

EFOP-3.4.3-16-2016-00014

A növényi stresszválasz genetikája

2020.

AP4_TTIK KÁRPÁT-MEDENCEI OKTATÁSI TÉR KIALAKÍTÁSA
ÉRDEKÉBEN TETT TEVÉKENYSÉGEK A TTIK-N
BBTE OKTATÁSI EGYÜTTMŰKÖDÉS

Dr. Szabados László
Tudományos tanácsadó
MTA-SZBK, Szeged

SZÉCHENYI  2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

A növények fejlődését befolyásoló extrém környezeti hatások

Szárazság

Szikesedés

Lepidium crassifolium, sziki zsázsa

Hideg

Hőség

Stressz: szárazság, hideg, meleg, szikes talaj, és ezek kombinációja

A szárazság és magas só hatása az Arabidopsis növényekre



Kontrol
növények

Só stressz

Szárauzság

Ion
toxicitás

Ozmotikus
stressz

Oxidatív
stressz

Negative hatások

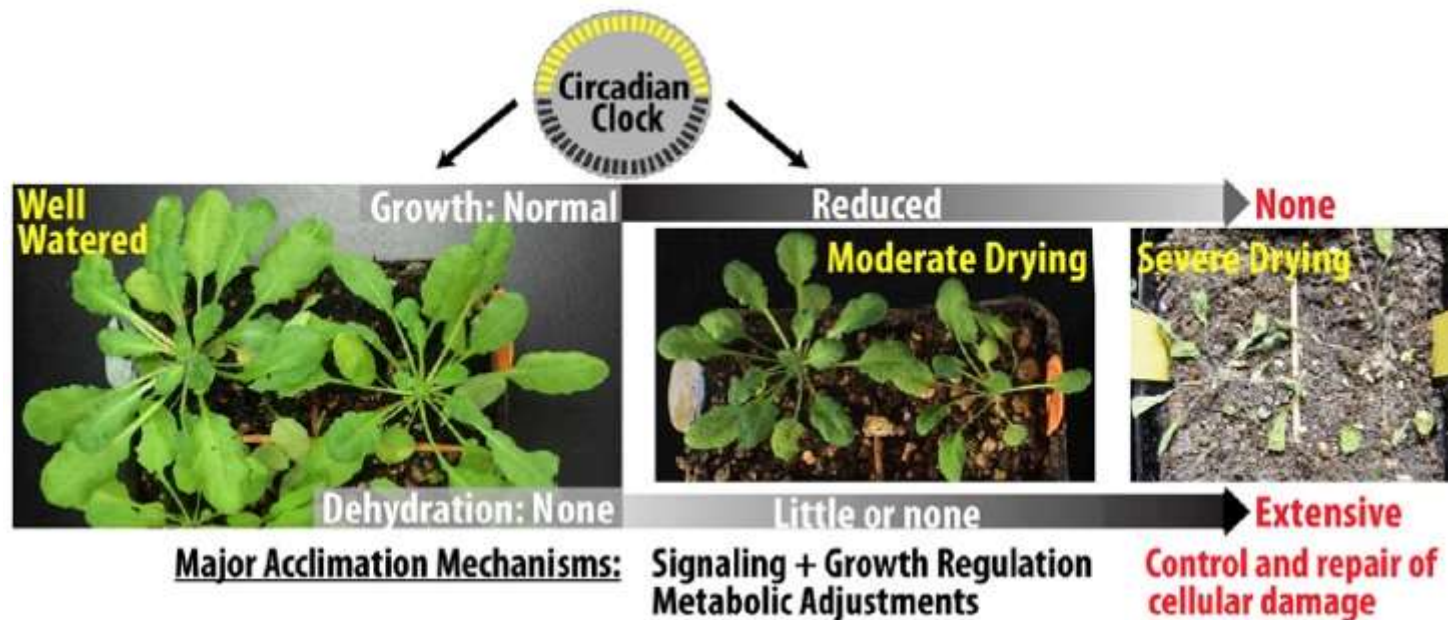
- Növekedés
- Sejtosztódás
- Fotoszintézis
- Párologatás
- Reaktív oxigén fajták
- Sejthalál

Pozitív hatások

- Védekezés beindítása
- Sztóma záródás
- Gén aktiváció
- Ozmotikus kiegyenlítés
- Reaktív oxigének semlegesítése



A szárazság stressz fokozatai és a növények válasza

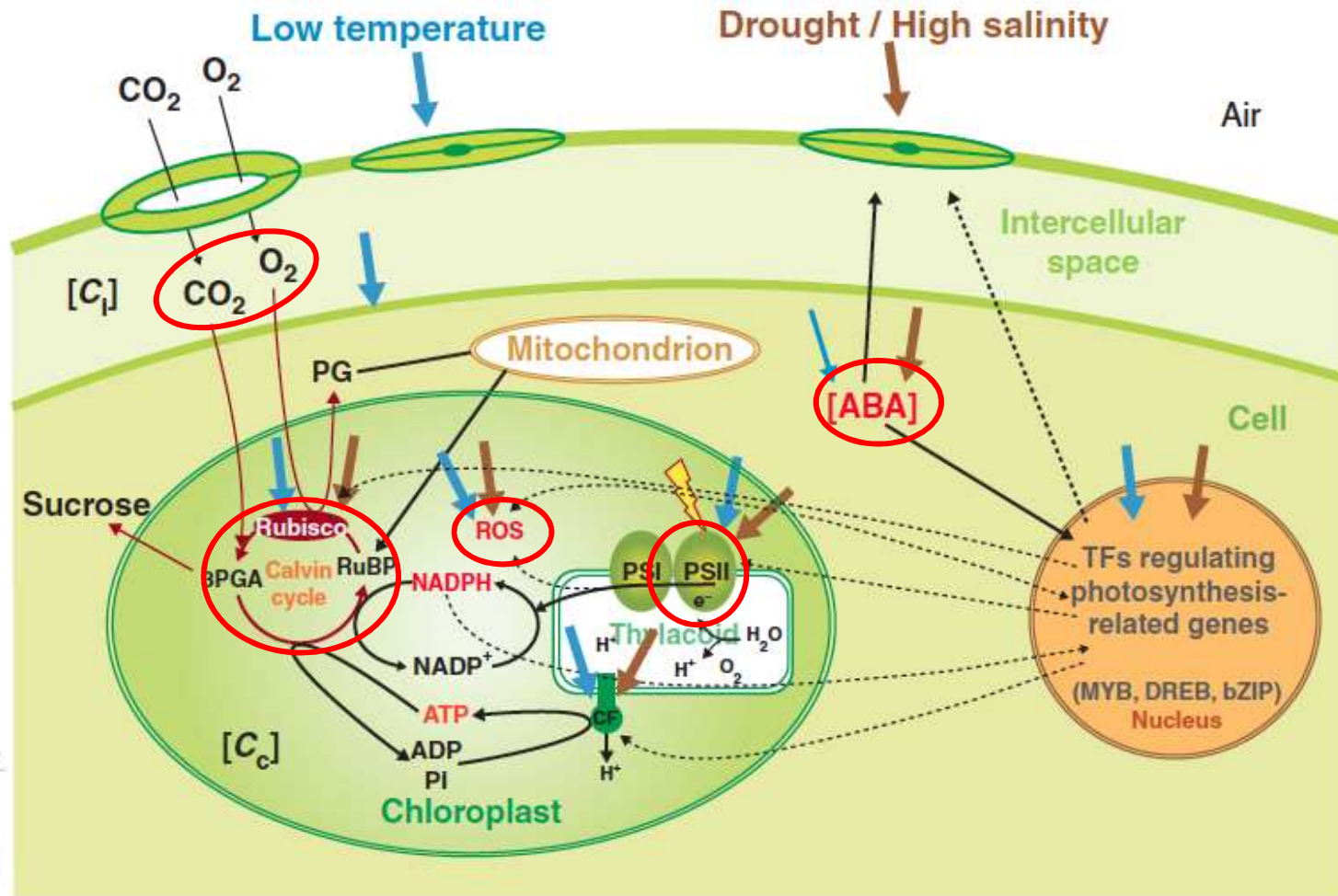


Optimális körülmények:
 Normál növekedés

Kismértékű szárazság:
 alkalmazkodás

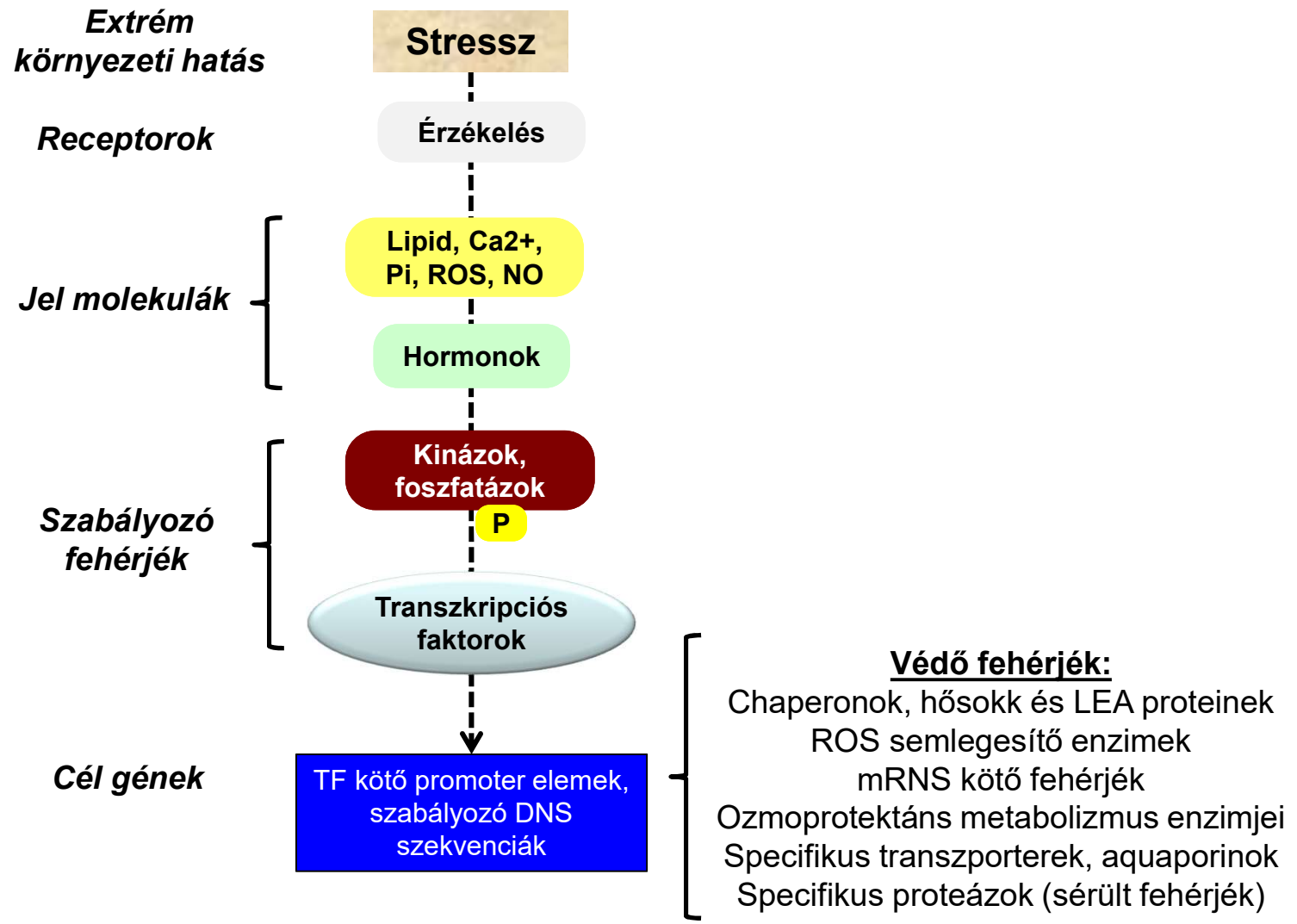
Súlyos szárazság:
 Sejt károsodás

A szárazság, só és hideg hatása a fotoszintézisre





Stressz jelátvitel vázlata a növényi sejtekben



Arabidopsis thaliana (lúdfű), a növénybiológia modellje

Felfedező: Johannes Thal (XVI. században a Harz hegységben, Németország)

Rendszertani besorolás: keresztesvirágú növény, a Brassicaceae családba tartozik

Magyar neve: lúdfű.

Első kutatások:

A. Braun (1873) az első Arabidopsis mutáns

F. Laibach (1907) kromoszóma szám meghatározása
(1943) potenciális model növény

E. Rheinholz (1947) az első indukált mutáns gyűjtemény

Rédei György (1950-70 évek) Arabidopsis genetika alapjai

Az Arabidopsis kutatás úttörő kutatói



Friedrich Laibach



Gerhard Röbbelen



Rédei György



Arabidopsis thaliana (lúdfű) fontosabb tulajdonságai

Tulajdonságok:

- Család: Brassicaceae.
- Gyors életciklus: 2-3 hónap.
- Könnyű szaporítás, sok mag.
- Hatékony transzformációs módszerek (Agrobacterium).
- 5, apró kromoszóma.
- Sok mutáns, nagy, hozzáférhető mutánsgyűjtemények.
- Legkisebb ismert növényi genom méret (125 Mb).
- Nagyfelbontású genetikai és fizikai térkép.
- Ismert genomikus DNS szekvencia
(az első megszekvenált növényi genom (2000)).
- Legtöbb alapkutató az Arabidopsis-on végzik
(sok egyetemi, ipari kutató intézet).
- PubMed: 64 ezer közlemény (Drosophila: 50 ezer).



Az Arabidopsis vad és termesztett rokonai

Halophytes



Arabidopsis thaliana

Eutrema salsugineum

Halophytes



Lepidium crassifolium

High altitudes



Arabidopsis lyrata

Crop plants



cauliflower



cabbage



Oilseed rape



Az Arabidopsis genom szekvenciája: 2000 december 14.

articles

Analysis flowering

The Arabidopsis Genome Initiative

* Authorship of this paper should

The flowering plant *Arabidopsis thaliana* is a model organism for genetic and molecular biology. Here we report the analysis of the 125-megabase genome of *A. thaliana*, followed by subsequent gene identification and transfer from a cyanobacterial ancestor to eukaryotes. *Arabidopsis thaliana* has a complete genome sequence and a large number of common proteins have been identified in all eukaryotes, identifying a wide range of plant-specific genes for crop improvement.

Genom méret:
125 MB / 115,5 MB ismert

Gének száma: 25.489
(komputer analízis, 2000)
valószínűleg: 27-28.000

Átlagos gén méret: 2000 bp

Átlagos gén gyakoriság: 1 gén / 4800 bp

Nature 408:796 – 815, 2000.

... sequence of the
thaliana

... paper

... determining their functions. 115.4 megabases of the whole-genome duplication, some enriched by lateral gene transfer. Coding proteins from 11,000 sequenced multicellular eukaryotes, indicating that the sets of conserved genes are similar in all eukaryotes. This is the first systematic way to identify

Az első ismert növényi genom szekvencia !

A növényi gének felfedezése és jellemzése

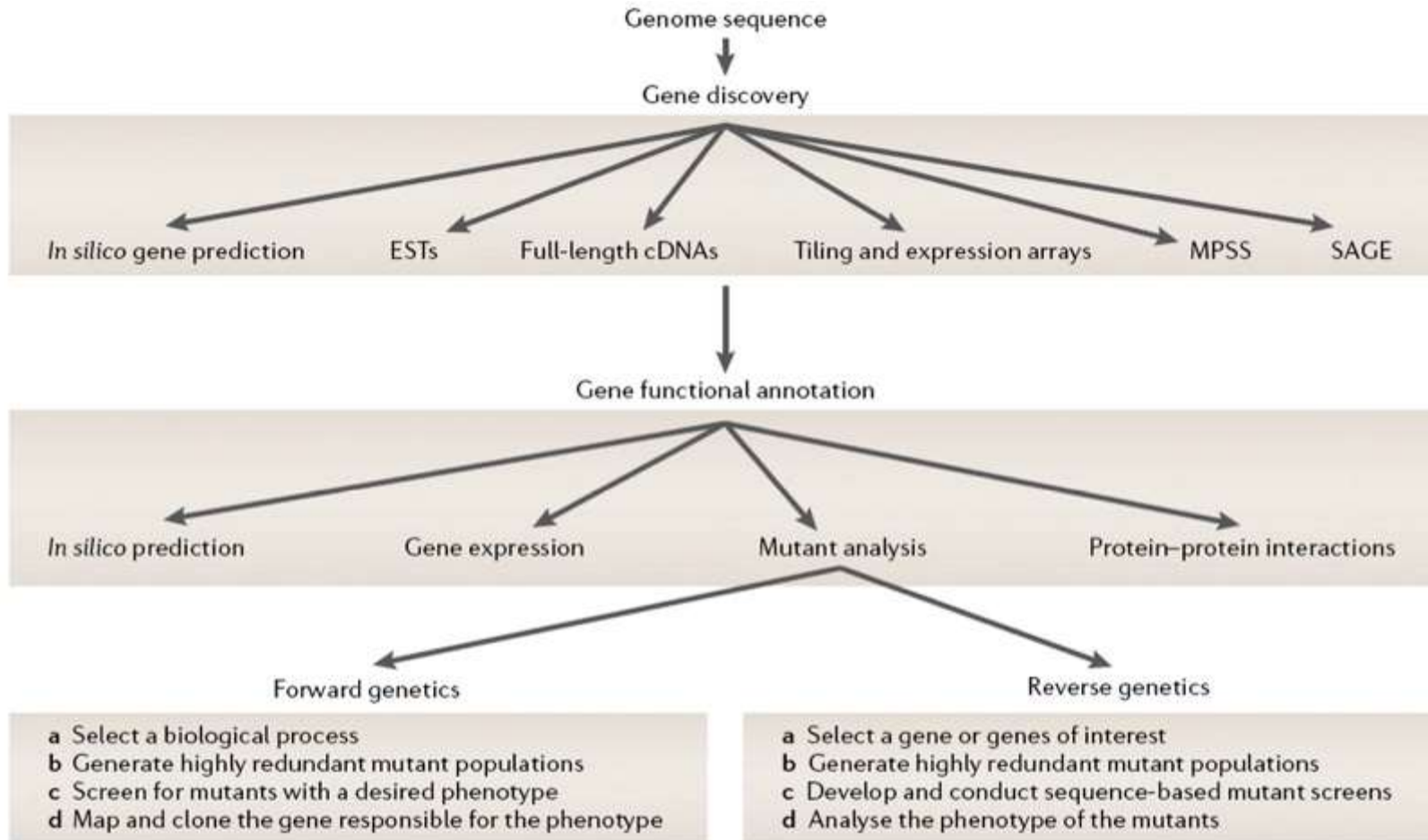
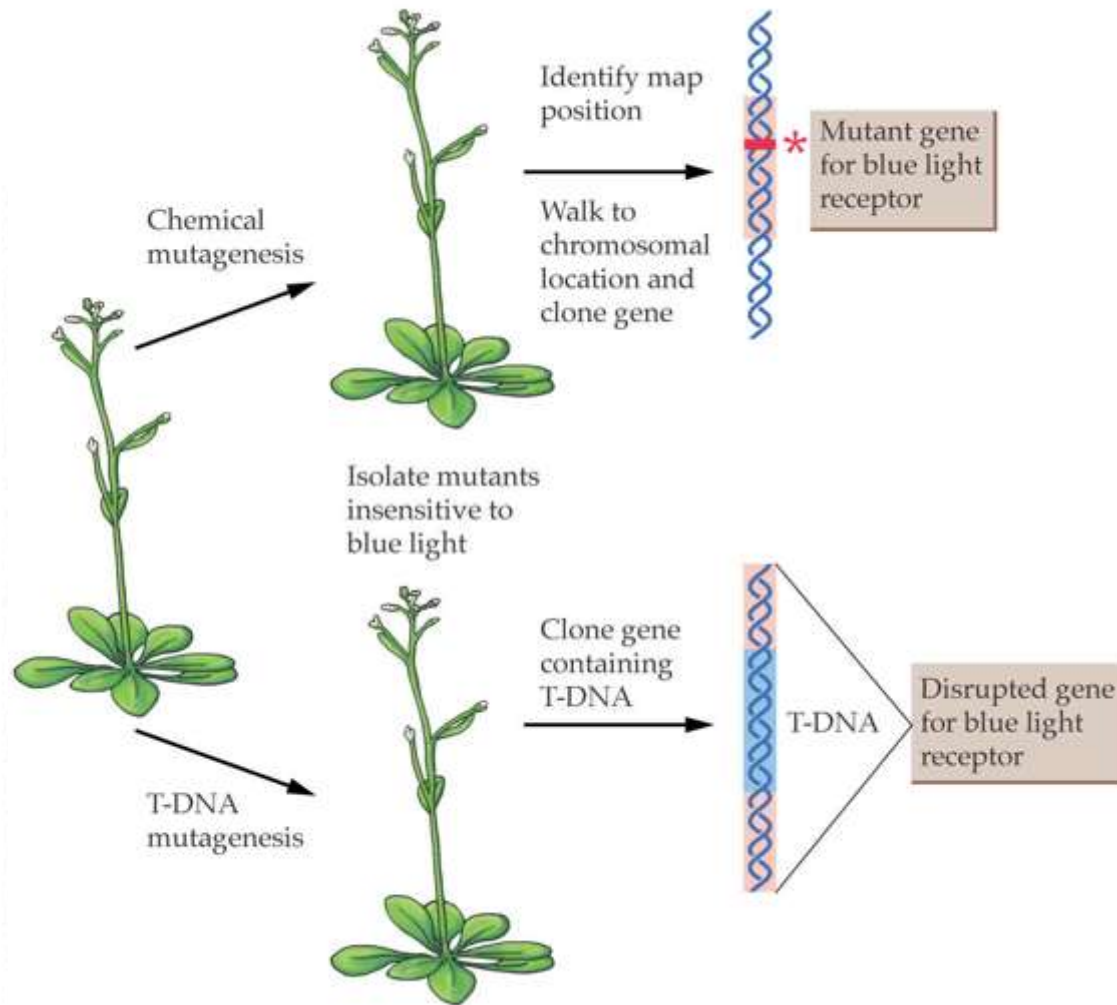


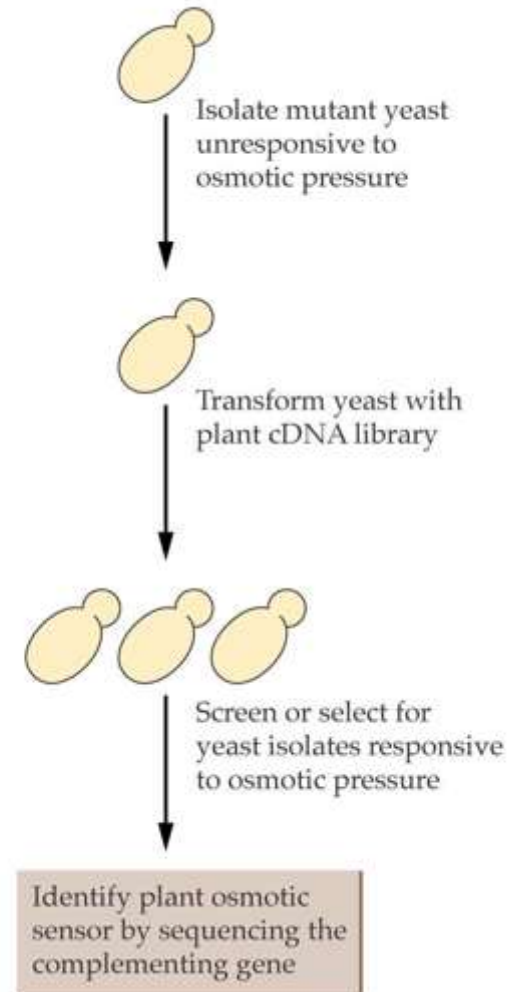
Figure 1 | **From genome sequence to gene function.** Steps and experimental approaches that are used in the functional annotation of the genome. MPSS, massively parallel signature sequencing; SAGE, serial analysis of gene expression.

Kémiai, inszerciós mutagenézis, genetikai komplementáció

(A) Chemical mutagenesis vs. T-DNA mutagenesis

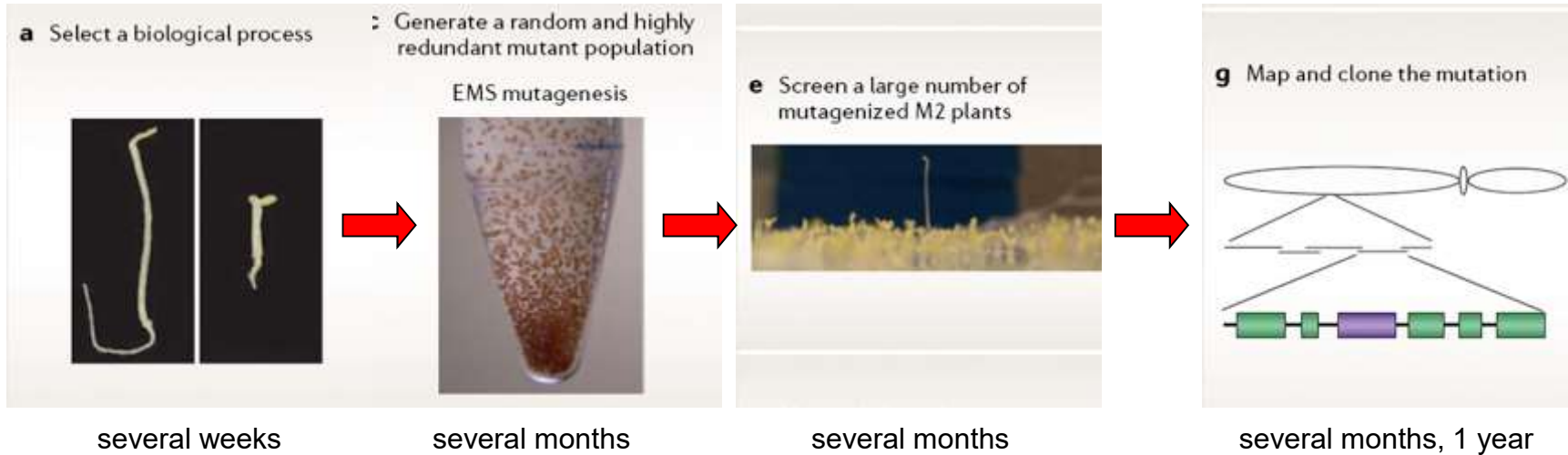


(B) Complementation of mutant yeast

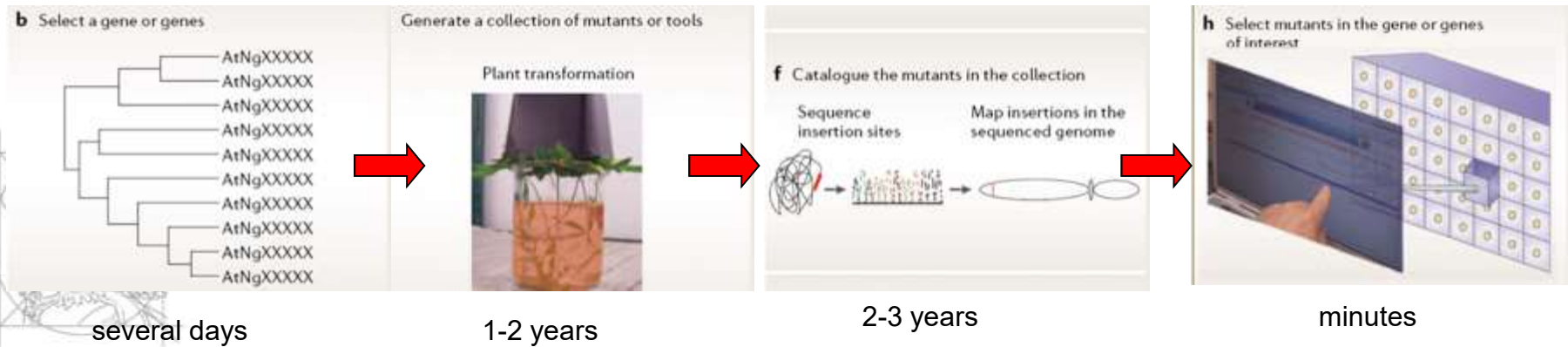


Direkt és fordított (reverz) genetikai stratégiák

Forward genetics



Reverse genetics



Arabidopsis fejlődési mutánsok.

Embryo lethals

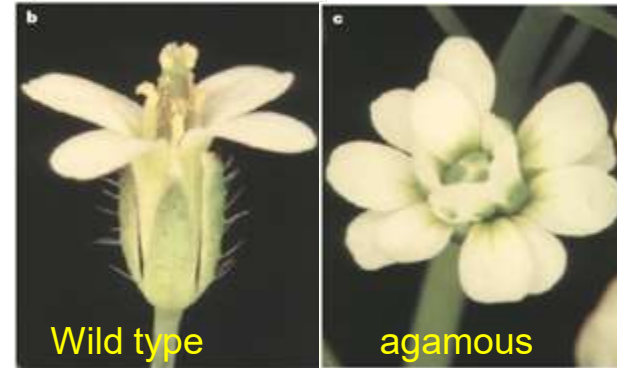
Wild type silique



Silique with segregating aborting embryos



Flower



Wild type

agamous

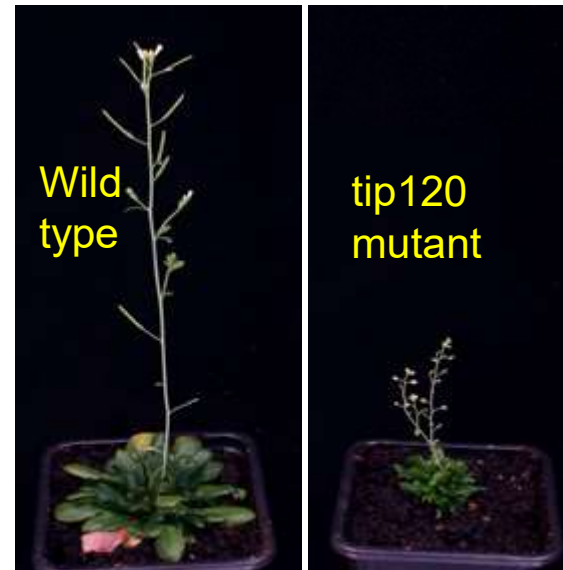
Seedling lethal



Hormone:



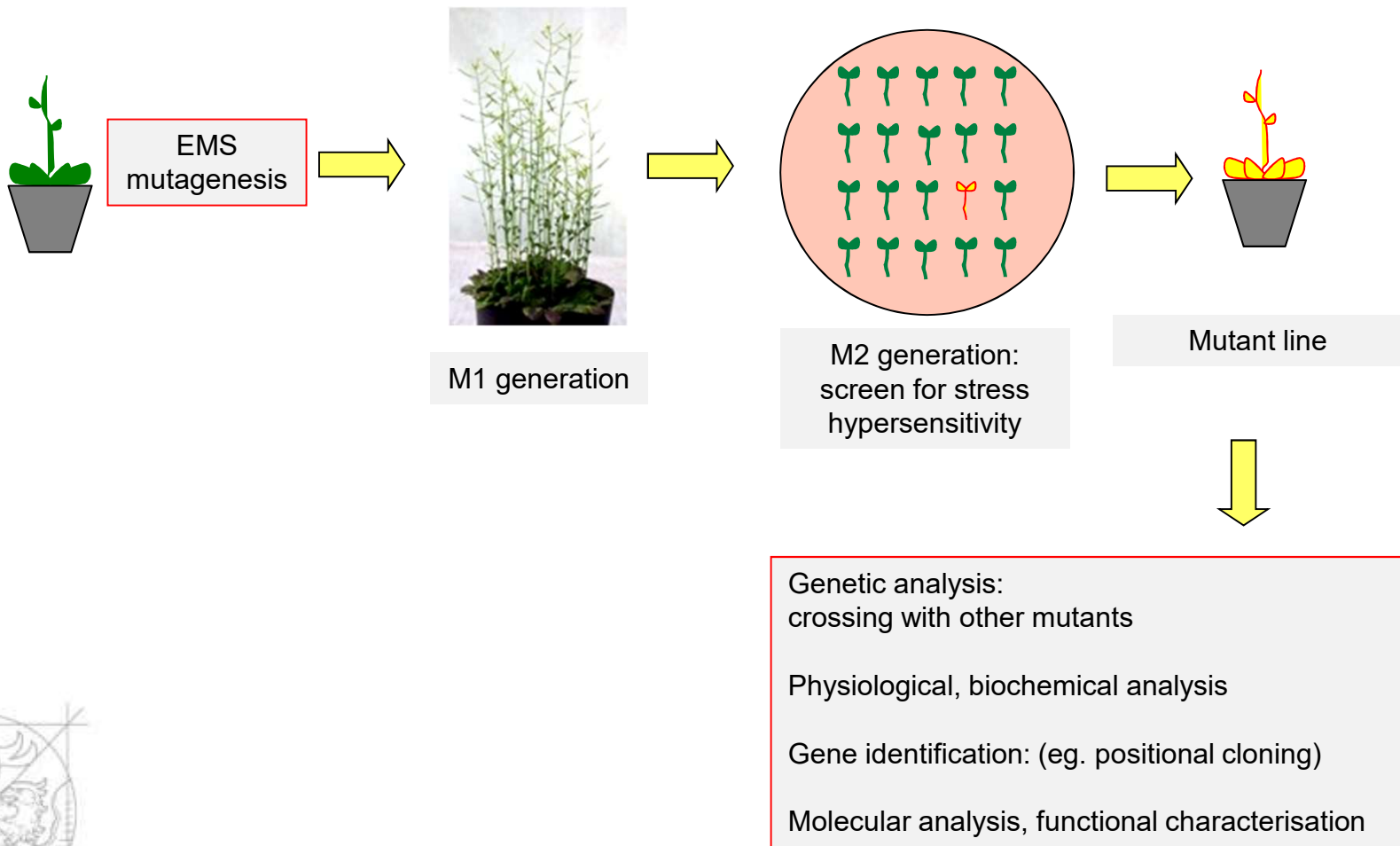
Dwarf



Wild type

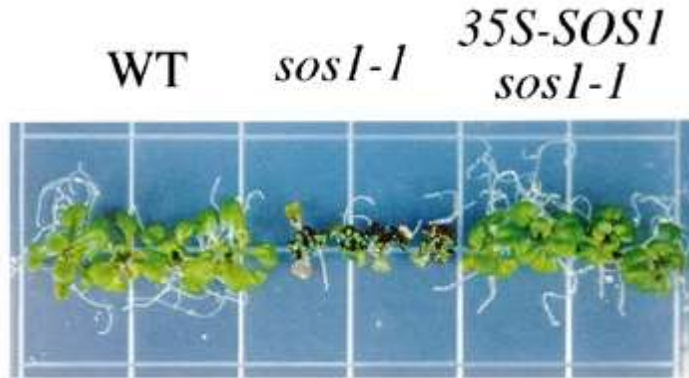
tip120 mutant

A stressz gének azonosítása 1: hyperszenzitív mutánsok



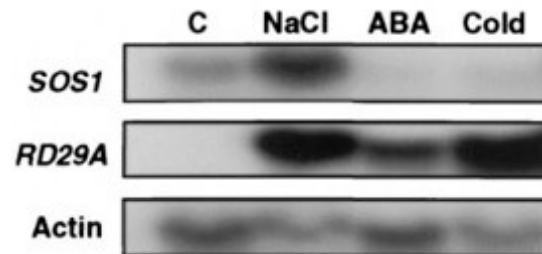
A só toleranciát szabályozó SOS1 gén: Na⁺/H⁺ antiporter

The *sos1* mutant is hypersensitive to NaCl

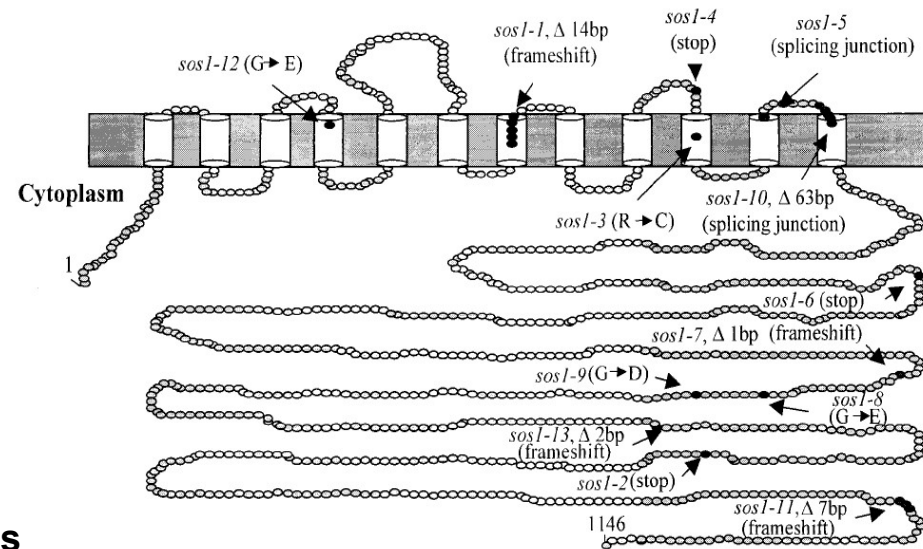


Salt sensitivity of wild type Arabidopsis, the *sos1* mutant, and the 35S-SOS1 complemented mutant.

Expression of SOS1 in Arabidopsis



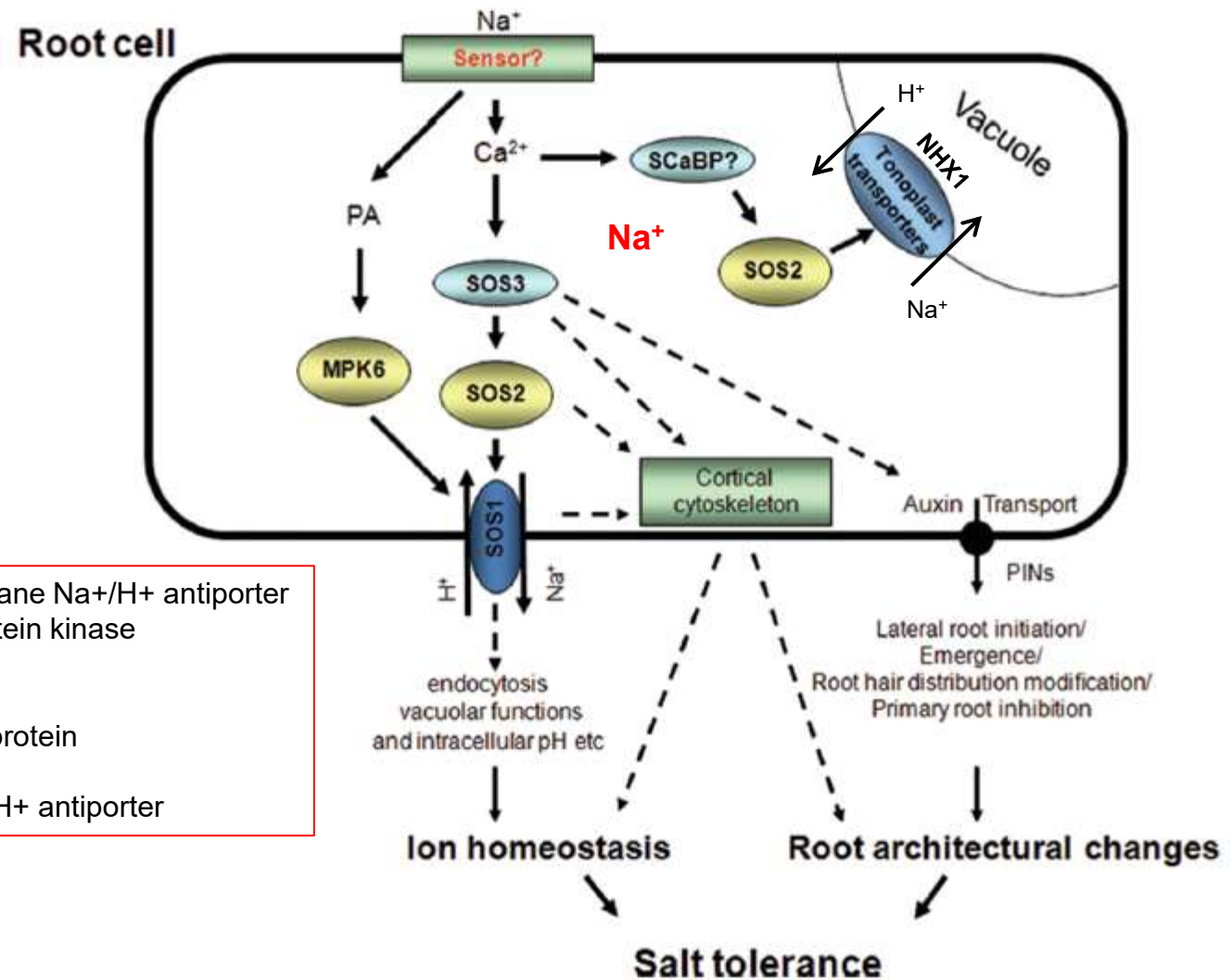
Positions of mutations on SOS1 protein



SOS1: plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter
Mediates NaCl exclusion through plasmalemma

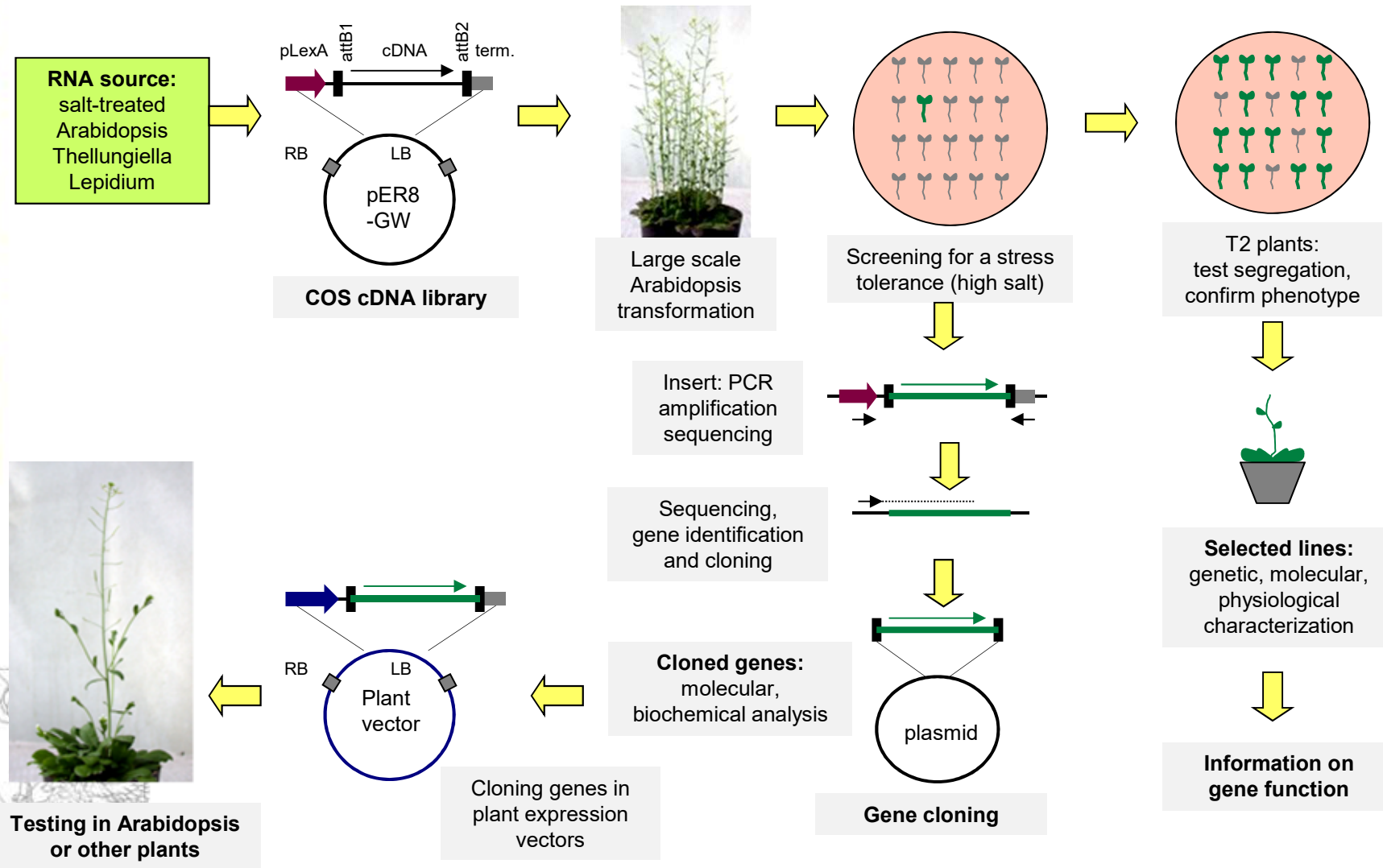
SOS1 is controlled by SOS2/SOS3 signals.

A SOS szabályozás és a só tolerancia kapcsolata



SOS1: plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter
 SOS2: SnRK-type protein kinase
 SOS3: calcium sensor
 MPK6: MAP kinase 6
 SCaBP: Ca²⁺ binding protein
 PIN: auxin transporter
 NHX1: tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter

Gene identification with the Conditional Overexpressing System (COS)



Só tolerancia gének azonosítása a COS cDNS transzformációs rendszer segítségével

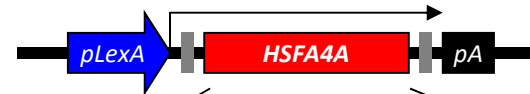
Screening for plant survival on
high salt medium



Gene identification
Gene cloning



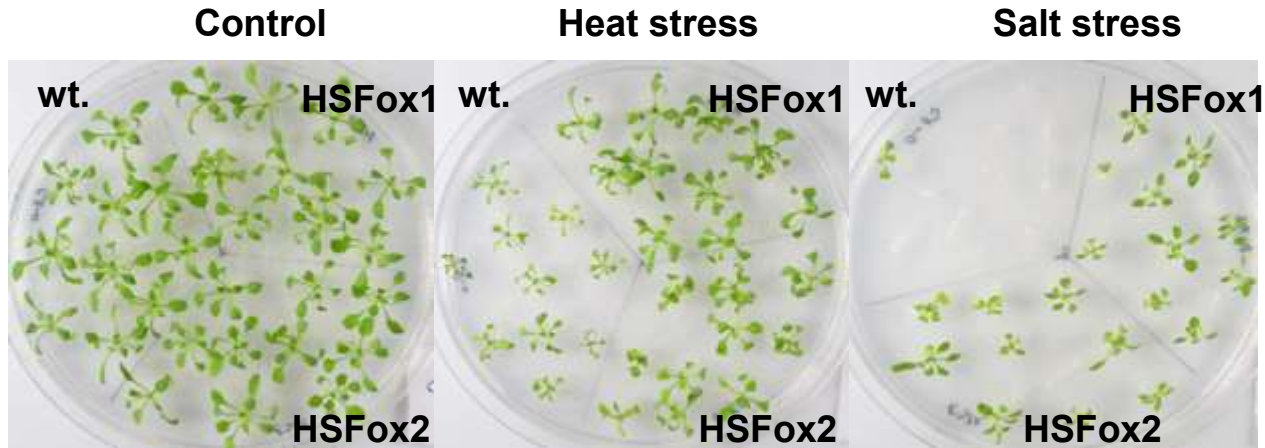
Full length cDNA of HSFA4A



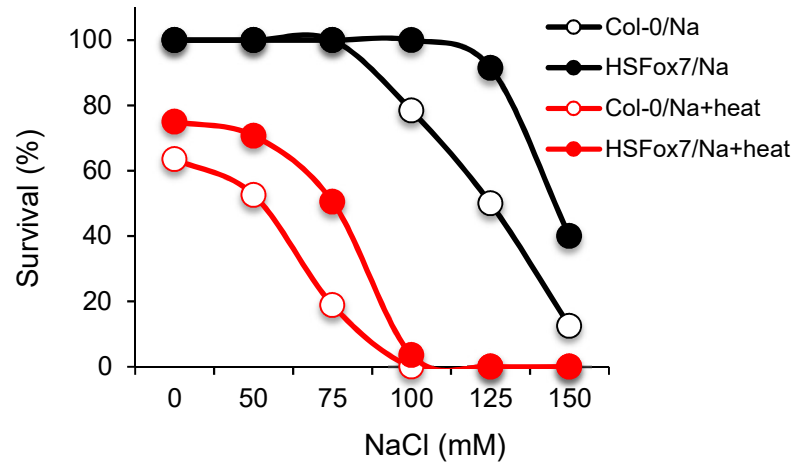
Heat shock factor: HSFA4A



A heat shock factor A4A (HSFA4A) túlermelése javítja a só és hő toleranciát

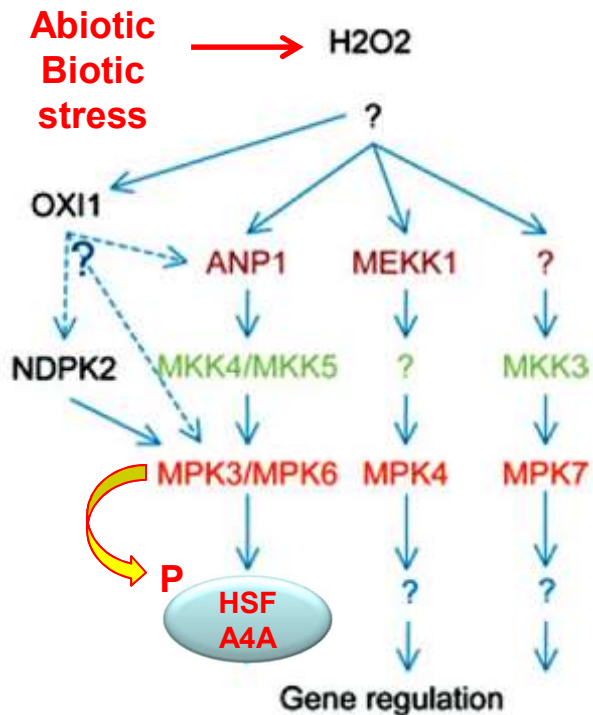


Survival in salt, heat and combined stresses



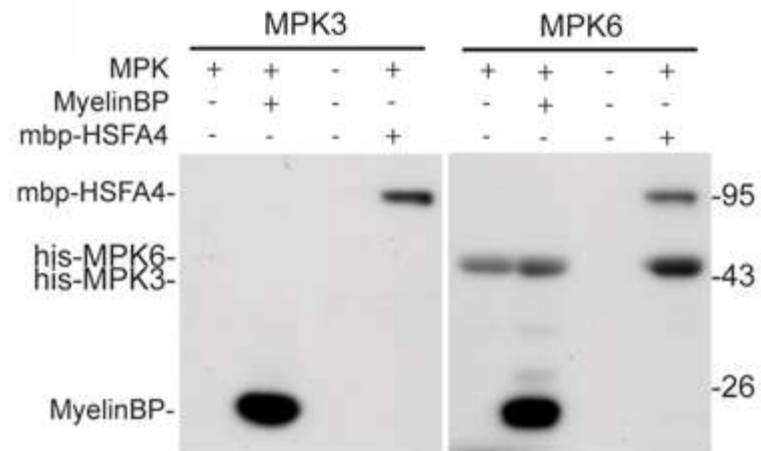
A MAP kinázok (MPK3, MPK6) foszforilálják és aktiválják a HSFA4A faktor

Peroxide-induced MAPK signalling

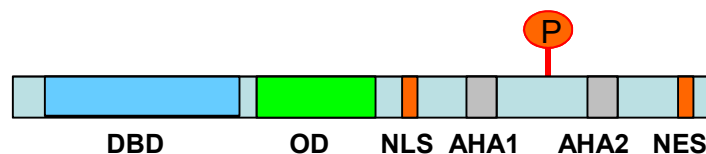


Activation of target genes:
 Transcription factors: ZAT12, WRKY30
 Defense genes: HSP, APX, ROS detox.

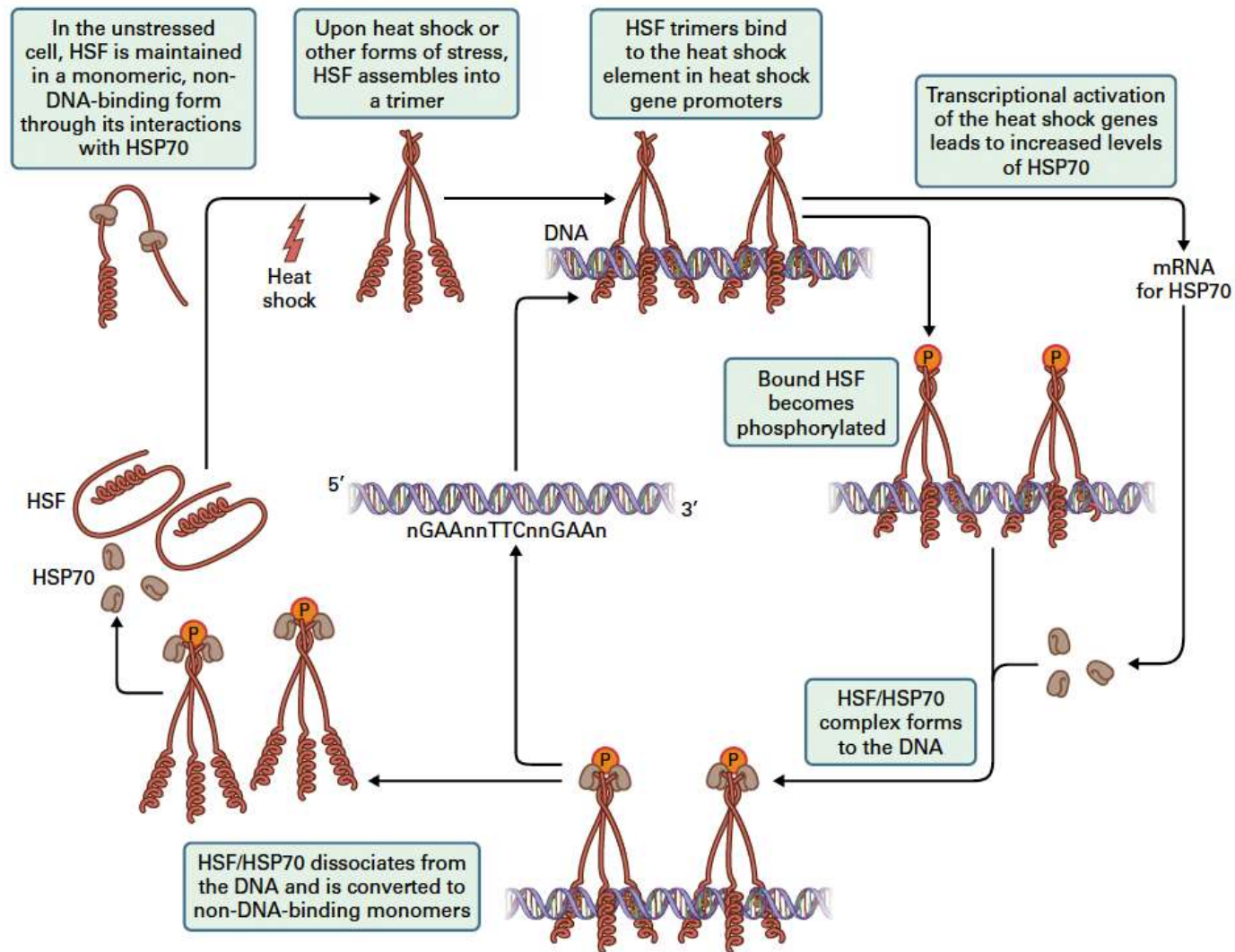
HSFA4A phosphorylation by MPK3/6



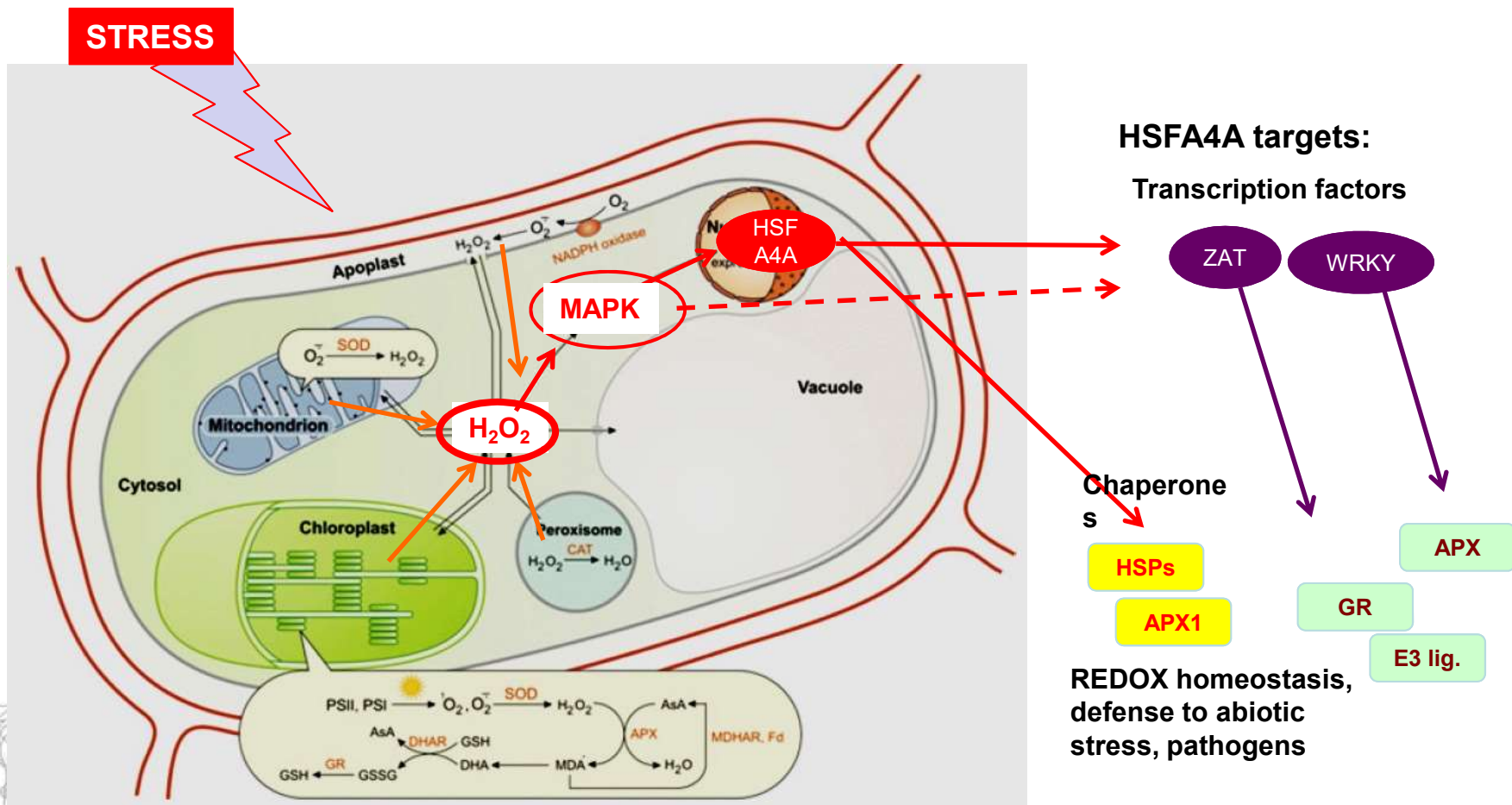
HSFA4A phosphorylation site: Ser309



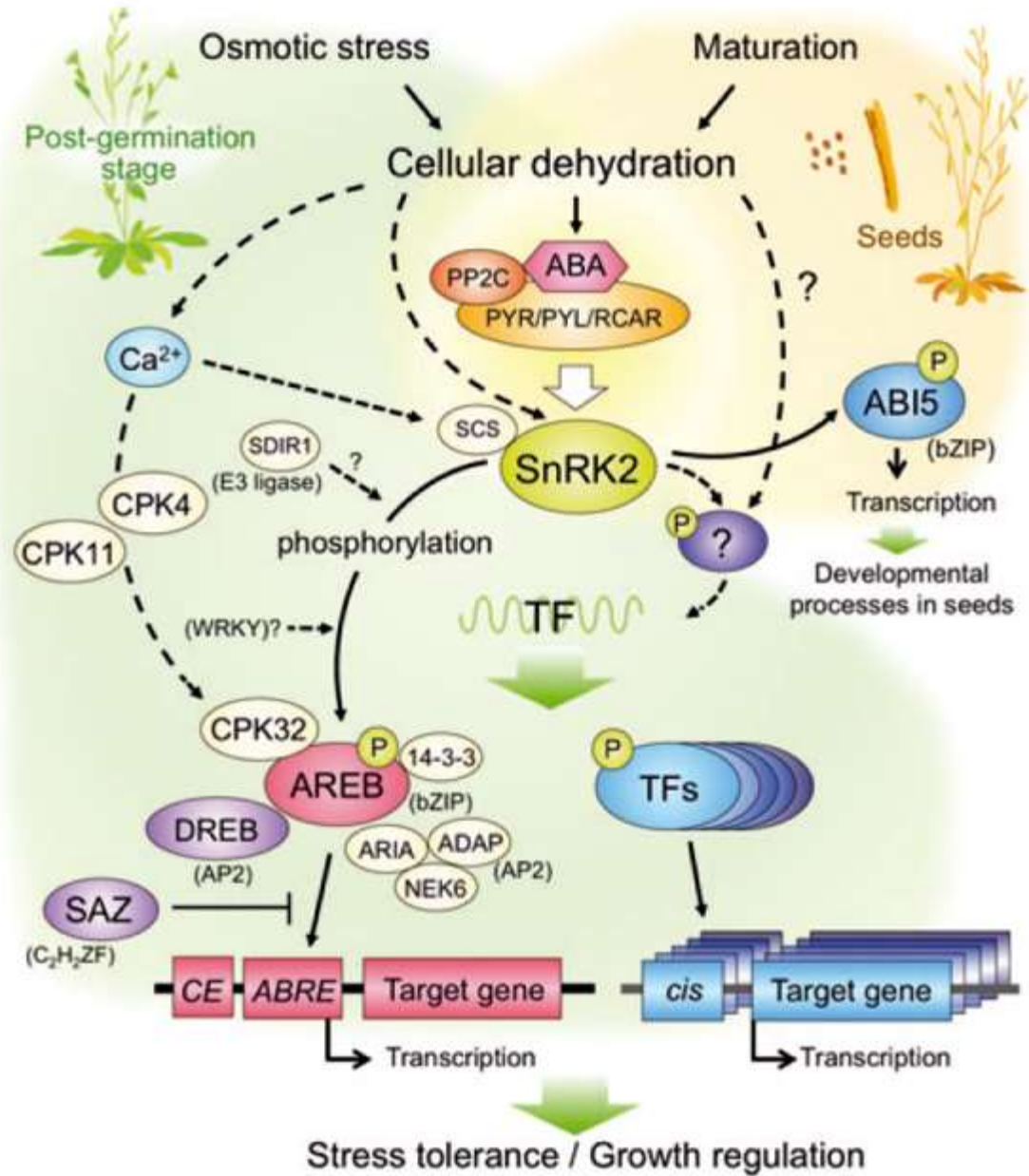
Gén aktiváció a hőszokk faktorokkal



A ROS jelátvitel, a MAP kinázok és a hősokk faktorok kapcsolata



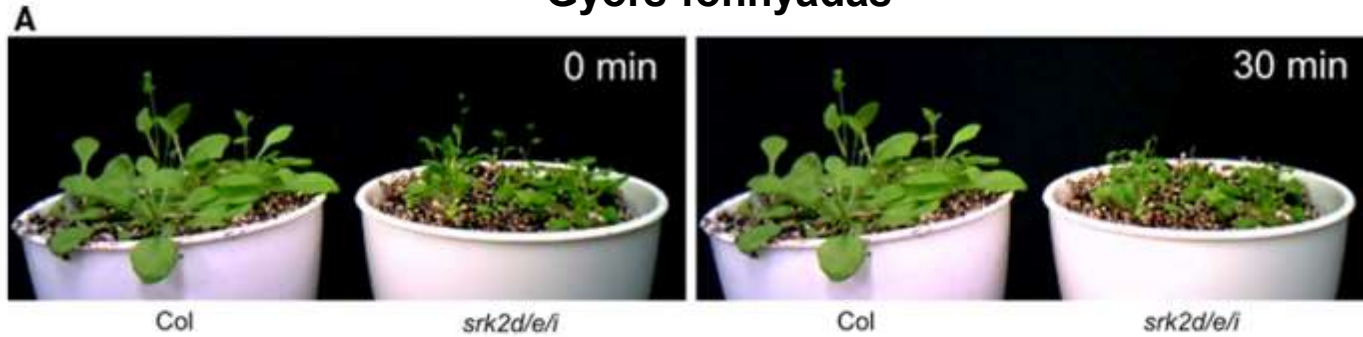
Az abszcizinsav (ABA) által szabályozott folyamatok



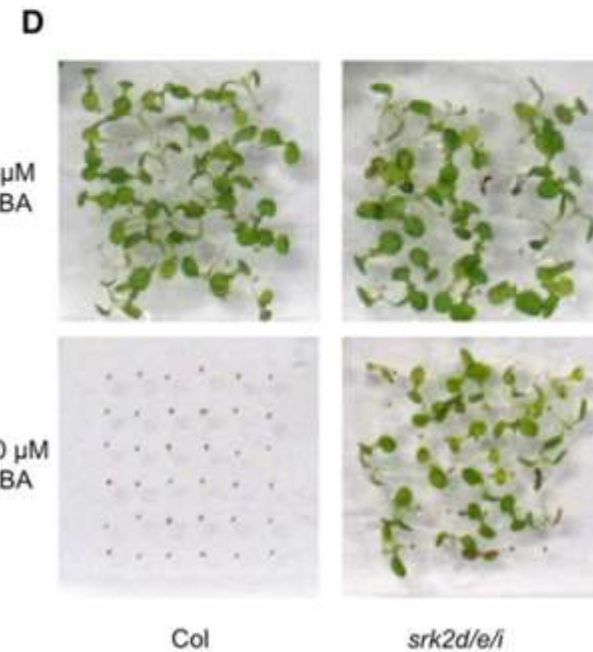
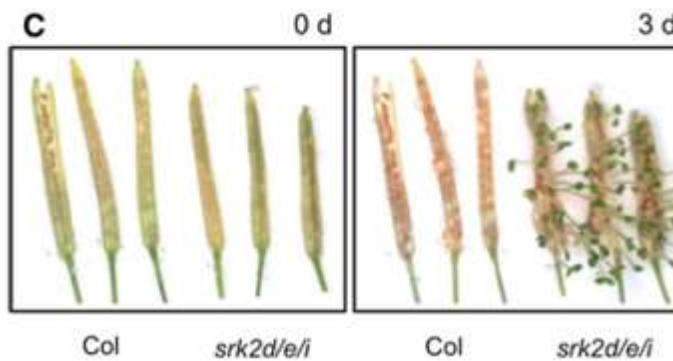


Az ABA érzéketlen mutánsok fenotípusa

Gyors fonnyadás

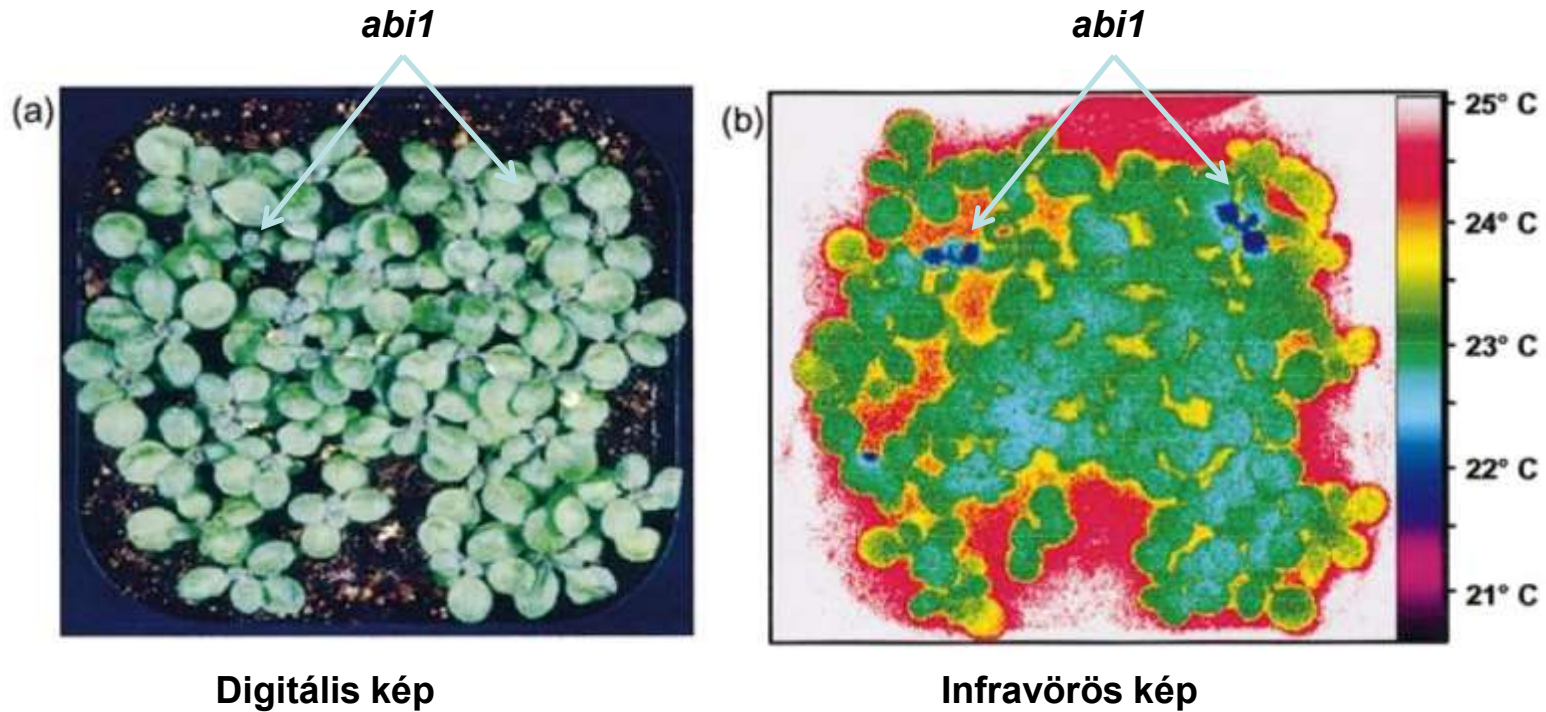


Korai csírázás



Csírázás ABA jelenlétében

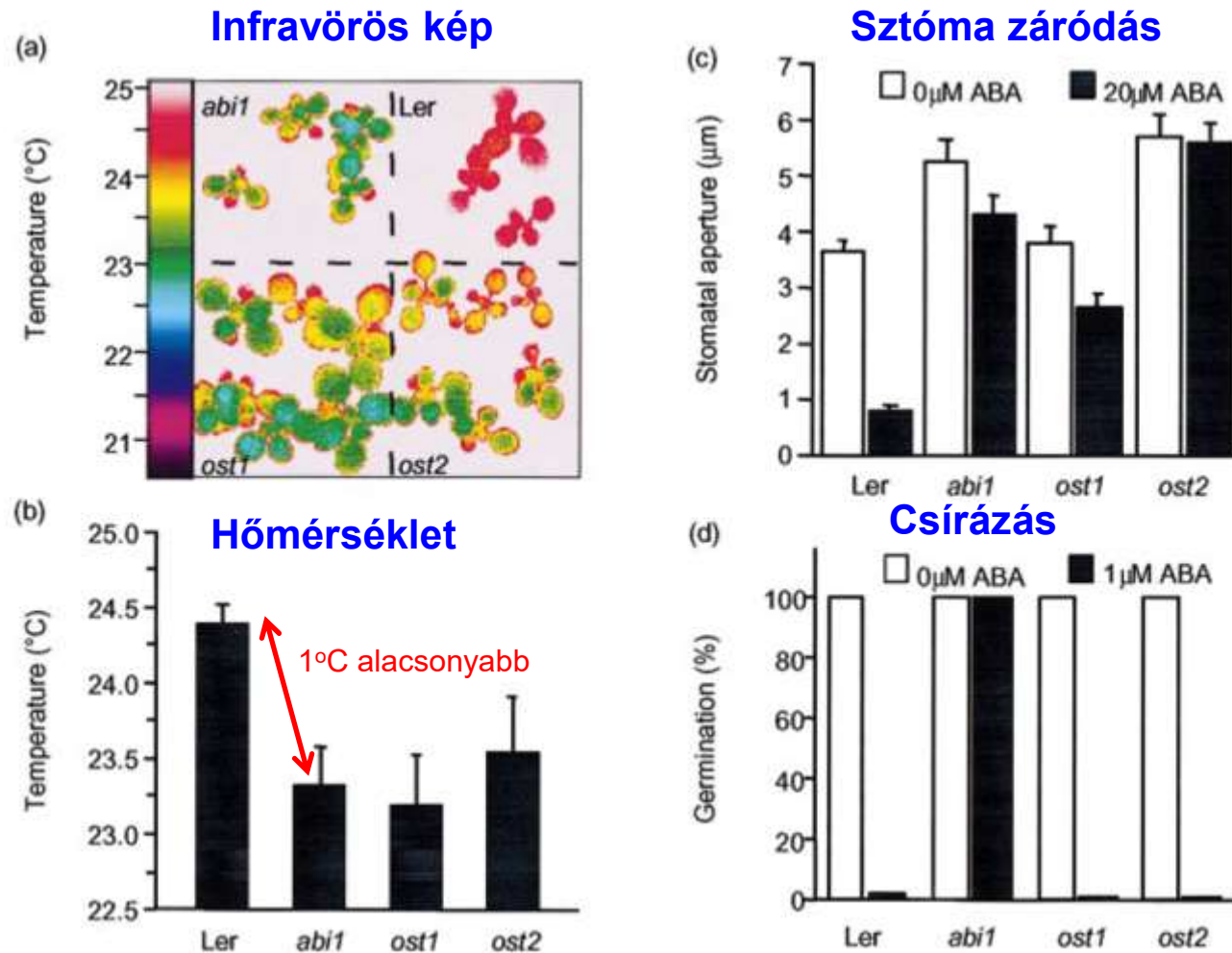
Az ABA mutánsok izolálása hőmérséklet különbségek alapján (infravörös képelemzés).



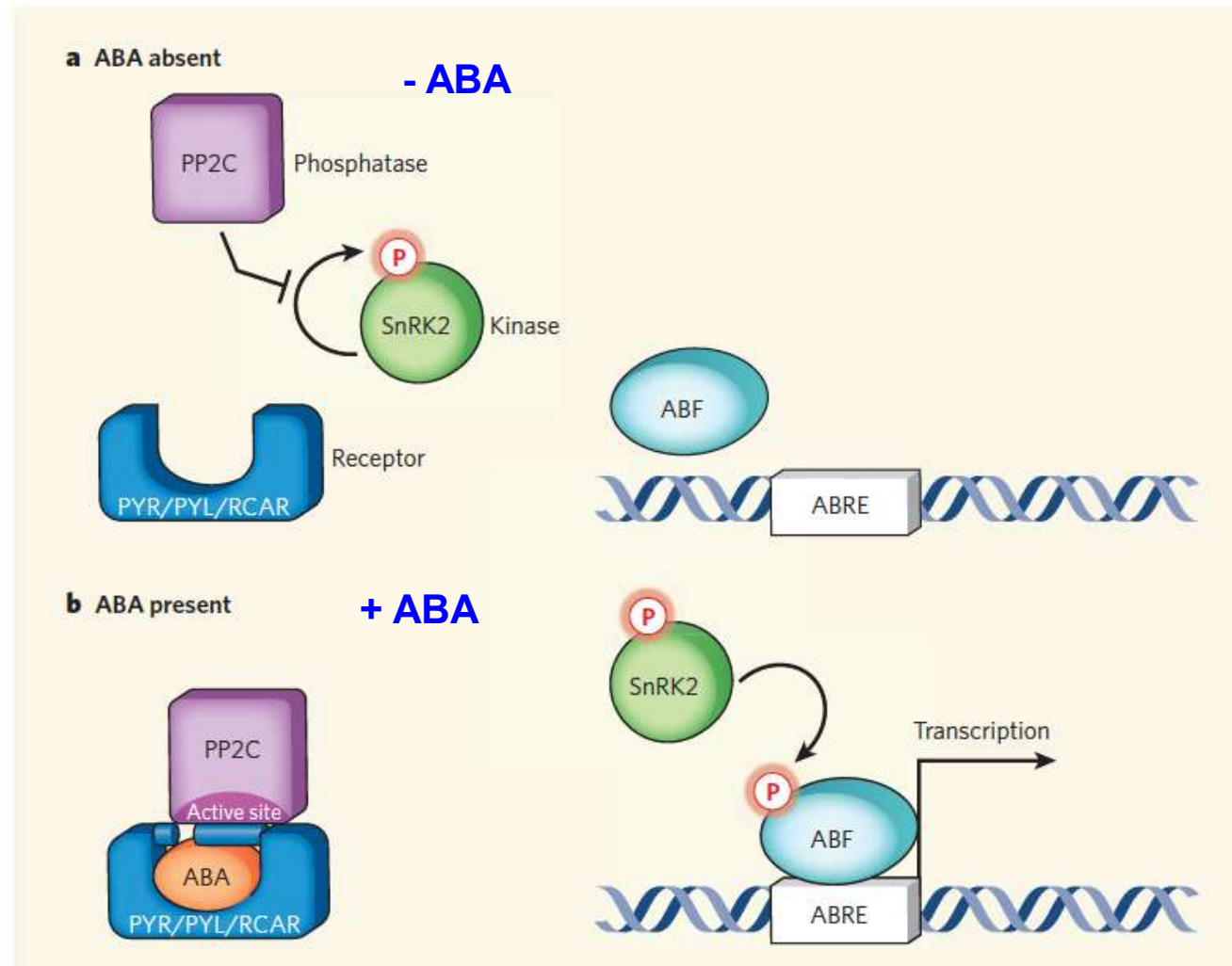
Az ABA érzéketlen *abi1* mutáns:
a nyitott sztómák miatt jobban párologtat,
emiat alacsonyabb a növény hőmérséklete



A nyitott sztóma (open stomata, ost) mutánsok izolálása infravörös képanalízis segítségével

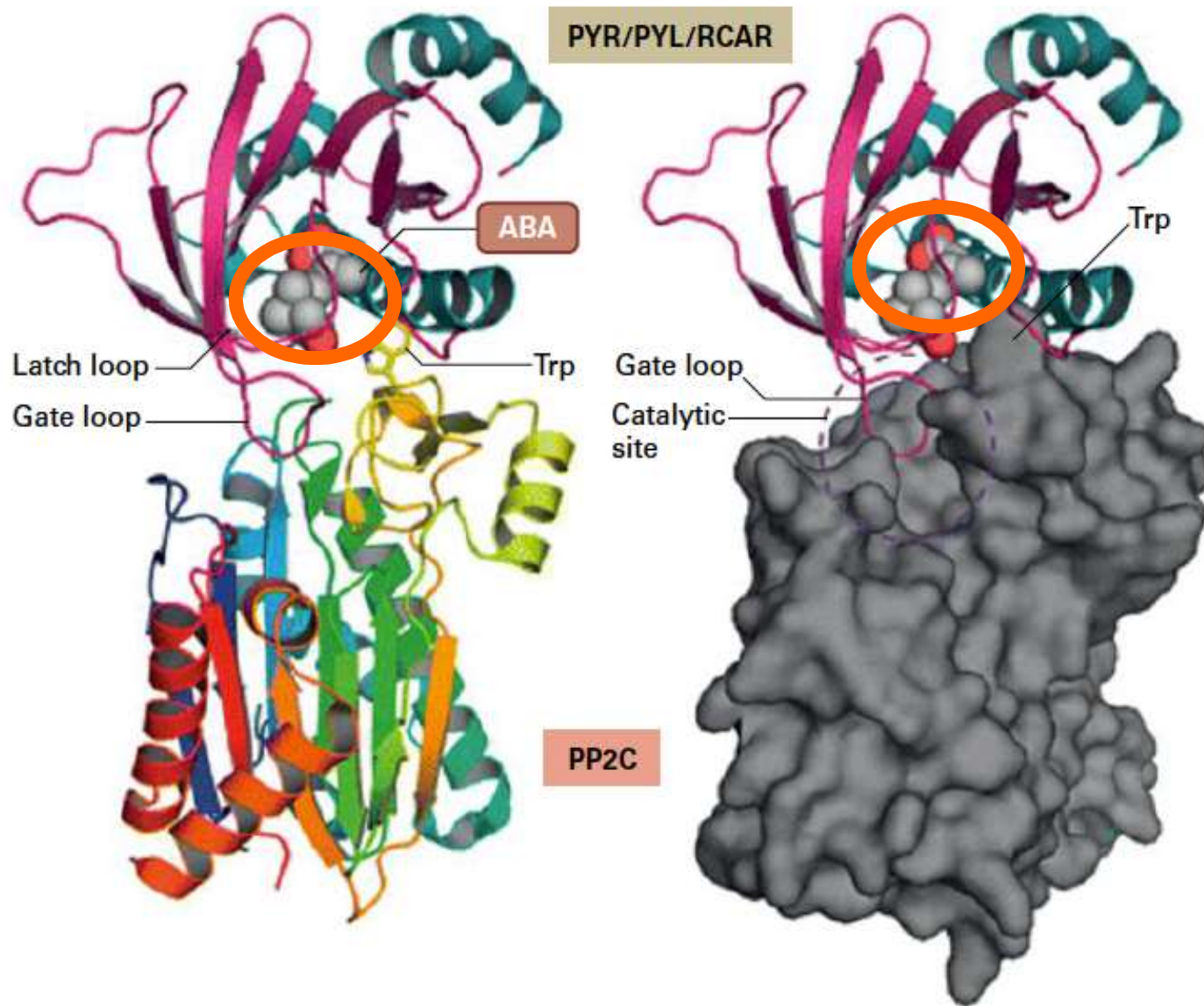


Az ABA érzékelés molekuláris mechanizmusa

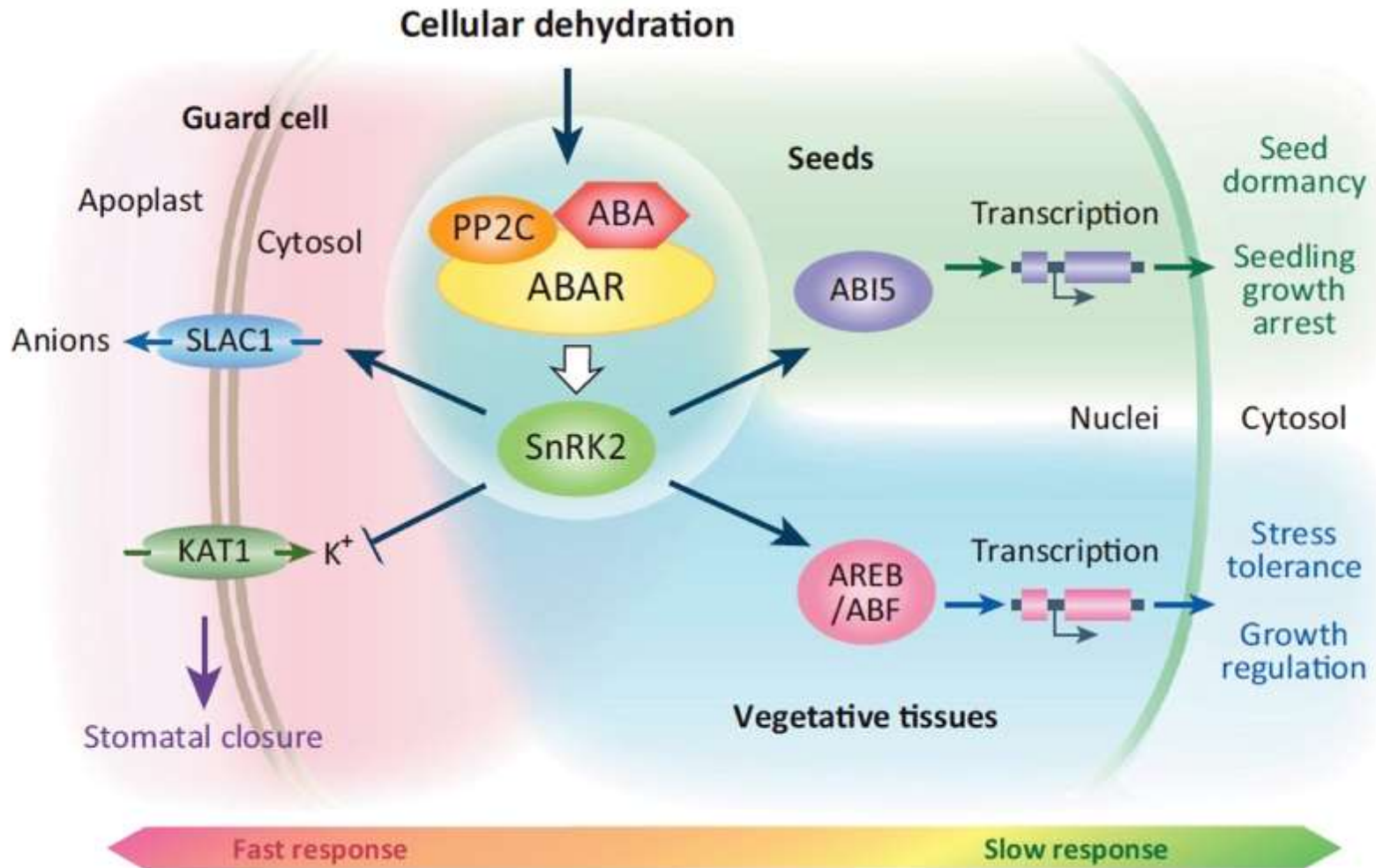




Az ABA receptor szerkezete

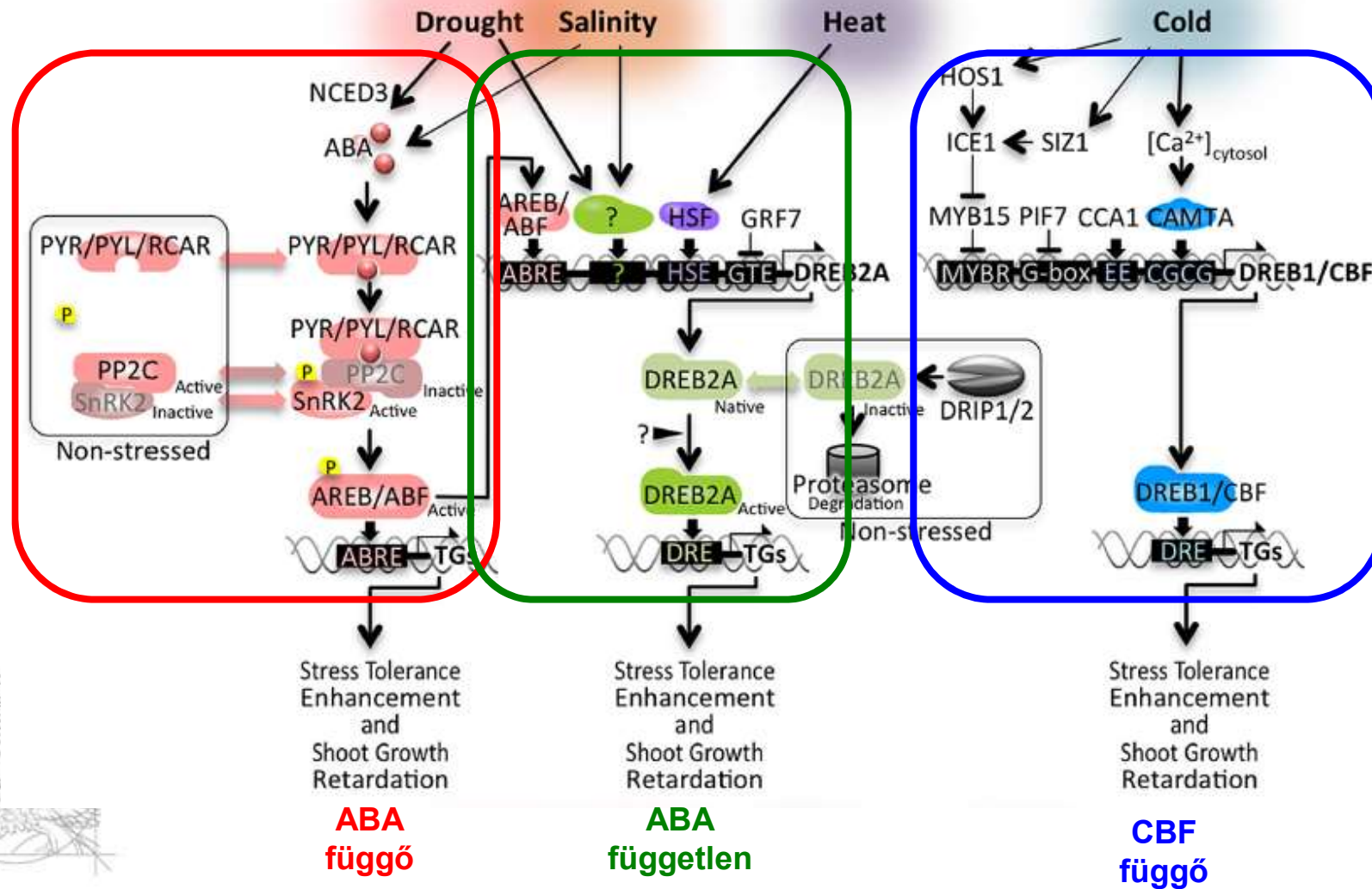


Az ABA érzékelése és a jelátvitel

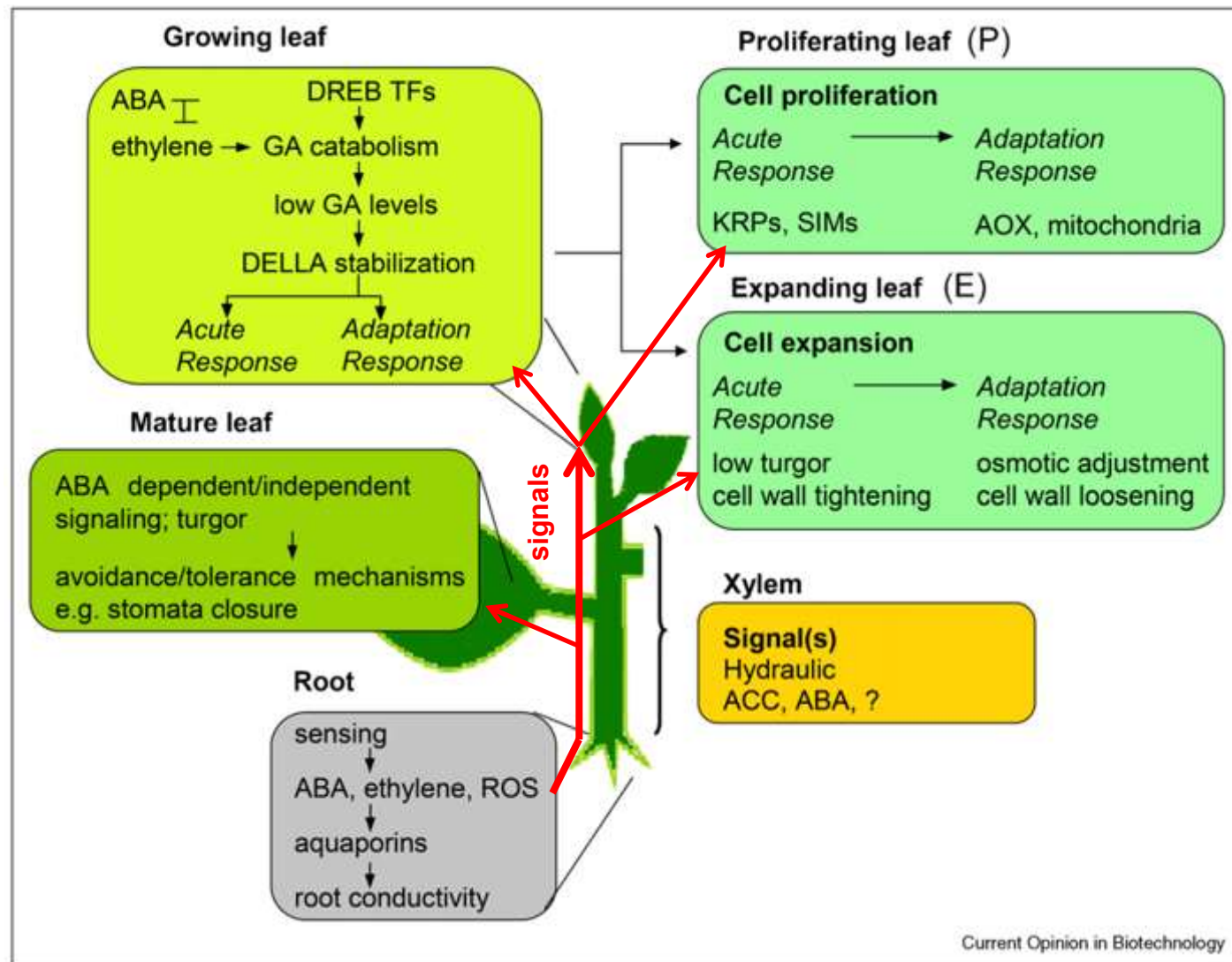


A stresszfüggő transzkripció szabályozás Arabidopsis-ban

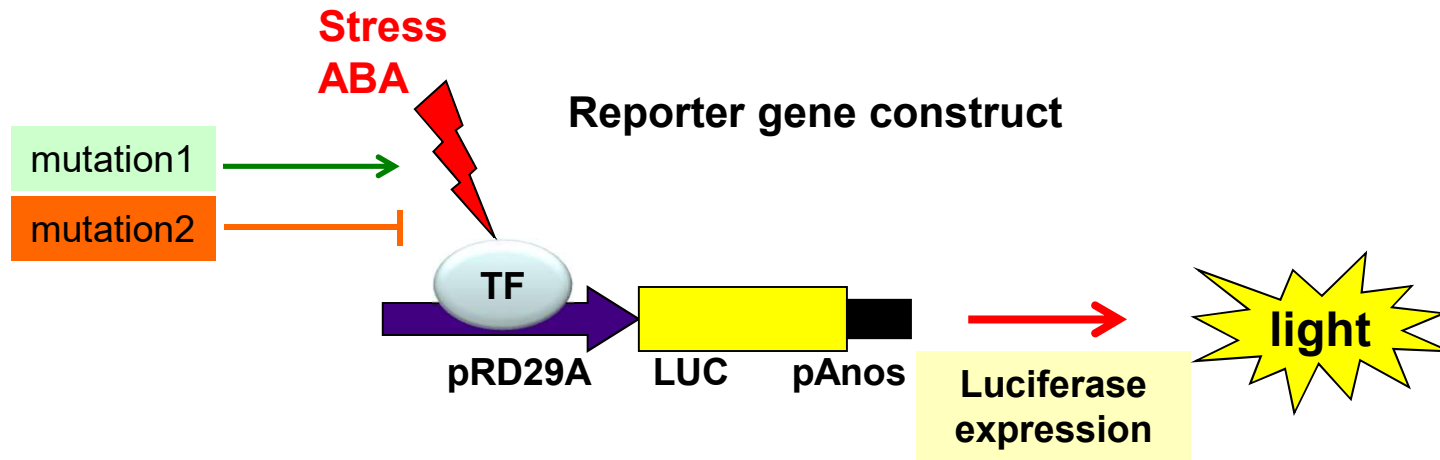
A



A szárazság érzékelése és hatása a levelek növekedésére



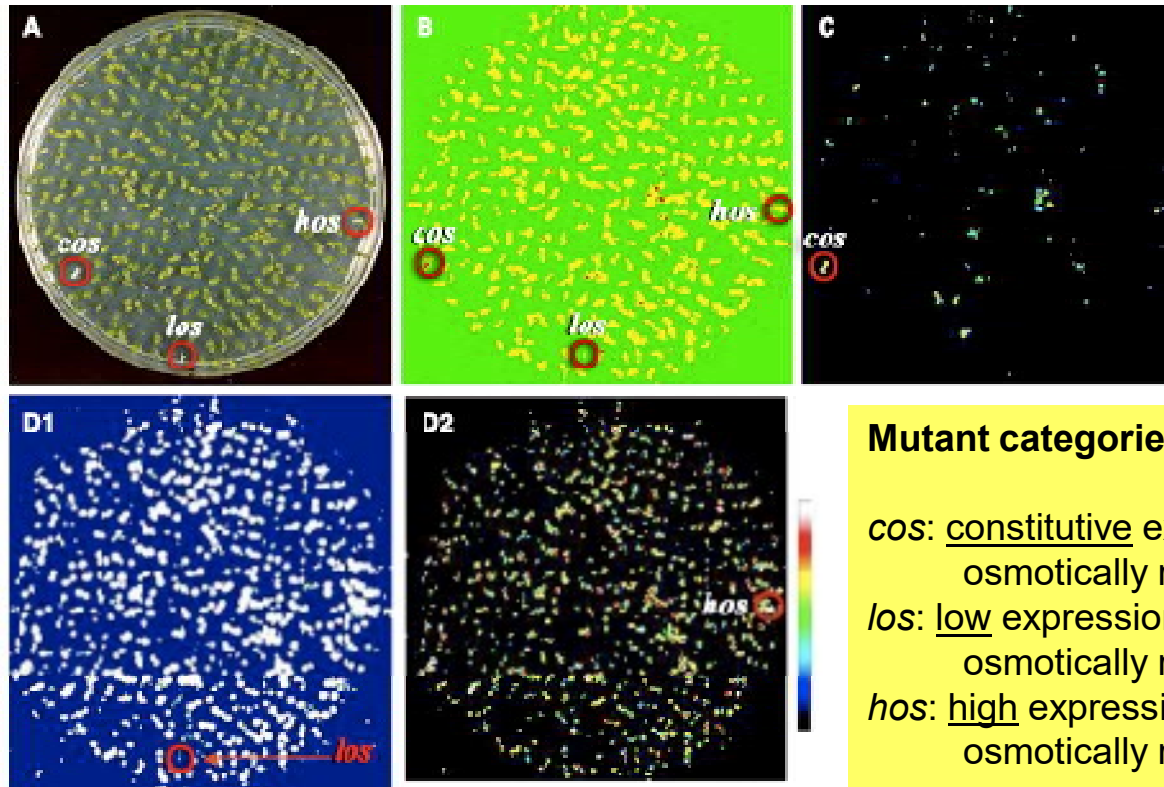
Reporter gének alkalmazása a szabályozó gének azonosítására



Activation of PC-LUC and RD29A-LUC reporter genes



A *cos*, *los* és *hos* mutánsok azonosítása megváltozott lumineszcencia alapján



Mutant categories:

- cos*: constitutive expression of osmotically responsive genes
- los*: low expression of osmotically responsive genes
- hos*: high expression of osmotically responsive genes

J.-K. Zhu (USA, China)

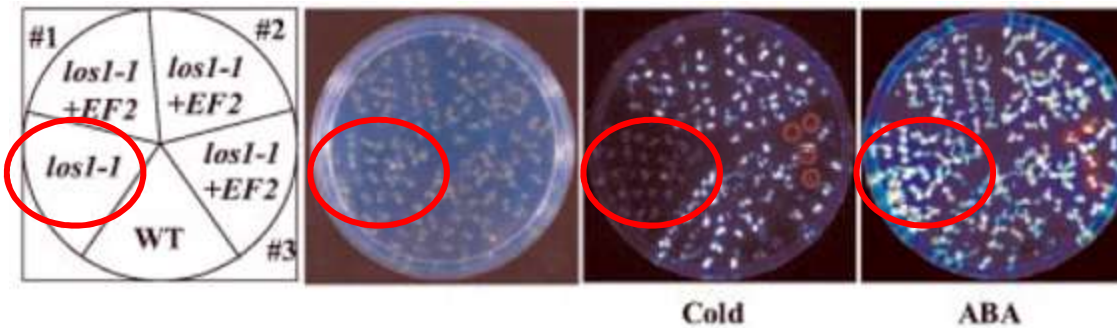
A *los1* mutáns és a LOS1 gén

Structure and position of the *los1* mutation



pRD29A-Luciferase aktivitás a *los1* mutánsban és komplementált vonalakban

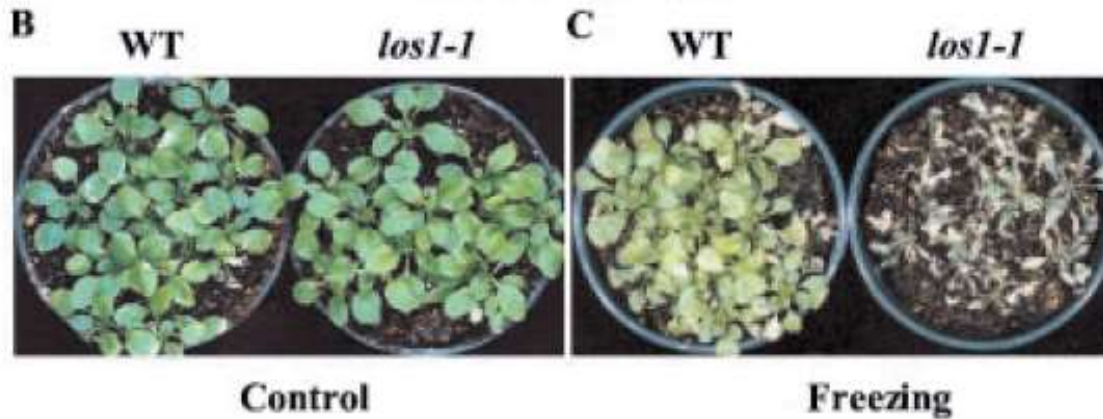
los1 mutáns



translation elongation factor 2

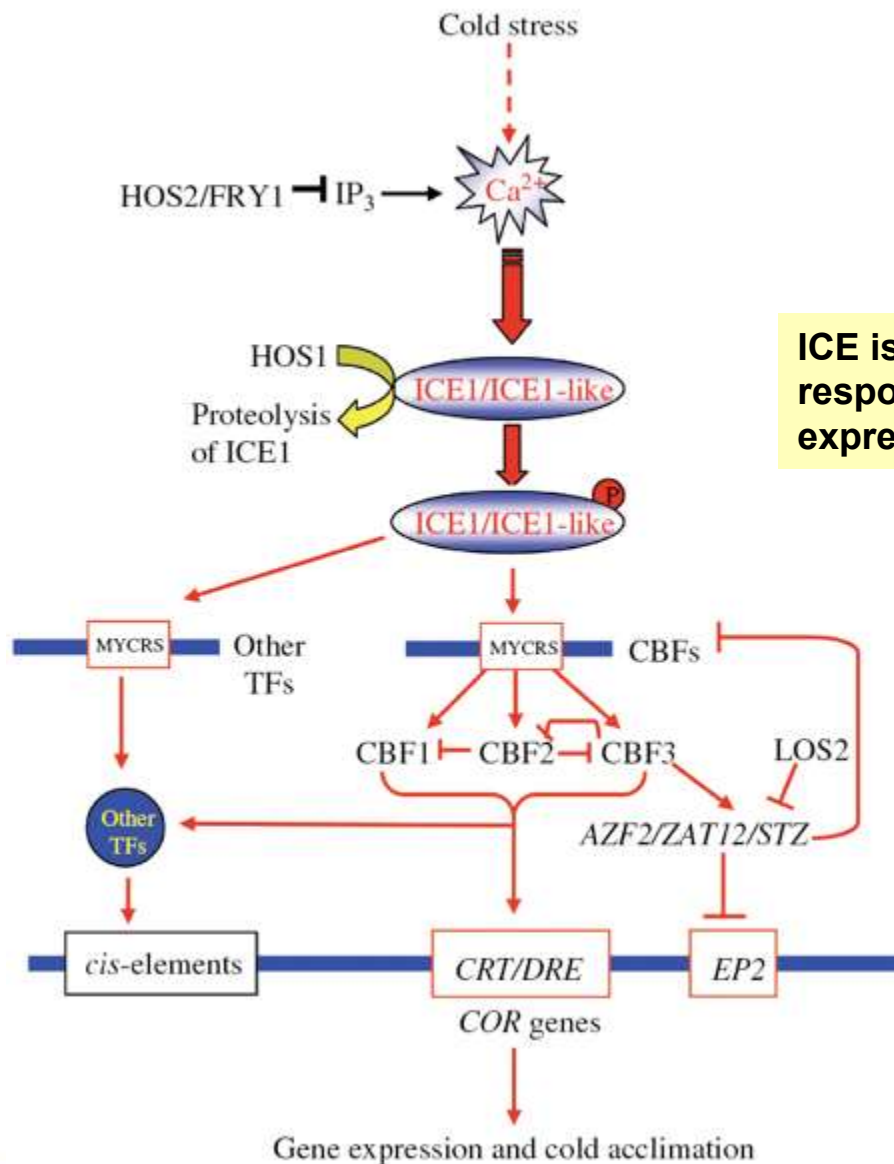
Fontos a gén aktiváláshoz, a hidegtűréshez.

A *los* mutáns fagy érzékeny.





A hidegtűrés szabályozása

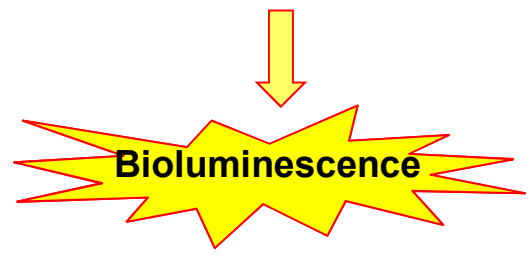
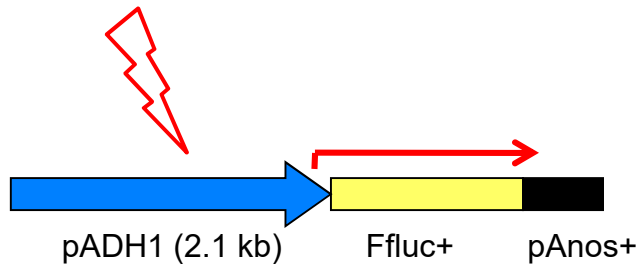


ICE is a central regulator of cold stress responses, controls cold-induced gene expression and cold tolerance.

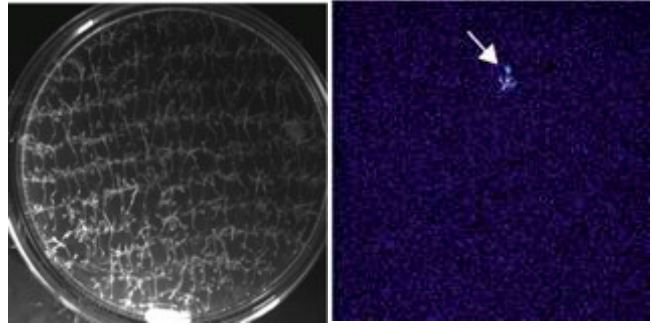
A szabályozó gének azonosítása az ADH1 expresszió alapján

Trans activation of pADH1-LUC reporter gene

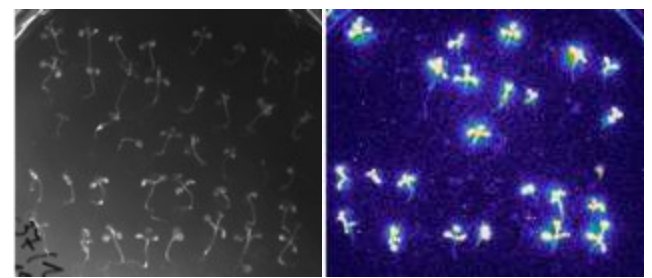
Stress, ABA



Transformation with COS library,
Genetic screen with
bioluminescence imaging



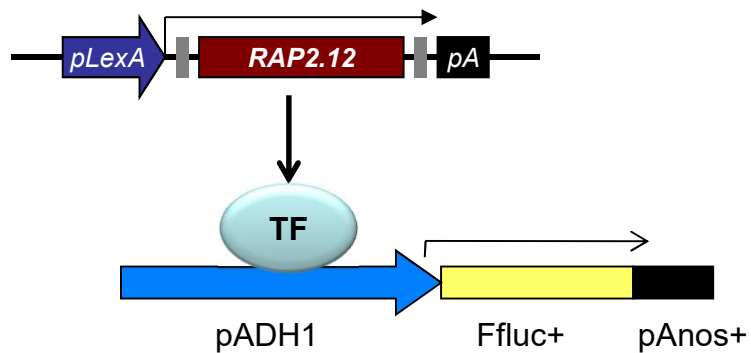
Segregation of luciferase activity
in a T2 generation line.



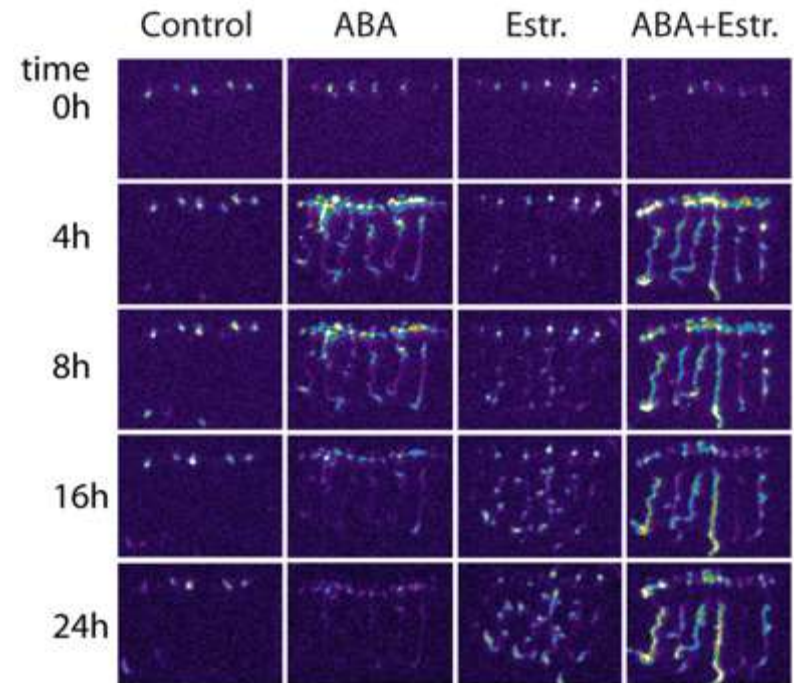
Reflected light bioluminescence

A pADH-LUC aktiválása: a RAP2.12 faktor

cDNA insert in ADH121:
ERFVII type transcription factor RAP2.12

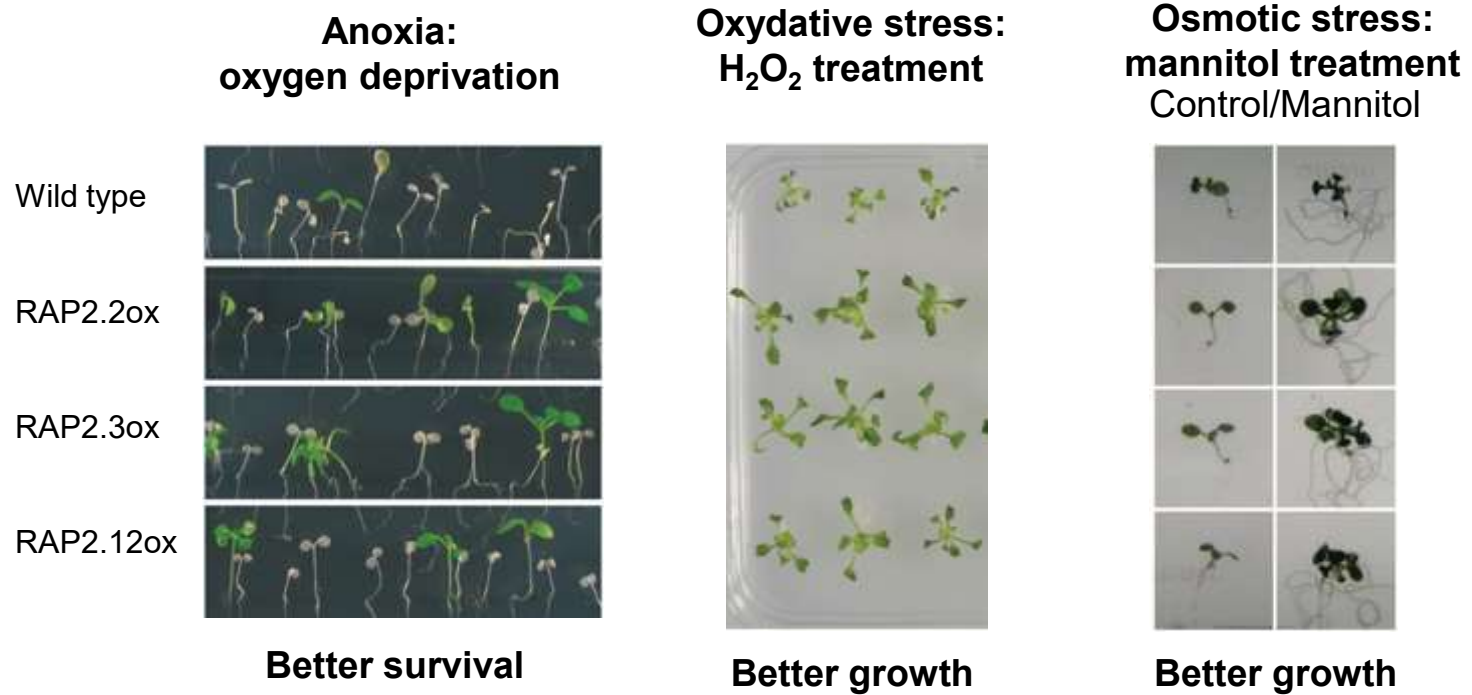


LUC activation in ADH121 line



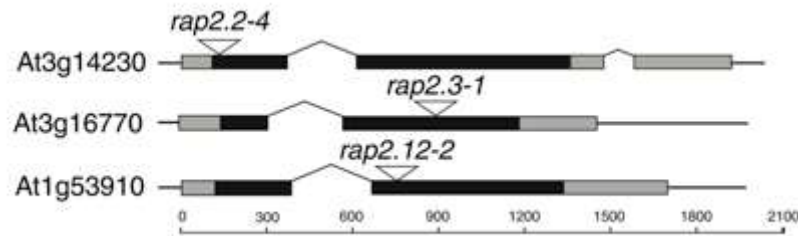
In ADH121 the ADH-LUC reporter is activated by ABA in leaves and roots, estradiol induces luciferase activity in roots. Combined ABA+estradiol treatment is additive.

RAP2.2, RAP2.3, RAP2.12 túltermelés: javítja a stressztűrő képességet.



rap2.2, *rap2.3*, *rap2.12* mutánsok: stressz érzékenység

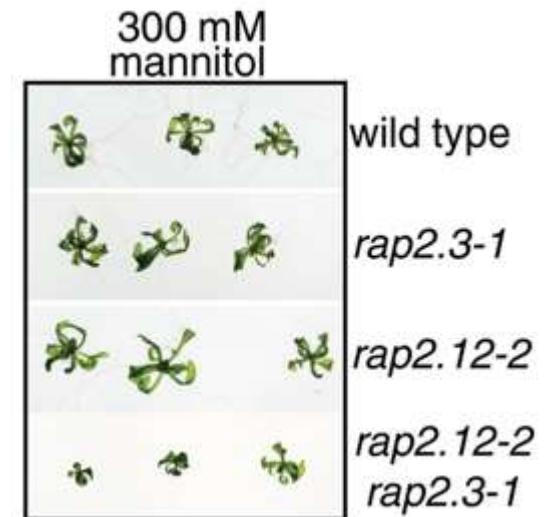
T-DNA insertions in RAP2 genes



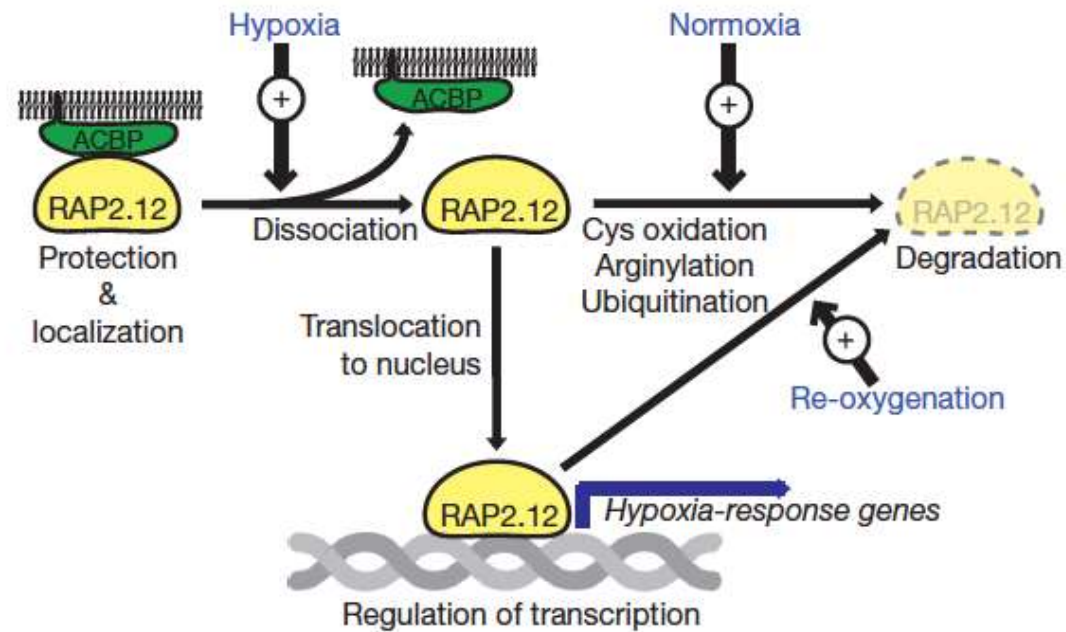
Sensitivity to submergence



Sensitivity to osmotic stress



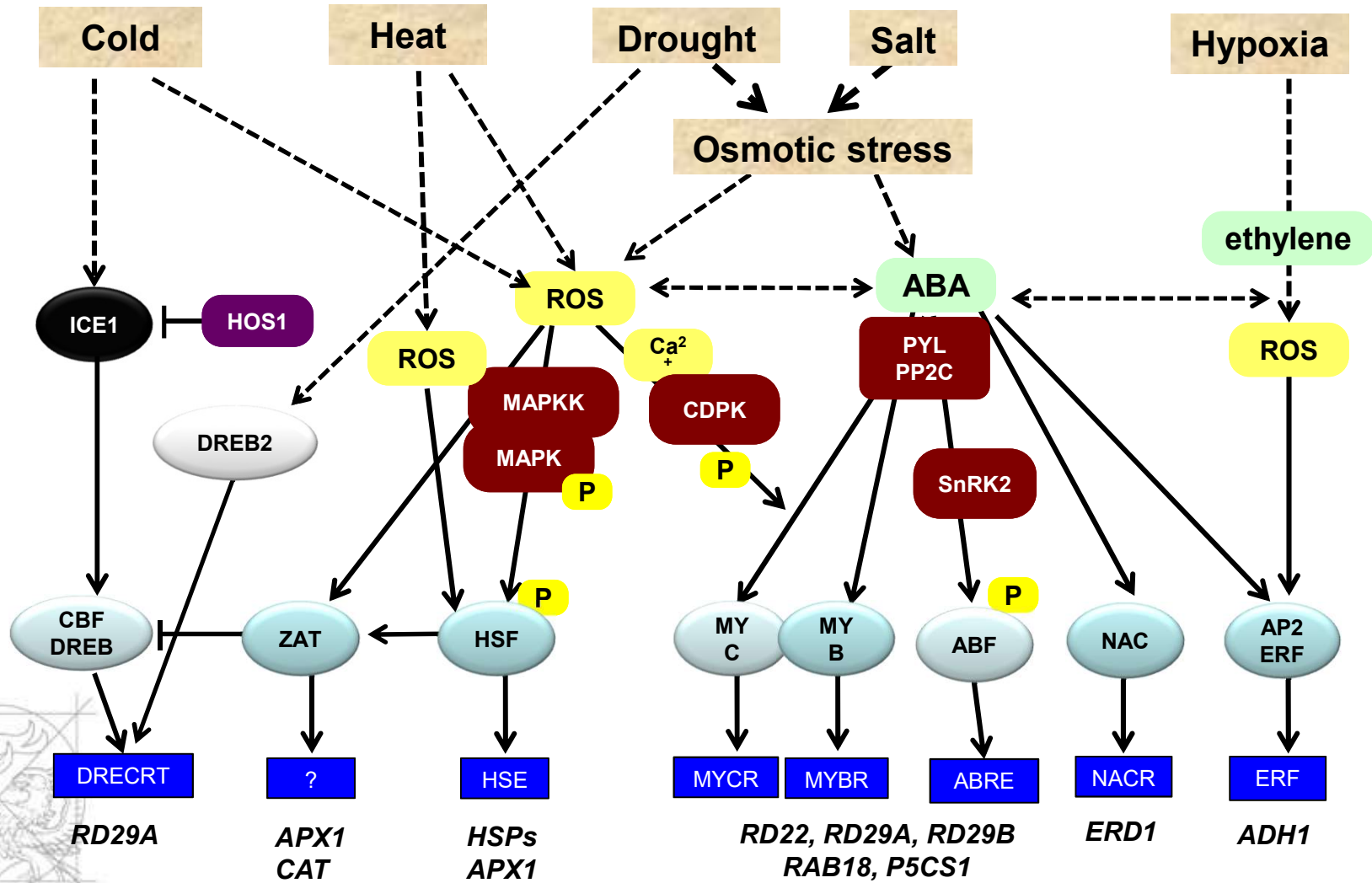
RAP2.12 is sensor of hypoxia through N-end rule pathway



Licausi et al., (2011) Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479**: 419-422

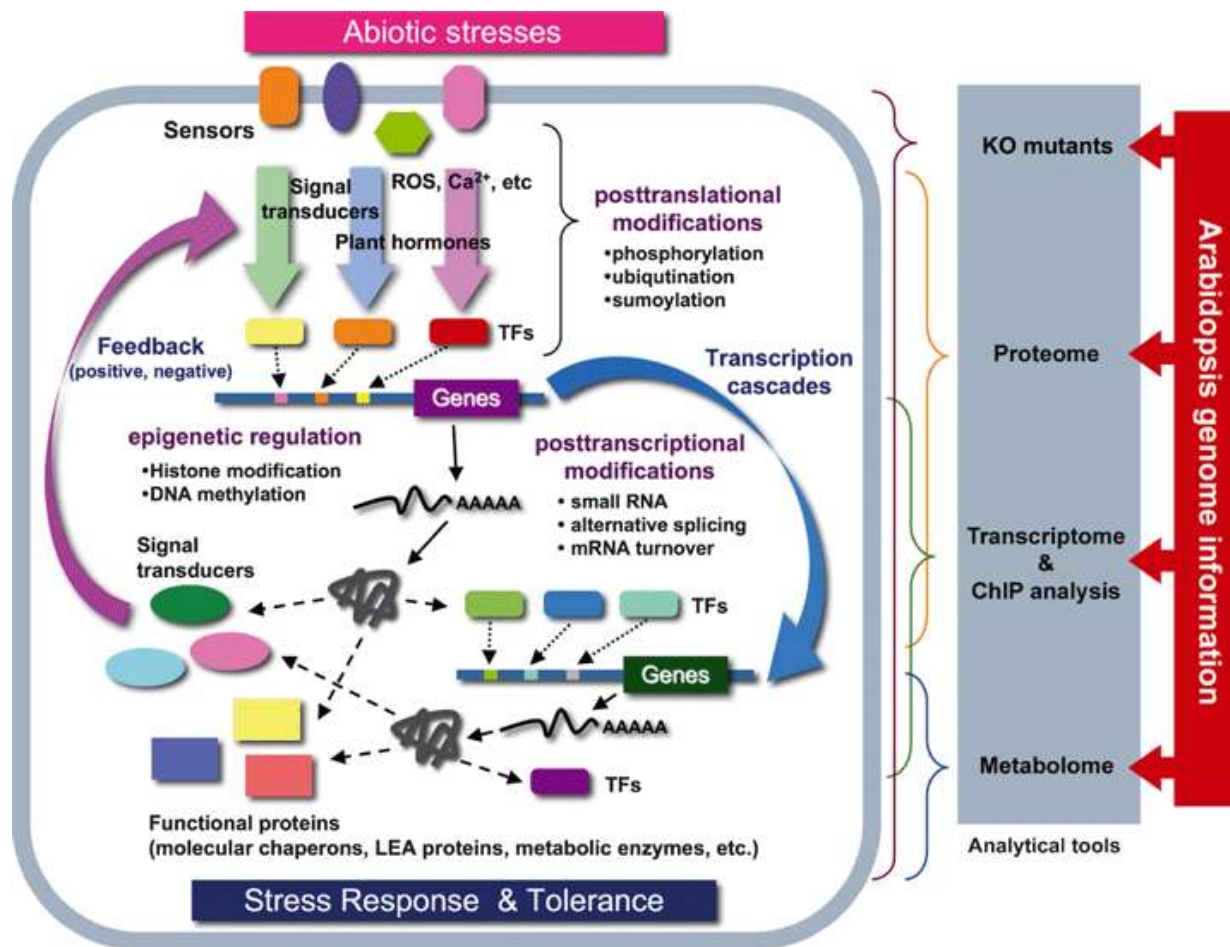
Gibbs et al., (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* **479**: 415-418

A stressz jelátvitel néhány ismert komponense





A környezeti stresszhatásokat kivédő mechanizmusok



KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

SZÉCHENYI  2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE