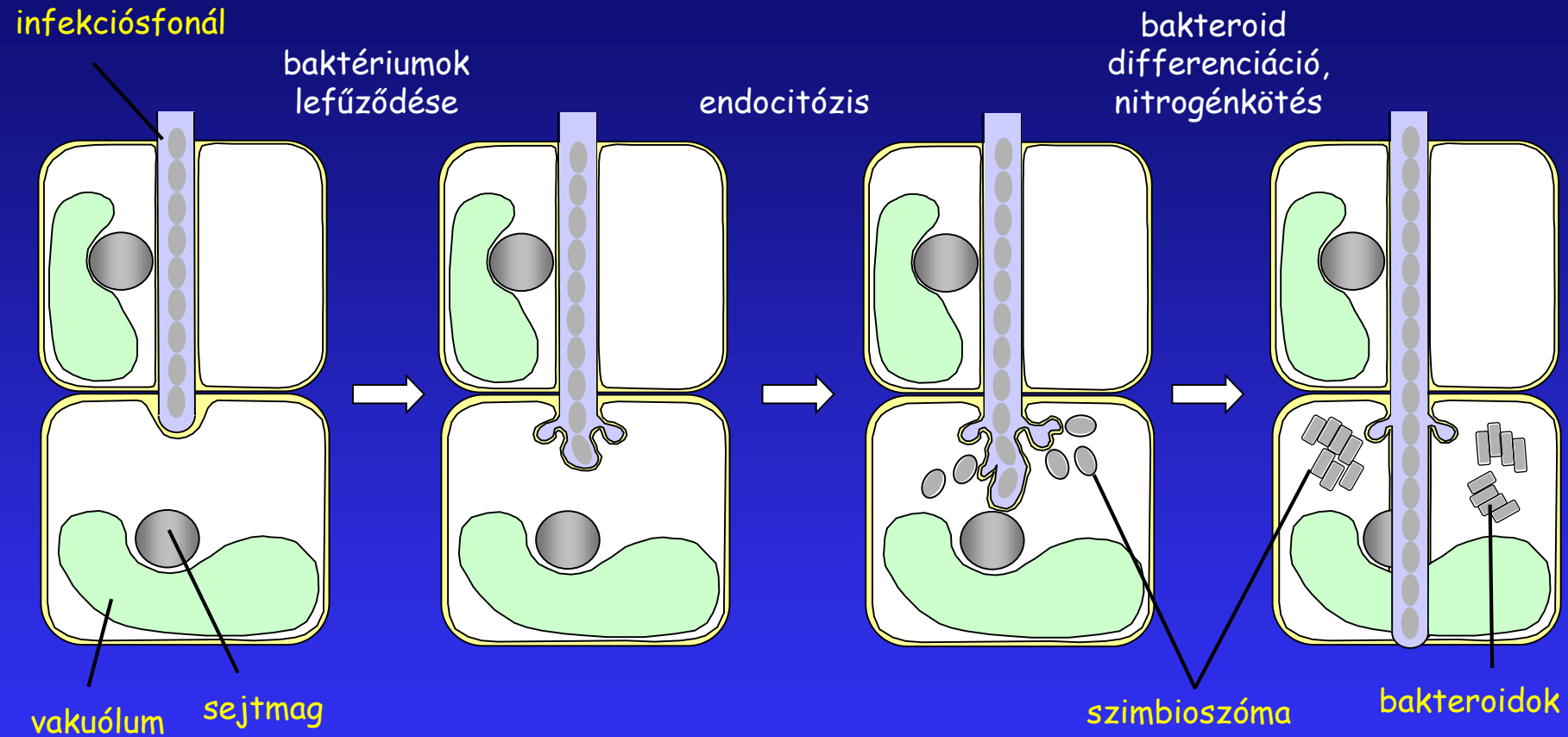
Medicago - rhizobium symbiotic interaction



Jones et al. 2007

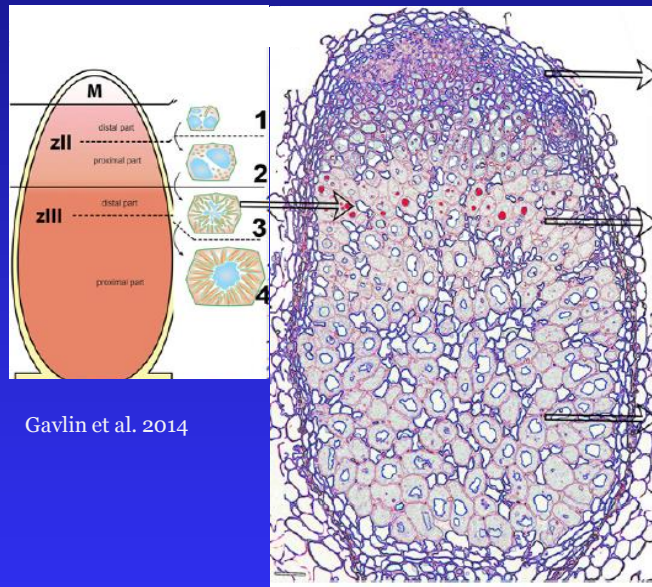


A rhizobium invázió és differenciálódás főbb lépései

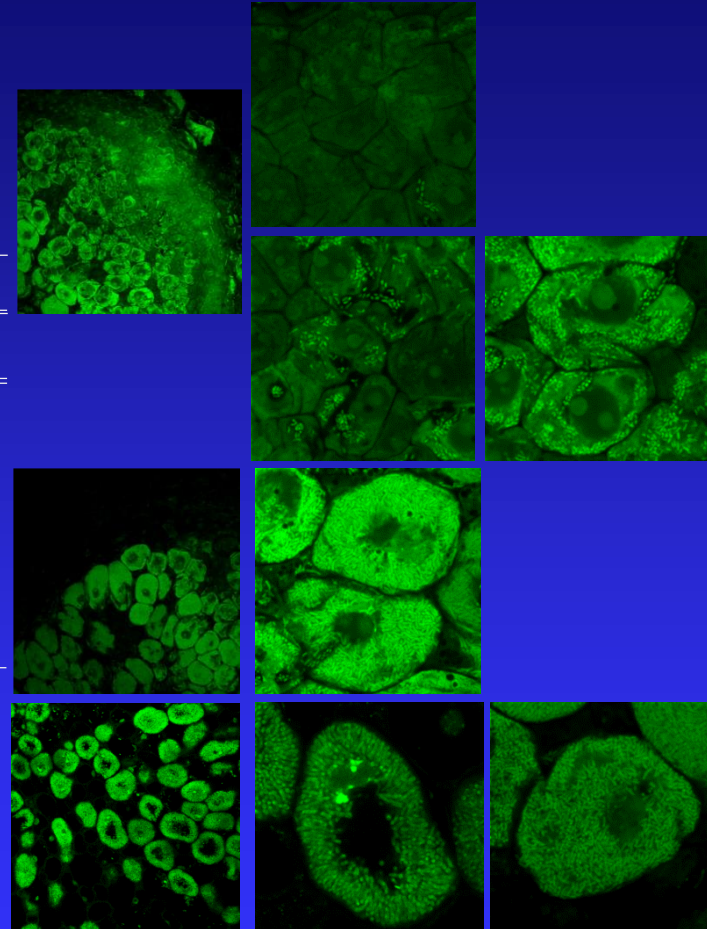
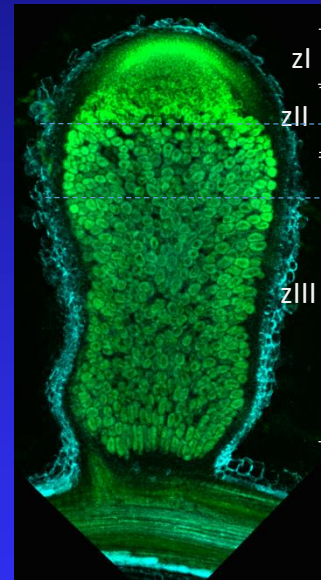


Cél: a szimbiotikus gümő inváziójában és működésében résztvevő növényi gének azonosítása és megismerése

Zonation of the indeterminate nodule of *M. truncatula*



Gavlin et al. 2014

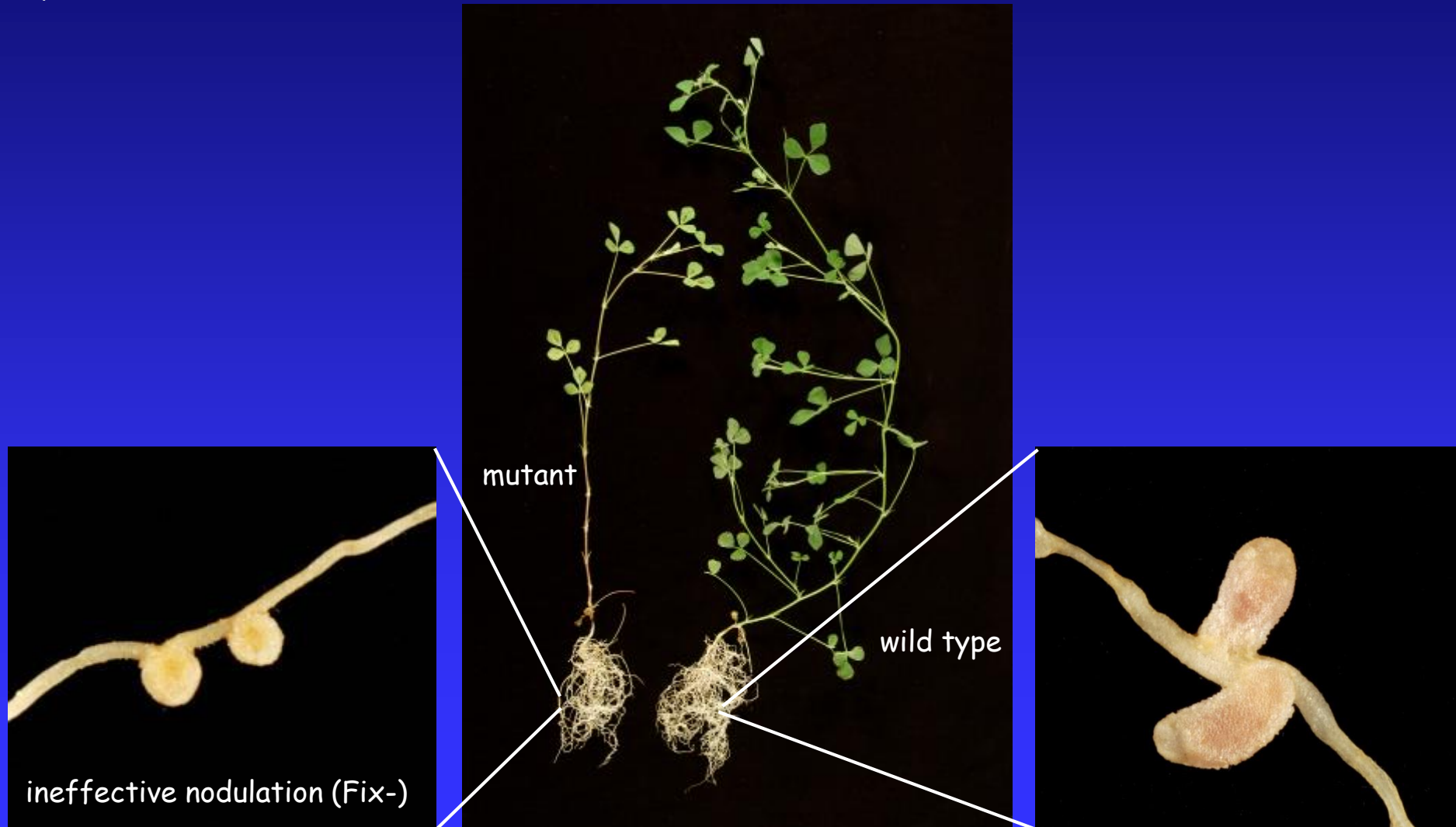


Syto13 staining

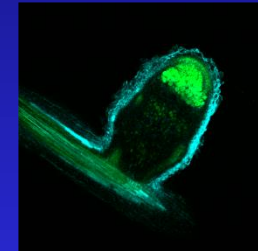
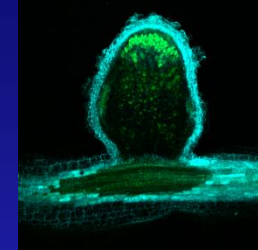
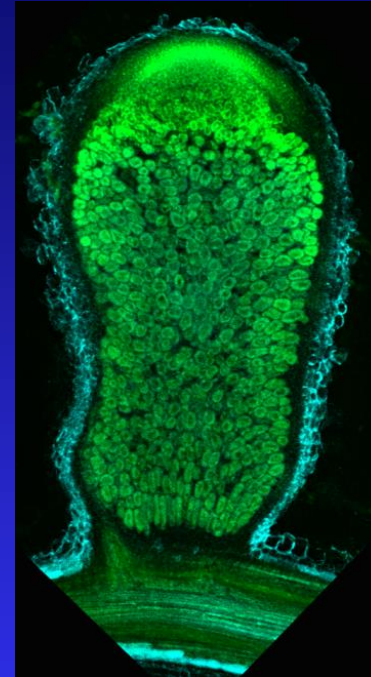
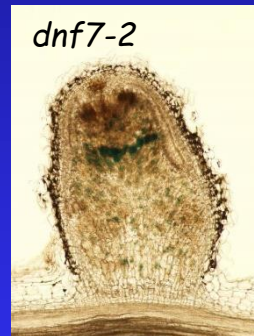
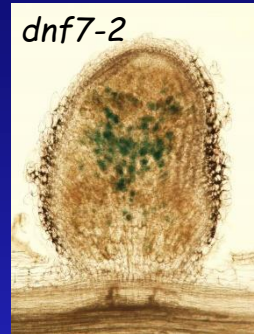
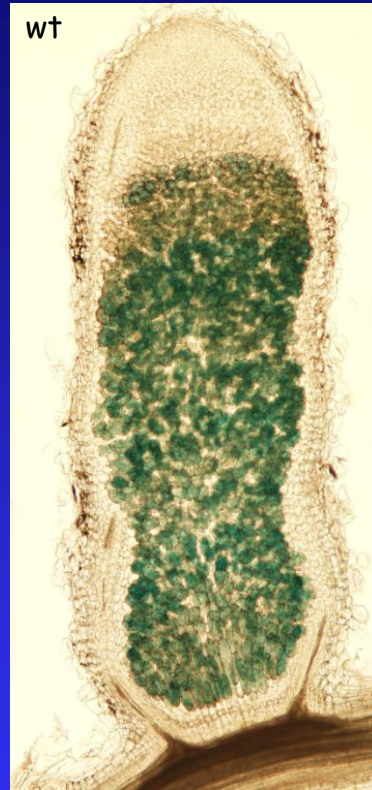
Dissecting of the later stages of symbiotic nitrogen fixation



Objective: identification plant genes required for bacterial invasion and function of the symbiotic nodule



Nodulation phenotype of *dnf7* mutants



X-gal staining

Syto13 staining

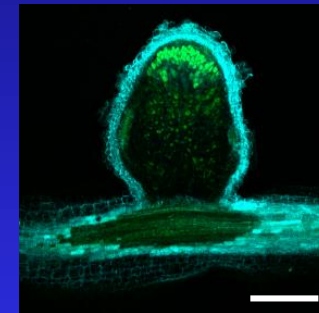
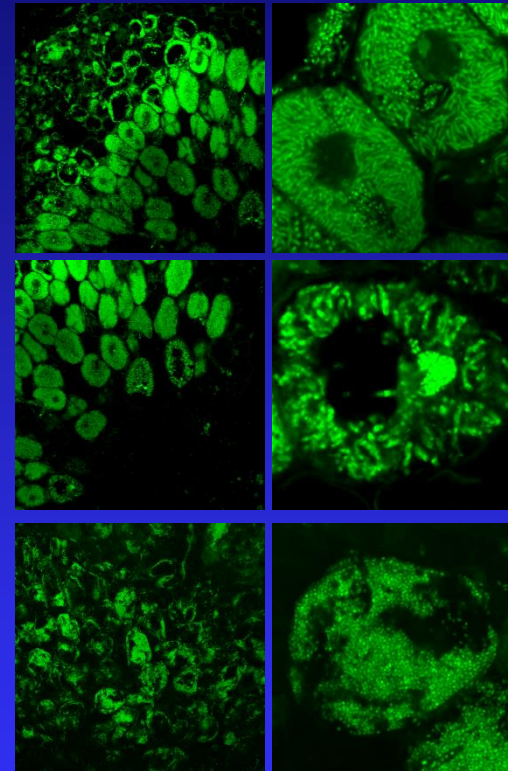
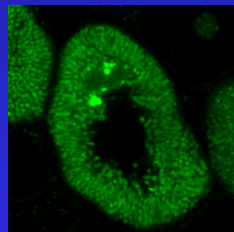
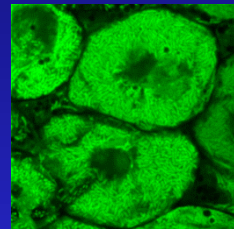
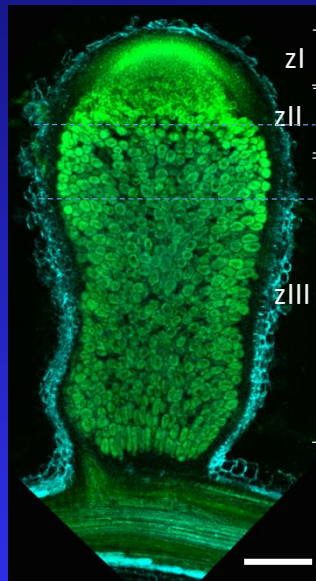
S. medicae WSM419 *LacZ*, 21 dpi

Persistence of rhizobia is defective in *dnf7* nodules



wild-type

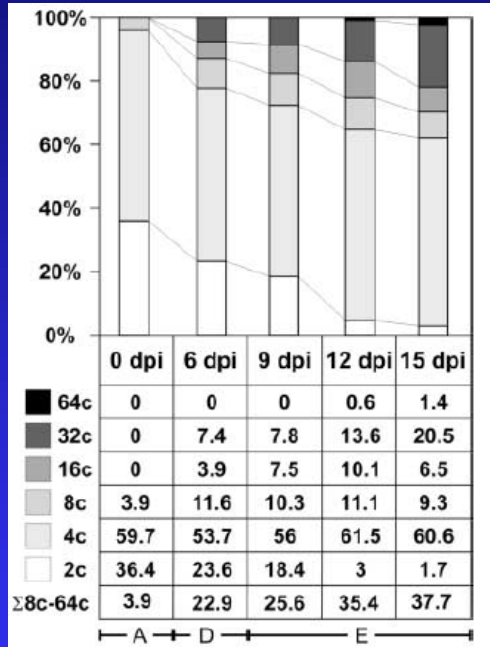
dnf7-2



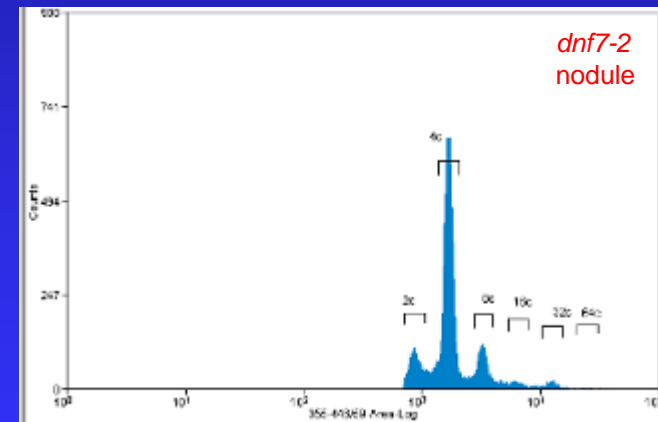
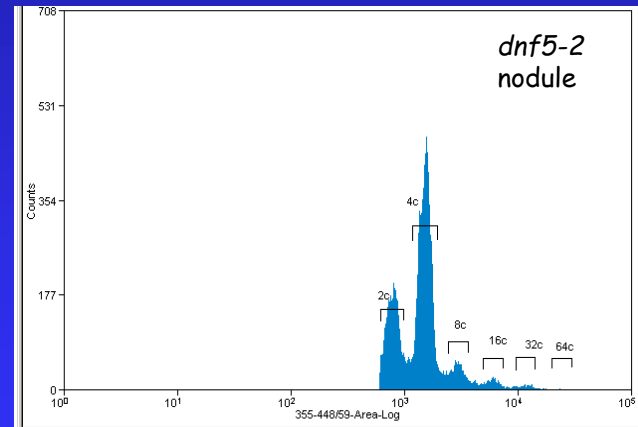
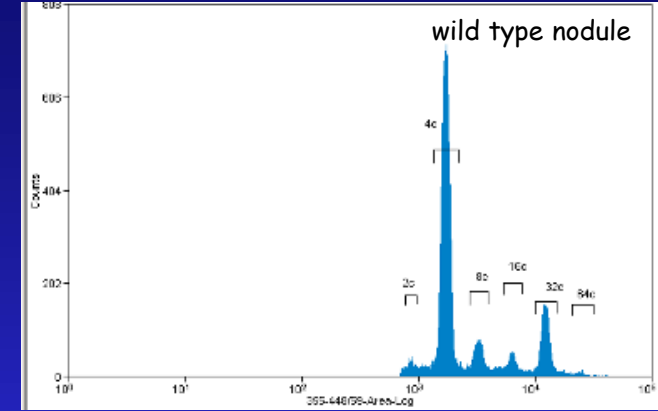
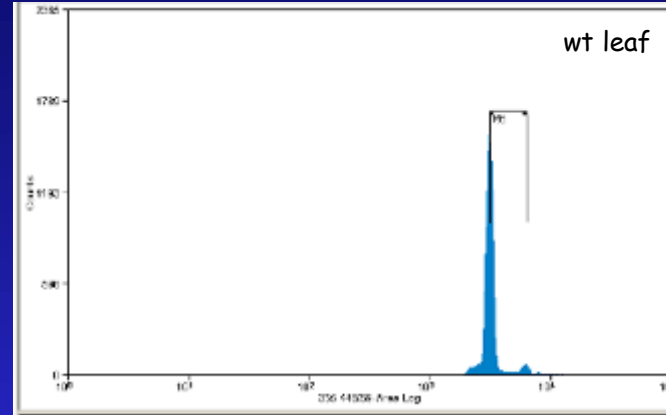
Syto13 staining

S. medicae WSM419 *LacZ*, 21 dpi

Endoreduplication of nodule cells is reduced in *dnf7-2* nodules

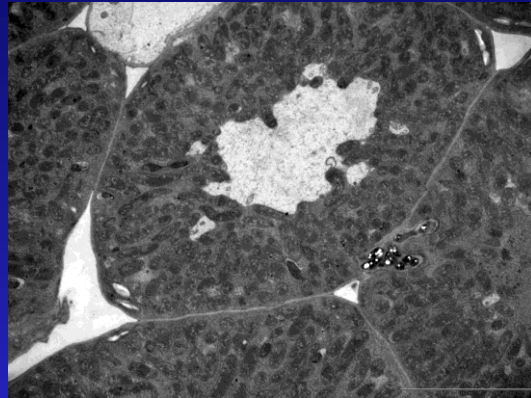


nuclear DNA content during nodule development (Vinardell et al. 2003)

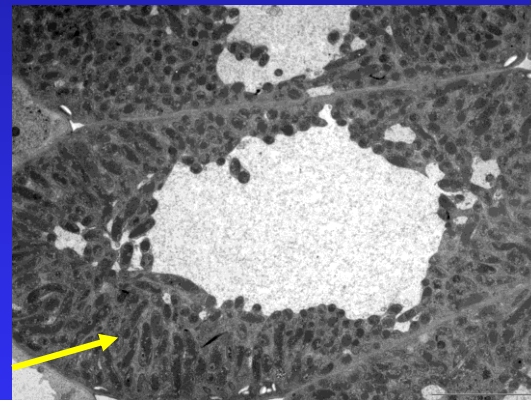
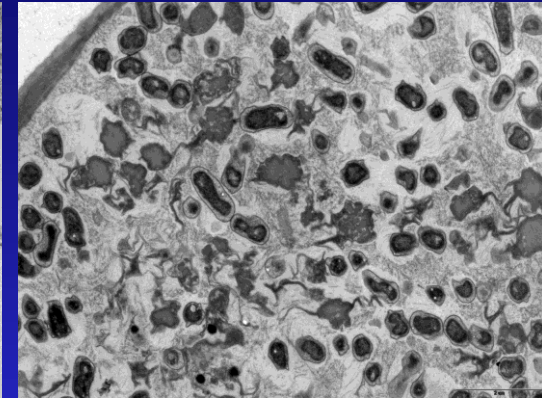


analysis of nodule cells by flow cytometry (S. Brown, ISV, Gif-sur-Yvette)

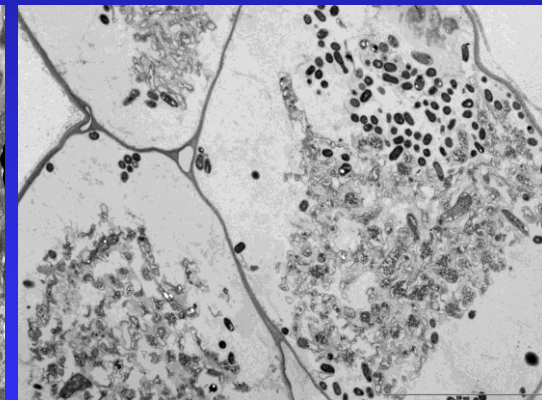
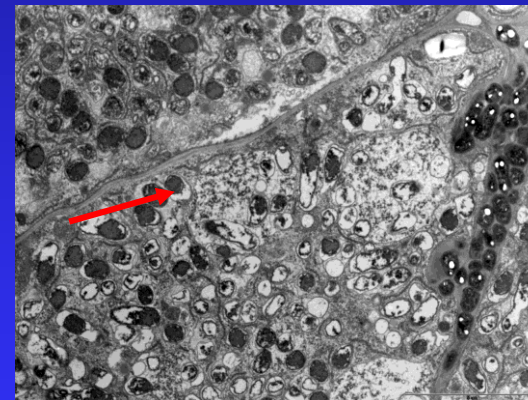
EM of *dnf7-2* mutants indicates failure of bacteroid elongation



proximal part
of zII



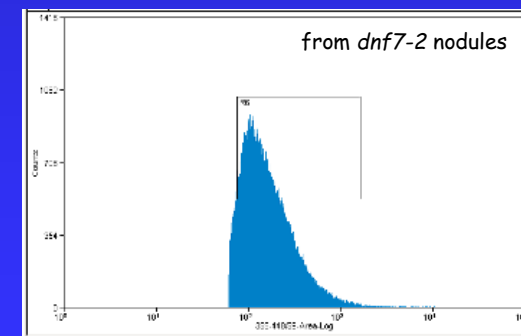
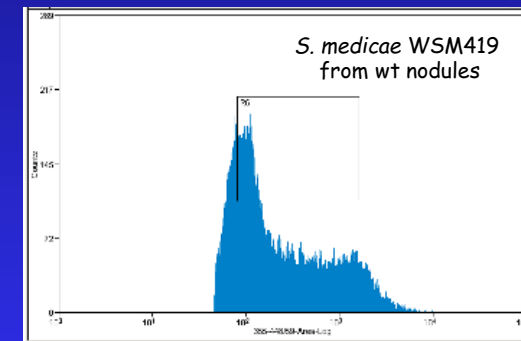
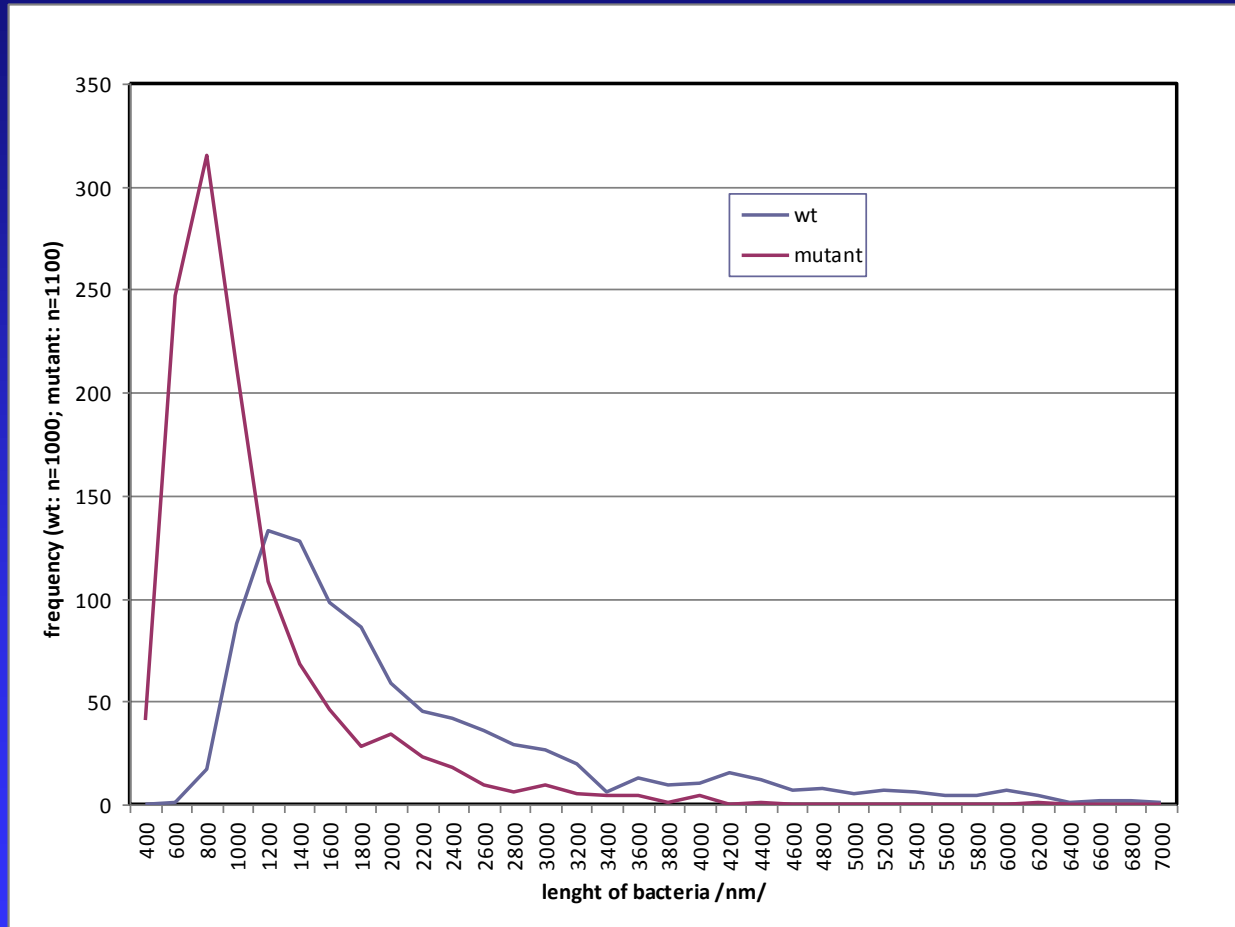
zIII



wt

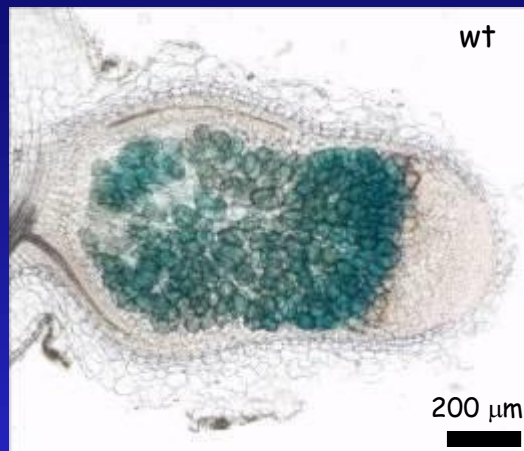
dnf7-2

Bacterial elongation is reduced in *dnf7-2* nodules

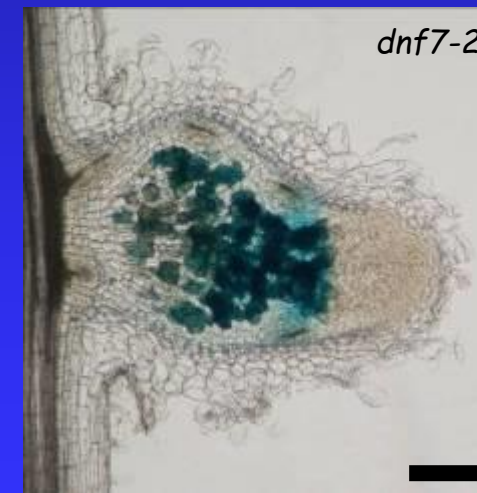


Measurement of length of bacteria in zone II

NCR169 restores the nodulation phenotype of *dnf7-2*



empty vector

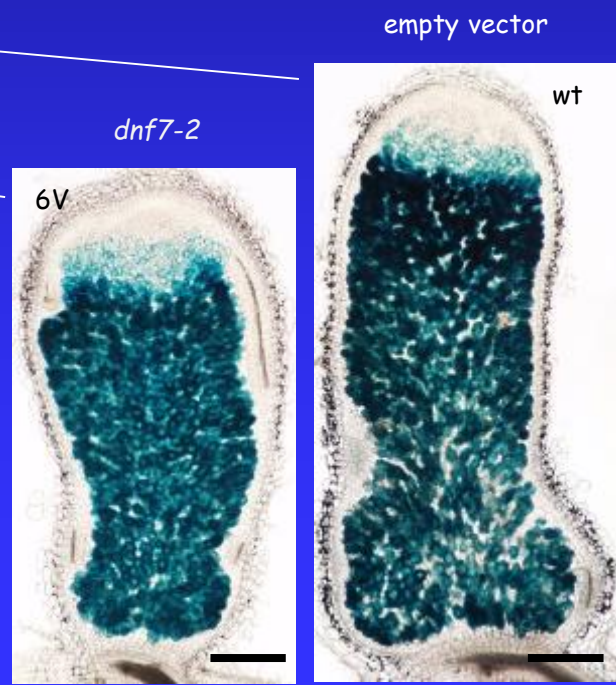
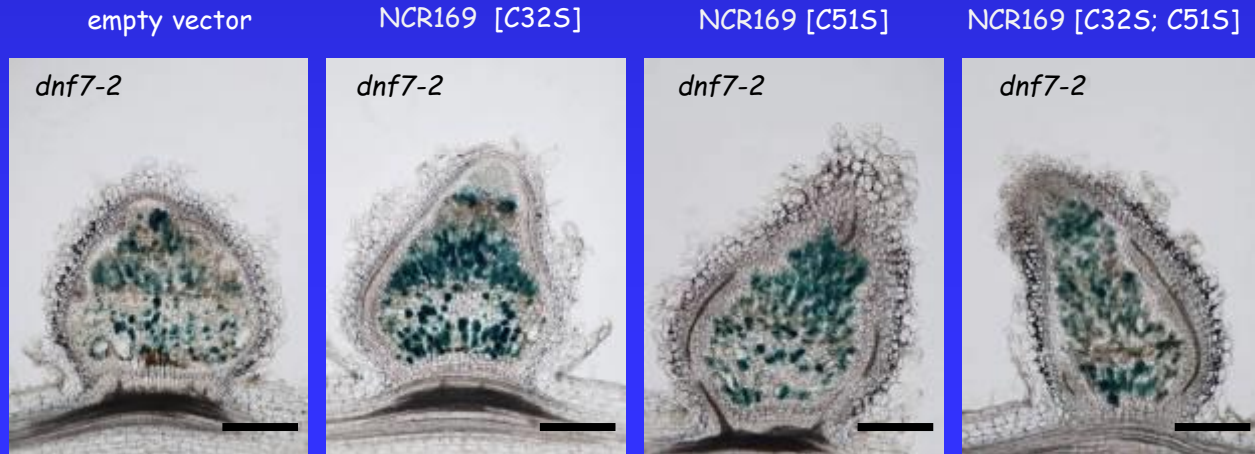
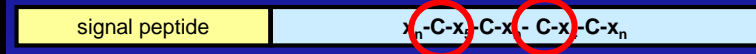


prNCR169::NCR169

A. rhizogenes transformation

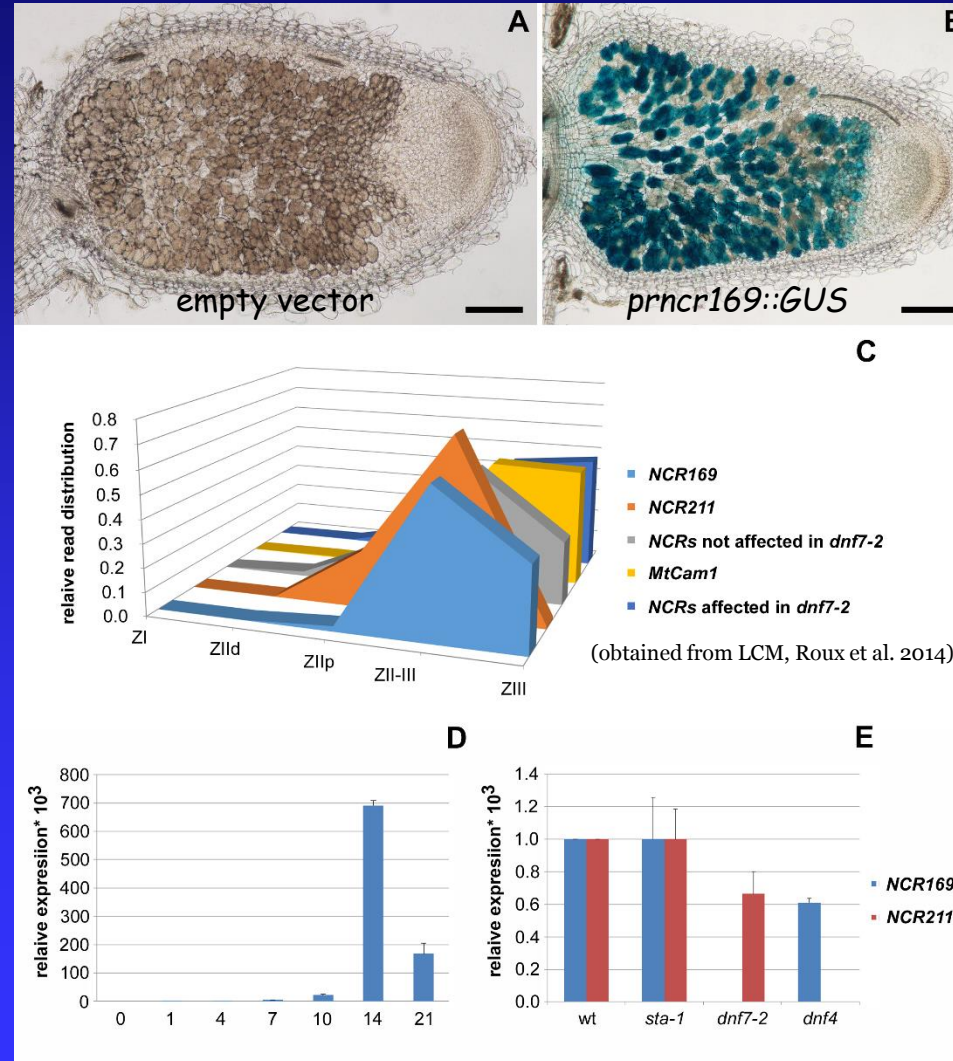
4 wpi with *S. meliloti nifH::GUS*

Mutations in Cys residues abolish the function of NCR169

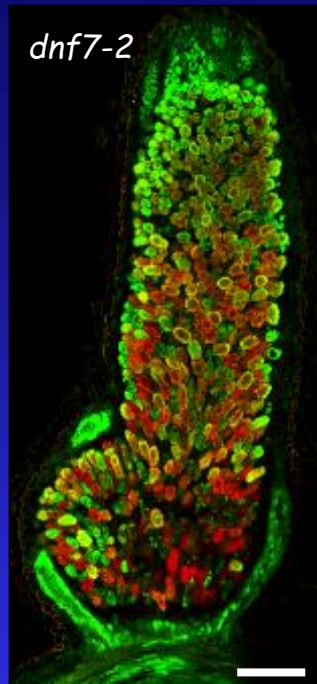


S. medicae WSM419 LacZ, 8wpi

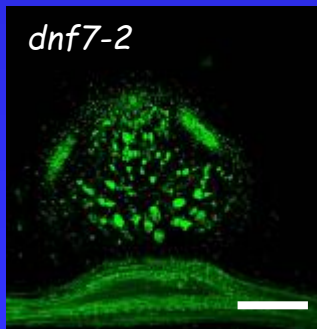
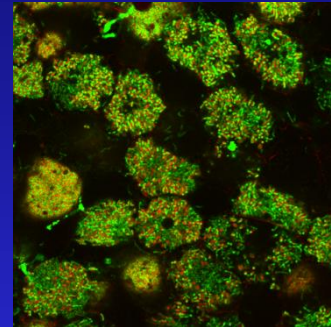
NCR169 is mainly expressed in the proximal part of zone II and zone III



NCR169-mCherry fusion protein is co-localized with bacteroids

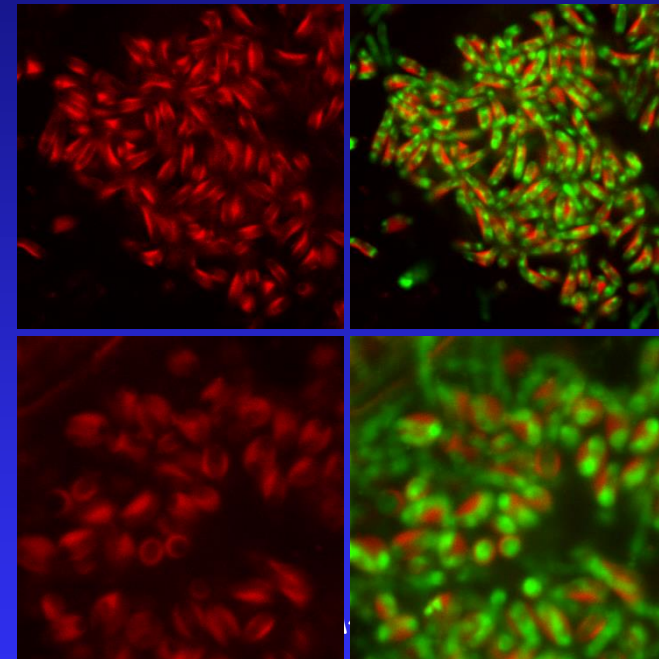


prNCR169::NCR169-mCherry



empty vector

dnf7-2 mutant *prNCR169::NCR169-mCherry*



mCherry

SYTO13 staining
+ mCherry

LC-MS/MS data: NCR169 peptide was found in high abundance in bacteroids (Düregó et al. 2015)

Köszönöm a figyelmet!