

# Növényi genomika

---

- Bevezetés - mi is a genomika?
- Növényi genomok szerveződése
- Növényi genomprogramok
- Növényi genomszekvenciák néhány alkalmazása (összehasonlító genomika, génizolálás)
- Genetikailag módosított növények

# Genomika - bevezetés I.

---

- **Genom:** egy organizmus teljes öröklődő információja
- **Genomika** - egy organizmus teljes örökítő anyagának (nukleáris, mitokondriális, kloroplasztisz DNS-ének), genomszerkezetének és változatosságának vizsgálata és elemzése
- **Funkcionális genomika** - a gének összességének, vagy egy-egy csoportjának a vizsgálata nagy áteresztőképességű kísérletekkel, amelyek vagy a genomszekvencia alapján lettek megtervezve (microarray, SNP), vagy amelyekhez szekvenálást használnak (ChIP-seq, RNA-seq stb.)
  - genom léptékű biológia (nagyobb léptékű DNS, expressziós vagy fehérje vizsgálat) <-> klasszikus molekuláris biológia
- Vizsgálatok **DNS** (genomika), **RNS** (funkcionális genomika), **fehérje** (proteomika) és **anyagcsere termékek** (metabolomika) szintjén - nem teljesen pontos (lsd. pl. SNP analízis - funkcionális genomika)

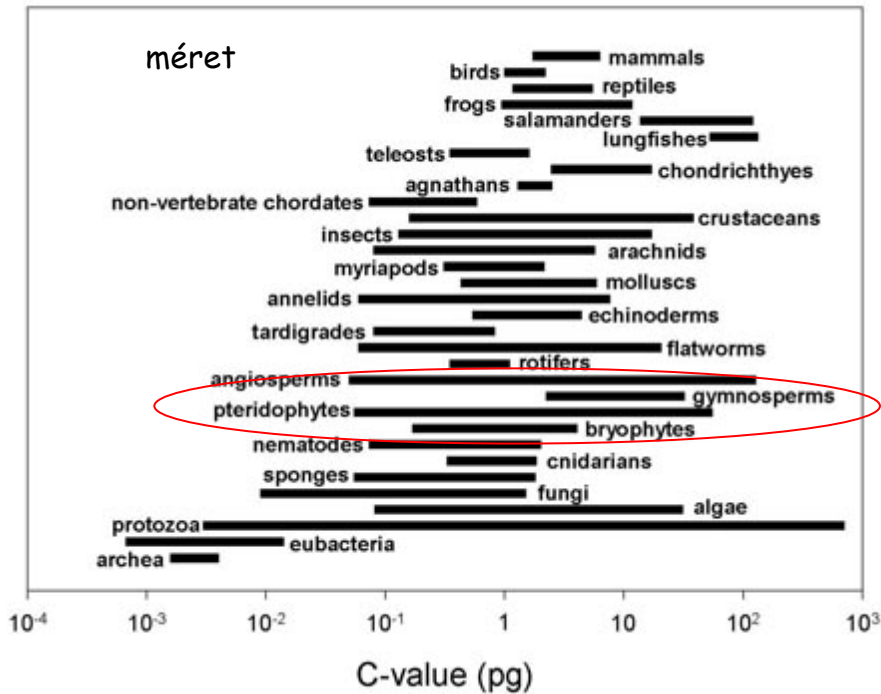
# Genomika - bevezetés II.

---

- **Újszerű megközelítés:** a teljes genomok ismerete és vizsgálata nagymennyiségű biológiai információt eredményez
- Ennek az információnak a kiaknázása más szemléletet és új módszereket igényel
- Paradigmaváltás a kutatásban:
  - Klasszikus tudományos kutatási módszer hipotézis alapú
  - Genomika - adatalapú kutatás
    - kísérletek megtervezése a fenotípus alapján
    - adatgenerálás
    - adatfeldolgozás, szisztematikus analízis
    - új hipotézisek felállítása
    - hipotézis igazolása kísérlettel
- **Alapok:**
  - Metodikai háttér kibővülése: új generációs szekvenálási módszerek, nagy volumenű vizsgálati módszerek, eljárások (pl. microarray/gén-chip)
  - Genomszekvenálási projektek (>100 élőlény teljes genomja ismert, és a lista folyamatosan bővül)
  - Bioinformatika
    - nagymennyiségű adat kezelése
    - új eredmények kinyerése és megjelenítése
    - egyelőre lemaradásban a metodikai fejlesztések mögött (szűk keresztmetszet)

# Növényi genomok szerveződése I.

- eukarióta genomok szerveződése komplexebb a prokarióta genomokénál



szerveződés:

- kromoszómákba „darabolva” (4 - 224)  
relatív vagy ténylegesen alacsony géndenzitás  
intronok (törzsfajlódással párhuzamosan számuk és méretük/sejt növekszik)
- duplikációk (géncsaládok, pszeudogének, kromoszóma szegmentek)
- poliploidia
- (retro)transzpozonok (gypsy/copia-like)
- repetitív szekvenciák, mini/mikro szatellit szekv.
- mtDNS (200 - 2500 kb növényekben)

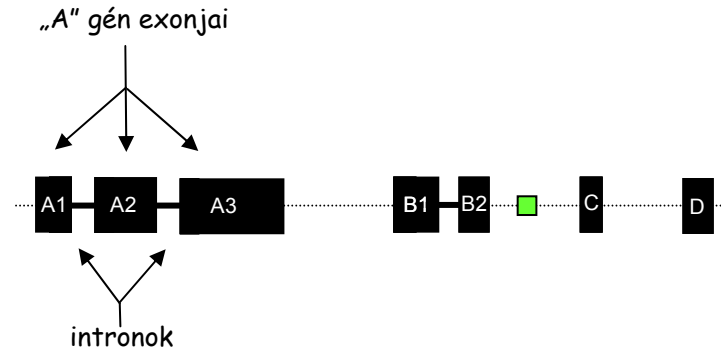
gének száma növekszik az organizmus fejlettségével (haploid)

	<u>génszám</u>	<u>genom (Mb)</u>
<i>E. coli</i>	4289	4,2
élesztő	6300	12,1
fonalféreg	19000	100
muslica	14000	180
<i>Arabidopsis</i>	26000	125
kukorica	~58000	2500
emlős	~35000	3000

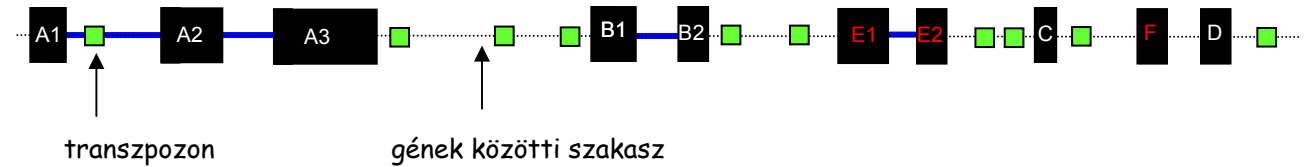
# Növényi genomok szerveződése II.

- példa genomméret növekedésre

Arabidopsis (125 Mb)



kukorica (2500 Mb)

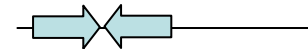


- repetitív szekvenciák

tandem ismétlődés



fordított ismétlődés



# Növényi genomok szerveződése III.

---

- növényi genomok összetettebbek (3 genom)

- kloroplaszt genom (10 - >100 kópia/sejt, 60-100 génszám/mol., 120-160 kb)

- genomméretek (Mb)

	<u>sejtmag (Mb)</u>	<u>kloroplaszt</u>	<u>mitokondrium</u>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	0,156	0,370
<i>Kukorica (Zea mays)</i>	~ 2500	0,136	0,570
<i>Lóbab (Vicia faba)</i>	~ 14000	0,120	0,290
Humán	~ 3000	-	0,016

- poliploidia

alloploidia: genetikailag elhatárolható kromoszómák, pl. búza allohexaploidia (AABBDD)

autoploidia: egy alap-kromoszómakészlet sokszorozódása, pl. tetraploid lucerna és burgonya

# Genom programok

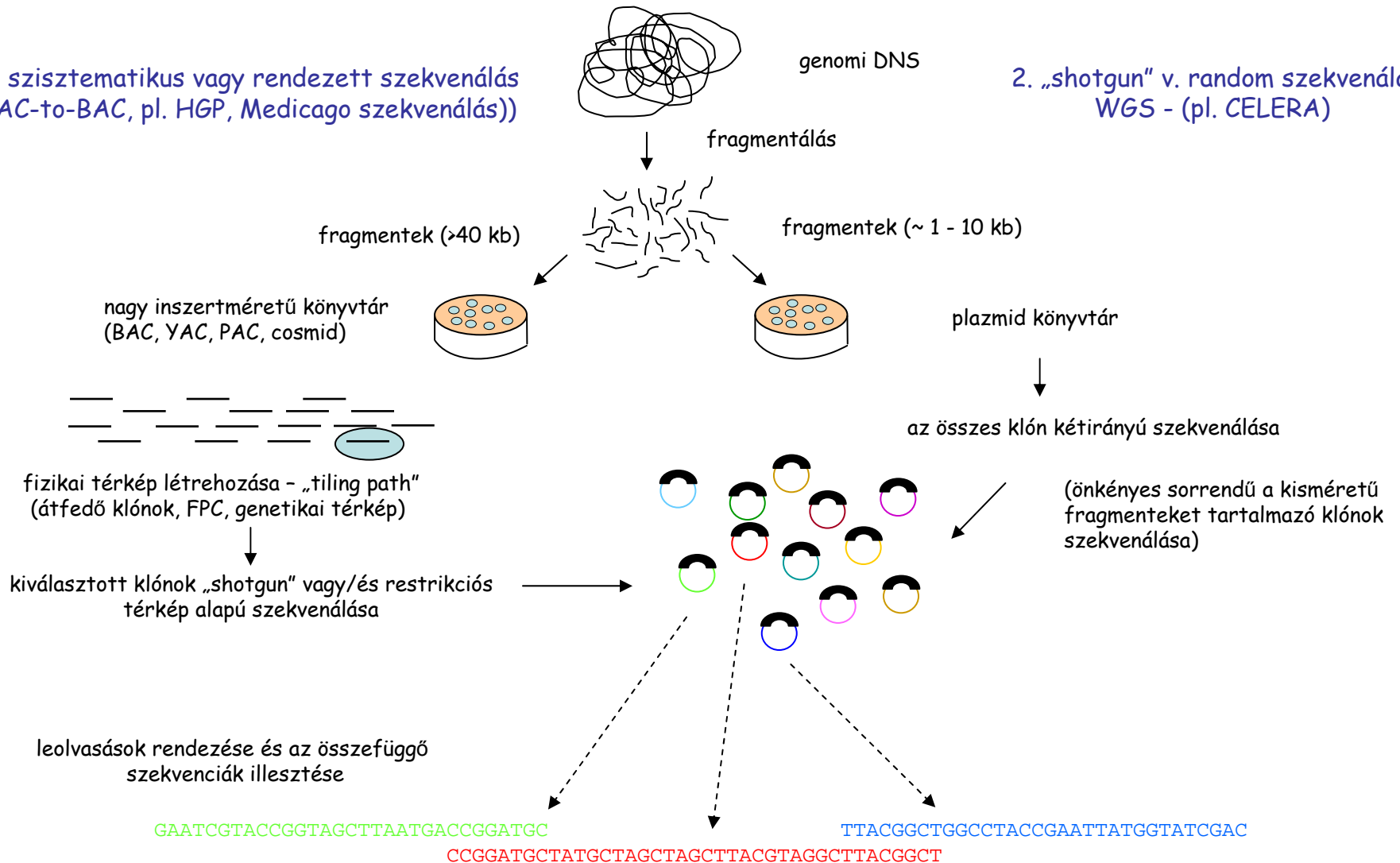
---

- **Növényi genomprogramok** („mint az állatok esetében csak kicsit máshogyan és lassabban“)
  - növényi alapanyag: referencia faj/vonal, beltenyésztett vonalak, mutánsgyűjtemény, természetes és vad változatok, stb.
  - DNS-szintű vizsgálatok: genetikai térképezés  
fizikai térképezés  
genomszekvencia meghatározása  
genomszekvencia analízise (kódoló és nem kódoló gének, génannotáció, ismétlődő szekvenciák, SNP, összehasonlító térképezés, duplikációk azonosítása, stb. )
  - RNS-szintű vizsgálatok: EST szekvenálás, teljes cDNS szekv., alternatív splicing, microarray/gén-chip, génatlasz
  - fehérjeszintű vizsgálatok: lokalizáció, ChIP, fehérje-fehérje interakciók vizsg., teljes fehérje összetétel, fehérje komplexek vizsg., poszttranszlációs módosulások
  - funkcionális vizsgálatok: loss-of-function technikák (mutáció, TILLING, RNAi)  
episztázis vizsgálatok (gének ill. géntermékek hierarchiája)  
gain-of-function technikák (ha van rá lehetőség)
  - metabolika: nagyléptékű anyagcsere vizsgálatok, kémiai „fingerprint“
  - funkcionális génannotáció: ismeretlen gének funkciójának azonosítása

# Genomszekvenálási stratégiák I.

1. szisztematikus vagy rendezett szekvenálás  
(BAC-to-BAC, pl. HGP, Medicago szekvenálás))

2. „shotgun” v. random szekvenálás  
WGS - (pl. CELERA)





# Genomszekvenálási stratégiák II.

```

<-- GAATCGTACCGGTAGCTTAATGACCGGATGC          <-- TTACGGCTGGCCTACCGAATTATGGTATCGAC
GAATCGTACCGGTAGCTTAATGACCGGATGC -->          TTACGGCTGGCCTACCGAATTATGGTATCGAC -->
          CCGGATGCTATGCTAGCTAGCTTACGTAGGCTTAGGGCT -->
<-- CCGGATGCTATGCTAGCTAGCTTACGTAGGCTTAGGGCT
          <-- TTACGTAGGCTTACGGCTGGCCTACCGAA
          TTACGTAGGCTTACGGCTGGCCTACCGAA -->
          <-- GCTGGCCTACCGAATTATGGTATCGACCTGACC
          GCTGGCCTACCGAATTATGGTATCGACCTGACC -->

```

GAATCGTACCGGTAGCTTAATGACCGGATGCTATGCTAGCTAGCTTACGTAGGCTTACGGCTGGCCTACCGAATTATGGTATCGACCTGACC

kész szekvencia - minden szál kb. 4-szer szekvenálva, 8X lefedettség

## Szisztematikus szekvenálás

## Random szekvenálás

### Előnyök

- minden egyes lépésnél tudjuk hol járunk a genomban
- kevesebb hiba az összeszerelés során, összeszerelés viszonylag egyértelmű (ismert térkép és kontig pozíció)
- lehetőség a génekben gazdag régiók szekvenálására

- a szekvencia összeszerelése során csak a későbbi fázisban derül ki, hogy a genom mely részét szekvenáljuk
- nagyobb esély a hibás összeszerelésre (pl. duplikációk, repetitív szekvenciák - gabonafélék)
- automatizálható
- kisebb genomok esetén hatékonyabb, nagyobbak esetén problémásabb

### Hátrányok

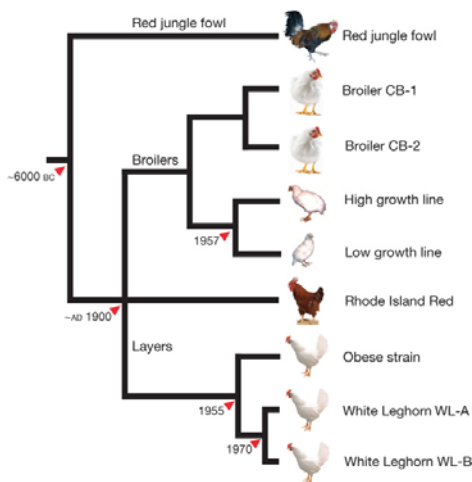
- költségesebb és munkaigényesebb
- lassabb

- kevésbé költséges és munkaigényes
- gyorsabb
- hatalmas klónkönyvtárat igényel
- nagy számítógép-kapacitást igényel

# Genomszekvenálási stratégiák III.

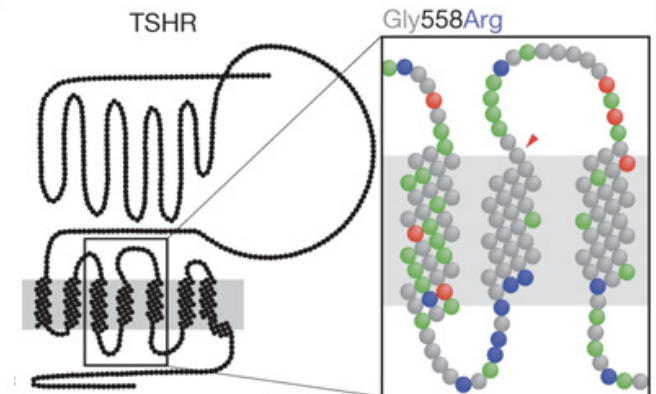
## Alternatív megközelítések:

- nem teljes genomszekvenálás
  - klónozás DNS frakcionálást követően (a gyakori fragmentek mennyiségének csökkentése RE követően)
  - egyes kromozómák izolálása
  - gén gazdag régiók feldúsítását követően (kevésbé metilált alacsony kópiás régiók, CoT analízis)
- Re-sequencing <-> *de novo* sequencing
  - genetikai eltérések keresése és variációk azonosítása (SNPs, INDELS) egész genomban vagy genom részletekben
  - referencia szekvencia szükséges
  - új generációs szekvenálási módszerek
  - humán genom SNP map (Nature 2000), C. Venter és J. Watson (PlosBiol 2007 and Nature 2008)
  - 1000 humán genom diverzitásának meghatározása (Science 2008)
  - Arabidopsis Col-0, Bur-0 és Tsu-1 - 2000 hiba a referencia genomban, 800 000 SNP és 80 000 INDEL azonosítása
  - SNP azonosítás rizs és *Medicago truncatula* genotípusokban (30 *M. truncatula* genotípus szekvencia - 2010)
  - 25 vad és 25 termesztett rizs alacsony lefedettségű genomszekvenálása - eltérés génekben és fenotípusban
  - Mezőgazdasági Biotecnológiai Kutatóközpont, Gödöllő - mangalica - házisertés (Duroc)
  - a tyúkháziasítás genetikai hátterének felderítése genomikai módszerekkel (SOLID szekvenálás - 7 millió SNP, 1300 INDEL))



thyroid stimulating hormone receptor - a szaporodás fotoperiódusos szabályozása

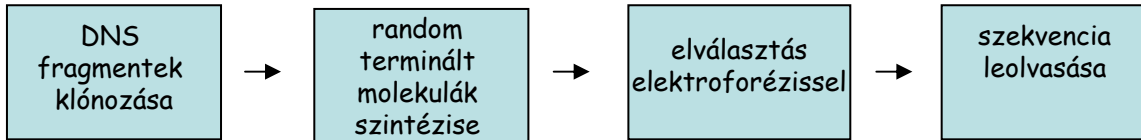
MLGGWLS	SCFL	LALL	PLVGV	SSYS	SKVSI	ICL	
			R				
-V	-VC				I	A	
-V	-VC				I	A	
-A	V		M		I	A	
-V	-VC				I	A	
-A	-VC				I	A	
-V	-VC				I	A	
-L	-VC				I	A	
-L	-AF	I			I	V	
-L	-VF	I			V	Q	
-L	I	F	L		V	Q	
-L	F	L			V	Q	
-LV	I	LSL		M	V	L	V
-A	-FSV		GM	-Y	V	-S	



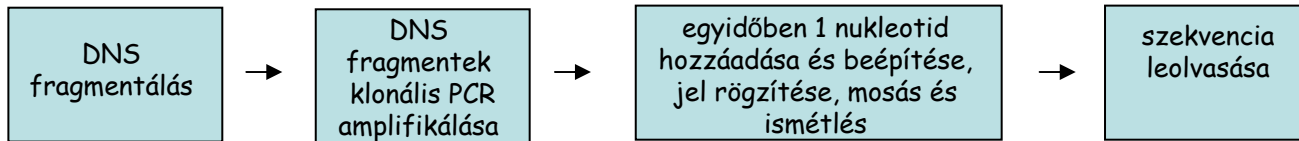
# Genomszekvenálási módszerek

A klasszikus és a leggyakoribb nagy átteresztőképességű szekvenálási módszerek folyamatábrája

## klasszikus Sanger-féle szekvenálás






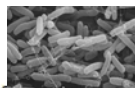
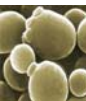








## szekvenálás szintézissel (454, Illumina, Solid)



Nagy átteresztőképességű vagy új generációs szekvenálási módszerek (milliónyi nukleotid leolvasás zajlik egy futtatás során; párhuzamos szekvenálás)

- Roche 454 technológia (Life Sciences)- amplifikáció víz-olaj emulzióban, < 450 bp leolvasási hossz
- Illumina (Solexa) - „bridge-amplification”, „reversible dye-terminator”; 70-80 bp leolvasási hossz
- SOLiD (Applied Biosystems) - ligálással, ~ 50 bp leolvasási hossz
- Ion Torrent Systems Inc. (Life Technologies, 2010 február) - hagyományos szekvenálás új, pH változáson alapuló detektálási módszerrel (a DNS polimerizáció során keletkező proton detektálása félvezető szenzorral), leolvasási hossz kb. 100 bp

# Mérőkövek a genomszekvenálásban

Organizmus/genom	Haploid genomméret (Mb)	Haploid kromoszóma-szám	Kromoszóma-szám	Gének száma	Genomszekvenancia			Megjegyzés
					közlés	labor	módszer	
 φX174 bakteriofág	0,005	cirkuláris		11	1977	Sanger et al.		első megszekvenált organizmus
Humán mtDNS	 0,016	1 cirkuláris		37	1981	Sanger et al.		
 <i>Haemophilus influenzae</i>	1,8	1 cirkuláris		1 743	1995	TIGR	shotgun	első megszekvenált baktérium
 <i>Escheria coli</i> K-12	4,2	1 cirkuláris		4 290	1997	U. Wisconsin, Madison	shotgun	
 sörélesztő ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	12,1	16	2n=32	5 770	1996	konzorcium	térképezés	első teljesen megszekvenált eukarióta genom
 fonálféreg ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	100	6	2n=12	18 424	1998	konzorcium	térképezés	első teljesen megszekvenált többsejtű genom
 ecetmuclica ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	180	4	2n=8	13 601	2000	UC Berkley Celera Genomics	shotgun/BAC térkép	
 human ( <i>Homo sapiens</i> )	3 000	23	2n=46	~ 30 000	2000	Human Genome Project & Celera Genomics	shotgun/térképezés	
 lúdfű ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	125	5	2n=10	~25 000	2000	konzorcium	shotgun/BAC térkép	első megszekvenált növényi genom
 rizs ( <i>Oryza sativa</i> )	389	12	2n=24	~ 28 000	2005	konzorcium	shotgun/BAC térkép	első megszekvenált egyszikű
<b>új generációs szekvenálási módszerek megjelenése</b>					2005			
 nyárfa ( <i>Populus trichocarpa</i> )	485	19	2n=38	~ 45 000	2006 (draft seq)	konzorcium	shotgun/BAC térkép	első megszekvenált fa
 kukorica ( <i>Zea mays</i> )	2 500	10	2n=20	~ 32 000	2009 (draft seq)	konzorcium	shotgun/BAC térkép	
 <i>Physcomitrella patens</i> (moss sp.)	520	27		~ 36 000	2008	konzorcium	shotgun	
<b>grandiózus szekvenálási projektek meghirdetése</b>					2010	humán 1000 genomprojekt, 100 Solanaceae projekt, 1000 növényi és állati genom projekt, stb.		

# *Arabidopsis thaliana* genom projekt I.

---

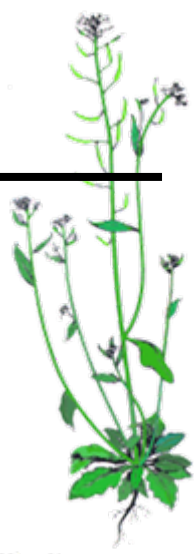


- kistermetű (20-25 cm), kétszikű gyomnövény (Európa, Ázsia, ÉNy Afrika)
- életsiklusa 6 hét (csírázástól magérésig); genomméret 125 Mb
- Johannes Thal (-> *thaliana*), (*Pilosella siliquosa*) XVI szd. Harz-hegység
- F. Laibach javasolta először modell növénynek 1943; ( $2n=10$ )
- Rédei György (1921-2008);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

[www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) (pl. At1g01480)

[www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/](http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/)

# Arabidopsis thaliana genom projekt II.



## Summary of Gene Structure Annotation (TAIR9 release)

- 27,379 protein coding genes
- 4827 pseudogenes or transposable elements and 1312 ncRNAs
- 33,518 genes in all, 39,640 gene models

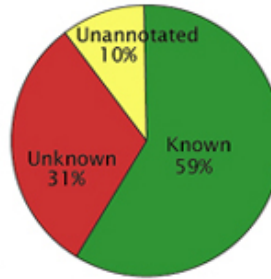
TAIR9 Genome Statistics										
Chr	Protein coding	pre-tRNA	rRNA	snRNA	snoRNA	miRNA	Other RNA	Pseudo gene	TE gene	Total
1	7,054	240	0	2	18	52	107	242	683	8,398
2	4,237	96	2	0	15	29	75	218	825	5,497
3	5,436	93	2	7	15	29	67	201	878	6,728
4	4,214	79	0	0	11	28	48	121	711	5,122
5	6,318	123	0	4	12	36	53	144	804	7,494
<b>Total</b>	<b>27,169</b>	<b>631</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>71</b>	<b>174</b>	<b>350</b>	<b>926</b>	<b>3,901</b>	<b>33,239</b>
C	88	37	8	0	0	0	0	0	0	133
M	122	21	3	0	0	0	0	0	0	146
<b>Total</b>	<b>27,379</b>	<b>689</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>71</b>	<b>174</b>	<b>350</b>	<b>926</b>	<b>3,901</b>	<b><u>33,518</u></b>

# Arabidopsis thaliana genom projekt III.



## Summary of Gene Functional Annotation

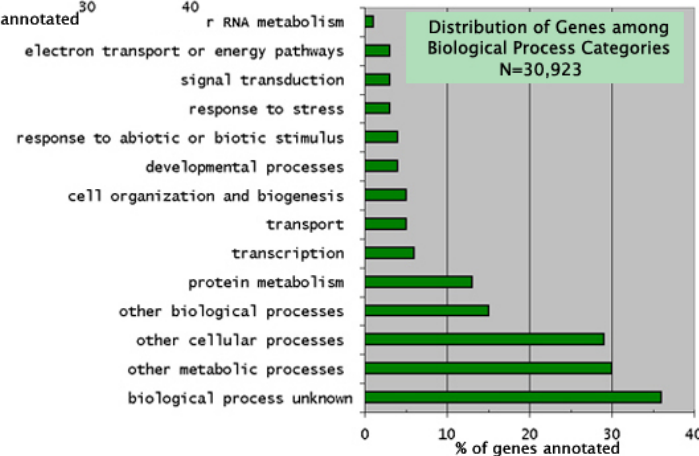
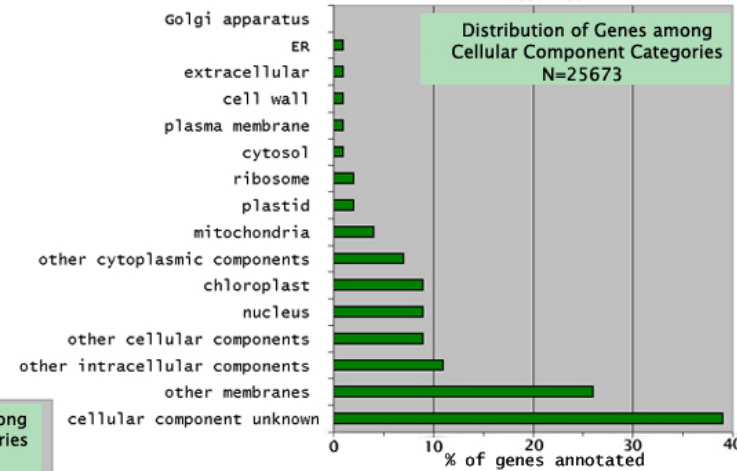
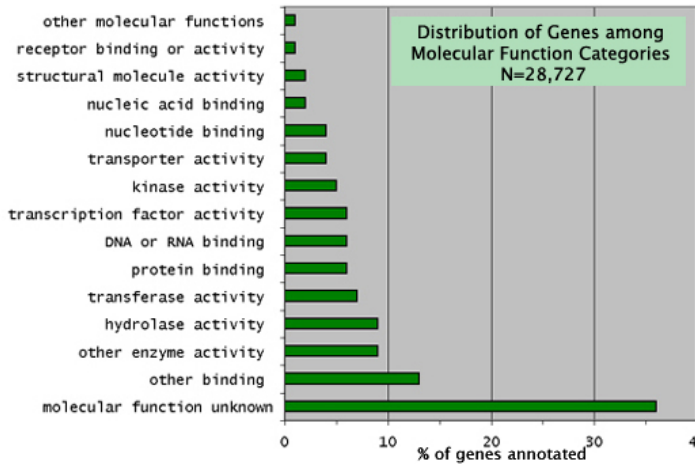
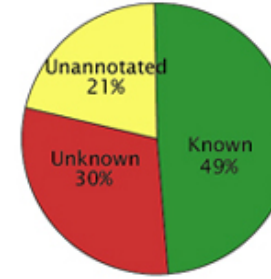
Molecular Function



Biological Process



Cellular Component



# Rizs genom projekt I.

---



- 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
- 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* genomszekvencia meghatározása szintén befejeződött (2002 - draft szekv.)

<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>

<http://rice.plantbiology.msu.edu/>

<http://rice.genomics.org.cn/rice/index2.jsp>



# Riz genom projekt II.



MSU Rice Genome Annotation, Release 6.1 (05/01/2009)

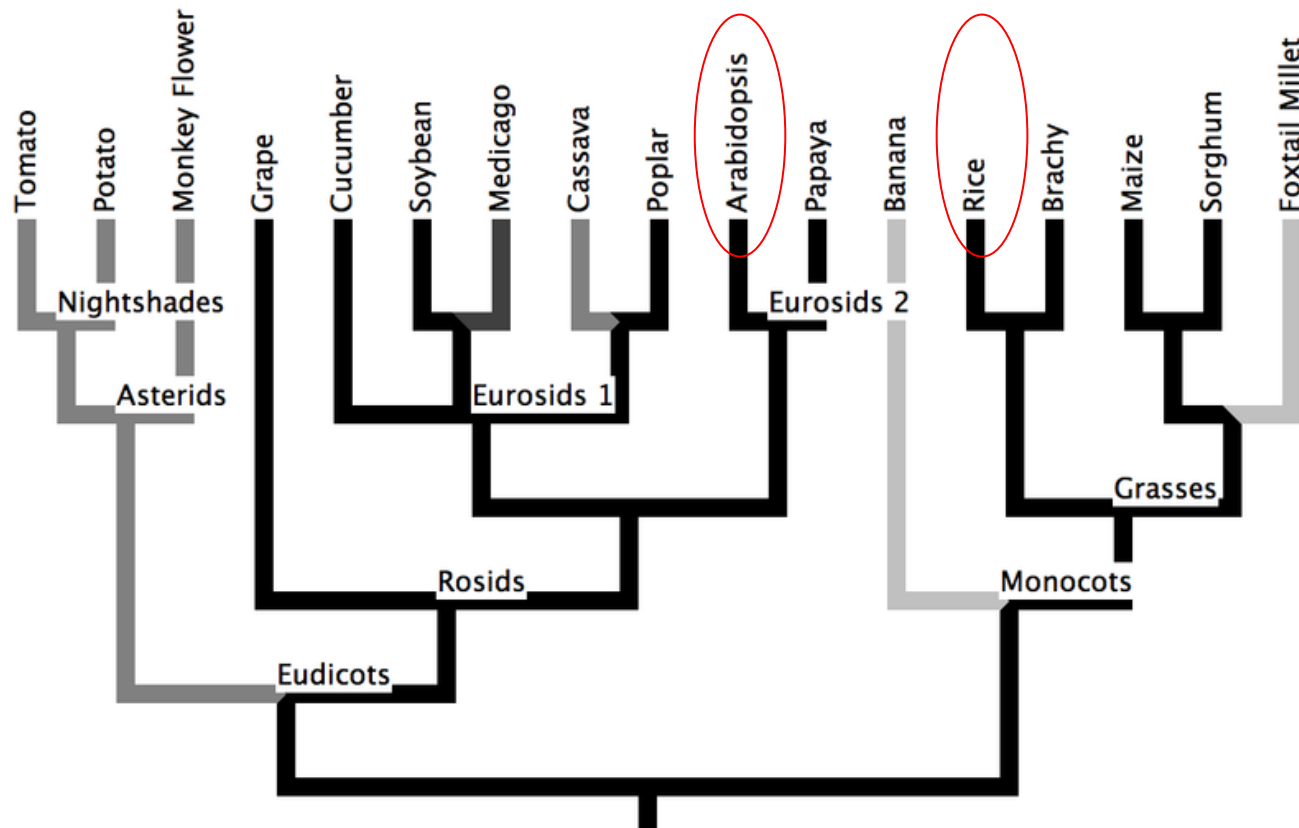
Features	TE-related Genes/Loci	Non-TE-related Genes/Loci
Gene number	16 220	40 577
Average Gene Size (bp)	3 257	2 841
Average Exon/Gene	4,2	4,9
Average Exon Length (bp)	526	313
Average Exon GC Content (%)	50,8	51,5
Average Intron/Gene	3,2	3,9
Average Intron Length (bp)	340	415
Average Intron GC Content (%)	42,9	37,6

Genes from MSU Rice Genome Annotation, Release 6.1

Functional Classification	Genes/Loci	Genes/Loci Percentage	Gene Models	Gene Models Percentage
Putative	23 348	41,1	31 752	47,1
Expressed	6 311	11,1	8 268	12,3
Conserved hypothetical	2 033	3,6	2 033	3,0
Hypothetical	8 885	15,6	8 886	13,2
TE-related	16 22	28,6	16 454	24,4
Total	56 797	100	67 393	100

(TE-related: Transposable-element related genes and gene models)

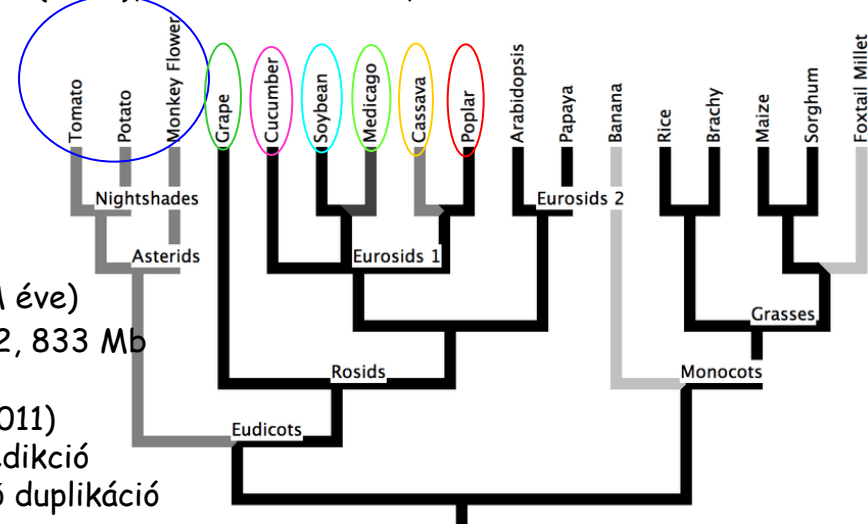
# További növényi genomszekvenálási projektek I.



fekete: publikált szekvencia  
szürke: folyamatban lévő szekvencia meghatározás  
(törzsfák ágainak hossza nem arányos az elválás idejével)

# További növényi genom szekvenálási projektek II.

- harangláb (*Aquilegia formosa*): Ranunculales rend; ~ 130 M éve vált el a rosid és asterid ágától, szekvencia meghatározás az utolsó fázisban
- **Asterids**
  - paradicsom: 950 Mb, 2n=24; részleges genom (v. 2.30), 22x lefedettség; Roche 454 szekv.
  - burgonya: 1700 Mb; 4n=48; részleges genom,
  - sárga bohócvirág: 430 Mb, nem teljes; ökológia jelentőség
- **Rosids**
  - szőlő: ~ 500 Mb, 19 kromoszóma; 2007 - pinot noir, 2093 metakontig, a genom ~ 94,6%-a
- **Eurosids I**
  - uborka: 7 kromoszóma; „Chinese long 9930” ~ 240 Mb; Gy14 inbred line 203 Mb
  - nyárfa: 3. megszekvenált növényi genom (2006), 370 Mb, 19 kromoszóma
  - ricinus: 10 kromoszóma, ~ 320 Mb, első genomszekvencia 2010
  - cassava: manioka v. tapióka; jelenlegi verzió 416 Mb és > 11000 kontig (~ a genom 50%-a)
  - vadkender: 400 Mb genom - Medicinal Genomics (Amszterdam) 2011; 131 000 Mb szekvencia - 327x lefedettség, nyers adatok publikálva - összeszerelésre várva
  - alma: 17 kromoszóma, ~740 Mb becsült genom; ~ 600 Mb (2010), 57 400 gén (genom duplikáció)
  - őszibarack: 8 kromoszóma, verzió 1.0 (2010), 7,7x lefedettség
  - *Medicago truncatula*: 8 kromoszóma, verzió 3.0 (2010), ~450 Mb becsült, szekv.: 240 Mb kromoszómákhoz kapcsolt, 17 Mb nem kapcs.
  - *Lotus japonicus*: 6 kromoszóma, verzió 1.0 (2009) ~470 Mb becsült megszekvenált > 90%
  - szója: 20 kromoszóma, ~1115 Mb becsült, 950 Mb ismert (2010) 46400 felt. kódoló gén (két teljes genom dupl. 59 és 13 M éve)
  - pigeonpea (*Cajanus cajan*): Phaseoleae, 2n=2x=22, 833 Mb félsivatagi mg-i kultúrnövény, Illumina nyers genomszekvencia (2011) 606 Mb (73%), 48 690 gén predikció nincs egész genomra kiterjedő duplikáció



# További növényi genom szekvenálási projektek III.

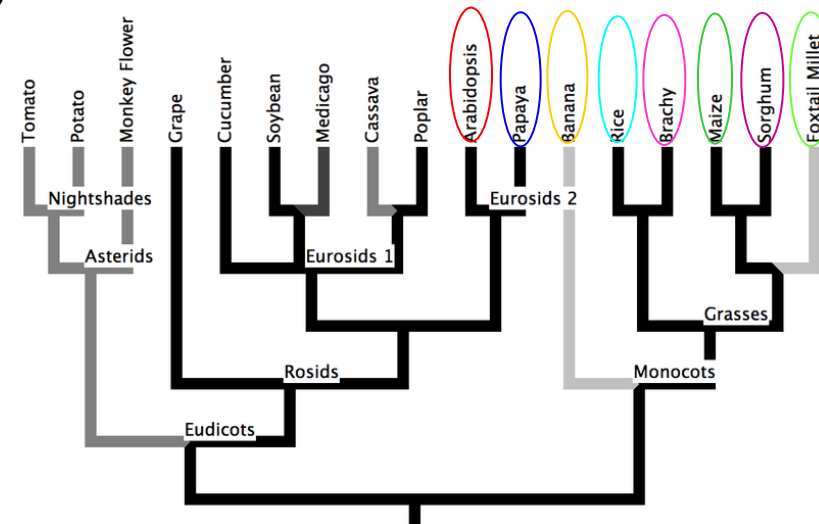
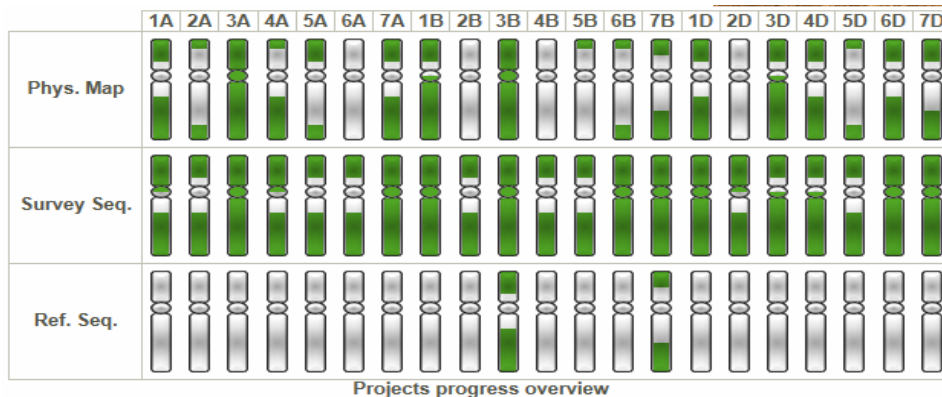
- Eurosid 2 - **papaya** : az első genetikailag módosított termesztett növény (papaya ringspot vírus rezisztencia) az Arabidopsishoz legközelebbi megszekvenált genom (2009), amely nem mutat nem teljes genom duplikációt; 9 kromoszóma, 372 Mb
  - *Arabidopsis thaliana*
  - *Arabidopsis lyrata* : nem publikált szekvencia - összehasonlító genomika

Egyszikűek - datolyapálma: kezdeti állapot

- **banán**: az első megszekvenált nem fűféle egyszikű genom lesz (Genoscope - 2011; nemzetközi konzorcium), 600-700 Mb

Fűfélék: - **rizs**

- **Brachypodium**: búza, árpa zab és rozs modell növénye, energianövény?  
a Földközi-tenger vidékén és a Közel-Keleten honos évelő fűféle, 2n, 4n és 6n  
272 Mb (Nature, 2010), 5 kromoszóma
- **kukorica**: 2500-3000 Mb becsült, 2n=20, 2300 Mb (2009), teljes genom duplikáció és 2x transzpozon felszaporodás
- **sorghum**: kukorica közeli rokona (C4 fotoszint.), ~700 Mb szekv. (2009)
- **Setaria italica** : róka farkú köles v. olasz muhar (2007)
- **búza**: 2n = 6x = 42, AABBDD, 15500-17000 Mb becsült;  
fizikai térképezési fázisban  
*Aegilops umbellata* (2n=14) és  
*A. tauschii* (2n=14, D genom)



# További növényi genom szekvenálási projektek IV.

---

- *Chlamydomonas* - egysejtű alga, amelynek fejlődése kb. 1 milliárd éve vált el a szárazföldi növényektől  
flagellum - a növények és az állatok közös őseitől; 120 Mb (2007)
- *Physcomitrella patens*: moha (virág és szállítószövet hiánya); 480 Mb (2008),  
36 000 gén modell
- csipkeharaszt: virág hiánya  
legkisebb szekvenált növényi genom lesz  
(~110 Mb)

# Tervezett és nem régen indult növényi genomszekvenálási projektek

---

- napraforgó: 2010-ben kezdődött (~ 3000Mb; 2n=34), legnagyobb megszekvenált genom lesz hamarosan
- gyapot: szekvenálás 2009-ben indult
- szamóca: első verziót 2010-re ígérték
- kakaó: MARS finanszírozza (Roche 454)
- Brassica fajok: *B. oleracea* (káposzta), *B. rapa* (tarlórépa), *B. napus* (repce) - Bayer CropScience - nem elérhető  
BGI, Shenzhen és IVF, Beijing - Illumina
- olajpálma
- kávé: *Coffea arabica* - allotetraploid; ~1160 Mb, 2010-ben indult
- Arabidopsis rokon fajok: *Boechera stricta*, *Thellungiella halophila* (sótűrő), *Capsella rubella*, *A. halleri*,  
*A. arenosa*, *Boechera divericarpa*
- *Eucalyptus grandis*
- *Zostera marina* (tengerifű), *Panicum virgatum* és *P. hallii* (díszfüvek)
- *Pinus taeda* (terpentin fenyő)
- *Miscanthus giganteus* (elefántfű)
- bab
- békalencse
- *Salix pupurea* (fűzféle)
- körte, cseresznye
- kristályvirág (ice plant) - CAM (crassulacean acid metabolism) fotoszintézis modell növénye

# Célzott növényi genom projektek

---

- kukorica domesztikációja: kukorica - sorghum
- ivari kromoszóma vizsg.: papaya, nyárfa (chr XIX)
- termés íz és tápanyag-utak vizsg. : paradicsom, kakaó, stb.
- magfejlődés: szója, bab
- virágfejlődés: oroszlánszáj, harangláb, *Amborella trichopoda*, avokádó, *Magnolia* fajok, kaliforniai mák, *Zamia fischeri* (pálmafaj), *Welwitschia mirabilis*, spárga, gerbera, stb.
- kromatinszerkezet és génexpresszió vizsg.: petúnia
- vadfajok: rizs, szója, *Solanum* sp.
- energianövények: elefántfü és díszfüvek, nyárfa, fűzfa, olajpálma



# Fontosabb genomszekvenálási projektek áttekintése (2011)

Common name	Latin name	Status	Sequencing group	Sequencing method
<b>DICOTS</b>				
mouse ear cress	<i>Arabidopsis thaliana</i>	completed	consortium (AGI)	clone
poplar	<i>Populus trichocarpa</i>	completed	JGI (Joint Genome Institute)	whole genome shotgun
lyreleaf rockcress	<i>Arabidopsis lyrata</i>	in progress	JGI	whole genome shotgun
pink shepherd's purse	<i>Capsella rubella</i>	in progress	JGI	whole genome shotgun
rapeseed	<i>Brassica rapa</i>	in progress	consortium (MGBP)	clone
tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i>	in progress	consortium (ITGSP)	clone
potato	<i>Solanum tuberosum</i>	in progress	consortium (PGSC)	clone
barrel medic	<i>Medicago truncatula</i>	completed?	consortium (IMGAG)	clone
	<i>Lotus japonicus</i>	in progress	consortium	clone
monkey flower	<i>Mimulus guttatus</i>	in progress	JGI	whole genome shotgun
soybean	<i>Glycine max</i>	in progress	JGI	whole genome shotgun

Common name	Latin name	Status	Sequencing group	Sequencing method
<b>DICOTS</b>				
cotton	<i>Gossypium hirsutum</i>	in progress	JGI	whole genome shotgun
cassava	<i>Manihot esculenta</i>	in progress	JGI	whole genome shotgun
grape	<i>Vitis vinifera</i>	completed?	consortium	whole genome shotgun
columbine	<i>Aquilegia formosa</i>	pending	JGI	whole genome shotgun
eucalyptus	<i>Eucalyptus grandis</i>	pending	JGI	whole genome shotgun
papaya	<i>Carica papaya</i>	in progress?	consortium	whole genome shotgun
castor bean	<i>Ricinus communis</i>	completed?	TIGR	whole genome shotgun
yellow owl's clover	<i>Triphysaria versicolor</i>	pending	JGI	whole genome shotgun

Common name	Latin name	Status	Sequencing group	Sequencing method
<b>MONOCOTS</b>				
rice	<i>Oryza sativa japonica Nipponbare</i>	completed	consortium (IRGSP)	clone shotgun
rice	<i>Oryza sativa indica</i>	completed	Beijing Genomics Institute	whole genome shotgun
maize	<i>Zea mays</i>	in progress	consortium	clone
sorghum	<i>Sorghum bicolor</i>	completed	JGI	whole genome shotgun
grass	<i>Brachypodium distachyon</i>	in progress	JGI	whole genome shotgun
foxtail millet	<i>Setaria italica</i>	pending	JGI	whole genome shotgun
banana	<i>Musa acuminata</i>	in progress	consortium	clone
wheat	<i>Triticum aestivum</i>	pilot	consortium (IWGSC)	clone or single chromosome shotgun
<b>OTHER</b>				
moss	<i>Physcomitrella patens</i>	completed	JGI	whole genome shotgun
gemmiferous spike moss	<i>Selaginella moellendorffii</i>	completed	JGI	whole genome shotgun

## 2008 - 1000 Plant Genomes Project meghirdetése

- kb. 370 000 növényfaj létezik
- ~ 80 000 fajról van DNS információ (95%-ban csak pár gén szekvencia)
- Beijing Genomics Institute (BGI . Shenzhen, China) - Illumina szekvenálás
- transzkriptom szekvenálás (teljes génkészlet szekvenálás <-> EST projektek)
- biotechnológiai alkalmazás az előtérben - a mintákat az egyes fajok esetében a biotechnológiai szempontból fontos szövetekből veszik (másodlagos anyagcseretermékek, olajtartalom, orvosi vonatkozás, stb.)



# A genetikai térképezés és genomszekvencia néhány alkalmazása

---

- a genetikai térképek biztos alapot jelentenek genomikai projektnél - genomszerveződés vizsgálata (pl. genomszekvenálás, fizikai térképezés, genetikai és citológiai térkép összevetése, stb. )
- összehasonlító genetikai térképezés (genom evolúció)
- gyakorlati szempontból fontos génekhez vagy lókuszokhoz kapcsolt markerek azonosítása
- génklónozás

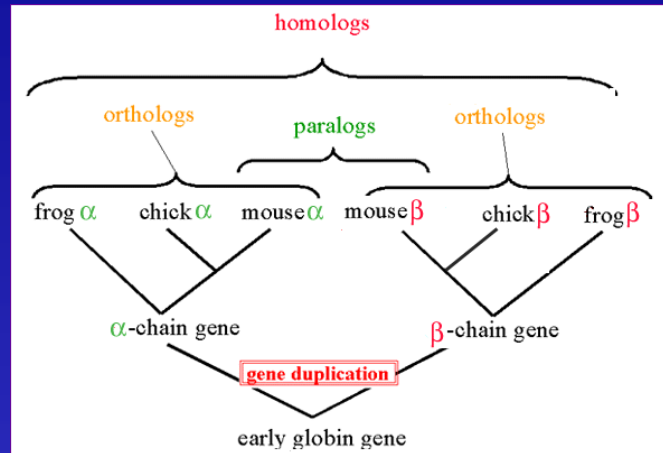
# Összehasonlító genetikai térképezés I. (alapfogalmak)

- Kapcsolt genetikai markerek (kapcsoltság) vizsgálata különböző fajokban vagy rendszertani kategóriák között
- Homológia = hasonlóság; *közös evolúciós eredet* (madár és denevér szárny; hasonló szerkezet és pozíció)
- Analógia = hasonlóság, *közös evolúciós eredet nélkül* (pl. légy és madár szárny)
- Homológia - ortológia és paralógia
  - két gén ortológ, ha két különböző fajban találhatóak, és egy közös ős-génből származnak, mely a két faj közös ősében jelen volt. Ugyanazt a funkciót szolgálják, a két fajban.
  - két gén paralóg, ha ugyanabban az organizmusban találhatóak, és egy közös ős-génből génduplikáció és azt követő divergens evolúció útján alakultak ki. Többnyire különböző, de egymással összefüggésben lévő funkciójuk van.



# Összehasonlító genetikai térképezés II. (alapfogalmak)

ortológ-paralóg

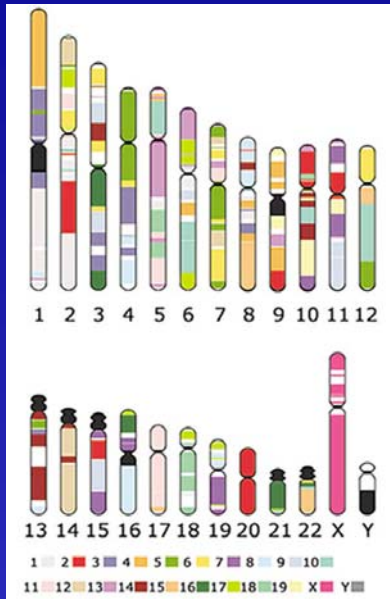


**Synteny** („egybeesés”) = ortológ lókuszok két különböző faj azonos kromoszómáján helyezkednek el  
**Colinear** = a lókuszok két különböző faj azonos kromoszómáján konzervált sorrendben helyezkednek el  
(nem helyesen manapság a kettőt azonos értelemben használják!)

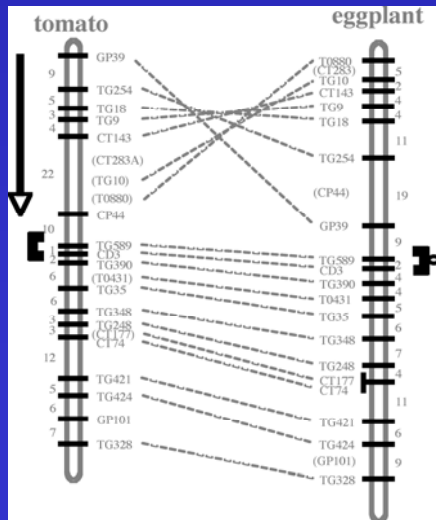
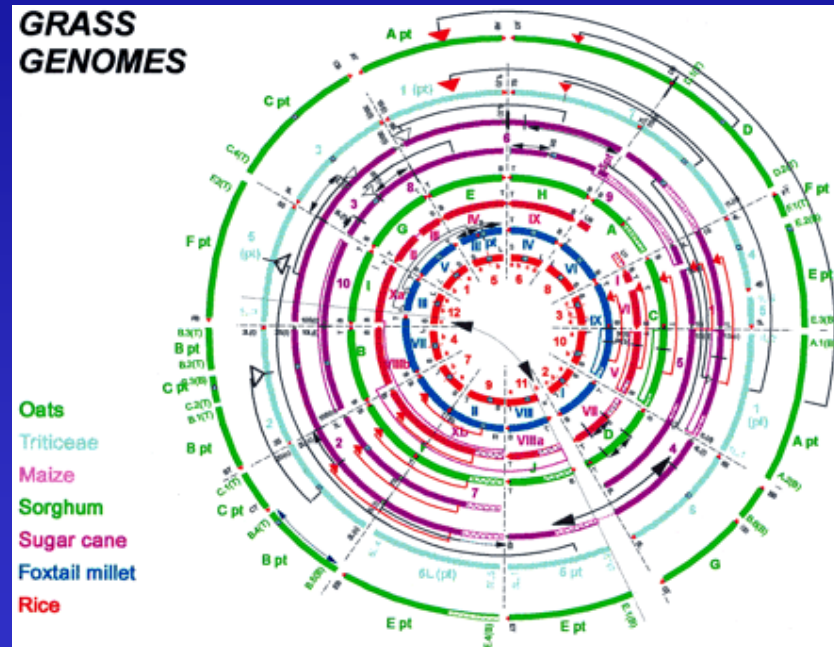
**Macrosynteny** = markerek sorrendjének konzerváltsága kromoszómaszinten

**Microsynteny** = markerek sorrendjének konzerváltsága kisebb genomi szakaszon

# Összehasonlító genetikai térképezés III.

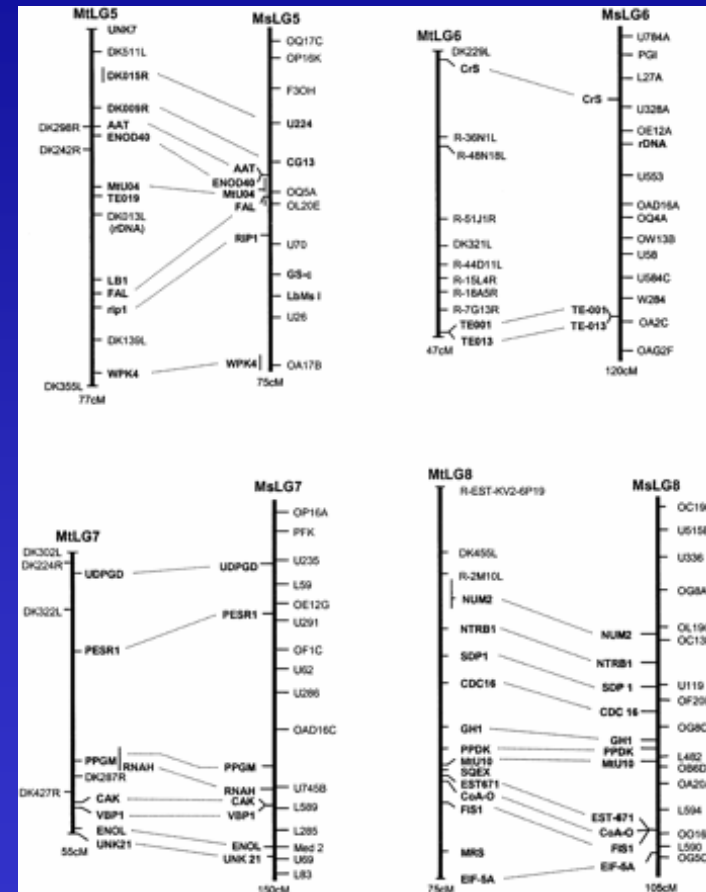
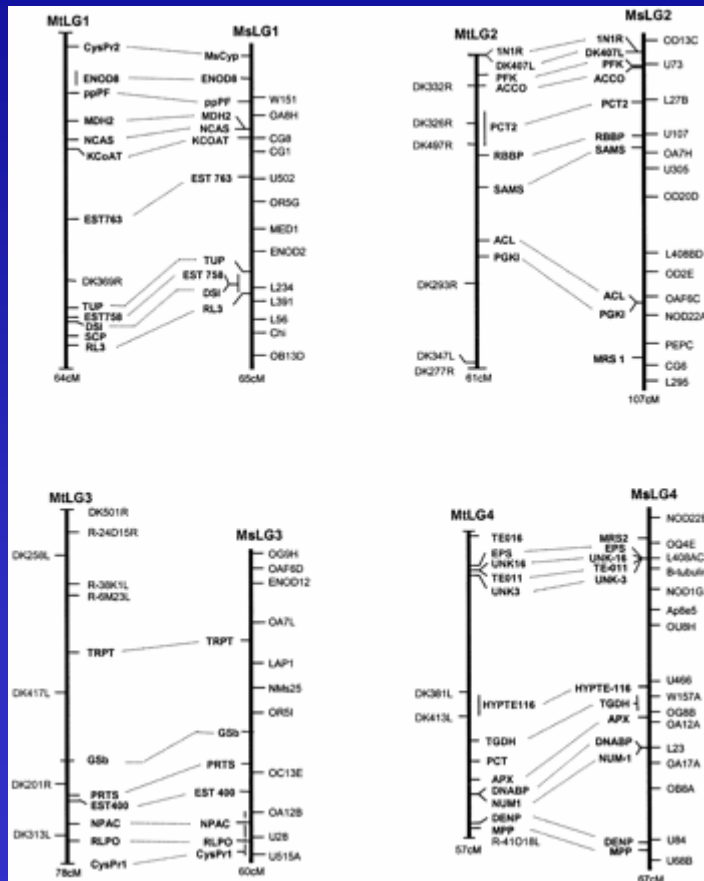


Macrosynteny humán és egér genom között

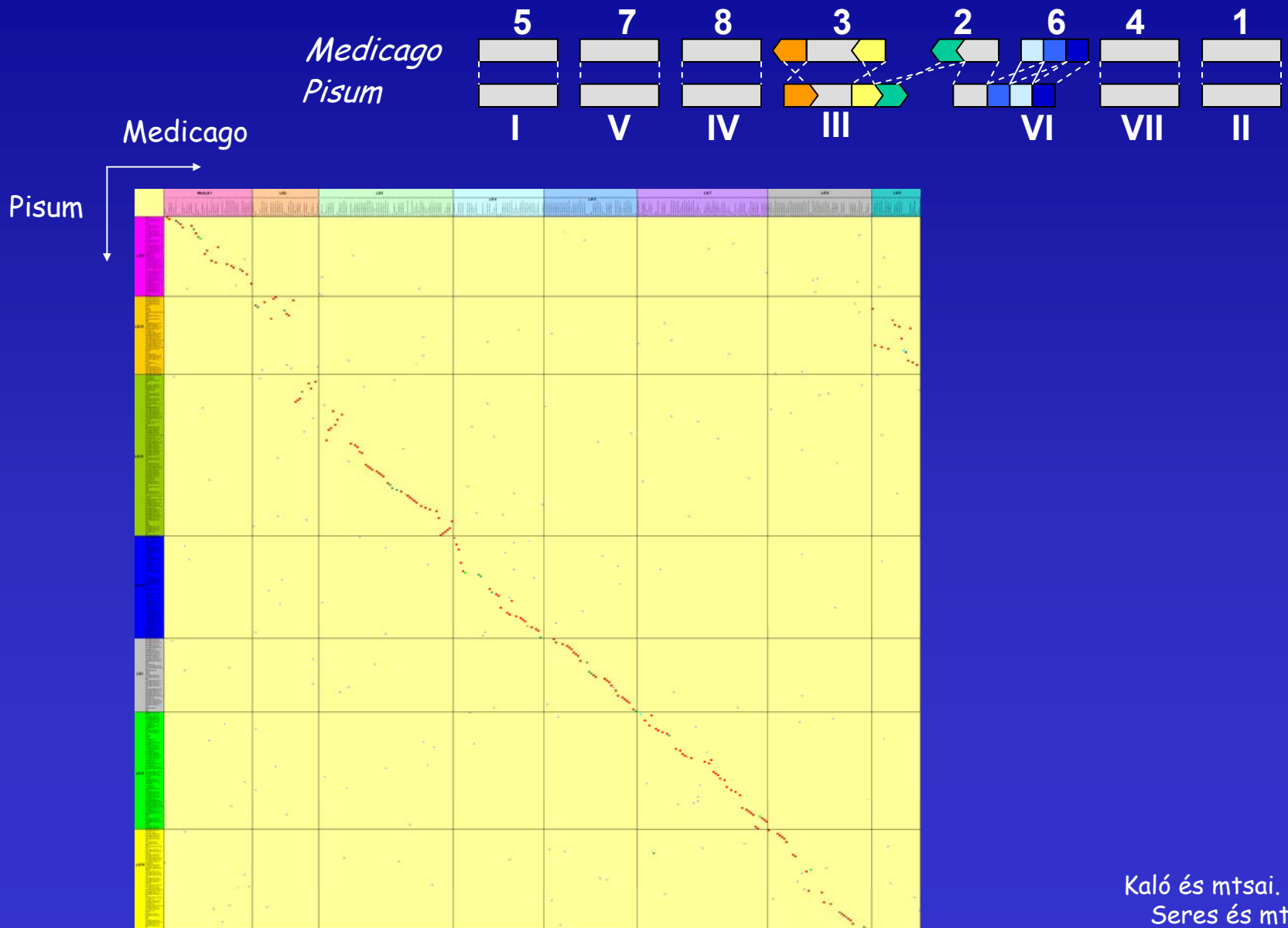


Inverzió egy paradicsom és padlizsán kromoszóma esetében

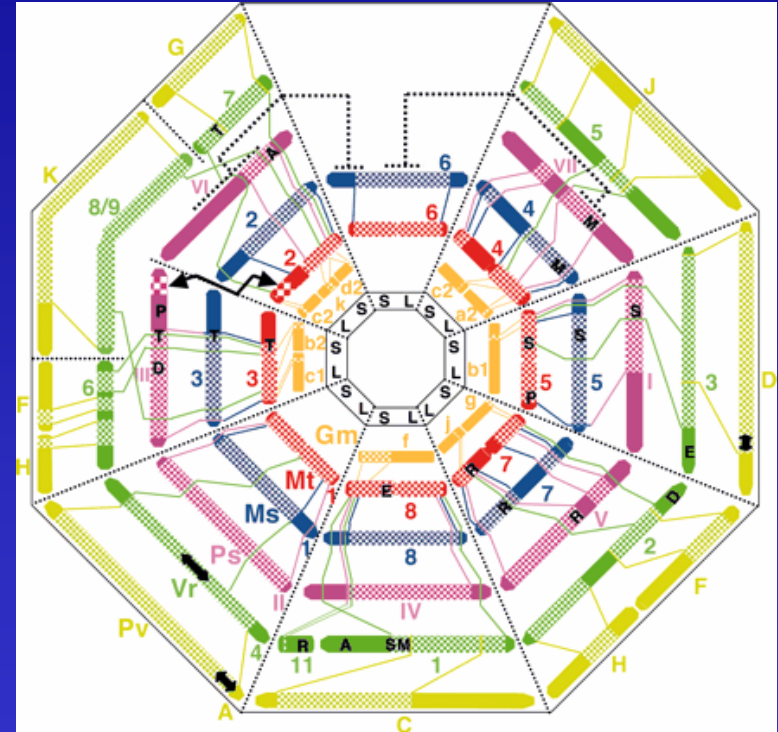
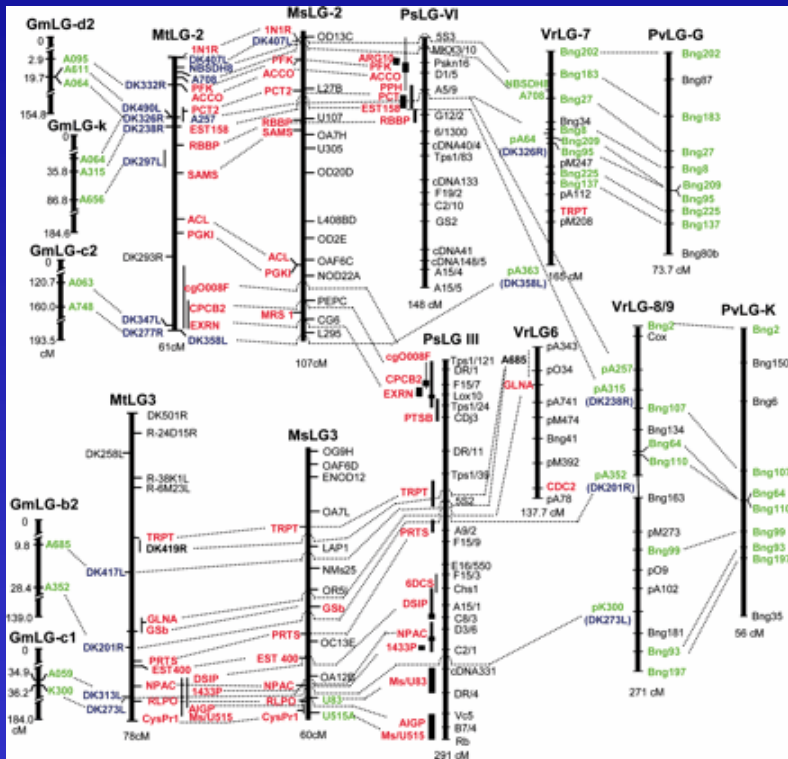
# Összehasonlító genetikai térképezés IV. (*Medicago sativa* és *M. truncatula*)



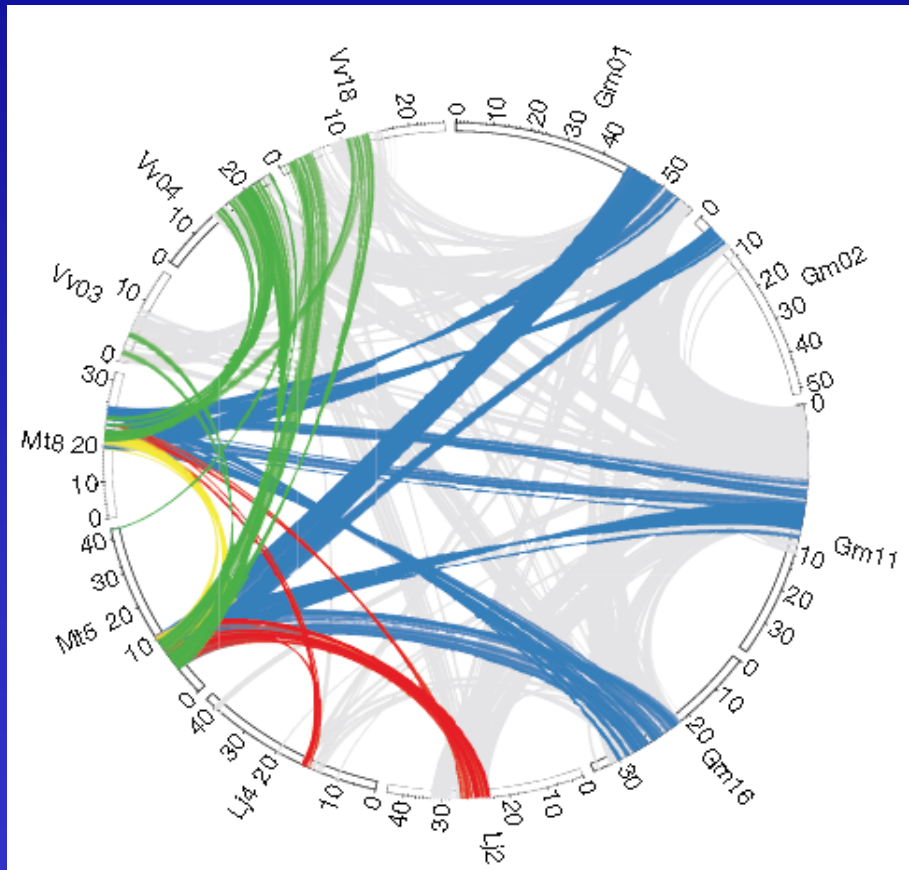
# Összehasonlító genetikai térképezés V. (Medicago - borsó)



# Összehasonlító genetikai térképezés VI. (pillangósok)



# Genom összehasonlítás teljes genomszekvencia felhasználásával



*Medicago truncatula*  
(Young et al. 2011, Nature)

sárga - Mt5 és Mt8 szintenikus régió  
piros - *Lotus japonicus*  
kék - szója  
zöld - szőlő



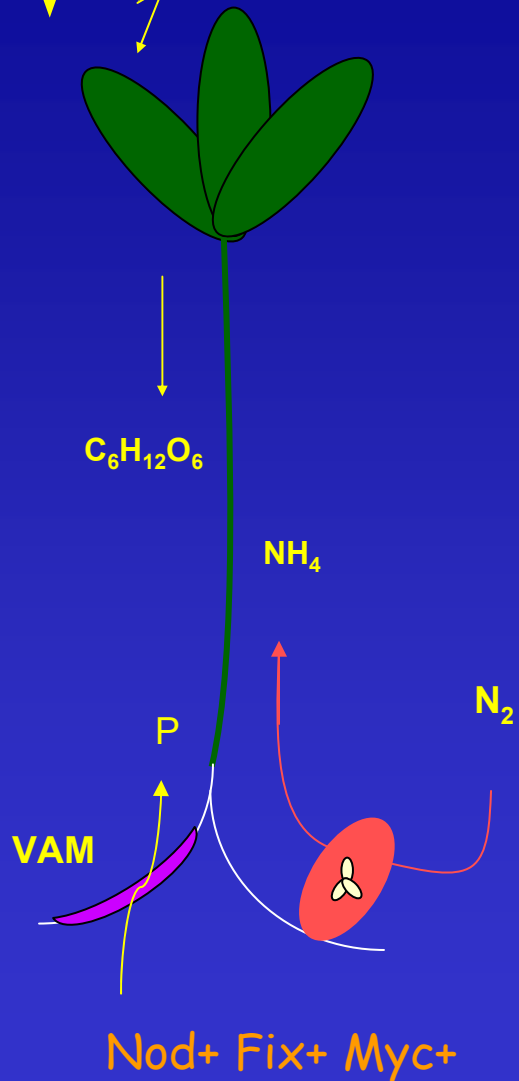
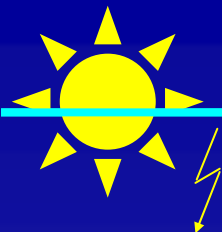
# Génizolálás

- Kérdés: hogyan azonosítanánk egy gént egy komplex szerveződésű eukarióta genomban?

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

- pl. mutagenézissel (transzpozonokkal egyből klónozzuk) de..
  - kicsi az egyedszám (nem tudunk elég utódot átnézni, mint mikrobáknál)
  - letális hatások
  - több helyre ugrik a transzpozon
  - szekvenálással megoldható
  - csak a mi génünkbe nem ugrik a transzpozon.. stb. MIT CSINÁLJUNK??
- kapcsoltsági analízissel
  - mihez legyen kapcsoltság? - **MARKEREK**
  - hogyan határozzuk meg a kapcsoltságot? **GENETIKAI ANALÍZIS**

# Nitrogénkötő szimbiotikus kapcsolat



mutációk

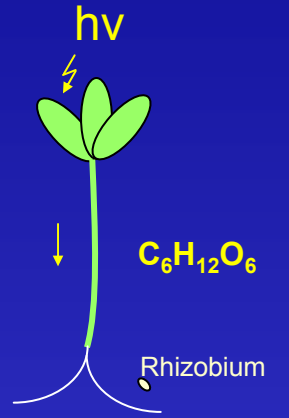


*Ms-MN1008*

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

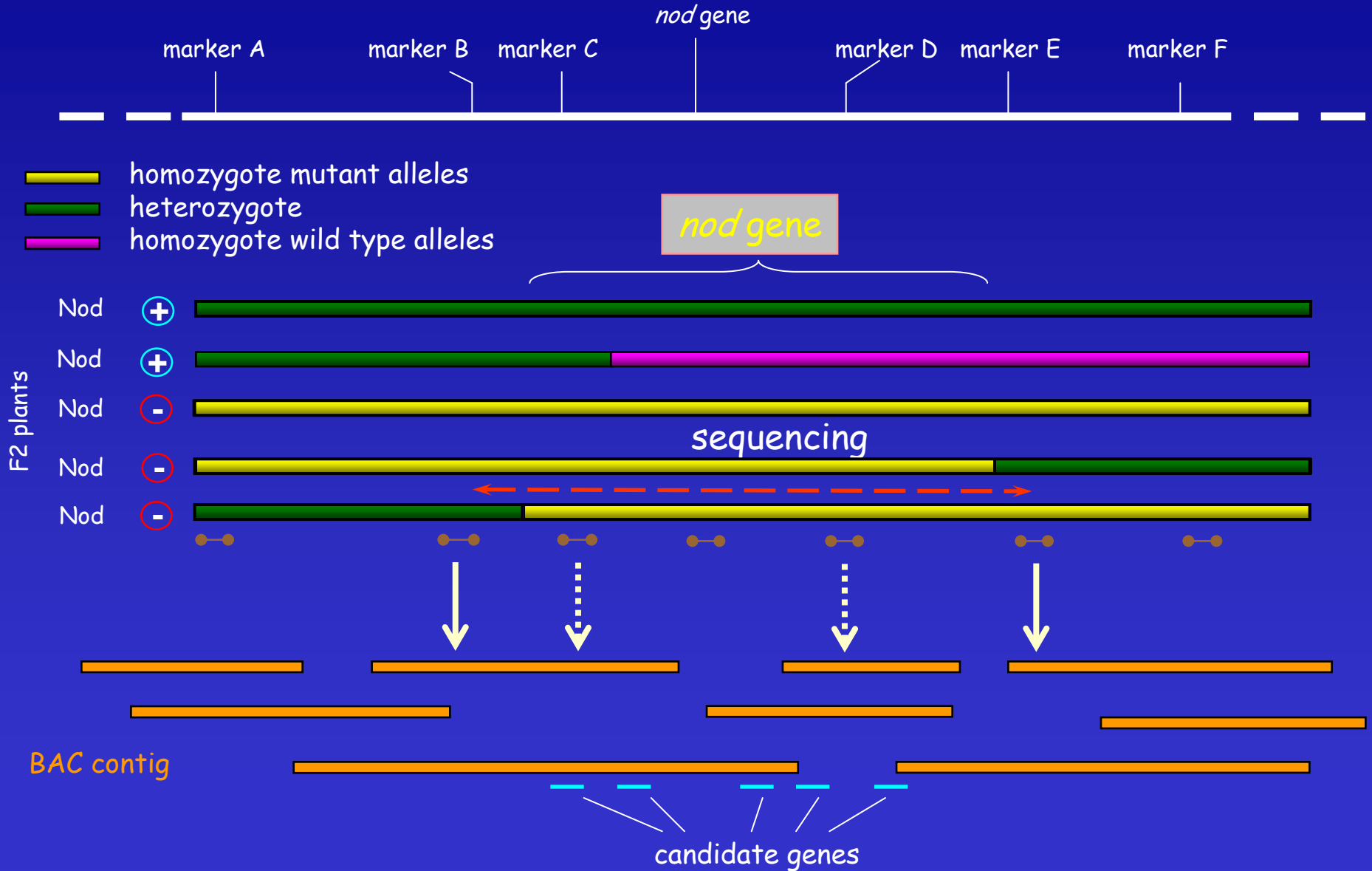
*Ps sym10; Ps sym19, stb.*

*Lj sym1; Lj sym2; sym5, stb.*

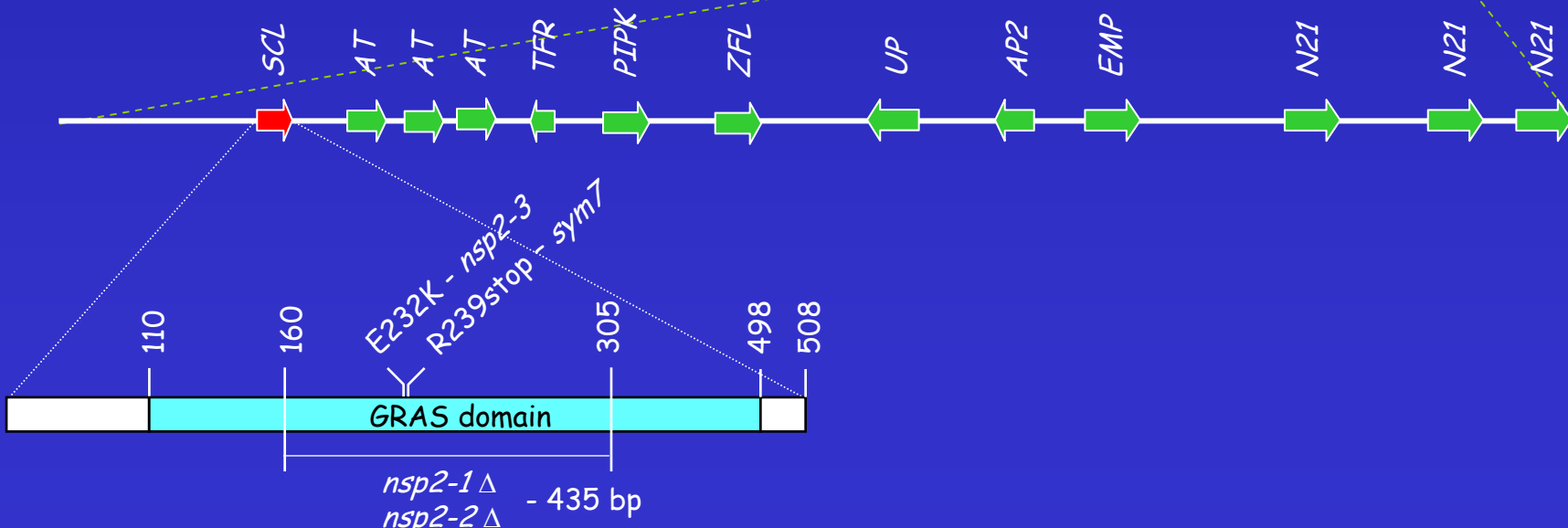
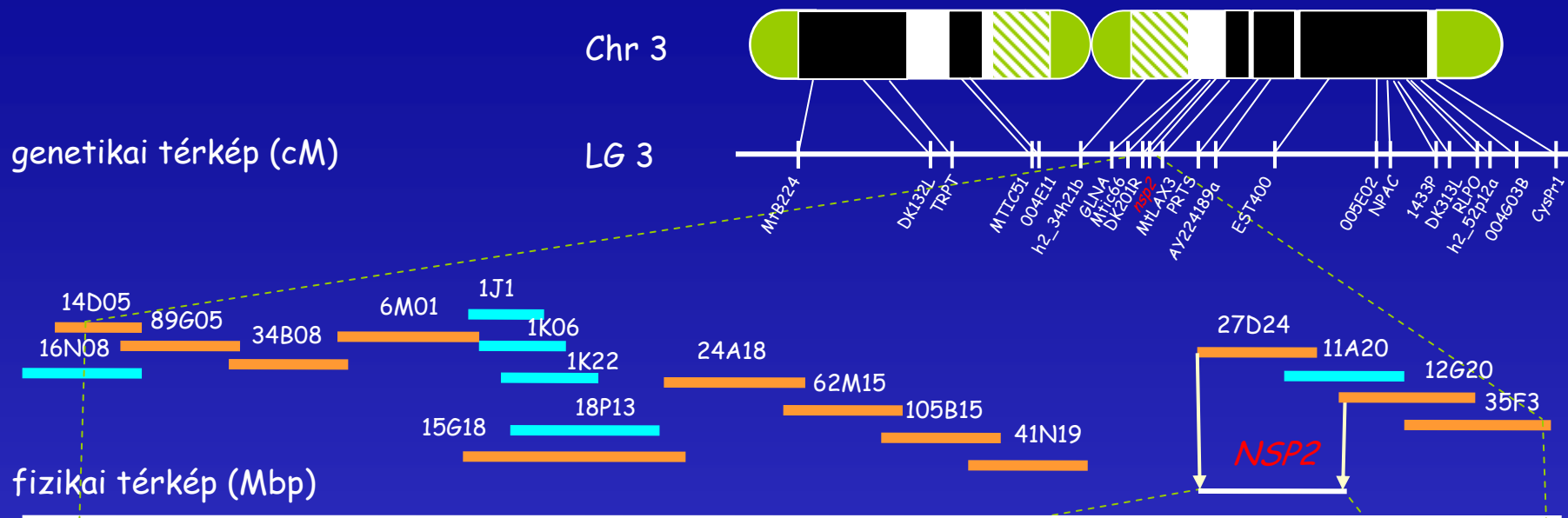


cél: a szimbiotikus nitrogénkötés biológiai folyamatának megismerése

# Génklónozás - térképezésen alapuló génizolálás stratégiája

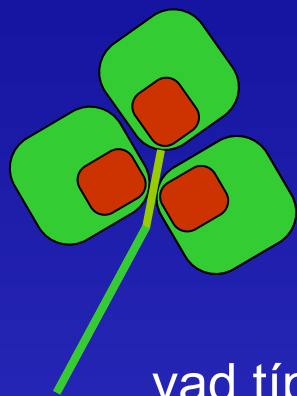


# Az *MtNSP2* gén térképezésén alapuló izolálása

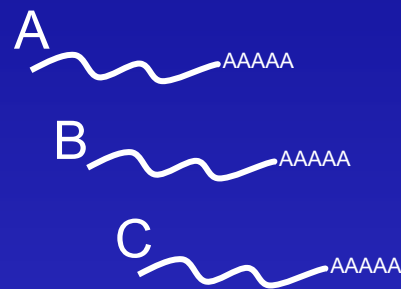


# Deléciók genetikai térképezése 1.

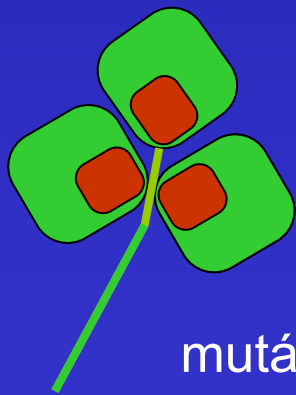
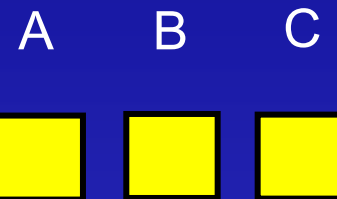
## Transzkripció mintázat alapján történő klónozás (Affymetrix gene chip)



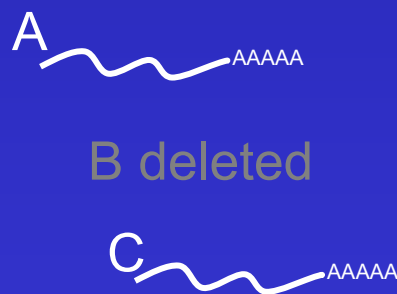
vad típus



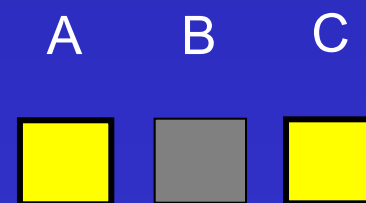
CHIP 1



mutáns  
(fast neutron)

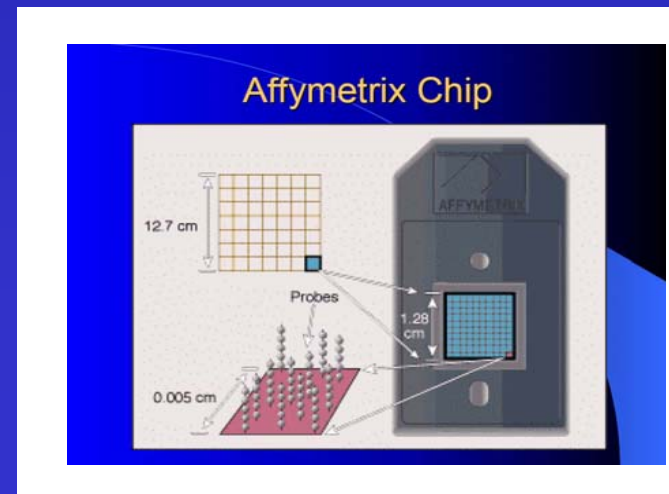


CHIP 2

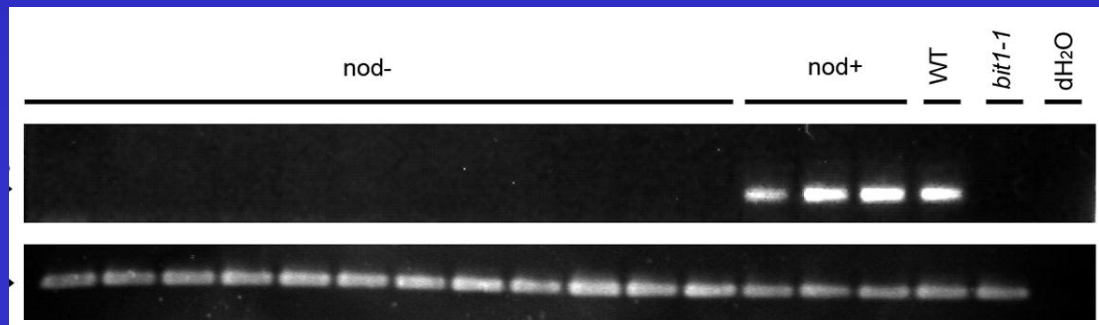
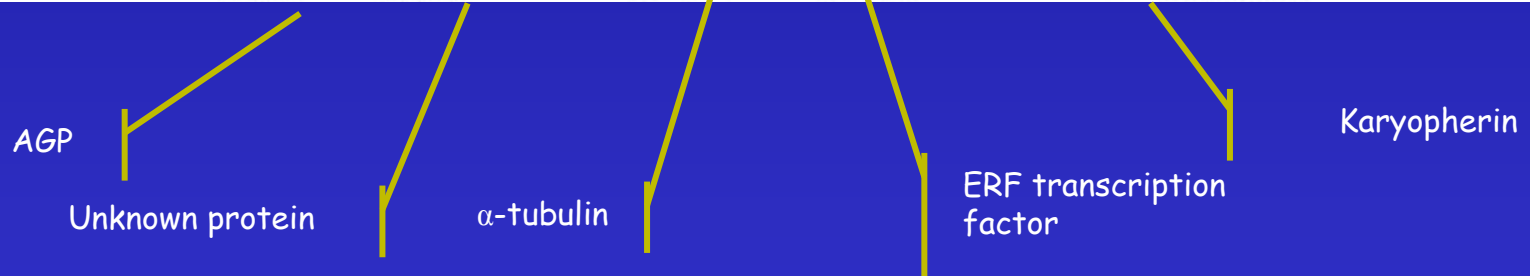
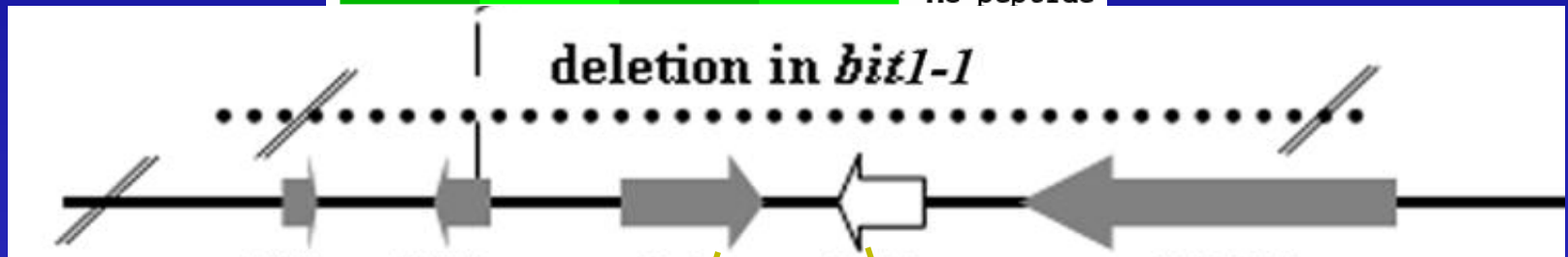
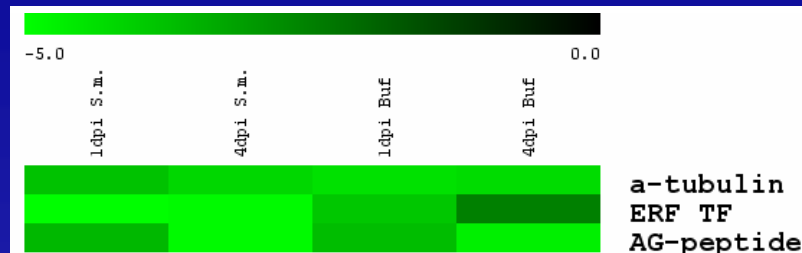


# Transzkripció mintázat alapján történő klónozás (Affymetrix gene chip)

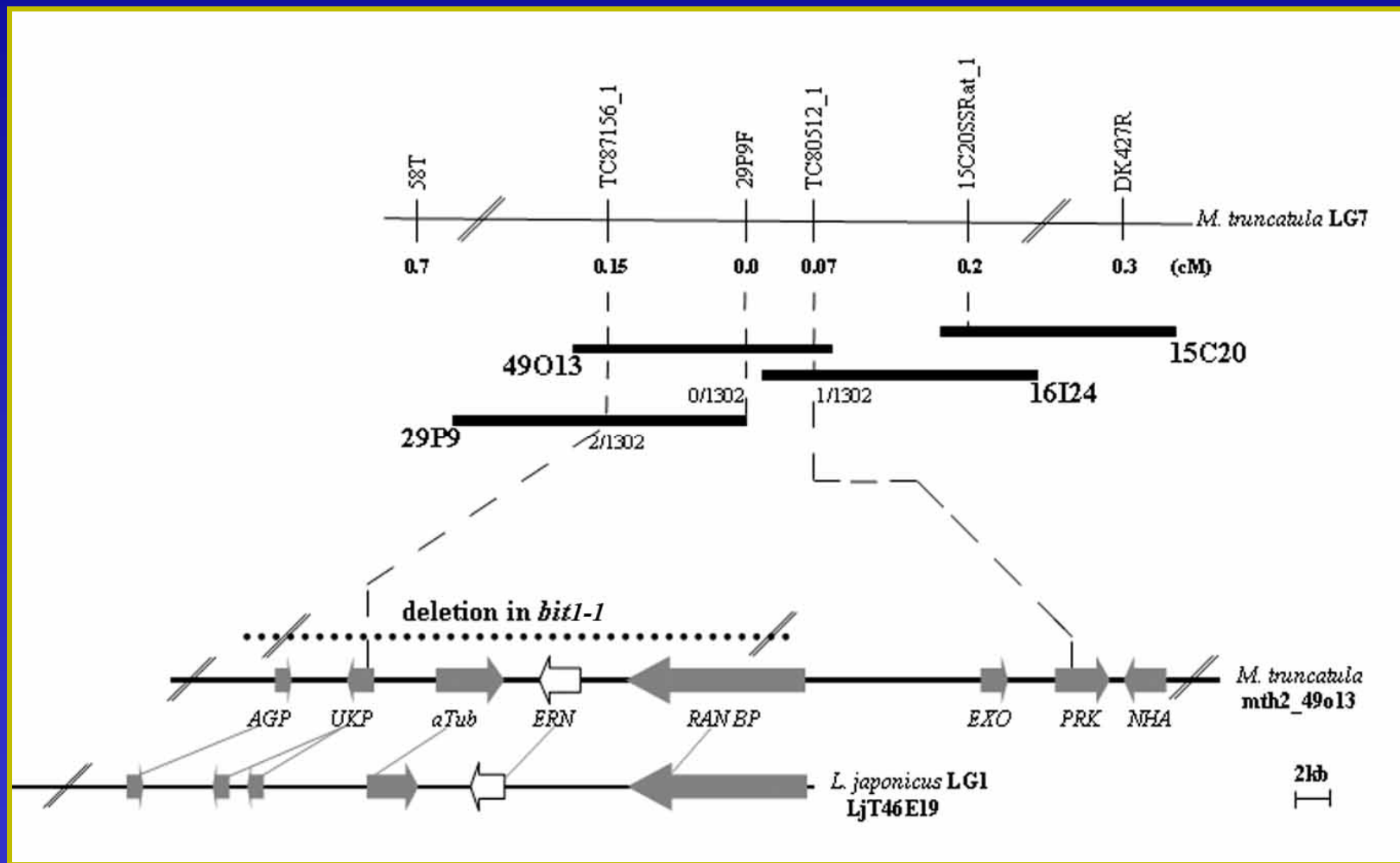
- minden egyes gént 16-20 szintetizált próbapár képvisel
- egy-egy próbapár egy tökéletesen párosodó (PM) és egy „mismatch”-et (MM) tartalmazó oligonukleotidból áll
- egy vizsgált génre a PM és a MM oligonukleotidok jelerősségei közötti átlagos különbségek adják az eredményt
- a Medicago Affymetrix gene 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

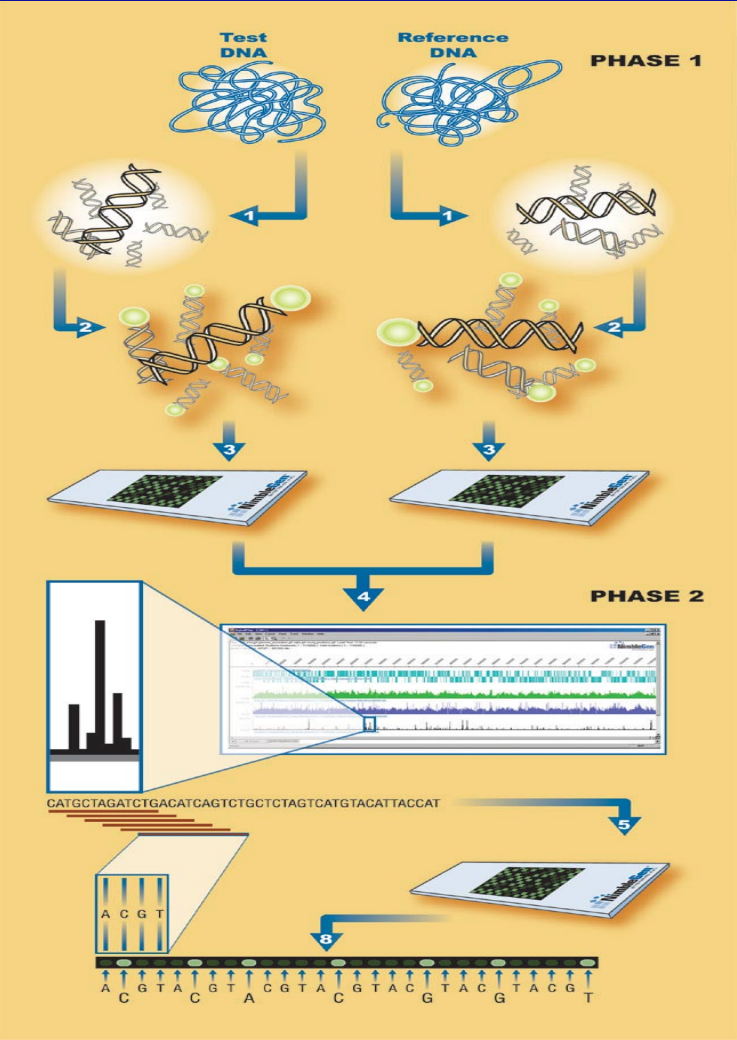


# Az *MtERN1* (*pdl* mutáns) gén térképezésén alapuló klónozása





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



CGS - Comparative Genome Sequencing

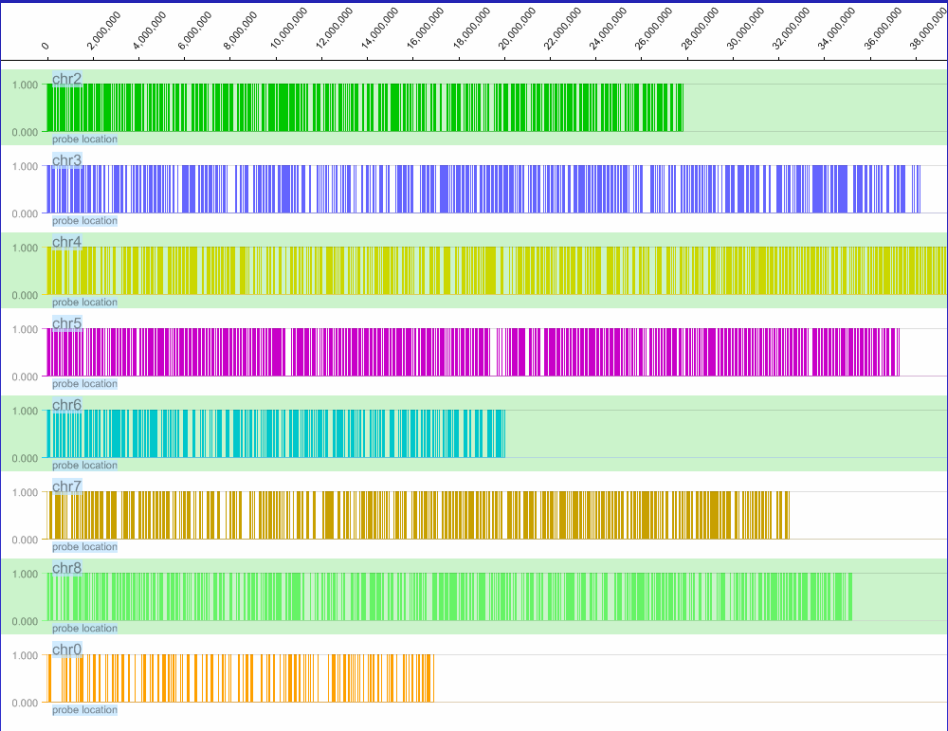
## Oligonukleotidok

- exon 150bp
- intron/utr 300bp
- unigenes  $\geq 1000$ bp 300bp

## Deléciók kimutatása

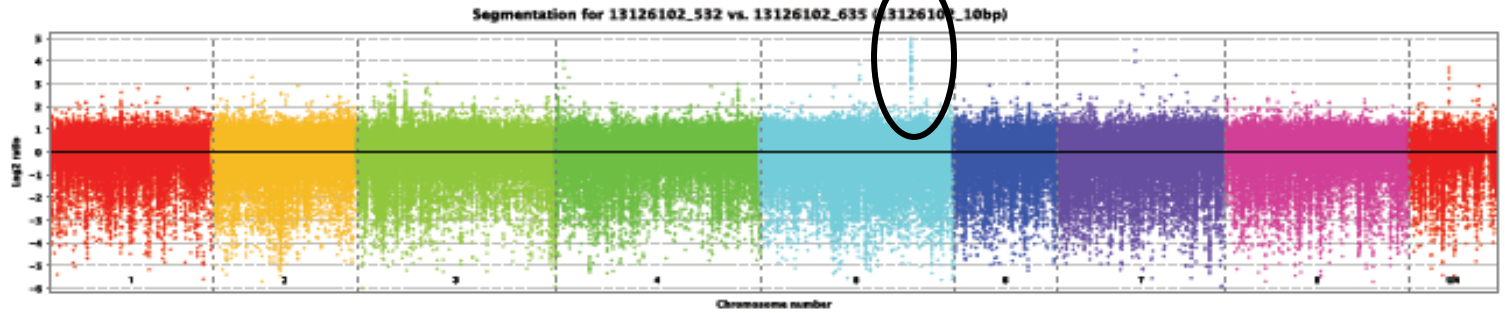
Egy és több kópiás amplifikáció kimutatása

## Transzlokáció kimutatása

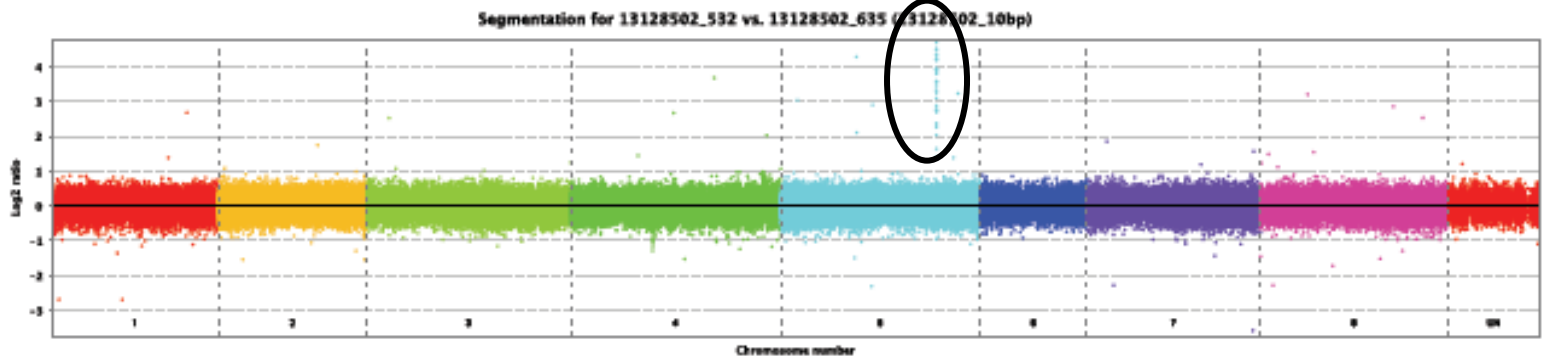


# oaCGH vizsgálat *M. truncatula* növényeken

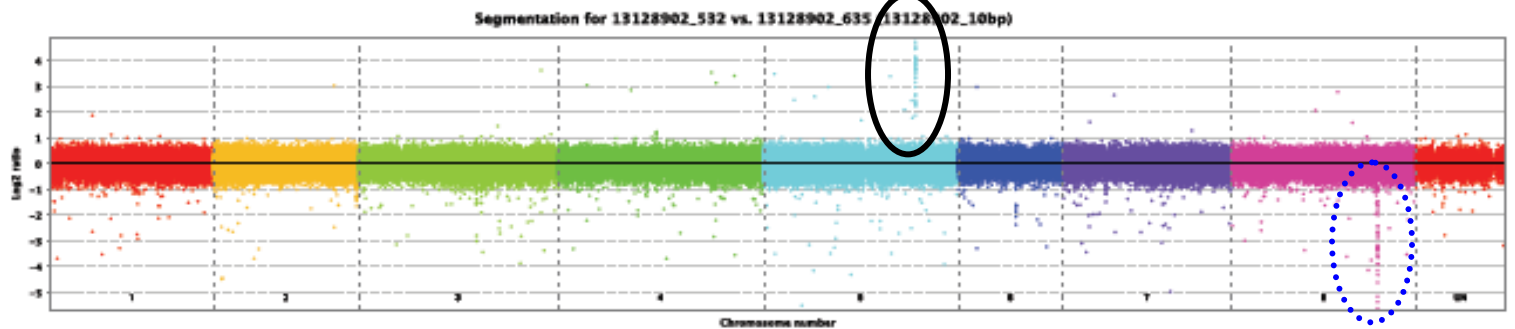
R108



PIN2



FNB#4



# GMO I.

---

- **GM** vagy **GMO**: genetically modified organism -génmódosított, genetikailag módosított vagy „génkezelt” élőlény  
(hagyományos mutagének, poliploidizáció, keresztezések?)  
génmanipulált?
- **Géntechnológia alkalmazásával előállított módosított genetikai állományú élőlény**
  - transzgenikus: nem rokon fajtól származó genetikai információ
  - ciszgenikus: azonos vagy rokon (pl. vad) fajtól származó genetikai információ
- **A transzgenikus növények nélkülözhetetlenek a gének szerepének kutatásában**
- **Mikroorganizmusok**: az iparban elterjedt a használatuk - vakcinák, gyógyszerek, táplálékkiegészítők, vitaminok, enzimek, adalékanyagok, stb., pl. B2 és C vitamin, citromsav, lizozim,  $\alpha$ -amiláz, (keményítő  $\rightarrow$  cukor), kimozin (sajtgyártás), inzulin, növekedési hormon, véralvadási faktorok
- **Állatok**:
  - omega-3 disznó (omega-3 zsírsav termeltetése egy nematóda gén beültetésével, 2006)
  - ENVIROPIG - jobb foszforhasznosítás (Canada, 1999)
  - megváltozott összetételű ill. szerkezetű tejet adó kecske
  - növekedési hormon termeltetése halakban (lazac, ponty, stb.)

# GMO II.

---

- Növények:

- **Első generációs GMO:** termelőnek/fajtatulajdonosnak kedvező tulajdonság bevitele [herbicidrezisztencia (pl. glifozát), kártevő elleni rezisztencia (Bt toxin, vírusrezisztencia), ipari szempontból kedvező tulajdonságot hordozó növény] - szinte kizárólag ilyenek vannak köztermesztésben
- **Második generációs GMO:** előnyös táplálkozási vagy élettani tulajdonsággal bíró növények (fogyasztó számára kedvező tulajdonság, pl. Lys/Trp összetétel megváltoztatása, Golden Rice)
- **Harmadik generációs GMO:** hideg-, és szárazságtűrő fajták
- **Negyedik generációs GMO:** gyógyszer-, és enzimtermelő fajták

A kezdet - 1996, USA

Az első szabadföldi termesztésbe és kereskedelmi forgalomba kerülő genetikailag módosított növény -



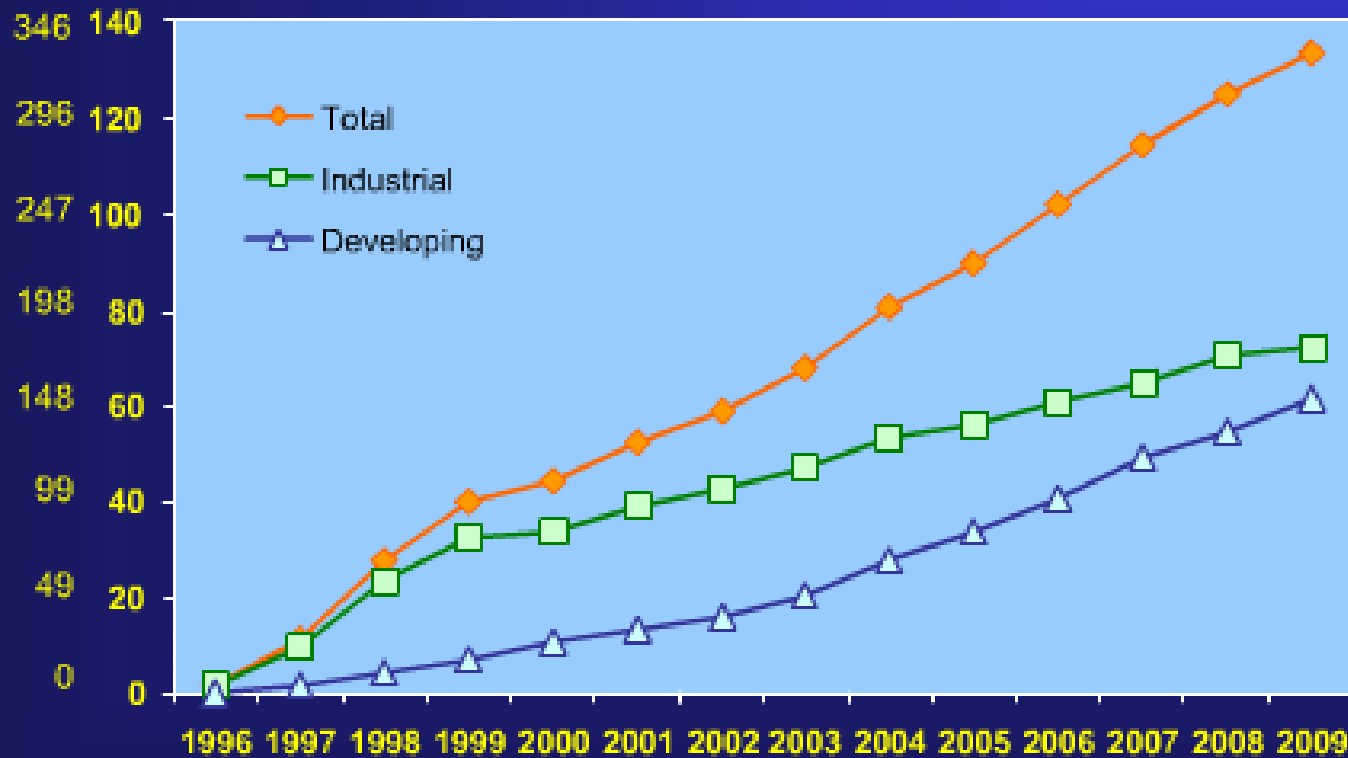
egy olyan paradicsom, amely a genetikai módosítás hatására tovább megőrizte frissességét, az érett termés lassabban puhult meg (sejtfal pektinjének lassított lebomlása).

# Genetikailag módosított növények termesztése napjainkban

## Industrial and Developing Countries (M Has, M Acres)



M Acres



134 millió hektár

Source: Clive James, 2010

Növekedés 2009-ben 7% = 9 millió hektár

# 2010 GM növények termesztése világszerte 29 országban történt 148 millió hektáron

Biotech Crop Countries and Mega-Countries\*, 2010



2007: 114,3 millió hektár  
 2008: 125 millió hektár  
 2009: 134 millió hektár  
 2010: 148 millió hektár

USA  
 Brazília  
 Argentína  
 Kanada  
 India  
 Kína

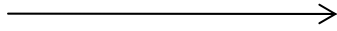
\* 17 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops.

# GM növények termesztése 2010

10%-os termőterület növekedés

17(15)

50 ezer hektár felett



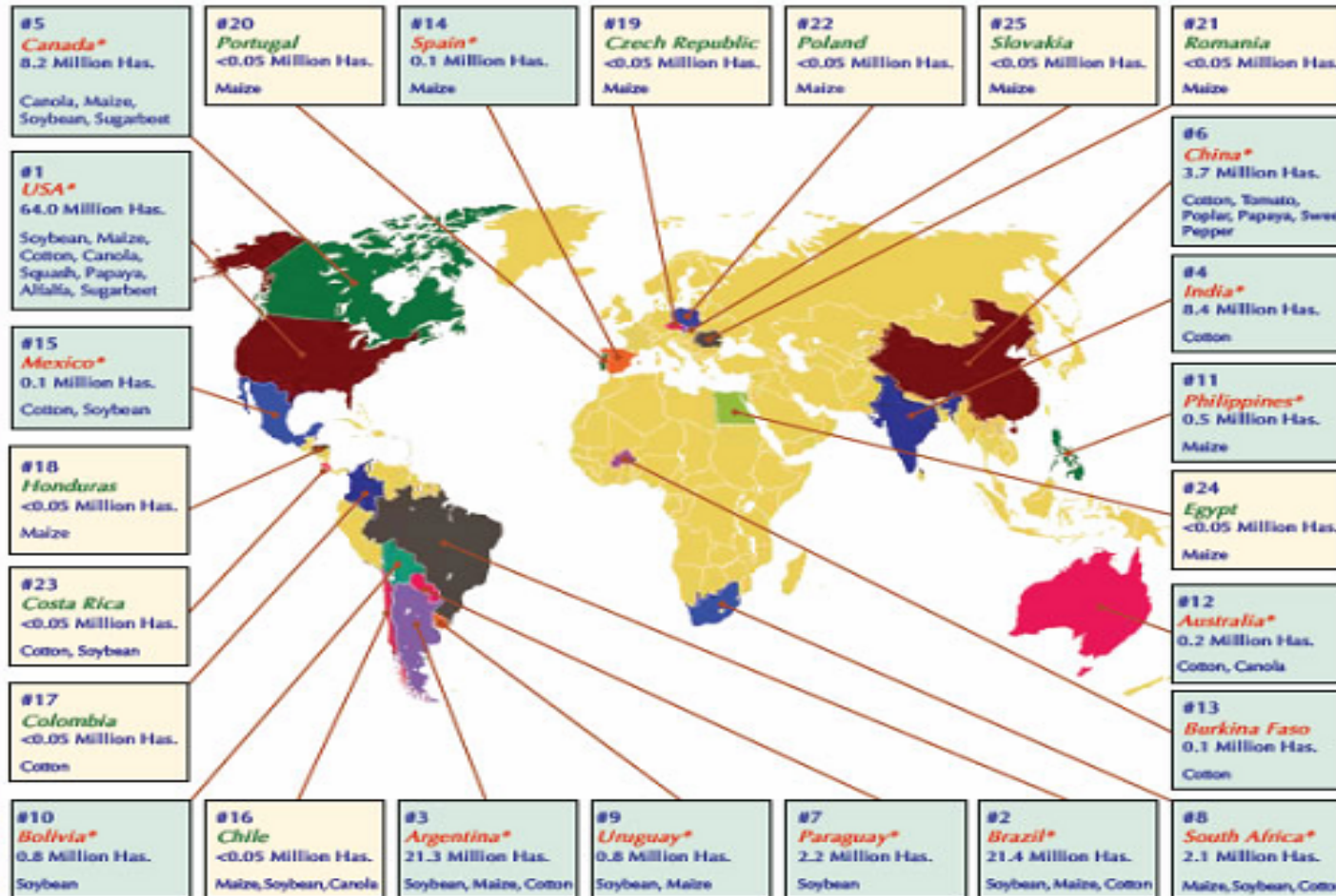
Rank	Country	Area (million hectares)	Biotech Crops
1	USA*	66.8	Maize, soybean, cotton, canola, sugarbeet, alfalfa, papaya, squash
2	Brazil*	25.4	Soybean, maize, cotton
3	Argentina*	22.9	Soybean, maize, cotton
4	India*	9.4	Cotton
5	Canada*	8.8	Canola, maize, soybean, sugarbeet
6	China*	3.5	Cotton, papaya, poplar, tomato, sweet pepper
7	Paraguay*	2.6	Soybean
8	Pakistan *	2.4	Cotton
9	South Africa*	2.2	Maize, soybean, cotton
10	Uruguay*	1.1	Soybean, maize
11	Bolivia*	0.9	Soybean
12	Australia*	0.7	Cotton, canola
13	Philippines*	0.5	Maize
14	Myanmar*	0.3	Cotton
15	Burkina Faso*	0.3	Cotton
16	Spain*	0.1	Maize
17	Mexico*	0.1	Cotton, soybean
18	Colombia	<0.1	Cotton
19	Chile	<0.1	Maize, soybean, canola
20	Honduras	<0.1	Maize
21	Portugal	<0.1	Maize
22	Czech Republic	<0.1	Maize, potato
23	Poland	<0.1	Maize
24	Egypt	<0.1	Maize
25	Slovakia	<0.1	Maize
26	Costa Rica	<0.1	Cotton, soybean
27	Romania	<0.1	Maize
28	Sweden	<0.1	Potato
29	Germany	<0.1	Potato
<b>Total</b>		<b>148.0</b>	

\* 17 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops

Source: Clive James, 2010.

# Európában GM növények termesztése 2009-ben 6 országban, 2010-ben 8 országban történt

## Biotech Crop Countries and Mega-Countries\*, 2009



\* 15 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops.

Source: Clive James, 2009.

2009 - 94750 hektáron

kukoricamoly rezisztens  
Mon810 GM kukorica

2010 - Amlflora burgonya  
Svédország,  
Németország  
Cseh köztársaság



Magyarországon  
köztermesztésben  
nincs GM növény



# A leggyakrabban termesztett GM növények gyomirtó és rovarrezisztens növényekek

Genetikailag módosított növény	GM vetésterület /millió hektár /	GM vetésterület az összes vetésterülethez viszonyítva
Szója	69,2	52%
Kukorica	41,7	31%
Gyapot	16,1	12%
Repce	6,4	5%

## Magyarország 2011

- köztermesztésben nem található GM növény - moratórium
- Magyarországon kísérleti céllal engedélyezett GMO kibocsátások adatbázisa

<http://biosafety.abc.hu>

# Jogszabályi háttér az Európai Unióban

A fogyasztónak joga van választani

ezért az EU törvényhozás szabályozta a *GMO*-k kereskedelmi forgalomba kerülését és jelölését

Európai Parlament és a Tanács

1829/2003 1830/2003 rendelete  
alapján

jelölési kötelezettség van minden olyan  
alapanyagra és termékre amelyben az  
EU-ban engedélyezett *GM* növényekre  
nézve a *GMO* tartalom

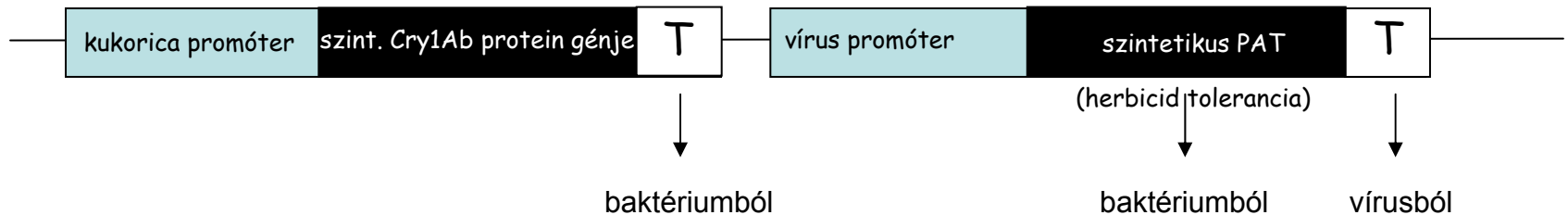
**0,9% felett van**

# GMO példák I.

- Példák:

1. MON810 jelű, rovarrezisztens génmódosított kukorica; *Bacillus thuringiensis* (Bt) talajbaktérium toxintermelő génjét építették be (kukoricamoly ellen; Mo-on ritka kártevő); USA - 1996 óta, világon 21, EU-ban 6 országban termesztik; a kivont toxint inszekticidként alkalmazzák (!!)

MON810 génkonstrukció (Heszky, Agrofórum 2008):

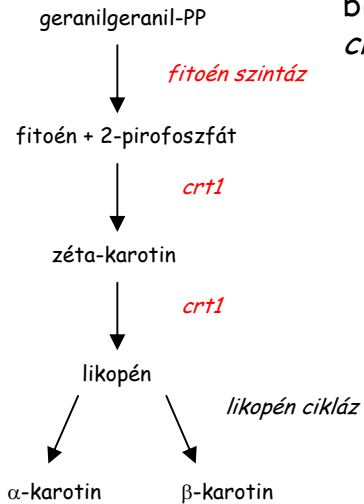


# GMO példák II.

## Példák:

2. **Golden Rice:** arany rizs - Ingo Potrykus (Swiss Federal Institute of Technology) és Peter Beyer (Univ. of Freiburg); Ye et al. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287 (5451): 303-305.

- A vitamin hiány vakságot és egyéb fejlődési rendellenességet okoz (egyoldalú táplálkozás)
- $\beta$ -karotint (A vitamin prekuzort) termelő rizs előállítása endospermiumban két bioszintézisben résztvevő gén transzformációjával: *psy* (phytoene synthase) nárciszból és *crt1* *Erwinia uredovara* baktériumból



- létrehozásakor nagy reményeket fűztek hozzá (nem profitszerzés a cél)
- Fülöp-szigeteken és Tajvanon szabadföldi termesztés során 4-5x több mint  $\beta$ -karotint termelt, mint üvegházban
- köztermesztése nagy ellenállásba ütközött (környezetvédelmi és antiglobalista aktivisták; változatosabb étrend?)

**Golden Rice 2 (2005)** - 23x több  $\beta$ -karotint termel mint az előző verzió (kukorica fitoén szintáz génnel)

**Bill és Melinda Gates (2005)** - támogatás a rizs további minőségi javítására (fehérje tartalom, E vitamin, vas, cink)

3. magasabb Ca tartalmú sárgarépa előállítása (2008) - 15 kg/napi fogyasztás lenne szükséges

# GMO példák III.

---

- További példák:
  4. szója - herbicidrezisztens fajták, allergén fehérjék csökkentése
  5. kukorica - Lys termelő, nagy vas, C-vitamin, folsavtartalmú fajták fejlesztése folyik
  6. gyapot - herbicid- és rovarrezisztens fajták
  7. repce - herbicidrezisztens fajták, nagy mennyiségű laurinsav termelés
  8. papaya - gyűrűfoltosodást okozó vírus (PRSV) rezisztens változat
  9. cukornád - rovarrezisztens és magasabb cukortartalmú (2. gen.) fajták
  10. cukorrépa - herbicidtoleráns fajták.
  11. lucerna - herbicidtoleráns fajták (glifozát)
  12. burgonya - ('Amflora' változat - BASF Plant Science) - majdnem tiszta amilopektint termel (amilóz tartalom minimális); csak az előállító biotechnológiai céggel szerződött partnerek számára elérhető, nincs közpiacon, az EU-ban ipari felhasználásra természetik 2010-től
  13. paradicsom - a puhulás nélkül érő Flavr Savr az első kereskedelmi célra termesztett génmódosított élelmiszer volt, forgalmazása nem termelt nyereséget, kivonták a piacról (1997). Azóta több zöldség és gyümölcsféle késleltetett érésű/ puhulás nélkül érő változatát is előállították, jelentőségüket a meghosszabbodott eltarthatósági idő adja.

# GMO - mezőgazdasági és társadalmi vonatkozások

---

- probléma: 2010 - 6,8 milliárd a világ népessége  
2050 - 9,1 milliárd
- cél: elegendő mennyiségű élelmiszer előállítása, terméshozamok növelése  
termőterület növelése  
hatékonyság növelése (öntözés kiterjesztése, műtrágyázás, vegyszeres védekezés, betakarítási veszteség és a fejlett világban az élelmiszerfogyasztás csökkentése - a nyugati világban a gabona 60%-át állatok etetésére használják, stb.) - ezek korlátozott lehetőségek (?)  
nem a nyugati világban kellene növelni a hatékonyságot
- GMO a megoldás? Forradalmasítja a mezőgazdasági termelést?
- Előnyök: ezekről más esett szó - jelenleg > 100 millió ha-on természetesen GM növényeket
- Hátrányok: génszökés/génáramlás problémája (repce 2010. aug.) - hímsteril fajták  
géntranszfer?  
antibiotikum-rezisztencia kialakulása/terjedése  
környezeti károk, ökológiai veszély (toxintermelő fajták)  
élelmiszerbiztonság, keveredés, allergének, (0,9% alatt nem kell jelölni)  
helyi termelők és multinacionális cégek érdeke ütközhet (mag- és vegyszerköltség)  
szabadalmi költségek - magyar fajta?
- Eredendő rossz? - nukleáris energia? Nem a technológia a probléma!
- Tudáshiány! kutatók - lehetséges veszélyek -> biztonsági rendszerek kifejlesztése  
a társadalom tájékozottsága és ismerete alacsony szintű

# Növényi genomprogramok weboldalai

---

<http://arabidopsis.org/>

<http://rice.genomics.org.cn/rice/index2.jsp>

<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>

[http://solgenomics.net/genomes/Solanum\\_lycopersicum/index.pl](http://solgenomics.net/genomes/Solanum_lycopersicum/index.pl)

[http://www.potatogenome.net/index.php/Main\\_Page](http://www.potatogenome.net/index.php/Main_Page)

<http://maizesequence.org>

<http://www.medicago.org/genome/>

<http://www.brassica.info/resource/sequencing.php>

<http://www.wheatgenome.org/>

[http://genome.jgi-psf.org/Poptr1\\_1/Poptr1\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

[www.jgi.doe.gov/](http://www.jgi.doe.gov/)

<http://www.phytozome.net/>

[www.sanger.ac.uk/](http://www.sanger.ac.uk/)

[www.expasy.ch/](http://www.expasy.ch/)

[www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/)

[www.kazusa.or.jp/](http://www.kazusa.or.jp/)