

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

TALLER DÉNES LÁSZLÓ

KESZTHELY

2020





SZENT ISTVÁN EGYETEM

***Capsicum annuum* mikroRNS-ek összehasonlító
genomszintű analízise**

DOI: 10.54598/000060

Taller Dénes László

KESZTHELY

2020

***Capsicum annuum* mikroRNS-ek összehasonlító genomszintű analízise**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Szent István Egyetem , Georgikon Campus,
Festetics Doktori Iskola, Növénynevelés, genetika és agrárbiotechnológia alprogram keretében,
Növénytermesztési és kertészeti tudományágban

Írta:

TALLER DÉNES LÁSZLÓ

Iskolavezető:

Dr. Anda Angéla, D.Sc. Egyetemi tanár

.....
iskolavezető

Témavezetők:

dr. Taller János

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
dr. Taller János

Dr. Havelda Zoltán

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Dr. Havelda Zoltán

A jelölt a doktori szigorlaton%-ot ért el,

Keszthely,

.....
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....

Bíráló neve: igen /nem

.....

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

Keszthely,

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....
Az EDHT elnöke

Tartalomjegyzék

1.	Kivonatok.....	1
1.1.	Magyar nyelvű kivonat	1
1.2.	Abstract	2
1.3.	Auszug	3
2.	Bevezetés	4
3.	Célkitűzés.....	8
4.	Irodalmi áttekintés.....	9
4.1.	<i>Capsicum</i> domesztikáció és az általa okozott változások	9
4.1.1.	<i>Capsicum</i> nemzetség általános jellemzése.....	9
4.1.2.	<i>Capsicum</i> fajok termesztésbe vonása.....	9
4.1.3.	‘Tepin’, a termesztett paprika botanikai őse	11
4.1.4.	Morfológiai változások a termesztésbe vonást követően	12
4.1.5.	Genetikai sokféleség alakulása a domesztikáció során	13
4.1.6.	A paprika útja Amerikán kívül és megjelenése a Kárpát-medencében.....	14
4.1.7.	A ‘Fehér özön’ fajtát megalapozó hazai szelekciós események és nemesítési munka 15	
4.2.	Szaporodásbiológiai jellemzők	16
4.2.1.	A paprikavirág és a belőle képződő termés legfontosabb jellemzői.	16
4.2.2.	Termésfejlődési folyamatok.....	18
4.3.	A termés elkülönülő részei.....	20
4.3.1.	Terméshús (<i>perikarpium</i>).....	20
4.3.2.	Mag (<i>ovulum, semen</i>).....	21
4.3.3.	Magléc (<i>Placenta</i>).....	23
4.4.	Az általunk alkalmazott VIGS vektorok alapját adó növényi vírusok.....	24
4.4.1.	A paprika, mint vírusgazda	24
4.4.2.	<i>Dohánymozaik vírus</i>	24

4.4.3.	<i>Dohány zörgőlevelűség vírus (TRV)</i>	26
4.4.4.	<i>Burgonya X vírus (PVX)</i>	28
4.5.	RNS-interferencia jelenség növényekben	28
4.5.1.	Az RNS-interferencia kulcsfehérjéi	30
4.5.2.	Az endogén gének szabályzói, a mikroRNS-ek	33
4.5.3.	Növényi miRNS-szabályzás alatt álló funkciók.....	36
4.5.4.	A siRNS-ek keletkezése és funkciója.....	40
4.5.5.	Vírus indukálta géncsendesítés (VIGS).....	40
4.6.	<i>Solanacea</i> családra vonatkozó genomszintű információk.....	45
4.6.1.	Genomszekvenálási módszerek, elérhető <i>Solanaceae</i> genomok.....	45
4.6.2.	A <i>Capsicum</i> nemzetségre vonatkozó mRNS-szintű információk	47
4.6.3.	KisRNS-szintű információk	48
5.	Anyag és módszer	50
5.1.	Növényanyag.....	50
5.2.	Alkalmazott felvételezési, biotechnológiai és bioinformatikai módszerek	51
5.2.1.	Morfológiai felvételezések és mérések	51
5.2.2.	Vírus indukálta géncsendesítési rendszer elemei	51
5.2.3.	RNS-kivonási módszerek	52
5.2.4.	Könyvtárkészítés, szekvenálás	53
5.2.5.	Bioinformatikai analízis eszköztára	54
5.2.6.	RNS-ek kimutatása, vizsgálata	55
6.	Eredmények és következtetések.....	59
6.1.	Morfológiai felvételezés eredményei az anyanövény-szelekcióhoz	59
6.1.1.	Binomiális tulajdonságok	59
6.1.2.	Bonitált tulajdonságok.....	60
6.1.3.	Mért tulajdonságok.....	60
6.1.4.	Felvételezett adatok értékelése, anyanövény szelekció	63

6.2.	Vírus indukálta géncsendesítés lehetőségei paprikában.....	64
6.2.1.	Alkalmazott VIGS vektorok és a fertőzési módszerek tulajdonságai	64
6.2.2.	VIGS vektorok hatása a <i>Capsicum annum</i> növények génexpressziójára.....	67
6.2.3.	Paprikán használt VIGS vektorok összehasonlítása.....	68
6.3.	RNS-könyvtárak készítése és szekvenálása	69
6.3.1.	RNS-kivonás, könyvtárkészítés és szekvenálási eredmények	69
6.3.2.	Szekvenálási eredmények szűrése és minőségellenőrzése	70
6.3.3.	A genomi szabályozó kisRNS-szekvenciák méreteloszlása	70
6.4.	KisRNS-ek azonosítása a fejlődő paprikában	72
6.4.1.	Konzervatív miRNS-ek.....	73
6.4.2.	Paprikaszpecifikus miRNS-ek	76
6.4.3.	Újonnan azonosított kisRNS-ek.....	77
6.4.4.	Prediktált miRNS-prekursorok tulajdonságai	80
6.5.	A kisRNS-könyvtárak validálása Northern hibridizációval.....	82
6.6.	Differenciálexpressziós vizsgálatok a termésfejlődés megporzás utáni korai szakaszában (DAA 14-20).....	84
6.6.1.	A miRNS-szintű eltérések a vad ('Tepin') és a jelenleg a termesztésben lévő változat ('Fehér özön') között.....	84
6.6.2.	A miRNS-expressziós változások a pollenszórást követő 2. és 3. hét között	86
6.7.	Differenciálexpressziós vizsgálatok a termésfejlődés pollenszórást követő 4. és 6. hét közötti szakaszában.....	88
6.7.1.	Szövetszintű miRNS eltérések a 28 napos stádiumban.....	88
6.7.2.	Szövetszintű miRNS-eltérések a 40 napos stádiumban	90
6.7.3.	Az egyes szövetek miRNS-expressziós változásai a két vizsgált időpont között	93
6.8.	A vizsgált miRNS-ek által szabályzott mRNS-ek, gének és funkciók.....	96
7.	Kitekintés	104
8.	Összefoglalás	106
9.	Tézispontok.....	110

9.1.	Új tudományos eredmények.....	110
9.2.	New scientific results	111
10.	Mellékletek.....	112
10.1.	Irodalomjegyzék	112
10.2.	Publikációs jegyzék.....	128
10.3.	Mellékelt ábrák.....	130
10.4.	További mellékletek	134
11.	Köszönetnyilvánítás	137

Rövidítések jegyzéke:

Rövidítés	Magyar megfelelője	Angol megfelelője
2n	krómoszómszám szomatikus sejtekben	somatic chromosome number
ABS	abszcizinsav	abscisic acid ABA
AFLP	felszaporított fragmens hossz polimorfizmus	amplified fragment length polymorphism
AGO	argonauta fehérje	argonaute protein
ALSV	alma látens gömb alakú vírus	apple latent spherical virus
ATP	adenozin-5'-trifoszfát	adenosine-5'-triphosphate
BAC	mesterséges baktérium kromoszám	bacterial artificial chromosome
bp	bázispár	base pairs
BSA	szarvasmarha-szérumalbumin	bovine serum albumin
cDNS	komplementerDNS	complementary DNA
Church puffer	0,5 M NaPi, 7% SDS, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% BSA, 0,02 mg/ml ssDNS	Church buffer
CMV	uborka mozaikvírus	Cucumber Mosaic Virus
CTAB	cetrimonium-bromid $[(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3]Br$	Cetrimonium bromide
DAA	pollenszórást követő napok száma	days after anthesis
DNS	deoxiribonukleinsav	deoxyribonucleic acid
dsRNS	duplaszálú RNS	double stranded RNA
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav	ethylene-diamine-tetraacetic acid
EST	expresszált szekvencia részlet	expressed sequence tags
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GBS	genotípus meghatározás szekvenálással	genotyping by sequencing
GFP	zöld floureszkáló fehérje	green flourescens protein
GRF	növekedés szabályozó faktorok	growth-regulating factors
GS	gibberelinsav	gibberellic-acid GA
het-siRNS	heterokromatikus siRNS	heterochromatic si-RNA
HPP	megporzást követő órák száma	hours past pollination
HR	hiperszenzitív reakció	hypersensitive reaction
kDa	kilodalton	kilodalton
ZLNS	zárt láncú nukleinsav	locked nucleic acid LNA

Rövidítés	Magyar megfelelője	Angol megfelelője
MFE	szabad energia minimum	minimum free energy
miRNS	mikroRNS	microRNA
MOPS	3-morfolino-propán-1-szulfonsav	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid
mRNAseq	mRNS-szekvenálás	mRNA-sequencing
mRNS	hírvivő RNS	messenger RNA
NGS	új generációs szekvenálási technikák	next generation sequencing
nm	nanometer	nanometer
nt	nukleotid	nucleotide
OD600	optikai denzitás 600 nm-en	optical density 600 nm
OEM	oltalom alatt álló eredetmegjelölés	Protected Designation of Origin – PDO
OFJ	oltalom alatt álló földrajzi jelzés	protected geographical indications, PGI
OP	szabad elvirágzású fajta	open pollinated variety
ORF	nyílt leolvasási keret	open reading frame
padj	korrigált p érték	adjusted p value
PCR	polimeráz láncreakció	polymerase chain reaction
PDS	fitoén-deszaturáz	phytoene-desaturase
pre-miRNS	miRNS-prekursor	miRNA-precursor
pri-miRNS	elsődleges miRNS-átirat	primary mirna transcript
PTGS	poszt-transzkripcionális géncsendesítés	post-transcriptional gene silencing
PVX	burgonya X vírus	Potato Virus X
qPCR	mennyiségi PCR	quantitative PCR
RAMPO	véletlenszerűen felszaporított mikroszatellit poliformizmus	random amplified microsatellite polymorphism
RAPD	Véletlenszerűen felszaporított DNS-polimorfizmus	random amplification of polymorphic DNA
RDRP	RNS-függő RNS-polimeráz	RNA-dependent RNA-polymerase
RFLP	restrikciós fragmenthossz polimorfizmus	restriction fragment length polymorphism
RGR	relatív növekedési ráta	relative growth rate
rGTP	ribóz guanin-trifoszfát	ribose guanine triphosphate.
RISC	RNS indukálta géncsendesítési komplex	RNA induced silencing complex
RNS	ribonukleinsav	ribonucleic acid
rNTP	ribóz nukleozid-trifoszfát	ribose nucleoside triphosphate.

Rövidítés	Magyar megfelelője	Angol megfelelője
RPM	egymillióra jutó leolvasás	read per million
RT-PCR	reverz-transzkripció PCR	reverse transcription PCR
RUBISCO	ribolúz 1,5 bifoszfát-karboxiláz, oxigenáz	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase
SAM	apikális hajtásmerisztéma	shoot apical meristem
SDS	nátrium-dodecil-szulfát	Sodium dodecyl sulfate
SHU	Scoville mértékegység	Scoville heat unit
siRNS	interferáló kisRNS	small interfering RNA
SPL	squamosa promóterkötő fehérje	squamosa promoter binding like
sRNA/SRNS	kisRNS	small RNA
ssDNS	egyszálú DNS	single stranded DNA
SSR	genomi egyszerű szekvencia ismétlődés	genomic simple sequence repeat
ta-siRNS	transz-ható siRNS	trans-acting siRNA
TCP	teosinte/cycloidea/proliferáló sejt faktorok	teosinte branched/cycloidea/ proliferating cell factors
TGS	transzkripcionális géncsendesítés	transcriptional gene silencing
TMV	Dohány mozaikvírus	tobacco Mosaic Virus
tRNS	transzferRNS	transfer RNA
TRV	dohány zörgőlevelűség vírus	tobacco rattle virus
TV	tölteni való	
VIGS	vírus indukálta géncsendesítés	virus induced gene silencing
WGS	teljes genom szekvenálás	whole genome sequencing

1. Kivonatok

1.1. Magyar nyelvű kivonat

Napjainkban a modern biológiai kutatások egyik fő célja a fejlődési folyamatokban résztvevő fontos gének, biomolekulák és szabályozó mechanizmusok feltárása és funkcionális megértése. Az RNS-interferencia jelenségének és az ebben résztvevő kis, nem kódoló RNS-ek felfedezésével a génszabályozás új szintje vált ismertté. A kis szabályozó RNS-ek, például a mikroRNS-ek (miRNS-ek) növényekben is sok élettani és fejlődési folyamatban játszanak fontos poszt-transzkripcionális szabályzó szerepet. Azonban konkrét funkcionális szerepükről és a gazdasági szempontból fontos termésjellemzőkre gyakorolt hatásukról kevés ismeret áll rendelkezésre. E molekuláknak a paprika termésében játszott funkciójuk jobb megértéséhez az itt lejátszódó dinamikus miRNS-expressziós változások nagy felbontású, térbeli és időbeli feltérképezésére van szükség.

A vizsgálataink során a miRNS profilokat új generációs szekvenálási eljárások felhasználásával határoztuk meg két genotípus ('Fehér özön', 'Tepin') és 4 gyümölcs fejlődési fázis (14, 20, 28, 40 DAA) mintáiból. A kapott kisRNSszekvencia adatokat segítségével számos konzervatív, paprikaspecifikus és eddig azonosítatlan miRNS jelenlétét igazoltuk a paprika termésben. A kapott expressziós profilok összehasonlítása jelentős különbségeket tárt fel a korábban leírt, és az újonnan azonosított miRNS-ek esetén is. A differenciál expressziós vizsgálatokkal sikeresen azonosítottunk szövet-, stádiumspecifikus kisRNS-eket is.

A paprika vizsgálata során nyert adatainkkal megerősítettük, hogy a termésnövekedést jelentős miRNS abundancia változások kísérik. A csillagszál és a prekursorok vizsgálatával a biogenezisének molekuláris hátteréről tudhatunk meg többet, a célpont mRNS-ek azonosításával közelebb kerülhetünk a molekulák funkcionális szerepének megértéséhez. A miRNS-ekhez bioinformatikai módszerek segítségével hozzárendeltük a csillagszál-, a prekursor- és potenciálisan szabályzott mRNS szekvenciákat. Ezeknek az összetett információknak a birtokában adott a lehetőség, hogy jó eséllyel az azonosított miRNS-ekhez hozzárendeltük a miRNS* szál, a lehetséges prekursor- és a potenciálisan szabályzott mRNS szekvenciákat, ennek az összetett információnak a felhasználásával jó eséllyel kiválaszthatjuk azokat a miRNS-eket, amik fontos biológiai funkciókban játszanak kulcsszerepet.

A mikroRNS-ek és az egyes gének funkciójának feltárására több, az RNS interferencián alapuló, tranzienst módszer áll rendelkezésre. Ezekre jellemző, hogy nem okoznak DNS szintű változásokat, viszont a génekről átíródó mRNS-eket hatékonyan és szekvenciaspecifikusan inaktíválják. A vírusok által indukált géncsendesítési módszer (VIGS) a gyorsasága, egyszerűsége és költséghatékonysága miatt sok növényfaj esetén előtérbe került a körülményes és költséges stabil genetikai transzformációt igénylő megoldásokkal szemben.

A VIGS alkalmazásakor egy olyan rekombináns vírussal fertőzzük meg a gazdanövényt, amely a célgén expressziójában szekvencia-specifikus gátlást indukál, így megjelenik a gén csökkent működésére jellemző ún. „knock-down” fenotípus. Ez a kísérleti rendszer mindig a vizsgált növényfaj és a felhasznált vírus közti kapcsolattól függ. A VIGS vektorokat általában jól jellemzett növényi vírusok módosításával állítják elő, és a kiinduló vírusnak meghatározó szerepe van a vektor legfontosabb tulajdonságaiban: a potenciális gazdanövénykör, a fertőzési rendszer, a jellemző tünetek, a növényen belüli terjedés és az általa a gazdaszervezetben indukált génexpressziós változások.

Paprikában három vírusalapú (TMV, TRV, PVX) géncsendesítési vektort teszteltünk, és mindhárom esetben látható tüneteket és több, rendszeresen használt qPCR referenciagén hibridizációs vizsgálata során drasztikus génexpressziós változást tapasztaltunk. A három rendszer összevetése során a TRV alapú rendszert találtuk a leginkább alkalmasnak a kijelölt miRNS szabályzás alatt álló gének későbbi funkcionális vizsgálatához.

1.2. Abstract

Nowadays, modern biological research aims to explore and functionally understand those important genes, biomolecules, and regulatory mechanisms, which play a role in developmental processes. A new level of gene regulation has been revealed by the discovery of the phenomenon of RNA interference and the small non-coding RNAs. In plants, small regulatory RNAs, such as microRNAs (miRNAs), also play an important post-transcriptional regulatory role in many physiological and developmental processes. However, published data are still limited in terms of their potential roles and their effect on economically important crop traits. High resolution, spatial, and temporal mapping of the dynamic miRNA expression changes can lead to a better understanding of the function of these molecules in pepper yield.

High-throughput sequencing was employed to determine the small regulatory RNA expression profiles of fruits in two genotypes and in various time points: 14, 20, 28 and 40 days after anthesis. Using the obtained small RNA-sequence data, we confirmed the presence of multiple conserved, pepper-specific and previously unidentified miRNAs in the pepper crop. Comparison of these profiles revealed important, functional variations and significant differences in the level of previously described and the newly identified miRNAs. Tissue- and stage-specific small RNAs were successfully identified by differential expression assays.

The collected small RNA information shows that fruit expansion is associated with extensive changes in miRNA abundance. By studying the miRNA* strands and its precursors, we can learn more about the molecular background, and the biogenesis of them. We can get closer to understanding the functional role of molecules by identifying the target mRNAs. The miRNA* strand, precursor, and potentially regulated mRNA sequences have been assigned to the identified miRNAs, with this complex information we have a good chance of selecting miRNAs that play a key role in important biological functions.

There are multiple transient methods based on RNA interference to elucidate the function of selected genes. These methods do not indicate changes in the level of DNA, but they can keep transcribed mRNAs under a sequence-specific silencing. Due to its speed, simplicity, and cost-effectiveness, the virus-induced gene silencing method (VIGS) has been preferred in many plant species, besides the cumbersome and costly solutions, that require stable genetic modifications.

By the usage of VIGS, we infect the host with a recombinant virus, which can induce a sequence-specific inhibition of the expression of the target gene, so the so-called knockdown phenotype will appear. This experimental system always depends on the relationship between the chosen plant species and the used virus. VIGS vectors are usually created by modifying well-characterized plant viruses, and the most important characteristics of the vector depend significantly on the original virus: potential host range, infection system, characteristic symptoms, spreading inside the plant, and expression changes induced in the genes of the host plant.

Three virus-based (TMV, TRV, PVX) gene silencing vectors were tested in pepper, in all tested cases visible symptoms emerged and the expression of usually used qPCR reference genes drastically altered. Comparing the three systems, we found the TRV-based system to be the most suitable for subsequent functional analysis of the designated miRNA-regulated genes.

1.3. Auszug

Entwicklungsbiologie und Genregulation Mechanismen stehen zweifellos in der ersten Reihe der wichtige Ziele der Grundlagenforschung in heutzutage. Die Entdeckung regulatorischer kleiner RNAs und das Phänomen der RNA Interferenz haben dazu geführt, dass dieser molekulare Mechanismus als neue Ebene der Genregulation erkannt wurde. Kleine regulatorische RNAs, wie microRNAs (miRNAs), wirken als wichtige posttranskriptionelle Regulatoren in viele pflanzenphysiologischen Entwicklungsprozessen. Die veröffentlichten Daten sind hinsichtlich an ihrer potenziellen Rolle und ihrer Auswirkung auf wirtschaftlich wichtige Pflanzenmerkmale immer noch begrenzt. Eine hoch-auflösende, räumliche und zeitliche Kartierung der dynamischen miRNA-Expression Änderungen kann zu einem besseren Verständnis der Funktion dieser Moleküle in der Paprika ausbeute führen.

Hochdurchsatz-sequenzierung wurde verwendet, um die kleinen regulatorischen RNA Expressionsprofile von Früchten in zwei Genotypen ('Tepin', 'Fehér özön') und zu verschiedenen Zeitpunkten zu bestimmen (14, 20, 28 und 40 DAA). Unter Verwendung der erhaltenen kleinen RNA-Sequenzdaten bestätigten wir das Vorhandensein mehrerer konservierter, paprikaspezifischer und zuvor nicht identifizierter miRNAs in der Paprikaernte. Ein Vergleich dieser Profile ergab wichtige funktionelle Variationen und signifikante Unterschiede in der Häufigkeit der zuvor beschriebenen und der vorhin identifizierten miRNAs. Gewebespezifische, zeitpunktspezifische kleine RNAs wurden erfolgreich durch differentielle Expressionsassays identifiziert.

Die gesammelten kleinen RNA-Informationen zeigen, dass die Fruchterweiterung mit umfangreichen Änderungen der miRNA-Häufigkeit verbunden ist. Durch die Untersuchung der miRNA * -Stränge und ihrer Vorläufer können wir mehr über den molekularen Hintergrund und deren Biogenese erfahren. Wir können dem Verständnis der funktionellen Rolle von Molekülen näher kommen, indem wir die Ziel-mRNAs identifizieren. Der miRNA*Strang, der Vorläufer und möglicherweise regulierte mRNA-Sequenzen wurden den identifizierten miRNAs zugeordnet. Mit diesen komplexen Informationen haben wir gute Möglichkeiten, miRNAs auszuwählen, die eine Schlüsselrolle bei wichtigen biologischen Funktionen spielen.

Es gibt mehrere transient biotechnologisch Methoden, die auf RNA-Interferenz basieren, um die Funktion von gewählten Genen aufzuklären. Diese Methoden bewirken keine Änderungen der DNA-Sequenzen, aber können transkribiertem RNAs unter einer sequenzspezifischen Expression Hemmung halten. Aufgrund seiner Geschwindigkeit, Einfachheit und Kosteneffizienz wurde das Virus-induzierte Gen-Silencing-Verfahren (VIGS) bei vielen Pflanzenarten bevorzugt, neben den umständlichen und kostspieligen Lösungen, die stabile genetische Modifikationen erfordern.

VIGS Methode enthält, dass wir den Wirt mit einem rekombinanten Virus infizieren. Das kann eine sequenzspezifische Hemmung der Expression des Zielgens induzieren, so dass der sogenannte Knockdown-Phänotyp auftreten werden. Dieses experimentelle System hängt immer von der Beziehung zwischen der ausgewählten Pflanzen und dem verwendeten Virus ab. VIGS-Vektoren werden normalerweise durch Modifizieren gut charakterisierter Pflanzenviren erzeugt und die wichtigsten Eigenschaften des Vektors hängen wesentlich vom Ausgangsvirus ab: potenzieller Wirtsbereich, Infektionssystem, charakteristische Symptome, Ausbreitung innerhalb der Pflanze und in den Genen induzierte Expressionsänderungen der Wirtspflanze.

Drei Virus-basierte (TMV, TRV, PVX) Gen-Silencing-Vektoren wurden in Paprika getestet. In diesen infizierten Pflanzen traten sichtbare Symptome und drastisch Expressionveränderung der üblicherweise verwendete qPCR-Referenzgene auf. Wir haben beim Vergleich der drei Systeme festgestellt, dass das TRV-basierte System für die anschließende Funktionsanalyse der bezeichneten miRNA-regulierten Gene am besten geeignet ist.

2. Bevezetés

A *Solanaceae* családba tartozó paprika (*Capsicum annuum* L.) az egyik legfontosabb és legszélesebb körben termesztett növény, termesztésbe vonása Kr.e. 5000-6000-ben feltehetően Kelet-Mexikóban történt. A termesztett változatok mellett a madárpaprika (*Capsicum annuum* var. *aviculare*, syn. *C. annuum* var. *glabriusculum*), köznapinévén ‘Tepin’, Észak- és Közép-Amerikában vadon is előfordul.

A vad és a jelenleg termesztésben alkalmazott változatok közti különbségek pusztán szemmel is jól láthatóak. A ‘Tepin’ növények több évig életben maradhatnak, és többszörösen elágazó száruk akár a két méteres magasságot is elérheti. A madárpaprika termései apró bogyók, amelyek zöldről pirosra érőek, igen csípősek, és érés után lehullanak. Több madárfaj is előszeretettel fogyasztja, és terjeszti magjait (Votava et al., 2002).

A termesztett paprikafajok közt a *C. annuum* a legjelentősebb. Erre a fajra nagymértékű alaktani variabilitás jellemző, mégis genetikai variabilitása elmarad a vad változatokhoz képest. A gazdasági szempontból legfontosabb fajták szinte kivétel nélkül az édes típusok közül kerülnek ki (Bosland & Votava, 2000). Ezek általában friss fogyasztásra kerülnek, és világszerte fontos részét képezik az emberi táplálkozásnak. A csokros növekedésű ‘Fehér özön’ konstans fajta, édes, fehér, széles vállú, megnyújtott kúp alakú termése, mintapéldája a Mo.-on legnagyobb mennyiségben fogyasztott Fehér töltenivaló (TV) típusnak.

A modern biológiai kutatások egyik elsődleges célja az élőlényekben zajló komplex fejlődési folyamatokban résztvevő gének és molekuláris szabályzómechanizmusaik feltárása. Egy új, eddig ismeretlen szabályozási szint felismeréséhez vezetett a szabályozó kisRNS-ek és az RNS-interferencia jelenségének felfedezése. Intenzív kutatás kezdődött e szabályozási rendszernek a legfontosabb résztvevőinek; a hírvivő RNS-eknek (mRNS), a kis szabályozó RNS-eknek és a mechanizmust működtető fehérjéknek megismerésére.

A kis szabályozó RNS-ek egy jellegzetes csoportja az endogén génekről keletkező mikroRNS-ek (miRNS). Ezek 21-24 nukleotid hosszúságú, általában endogén gének poszt-transzkripciós gátlásáért felelős RNS-ek. A miRNS-eket kódoló gének megtalálhatóak a legkülönbözőbb állati és növényi genomokban (Bonnet et al., 2004), és számuk nagyságrendileg megegyezik a transzkripciós faktorokéval. Amíg a transzkripciós faktorok általában a célgénjeiknek a genomról történő átírását szabályozzák, addig a miRNS-ek az

mRNS-ek szintjén fejtik ki gátló hatásukat. A miRNS-ek sokszor transzkripció faktorok szabályozásával a több gént érintő szintézisútvonalak és szövet-differenciációs folyamatok beindításáért vagy gátlásáért felelősek.

Az új nagyáteresztőképességű szekvenálási eljárások (NGS) megjelenésével, a genom szintű információk költség- és időigénye jelentősen lecsökkent. Ezzel a technológiával lehetségessé vált a rövid DNS fragmentumok tömeges leolvasása (Marioni et al., 2008). A módszer nemcsak a genomok, de az mRNS-ek, a nem kódoló RNS-ek és a szabályozó kisRNS-ek átfogó vizsgálatában is jelentős előrelépést hozott. Ezáltal lehetőség nyílt közelebb jutni ennek az összetett szabályozási rendszernek a vizsgált sejt, szövet vagy élőlény fejlődésében, növekedésében játszott szerepének megismeréséhez.

A szekvenálási hatékonyság rohamos növekedésével folyamatosan nőtt az igény a gyűjtött szekvenciaadatok által rejtett funkciók feltárására is. A növényi miRNS-ek a leggyakrabban alkalmazott modellnövényekben (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*) való funkcióvizsgálatához rövid időn belül több vírus és agrobaktérium alapú hatékony módszer is született.

Az RNS-interferencián alapuló tranziens módszerekre jellemző, hogy a DNS-ben nem okoznak változást, viszont a génekről átíródó mRNS-eket hatékonyan és szekvenciaspecifikusan inaktíválják. A vírusok által indukált géncsendesítési módszer (VIGS) a gyorsasága, egyszerűsége és költséghatékonysága miatt sok növényfaj esetén előtérbe került a körülményes és költséges stabil genetikai transzformációt igénylő megoldásokkal szemben.

A módszerhez a vizsgálni kívánt gén egy szakaszát tartalmazó rekombináns vírussal fertőzik a növényeket. A vírus szaporodása során indukálja az RNS-interferencia mechanizmusát, és a célzott RNS-ek szekvenciaspecifikus gátlásával drasztikus expressziócsökkenés történik (Kumagai et al., 1995). Az így kialakuló ún. “knockdown” fenotípus segít a vizsgált gén funkciójának megismerésében (Orzaez et al., 2006; Pflieger et al., 2008).

A VIGS rendszer mindig függ a vizsgált növényfaj és a felhasznált vírus közti kapcsolattól. Bizonyos esetekben a fertőzés körülményei, növényen belüli lokalizációja vagy az okozott tünetek és génexpressziós változások korlátozhatják az adott vektor használatát. Ezek alapján elmondható, hogy egy meglévő VIGS rendszert mindig adaptálni kell a vizsgálni kívánt fajhoz, szövethez és fejlődési stádiumhoz.

Számos növényi miRNS-t azonosítottak kísérletesen vagy jósoltak meg a kisRNS-adatbázisok bioinformatikai vizsgálatával. A miRNS-ek kiemelt jelentőségű elemei a génexpresszió szabályozási rendszerének mind állati, mind növényi rendszerekben. A miRNS-ek célmolekulái, rengeteg különböző folyamatban játszhatnak szerepet, és általuk a miRNS-ek is fontos hatással vannak szinte minden élettani és anyagcsere folyamatra. (Zhang et al., 2006a).

Vannak ún. konzervatív miRNS-ek, amiknek a szekvenciája, célmolekulája és funkciója is megőrződött a növényi evolúció során (Zhang et al., 2006b, Chavez-Montes et al., 2014). Ezek általában olyan fontos funkciókhoz kötődnek, mint a hormonháztartás, a levélpolaritás, a vegetatív/generatív váltás vagy az RNS-interferencia. (Zhang et al., 2006a) Ezek közül többre jellemző, hogy mind a hiánya, mind a túlzott jelenléte drasztikus eltéréseket okoz a növényi fejlődésben. A nagyhatású miRNS-ekre jellemző, hogy több szövet fejlődéséhez hozzájárulnak, illetve alapvető funkciók, növényi hormonok szabályozói. Például a miR165/166 és célgénjeik a hormonháztartás befolyásolásával részt vesznek az érrendszer differenciálódásában, a hajtáscsúcs kialakításában, az embriógenézisben és a gyökér növekedésében is.

Számos miRNS jelenlétét és aktivitását mutatták ki a növények különböző szerveiből (levél, hajtás, mag, pollen, termés). Egyes miRNS-eknél különböző környezeti stresszhatásokra bekövetkező aktivitásváltozást és jelentős szövetszintű eltéréseket is találtak (Sunkar et al., 2012, Qin et al., 2014, Mohorianu et al., 2011). Több esetben igazolták, hogy több miRNS együttműködése, aránya és sejtek közötti mozgása is szükséges a bonyolult szövetekben történő génszabályzás finomhangolásához. A miRNS-ek és az általuk szabályzott folyamatok közvetlenül hatnak a növények élettani állapotára és fejlődésére, és ezeken keresztül képesek jelentősen befolyásolni a gazdaságilag fontos tulajdonságokat is.

A termésben lejátszódó molekuláris folyamatok befolyásolják az adott termés méretét, minőségi és beltartalmi tulajdonságait, ezért sok tanulmány célja feltárni a miRNS-ek által a termésfejlődésben betöltött funkciókat (Xu et al., 2010, Ge et al., 2013, Yanik et al., 2013). A paradicsom mint a klimakterikus termésérés modellnövényének vizsgálata a *Solanaceae* családon belül kiemelt kutatási cél volt mind a genomszintű miRNS szekvenálás (Mohorianu et al., 2011, Moxon et al., 2008a, Karlova et al., 2013) mind a funkcióvizsgálatok (Zuo et al., 2012, Karlova et al., 2013) körében.

Az elérhetővé vált teljes paprikagenom jelentősen megkönnyíti a nagy mennyiségű RNS-leolvasások feldolgozását és annotációját. Ennek ellenére a termésfejlődést kevesen vizsgálták paprikában, az mRNS-ek és még kevesebben a miRNS-ek (Hwang et al., 2013, Kim et al., 2014, Liu et al., 2017) szintjén. A paprika termésfejlődés korábbi vizsgálataiban során a metabolitok szintjében és az enzimaktivításban is találtak fenológiai stádium-, szövet- és fajtaspecifikus eltéréseket.

A vad és a termesztett változatok összehasonlításával képet kaphatunk a domesztikáció miRNS-szintű hatásairól. A paprikában megfigyelték, hogy a miRNS-ek különböző szövetekben és fenológiai fázisokban eltérő aktivitást mutatnak (Liu et al., 2017, Qin et al., 2014; Chavez-Montes et al., 2014). A korábbi paprikatermesre vonatkozó miRNS vizsgálatokban a termést egyben kezelték, így a placentára, a magra és a terméshúsra vonatkozó miRNS-profil nem azonosították. Ezek alapján az egyes termésrészek külön-külön vizsgálatával olyan új molekuláris szabályozási elemek fedezhetőek fel, amelyek kiemelt fontosságú folyamatokban (kapszaicin szintézis, érés, pektinbontás) vesznek részt.

3. Célkitűzés

1. A kutatási program fő célja, hogy egy jól működő vizsgálati rendszert állítson fel, és ennek felhasználásával új mikroRNS-eket azonosítson, és részletes adatokat szolgáltatson a paprika termésfejlődése során kialakuló miRNS-szintű expressziós változásokról és kölcsönhatásokról.

2. Módszertani célként tűztük ki, hogy a korábban modellnövényeken (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*) leírt, és sikerrel alkalmazott módszereket (RNS-ekivonás, kisRNS-ekönyvtár készítés, kisRNS-hibridizáció, vírus indukálta géncsendesítés) adaptáljuk paprika növényekre.

3. Ezeknek az adaptált módszereknek a felhasználásával tervezzük meghatározni a paprika termésszöveteiből (hús, mag, placenta) különböző időpontokban vett minták kisRNS-profilját. Az így nyert szekvenciák felhasználásával képet kapunk a konzervatív, korábban publikált, paprikaspecifikus miRNS-ek előfordulásáról, és lehetőségünk lesz ezek bioinformatikai módszerekkel való jellemzésére is. A szekvenálás eredményeiből kiindulva kereshetünk a paprikatermesre jellemző, új, eddig le nem írt miRNS-eket is.

4. A termesztett paprika (*C. annuum* var. *annuum*) vadon élő őse a madárpaprika (*C. annuum* var. *aviculare*). Célunk, hogy a miRNS-szintű vizsgálatainkba mindkét faj egyedeit bevonjuk és meghatározzuk a rájuk jellemző miRNS-profilokat. A miRNS-profilok részletes összehasonlításával lehetőségünk lesz a domesztikáció során a termesztett változatban megjelent új miRNS-ek és kizárólag a vad fajban fennmaradt miRNS-ek azonosítására is.

5. Az eltérő szövetek, fejlődési stádiumok kisRNS mintázatainak differenciálexpressziós összehasonlító elemzésével célunk a szignifikáns, feltételezhetően biológiai funkciót is rejtő, miRNS különbségek feltárása, és igazolhatóan szövet-, illetve stádiumspecifikus expressziót mutató miRNS-ek azonosítása.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. *Capsicum* domesztikáció és az általa okozott változások

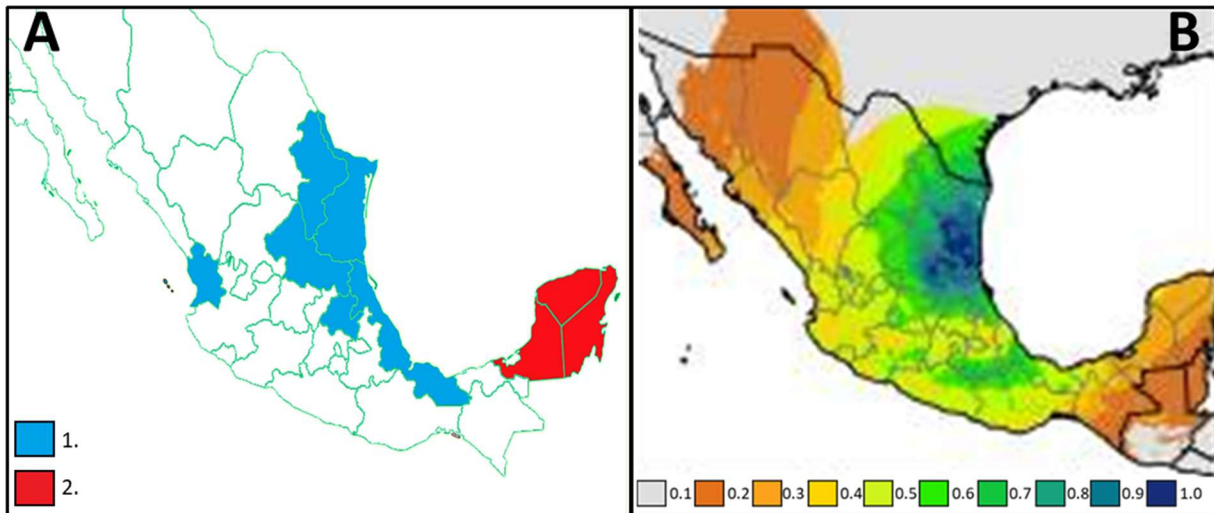
4.1.1. *Capsicum* nemzetség általános jellemzése

A *Solanaceae* (burgonyafélék) családjához tartozó *Capsicum* nemzetség fajai közé sokmagvú termést hozó, többségében lágyszárú növények tartoznak. A fajok többsége Közép- és Dél-Amerika géncentrumából származik (Eshbaugh, 1993; Bosland, 1996). Ezek a fajok trópusi körülmények között évelő életformát mutatnak, de a termesztési gyakorlatban általában egyéves növényként ismerik őket. Napjainkban a tudomány 25-30 *Capsicum* fajt ismer el (Eshbaugh, 1993; Barboza et al., 2005), de a fajok száma az új felfedezések és a taxonómiai felülvizsgálatok miatt napról-napra változik (Csilléry, 2006). A leggyakoribb alapkrómoszómaszám a nemzetségben, akárcsak a burgonyafélék családjában a 12 ($2n=2x=24$) (Smith & Heiser, 1951; Lippert et al., 1966; Pickersgill, 1971, 1977, 1991; Limaye & Patil, 1989; Moscone, 1993) és ez jellemző mind a vad, mind a termesztésbe vont, mind a modern fajtákra. Természetes poliploiditást ($2n=38$) egyetlen a *C. annuum*-hoz sorolt vad genotípus esetén azonosítottak (Pickersgill, 1977). Több kisebb jelentőségű (többnyire brazil eredetű) *Capsicum* faj esetében leírtak 13 kromoszómával rendelkező *Capsicum* genotípusokat is, például *C. ciliatum*, *C. lanceolatum* (Pickersgill, 1977, 1991; Tong & Bosland, 1997, 2003), *C. mirabile*, *C. campylopodium* (Moscone et al., 1993) *C. buforum*, *C. cornutum*, *C. schottianum*, *C. villosum* var. *villosum* (Pozzobon et al., 2006). A termesztésbe vont *Capsicum* genotípusok öt fajba (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* és *C. pubescens*) sorolhatóak (Andrews, 1984; Eshbaugh, 1993; Bosland, 1996; Pickersgill, 1988, 1997).

4.1.2. *Capsicum* fajok termesztésbe vonása

Az öt *Capsicum* faj egyedeit egymástól függetlenül vonták termesztésbe az Amerikai kontinens legalább két egymástól jól elkülönülő régiójában. Közép-Amerikában a *C. annuum* és a *C. frutescens*; Dél-Amerikában a *C. baccatum*, *C. pubescens*, és a *C. chinense* fajok domesztikációja történt meg (Pickersgill, 2007). A chili paprikák termesztésbe vonását bizonyító legrégebbi leleteket Mexikó déli középső részén találták meg, és Kr.e. 5000-6000 körülre datálják (Perry et al., 2007; Pickersgill, 2007), ezzel a paprika az Amerikai kontinens egyik legkorábban termesztésbe vont faja.

A *Capsicum* nemzetség tagjain számos fehérje- (izoenzim-vizsgálat; McLeod et al., 1983, Loaiza-Figueroa et al., 1989, Hernández-Verdugo et al., 2001) és DNS-alapú (kariotipizálás; (Pickersgill, 1971), RAPD (Rodriguez et al., 1999), RFLP; (Prince et al., 1992) és AFLP; (Guzmán et al., 2005)) vizsgálatot végeztek a fajon belüli és fajok közti genetikai sokféleség meghatározására, ennek ellenére a domesztikációs események számát és pontos helyét eddig nem sikerült egyértelműen azonosítani.



1:Loaiza-Figueroa et al., 1989
2:Aguilar-Meléendez et al., 2009

Kraft et al., 2014

- 1. ábra A paprika domesztikációjának feltételezett helye.** **A:** Két molekuláris tanulmány által feltételezett domesztikációs régió, elhelyezve a térképen. **B.:** Konszenzus modell annak valószínűségére, hogy a termesztett chili paprika mely területről származik. A modellt négy bizonyítéksor (régészeti, ökológiai, paleobiolingvisztikus és genetikai adatok) kombinálásával állították elő. Az összesítés során a genetikai adatok ½-ed súllyal a másik 3 adatsor ⅓-od súllyal lett beszámítva. Az egyesítés után az értékeket 0 és 1 közé skálázták és a kerekített értékeket különböző színekkel ábrázolták a térképen.

Például az egyik legátfogóbb izoenzim-alapú vizsgálat (Loaiza-Figueroa et al., 1989) azt találta, hogy számos vad, fél-vad és gyakorlatilag az összes domesztikált (*C. annuum*) változat hordoz egy a *Pgm-3* gént érintő duplikációt és a fehér pártaszínt. Ezek alapján 5 kelet-mexikói államot neveztek meg elsődleges domesztikációs központnak, és egy északnyugat-mexikói államot másodlagos központnak (Loaiza-Figueroa et al., 1989) (1. ábra A).

Egy újabb publikációban (Aguilar-Melédez et al., 2009) a vizsgált 80 mexikói genotípus esetén a genetikai sokféleséget három alacsony kópiaszámú, sejtmagi lókuszt (*Dhn*, *G3pdh* és *Waxy*) szekvenciális variabilitásával jellemezték. Az általuk kapott eredmények alapján, a *Capsicum annuum* termesztésbe vonása többször, egymástól függetlenül, eltérő mexikói helyszíneken, széles körben, vadon elterjedt populációkból történhetett meg, és ebben a folyamatban kiemelt szerepe lehetett a Jukatán félszigetnek (1. ábra A).

A kérdésben végeztek egy komplex vizsgálatot (Kraft et al., 2014) is, ahol a domesztikáció helyének meghatározásához együttesen használták fel az egyes területekhez köthető archeobotanikai leleteket, a nyelvészeti, ökológiai és a mikroszatelit vizsgálatból származó adatokat. Ez a megközelítés megerősítette és pontosítani tudta a Loaiza-Figueroa és munkatársai által meghatározott elsődleges domesztikációs központot. Ráadásul alacsonyabb valószínűség mellett megnevezett egy új, a korábban megjelölt régiókhoz képest délebbre fekvő másodlagos központot is (1. ábra B).

4.1.3. ‘Tepin’, a termesztett paprika botanikai őse

A *C. annuum*-ra jellemző, hogy két pár akrocentrikus kromoszómával rendelkezik, ez a kariotípus a vad változatok közül mindössze néhány közép-mexikói *Capsicum*-ra jellemző. Ez az egyedi kariotípus változat alapján Pickersgill (1971, 1988, 1991) feltételezte, hogy a *C. annuum* var. *glabriusculum* a vadon élő őse a termesztett *C. annuum* var. *annuum*-nak, ezt a feltevést több publikációban is megerősítették (Aguilar-Melédez et al., 2009; González-Jara et al., 2011). A ‘Tepin’ problémamentesen keresztezhető a meglévő *C. annuum*-hoz tartozó fajtákkal.

A madárpaprika (*Capsicum annuum* var. *aviculare*, syn. *C. annuum* var. *glabriusculum*) köznapi nevén ‘Tepin’, chil’Tepin’ vagy chiltecpin. A ‘Tepin’ elnevezés a nahuatl nyelvből származó tepcin szóból ered, ami bolhát jelent és az apró termések elfogyasztásával járó heves, de gyorsan elillanó csípősségérzetre utal. Észak- és Közép-Amerikában több helyen vadon is előfordul, Arizona és Mexikó egyes körzeteiben a termését saját felhasználásra és eladásra is gyűjtik (Anderson, H. A., 2016).

A ‘Tepin’ növényre jellemző, hogy többszörösen elágazó vékony szára akár a két méteres magasságot is elérheti. Levelei aránylag hosszú (1-2,5 cm) és vékony levélnyélén ülnek és szélességük 1-4 cm, hosszúságuk 1-6 cm között változik. (Nabhan, 1985). A 1,5-2 mm-es

csészével és 6-9 mm- es pártával rendelkező virágai egyesével jelennek meg a növényen (Nabhan, 1985).

A madárpaprika termése kicsi (kb. 1 cm hosszúságú), felálló, zöldről pirosra érő, igen csípős és puha húsú felfűjt bogyótermés (Votava et al., 2002). A ‘Tepin’ termései a *Capsicum annuum* fajon belül jelentős kapszaicin-tartalommal jellemezhetőek (70000-75000 SHU) (Kumar et al., 2006). A termésben található magok sárgás vagy fehér színűek és 2,5-3 mm nagyságúak. Az érett gyümölcsök a kocsányról könnyen, maguktól leválnak. A gyümölcssevő madarak szívesen fogyasztják a termését, a benne lévő csípősségéért felelős alkaloidról (kapszaicin) kimutatták, hogy a legtöbb növényevőt elriasztja, de a madarakra nincs táplálkozást gátló, riasztó hatása (Tewksbury és Nabhan, 2001). Miután a madarak elfogyasztják a termést, a magok az emésztőrendszerükön sértetlenül áthaladnak, és a anyanövénytől távolabbi, új helyen érnek földet. A magok madarak általi terjesztése meghatározó a ‘Tepin’ esetében (Votava et al., 2002).

4.1.4. Morfológiai változások a termesztésbe vonást követően

A vad és a jelenleg termesztésben alkalmazott változatok közti különbségek pusztán szemmel is jól láthatóak, azonban a domesztikáció, a szelekció és a nemesítés hatására lejátszódott morfológiai változások genetikai és molekuláris hátterére vonatkozó tudásunk csekély. Néhány fontos tulajdonság esetén ismerünk kulcsfontosságú géneket és ezek öröklődését, de előfordulhatnak további ezeket a tulajdonságokat befolyásoló, eddig fel nem fedezett módosító elemek és szabályzási útvonalak.

A legnagyobb területen termesztett fajták a *Capsicum annuum* fajhoz tartoznak, amely nagymértékű variabilitást mutat, különösen a termés egyes minőségi és mennyiségi tulajdonságaiban. A paprika házasítása során jelentősen megváltozott. Először feltehetően két fontos tulajdonságban következett be változás. Az egyik a termések érés közbeni hullása volt, mert ennek elmaradásával a termések a szedésig a növényen maradtak (Paran et al., 2007). A másik a termések állása volt, ami felálló típusúról csüngő típusúra változott. Ezutóbbi változás együtt járhatott a termés méret és a ragadozó madarakkal szembeni védelem növekedésével is (Paran et al., 2007).

Egyéb változások (csökkent csípősség, kedvező termésminőség) is összefüggést mutatnak a domesztikációval. A további szelekció lehetővé tette a termés méret nagymértékű növekedését és a termés új alakváltozatainak megjelenését. A vad típusra főleg a gömbölyű

vagy szív alakú termések jellemzőek, de előfordulnak ovális vagy hosszúkás termésű változatok is. Bizonyos alakváltozatok (kúpos blocky, hosszú hegyes) már a domesztikáció korainak tekinthető stádiumában, a mexikói tájfajtáknál is megjelentek (Taitano et al., 2018). A további szelekció során rengeteg további átmeneti és szélsőséges változat is megjelent (Paran et al., 2007).

A termésszín esetén a vörös tekinthető a „vad” típusnak, ez a szín ráadásul minden termesztett paprikafajban előfordul. Az emberi tevékenységnek köszönhetően ma már ismerünk sárga, narancssárga, barna és fehér színűre érő változatokat is.

Végül egy másik fontos szelekciós feladat volt a csípősségmentes változatok kiválasztása. Az első, termesztésben is használt édes változatot a XVIII. Században írták le (Boswell, 1937). A legtöbb édes változat a *Capsicum annum* fajhoz tartozik, de más fajok is felhasználhatóak ennek a tulajdonságnak a forrásaként. A gazdasági szempontból meghatározó fajták többsége az édes típusok közül kerül ki (Bosland et al., 2012). A magyar termesztésben legfontosabb típusok is csípmentesek, a hajtató berendezésekben legnagyobb arányban az édes, fehér, töltenivaló típust, a szabadföldön többnyire kápiát vagy paradicsompaprikát termesztenek.

4.1.5. Genetikai sokféleség alakulása a domesztikáció során

A termesztésbe vonáskor feltehetően néhány anyató, vagy kisebb populáció került be a termesztési rendszerbe, és ezeknek az utódai adják a termesztett faj genetikai variabilitásának bázisát. Az egyedek kiemelésekor az ún. genetikai palacknyak-hatás következtében a fajok a domesztikáció során veszítenek genetikai variabilitásukból (Tanksley & McCouch, 1997, Eyre-Walker et al., 1998 , Gepts, 2004).

A domesztikációt követően a nemesítési munka is képes tovább csökkenteni a genetikai sokféleséget (Tanksley & McCouch, 1997). A csökkenés mértéke fajonként változó lehet, de általában a vad fajban szereplő genetikai variabilitás kétharmada elveszik a domesztikációs és fajtafejlesztési folyamat során (Buckler et al., 2001).

Több markerezési rendszerrel (SSR, RAMPO) vizsgálva a 3 kevésbé elterjedten termesztett paprikafaj (pl: *C. baccatum*, *C. chinense* és *C. frutescens*) genetikai szempontból jelentősen változatosabbnak bizonyult a *Capsicum annum* elterjedten termesztett genotípusaihoz viszonyítva (Rai et al., 2013).

A paprika nemesítési folyamata során a kiemelkedő, meghatározó típusok (pl: Californian Wonder) sokszoros felhasználásával, azok allélkombinációja feldúsult és a variabilitás tovább csökkent (Ince et al., 2009). Ezt bizonyítja, hogy a fajtanemesítés által előállított, emelt értékű, nagy területen termesztett fajták jelentősen kisebb genetikai sokféleséget mutatnak a vad, félvad és a tájfajtákhoz képest is (Oyama et al., 2006).

Ahogy a morfológiai változások esetén említettük, a kapszaicinmentes változatok később kerültek felfedezésre. Molekuláris marker alapú összehasonlítás alapján a termesztett *Capsicum annuum* fajták közül egyértelműen a csípős változatok között maradt fenn nagyobb mértékű genetikai sokféleség (Ortiz et al., 2010).

4.1.6. A paprika útja Amerikán kívül és megjelenése a Kárpát-medencében

A paprika feltehetően Kolumbusz Kristóf első útjáról hazatérő hajókkal érkezett először Európába, mint egy borsos ízű fűszernövény (Idrees et al., 2020). Ebből adódóan Spanyolország a *Capsicum annuum* faj esetén a genetikai diverzitás egy másodlagos központjának tekinthető (Crosby, 2008). Ezt alátámasztja az is, hogy *C. annuum* fajhoz köthető fajtákra és termékekre Spanyolországban van a legtöbb uniós oltalom alatt álló eredetmegjelölés (OEM) és oltalom alatt álló földrajzi jelzés (OFJ) is (Pereira-Dias et al., 2019).

A hagyományos fekete bors alternatívájaként a paprika gyorsan terjedt Európában, Afrikában és Ázsiában is. Az arab világba portugál hajósok vitték el a paprikát, és ezekben az országokban is nagy népszerűsége tett szert. Nagyjából fél évszázad alatt eljutott Ázsiáig is, és világszerte változatos formában épült be az étkezési kultúrába (Idrees et al., 2020). A Kárpát-medencébe először az Oszmán Birodalom közvetítésével érkezett meg (Andrews, 1984).

A friss fogyasztásra alkalmas változatok a XIX. század előtt ismeretlenek voltak hazánkban. A paprika zöldségnövényként való termesztését a XIX. század végén Bulgáriából betelepült kertészek hozták hazánkba (Zatykó, 2006). A termesztéstechnológián felül több különböző fajtaváltozatot (pl: paradicsomalakú, kosszarv) is meghonosítottak és ezeket pozitív egyedszelekcióval fenn is tartották (Czibulya, 1987). A bogysiszlói, erős, vastag, fehér húsú, méltán híres változat is hozzájuk köthető.

4.1.7. A 'Fehér özön' fajtát megalapozó hazai szelekciós események és nemesítési munka

Ezt követően az ország különböző területein a termelői szelekció lehetővé tette a helyi viszonyoknak megfelelő tájfajták kialakulását. A legfontosabb ilyen tájfajta Cece termelőihez köthető, akik az 1920-as években egy széles vállú, megnyújtott kúp alakú és igen ritka, fehér húsú változatot emeltek ki (Zatykó, 2006). Ez a tájfajta adta az alapját a mai napig is a legnagyobb mennyiségben fogyasztott, nemzetközi szinten is ismert Fehér töltenivaló (Hungarian white) típusnak. Az első cecei típusok enyhén csípősek és rendkívül jó ízűek voltak (Zatykó, 2006).

Angeli Lambert volt az első nemesítő, aki a Cecei tájfajta populációit egy szervezett nemesítési program keretein belül szelektálta. Az ő nevéhez köthető az első nagy bogyójú, édes változat a 'Cecei 3' (Cecei Sweet 3) 1953-as regisztrációja. Ennek a fajtának a bevezetésével a hazai paprika termesztés hozama megduplázódott és a paprika fogyasztás is ugrásszerűen növekedett. 1960-ra az évi fogyasztás megközelítette a 200 ezer tonnás mennyiséget (Zatykó, 2006).

Angeli kezdte el a csokros növekedésű paprikavonalak és -fajták nemesítését is, ezek előállításához a *C. annuum cv. fasciculatum* különböző típusait használta fel. Ennek a programnak a sikerét sajnos nem élhette meg (Zatykó, 2006). Kollegái folytatták a munkát és ebből a programból került ki a nagysikerű, országszerte termesztett, az 1980-ban regisztrált, és a mai napig a nemzeti fajtajegyzéken szereplő 'Fehér özön' konstans fajta (Nemzeti fajtajegyzék, 2019).

A hetvenes években a cecei típus szabadföldi termésmennyisége jelentősen csökkent az uborkamozzaik vírus (CMV) fertőzések hatására, eközben jelentősen növekedett a fóliás berendezésekben történő hajtatás. A Túri István által nemesített első fajta a 'Soroksári hajtató' (konstans) rövid időn belül meghatározóvá vált a hajtatásban. Az 1980-as években azonban, mind a hajtatóberendezésekben, mind a szabadföldön a 'Fehér özön' lett meghatározó (Zatykó, 2006).

A 'Fehér özön', egy Zatykó Lajos nemesítette, determinált növekedésű, dohány mozaikvírussal (TMV) szemben rezisztens fajta. Felálló termése édes, fehér, kúp alakú; átlagos tömege 90-100 g, hossza 10-14 cm, vállátmérője 5-7 cm. Tartalmazza a TMV rezisztenciát biztosító *L1* gént, és a takácsatka kártétellel szemben is toleráns (Zatykó, 2006, Slezák, 2001). "Ez a fajta egy ideális csokros típus, ami hajtatott termesztés mellett

szabadföldre ültetve, sőt helyre vetve is kiváló terméseredményeket adott. Bizonyára ez a minden idők legnagyobb felületen termesztett étkezési típusú magyar fajtája.”(Csilléry, 2013). A vetőmag piacon más növényekhez hasonlóan, a paprika esetén is a hibridek váltak meghatározóvá, de a ‘Fehér özön’ a mai napig kereskedelmi forgalomban tudott maradni.

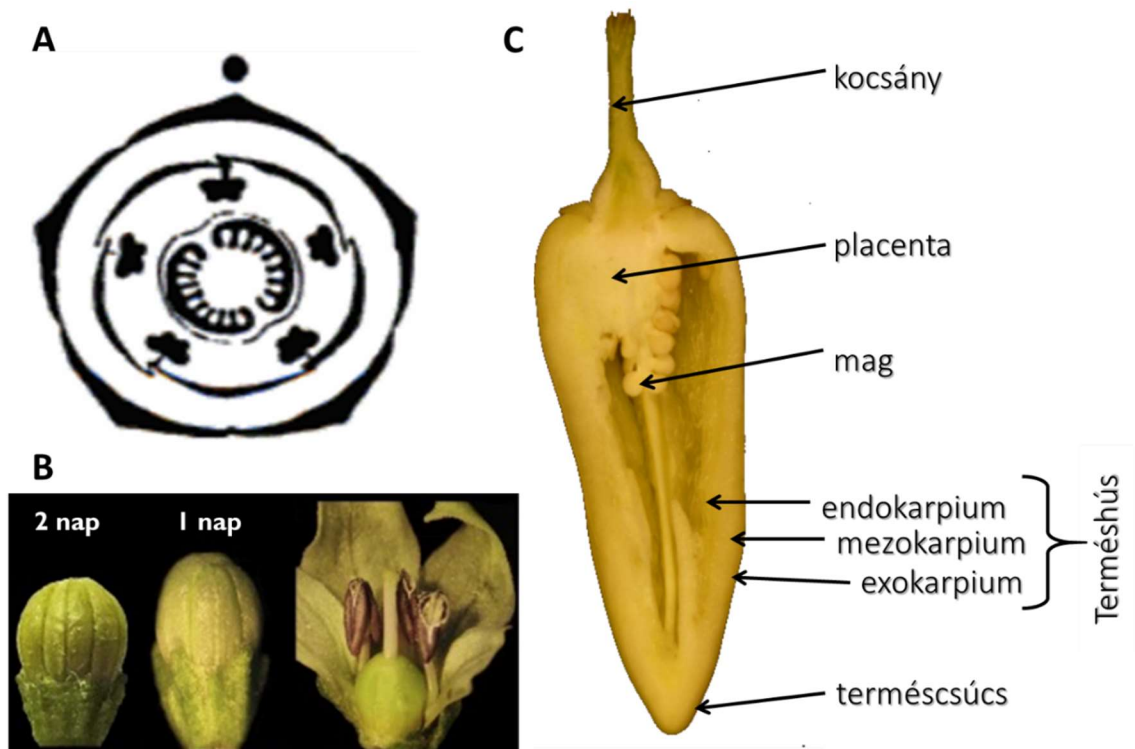
4.2. Szaporodásbiológiai jellemzők

4.2.1. A paprikavirág és a belőle képződő termés legfontosabb jellemzői.

A *Capsicum* fajokra jellemző, hogy sugaras, általában öttagú virágaik hímnősek (2. ábra A), és magházuk felső állású. Az összeforrt pártát alkotó szíromlevelek száma a legtöbb fajnál 5 és 7 között változhat, ezek általában 10-20 mm hosszúak. Jellemzően önbeporzók; általában körülbelül 17% kereszt-beporzás történik szél vagy rovarok által (Idrees et al., 2020). A termesztett *Capsicum annuum* virágai 10-15 mm átmérőjűek és többnyire hat szíromlevéllel rendelkeznek (2. ábra B) (Munting, 1974, Bosland et al., 2012). A vad változatok virágai kisebbek, és a legtöbb esetben 5 szirmúak (Munting, 1974, Bosland et al., 2012).

A virág színe fajtól függően változik, de a legtöbb faj esetén fehér színű. A *C. frutescens* zöldes virágszínű, míg a *C. eximium*, *C. pubescens* és a *C. cardenassi* fajokra elsődlegesen a lila virágszín jellemző. A *C. annuum* esetén is leírtak néhány genotípust, amire a lila virágszín jellemző (Bosland et al., 2012, Souza-Macedo et al., 2017).

A *C. annuum* virágai magányosan vagy ritka esetben párosan helyezkednek el. Egy növényen több, mint 100 virág is kialakulhat. A bekötött termések számának növekedésével a virágok kialakulása jelentősen csökken. Az első virágokból fejlődő termésekre jellemző, hogy nagyobb méretűre nőnek, mélyebb színűek és az általuk okozott csípős ízérzet intenzívebb (Bosland et al., 2012).



2. ábra A *Capsicum annum* generatív részei. **A:** A Solanaceae családra vonatkozó virágdiagramm (Soni, 2010). **B:** A paprikavirág fejlődése a pollenszórást megelőző napokon (Pérez-Pastrana et al., 2018) **C:** A termés részei a hosszszetszeti képen megjelölve (saját fotó).

A virágképződéshez az ideális hőmérséklet 16 és 21 °C között van. A paprikánál magas hőmérsékleten a virágelrűgés általános jelenség (Bosland et al., 2012). Jelentős számú virág elrűgására lehet számítani, amennyiben az éjszakai hőmérséklet 24 °C fölé emelkedik (Rylski & Spigelman, 1982). A 32 °C feletti és a 16°C alatti hőmérséklet is gátolja a virágok bekötését. A magas hőmérséklet a megporzás előtti 16-18 napon a pollen életképességének csökkentésével és a megporzás után a pollentömlő-növekedés és a megtermékenyítési folyamatok gátlásával komoly termés kiesést okozhat (Erickson & Markhart, 2002).

A *Capsicum annum* faj terméseire jellemző a rendkívül nagy formai variabilitás. A kettő-tíz termőlevélből összenőtt, felső állású termőből alakul ki a sokmagvú bogzótermés, ami rendkívül változatos alakú (blocky, gömbölyű, lapított gömb, kúpos, hosszú, hegyes) és mind gazdasági (fehér, zöld, lila), mind biológiai érettségben (piros, fehér, sárga, narancs, rózsaszín, zöld, barna, fekete) sokféle színű lehet. Kapszaicintartalmától függően édes vagy csípős ízű (Csilléry, 2006). A termést több különböző részre bonthatjuk (2. ábra C).

4.2.2. Termésfejlődési folyamatok

A burgonyafélék családjában a termés növekedése a megtermékenyítéstől kezdődik, annak ellenére, hogy a termések további fejlődése késhet vagy meg is szakadhat bizonyos kedvezőtlen termesztési feltételek hatására. Mivel a magszám általában nagymértékben befolyásolja a termés méretét és tömegét, a beporzás és a megtermékenyítés kulcsfontosságú a termésfejlődés folyamatában (Ho & Hewitt, 1986).

A *C. annuum*-ban a megtermékenyítés 20–28 órával a megporzást követően (HPP) történik meg (Tiwari et al., 2013). A paradicsomban hasonló idő alatt történik meg a megtermékenyítés (Iwahori 1966), míg az *Arabidopsis*-ban szignifikánsan gyorsabb ez a folyamat (5 HPP körül) (Faure et al., 2002). A fejlődő termésekben létrejön a magkezdemény (*ovolum*) és a hártvás válaszfal (*replum*) közötti vaszkuláris kapcsolat, ez a kapcsolat az abortálódó termésekben nem alakul ki (Tiwari et al., 2013).

Capsicum annuum L. cv. 'Trophy' fajtáján végzett vizsgálatban a következőket találták: A paprikatermés friss tömeg grammban nézve kezdetben meglehetősen lassan gyarapodik, de a relatív növekedési ráta (Relative Growth Rate, RGR) a korai fejlődés (12 DAA-ig) során magas (akár 33% is 24 óra alatt) értéket mutat. Ezen kezdeti időszak után egy intenzív tömegnövekedéssel (kb. napi 5 gramm) járó szakasz (30 DAA-ig) következik. A további szakaszokban a méretnövekedés üteme és az RGR tovább csökken. Ezt a szakaszt 3 részre bonthatjuk. A 30-40 DAA közti időszakot a kicsit lassabb, de még jelentős tömeggyarapodás (naponta kb. 4 g friss tömeg) jellemzi. A 40-55 DAA közti időszakban a növekedés üteme jelentősen lelassul (napi 1,5 gramm alatti növekedés). Az utolsó szakaszban, az 55. nap után a friss tömeg mérhetően csökken. Ez a növekedési mintázat azt jelzi, hogy a friss tömeget eredményező bioszintetikus aktivitás magas a gyümölcs korai fejlődése során, majd fokozatosan (több lépcsőben) csökken (Nielsen et al., 1991).

Egy korábbi vizsgálatban egy *Capsicum annuum L. var. minimum (Mill.)* és egy *Capsicum annuum L. var. annuum 'Chile cascabel'* fajtán végeztek hasonló méréseket. Itt a bogyóméret növekedését követték, és azt tapasztalták, hogy az előző vizsgálattal összefüggésben a hossz és az átmérő is az elején nagyobb mértékben növekedett, és folyamatosan lassuló növekedéssel érte el a maximális méretét (Munting, 1974). Ezeknél a fajtáknál (a *'Trophy'*-hoz viszonyítva) ez hamarabbi időpontban következett be, a kisebb bogyójúnál

(*Capsicum annuum L. var. minimum*) kb. a 20. napon, a 'Chile cascabel' fajtánál a 28. napon történt meg.

Munting (1974) tintával jelölt bogyók növekedését követve megállapította, hogy a növekedési zóna a bogyók kocsányhoz közeli, alapi részén helyezkedik el. Akárcsak a paradicsom és a lúdfű esetében, a paprikatermésnél is a sejtosztódás és a sejtmegegyülés okozza a magház termékenyülést követő gyors növekedését (Nitsch 1970, Cheniclet et al., 2005, Tiwari et al., 2013).

A paprika korai növekedési szakaszában a sejtosztódás a meghatározóbb a termés méret növekedésében, akárcsak a lopótök és a paradicsom esetében (Quan Yu et al., 2001, Bertin 2005). Paprikában a későbbi termésnövekedést a sejtmegegyülés határozza meg, akárcsak a paradicsom (Gillaspy et al., 1993), az uborka (Marcelis és Hofman-Eijer 1993) és a japánkajsi (Matsumoto et al., 2008) esetén, ahol a korai növekedés után a sejtosztódás megszűnik, és a gyümölcsök későbbi növekedése a sejtek expansziójával és intercelluláris terek kialakulásával valósul meg.

A termésfejlődés során a metabolitok változásával sok tanulmány foglalkozott. Az első gyors növekedési fázisban lignint és szabad fenolos vegyületeket magas koncentrációban és minimális kapszaicin tartalmat találtak, valamint jelentős peroxidáz aktivitást és markáns hexóz (fruktóz, glükóz) akkumulációt figyeltek meg. A következő lassuló növekedési fázisban a szacharóz és a keményítő felhalmozódása, a peroxidáz-aktivitás csökkenése, a glükóz, a fruktóz, a lignin és a fenolos vegyületek csökkenése és a kapszaicinszint lassú emelkedése volt jellemző (Nielsen et al., 1991, Estrada et al., 2000).

A termésérés a termésfejlődés utolsó fázisa, ennek biológiai célja a gyümölcscsőzövetet kívánatosá tenni az azokat elfogyasztó állatok számára, és ezáltal biztosítani a magvak elterjesztését. Az érés során általánosan jellemző a keményítőtörés, a fokozott pigment bioszintézis és az íz- és aromaanyagok feldúsulása (Seymour et al., 1993). A paprikában azt találták, hogy a lignin, a fenolos vegyületek koncentrációja és a peroxidáz aktivitása tovább csökken, a szacharóz és a keményítő törésével egyszerű cukrok keletkeznek és a kapszaicin-szint és a C-vitamin tartalom is emelkedik (Nielsen et al., 1991, Estrada et al., 2000, Nagy et al., 2015). Ezeket a biokémiai folyamatokat jelentősen befolyásolhatja a genotípus és a termesztési körülmények (Nagy et al., 2015., Barbero et al., 2016).

A paprika termésfejlődése és termésérése során a respirációban és az etilénprodukciónban nem tapasztalható növekedés, és ezt ethephor/propilén kezeléssel sem lehetett kiváltani (Finger és Pereira, 2016, Pretel et al., 1995). A paprika utóérését a nem klimaktérikus jellegűek közé sorolták. A termések utóérőek, tehát az érés megfelelő körülmények között a szedés után is folytatódhat. Az utóérés jellege és sebessége fajtánként eltérő lehet, egyes fajták külső etilénkezelésre érzéketlenek, mások jól reagálnak (Finger & Pereira, 2016).

Az utóérésre általánosan jellemző, hogy ha a termést egy bizonyos állapot előtt szedjük az utóérés nem tud lezajlani, illetve hogy a hőmérséklet emelkedésével az érési folyamat felgyorsul. A szedés után az utóéréssel párhuzamosan a lebontó folyamatok is megkezdődnek, és a termés víztartalma és egyes összetevőinek (pl: cukrok, C vitamin) koncentrációja is növekvő ütemben csökken, és eljut a túlrett stádiumba.

4.3. A termés elkülönülő részei

4.3.1. Terméshús (*perikarpium*)

A perikarpium (2. ábra C) vagy terméshús alatt a termés teljes falát értjük, ami érettségtől és színezettségtől függően lehet zöld, lila, fehér, barna, sárga vagy piros. A perikarpiumot három további részre lehet osztani:

A termést kívülről borító fényes, viaszos, védelmi funkciót ellátó egysejtréteget exokarpiumnak nevezzük (2. ábra C). Ebben a rétegben antiklinális sejtosztódás történik, azaz a sejtek a felszínre merőleges síkban osztódnak (Munting, 1974). Így az adott szövet felülete növekszik, míg sejtrétegszáma változatlan marad. A termésfejlődés során az exocarpium sejtszelei kisméretűek maradnak, sejtfaluk megvastagszik és jelentős kutikularéteget képeznek (Munting, 1974).

A középső soksejtes réteget mezokarpiumnak nevezzük, ezek a sejtek adják a termésfal legnagyobb hányadát, és itt tárolódik a termés víztartalmának nagy része (2. ábra C). Ebben a rétegben antiklinális (felületnövekedéssel járó) és periklinális (réteg vastagodásával járó) sejtosztódás is történik. Ugyanezt a sejtosztódási mintázatot írták le a *Solanum lycopersicum*-ban és a *Lagenaria leucanthaban*-ban is (Varga & Bruinsma 1976, Quan Yu et al., 2001, Cheniclet et al., 2005). A sejtosztódáson kívül itt jelentős sejtmelegnyúlás is végbemegy a termésfejlődés során.

A mezokarp rétegekben egyértelmű sejtméretgradiens alakul ki. Az exokarphoz közel a sejtek kisebbek és laposabbak, a középső részen lekerekítettek és viszonylag izodiametrikusak, az endokarpium felé haladva egyre nagyobbak és hosszúkásabbak (Tiwari et al., 2013).

A paradicsom bogyóban a sejtek expansziós folyamatát szabályozó gének (γ TIP és PRP) és az ezeket szabályozó egyes folyamatok (pl: auxin és gibberelinsav válasz, transzkripciós szabályzás) kulcsgénjei egy gradiens mentén expresszálódnak, expressziójuk a belső résztől a külső rész felé haladva egyre csökken. Feltehetően ez alakítja ki a gradiens mentén változó méretű sejteket (Lemaire-Chamley et al., 2005), amit paprikában is megfigyelhetünk.

A belső, vékony, hártyszerű réteget endokarpiumnak (2. ábra C) nevezzük, ez két sejsorból áll, egy sorban normál és egy sorban óriássejteket találunk. Erre a rétegre is az antiklinális sejtosztódás jellemző, ezért az osztódási szakasz végére is kétrétegű marad (Tiwari et al., 2013). A természetes fejlődés során az endokarpium legbelső sejtjei megmaradnak kisméretűnek, míg az óriás endokarp sejtek jelentős sejtmegegyüléson mennek át. Az óriássejtek sejtfa megvastagszik, az endokarpium belső sejsorában vékony és vastag falú sejtek vegyesen fordulnak elő (Munting, 1974).

A paprikát elsősorban a húzáért termesztjük. 2018-ban Magyarországon közel 120 ezer tonna termést takarítottak be a gazdák. Ez több, mint 30 milliárdos bruttó termelési értéket jelentett, ami a teljes zöldségágazat bruttó termelési értékének (182M) 17,34%-át adta (KSH, 2019).

4.3.2. Mag (*ovulum, semen*)

A magkezdeményből kialakul a zárvatermőkre jellemző szaporítószerv, a mag. Ennek fő feladata, hogy biztosítsa a fejlődő utód sikerességét. A magok fontos szerepet játszanak a kötések számában és a termésméret növelésében is (Rylski, 1986, Khah és Passam, 1992), azonban a termés tömege és a termésenkénti magok száma között nem mindig figyelhető meg egyértelmű összefüggés (Bakker, 1989). A magok érése a megporzás után akár 25 nap alatt is lejátszódhat, azonban ez és a termésenkénti magszám is jelentősen függ a genotípustól és a termesztési körülményektől. A magnak három fő részét különíthetjük el: az embriót, a táplálósövetet és a maghéjat (Nyakas, 2006).

A női ivarsejt megtermékenyítésével alakul ki a zigóta, ami jól meghatározott sejtosztódásokkal embrióvá fejlődik (Yadegari & Drews, 2004). A kétszikű növényeknél a

mag képződése során az embrió az alábbi stádiumokon megy át: szív (két sziklevédudor megjelenése), torpedó (sziklevek kialakulása) és bipoláris embrió (differentiálódott gyökér- és hajtáscsúcs) (Nyakas, 2006).

A kettős megtermékenyítés során a petesejt mellett az embriózsák központi sejtje is megtermékenyül. A megtermékenyített központi sejtből fejlődik ki a mag különleges (triploid) táplálószövege, az endospermium (Nyakas, 2006). Az embrió és a maghéj közti teret ez a szövet tölti ki. A paprikaembriókat endospermium veszi körül, ami tartalmazza az embrió és a fiatal csíranövény táplálékszükségletének kielégítéséhez szükséges anyagok nagy részét (Cochran, 1938).

A maghéj a magkezdemény integumentumaiból fejlődik ki, elsődleges funkciója az embriók fizikai védelme (Nyakas, 2006). Egyes fajoknál késleltetheti a csírázást, de a paprika esetén a maghéj nem jelent mechanikai korlátot a csírázásban (Watkins & Cantliffe, 1983).

A magok sima felületűek, lapított vese alakúak, ezermagtömegük 5–7 g (Gyúros, 2004). Az öt termesztett faj közül a (barna, fekete magszínű) *C. pubescens* kivételével fehér, sárga vagy krémszínűek (Csilléry, 2006) (2. ábra C). A paprikamagok ideális körülmények között tárolva akár 50 év múltán is életképesek maradnak. A 25 °C feletti hőmérséklet és a magas relatív páratartalom drámai csökkenést okozhat a magok életképességében (Berke, 2000).

A magra jellemző, hogy a termésfejlődés során mind a friss tömege, mind a szárazanyagtartalma jelentősen növekszik. A relatív szárazanyagtartalom a kezdeti időszakban megegyezik a többi termésrészre jellemző értékkel (10-15%), azonban a 28.-30. nap után ugrásszerűen megemelkedik (kb. 50%-ra). A magok az érett termésben mért friss tömegnek csekély (1-2%) hányadát adják, viszont a szárazanyagtartalom akár 18%-át is adhatják (Marcelis & Hofman-Eijer, 1995).

Több tanulmány is beszámolt a paprikamagok magas fehérje, lipid és ásványi anyag tartalmáról (Zou et al., 2015, El-Adawy & Taha 2001). Továbbá a *Capsicum annuum* faj esetén bizonyították olyan magas antioxidáns hatású vegyületek jelentős mértékű jelenlétét, mint a polifenolok, karotenoidok vagy a terpének (Silva et al., 2013). A magban viszonylag alacsony a kapszaicinszint a placentához képest.

Paprikamagok esetén is megfigyelhető a magok természetes nyugalmi állapota, a dormancia jelensége. Korábban igazolták, hogy a piquin/'Tepin' paprika magjainál ez markánsabban

megjelenik, és ez sok esetben alacsony mértékű és egyenetlen csírázást eredményez (De la Rosa et al., 2012, Alcalá-Rico et al., 2019).

A paprikanövényeken előállított termékek közül a legértékesebb a vetőmag. Előállítása nagy odafigyelést és sok kézimunkaerőt igényel. A vetőmagok árai függenek a típustól a fajtától, a cégtől az előállítási költségektől, és az értékesítési országtól is. A paprika vetőmagjainak hazai szemenkénti ára 1,5 és 40 forint közé tehető.

4.3.3. Magléc (*Placenta*)

A magház falának azon részét, ahol a magkezdemények ülnek, maglécnek (*placenta*) nevezzük. A magkezdemények köldökzsinórral (*funiculus*) kapcsolódnak a placentához (Nyakas, 2006). A paprikára az axiális, tengelyi placentáció a jellemző, a placentális szövetek nagy része közvetlenül a kocsány alatt helyezkedik el (Zhigila et al., 2014) (2. ábra C).

A paprikában található egy speciális vegyületcsalád, a kapszaicinoidok, amelyek kizárólag a *Capsicum* nemzetségre jellemzőek (Govindarajan et al., 1987; Gopveindarajan & Sathyanarayana, 1991), és a placentában halmozódnak fel. Az erős paprikák fogyasztása során fellépő csípős ízérzetért 90%-ban két vegyület (a kapszaicin és a dihidro-kapszaicin) a felelős (Kosuge & Furuta, 1970, Reyes-Escogido, 2011). Ezeket a másodlagos metabolitokat egy komplex reakciósorozat képezi, amely több sejten belüli egységben (mitokondrium és plasztisz) zajlik és a fenilpropanoid és az elágazó láncú zsírsav bioszintézis utakat is magában foglalja (Naves et al., 2019). A paprikák csípősségét a kapszaicin relatív mennyiségét mutató Scoville-féle (Scoville, 1912) csípősségi egységben (SHU) szokták kifejezni. A nagy SHU-val rendelkező fajták termésében általában több placentális szövetet találunk.

A magléc relatív szárazanyagtartalma a termésfejlődés során nagyjából állandó marad (10-15%). A termés összes szárazanyagtartalmának a placentális szövetek kezdetben nagy arányát, 40-50%-át adják, a terméshús intenzív növekedésével a placenta egyre kisebb mértékben járul hozzá a szárazanyagtartalomhoz. A 28.-30. napon a szárazanyagtartalom 75-85%-át már a terméshús, 10-15%-át a placenta, a többit a mag adja. Ezek az értékek a későbbi stádiumokban jelentősen nem változnak (Marcelis & Hofman-Eijer, 1995).

Az EU és az FDA jóváhagyta a kapszaicint gyógyszerként a neuropátiás fájdalom lokális kezelésére, azonban fájdalomcsillapító hatása erősen dóziszfüggő. Ezen farmakológiai hatás alapján a kapszaicint gyakorlatban is alkalmazzák fájdalmas állapotok és rendellenességek

(pl: krónikus reumás fájdalom, herpesz utáni neuralgia, fájdalmas diabéteszes neuropátia és osteoarthritis) kezelésére (Baenas et al., 2019).

4.4. Az általunk alkalmazott VIGS vektorok alapját adó növényi vírusok

4.4.1. A paprika, mint vírusgazda

A növényi vírusok felfedezése és a vírus elnevezés is Dimitrij Ivanovszkij nevéhez fűződik (1892), aki fertőzött dohányból nyert és baktériumszűrőn átengedett növényi nedvvel, sikeresen fertőzött meg egészséges növényeket. Ez volt az első vírus, amelyet leírtak és később az általa okozott tünetek miatt a dohánymozzaikvírus (TMV) nevet kapta. Azóta számos különféle vírust találtak növényekben, egy 2006-os becslés szerint 1000-nél több növényi vírus fordul elő a világban (Gergerich & Dolja, 2006).

A *Capsicum* nemzetség tagjai sokféle vírusfaj fertőzésére érzékenyek. A paprikában a vírushatás által kiváltott tünetek is sokfélék lehetnek: enyhe levélklorózis, levél hullámosodás, lokális nekrosis, hervadás, teljes pusztulás. Ám önmagában a tünetek alapján ritkán lehetséges a vírus pontos diagnosztizálása, mivel több vírusfaj is okozhat nagyon hasonló tüneteket (Kenyon et al., 2014).

Hanssen és munkatársai 2010-ben egy összefoglaló tanulmányban mindössze 49 vírusfajt listáztak, amelyek képesek megfertőzni a paprikanövényt (ami igen kevés a paradicsomot fertőző 136 vírusfajhoz képest), amelyek között körülbelül 20 olyan volt, amely jelentős kárt is okoz a paprikanövényekben. Azóta jelentős számú a paprikát fertőző vírus került leírásra, ezek nagyrésze rovarvektorok által terjesztett és a trópusi vagy a szubtrópusi klímán fordul elő. Például 2003 (Pernezny et al., 2003) és 2014 (Kenyon et al., 2014) között a paprikából leírt begomovírusok száma 6-ról 43-ra nőtt míg a tospovírusok száma 3-ról 13-ra.

4.4.2. Dohánymozzaik vírus

A *Virgaviridae* víruscsalád, *Tobamovirus* nemzetségére jellemző, hogy a vírusgenomot egy RNS-molekula hordozza, a köpenyfehérje 17-18 kDa nagyságú és a nemzetség minden tagja mechanikus úton átvihető (Adams et al., 2009). A *Tobamovirus* nemzetségbe tartozó vírusok száma jelentősen növekedett az elmúlt években 22-ről (Faquet et al., 2005), négy év alatt 25-re (Adams et al., 2009), majd elérte a jelenlegi 37 regisztrált fajt (ICTV, 2018). A nemzetség természetes gazdanövényei a *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Cactaceae*, *Fabaceae*, *Passifloraceae*, *Apocynaceae*, *Gesneriaceae* és

Orchidaceae családokba sorolhatóak. 11 elismert tobamo vírusfajról (1. táblázat) írták, hogy képesek megfertőzni a paprikát (TMV, ToMV, TMGMV, PaMMV, PMMoV, BePMV, ObPV, RMV, ORSV, SHMV). A két legújabban elismert paprikapathogén tobamovírus a ToBRFV és a BPeMV.

1. táblázat Paprikapathogén tobamovírusok.

Elnevezés	Rövidítés	Referencia
Bell pepper mosaic virus	BPeMV	Feldman & Oremianer, 1972
Obuda pepper virus	ObPV/DYFV	Salamon et al., 1987
Odontoglossum ringspot virus	ORSV	Salamon & Némethy, 1988
Paprika mild mottle virus	PaMMV	Rast, 1979
Pepper mild mottle virus	PMMoV	McKinney, 1952
Ribgrass mosaic virus	RMV	Wetter, 1986
Sunn-hemp mosaic virus	SHMV	Capoor, 1950
Tobacco mild green mosaic virus	TMGMV	McKinney, 1929
Tobacco mosaic virus	TMV	Mayer, 1886
Tomato Brown Rugose Fruit Virus	ToBRFV	Cambrón-Crisantos et al., 2018, Panno et al., 2020
Tomato mosaic virus	ToMV	Clinton, 1909

A nemzetség (Toba-mo-virus) névadó és típusfaja a dohánymozaik vírus, az elsőként felfedezett növényvírus, a virológia fontos modellvírusa.

A tobamovírusok mechanikusan könnyen elterjednek, magokban és növényi törmelékben és például üvegházi felületeken (Spence et al., 2001), de még a drénvízben is fennmaradhatnak (Rosario et al., 2009). A TMV-fertőzött paprikanövényeken általában megfigyelhető a klorotikus mozaik, és a fiatalabb levelek és gyümölcsök torzulása is (Nemes & Salánki, 2020).

A tobamovírusok genomját egyetlen, pozitív, egyszálú a fajoktól függően változó méretű (6300-6500 nt) RNS-molekula képezi, amely a köpenyfehérje eltávolítása után is képes fertőzni (Brunt et al., 1996). A vírus RNS stabilitásához feltétlen szükséges, hogy a végek az RNázok számára hozzáférhetetlenek legyenek. A TMV genomi RNS-ének az 5'-végét cap struktúra, 3' végét egy aminosavat (hisztidint) kötő tRNS-szerű struktúra zárja le (Matthews & Hull, 2002).

A TMV genom négy nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, amelyek négy proteint kódolnak: egy a metil-transzferáz (MT) és RNS helikáz (HEL) doméneket tartalmazó 126 kDa

fehérjét, egy átolvasással transzlálódó RNS-függő RNS-polimeráz (RDRP) domént tartalmazó 183 kDa méretű fehérjét, a 30 kDa-os sejtről sejtre törénő mozgást lehetővé tevő mozgásfehérjét (MP) és a 17,5 kDa-os köpenyfehérjét (CP) (Faquet et al., 2005, Goelet et al., 1982, Lewandowski & Dawson, 2000). További két lehetséges ORF-t is azonosítottak, ORF5 (54 kDa fehérje) és ORF6 (4-5kDa fehérje) (Sulzinski et al., 1985, Morozov et al., 1993).

A virionokban a csekély tömegű (kb. a virion 5%-át adó) genomi RNS-t megközelítőleg 2600 az ORF4-ről transzlálódó 17.5 kDa molekulatömegű köpenyfehérje (CP) alegységből felépülő helikális fehérjekomplex veszi körbe. A viriont felépítő fehérjekomplex kismértékben növényi eredetű fehérjéket is tartalmazhat (Matthews & Hull, 2002). A TMV virionjai merev pálcika alakúak, hosszúságuk 300 nm, szélességük 17-18 nm (Brunt et al., 1996).

A *Capsicum* fajokban a tobamovírusok elleni rezisztencia hiperszenzitív reakcióként (HR) nyilvánul meg, és az inokulálási helyeken lokális léziók keletkeznek. Ezt a rezisztenciát az L lókuszon található gén 4 eltérő allélja biztosítja (*L1*, *L2*, *L3* és *L4*), amelyek növekvő hatékonyságot mutatnak a különféle tobamovírusok ellen. A patogenitás és a rezisztencia gének közötti kölcsönhatás alapján a paprikát fertőző tobamovírusokat öt csoportba sorolták (P0, P1, P1, 2, P1, 2, 3, P1, 2, 3, 4 patotípus) (Boukema, 1980, Boukema, 1984, Gilardi et al., 2004, Antignus et al., 2008). Az *L1* a P0-al szemben, az *L2* a P0 és a P1-el szemben, az *L3* a P0, P1, P1,2-vel szemben biztosít rezisztenciát, az *L4* a P1, 2, 3, 4 kivételével minden patotípussal szemben ellenálló (Antignus et al., 2008). A termesztett fajták között továbbra is sok az *L1*, *L2*, *L3* génnel rendelkező fajta, de mivel a P1,2,3 és a P1,2,3,4 patotípus széleskörben nem terjedt el, ezek is megfelelő védelmet nyújthatnak. Jelenleg nem írtak le olyan paprikagenotípust, ami *L5* rezisztenciaszinttel rendelkezik.

4.4.3. *Dohány zörgőlevelűség vírus (TRV)*

A dohány zörgőlevelűség vírus a *Virgaviridae* víruscsalád, *Tobravirus* nemzetségébe tartozó és a nemzetség nevét adó növényi vírus. A tobnavírusok családjába 3 vírusfaj (Tobacco rattle virus, Pepper ringspot virus, Pea early-browning virus) tartozik, ezek mindegyike két elkülönülő egyszálú RNS-szálon elhelyezkedő genommal rendelkezik és mindhárom a talajban élő fonálféreg (*Trichodorus* és *Paratrachodorus* fajok) terjesztik. A fonálféreg-átvitelen kívül a mechanikai átvitelről és magátvitelről is beszámoltak. A TRV az egyik, ha

nem a legszélesebb gazdakörrel rendelkező növényi vírus több, mint, 50 családban 400 növényfaj fertőzhető meg kísérletileg, bár sok esetben ezek a fertőzések nem válnak szisztemikussá (Uschdraweit & Valentin, 1956, Schmelzer, 1957). Amennyiben a TRV szisztemizálódik, akkor általában más vírusokkal ellentétben képes elterjedni az egész növényben és bejut a merisztémába is (Martín-Hernández & Baulcombe, 2008), ennek ellenére többségében enyhe tüneteket vagy kismértékű fenotípusos változásokat okoz.

Mindkét vírusgenomot hordozó RNS (RNS-1 és RNS-2) pozitív polaritású és 5'-végükön cap és 3'-végükön tRNS-szerű, aminosav-kötő-szerkezet növeli stabilitását (Harrison & Robinson, 1986; van Belkum et al., 1987). A két RNS eltérő méretű. A hosszabb az RNS-1 kb. 6800 nukleotidból (nt) áll, önmagában is képes a replikációra és a szisztemikus fertőzésre (virion kialakításra nem), és általában szekvenciája és mérete is konzervált az egyes izolátumok között. Az RNS-2 rövidebb és izolátumonként nagy eltéréseket mutathat mind szekvenciáját, mind méretét (kb. 1900-3900 nt) tekintve (Angenant, 1986), önmagában nem fertőzőképes.

Az RNS-1 négy nyílt leolvasási keretet tartalmaz. Ezekről két replikázaktivitással rendelkező fehérje íródik át, egy átolvasást (readthrough) lehetővé tevő stop kodon segítségével, egy rövidebb 134 kDa és egy hosszabb 194 kDa méretű (Robinson & Harrison, 1989). Úgyszintén az RNS-1 genomjában van kódolva egy 29 kDa méretű mozgási és egy 16 kDa méretű RNS-csendesítést gátló fehérje (Robinson & Harrison, 1989, Martín-Hernández & Baulcombe, 2008), azonban ezek kifejeződéséhez általában szubgenomi RNS-ek kialakulása szükséges.

Az RNS-2 kódolja a genomi RNS-ről átíródó 25 kDa-os köpenyfehérjét és egy második szubgenomi RNS-ről átíródó 29,4 kDa (az RNS-1-en leírt 29kDa méretű fehérjével nem megegyező), és egy 32,8 kDa méretű fehérjét. Néhány vírustörzs esetében a 16kDa méretű RNS csendesítést gátló fehérje az RNS-2 genomján szinte azonos szekvenciával megtalálható (Robinson & Harrison, 1989).

A vírusrészecskék helikálisan szimmetrikusak, 23 nm átmérőjűek, pálcika alakúak és középvonalukban egy 5 nm átmérőjű csatorna figyelhető meg (Nixon & Harrison, 1959; Cooper & Mayo, 1972).

4.4.4. *Burgonya X vírus (PVX)*

Ezt az *Alphaflexiviridae* viruscsaládba és *Potexvirus* nemzetségbe tartozó vírust Smith írta le először 1931-ben. A PVX fertőzi a *Solanaceae* és legalább 26 másik család fajait. Növényi nedvvel és mechanikus úton terjed, de beszámoltak rágószájszervű vektorokkal (például szöcskékkal) történő terjedésről, de ez a fajta átvitel korlátozottnak tűnik a többi (eszköz, gép, ember, szél általi) mechanikai átvitelhez képest.

A PVX széles gazdakörrel rendelkezik, amely 27 családban legalább 62 növényfajban előfordul (Edwardson & Christie, 1997). Világszinten a burgonya esetén bír a legnagyobb jelentőséggel, de a többi nagyobb területen termesztett burgonyaféle (paradicsom, paprika, dohány) esetén is számolni kell vele, emellett sok gyomnövény is a természetes gazdája. A fertőzés tünetei a nekrotikus foltok a levélen és a száron, de szerencsére paprikán ritkán fordul elő. Az Y vírussal együtt szisztemikus és jelentős mértékű levélklórozist és deformációt tud okozni (Fribourg & Fernandez-Northcote, 1972). Több PVX rezisztens paprikafajtát is leírtak már, de viszonylag keveset tudunk ezekről a paprikában működő rezisztencia gének öröklődéséről és genomi elhelyezkedésükről (Shi et al., 2008).

Egyrészes pozitív, egyszálú RNS-genomja 5 leolvasási keretet (ORF) tartalmaz. Az első egy 166 kDa méretű RNS-replikáz aktivitású fehérjét, a második egy 25 kDa nagyságú helikázt kódol. A 3. és 4. ORF rövidebb, ezek egy-egy (12 kDa, 8 kDa) membránkötő fehérjét kódolnak, ami feltehetően a vírus növényen belüli mozgását segíti elő. Az ORF5, pedig a 25 kDa méretű köpenyfehérjét kódolja. A virion alakja fonálszerű, hosszúsága 515, szélessége 13 nm.

4.5. RNS-interferencia jelenség növényekben

Ecker & Davis (1986) azt a baktériumokban és az állati rendszerekben megfigyelt jelenséget, hogy az antiszensz RNS gátolja a génexpressziót, növénysejtvonalakon végzett kísérleteivel kiterjesztette a növényvilágra is. Ezután rövidesen megjelent a tanulmány egy olyan transzgenikus növényről (petúnia), ahol antiszensz RNS-sel gátolták egy növényi gén (chalkon-szintáz) működését (van der Krol et al., 1988). Az RNS-interferencia vagy géncsendesítés jelenségét először úgyszintén egy transzgenikus petúnia kísérlet kapcsán vetették fel. Napoli és munkatársai a korábban leírt chalkon-szintáz gén felhasználásával sötétebb, lilább virágszínt kívántak előállítani a gént extra kópiában tartalmazó transzgenikus vonalak létrehozásával. A transzgenikus vonalak előállítása sikeres volt, azonban ezeken a

virágok színe a várt sötétlila helyett fehér vagy fehér-lila mozaikos lett. A jelenség pontosabb megismerésére összetett kísérletsorozatot végeztek szensz és antiszensz konstrukciók felhasználásával, a transzgén és az endogén gén együttes gátlását/csendesítését koszupresszióknak nevezték el, de a molekuláris hátterét ekkor még nem sikerült feltárni (Jorgensen et al., 1996).

Ebben az időszakban a szensz transzgén konstrukciók endogén génekre gyakorolt gátló hatását több különböző élőlényben megfigyelték (dohány (Ingelbrecht et al., 1994, Mueller et al., 1995), paradicsom (Smith et al., 1990), lúdfű (Dehio & Schell, 1994), kenyérpenész (Romano & Macino, 1992)). A különböző szerzők e jelenségre változatos elnevezéseket használtak: transzgén-csendesítés, endogén géninhibíció, homológia alapú géncsendesítés, „elfojtás” („quelling”), poszttranszkripcionális csendesítés.

Fire et al., 1998-ban újszerű megközelítést alkalmaztak, hosszú egy- és kétszálú RNS-eket injektáltak *C. elegans* embriókba. Az injektált RNS-molekulák az endogén mRNS-ek degradációját okozták, ennek a jelenségnek az elnevezésére alkották meg az RNS-interferencia kifejezést. Ebben a kísérletben egyértelműen igazolták, hogy a bevitt duplaszálú RNS-ek (dsRNS) sokkal nagyobb hatást fejtenek ki, mint az egyszálú (ssRNS) változataik. Bár ebben a publikációban a jelenségért felelős kis méretű RNS-eket nem azonosították, a szerzők a molekuláris biológia egy teljesen új területét nyitották meg, és rekord idő alatt (2006-ban) orvosi Nobel díjat kaptak felfedezésükért (Fire et al., 1998).

Egy évvel később jelent meg egy a koszupressziót, a növényi RNS-interferenciát és a poszttranszkripcionális géncsendesítést (PTGS) növényekben részletesen vizsgáló publikáció. A kísérletben a PTGS, 3 transzgén által indukált és egy vírus által indukált (VIGS) példáját elemezték *Solanum*, *Nicotiana*, *Arabidopsis* és *Petunia* növényekben. Mindegyik esetben ki tudtak mutatni a megcélzott mRNS-szekvenciára specifikus kis RNS-eket. Mivel a talált 25 nukleotid hosszú RNS-ek mérete lehetővé teszi, hogy megfelelő szekvencia-specifitás és a plazmodezmatákon való átjutást biztosítsanak, feltételezték, hogy ezek résztvehetnek a géncsendesítő hatás szekvenciaspecifikus kialakulásában és sejtek közti átadásában (Hamilton & Baulcombe, 1999).

Feltételezésüket azóta sikerült bizonyítani, sőt ma már tudjuk, hogy mind növényekben, állatokban és gombákban ezek a kisméretű RNS-ek a kulcsmolekulái az RNS-interferencia alapú szabályzásnak. Ennek a szabályzási formának és a kisméretű RNS-eknek három

kiemelt fontosságú biológiai folyamatban is nagy szerepe van. Vírusokkal szembeni védekezés, posztranszkripcionális (PTGS) (Bartel & Bartel, 2003) és transzkripcionális génszabályzás (TGS) (Allshire, 2002). Mindhárom funkció esetén a DCL, az AGO és a 21–23 nt dsRNS a csendesítő komplex kulcsfontosságú elemei (Carthew & Sontheimer 2009). A különböző molekuláris útvonalon keletkező és eltérő funkciót betöltő kis RNS-ek mindegyikére igaz, hogy duplaszálú (dsRNS) vagy duplaszálú szerkezetet tartalmazó RNS-molekulák hasításával jönnek létre (Zamore et al., 2000, Bartel, 2004). Különböző típusú kis RNS-eket fedeztek fel és kategorizáltak a biogenezis módjuk és az eredetük alapján.

4.5.1. Az RNS-interferencia kulcsfehérjéi

A DICER/DICERLIKE enzim családba nagy, több doménnel rendelkező ribonukleáz fehérjék tartoznak. A miRNS útvonalban a DCL1 RNáz-III endonukleáz játszik fontos szerepet (2. táblázat). Ez képes a hajtű struktúrával rendelkező pri-miRNS-t, két lépésben 21 nt hosszúságú kisRNS (sRNS) duplexekké alakítani, amelyek 3'-végükön 2 nukleotid (nt) túlnyúlást és 5' végükön egy monofoszfátot hordoznak. Ennek a fehérjének (DCL1) a következő fontos doménjeit írták le *Arabidopsis*-ban: DEXD-BOX HELIKÁZ-C, DUF283 (domain unknown function), PIWI / ARGONAUTE / ZWILLE (PAZ), két tandem elhelyezkedő RNáz-III és két tandem dsRNS-kötő domén (DSRBD) (3. ábra) (Bologna & Voinnet, 2014). A pre-miRNS hasításakor a kisRNS 3' végét a PAZ domén köti meg, amelyet egy szabályos alfa helix (molekuláris vonalzó) köt össze a vágásért felelős ribonukleáz doménnel, így a hasítás után keletkező kisRNS mérete pontosan 21 nt lesz.

A többi említett domén közül, a DSRBD, a helikáz és a DUF283 is képes RNS-ekhez kötődni, ezek a kötőhelyek feltehetően a hosszabb pri-miRNS hasításakor játszanak fontos szerepet. Bizonyították, hogy a helikázban vagy a dsRNS-kötő doménben történt mutációk jelentősen csökkentik a miRNS-felhalmozódást. E fehérjecsalád tagjainak a génkiütéses változatai, több az RNS-interferenciában résztvevő fehérjéhez hasonlóan súlyos fenotípusos eltéréseket vagy embriókori pusztulást is okozhatnak.

További 3 DCL fehérjét írtak le *Arabidopsis*-ban (2. táblázat), ezek feladata a két színté teljesen komplementer szálból álló hosszú dsRNS-ek különböző méretű kisRNS-ekké történő hasítása (Henderson et al., 2006). A DCL2 a virális eredetű kétszálú RNS-ek bontásáért felelős és 22 nt-os kisRNS-eket generál. A DCL3 a transzkripcionális génszabályzásban is

résztevő, 24 nt-os heterokromatikus siRNS-ek (het-si-RNS) biogenezésében vesz részt. A DCL4 21-nt-os kisRNS-eket generál, virális eredetű és egyéb kétszálú RNS-formákból (Cuperus et al., 2011).

A HUE ENCHANCER (HEN1) metiltranszferáz funkciója, hogy a (minden eddig ismert kisRNS esetén) kisRNS-duplexek mindkét szálára (2-OH csoportjára) egy-egy metilcsoportot helyezzen (Yu et al., 2005). Az *Arabidopsis* HEN1 öt szerkezeti elemből áll (3. Ábra), amelyek közül négy közvetlenül kölcsönhatásba lép kisRNS-szubsztrátokkal. A legjellemzőbb eleme az erősen konzervált metil-transzferáz domén (MTASE), mely a metilcsoportok átviteléért felel. Két kettősszálú RNS-kötőhely (DSRBD1 és DSRBD2) és egy La-motívumot tartalmazó domén (LCD), amely kifejezetten a 3-OH csoport felismeréséért felel. Az utolsó domén a PPIáz-szerű domén (PLD), ez nem lép kölcsönhatásba a kisRNS-ekkel (Huang et al., 2009a). Az *Arabidopsis* HEN1 – dsRNS komplex szerkezeti elemzése alapján a dsRNS-duplexek két 3' vége külön-külön metilálódik (Huang et al., 2009a).



- 3. ábra Az RNS interferenciában kiemelt szerepet játszó fehérjék (DCL: dicerlike, HEN1: hue enhancer, AGO: argonaute) jellemző doménszerkezete.** Doménrövidítések: DUF283: ismeretlen funkciójú domén 283 (domain of unknown function 283), PAZ: PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE, DSRBD: kettősszálú RNS-kötő domén, LCD: La motívumot tartalmazó domén, PLD: PPIase-like domén, MTASE: metiltranszferáz domén (Bologna & Voinnet,2014).

Mind állatokban, mind gombákban és növényekben az RNS indukálta géncsendesítési komplex (RISC) központi elemként AGO vagy AGO-szerű fehérjét tartalmaz. Az *AGO* gének számában fajonként jelentős eltérés mutatkozik. A *Schizosaccharomyces pombe* 1, a *Homo sapiens* 8, az *Arabidopsis thaliana* 10, az *Oryza sativa* 18, *Caenorhabditis elegans* genomjában 27 AGO fehérjét kódoló gén található (Singh et al., 2015).

2. táblázat Az RNS interferenciában résztvevő kiemelt fontosságú fehérjék (Bologna & Voinnet,2014).

Fehérje	Rövidítés	Sejten belüli elhelyezkedés	Funkció	kisRNS preferencia	Fehérje típus	Colokalizáció
DICER-LIKE	DCL1	sejtmag	pri- és pre-miRNS-ek hasítása	21-nt-hosszú	RNS endonukleáz	HYL1,SE,DCL3, DCL4, HEN1
DICER-LIKE	DCL2	sejtmag	hosszú dsRNS-ek hasítása	22-nt-hosszú	RNS endonukleáz	
DICER-LIKE	DCL3	sejtmag	hosszú dsRNS-ek hasítása	24-nt-hosszú	RNS endonukleáz	AGO4,RDR2, NRPE1, DCL-k, HEN1
DICER-LIKE	DCL4	sejtmag	hosszú dsRNS-ek hasítása	21-nt-hosszú	RNS endonukleáz	DCL1, HEN1
RNS FÜGGŐ RNS POLIMERÁZ	RDR2	sejtmag	dsRNS létrehozása	siRNS útvonal	RNS polimeráz	DCL3, AGO4, NRPE1
RNS FÜGGŐ RNS POLIMERÁZ	RDR6	citoplazma	dsRNS létrehozása	siRNS útvonal	RNS polimeráz	SGS3, AGO7
HUE-ENCHANCER	HEN1	citoplazma, sejtmag	kisRNS duplexek metilálása	minden kisRNS	metiltransferáz	DCL1, DCL3, DCL4
ARGONAUTE	AGO1	citoplazma, sejtmag	fő RNS csendesítési faktor (PTGS)	21, 22 nt 5'U	RNS endonukleáz	HYL1
ARGONAUTE	AGO4	sejtmag	RNS csendesítési faktor (TGS)	24 nt 5'A	RNS endonukleáz	RDR2, DCL3, NRPE1
ARGONAUTE	AGO5	citoplazma	RNS csendesítési faktor (PTGS)	21-24 nt 5'C	RNS kötő, represszor	-
ARGONAUTE	AGO7	citoplazma, sejtmag	RNS csendesítési faktor (PTGS, tasi-RNS)	21 nt 5'A	RNS kötő, represszor	RDR6, SGS3, DCL4
HYPONASTIC LEAVES1	HYL1	sejtmag	pri- és pre-miRNS-ek feldolgozás	miRNS útvonal	RNS kötő	DCL1, AGO1, SE, TGH, CPL1, SIC,
SERRATE	SE	citoplazma, sejtmag	pri- és pre-miRNS-ek feldolgozás	miRNS útvonal	Cink-ujj fehérje	DCL1, HYL1, TGH, CPL1
TOUGH	TGH	sejtmag	pri- és pre-miRNS-ek megkötése	miRNS és siRNS útvonal	RNS kötő	DCL1, HYL1, SE
C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1	CPL1	sejtmag	pri- és pre-miRNS-ek feldolgozás	miRNS útvonal	foszfatáz	HYL1, SE, DCL1

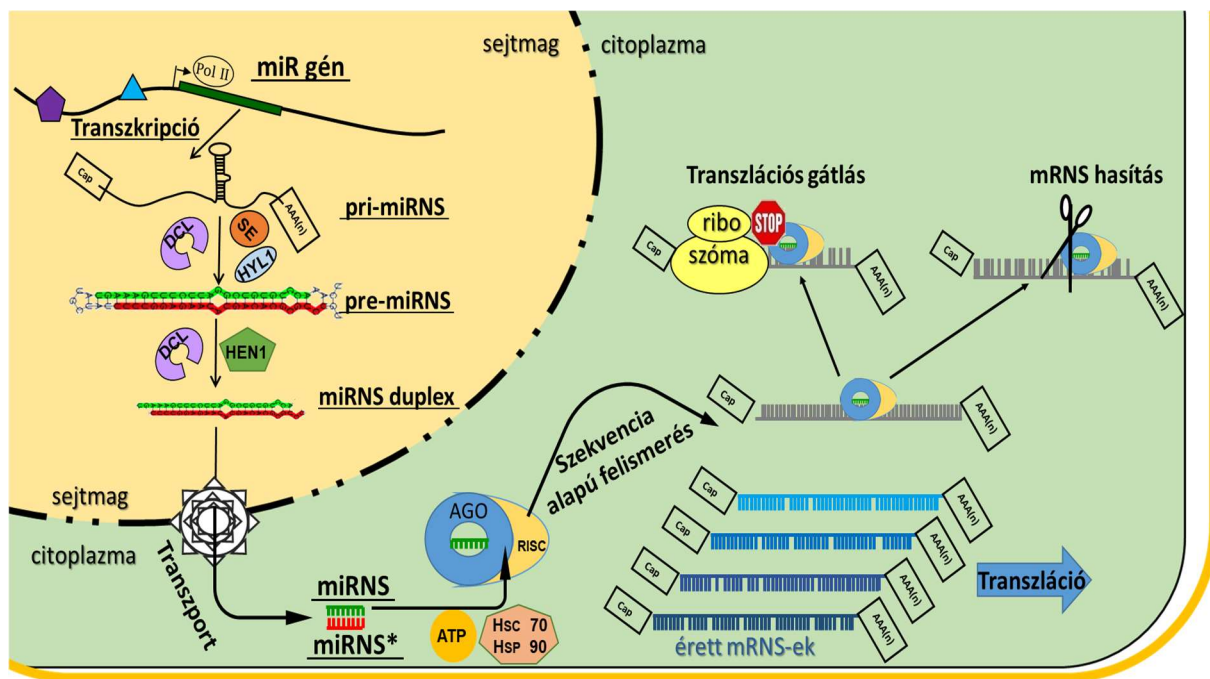
Az AGO fehérjék négy fő domént tartalmaznak (3. ábra). A kisRNS a célpont-RNS-hez viszonyított elhelyezésében az AGO fehérje 3 konzervatív része, a PAZ, a MID és a PIWI domének együttesen vesznek részt, ezt a három domént az L1 és L2 kapcsoló régiók kötik össze. PAZ (3' vég) és a MID domén (5' vég) köti meg a kisRNS két végét. Az endonukleáz aktivitásért a PIWI doménben lévő katalitikus triád a felelős (Vazquez, 2006). A negyedik kiemelt részt N-terminális doménnek nevezik és ennek szekvenciájában nagyobb variabilitás figyelhető meg (Bologna & Voinnet,2014).

A növényi AGO immunprecipitációs vizsgálatok során kiderült, hogy a kisRNS mérete és az 5'-terminális nukleotid befolyásolja, hogy melyik kisRNS-ek melyik AGO fehérjékbe épülnek be (2.táblázat) (Mi et al., 2008). Az AGO1, az AGO2, az AGO5 és az AGO10 elsősorban a 21, 22 nt hosszú kisRNS-eket kötik, az 5' vég szempontjából az AGO1 az uracilt, az AGO2 az adenint, míg az AGO5 a citozint tartalmazó kisRNS-eket preferálja. Az AGO4,-6,-9-el leginkább 5' terminális adenozinnal rendelkező 24-nt-os kisRNS-ekkel asszociálódnak (Mi et al., 2008). A mutációs elemzések megerősítették az 5'-nukleotid fontosságát egyes kisRNS-ek és AGO fehérjék közti kapcsolatban, de találtak olyan miRNS-eket, amik a korábban leírt rendezési elvtől eltérően működtek (Bologna & Voinnet,2014).

4.5.2. Az endogén gének szabályzói, a mikroRNS-ek

A miRNS-ek rövid, többségében 21 nukleotid hosszúságú (19-25 nt) fehérjét nem kódoló RNS-ek, melyek általában saját promoterral rendelkező többnyire intergénikus régióban elhelyezkedő, endogén génekről (*MIR* gének) keletkeznek (Reinhart et al., 2002). Az *Arabidopsis*-ban több, mint 180 *MIR* gént írtak le, a nagyobb genomméretű növényekben feltehetően még több ilyen gén található (Griffiths-Jones et al., 2007).

A *MIR* gének transzkripcióját a fehérjekódoló génekhez hasonlóan az RN-SPOLIMERÁZ II végzi (POL II) (Baulcombe, 2004; Herr & Baulcombe, 2004) (4. ábra). A *MIR* gének megtalálhatóak a legkülönbözőbb fajok genomjában (Bonnet et al., 2004), és egy speciális, hosszú nem kódoló RNS-t (pri-miRNS-t) kódolnak. A keletkező pri-miRNS-ek poliadeniláltak, 5' végi „cap”-et tartalmaznak és az mRNS-ektől eltérően erős másodlagos szerkezettel (hajtú) rendelkeznek (Bartel & Bartel, 2003) (4. ábra). Ezt a másodlagos szerkezetet ismeri fel egy speciális RNáz III típusú endonukleáz DICER-LIKE1 (DCL1) és hasítással állítja elő, a másodlagos szerkezetet továbbra is tartalmazó, de jelentősen rövidebb prekursor-miRNS-eket (pre-miRNS). Ez a hasítási folyamat a sejtmagban játszódik le (Park et al., 2005, Voinnet, 2009) és 2 további RNS-kötő fehérje is részt vesz a folyamatban; a HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) és a SERRATE (SE) (Yang et al., 2006), ezek a fehérjék és feltehetően további faktorok részvételével alakulnak ki a speciális dicer aktivitást elősegítő struktúrák (“dicing bodies”) (Fang et al., 2007).



4. **ábra A növényi miRNS-ek biogenezise és szabályozási mechanizmusai.** A növényi primer miRNS-eket (pri-miRNS) többnyire MIR-génekről írja át az RNS-POLIMERÁZ II (POL II). A pri miRNS-eket a DCL1 hasítja pre-miRNS-ekké SE, DSRBP és HYL1 segítségével. A pre-miRNS-ekből a DCL1 a HYL1 fehérje közreműködésével hasítja ki a 21–24 nukleotidos miRNS-duplexeket. A duplex miRNS-eket a HEN1 egy metilcsoport hozzáadásával stabil, érett miRNS-duplexekké alakítja. A HASTY növényi exportin 5 ortológjának és egyéb idáig ismeretlen faktorok hatására a miRNS-duplexek exportálódnak a citoplazmába. A miRNS szál (zöld) ezután a HSC70 / HSP90 dajkaféhérjék segítségével és ATP felhasználásával beépül egy AGO-fehérjébe, a másik szál (csillagszál, miRNS*) (piros) eliminálódik. A citoplazmában a növényi miRNS kétféle módon képes gátolni a célgénjét. A növényekben gyakoribb, hogy a miRNS az mRNS hasításán keresztül szabályozza a célpontját. A ritkábban előforduló (állatokban ez a gyakoribb) szabályozási mód a transzlációs gátlás. Ez úgy valósul meg, hogy az mRNS-hez szekvencia alapon kötődő mi-RNS-sel töltött RISC fehérjekomplex a transzláció során megakasztja a riboszómát, így az mRNS-ek detektálhatóak maradnak, azonban fehérje nem keletkezik. Az ábrán alkalmazott rövidítések megegyeznek a 2. táblázatban szereplő rövidítésekkel.

Vannak olyan miRNS-ek is, amelyek nem kanonikus módon, nem saját genomi régiókról keletkeznek, hanem rövid hajtű szerkezettel rendelkező intronokban kódoltak, ezeket mirtronnak nevezzük (Okamura et al., 2007). Főleg állati rendszerekre jellemző, de növényekben is előfordul. *Arabidopsis*-ban 5, *Medicago truncatula*-ban 27, *Oryza sativa*-ban 39 ilyen intront találtak (Fonseca et al., 2019). Ezeknek a miRNS-eknek a prekursora (pre-miRNS) a splicing során keletkezik (Ruby et al., 2007).

A pre-miRNS-ek, a pri-miRNS-ből származó, 5' cap és 3' poliA nélküli, rövidebb, másodlagos szerkezettel rendelkező RNS-ek. A sejtmagban történik a DICER-LIKE1 (DCL1) endonukláz, a HLY1 és további faktorok segítségével végbemenő második hasítási folyamat, amivel a pre-miRNS-ből egy a másodlagos szerkezet alapján meghatározott szekvenciájú rövid RNS-duplex keletkezik (Park et al., 2005, Voinnet, 2009).

A pre-miRNS-ből keletkezett duplex a miRNS-ből és a miRNS-csillagszálból áll, és feltételezhetően egy (a β -exportin fehérjecsalád tagja) HASTY (HST) nukleocitoplazmikus transzporter fehérje és egyéb idáig ismeretlen faktorok segítségével kerül a citoplazmába (Bollman et al., 2003.) (4. ábra).

A miRNS-duplexek mindkét szálára egy-egy metilcsoport kerül (Yu et al., 2005), ezt a folyamatot a HUE ENCHANCER (HEN1) metiltranszferáz katalizálja, és ezáltal védi a kisRNS-eket (Li et al., 2005). Mivel a HEN1 a sejtmagban és a citoplazmában is jelen van (Fang et al., 2007, Xie et al., 2004), ezért a kisRNS-metiláció sejten belüli helyszínét eddig nem sikerült egyértelműen meghatározni.

A citoplazmába kijutott miRNS-duplex közvetlenül kapcsolódik a RISC-komplex központi fehérjéjével (AGO1). A miRNS érett szálának beépülésével válik az ARGONAUTE (AGO1) szekvenszifikussá (Park et al., 2005; Vaucheret, 2008). Az AGO1-et központi molekulaként tartalmazó RNS-indukálta csendesítési komplex (RISC) felépülése a HSC70 és HSP90 dajkafehérjék részvételével és ATP felhasználásával valósul meg. A miRNS-duplex másik szála, az úgynevezett csillagszál eliminálódik (Iwasaki et al., 2010; Nakanishi, 2016). A beépült miRNS-el komplementer endogén mRNS-eket a RISC-komplex felismeri, ezt követően elhasítja vagy transzlációsán gátolja azok aktivitását.

A RISC-komplexek az AGO1-hez kötött miRNS-szekvenciával komplementer szakaszt tartalmazó endogén mRNS-eket felismerik és megakadályozzák az általuk kódolt fehérjék szintézisét. Az AGO fehérje a beépült kisRNS 10-és 11-es nukleotidja között képes hasítani, ha ezekben a pozíciókban a két RNS között kialakul a bázispárosodás. Ha a hasítás nem tud megtörténni (pl: a két szekvencia között túl nagy az eltérés, vagy épp ezekben a pozíciókban van eltérés) a RISC és az mRNS közti kötés akkor is kialakul. A kötött mRNS-en a transzláció el tud indulni, de a kötött RISC-KOMPLEX miatt az mRNS-ről történő fehérjeszintézis egy ponton leáll (Rogers & Chen, 2013).

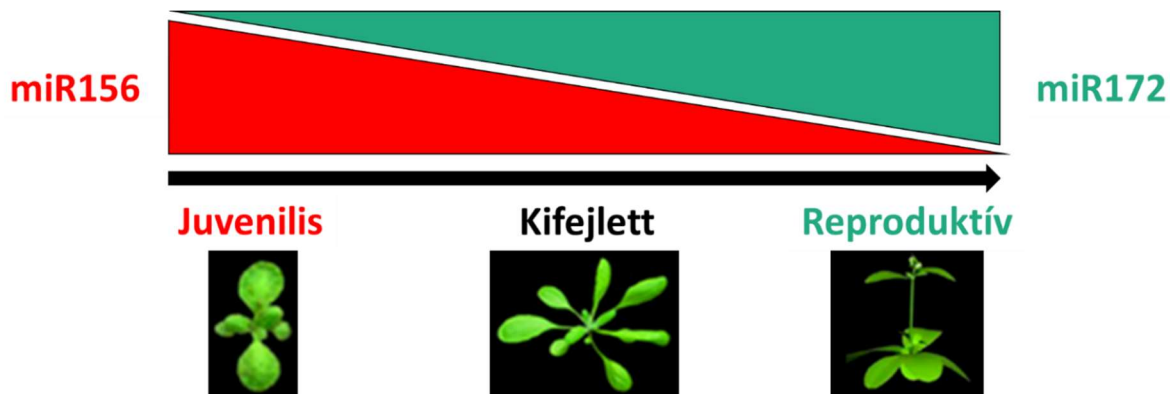
Növényekben a miRNS-ek általában az mRNS kódoló szakaszán található célszekvenciával teljes vagy szinte teljes komplementaritást mutatnak, és e szakaszok hasítását indukálják (Tang et al., 2003, Jones-Rhoades & Bartel, 2004). Az állati rendszerekre az jellemző, hogy a miRNS-ek a részlegesen komplementer szekvenciájú mRNS-ek nem transzlálódó részéhez (3'-UTR) kötődnek és transzlációs gátlást okoznak (Molnár et al., 2008.).

4.5.3. Növényi miRNS-szabályzás alatt álló funkciók

Számos jellemzett miRNS játszik fontos szerepet a mag-, a gyökér-, a levél- és a virágszervek fejlődésének szabályozásában mind az egyszikű, mind a kétszikű növényekben. Az kisRNS-útvonalban résztvevő fehérjéken túl egyes miRNS-ek és ezek funkciója is konzerválódott a növények különféle csoportjai között.

A kisRNS-biogenezis komponenseiben történő mutációk fejlődési rendelleneségekhez vezetnek, és olyan alapvető folyamatok sérülhetnek, mint a vegetatív-generatív fázisváltás, a levél- és hajtásképződés, embriogenezis. Ezek a megfigyelések megerősítik az endogén siRNS-ek (miRNS és ta-siRNS) funkcionális jelentőségét a növényi fejlődés alakításában.

A zárva termő növény egész életciklusa alatt két fő fejlődési fázisátmenet történik. Az egyik a csírázás (a magtól a csíranövényekig, a másik a virágzás megjelenésével járó vegetatív/generatív stádium váltás).



5. ábra A miR156 és a miR172 arányai által szabályzott vegetatív/generatív fázisváltás az lúdfűben (lefordítva, átrendezve Singh et al., 2018).

Egyes újabb tanulmányok azt mutatják, hogy vannak olyan gének és miRNS-ek is, amelyek mindkét fontos átmeneti fázisban szabályozó szerepet töltenek be. Mind a miR156 és a miR172 fő szabályozóelemei a virágzásnak és a csírázásnak is (Li & Zhang, 2016) (5. ábra). A miR172 a virágzást késleltetni tudó AP2 doménnel rendelkező transzkripciós faktorokat,

míg a miR156 az *SPL* géncsalád tagjait szabályozza, a géncsalád több tagjának (*SPL3,9*) is igazolták a virágzást, virágképződést indukáló hatását.

Az egy- és kétszikűekben a virág fejlődését különböző gének és kisRNS-ek által kialakított hálózat szabályozza. A miR156, miR159, miR171, miR172 és miR396-ról is ismert, hogy szabályozó szerepet töltenek be a virágok differenciációjában és a virágzás időzítésében is. *Arabidopsis*-ban a miR159 túltermelésének vizsgálata során azt találták, hogy a miR159 szint emelkedésével a porzók mérete megnövekedett, a színük sötétebb lett, és nem voltak képesek életképes pollent termelni (Achard et al., 2004). Több miRNS (miR156, miR160, miR167 és miR173) jelenlétét kimutatták mind lúdfű, mind rizs pollenből (He et al., 2015), ezek funkcionális szerepét megerősíti, hogy például a miR167 esetén a pollenben lévő célgének magasabb aktivitása sterilitást okozott.

Több kisRNS a gyökérfejlődésben résztvevő gének megcélzása révén fontos szabályozója ennek a fejlődési folyamatnak. Például a miR160 a gyökér növekedéséhez és elágazásához elengedhetetlen. A miR164 az oldalsó gyökér megjelenését és elágazását, a miR393 a növekedését szabályozza. A miR165/166 és célgénjei a hormonháztartás befolyásolásával részt vesznek az érrendszer differenciálódásában és a gyökernövekedésben is (Singh et al., 2018). A miR171 a főgyökér hosszában, a miR847 az oldalgökörek számában, a miR408 és a miR528 a gyökernövekedésben, az oldalgökörek fejlődésében és a gyökérsapka kialakításában játszanak fontos szabályozó szerepet.

Az apikális hajtásmerisztéma (SAM) fenntartását több gén és miRNS aktivitása is szabályozza. Az egyik kiemelt miRNS a miR394, aminek érdekessége, hogy a merisztéma csúcsi sejtrétegében keletkezik, de célmolekulája a merisztéma egy belsőbb rétegében helyezkedik el. A miR394 rétegek közötti mozgása meghatározó a helyes SAM fejlődés kialakításában. További miRNS-ek is részt vesznek a SAM kialakításában és fenntartásában (miR390 és miR166) (Singh et al., 2018).

A levélfejlődésben is részt vesznek már említett konzervált miRNS-ek, például a levélszín és fonák kialakításában kulcsszerepet játszó miR165/166 és a levélpolaritás kialakításában résztvevő miR394. A levél végső alakjának és méretének kialakulásához meghatározó a miR396 és a miR319 célgénjeinek (*TCP*-k, *GRF*-k) aktivitása (Palatnik et al., 2003). A miR164 a levél fogazottságát szabályozza.

Számos miRNS hatását mutatták ki a magok fejlődésében. A magban a hormonok és a kisRNS-ek között komplex, többszörös visszacsatolásokat tartalmazó szabályozási rendszert tártak fel. Például a gibberelinsav (GS) és abszcizinsav (ABS) függő expressziót mutató miR159 a GS és az ABS hormon jelátvitel modulálásával fontos szerepet tölt be a csírázás szabályozásában. (Martin et al., 2010).

A miR165/166, miR167, miR164, miR158 és miR160 az embrió fejlődéséhez elengedhetetlen auxin homeosztázis szabályozásában játszanak szerepet (Martin et al., 2010). A miR156 és a miR172 az érett embrióban a fejlődési átmenet szabályozásával képesek a magokat nyugvó állapotban tartani (Martin et al., 2010).

Bizonyos miRNS-ek a mag csírázásában játszanak kulcsszerepet, sok esetben ezek hatását só- illetve szárazságstressz körülmények között figyelték meg. A miR395 család egyes tagjai a mag csírázását hatékonyan segítik, míg más tagjai képesek gátolni azt. (Kim et al., 2010). Abiotikus stresszkörülmények között további miRNS-ek esetében is kimutattak a csírázási folyamatokra gyakorolt pozitív (pl: mir402) vagy negatív (pl: mir417) hatást.

Az eddig felsorolt funkciós vizsgálatok eredményei igazolják, hogy a miRNS-ek jelentős szerepet játszanak a növény növekedésében és fejlődésében, bár a gyümölcsfejlődésben játszott szerepükről jelenleg korlátozott információ érhető el. Kutatók bizonyították, hogy *Arabidopsis*-ban a miR172 kritikus szerepet játszik a termésfejlődés irányításában, mivel a miR172 deaktíválásával a becő növekedése leáll (Ripoll et al., 2015).

A miR160, a miR164 és a miR167 termésfejlődésben betöltött szerepét mutatja, hogy a szőlőben az érés során mennyiségük folyamatosan csökken, míg egyes célgénjeik szintje növekszik (Carra et al., 2009). Olajfánál a miR166 és a miR171 esetén hasonló jelenséget figyeltek meg. Mindkettő esetén az érés során csökkenő expressziót és célpontjukként a szervfejlődésben szerepet játszó géneket azonosítottak (Yanik et al., 2013). Szintén szőlőnél azonosítottak a miR535 esetén egy célgént, amiről ismert, hogy a termésfejlődést szabályozó transzkripciós faktort kódol (Carra et al., 2009).

A miRNS-ek szerepet játszanak a termés beltartalmi értékének kialakításában is. Narancs termésében a miRNA319 és a miR1857 színanyagok keletkezésében játszott szerepéről számoltak be (Xu et al., 2010). Körtében 10 miRNS hatását (miR397a, miR1132, miR1318, miR2635; miR394a, miR396b, miR5077, miR5500, miR825* és miR952b) mutatták ki.,

olyan a termés kialakításában meghatározó folyamatok szabályozásában, mint a lignifikáció és a cukor- és a savszintézis (Wu et al., 2014).

A datolyában végzett hasonló kísérlet során több termésspecifikus miRNS-t is azonosítottak, ezek közül kettőt emeltek ki, amik a keményítő-cukor átmenetben szereplő enzimeket szabályozzák (Xin et al., 2015). Szamócában azt találták, hogy az alacsonyabb miR399 szint és az emelt cukortartalom együtt jelentkezett (Li et al., 2013).

A *Solanaceae* családon belül a paradicsom termést többen is vizsgálták miRNS-szinten. Az egyik tanulmányban a sly-miR169 és célgénjének (*HAP2*) valamint a sly-miR390-nek a korai termésfejlődésben való aktív részvételét feltételezték (Moxon et al., 2008a). Egy másik tanulmányban a miR393 és a miR167 által szabályzott *SITIR1* és az *ARF* szerepéről számoltak be a termésfejlődés kezdeti szakaszában (Karlova et al., 2013). Mind a miR156, mind a miR172 expresszálódik a paradicsom különböző termésfázisaiban, és a piros bogyószín megjelenésével az expressziójuk csökken (Mohorianu et al., 2011). A paradicsom érését a *CNR* és az *AP2a* gének és az őket reguláló miR156 és miR172 által alkotott rendszer szabályozza. A két gén (*CNR* és az *AP2a*) negatív hatást gyakorol egymás expressziójára, és a miR156 a *CNR*, a miR172 az *AP2a* gén aktivitását korlátozza (Karlova et al., 2013). A sly-miR156a vagy az At-miR156b túlzott expressziója a paradicsomban kisebb méretű, extra termőleveleket tartalmazó, torz alakú bogyókat eredményezett (Zhang et al., 2011, Ferreira e Silva et al., 2014).

Korábban igazolták, hogy az auxin döntő szerepet játszik a termésfejlődésben, paprikában a can-miR160 célpontja az auxin válaszfaktor (ARF), ami egy kiemelt auxin jelátvitelt szabályozó transzkripció faktor (Hwang et al., 2013), az auxin szabályzásban a miR167 szerepét is kimutatták. Az etilénszabályzásban résztvevő gének (F-BOX) szabályzásában résztvevő miR394 szerepéről is beszámoltak (Liu et al., 2017).

Három paprikaspecifikus miRNS-t (Novel_miR65, Novel_miR75 és Novel_miR92) is azonosítottak, amik a szénhidrát-anyagcserében szereplő kulcsenzimet képesek deaktíválni. A kapszaicin-útvonalban szereplő DIHIDROLIPOAMID-DEHIDROGENÁZ-t (*Capana12g000245*) a can-miR159a/b, míg az α -CT-t (*Capana09g001602*) a can-miR5303 szabályozza. Összességében a miRNS-célgének sokféle szabályozási funkcióban és biológiai folyamatban vesznek részt, beleértve az apoptózist, a védelmi válaszokat és az ATP-kötést is (Kim et al., 2014).

4.5.4. A siRNS-ek keletkezése és funkciója

A siRNS-biogenezis (6. ábra) egy vírus, transzpozon, transzgen vagy endogén eredetű hosszabb kétszálú RNS-molekulából indul ki (Ding & Voinnet, 2007). Vírusfertőzés során a kétszálú RNS a növény citoplazmájába kerülő egyszálú vírus-RNS-eknek és ezek komplementer szálának összekapcsolódása által keletkezik, vagy a vírusreplikáció vagy a növényi RNS-függő RNS-polimerázok (RDRP) munkája által (6. ábra). A DNS vírusok esetén a vírusgenomról keletkező mRNS-ek komplementer szálát a növényi RDRP fehérjék építik fel, és az így kialakult dsRNS-ek felhasználásával is keletkezhetnek siRNS-ek.

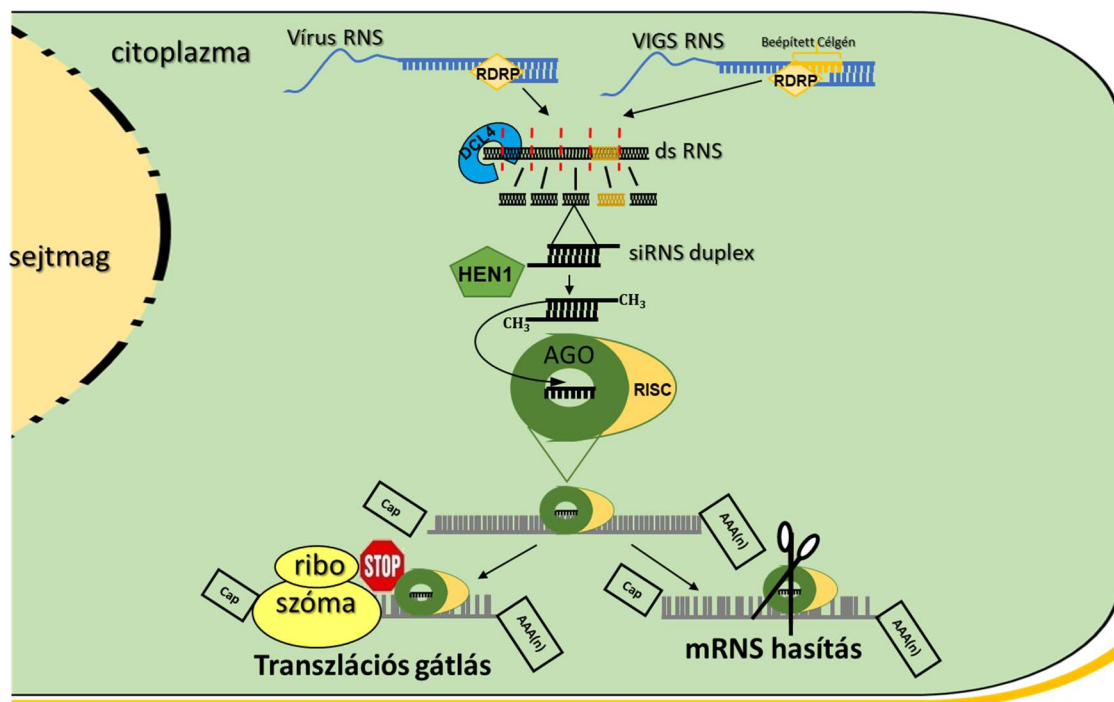
Ezután a miRNS-ekhez hasonló folyamatokon mennek keresztül. Ezeket a dsRNS-eket a növényi sejtekben az Rnáz-III típusú DICER-LIKE enzimkomplexek (DCL1 (21 nt), DCL2 (22 nt), DCL3 (24 nt), DCL4 (21nt) ismerik fel és 21-24 bázispár hosszú siRNS-duplexekre hasítják. A keletkező duplexek egyik szála beépül valamelyik AGO fehérjébe, így kialakul a szekvensspecifikus endonukleáz aktivitással rendelkező RISC-KOMPLEX (6.ábra).

A RISC elsődleges szerepe, hogy gátolja a szekvenca-specificitást adó kisRNS-sel komplementer mRNS-ekről történő translációt. A gátlás a miRNS-ekhez hasonló módon kétféleképpen valósulhat meg: az mRNS hasításával és az mRNS-ről történő fehérjeátírás blokkolásával (6.ábra). A hasítás utáni RNS-melléktermékeket, a növényi exonukleázok a vágással keletkező végektől indulva bontják el.

4.5.5. Vírus indukálta géncsendesítés (VIGS)

A "Vírus indukálta géncsendesítés" kifejezés van Kammen-től származik (van Kammen, 1997), és olyan az RNS-interferencia alapú poszttranszkripcióális génszabályzási rendszert értünk alatta, aminek kiváltója egy vírussal való fertőzés. A vírusgenomba a vizsgálni kívánt növényi gén egy szakaszának bejuttatásával olyan rekombináns vírusok hozhatóak létre, amelyek lehetővé teszik a VIGS endogén gének funkcióvizsgálatában való hatékony felhasználását.

A rekombináns vírus a növényben replikálódik és ennek során a siRNS útvonalat indukáló kettős szálú RNS molekulák keletkeznek (6. ábra). A korábban leírt úton ezekből a kettős szálú RNS-ekből, több eltérő szekvenciájú szabályozó kisRNS keletkezik, ami a RISC-be épülve szekvensspecifikusan képes lecsökkenteni a célzott RNS-ek és a róluk keletkező fehérjék koncentrációját (Baulcombe, 1999; Kumagai et al., 1995) (6. ábra).



6. ábra A növényi vírusokról és VIGS vektorokról keletkező siRNS-ek. A növényi RNS vírusokra (kézzel jelölve) jellemző, hogy a vírus replikációját RdRP típusú fehérjék végzik, és a folyamat során kétszálú RNS-ek keletkeznek. A növény DCL4 enzime a virális dsRNS-ekhez kapcsolódik és azt rövid 21 nt hosszúságú siRNS-duplexekre darabolja fel. Az így keletkező siRNS-duplexek egyik szála beépül valamelyik AGO fehérjébe, ami a központi elemét adja a szekvensspecifikus endonukleáz aktivitással rendelkező RISC-KOMPLEXnek. A RISC elsődleges szerepe, hogy gátolja a kisRNS-sel komplementer mRNS-ekről történő transzlációt. A gátlás a miRNS-ekhez hasonló módon kétféleképpen valósulhat meg: az mRNS hasításával és az mRNS-ről történő fehérjeátírás blokkolásával. A VIGS-en alapuló módszer alkalmazása során egy növényi gén egy szakaszát (aranszínnel jelölve) beépítik a vírus genomjába, ezt követően megfertőzik a rekombináns vírussal a növényt. A siRNS-ek a VIGS vektrokról az eredeti vírussal megegyező módon keletkeznek. E beépített rész a növény endogén génjére komplementer szekvenciákat tartalmaz, ezért a keletkező siRNS-ek a növényi gén mRNS-eiről történő transzlációt gátolják, és kialakul az adott gén hiányára jellemző fenotípus.

A vírus indukálta géncsendesítés alkalmazásával a teljes funkcióvesztés (“knock out”) nem érhető el, de a folyamat során markáns (70-90%-os) expressziócsökkenés történik, és ún. “knockdown” fenotípus figyelhető meg a növényeken (Orzaez et al., 2006; Pflieger et al., 2008). Ez a módszer egy gyors és hatékony megoldást kínál a “knockdown” fenotípusok előállítására, és a feltételezett funkciók igazolására.

A VIGS alkalmazásával a költséges és időigényes növényi transzformáció elkerülhető. A módszer gyors, könnyen elsajátítható és költséghatékony (Senthil-Kumar et al., 2008). A rendszer további előnye, hogy egy VIGS konstrukció több növényfajon is alkalmazható, ennek általában a kiinduló vírus gazdaköre szab határt. A csendesítés részleges szekvenciainformáció esetén is lehetséges, mivel a rendszer indukálásához egy rövid (23nt) szakasz beépítése elegendő lehet (Thomas et al., 2001). Bár a nagyobb megbízhatóság érdekében érdemes nagyobb génszakaszokat bevinni. A beépítéshez használt génszakasz gondos kiválasztásával több szekvenciahasonlóságot mutató gén, vagy egy géncsalád több tagja együttesen (konzervált szakasz) és külön-külön (specifikus szakasz) is csendesíthető (Lee et al., 2015). A VIGS további jellemzője, hogy a vírusfertőzés időzítésével a génfunkció a növényi fejlődés különböző szakaszaiban is vizsgálható, és így lehetővé teszi a korai stádiumokban létfontosságú gének kifejlett növényben betöltött funkciójának vizsgálatát is (Senthil-Kumar et al., 2008).

A VIGS rendszer mindig függ a vizsgált növényfaj és felhasznált vírus közti kapcsolattól. Néhány növény-vírus kapcsolatban a mesterséges vírusfertőzés módszere nem kidolgozott vagy összetett, időigényes és alacsony megbízhatóságú (például rovarvektort igénylő) folyamat. Vannak vírusok, amelyek bizonyos növényeken súlyos tüneteket okoznak, míg más növényeken szinte tünetmentesek vagy nagyon enyhe tüneteket mutatnak.

In situ hibridizációs technikákat alkalmazva mutatták ki, hogy vírusfertőzött növények szöveteiben egyes gének (pl: lipoxigenáz) expressziós szintje jelentősen és tartósan lecsökken. Ezt a jelenséget nevezték el shut-off-nak (Escaler et al., 2000; Havelda & Maule, 2000). A shut-off folyamat az érintett gének transzkripcióját gátolja és ezekből hosszabb időn át képes folyamatos hiányt, csökkent expressziót fenntartani. Ez a folyamat több ún. "háztartási gén" vagy gyakran használt referenciagént érinthet, ez igen megnehezíti a VIGS vizsgálatokban gyakran alkalmazott qPCR eredmények kvantitatív értékelését. Ezek alapján elmondható, hogy olyan vírust érdemes VIGS vektorként alkalmazni, amivel a vizsgált növényünk egyszerűen és gyorsan fertőzhető, a bejutott vírus hatékonyan tud terjedni a növényben, de nem vált ki súlyos tüneteket és nem okoz drasztikus génexpressziós változásokat sem.

Az első azonosított növényi vírust, a dohány mozaik vírust (TMV) alkalmazták először VIGS vektorként. A *növényi fitoén deszaturáz (PDS)* gén egy szakaszát építették be a vírusba

(Kumagai et al., 1995). A PDS fehérje a karotinoid bioszintézisben vesz részt, hiányában ezek a fotoprotektív vegyületek keletkezése gátolt, és így nem képesek megvédeni a klorofillt a fény destruktív hatásától. Azokban a növényekben, ahol a *PDS* gén alulműködik (knockdown), fény hatására a klorofill lebomlik, így klorotikus tünetek és a levelek kifehéredése figyelhető meg ("photobleaching"). Ezt a gént előszeretettel használják riporter géneként a VIGS kísérletekben.

Néhány éven belül Ruiz és munkatársai létrehoztak egy új, a burgonya X vírusán (PVX) alapuló VIGS vektort. Egy a *PDS* és egy a *GFP* (green fluorescent protein) gén szakaszát tartalmazó konstrukciót is készítettek és ezeket sikerrel tesztelték vad típusú és *GFP* transzformált *N. benthamiana* növényeken (Ruiz et al., 1998).

Mindkét korábban említett esetben a fertőzés az *in vitro* transzkripcióval előállított vírus RNS-ek mechanikai átvitelével történt. A TRV vírus esetén egy új vektorrendszert hoztak létre, ahol a vírus RNS cDNS-ét (komplementer DNS) egy speciális bináris vektorba építették. Ezzel lehetővé vált, hogy a konstrukciót *E. coli*-ban szaporítsák és tartsák fenn, sőt a bináris vektor átvihető *Agrobacterium*-ba is. A vektort hordozó *Agrobacterium* törzs felhasználható agroinfiltrálásra; így a vektor bejut a növényi sejtbe, és erről átirodik a fertőzőképes vírus RNS, amely képes szisztemikus vírushordozást kialakítani az agroinfiltrált növényekben (Ratcliff et al., 2001). A TRV vektorra jellemző, hogy a kiinduló vírushoz hasonlóan hatékonyan tud elterjedni a növényben és más vírusokkal ellentétben képes bejutni a merisztémába is. A hatékony fertőzőképesség és a rendkívül széles gazdakör is hozzájárult, hogy a VIGS kísérletekben való felhasználása széles körben elterjedt (3. táblázat).

Számos egyéb vírus felhasználásával számos további növényen végeztek VIGS alapú kísérleteket, gének és szabályozóelemek funkciójának feltárására. A *Solanacea* családba tartozó növények közül a dohányfajokat előszeretettel vonták be ilyen vizsgálatokba (Kumagai et al., 1995, Ruiz et al., 1998, Hiriart et al., 2003, Ratcliff et al., 2001, Igarashi et al., 2009), de további a burgonyafélék családjába tartozó növényen is alkalmazták ezt a módszert (3. táblázat). RNS és DNS vírusokat is felhasználtak a növény család ilyen jellegű vizsgálataiban. A TRV-alapú vektor volt az, amit a családba tartozó legtöbb növényen sikerrel alkalmaztak (3. táblázat).

3. táblázat A Burgonyafélék családjába (*Nicotiana sp.* kivételével) tartozó növényeken végzett válogatott VIGS kísérletek és az általuk alkalmazott vektorok, célgének és endogén kontrolok.

Növényfaj	Vektor	Referencia	Célgén	Endogén kontrol
<i>Capsicum annuum</i>	TRV	Chung et al., 2004,	PDS, CarbcS	rRNS
		Wang et al., 2013	CaPDS, CaPOD	ubiquitin (UBI3)
		Tian et al., 2014	CCS, PSY, LCYB, CRTZ	ubiquitin (UBI3)
		Hou et al., 2018	ACO3, NCED1, NCED3	ubiquitin (UBI3)
		ul Haq et al., 2019	CaPDS CaHSP60-6	ubiquitin (CaUBI3)
		Ma et al., 2019	CaCIPK1	aktin
		Lu et al., 2019	CaPDS, CaMYC	ubiquitin (CaUBI3)
		Jang et al. 2020	PSY2	aktin
		Jeong et al., 2020	PRR2	aktin
	Gai et al., 2020	CabZIP25	ubiquitin (CaUBI3)	
BBWV2	Choi et al., 2019	PDS, CaLEA6	aktin (CAACT7)	
<i>Capsicum chinense</i>	ALSV	Li et al., 2019	pAMT	18S rRNS
<i>Petunia sp.</i>	TRV	Naing et al., 2019a	CaPDS	tubulin (TUB)
	TRV	Chen et al., 2004	PhPDS, PhCHS	18S rRNS
	TYDV	Atkinson et al., 1998	PhCHS	ubiquitin (UBQ) + (DFR) + (XET)
<i>Physalis peruviana</i>	TRV	Osorio-Guarín et al., 2019	PpPDS	tubulin (α -TUB)
<i>Solanum bulbocastanum</i>	TRV, PVX	Brigneti et al., 2004	RB, R1, Rx, GUS,	ubiquitin
<i>Solanum lycopersicum</i>	TRV	Fu et al., 2005	LeEIN2, LeEIL, LeCTR1	ubiquitin (UBI3)
		Velásquez et al., 2009	PDS	
<i>Solanum pseudocapsicum</i>	TRV	Xu et al., 2018	SpPDS, SpChIH	ubiquitin, aktin
<i>Solanum tuberosum</i>	TRV, PVX	Brigneti et al., 2004	RB, R1, Rx, GUS,	aktin
	PVX	Faivre-Rampant et al., 2004	PDS, GFP	GAPDH
<i>Solanum nigrum</i>	TRV, PVX	Brigneti et al., 2004	RB, R1, Rx, GUS,	ubiquitin
<i>Solanum okadae</i>	TRV, PVX	Brigneti et al., 2004	RB, R1, Rx, GUS,	ubiquitin

Paprikán először 2004-ben alkalmazták a VIGS rendszert, ebben és a további esetekben is a korábban leírt TRV vektor alapján készült konstrukciókat agroinfiltrálással jutatták be a fiatal növények sziklelevelébe vagy fiatalkori leveleibe (Ratcliff et al., 2001, Chung et al., 2004). Wang és munkatársai 2013-ban dolgozták ki a TRV-vektor rendszer egy paprikára optimalizált alkalmazási módszerét. Több paprikafajta bevonásával határozták meg az optimális agroinfiltrálás paramétereit (OD600, növénystádium, vegetációs hőmérséklet, stb.). Két tanulmányban is kiválasztott gének (*CaPO2*, *CaMLO2*) szárazságstresszre, abszcizinsav (ABA) útvonalban játszott szerepét vizsgálták (Choi & Hwang, 2012, Lim & Lee, 2014). Más tanulmányok a TMV fertőzéshez kapcsolódó gének (*CaBtf3*, *CaRDR1*, *CaWRKY1*) vizsgálatához használták a TRV-VIGS rendszert (Huh et al., 2012, Lim et al., 2011, Qin et al., 2017).

Létezik egy speciális vírusalapú mikroRNS-csendesítő (VbMS) rendszer, amely lehetővé teszi a növényi miRNS-ek funkcionális elemzését. A VbMS dohány zörgőlevelűség vírus

(TRV) alapú és a miRNS célpontokat imitáló (target mimikri) RNS-ek expresszióján keresztül képes az endogén miRNS-ek aktivitását lecsökkenteni. A módszert több miRNS esetén sikerrel alkalmazták, a miR172-re és a miR165/166-ra tervezett VbMS fejlődési hibákat okozott *Nicotiana benthamiana*-ban, míg a miR319-re tervezett TRV konstrukcióval fertőzött paradicsomon (*Solanum lycopersicum*) kevésbé összetett levelek jelentek meg (Sha et al., 2014).

A VIGS vírusvektorok felhasználhatóak öröklődő mutációkat indukáló génszerkesztő elemeknek az élő növényekbe való bejuttatására is. A dohányzörgőlevelűség vírust (TRV) használták az CRE-I meganukleáz expresszáására *Nicotiana alata*-ban. A fertőzött növényekből gyűjtött magokból fejlődő utódok hordozták a kívánt öröklődő deléciós mutációkat (Marton et al., 2010). A TRV-t szintén használták cinkujj-nukleáz (ZFN) kifejezésére *Nicotiana tabacum*-ban és *Petunia hybrid*-ban (Honig et al., 2015). Ez esetben azonban az öröklődő mutációkat hordozó egyedeket, csak a fertőzött szomatikus szövetekből indított *in vitro* tenyészetekből regenerált növények között azonosítottak. Biotechnológiai módszerekkel sikerült egy olyan negatív szálú RNS-vírust létrehozni, ami képes mind a CRISPR-asszociált 9-es fehérjét (CAS9), mind az gRNS-eket kifejezni (Dinesh-Kumar & Voytas, 2020). Ezzel a vírusvektorral (SYNV) való fertőzés más módszerek (Agrobaktérium, génpuska) bevonása nélkül is alkalmas módszer a nagy hatékonyságú génszerkesztés (gene editing) megvalósítására *N. benthamiana* növényekben (Ma et al., 2020).

4.6. Solenacea családra vonatkozó genomszintű információk

4.6.1. Genomszekvenálási módszerek, elérhető *Solanaceae* genomok

Az ezredforduló óta óriási előrelépés történt a növényi genomok kutatásának területén. Az *Arabidopsis thaliana* volt az első növény, aminek a teljes genomszekvenciáját publikálták (Initiative, A. G., 2000). Ezt rövid időn belül követte a rizs genomja, amit szintén mesterséges baktérium kromoszámák (BAC) felhasználásával szekvenálták. A következő az első fászfű növényi genom (*Populus trichocarpa*) volt, amit már nem BAC klónok, hanem a genom random feldarabolásával előállított rövidebb szakaszok (teljes genom shotgun szekvenálás WGS) szekvenciáinak összeillesztésével alkottak meg (Tuscan et al., 2006). Az ezt követő növényi genomok elemzése során sok esetben mindkét stratégiát alkalmazták a hatékony genomösszeszerelés érdekében.

Bár a WGS megközelítés jelentősen csökkentette a genomösszeállításához szükséges időt és költségeket, a Sanger-szekvenálás magas költségei miatt továbbra is drága és időigényes folyamat volt. Az új generációs szekvenálási módszerek megjelenése drámai módon javította a genom szekvenálás sebességét és költséghatékonyágát. Az NGS alatt több különböző szekvenálási megközelítést (454, Illumina, SOLID) értünk, de mindegyikre jellemző, hogy több DNS-fragmenst szekvenálnak párhuzamosan, ezáltal sokkal nagyobb mennyiségű, de általában rövidebb és gyengébb minőségű szekvenciaolvasást eredményeznek (Bolger et al., 2014).

Az első NGS technológia, a piroszekvenálás alapú 454 volt, melyet először baktérium méretű genomok, később (sanger típusú szekvenálással együtt) komplexebb genomok (alma, kakaóbab) azonosítására is használtak (Velasco et al., 2010, Argout et al., 2011). Egy másik korai NGS-technológia az Illumina által nyújtott szintézis alapú rendszer volt. Ez a technika, a 454-hez képest jelentősen több, bár rövidebb leolvasást eredményez. Bevezetése óta a technika fejlesztésével a leolvasások hossza és száma is növekedett. Ez a technika felhasználható komplex növényi genomok szekvenálására is. Ezt a technikát uborka esetén Sanger szekvenálással, a szamóca esetén 454 és SOLID szekvenálással kombinálva sikerrel alkalmazták a teljes genom meghatározására (Huang et al., 2009b, Shulaev et al., 2011).

A közelmúltban az Illumina szekvenálás vált a legmeghatározóbb NGS platformmá a genom szekvenálások terén (Bolger et al., 2014) és sok más 2010 után meghatározott genomon felül (banán, csicscriborsó, narancs és görögdinnye), az első *Solanacea* faj (burgonya) (Xu, et al., 2011) genomszekvenálása is ehhez a módszerhez kapcsolódik.

A burgonyát követően a paradicsom és két dohányfaj, a *N. benthaminana* és a *N. tabacum* genomja vált elérhetővé (Tomato Genome Consortium., 2012, Bombarely et al., 2012, Siervo et al., 2014). A termesztett dohánnyal nagyjából egyidőben a paprika genomját két független csapat is sikeresen összeállította (Kim et al., 2014, Qin et al., 2014). Azóta publikálták két petúniafaj a *P. axillaris*, a *P. inflata* és nemrégiben a *Solanum melongena* genomszekvenciáit is (van der Krol & Immink, 2016, Barchi et al., 2019).

Az első publikált paprika genom a mexikói ‘Criollo de Morelos’ (CM334) tájfajtának és a *Capsicum chinense* PI159236 teljes genomjának szekvenálásáról számolt be (Kim et al., 2014). Alig néhány hónappal később közzétették a *C. annuum* Zunla-1 és a vadon élő Chil’Tepin’ faj (*C. annuum* var. *aviculare*) genomszekvenciáit is (Qin et al., 2014). Mindkét

tanulmány szerint a paprika genom mérete 3–3,5 Gb, amely ismétlődő elemekben gazdag (több, mint 80%) és körülbelül 35 ezer gént tartalmaz.

Azóta további paprikagenomok is meghatározásra kerültek. Kim és munkatársai 2017-ben a CM334 és a korábban publikált chinense genotípusra vonatkozó genom frissített verzióját és egy újabb *Capsicum* faj a *C. baccatum*, PBC81 genotípusának genomszekvenciáját publikálták. Az első paprika F1 hibridet, ami szekvenálásra került, a korábban szekvenált CM334 és egy édes blocky típusú szülővonal keresztezésével állították elő. (Hulse-Kemp et al., 2018). 2019-ben publikálták először nagyszámú (190) *Capsicum* spp. tételen végzett genotípus-szekvenálás (GBS) során gyűjtött szekvenciainformációkat. Ebbe a vizsgálatba mind az öt termesztett *Capsicum* faj (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* és *C. pubescens*) és a vadon is előforduló (*C. annuum* var. *aviculare*) faj több genotípusát is bevonták (Pereira-Dias et al., 2019).

4.6.2. A *Capsicum* nemzetségre vonatkozó mRNS-szintű információk

Az újgenerációs, nagy áteresztőképességű szekvenálási technológiák megjelenése nemcsak a genomszekvenelések terén, de az RNS-ek vizsgálatában is új utat nyitott. A DNS-szintézisen alapuló Illumina technológia párhuzamosan több millió rövid DNS-fragmentumot képes szekvenálni (Marioni et al., 2008). A módszer lehetővé teszi az mRNS-ek, a nem kódoló RNS-ek, a szabályozó kisRNS-ek, a miRNS-ek és speciális célzott RNS vizsgálatok kivitelezését.

Az mRNS szekvenálás teljes genomszintű információt ad a transzkriptumról és a mikromátrix (microarray) vizsgálatokkal szemben nem igényel előzetes szekvenciaismeretet. Ez a módszer képes azonosítani és elkülöníteni az eltérő izoformákat, génfüziókat, és képes kimutatni az allél-specifikus expresszió különbségeket is. Szövetszintű könyvtárak készítésével és szekvenálásával a szövetspecifikus transzkriptomikai profil elkészíthető és elvégezhető az RNS-szintű differenciálexpressziós vizsgálat. Ez a módszer biztosan elő fogja segíteni a növényekben lévő komplex RNS-szintű szabályozás különböző elemeinek megismerését és megértését (Jain, 2011).

Paprika esetén többféle NGS módszert is alkalmaztak a transzkriptumok szekvenálásához és referencia nélküli („de novo”) összeszereléséhez (Liu et al., 2013a, Liu et al., 2013b, Lu et al., 2012, Góngora-Castillo et al., 2012, Ashrafi et al., 2012). Amíg nem állt rendelkezésre a teljes genomszekvencia, a szekvenciák annotálását és a lehetséges funkciók hozzárendelését

is az mRNS-szekvenciákon (EST) végezték el (Kim et al., 2008). Az RNS szekvenálást több esetben a kapszaicin szintézis mélyebb megértésére és ebben a folyamatban résztvevő új fontos gének azonosítására használták fel (Liu et al., 2012, Liu et al., 2013b). Más kutatók új molekuláris markerek fejlesztésében vették hasznát az így szerzett információkat (Liu et al., 2013a, Lu et al., 2012, Ashrafi et al., 2012).

A paprika termésfejlődése során történő mRNS-szintű változásokat is vizsgálta egy kutatócsoport (Martínez-López et al., 2014). Ez a tanulmány a termésfejlődés négy szakaszában (10, 20, 40, 60 DAA) vizsgálta a paprikagének expressziójának változásait. Vizsgálatuk során a legtöbb egyedi mRNS-szekvenciát 40 DAA stádiumban, míg a szekvenált transzkripteknél a legkisebb szekvenciavariabilitást az utolsó, a 60 napos stádiumban találták. A kapszaicinoid és az aszkorbinsav bioszintézissel kapcsolatos gének esetén 20 DAA-nál, míg a karotinoid bioszintézissel kapcsolatos gének esetén 60 DAA-nál tapasztalták a legmagasabb expressziós értéket. (Martínez-López et al., 2014).

4.6.3. KisRNS-szintű információk

A 30 nukleotid alatti kisRNS-ek kimutatásához az Illumina szekvenálásra általában jellemző 150 bp-os maximum leolvasási méret több, mint elegendő. A kisRNS-ekre ún. RNS-adapttereket csatolnak (ezek rövid ismert szekvenciájú szakaszok), majd az ezekre tervezett specifikus primerekkel végzett reverz-transzkripció során állítják elő az RNS-ről átírt komplementer DNS-t (cDNS) (Luo, 2012). Ezen cDNS-ek felszaporításával olyan DNS-könyvtárat kapunk, ami rövid, mindkét végén a felhasznált adaptterekre jellemző szekvenciát hordozó DNS-molekulákból áll. A nagy áteresztőképességű szekvenálás során nem csak a könyvtárban szereplő kis RNS-ek szekvenciáját ismerhetjük meg, de a leolvasások száma alapján az egyes szekvenciák mennyiségéről is pontos képet ad. Eltérő adapttereket használva több ilyen könyvtár összekeverhető, mert a kapott leolvasások az adaptterszekvenciák alapján szortírozhatóak.

A burgonyafélék családján belül az egyik kiemelt biológia folyamat a klimakterikus termésérés. Ezért mind az átfogó, szekvenálás alapú miRNS-azonosításra, mind a miRNS-ek által szabályozott funkciók feltárására törekvő vizsgálatokat a folyamat egyik választott modellnövényén, a paradicsomon végezték el (Mohorianu et al., 2011, Moxon et al., 2008a, Zuo et al., 2012, Karlova et al., 2013, Gao et al., 2015).

Paprikában a miRNS-ek azonosításához a kísérletes vizsgálatok mindegyikében Illumina alapú módszert alkalmaztak. Hwang és munkatársai 128 konzervatív és 50 új miRNS-t azonosítottak. Qin és munkatársai a genomszekvenálással párhuzamosan végeztek kisRNS szekvenálást, ők 141 konzervált és 35 paprikaszekvenálást, ők 141 konzervált és 35 paprikaszekvenálást írtak le. Egy további vizsgálatban 59 ismert és 310 újonnan azonosított miRNS-ről számoltak be (Liu et al., 2017).

Akárcsak az mRNS-eknél, a kisRNS-ek esetén is lehetőség van szövetszintű könyvtárak létrehozására és ezáltal a szövetek miRNS és siRNS-profiljának meghatározására is. Így azonosíthatunk a vizsgált szövetben kiemelt jelentőségű, az mRNS-ek jelenlétét és aktivitását szekvenspecifikusan befolyásoló kisRNS-eket. A módszerrel azonosított új kisRNS-ek lehetséges keletkezésének és prekursoraiknak az azonosításához több bioinformatikai programcsomag is rendelkezésre áll, azonban legtöbbjük alkalmazásához egy meglévő referenciagenomra van szükség (Moxon et al., 2008b, Yang & Li, 2011).

A paprikában végzett miRNS-alapú vizsgálatok során a paprika különböző részeire, szöveteire (levél, szár, virág, termés) jellemző konzervált és új fajspecifikus miRNS-ek is leírásra kerültek. Érdekes módon a termést is vizsgáló tanulmányokban a termést nem osztották több részre, mindig egyben, egy egészként kezelték (Gao et al., 2015; Hwang et al., 2013; Kim et al., 2014; Qin et al., 2014).

A miRNS-ek expressziója szövet és fenológiai fázisra jellemzően változhat (Liu et al., 2017, Nag et al., 2009, Inui et al., 2010), ezért a termésfejlődés miRNS-szintű szabályozásának mélyebb megértéséhez közelebb juthatunk a szövet és stádium specifikus miRNS mintázatok meghatározásával.

5. Anyag és módszer

5.1. Növényanyag

A vizsgálatainkhoz a modern beltenyésztett paprikavonalat a ‘Fehér özön’ fajtát használtuk a legnagyobb arányban, melynek a vetőmagjait a ZKI-Vetőmag Kft.- től (H-6000 Kecskemét, Mészöly Gyula u. 6) szereztük be. A *Capsicum annuum var. aviculare* fajhoz tartozó, a ‘Tepin’ és Pequin néven szereplő tételeket a pepperseeds.eu online vetőmagértékesítőtől vásároltuk. Az első populáció felnevelése után, a morfológiai jellemzők alapján kiemeltük a céljainknak leginkább megfelelő vad típusú anyanövényt. Ennek az anyanövénynek az öntermékenyítésével előállított utódnövényeket (későbbiekben: ‘Tepin’) vontuk be a kultúrevolúciós vizsgálatainkba.

A magokat petri csészében nedves szűrőpapíron sötét hőkamrában csíráztattuk stabil 21 ° C-on, a kikelt magokat cserépbe ültettük és hosszú nappalos (16 /8) körülmények között fényszobában neveltük. A fejlődésük során minden virágon megjelöltük a pollenszórás időpontját és ezt követően 4 különböző időpontban, a 14., 20., 28. és 40. napon végeztünk mintavételt. A 14, 20 napos terméseket a méretük miatt egyben kellett kezelnünk. A későbbi időpontban gyűjtött terméseket három jól elkülönülő részre választottuk szét: magra, placentára és húsrá.

A TMV alapú VIGS vizsgálatokhoz a már említett ‘Fehér özön’ fajtán kívül szükséges volt egy TMV fogékony paprika fajta bevonására is, választásunk a hasonló típusba tartozó ‘Javított Bogyiszlói’ fajtára esett. A TRV-VIGS konstrukciók in vivo felszaporításához *Nicotiana benthamiana* növényeket használtunk. A fertőzött dohánynövények nedvét felhasználva passzáltuk a víruskonstrukciókat a paprika növényekre. A vírusfertőzött növényeket hasonló körülmények között, de elkülönítve neveltük. 3-4 tüneteket mutató növény csúcsi leveleit összegyűjtöttük, és együttesen használtam fel őket a további vizsgálatokhoz. Egyes növények hosszú távú megfigyeléséhez a fertőzött növényeket a fényszobából, üvegházi körülmények közé kellett áthelyeznünk.

5.2. Alkalmazott felvételezési, biotechnológiai és bioinformatikai módszerek

5.2.1. Morfológiai felvételezések és mérések

A *Capsicum annuum* var. *aviculare* fajhoz tartozó tételekben lévő variabilitás jellemzéséhez az UPOV által a DUS vizsgálat során vizsgált jellemzők közül választottunk 40 tulajdonságot. A szár-, a levél- és a termés méretek meghatározásához tolmérőt használtunk.

5.2.2. Vírus indukálta géncsendesítési rendszer elemei

5.2.2.1. *In vitro* transzkriptummal történő fertőzés

Ezt a rendszert az általunk használt VIGS vektorok közül a TMV (Tobacco Mosaic Virus)(Kumagai et al., 1995) és a PVX (potato virus X) (Chapman et al., 1992) alapúak esetén alkalmaztuk (Ratcliff et al., 2001). A TMV-PDS és a PVX-PDS konstrukciókat Oláh Enikő munkatársam állította elő, és bocsátotta rendelkezésemre. A TMV-VIGS konstrukciót KPN-I, a PVX-VIGS konstrukciót SPE-I enzimmel linearizáltuk. Az restriktív emésztéshez 25 µl plazmid, 5 µl enzimhez javasolt puffer (10x), 3 µl enzim (KPN-I vagy SPE-I) és 17 µl desztillált víz elegyét 2,5 óráig 37 °C-on inkubáltuk. A fehérjék eltávolításához ProtK (Fermentas) kezelést (50°C, 30 perc) alkalmaztunk 100 µl végtérfogatba (50 µl emésztési elegy, 5 µl 10% SDS-t, 44 µl milliQ víz és 1 µl proteináz K (Fermentas)). Az így előállított elegyből a linearizált plazmidot fenol-kloroformos extrakcióval tisztítottuk. A nukleinsavakat abszolút alkohollal kicsaptuk és 70%-os etanollal átmostuk, majd szárítottuk és 30 µl steril desztillált vízben oldottuk fel. Ezt a linearizált plazmidot tartalmazó oldatot használtuk az T7 polimeráz alapú *in vitro* transzkripcióhoz. A reakcióhoz az alábbi 50 µl-es elegyet készítettük el: 10 µl 5x transzkripció puffer, 1 µl ribolock RNáz inhibitor, 5 µl 10mM rNTP mix (rGTP csökkentett), 2,5 µl plazmid, 10 µl 5mM CAP analóg és 1,2 C T7 polimeráz, 30 perc 37 °C-on történő inkubáció után 10 µl 20mM rGTP-t adtunk hozzá, majd azonos hőmérsékleten még egy órát inkubáltuk. Az átírt RNS-eket ellenőrzés céljából agaróz gélen választottuk el. A növények fertőzéséhez a transzkriptum, az inokuláló puffer (50 mM glicin, 30 mM K₂HPO₄, 1 % bentonit, 1 % cellit) és steril desztillált víz 2:3:5 arányú keverékéből növényenként 2-2 levélre 15-15 µl-t vittünk fel üvegspatula segítségével. A negatív kontrollként használt növényeinken úgyszintén 2-2 levelet desztillált víz és inokuláló puffer 1:1 arányú keverékével kezeltünk.

5.2.2.2. Agroinfiltrált dohánynövényekről történő fertőzés

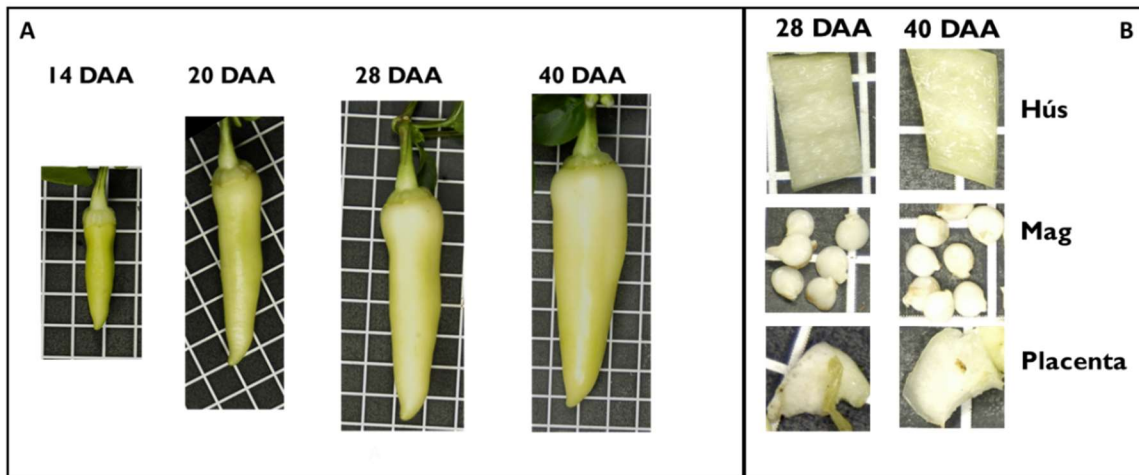
Ezt a fertőzési rendszert a TRV(Tobacco Rattle Virus) alapú VIGS vektorok esetén alkalmaztuk. A TRV vírusfertőzéshez a két RNS-nek egyidejűleg kell jelen lennie a növényben (TRV1, TRV2) (Harrison és Nixon, 1959). Az infiltráláshoz 3 TRV tartalmú vektorkonstrukciót használtunk, mindegyiket a C58C1 agrobaktérium törzsben szaporítottuk fel, és ennek segítségével is juttattuk be. Az agrobaktérium telepeket 5 ml folyékony táptalajba (kanamicin és tetraciklin tartalmú YEB) oltottuk és egy éjszakára rázógéphez (28-30 C°) helyeztük. A következő napon centrifugáltuk (28-30 C°, 4000 rpm, 10 perc) és a felülúszó eltávolítása után a pelletet felszuszpendáltuk (10mM MgCl₂, 150 µM acetosziringon). Az így kapott szuszpenziókat spektrofotométerrel mértük, hígítással beállítottuk az optikai denzitásukat (OD₆₀₀=1), majd szobahőmérsékleten inkubáltuk (2 óra). A TRV1-es konstrukció önmagában nem képes fertőzni, így a TRV1 szuszpenzió (TRV2 nélkül) jól használható volt a kontrol növények kezeléséhez. Infiltrálás előtt kétféle 1:1 arányú keveréket állítottuk elő: TRV1:TRV2-üres, TRV1:TRV2-PDS. Ezek agroinfiltrálását paprika növények levelén is kipróbáltuk, de sajnos így nem sikerült a fertőzés. Ezért a fertőzéshez az említett kombinációkat fiatal *Nicotiana benthamiana* növények két-két levelébe (fonáki oldalról) fecskendeztük, majd a tünetek és a PDS reakció megjelenése után a kiválasztott dohányleveleket mozsárban összetörtük és üvegspatulával a paprikanövényeink karburundummal beszórt leveleire kentük.

5.2.3. RNS-kivonási módszerek

3 eltérő RNS-kivonási módszert (Trizolos (Simms et al., 1993), CTAB (Gambino et al., 2008), Butanol-CTAB-os (Camacho-Villasana et al., 2002)) próbáltunk ki paprikából származó mintákon és ezek közül a TRI® Reagent RNA Isolation oldat használatán alapuló, a gyártó utasításai alapján történő (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kivonási módszert választottuk ki. Erre az volt a jellemző, hogy megbízhatóan, megfelelő mennyiségű és tisztaságú RNS-t sikerült kivonni a különböző paprikamintáinkból. Ezt a módszert sikerrel alkalmaztuk a termések, a magok és a fertőzött levelek esetén is. A kivont RNS-ek minőségét gélelektroforézissel és spektrofotométerrel (NanoDrop 2000) is ellenőriztük.

5.2.4. Könyvtárkészítés, szekvenálás

A pollenszórás időpontját követően 4 különböző időpontban, a 14., a 20., a 28. és a 40. (7. ábra A.) napon vett biológiai mintákból RNS-t izoláltunk és a kiválasztott jó minőségű RNS-kivonatokból, vizsgálati időpontonként és szövetenként (hús, mag, placenta) (7. ábra. B) két biológiai ismétlésben készítettünk kisRNS-könyvtárakat.



7. ábra A paprikatermések (A) és termésszövetek (B) a kiválasztott fejlődési stádiumokban.

Mintánként 30 μg totál RNS-t választottunk el 8%-os denaturáló poliakrilamid/urea gélben, RNS méretmarkerek segítségével a kisRNS-tartományt a gélen kijelöltük és szike segítségével kivágtuk (Mellékelt ábra 1B). A kivágott gél RNS-tartalmát visszanyertük (Mathioni et al., 2017) és 20 μl ribonukleáz-mentes ultratiszta vízben oldottuk fel. Az így készült oldatból 2,5 μl -re volt szükség a könyvtár elkészítéséhez. A kisRNS-könyvtárakat a Truseq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina, CA, US) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint hoztuk létre (Mellékelt ábra 1C). A különböző genotípusokból, fenológiai stádiumokból és szövetekből összesen 20 könyvtárat készítettünk (5. táblázat). Ezek minőségét és koncentrációját gélelektroforézissel ellenőriztük (Mellékelt ábra 1D), és a PCR-amplifikált, gélen tisztított és bar-kódolt cDNS-könyvtárakból nyolcasával csoportokat hoztunk létre, és így 3 csoportot (pool-t) küldtünk el az UDGenomed Kft.-nek Illumina HiSeq 2000 platform-on való szekvenálásra.

5.2.5. Bioinformatikai analízis eszköztára

A visszkapott nyers, kisRNS-szekvenciákat a cutadapt 1.9.1. (Martin, 2011) verziójával dolgoztuk fel. A kisRNS-könyvtárakból származó szekvenálások minőségellenőrzését a FastQC 0.11.5 (Andrews, 2010) használata előtt és után is elvégeztük. A mikroRNS-vizsgálathoz, a szűrt tiszta leolvasásokat a *Capsicum annuum* cv. CM334 (version 1.55) genomra illesztettük. Az új miRNS-ek bioinformatikai azonosításához, a MirCat (Stocks et al., 2012) és miRDeep-P (Yang és Li 2011) szoftvereket párhuzamosan használtuk, mivel mindkét rendszer nagyszámú potenciális miRNS-t ad vissza, ezért a két rendszerből származó adatok egyesítésekor az érett szekvenciák tekintetében csak a teljes szekvencia azonosságot fogadtuk el. A két adatszett egyesítését (1. Mellékelt szkript: intersection.py) és a szükséges szűréseket Python szkriptek segítségével végeztük el.

A miRNS-eket 3 csoportba soroltuk: konzervatív miRNS-ek, ezeket a MirProf segítségével azonosítottuk a miRNS-ek online adatbázisában szereplő szekvenciákhoz való hasonlóságuk alapján. A miRBase adatbázisban nem szerepelt egyetlen *Capsicum*-ra vonatkozó szekvencia sem, ezért a korábban *Capsicum* fajokban leírásra került miRNS-ek (Hwang et al., 2013, Kim et al., 2014) összegyűjtésére létrehoztuk a *Capsicum* nemzetség-specifikus miRNS-ek csoportját. A harmadik csoportban az új, korábban nem azonosított, a MirCat és a miRDeep-P-vel előrejelzett miRNS-ek kaptak helyet.

A nyers expressziós értékek meghatározásához a Patman (Prüfer et al., 2008) programot használtuk. A differenciálexpressziós vizsgálatokhoz a DESeq2-t (Love et al., 2014) alkalmaztuk a nyers abundancia mátrixon. A DESeq2 a nyers értékek normalizálását a medián arány normalizálásával hajtja végre. Mind a korrigált középértéket (basemean), mind a változás mértékét (\log_2 fold) a DESeq2 alkalmazásával kaptuk meg. Az olyan miRNS-ek kifejeződését tekintettük eltérőnek, amikhez legalább átlagosan 10 leolvasás (basemean) tartozott és a változás mértéke (fold change) 6 vagy annál nagyobb volt és a korrigált p érték (adjusted p value, padj) 0,05 alatti volt.

A differenciálexpressziós vizsgálat eredményeinek megjelenítéséhez MA-diagramokat készítettünk. A miRNS-eket családokba soroltuk a szekvencia-hasonlóságuk alapján ehhez a cd-hit EST (Huang et al., 2010) programot használtuk, az egyediségre vonatkozó határértéket (identity cut.off) 0,8-re állítottuk be. Az egy családba tartozó miRNS-ek többszörös

illesztéséhez és együttes megjelenítéséhez a Clustal Omega, a Color Align Conservation (Stothard 2000) és a WebLogo (Crooks et al., 2004) online alkalmazásokat használtuk.

A vizsgált miRNS-ek célpont-RNS-einek az azonosításához a PsRNATarget programot az alábbi paraméterekkel (várt érték: 5.0, büntetőpont G:U párosodás esetén: 0,5, büntetőpont más eltérésért: 1, A kapcsolódó régió: 2.-13. nukleotid között, extra súlyozás a kapcsolódó régióban: 1,5, maximum eltérés a kapcsolódó régióban: 2, büntetőpont rés nyitásáért: 2,0, büntetőpont rés meghosszabbításáért: 0,5, translációs gátlásért felelős régió: 10.-11. nt) használtuk, és a 'Zunla-1' fajtán leírt és annotált génszettet adtuk meg referencia génlistaként (Dai et al., 2018, Qin et al., 2014).

A megfelelő miRNS kategóriákhoz rendelt transzkript azonosítókat (pl: Capana01g003808) python scriptek segítségével kivonatoltuk a PsRNATarget kimeneti szöveges fájlból. Ezekhez az azonosítókhoz hozzárendeltük a 'Zunla-1'-ről közzétett (ftp szerveren elérhető) annotált génlistából a fehérjeazonosítókat (pl: PP227_ARATH). Az így kapott fehérjeazonosítókat tartalmazó listát használtuk a panther fehérjeosztályok és a GO Slim gén ontológiai analízishez a panther adatbázisban (Mi et al., 2019).

A Go vizsgálat során fajsztű szűrést nem alkalmaztunk. A vizsgálatot mindhárom főkategórián: biológiai folyamat, molekuláris funkció, sejtkomponens elvégeztük, sőt a főkategóriákon belül további alkategóriákat (például a biológiai folyamat főkategórián belül az elsődleges anyagcsere folyamatok (GO:0044238) kifejezést, a sejtkomponens kategórián belül az intracelluláris membránhoz kötött organelum kifejezést (GO:0043231) panther fehérjeosztályokon belül a nukleinsavat kötő fehérjéket (PC00171)) is vizsgáltunk.

5.2.6. RNS-ek kimutatása, vizsgálata

Az RNS hibridizációs technikák szekvenálástól függetlenek és segítségükkel egy ismeretlen biológiai mintából ki lehet mutatni egy adott, általunk ismert RNS-szakaszt, ráadásul megfelelő körülmények között az egyes mintákban lévő RNS-ek mennyiségéről is megbízható információt ad. Munkánk során ezt a módszert alkalmaztuk a szekvenálási adatok megerősítésére, a vírusvektorok azonosítására és az endogén növényi gének expressziós szintjeinek meghatározására is.

A kis-RNS northern hibridizációhoz (Várallyay et al., 2008) mintánként 5 µg totál RNS-t választottunk el a 8M urea tartalmú 12%-os polyakrilamid gélen. A gélből az RNS-eket

HybondTM-NX (Amersham) membránra elektroforetikusan vittük át a Fast Blot (Biometra) blottoló segítségével. Az átvitt RNS-eket kémiai keresztkötésekkel (Pall & Hamilton 2008) stabilan hozzákötöttük a membránhoz. A miRNS-ek kimutatásához specifikus DNS- vagy ZLNS- oligókat használtunk (4. táblázat). A specifikus (10 pmol) oligonukleotid próbák 5'-végét T4 polinukleotid kináz jelenlétében radioaktív [γ 32P] ATP-vel jelöltük.

4. táblázat: A kísérleteink során felhasznált oligonukleotidok

Felhasználás	Típus	Azonosító	Szekvencia (5'-3')
Konzervatív miRNS-ek kimutatása	DNS oligo	mir168	GTCCCGACCTGCACCAAGCGA
		mir171	GAGTGATATTGGTTCGGCTCA
		mir172	CTGCAGCATCATCAAGATTCT
		mir396	AGTTCAAGAAAGCTGTGGAA
		mir166	GGGGAATGAAGCCTGGTCCGA
	LNA oligo	mir159 (LNA)	tAgaGctmCccTtcAatmCcaAa
mir167 (LNA)		tAgaTcaTgcTggmCagmCttmCa	
Új miRNS-ek kimutatása	DNS oligo	Can-mir-f01	CAGCTTGCATCAGTGAACCCCTCT
		Can-mir-f13	GCCCTTACAGCTCCTCCTCCTA
		Can-mir-f42	TACTGTTTCTGCTCCTACTCA
		Can-mir-f44	ACACTCAAACCTCATGAGGGTCTCT
Endogén gének kimutatása	PCR primer	RubiscoF	CTTTCCTCTGCAGCAGTTGCC
		RubiscoR	GCACTTGACGCACGTTGTGCG
		Gapdh F	TCTCAAATATGACTCCACCC
		Gapdh R	ACCCATTTCATTGTCATACC
Vírus kimutatás	PCR primer	TMV F	GCTATAACCACCCAGGACGCGA
		TMV R	TGGGCCCTACCGGGGGTAACG
		TRV F	GCTGCTAGTTCATCTGCAC
		TRV R	GCACGGATCTACTTAAAGAAC

A membránt hibridizáció előtt 5 percig a hibridizálás hőmérsékletén 2xSSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na-citrát, pH=7.2) oldatban előkezeltük, majd előmelegített ULTRAHyb-Oligo (Ambion Inc., Austin, TX, USA) pufferben (próba nélkül) 1 órán keresztül prehibridizáltuk. DNS-oligók esetén 37 °C –on, ZLNS-oligók esetén 50 °C-on egy éjszakán át hibridizáltuk a membránt.

A hibridizálás után a nem kötődött radioaktív próbákat el kell távolítani, ezért a membránokat kétszer 10 percig 0,1% SDS-t és 2× SSC-t tartalmazó oldattal mostuk a hibridizálási hőmérsékleten. A membránokat exponáló kazettába helyeztük és a kibocsátott radioaktív jeleket X-RAY röntgen film segítségével tettük láthatóvá. Voltak membránok, amelyeket több próbával is hibridizáltunk, az újbóli hibridizáció előtt a membránról a korábbi radioaktív próbát 0,1% SDS, 5 mM EDTA oldatban, magas hőmérsékleten távolítottuk el.

Az általunk használt VIGS vektorokat növényi RNS vírusok módosításával állították elő, ezért a fertőzött növények mintáiból Northern blot segítségével kimutathatóak. Az RNS-kivonatok méret szerinti elválasztásához 1,2%-os agaróz gélt és 100 V körüli feszültséget alkalmaztunk.

A Northern blot úgyszintén alkalmas vizsgálati módszernek bizonyult az endogén gének expressziós szintjeinek vizsgálatára is, azonban itt a megbízható eredményekhez egy kifinomultabb elválasztási rendszerre volt szükség. Az endogén RNS-ek vizsgálatához az RNS-kivonatokhoz géltre való felvitel előtt formaldehid, formamid és MAE; 4:7:20 arányú keverékét, 1µl ethidium-bromidot és 1µl FDE-t adtunk, majd az így készült oldatot tartalmazó Eppendorf-csőveket 65°C-ra melegítettük és 10-15 percig denaturáltuk, majd közvetlenül jégre tettük. Az így előkészített mintákból 20 µl-t vittünk fel a MAE pufferrel (0,1M, 40mM Na-acetát, 5 mM EDTA) feltöltött elektroforézis kádban elhelyezett 1,2%-os, formaldehides, denaturáló géltre. A gélelektroforézist 4 C°-on, 80 V gyorsítófeszültséggel hajtottuk végre.

Az RNS-eket mindkét esetben 20xSSC puffer rendszerben kapilláris blottal vittük át a gélből, Nytran NX membránra, amihez UV fény (600 J/m²s) segítségével az RNS-eket hozzá is kötöttük (UV transzilluminátor, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). A különböző vírus RNS-ek jelenlétét, és a vizsgált génekhez tartozó mRNS-szinteket Northern hibridizációval vizsgáltuk, ahol [³²P] jelölt (DNA labelling kit, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) specifikus PCR termékeket (4. táblázat) használtunk hibridizációs próbának. (Várallyay et al., 2014).

Az endogén gének esetén a radioaktív próba készítéséhez stabil, megbízható templátra volt szükségünk, ezért a vizsgálatba vont gének (*GAPDH*, *Rubisco*) egy darabját cDNS-ből kiindulva PCR-reakcióval szaporítottuk fel és pBluescript II KS (+) klónozó vektorba ligáltuk. A kapott ligátumot *E. coli* DH5α kompetens sejtbe transzformáltuk. Ezeket a sejteket 500 µl SOC tápoldat hozzáadása után (Sambrook et al., 1989) 40 percre a 37 °C-ra állított rázógépre helyeztük.

Az így felszaporított tenyészetekből 300-300 µl-t szelektív szilárd LB táptalajra (Sambrook et al., 1989) szélesztettünk és a petricsészéket egy éjszakára termosztátba (37 °C-ra) helyeztük. A kiválasztott baktériumtelepekből izolált plazmidokat restriktions emésztéssel és szekvenálással is ellenőriztük. Végül a GAPDH esetén Oláh Enikő által klónozott, a RUBISCO esetén az általam klónozott szakaszt (Mellékelt ábra 2.-3.) használtuk templátként a specifikus PCR termékek előállításánál.

A membránt a korábban leírt módon előkezeltük (5 perc 2xSSC) és prehibridizáltuk (ez esetben Church pufferrel 1 óra 65°C-on), majd kezdetét vette az egy éjszakán át tartó 15 ml radioaktív próbát tartalmazó Church pufferes hibridizáció. A hibridizáció után 2xSSC és 0,1% SDS oldattal 5-10 percig, 0,5xSSC és 0,1% SDS oldattal 15 percig és 0,1xSSC és 0,1% SDS oldattal 3-4 percig mostuk a membránokat, hogy a nem kötött radioaktív anyagot eltávolítsuk, és így tisztább, jobban értékelhető mintázatokat kapjunk a röntgenfilmeken. Az exponálási idő a membránon mért radioaktív sugárzás intenzitásától függően pár perctől, több napig változott (18-19. ábra).

6. Eredmények és következtetések

6.1. Morfológiai felvételezés eredményei az anyanövény-szelekcióhoz

A vad paprika génbanki tétéleket általában nyílt beporzású, nagyobb populációk felhasználásával tartják fenn. A populáció tagjai egymás között kereszteződhetnek, és a populációban lévő növényekről fogott magokat összekeverve használják a következő generáció előállításához. Ilyen formában tartható fenn leginkább az adott tételre jellemző variancia is. Az általunk vizsgált tétélek esetén komoly morfológiai különbségekre lettünk figyelmesek, ezért az International Union For The Protection Of New Varieties Of Plants (UPOV) szervezet által közzétett paprikára vonatkozó DUS irányelvben szereplő tulajdonságok közül 40 tulajdonságot (6 binomiális, 26 nominális, 8 kvantitív) (1. mellékelt táblázat) felvételeztünk, hogy részletes leírást készítsünk a kapott genetikai anyag egyes növényeiről. A 'Tepin' genotípusból 11 növényt neveltünk fel termésérésig, ezenkívül egy másik vad paprika tételt is vizsgáltunk („4” 21569).

Ezekkel a morfológiai vizsgálatokkal az volt a célunk, hogy vonalkialakítás céljából kiválasszuk a rendelkezésünkre álló genetikai anyagok közül a korábbi publikációkban ősi, domesztikáció előtti jellemzőként leírt tulajdonságokat (intenzív antociános és szőrözött nóduszok, kisméretű, kerek termések) leginkább hordozó vadpaprika egyedét. A mérlegelés során figyelembe vettük a szabályozott mesterséges környezetben (fényszoba, üvegház) való kezelhetőséget (kompakt méret, korai és folytonos virágzás) is.

6.1.1. Binomiális tulajdonságok

Az említett 40 tulajdonság közül 6 binomiális tulajdonság szerepelt, ezek olyan tulajdonságok, ahol egy adott fenotípusos jelleg jellemző (9) vagy nem jellemző (1) az adott egyedre. Az általunk felvételezett binomiális tulajdonságok a csípősségen, és a csokros növekedésen kívül a növény különböző részeiben (szik alatti szár, nódusz, portok, termés) történő antocián felhalmozódásra vonatkoztak. A binomiális skálából adódóan itt kisebb variabilitás várható. 4 tulajdonság esetén az összes vizsgált egyed esetén azonos eredményt kaptunk. A nóduszok és a portokok minden esetben antociánosak, a termések minden esetben zöldről érőek és csípősek voltak. A magonckori vizsgálat során találtunk zöld és lila szik alatti szárral rendelkező egyedeket is (1. Mellékelt táblázat).

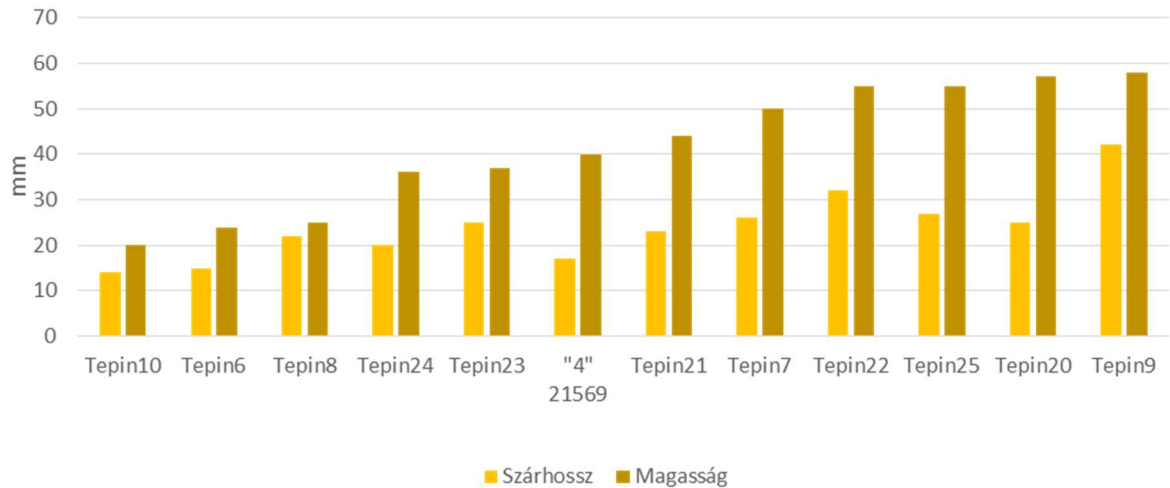
6.1.2. Bonitált tulajdonságok

A sok bonitált tulajdonság közül azt emelném ki, hogy a vizsgált 'Tepin'egyedek mindegyikére, így a tételre általánosan jellemző, hogy vékony, felálló kocsányon zöld színből pirosra érő vékony terméshúsú, kocsányüreggel nem rendelkező, kapszaicintartalmú, kétrekeszes terméseket hoznak. A megfigyelt tulajdonságok közül a legnagyobb variabilitást a vegetatív részekre vonatkozó tulajdonságoknál találtunk: a nóduszok antociános elszíneződésének színintenzitásában, a növény szőrözöttségben, a levélszélek hullámosságában és a levél zöld színének intenzitásában. A termésre vonatkozó tulajdonságok közül a termésalak esetén tapasztaltuk a legnagyobb eltéréseket. Az egyes egyedek virágzási és termésérési időkben is jelentős eltéréseket mutattak (1. Mellékelt táblázat).

6.1.3. Mért tulajdonságok

7 tulajdonság volt, amiket tolómérő segítségével, milliméter pontossággal mértünk. E méréseket növényenként 10-10 levélen és 10-10 érett termésen végeztük el. Szárhossz alatt a sziklelevél és az első virág közti távolságot, magasság alatt a sziklelevél és a növény legmagasabban lévő elágazása közti távolságot rögzítettük. A magasságot a termésparaméterekkel egy időpontban mértük, amikor a 'Tepin' növényeken legalább 10 érett termés volt.

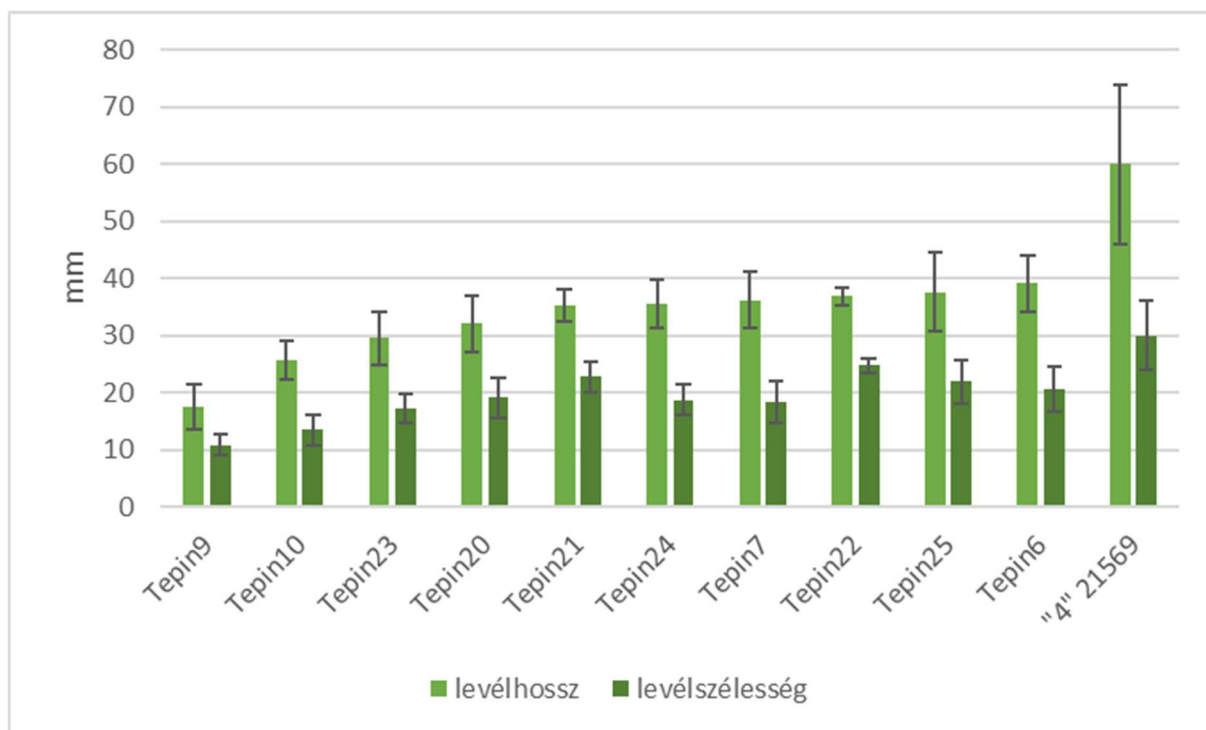
A szárhossz és a magasság esetén jelentős eltéréseket tapasztaltunk az egyes növények között, a legkisebb mért szárhossz 14 cm, a legnagyobb 42 cm volt. A magasság esetén 20 és 58 cm közötti értékeket mértünk (8. ábra). Megfigyeltük, hogy az alacsony növények esetén általában a szárhosszra is alacsonyabb értéket kaptunk. Ezért megvizsgáltuk a két tulajdonság között a lineáris korrelációt, a kapott R^2 determinációs együttható értéke: 0,62, ami azt mutatja, hogy érdemes mindkét tulajdonságot külön-külön is követni.



8. ábra *A C. annuum var. aviculare* tételekhez tartozó magasság és szárhossz értékek.

Levélpármeterek

A 21569-es tétel egyértelműen hosszabb levelekkel rendelkezett. A többi ‘Tepin’ növény között is jelentős különbségeket figyeltünk meg. A ‘Tepin’ növények összesített levélhossz átlaga 32,4 mm lett, a legkisebb értéket (17,5 mm) a 9-es növénynél kaptuk, a legnagyobb átlagérték (39,1 mm) a 6-os növényhez tartozott (9. ábra). A levélátmérők esetén is több, mint kétszeres különbség volt megfigyelhető a legkisebb és a legnagyobb átmérővel rendelkező ‘Tepin’ növények között. A 21569-es nemcsak a levélhosszban, hanem a levelek átmérőjében is egyértelműen meghaladta a ‘Tepin’-eknél mért átmérőket. A két tulajdonságból számított levélarány a ‘Tepin’-eknél (1,48 és 1,9 között alakult). A ‘21569’-es levelei megnyúltabbak, itt a levélhossz több, mint kétszerese volt a levélátmérőnek. A két mért levéltulajdonság között szoros korrelációt találtunk ($R^2=0,853$).

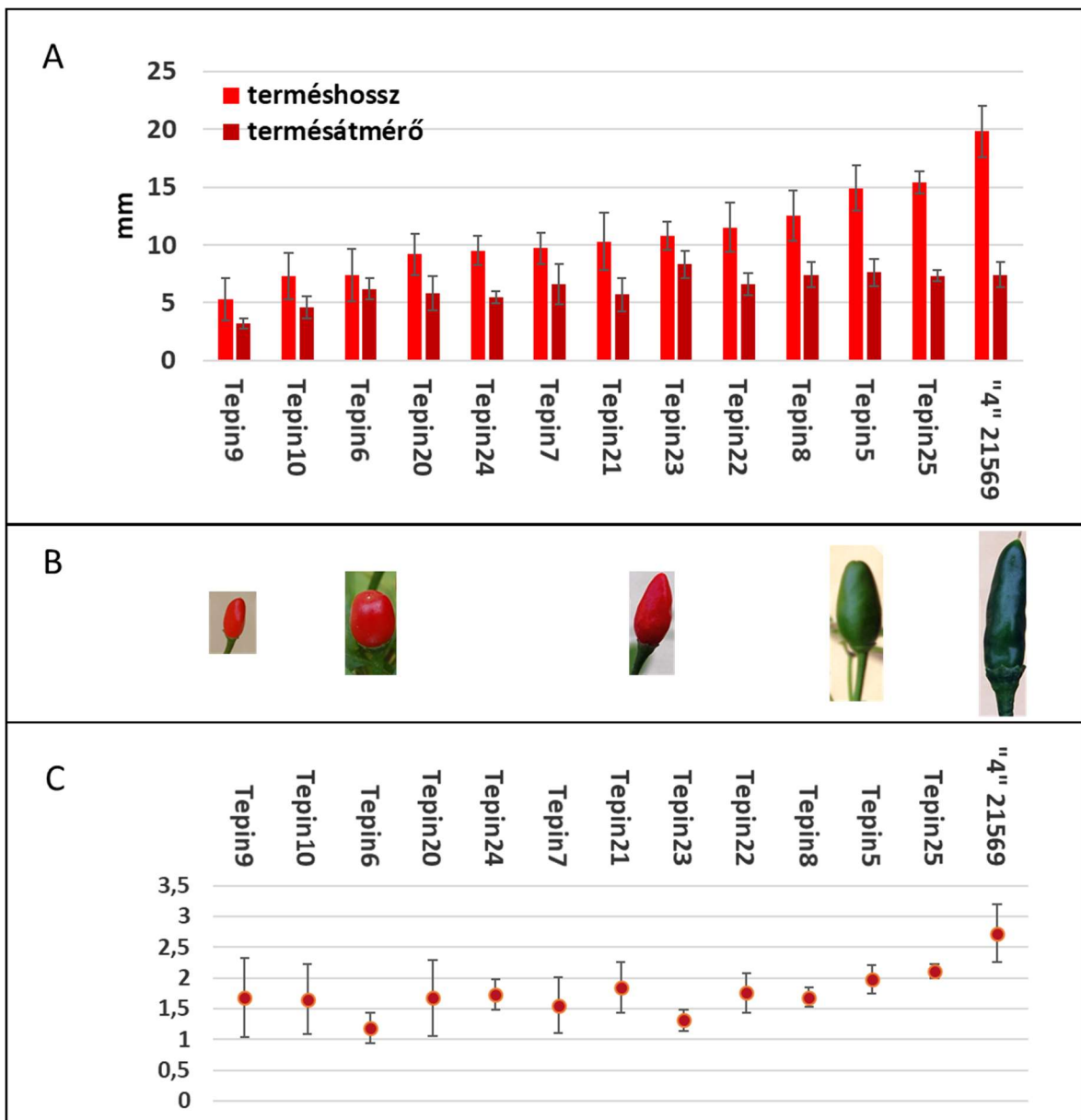


9. ábra Az egyes 'Tepin' növényeken mért átlagos levélhossz és levélszélesség.

Terméssparaméterek

A termésparamétereket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy mind méretben, mind alakban jelentős különbségek voltak az egyes növények között. A '21569' itt is jelentősen nagyobb méreteket mutatott a 'Tepin' növényekhez képest. A 'Tepin' növényeken mért terméshossz és termésátmérő adatokra az volt a jellemző, hogy több, mint 2,5-szeres különbség volt a legmagasabb átlaggal (19,8 mm, 8,3 mm) és a legalacsonyabb átlaggal (5,3 mm, 3,2 mm) jellemzett növény termései között (10. ábra A). A vizsgált termések hosszszetszeti alakjában is jelentős változatosságot figyelhettünk meg, a szív alak volt a legjellemzőbb, de előfordultak kerek, háromszög, szögletes és trapéz alakú bogyók is. A különböző termésalakok eltérő méreteken is előfordultak (10. ábra B).

A terméshossz és a termésátmérő között gyenge korrelációt (0,49) találtunk. A korábban említett termésalaki változatosság a terméshossz és termésátmérő arányában is megjelent, ami a 'Tepin'-ek között: 1,19 és 2,1 között alakult (10. ábra C). Az ábrán jól látható, hogy a kerekesebb (1-hez közeli terméсарány) és a hosszúkás (kettőhöz közeli terméсарány) termésalak eltérő bogyóméretnél is megjelenik. A '21569' ezeknél a paramétereknél is kiugró értékeket mutat, a termései megnyúltak a hossz-átmérő arány 2,67.



10. ábra Az egyes *C. annuum* var. *aviculare* növények termésparaméterei. **A:** 11 'Tepin' növény termésparaméterei. **B:** Az adott egyedek bogyóiról készült képek. **C:** A növényekre vonatkozó termésátmérő és a termésátmérő aránya.

6.1.4. Felvételezett adatok értékelése, anyanövény szelekció

Az elvégzett morfológiai vizsgálatok tükrében egyértelművé vált, hogy a '21569' több fontos tulajdonság esetén jelentős eltérést mutatott a 'Tepin'tétel egyedeihez viszonyítva, a nagyobb és megnyúlt termései miatt nem ezt választottuk a későbbi vizsgálatainkhoz. A 'Tepin'-ek közül a korábban említett szempontok alapján a 6-os növényt választottuk ('Tepin6').

A 'Tepin6' termése állt legközelebb a gömb alakhoz, terméshosszban a vizsgált egyedek között a harmadik legkisebb. A nóduszok szőrözöttségében a legmagasabb bonitálási értéket kapta, antociános elszíneződésben egyedül a 'Tepin'9, a zöld levélszín intenzitásában egyedül a 'Tepin'8 előzte meg. A szárhossz és a növénymagasság szintén kedvezően alakult, egyedül a 'Tepin'10 kompakt növényén mértünk alacsonyabb értéket. Az egyedek közül a mi feltételeink között ez a növény virágzott elsőként és utána is nagy mennyiségű apró virágot hozott, ez a tulajdonsága jelentős előnyt jelenthet az időzített termések vizsgálatánál.

A felvételezési adataink kapcsán felmerült a kérdés, hogy az általunk tapasztalt tételen belüli változatosság mekkora részéért felelnek valós genetikai különbségek, és mekkora a szerepe a környezeti tényezőknek és a mérési vagy felvételezési hibáknak. Ezért mindegyik növényből magot fogtunk és az utódokat felneveltük. A 'Tepin6' esetén a legtöbb előnyben részesített tulajdonság (apró, kerek bogyó, szőrözöttség, kompakt növény, korai virágzás) megmaradt az utódoknál is. A miRNS-alapú kultúr-domesztikációs vizsgálataink során ennek az anyanövénynek az utódait használtuk.

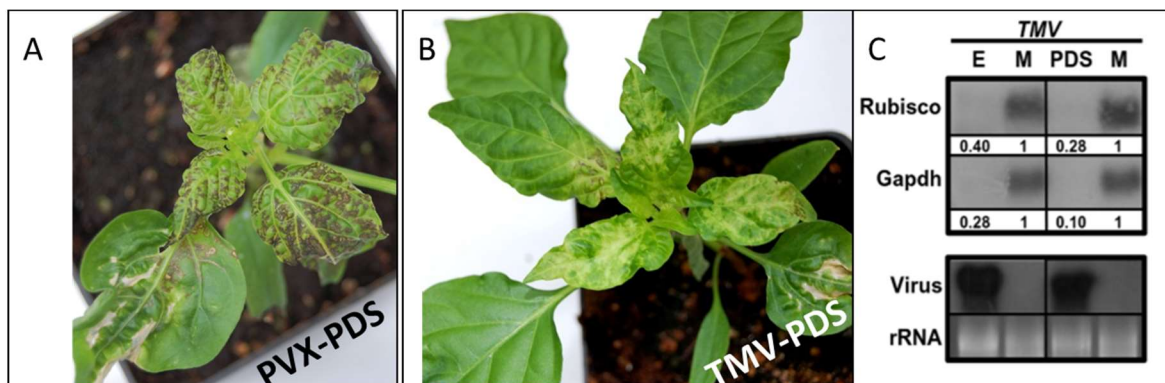
6.2. Vírus indukálta géncsendesítés lehetőségei paprikában

A VIGS egy rendkívül hatékony módszer a gének specifikus funkcióvesztésének vizsgálatához, amit sikeresen alkalmaztak több növényfajnál is. A legtöbb növényi VIGS vektort olyan vírusokból alakították ki, amelyek eredeti gazdanövényei a *Solanaceae* családba tartoznak, így nem meglepő, hogy ezeknek az alkalmazása lehetséges más, a burgonyafélék családjába tartozó növényeken is (pl: paprika, paradicsom, burgonya, petúnia) (Chung et al., 2004, Brigneti et al., 2004, Liu et al., 2002, Chen et al., 2004). A paprika teljes genomja a közelmúltban elérhetővé vált és ezáltal még kedveltebb célnövénye lett a VIGS alapú funkcionális vizsgálatoknak.

6.2.1. Alkalmazott VIGS vektorok és a fertőzési módszerek tulajdonságai

A dohánymozaikvírus (TMV) volt az első vírus, amit a VIGS módszer növényeken való alkalmazására módosítottak (Baulcombe 1999). A TMV-fogékony paprikafajták közül, ehhez a vizsgálathoz a 'Fehér özön'-nel sok hasonlóságot mutató 'Javított Bogysiszlói' konstans fajtát választottuk. A TMV alapú VIGS konstrukciókat (üres, PDS) *in vitro* transzkripcióval előállított (ld. Anyag és módszer) fertőzőképes RNS-ekkel való inokulálás segítségével, nagy hatékonysággal sikerült bejuttatni a paprikanövényekbe.

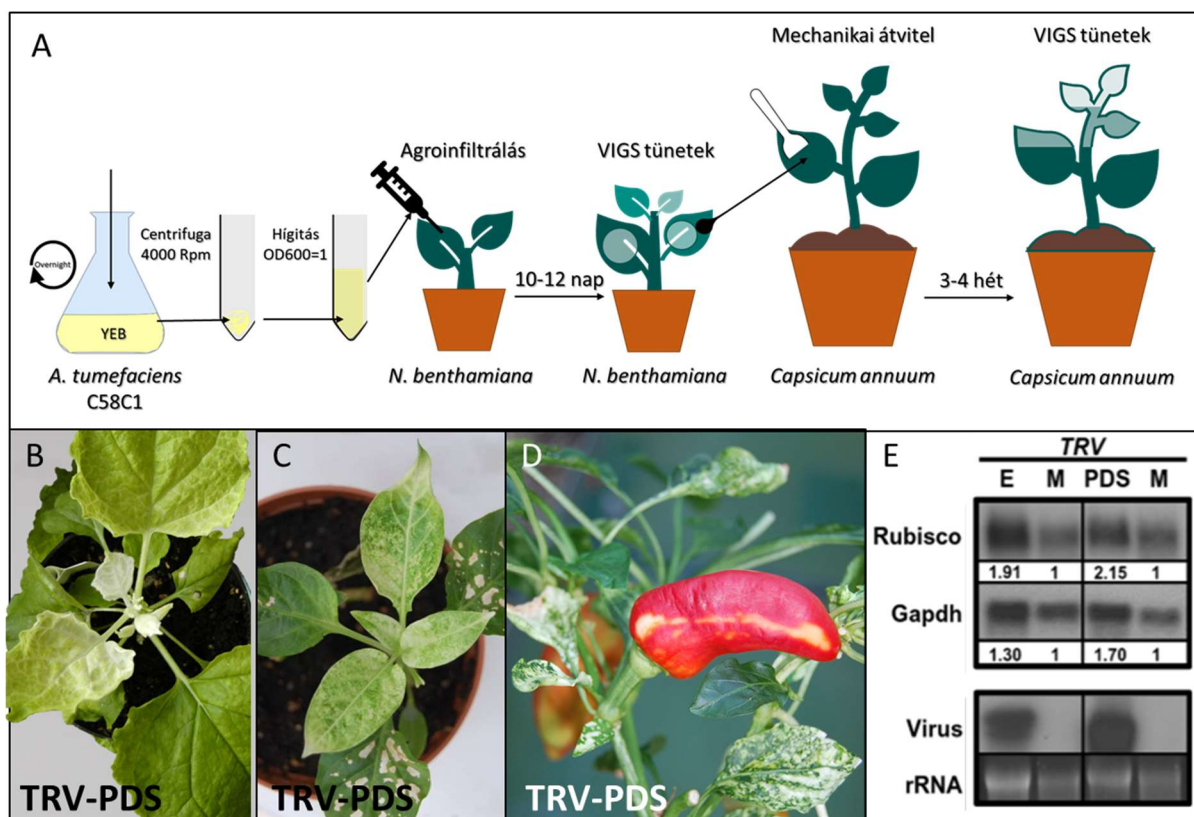
A PDS-konstrukciók a karotinoid-bioszintézisben résztvevő, fitoén-deszaturáz (*PDS*) gén egy darabját hordozzák, és ennek a génnek a csendesítésével a fényvédő szerepet betöltő és karotinoidok képződése is gátolt. A fotoprotektív karotinoidok hiányában a klorofil-pigmentek fény hatására lebomlanak, a meglévő leveleken klorotikus tünetek jelentkeznek, és az újonnan fejlődő levelek kifehérednek. A TMV-PDS VIGS fertőzést követően 14.-16.-on napon már megfigyelhettük a leveleken a klorotikus tüneteket, a levéllemez hullámosodását és az új, fehér levelek megjelenését (11. ábra B).



11. ábra A PVX és a TMV alapú VIGS által kiváltott tünetek, PDS reakció és génexpressziós változások. **A:** PVX fertőzést követően gyorsan megjelentek a nekrotikus tünetek **B:** A TMV esetén gyors reakciót, erős tüneteket és a levél kifehéredését tapasztaltuk. **C:** A TMV konstrukciókkal fertőzött növényeken az általánosan használt referenciagének (*RUBISCO*, *GAPDH*) mRNS és a vírus RNS-szintjét Northern hibridizációval vizsgáltuk. TMV hatására az ált. referencia gének expressziója jelentősen csökkent. (E: „empty” üres vektorral fertőzött, M: „mock”, vírusmentes inokuláló pufferrel kezelt, PDS: PDS konstrukcióval fertőzött, *Rubisco*: ribulóz-1-5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz, *GAPDH*: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz, rRNA: riboszomális RNS).

N. benthamiana növényeken már sikerrel alkalmazták a Burgonya X vírus (PVX) alapú VIGS vektorokat is (Ruiz et al., 1998). A PVX alapú vektorok szűkebb gazdakörrel rendelkeznek, de általában stabilabbak, mint a TMV alapú vektorok (Burch-Smith et al., 2004). A PVX konstrukciókból *in vitro* transzkripcióval előállított RNS-ek is jó hatékonysággal fertőztek. A PVX-üres és a PVX-PDS VIGS vektorral való fertőzések nagyon súlyos tüneteket és nekrotizist okoztak a paprikanövényeken. Így kijelenthetjük, hogy paprika esetén az okozott nekrotizis mértéke ellehetetleníti az általunk használt PVX alapú vektorok funkcionális vizsgálatban való alkalmazását (11. ábra A).

A dohány zörgőlevelűség vírus (TRV) felhasználásával is alakítottak ki hatékony géncsendesítést okozó vektorokat. A TRV-vektorok előnye, hogy a t-DNS-be építve agrobaktérium tenyészetben fenntartható, és infiltráció segítségével bejuttatható a növényekbe (12. ábra A) (Liu et al., 2002; Ratcliff et al., 2001). További előnyös tulajdonsága, hogy általában gyenge tüneteket okoz, és hatékonyan képes elterjedni az egész növényben (Liu et al., 2002).



12. ábra A TRV VIGS rendszer paprikán. **A:** A TRV esetén a tünetek a PVX-hez és a TMV-hez képest lassabban jelentek meg, és sokkal enyhébbnek bizonyultak. **B-C:** TRV-PDS indukálta géncsendesítő hatás *N. benthamiana* (B) és *C. annuum* (C) növényen. **D:** A PDS hiányára jellemző kifehéredés (photobleaching) a terméseken is jelentkezett. **E:** Az általános referenciagének expressziója jelentősen megnőtt a vírus jelenlétében (E: „empty” üres vektorral fertőzött, M: „mock”, vírusmentes inokuláló pufferrel kezelt, PDS: PDS konstrukcióval fertőzött).

A fertőzéshez fiatal *N. benthamiana* növényeket infiltráltunk (ld. Anyag és módszer), és ezekről passzáltuk a VIGS vektorokat 10-12 nap elteltével a paprika növényekre (12. ábra A). Ezzel a módszerrel sikerült a fertőzést egységesebbé és hatékonyabbá tennünk. Az infiltrálást és a fertőzést is 3 ismétlésben végeztük el, 3-3 növényen. TRV-üres VIGS

vektorral fertőzött növényeken a TRV-re jellemző, gyenge tüneteket, a TRV-PDS vektorral fertőzött növényeken kb. 25 nap elteltével a jellegzetes PDS VIGS reakció jelent meg, és a növények levelei jól láthatóan kifehéredtek (12. ábra C). A VIGS vizsgálatok során a fertőzéstől a PDS-re jellemző kifehéredés megjelenéséig 25 napra volt szükség. Ez a *N. benthamiana*-n leírt 7-10 naphoz (12. ábra B) képest jelentősen lassabb, de a *Vitis vinifera*-n leírt 17 hónaphoz (Kurth et al., 2012) viszonyítva még mindig gyors reakciónak számít.

Egyes TRV-PDS-sel fertőzött növényeket hosszútávú megfigyelésre a fényszobából, üvegházi körülmények közé helyeztünk, ezek között volt olyan, amelyik termést is hozott. Érdekes módon a termésben a PDS-reakció nem egységesen, hanem foltszerűen, szektorosan jelent meg (12. ábra C).

A fehér és piros szektorokból (4. mellékelt ábra A) külön-külön izoláltunk növényi nedvet, és ezzel dohánynövényeket fertőztünk meg. Érdekes módon a fehér szektorokról fertőzött növényeken a TRV-PDS-re jellemző kifehéredéses tünet is, míg a piros szektorokról fertőzött növényeken csak a TRV-re jellemző tünetek jelentek meg.

A fertőzött dohánynövényekből több időpontban vett levélmintákból izolált RNS-eket gélen elválasztottuk és TRV próbával hibridizáltuk (Northern blot). Az inokulást követően két időpontban vettünk mintát, de csak a másodikban sikerült kimutatni a vírus jelenlétét. Mindkét szektorból fertőzött növények esetén kaptunk TRV specifikus jelet, de ezek az alacsony felbontású elválasztás ellenére is láthatóan eltérő molekulásúlyhoz tartoznak (4. mellékelt ábra B).

Ez alapján elmondható, hogy találtunk és sikeresen alkalmaztunk egy olyan VIGS rendszert, ami a paprikatermésében is képes a célgén csendesítésére. Feltételezésünk szerint a fertőzés későbbre, a termések megjelenése utáni időzítésével egységesebb géncsendesítést érhetünk el a keletkező termésekben.

6.2.2. VIGS vektorok hatása a *Capsicum annum* növények génexpressziójára

A TMV és a TRV alapú vektorok esetén is együtt vizsgáltuk a PDS, az üres és a kontroll kezelést kapott (mock) növényeket. Mind a TMV, mind a TRV alapú vektorok esetén két háztartási gén (*GAPDH*, *RUBISCO*) expressziós szintjét vizsgáltuk, hogy képet kapjunk a gazdanövény génexpressziós rendszerében történő változásokról. A TMV és a TRV vektorok esetén is azt tapasztaltuk, hogy az üres és a PDS tartalmú vektorkonstrukciók hasonló hatást

indukáltak. A TMV vektorok esetén Northern blot segítségével kimutattuk, hogy mind a Rubisco, mind a GAPDH RNS-szintjei drasztikusan lecsökkentek a mock növényekben található RNS-szintekhez képest (11. ábra C). Érdekes módon a korábbi, más gazdanövények esetén megfigyelt “shut-off” jelenséggel ellentétben a paprika és a TRV-VIGS konstrukciók esetében a *RUBISCO* és a *GAPDH* expressziós szintje is jelentősen emelkedett a kontrollnövényekben tapasztaltakhoz képest (12. ábra E). Ennek a jelenségnek megértéséhez további vizsgálatokra volna szükség. PVX vektorok olyan mértékű tüneteket és nekrozist okoztak a paprika növényeken, hogy paprikán nem lehetett őket VIGS vizsgálatokra használni, ezért ezeknél a növény-vektor kombinációknál a génexpressziós vizsgálatokat nem tudtuk elvégezni.

6.2.3. Paprikán használt VIGS vektorok összehasonlítása

Az eredményeink megmutatták, hogy a paprika különösen érzékeny a VIGS vektorokkal való fertőzésekre. A vírusvektortól függően más-más hatást gyakorolhat a növény expressziós rendszerére. A PVX az okozott tünetek miatt nem bizonyult alkalmasnak. A TMV vektorral közvetlenül sikerült fertőzni a paprika növényeket, és rövidebb idő kellett a tünetek megjelenéséig, de erős vírustüneteket és emiatt kevésbé jól látható VIGS hatást (levelek fehéredése) mutatott. A TRV esetén a közvetlen infiltráció nem működött, a hatékony fertőzéshez infiltrált *N. benthamiana* növényekről való átfertőzésre volt szükség. Ebből adódóan a TRV-alapú vektorok esetén hosszabb idő szükséges egy VIGS alapú vizsgálathoz. A TRV-alapú vektor gyenge vírustüneteket mutat és markánsan mutatja a célgén hiányára jellemző fenotípus megjelenését. A TRV vektorkonstrukció képes volt a teljes növényt és a termést is megfertőzni. A TMV és a TRV esetén működött a géncsendesítés, de mindkét fertőzés komoly hatást gyakorolt az általunk kiemelt két háztartási gén expressziós szintjére. Bármelyiket is választjuk, amennyiben RT-PCR vagy qPCR-rel szeretnénk validálni a változásokat, alaposan meg kell fontolni, milyen géneket választunk referenciagénnek. Egy megbízhatóbb rendszer kialakításához érdemes lenne további VIGS vektorokat és potenciális referenciagéneket is kipróbálni. Az irodalomban szereplő referenciagének közül többnek (*tubulin*, *Cph*, *aktin*, *elongációs faktor*) a c-DNS-ről való felszaporítására végeztünk kísérletet, azonban ezek közül egyikkel sem jutottunk el a használt víruskonstrukciók Northern blot-os vizsgálatához.

6.3. RNS-könyvtárak készítése és szekvenálása

6.3.1. RNS-kivonás, könyvtárkészítés és szekvenálási eredmények

A kísérleteinkben a nagy áteresztőképességű szekvenálás módszerét alkalmaztuk, hogy meghatározzuk a paprika termésfejlődésének különböző szakaszaira jellemző kisRNS-expressziós mintázatokat. A vizsgálatokhoz 4 időpontban vettünk mintákat, a pollenszórás követő 14., 20., 28. és 40. napon. A paprika termésfejlődését 4 szakaszra szokták osztani; preantézis, antézis, posztantézis és termésérés. Korábban több *Capsicum* faj esetén is leírták, hogy a termésméretet a posztantézis szakaszban történő sejtosztódás és sejtmegnyúlás határozza meg. Az általunk választott időpontokkal ezt a fejlődési szakaszt próbáltuk arányosan lefedni. A kiválasztott növényeken minden virágot megjelöltünk a pollenszórás napján, és a megfelelő napon a termésekből RNS-kivonatot készítettünk. A későbbi időpontokban (28, 40 DAA) három szöveti részre osztottuk a termést (hús, mag és placenta) és ezeket külön mintaként vizsgáltuk tovább.

5. táblázat: Szekvenált kisRNS-könyvtárakban lévő leolvasások száma az egyes szűrési lépések során

Szűrési lépések		Nyers leolvasások	Eltávolítva			Illesztve	
			Adapterek, nem megfelelő méretűek	Alacsony (<3) abundanciájúak	rRNS/tRNS adatbázisra illők	CM334 genomra	Ismert miRNS-ekre
DAA14	Fehér özön	8,16 M	8,01 M	3,82 M	3,72 M	3,34 M	0,23 M
		27,50 M	26,74 M	17,66 M	17,08 M	15,11 M	1,32 M
	Tepin	14,73 M	14,38 M	11,47 M	11,28 M	9,35 M	0,27 M
DAA20	Fehér özön	19,56 M	19,20 M	13,34 M	13,04 M	11,19 M	0,78 M
		6,18 M	5,44 M	2,78 M	2,65 M	2,30 M	0,17 M
	Tepin	16,22 M	16,08 M	8,54 M	8,39 M	7,39 M	0,63 M
DAA28	placenta	11,69 M	10,42 M	9,56 M	9,03 M	6,49 M	1,26 M
		4,41 M	4,02 M	2,42 M	2,26 M	1,99 M	0,54 M
	terméshús	17,51 M	17,33 M	11,29 M	10,72 M	9,00 M	1,96 M
DAA40	placenta	12,18 M	11,79 M	8,43 M	7,90 M	6,82 M	1,55 M
		12,67 M	12,48 M	6,34 M	6,11 M	5,23 M	0,37 M
	terméshús	15,11 M	14,99 M	8,08 M	7,77 M	6,70 M	0,64 M
DAA40	mag	8,91 M	8,78 M	5,23 M	4,84 M	4,26 M	1,01 M
		8,35 M	8,29 M	5,32 M	5,15 M	4,65 M	2,14 M
	placenta	9,27 M	9,15 M	4,04 M	3,79 M	3,37 M	0,26 M
DAA40	placenta	12,62 M	12,43 M	6,57 M	6,21 M	5,61 M	0,35 M
		4,43 M	4,26 M	2,31 M	2,17 M	1,53 M	0,17 M
	terméshús	7,99 M	7,60 M	4,69 M	4,45 M	3,34 M	0,55 M
DAA40	mag	10,62 M	10,35 M	5,74 M	5,54 M	4,21 M	0,61 M
		7,60 M	7,27 M	4,99 M	4,75 M	3,38 M	0,27 M
Összesítve		235,72 M	229,00 M	142,61 M	136,85 M	115,26 M	15,07 M

Az RNS-kivonatok minőségét minden esetben NanoDrop2000 spektrofotométerrel és (akrilamid, agaróz) gélelektroforézis alapú elválasztással is ellenőriztük, majd előkészítettük kisRNS-szekvenálásra. Minden vizsgált stádium, szövet és genotípus esetén két biológiai ismétlésből készítettünk kisRNS-könyvtárakat. Összesen 20 kisRNS (5. táblázat) könyvtárat készítettünk. A kisRNS esetében mi készítettük el a könyvtárakat (ld. Anyag és módszer). A

kisRNS-könyvtárakat akrilamid gélen elválasztva is ellenőriztük a szekvenálás előtt. A 20 kisRNS-könyvtár szekvenálásából összesen több, mint 235 millió leolvasást kaptunk (5. táblázat).

6.3.2. Szekvenálási eredmények szűrése és minőségellenőrzése

Az összesen több, mint 235 millió szekvencia különböző mennyiségű leolvasást tartalmazó (4,4-27,4 millió) könyvtárakból származott (5. táblázat). Az adaptorszekvenciák és nem megfelelő méretű szekvenciák kiszűrése után is több, mint 229 millió 16-24 nt méretű leolvasás maradt. A következő lépésben eltávolítottuk az alacsony abundanciájú (minimum 3) szekvenciákat, ez mintegy 38%-al csökkentette a további vizsgálatokhoz használt szekvenciákat. Ezek után az ismert nem kódoló RNS-ekre (rRNS, snRNS, snoRNS, tRNS) illeszkedő és az érvénytelen szekvenciáinkat távolítottuk el. Ezek a szűrési lépések után 136,8 millió szűrt leolvasással dolgozhattunk tovább, ezeknek a 84,2%-a tökéletesen illeszkedett a 'CM334' paprikafajta genomjára (1.55 verzió) (Qin et al., 2014). Ezek alapján elmondható, hogy a 235 millió nyers szekvencia 45,6 %-a átment az általunk felállított összes szűrési lépésen (5. táblázat). A legerősebb szűrési kritériumnak az abundancia-minimum bizonyult, a teljes szűrési folyamat során eltávolított összes szekvencia több, mint 70%-a ennek a kritériumnak nem felelt meg. A vizsgált minőségi mutatók (N-tartalom, alacsony komplexitású és nem megfelelő hosszúságú szekvenciák száma) alapján a könyvtáraink szekvenálása magas minőségűnek bizonyult.

6.3.3. A genomi szabályozó kisRNS-szekvenciák méreteloszlása

A szűrt, genomra illeszthető szekvenciák méreteloszlása is alátámasztja a kisRNS szekvenálás magas minőségét. Az összes kapott szekvencia 95,43%-a az elvárt 21-24 nt mérettartományba tartozott, amíg a 17-20 nt és a 25-27 nt hosszúságú tartományokba 3,33%-a és 1,23%-a esett (13. ábra). Az összes kisRNS-szekvencia 52,5 %-a 24 nt hosszúságú, míg 19,13 %-a 21 nt hosszúságú volt. A 22 és 23 nt méretkategóriába a kisRNS-ek 11,84%-a és 11,95 %-a tartozott (13. ábra). A könyvtárak egyedi vizsgálatával megállapítottuk, hogy a 24 nukleotid méretű kisRNS-ek voltak a meghatározóak a minták többségénél (Parent et al., 2012, Axtell, 2013). A 28 napos terméshús mintákban leolvasott miRNS-ek között több volt a 21 nt hosszúságú, ráadásul a 40 napos terméshús mintáiban talált kisRNS-ek esetén a 21 nukleotid volt a leggyakoribb (átlagosan 47,6%) méret. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a különböző kisRNS-típusok aránya megváltozhat a paprika termésfejlődése során.

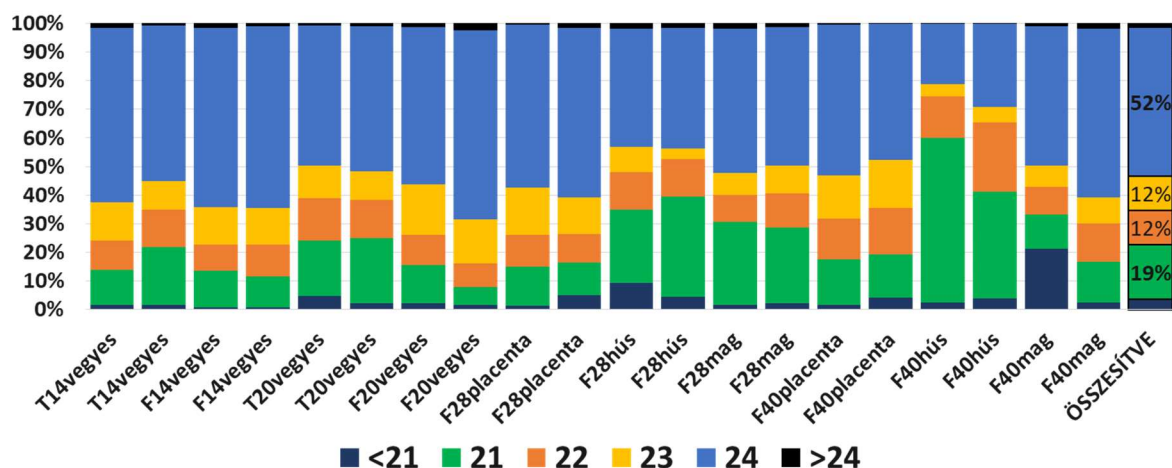
Ennek a jelenségnek a részletes vizsgálatára, minden minta esetén kiszámoltuk a 21/24 nt méretű kisRNS-szekvenciák arányát, ezek összehasonlításával jelentős különbségeket találtunk az egyes szövetek és fejlődési stádiumok között.

A 21/24 nt méretű kisRNS-ek arányának összehasonlításához a kétféle mintavételezést (14-20 DAA, 28-40 DAA) külön-külön kezeltük. A 14 DAA és a 20 DAA mintáknál is azt figyeltük meg, hogy a 'Tepin' mintákban a 21 nt hosszúságú kisRNS-ek nagyobb arányban vannak jelen az azonos stádiumú 'Fehér özőn' mintákhoz képest, ez a különbség a 20 napos mintákban még jelentősebb volt.

A későbbi időpontokban (28 DAA, 40 DAA) a termést három külön szövetre bontva vizsgáltuk. A két időpont között minden esetben találtunk változást a 21 és 24 nt hosszúságú szekvenciák arányában, a magban jelentősen csökkent, 55%-ról (28 DAA) 25%-ra (40 DAA), ezzel ellentétben a placentában visszafogott, a hús esetén (75%-ról 28 DAA 200%-ra 40 DAA) jelentős növekedést tapasztaltunk.

A 40 napos mintáknál összehasonlítottuk a különböző szövetek esetén tapasztalt méreteloszlásokat és a két-két biológiai minta összecsoportosítható volt a kisRNS méreteloszlások alapján. Minden szövet esetén tapasztaltunk a méreteloszlásban a szövetre jellemző tulajdonságokat. Legnagyobb mértékben a hús tért el a többi szövetől a 21 nt-os szekvenciák kiemelkedő, és a 23 és a 24 nt-os szekvenciák alacsony előfordulásával. A placentára jellemző volt, hogy a szekvenciák nagyjából fele 24-nt hosszúságú volt, és mind a 21, a 22 és a 23 nt-os kategóriába a szekvenciák 14-16%-a került. A mag esetén azt tapasztaltuk, hogy a szekvenciák többsége úgyszintén 24 nt-os volt, de a 23 nt hosszúságú szekvenciák a placentához viszonyítva jelentősen kevesebbszer fordultak elő (7-9%).

A különböző szabályozó kisRNS-fajták relatív felhalmozódásában a fejlődési folyamat előrehaladásával tapasztalt dinamikus változások azt jelzik, hogy a kis, szabályozó RNS-ek döntő szerepet játszhatnak a termélnövekedés szakaszában. A szövetek közötti méreteloszlási eltérések alapján feltételezhető, hogy a differenciáció során kialakult génexpressziós mintázatok fenntartásában, méretükben is különböző szabályozó kisRNS-ek vesznek részt. Ráadásul a 21 nt hosszúságú RNS-ek a terméshús esetén tapasztalt megnövekedett arányú előfordulása arra utalhat, hogy a miRNS-ek, phasiRNS-ek és más 21 hosszúságú siRNS-ek kritikus jelentőségűek lehetnek a paprikatermés gazdaságilag legfontosabb részének fejlődésében.



13. ábra A kisRNS-könyvtárak méreteloszlása. A genotíposokat a kezdőbetűikkel rövidítettük: T: ‘Tepin’; F: ‘Fehér özön’, A termésstádiumokat a DAA értékkel jelöltük: 14, 20, 28, 40; a szövettípusokat kiírtuk, a biológia ismétléseket egymás mellé rendeztük A 14 és a 20 napos mintáknál a termékek kicsik és fejletlenek voltak, ezért itt a hús, placenta, mag részeket nem választottuk szét (vegyes).

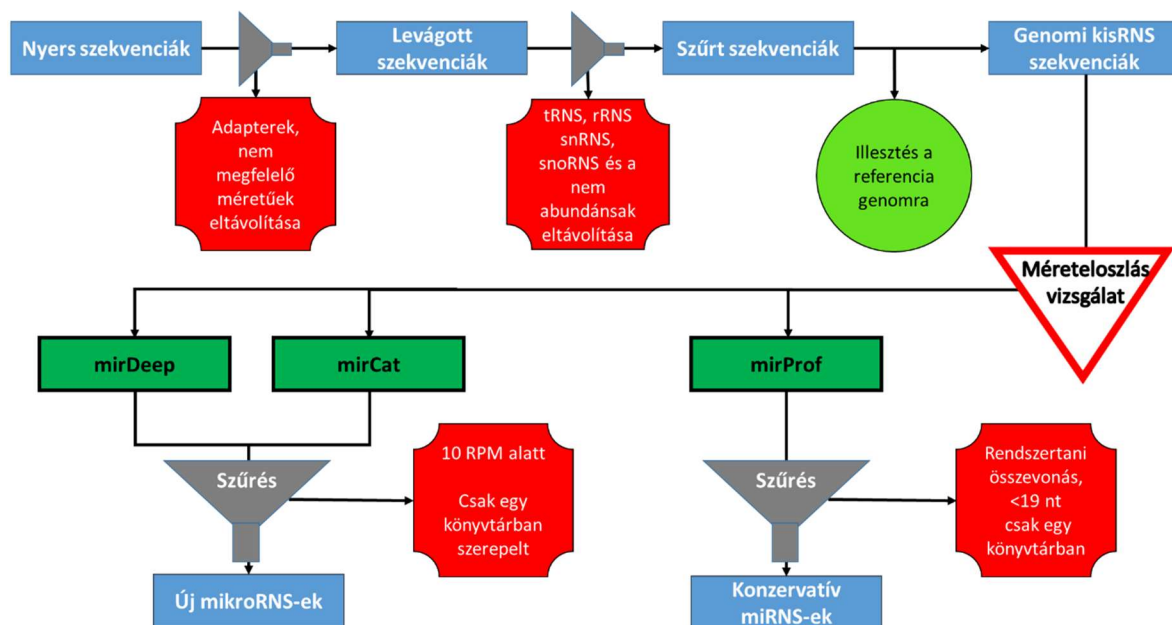
6.4. KisRNS-ek azonosítása a fejlődő paprikában

Az általunk elkészített és szekvenált 20 kisRNS-könyvtáron két megközelítést alkalmaztunk a korábban már ismert miRNS-ek felismerésére.

A konzervatív miRNS-ek megtalálásához a MirProf nevű programot használtuk (14. ábra), ami a miRBase-t (Kozomara & Griffiths-Jones, 2013) tekinti alap, referencia miRNS adatbázisnak, és az illesztésekhez Patman alapú szekvenciaillesztést használ maximum két nukleotid eltérés (mismatch) elfogadásával. A miRBase adatbázis jelenleg egyáltalán nem tartalmaz *Capsicum* fajból származó szekvenciákat, ezért szükségesnek tartottuk, hogy a *Capsicum* mintákból leírt miRNS-szekvenciákból létrehozzunk egy ismétlődéseket nem tartalmazó szekvencialistát.

Érdekes módon a különböző szerzők által paprika növényekben leírt miRNS-szekvenciák között nagyon kevés átfedést találtunk. A 2 szigorúbb feltételekkel dolgozó tanulmány szekvenciáit felhasználva egy 68 egyedi miRNS-szekvenciát tartalmazó listát hoztunk létre, amire az általunk készített kisRNS-könyvtárakból származó szekvenciáinkat Patman illesztési módszerrel, a MirProf által alkalmazott paraméterekkel (Hwang et al., 2013, Qin et al., 2014) megegyező paraméterekkel illesztettük.

Az új, eddig ismeretlen miRNS-ek felfedezéséhez létrehoztunk egy miRNS-azonosítási folyamatot (14. ábra). Ennek alapját két miRNS-ek előrejelzésére használt bioinformatikai eszköz (miRDeep-P és miRCat) adja. A két módszer kombinálása növelte a predikció megbízhatóságát és jelentősen csökkentette a visszakapott potenciális miRNS-ek számát.



14. ábra Az általunk felállított bioinformatikai folyamatot felépítő szűrési lépések és alkalmazott programok.

6.4.1. Konzervatív miRNS-ek

A 20 kisRNS-könyvtárból származó szűrt és genomra illesztett szekvenciákat (107 millió leolvasás) a MirProf program segítségével illesztettük a miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones, 2013) adatbázisra. Az illesztés során 2033 miRNS-azonosítóval mutattunk ki egyezést. A találatok között sok olyan volt, ami a konzervált miRNS-ek különböző növényben leírt nagyon közeli, gyakran szekvenciaszinten azonos változatai voltak. Ezt a fajta többszörös előfordulást ezen változatok összehasonlásával szüntettük meg. Az összehasonlások során mindig azt az azonosítót tartottuk meg, ami a *Capsicum annuum*-hoz rendszertanilag a legközelebbi növényfajhoz tartozott. A vizsgálat végén 19 olyan fajból álló lista állt össze, ami egy bizonyos szekvenciánál a rendszertanilag a legközelebbinek bizonyult. Az elsők között találjuk a két gyakran vizsgált *Solanum* faj (*Solanum tuberosum* és a *Solanum lycopersicum*) mellett a *Glycine max* és a *Nicotiana tabacum* fajokat is. Érdekes módon erre a listára egyszikű fajok is fel tudtak kerülni (*Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*).

A kisRNS-könyvtárakat a konzervatív miRNS-családoknál mért expressziós szintek alapján klasztereztük és hőtésképen ábrázoltuk a kapott eredményeket (15. ábra). Az ábrán jól látható, hogy a biológiai ismétlések együttmozognak, tehát az adott mintára jellemző miRNS-profilhoz leginkább hasonló profil az adott minta biológiai ismétléséhez tartozik. A mag és a hús esetén az adott szövet két 28 napos mintája egy az adott szövet 40 napos mintáitól jelentősen eltérő (a törzsfá más ágán elhelyezkedő) csoportot alkottak (15. ábra). A placenta esetén azonban a 28 és a 40 napos minták nem választhatóak szét a konzervatív miRNS-szintek alapján, de egy a többi szövettől elkülönülő mind a négy mintát (placenta28_1, placenta28_2, placenta40_1, placenta40_2) tartalmazó csoportot alkotnak (15. ábra). Ezt megerősítette, hogy a dolgozat későbbi részén szereplő differenciálexpressziós vizsgálat során nem találtunk olyan miRNS-t, ami a 28 és a 40 napos placenta minták összehasonlításakor szignifikáns expresszióváltozást mutatott volna.

Egy 2014-ben megjelent tanulmányban a konzervatív miRNS-ek növényrendszertani elterjedését vizsgálták. A 31 magasabbrendű növényfajban leírt 82 konzervatív miRNS-családot 8 nagyobb csoportba sorolták az egyes rendszertani csoportokban való expressziós mintázatuk alapján (Chavez-Montes et al., 2014). A *Solanaceae* családból a *Petunia*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* és a *Capsicum annuum* fajokat vonták be ebbe a vizsgálatba.

Az első csoport azokat a miRNS-családokat tartalmazta, amelyek sok szárazföldi fajban megtalálhatóak és általában magas expressziót mutatnak. A mi mintáinkban az összes ilyen miRNS-család az RPM adatok alapján magas szinten fordult elő (miR156: 252 RPM, miR166: 467834 RPM, miR167: 95 RPM, miR168: 4436 RPM), kivéve a miR172 család, ami alacsonyabb szinten jelent meg (18 RPM).

A második csoportba azok a miRNS-családok kerültek, amik minden általuk vizsgált rendszertani csoportban megjelentek, de ezen belül egyes fajokban alacsony expressziós szinten vagy egyáltalán nem jelentek meg (miR158, miR159, miR160, miR162, miR164, miR169, miR171, miR319, miR390, miR393, miR394, miR396, miR397, miR529, miR535 és miR4414). A második csoport miRNS-családjai közül a miR158, miR529, és miR535 családok kivételével mindet megtaláltuk a mintáinkban, ezek közül 7 család (miR159, miR162, miR169, miR171, miR319, miR393, miR396) legalább egy könyvtárban abundánsan (több, mint 75 RPM) jelent meg. A miR160, miR164, miR390, miR394,

miR397, miR4414 családok közepes szinten expresszáltak (kb 5-74 RPM). A miR158, miR529, és miR535 egyetlen paprika könyvtárunkban sem volt jelen. Egy a *Nicotiana benthamiana* sRNS-ek vizsgálatával foglalkozó tanulmányban leírt könyvtárakból szintén hiányzott a miR529 és a miR535 (Baksa et al., 2015).

A hat másik csoportból a *Solanaceae* család esetén a nyolcas csoportnak volt kiemelt szerepe, mert ez tartalmazta azokat a miRNS-családokat, amik főleg *Solanaceae* fajokban expresszáltak. Az ebben a csoportba került 10 miRNS-család közül (miR1919, miR4376, miR5300, miR5301, miR6022, miR6023, miR6024, miR6025, miR6026, miR6027, miR6149), mi ötöt (miR4376, miR5300, miR5301, miR6024, miR6027) azonosítottunk a könyvtárainkban. A hiányzó családokat ellenőriztük az általuk készített paprika könyvtárakban is. Érdekes módon némelyik alacsony expressziós szinten volt jelen, míg a miR1919 az ő paprika könyvtáraikból is teljesen hiányzott (Chavez-Montes et al., 2014).

6.4.2. Paprikaspecifikus miRNS-ek

A *Capsicum*-specifikus miRNS-ek közé azokat a szekvenciákat soroltuk, melyek korábbi, paprikával foglalkozó tanulmányokban új miRNS-ként kerültek leírásra. Érdekes módon a Hwang és munkatársai és Qin és munkatársai által leírt új miRNS-ek között mindössze két szekvenciaátfedés volt (*can-miR-n010/can-miRC7-3p.1* és *can-miR-n003a/can-miRC13-5p*). Ezekből a szekvenciákból egy 68 egyedi szekvenciát tartalmazó listát hoztunk létre.

A 68 szekvencia közül Patman illesztéssel (2 mismatch) 42-t (köztük azt a kettőt is, ami mindkét cikkben szerepelt) találtunk meg a saját adatszettünkben. A Hwang és munkatársai által leírt paprikaspecifikus miRNS-ek több, mint 86%-a (Hwang et al., 2013), míg a Qin és munkatársai által leírt miRNS-ek 51,6%-a fordult elő a mi mintáinkban is (Qin et al., 2014). Előfordult néhány olyan miRNS (pl: *can-miR-n05* és *can-miR-n027*), amit feltehetően azért nem sikerült megtalálni a könyvtárainkban, mert a leírt expressziós mintázatukat megfigyelve a gyökérben és a szárban expresszáltak, de a termésben nem. Érdekes módon azonban sikerült termésmintákban azonosítanunk néhány olyan miRNS-t is, ami a fent említett tanulmányokban virág- vagy levélspecifikus expressziót mutatott.

2017-ben megjelent még egy tanulmány (Liu et al., 2017), amiben kutatócsoportunkat megelőzve új miRNS-eket írtak le paprika mintákból. Ez a tanulmány 310 új, főleg 24 nt hosszú miRNS-t tartalmaz, és mindössze 1 szekvencia átfedést mutat a korábban említett tanulmányokban leírt szekvenciákkal. Mivel e tanulmány megjelenésének időpontjában már

elvégeztük a könyvtáraink felhasználásával az új miRNS-ek azonosítását, ezért összevetettük az általunk leírt, új és az ebben a tanulmányban szereplő miRNS-szekvenciákat. Négy olyan miRNS-t (*Novel_miR23*, *Novel_miR218*, *Novel_miR265*, *Novel_miR279*) találtunk, ami mindkét adatsztben szerepelt. Ezeknek a miRNS-eknek a jelölésére az általuk használt azonosítókat használtuk, és ezeket a szekvenciákat az új miRNS-ek közül a paprikaspecifikus miRNS-ek közé helyeztük át.

6.4.3. Újonnan azonosított kisRNS-ek

A két korábbi cikkben (Hwang et al., 2013, Qin et al., 2014), viszonylag kevés információt osztottak meg a miRNS-ek azonosításának módszertana kapcsán. Egyik cikkben sem hivatkoznak miRNS-ek azonosítására fejlesztett program vagy programcsomag felhasználására, ezért feltehetően az általuk leírt azonosítási lépéseket egyedi szkriptek segítségével hajtották végre.

107,64 millió leolvasáson futtatuk le az új, eddig ismeretlen miRNS felfedezésére létrehozott miRNS azonosítási folyamatsort. Ezt a folyamatsort két korábban leírt és sikeresen alkalmazott növényi miRNS-ek azonosítására fejlesztett bioinformatikai előrejelző alkalmazás (miRDeep-P, miRCat) párhuzamos használatával és általunk paraméterezett, szűrési lépések beiktatásával alakítottuk ki.

A két párhuzamosan alkalmazott előrejelző rendszer illeszti a leolvasásokat a genomra és az így meghatározott genomi pozíciót felhasználva megtalálja a környező szekvenciákat, és mint potenciális miRNS-prekurzor a Vienna RNA package (Lorenz et al., 2011) felhasználásával vizsgálja meg ezek potenciális másodlagos RNS-szerkezetét. Az így kapott potenciális prekurzorokat mindkét rendszer egy pontozási rendszer alapján rangsorolja.

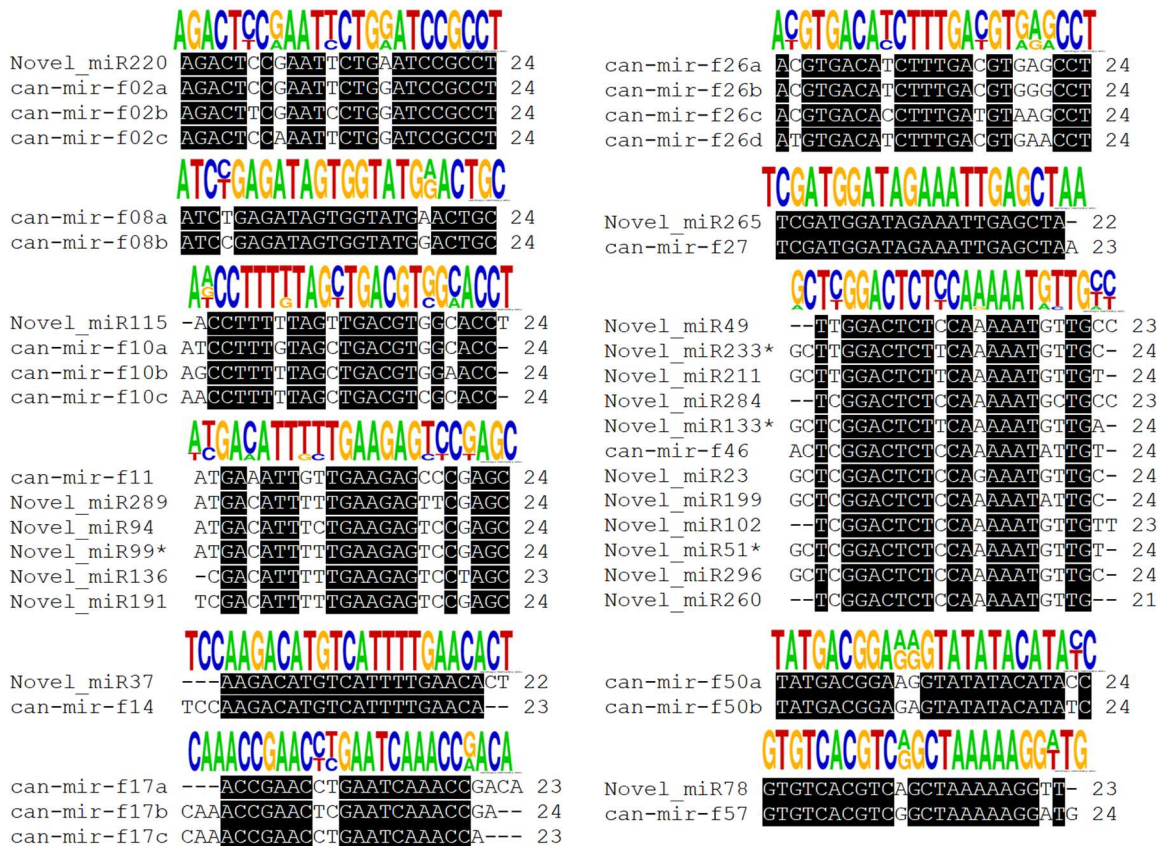
6. táblázat: A predikált új miRNS-ek és a hozzájuk rendelt csillagszál- és prekurzorok szekvenciák

Azonosító	Érett szál			Csillagszál			Prekurzorok	
	Szekvencia	hossz	kezdő nt	Csillagszál szekvencia	hossz	kezdő nt	száma	GC%
can-mir-f01	AGAGGGTTCAGTGCAGCTG	24	A	GCTTGCATCATTGGTCCCTCAA	24	G	3	43%
can-mir-f02a	AGACTCCGAATTCGGATCCGCT	24	A	AGGCGAACTTAGGATTTGGAGTCT	24	A	2	38%
can-mir-f02b	AGACTCGAATTCGGATCCGCT	24	A	TGACGTGCATCAGGATTTGAAGT	24	T	8	36%
can-mir-f02c	AGACTCCAATTCGGATCCGCT	24	A	AGGCGAACTCAGGATTTGAAGTCT	24	A	1	36%
can-mir-f03	CGAGGACTCGAATCTAAGACGCGA	24	C	TTTTGCGTCTTAGATTCGAGTCT	24	T	12	38%
can-mir-f04	TCCAGTTGGACAGGTATATGCC	22	T	CATATATTGCTCAAGCTGGACC	22	C	5	36%
can-mir-f05	ATGACGACGAGACTCTCAAGTCT	24	A	GCAGAGTTGAGAGTCTGTTACT	24	G	5	35%
can-mir-f06	TGAGAAGATGATTGATCGGGCT	24	T	TCTCACATCCATCATCTCTGGT	23	T	6	33%
can-mir-f07	TTCTGATTCACAGGTTGGCTAG	23	T	AGCCAATCTGATGAATAAGAAGAT	24	A	2	36%
can-mir-f08a	ATCTGAGATAGTGGTATGAACCTG	24	A	GTCCATACCACCTACCTCAGATGAA	24	G	7	40%
can-mir-f08b	ATCCGAGATAGTGGTATGACTGC	24	A	AGACCATACCACCTATCTCAGATGA	24	A	1	45%
can-mir-f09	TGTCACAGAGGATTAATTTGGA	21	T	CAATAATCTCTTTGACACAC	21	C	3	39%
can-mir-f10a	ATCCTTTAGTGTGACGTGGCACC	24	A	TGTCACGTGACGACAAAAGGATG	23	T	12	38%
can-mir-f10b	AGCCTTTTAGTGTGACGTGGCACC	24	A	TGTCACGTGACGACAAAAGGATG	23	T	1	39%
can-mir-f10c	AACTTTTAGTGTGACGTGGCACC	24	A	TGTCACGTGACGACAAAAGGATG	23	T	1	39%
can-mir-f11	ATGAATTTGTTGAAGACCCGAGC	24	A	TTGCTGGACTCTCAAAATG	23	T	2	34%
can-mir-f12	GAGGACATGACCTGGATAGGAAA	24	G	TTCTATCCAGGGTCACTGCTC	23	T	10	39%
can-mir-f13	TAGGAGGAGGAGCTGTAAGGGC	22	I	GCCGATGTAAGAACTGTTCTG	22	G	28	44%
can-mir-f14	TCCAAGACATGCTATTTGAACA	23	T	GTCCAAAATGACATGCTTGGTC	23	G	2	33%
can-mir-f15	AATCGAGGATCAAAATGGAT	21	C	TTTTGATTTGCTGCTGGCCG	21	T	11	42%
can-mir-f16	TGCACGCAAGATGGTCCGGACA	22	T	TTTGGGCAACTATGTCATC	22	T	10	42%
can-mir-f17	ACCGAACCTGAATCAACCGACA	23	A	TTGGTTGATTTGGTTGGCGTTA	23	T	3	33%
can-mir-f18	CTCTTCGCTACCTATAGGGCC	24	C	AGGACCAATAGATAGTAAGGGCC	24	A	7	59%
can-mir-f19	ATGAGAGTCTAGTGAAGAAT	24	A	TATTCCTACATCAGACTCTATT	24	T	3	21%
can-mir-f20	TTCTAGGTTCTAGCAAGTTGACC	24	T	TCAACTGCCGAGCCCTAGAAT	23	T	2	40%
can-mir-f21	AGTAGGAATCTGACTGACAGTAA	24	A	TTACTATCAGTAACGATCTACT	24	T	16	34%
can-mir-f22	AGGCACACTGAACCTTAGAAGGGT	24	A	TAGGACCTCTAAAGTTGGTGT	24	T	2	43%
can-mir-f23	AATGGACCTTGGCTAACTCAAC	24	A	GAGGTTGAGTTAGGCCAAGGTTCC	24	G	11	45%
can-mir-f24	ATGGGCAGAGAGAAATTTCTAG	22	A	GGGAAATTTCTGAACTGCTCT	21	G	6	39%
can-mir-f25	CGGACGACGCTGACTAAGTTGGAT	24	C	CCAACCTAGCCAGCTGTGCCCG	24	C	4	43%
can-mir-f26a	ACGTGACATCTTTGACGTGACCT	24	A	TTTTATGTAATAAAGTGTACCT	24	T	8	40%
can-mir-f26b	ACGTGACATCTTTGACGTGACCT	24	A	ATTTATGTAATAAAGTGTACCT	24	A	1	36%
can-mir-f26c	ACGTGACATCTTTGATGAAGCT	24	A	TTTTATGTAATAAAGTGTACCT	24	T	4	34%
can-mir-f26d	ATGTGACATCTTTGACGTGACCT	24	A	ATTTATGTAATAAAGTGTACCT	24	A	2	41%
can-mir-f27a	TGATGGATAGAAATGAGCTAA	23	T	AGCTCAATTTGCTGCTGGT	22	A	5	41%
can-mir-f27b	TGATGGATAGAAATGAGCTAA	22	T	AGCTCAATTTGCTGCTGGT	22	A	23	41%
can-mir-f28	TTTGTGCTCTTTGTTGACA	21	T	TGTTGTCAAAGGAGTATCAGT	22	T	10	40%
can-mir-f29	TCTATGACCTCAACTTTGAATG	24	T	TTGTACACCCAAAGTTGGAGG	23	T	11	35%
can-mir-f30	AACCGAGGCTCGGATTCGA	21	A	AACCTCGACCTCTGATTAAGG	22	A	5	41%
can-mir-f31	AGAATTTATATTGTGACGACGAT	24	A	TCAGTTCCTGCACAATAATTTGT	24	T	8	30%
can-mir-f32	AGTTCAGGATGGTAATAGGACCC	24	A	GAGGTCTATATCCCTGAACT	23	G	3	37%
can-mir-f33	ACCCTGTGAGGACTACCAACT	24	A	GTTTCGTAGTCTCAGAGGGTA	23	G	2	32%
can-mir-f34	AATGACATTCAGAGATCTGTT	22	A	CACAAGCGAGTCTTTTATGTC	22	C	2	39%
can-mir-f35	TTTAACAACCACTACTCTTAGGAT	24	T	GCTAAGAGTAAATGTTGCAATC	24	G	1	34%
can-mir-f36	ATTGGTCTGGCTTTAGTGGGGA	22	A	TTTTGTCATCGAAGCCAGAGA	22	T	3	40%
can-mir-f37	GCTAAATAGTCATTATTAAGC	22	G	TAAATATGCAAAATTAAGTCT	21	T	5	35%
can-mir-f38	CACCTTGGACCTCTCAACGGAG	23	C	TCAGTAGGATTTGGCCAAAGTGGGA	24	T	4	41%
can-mir-f39	TGTAGTTGAGGACAACTGTGCT	24	T	AACTAGGTGATGTTGAGGACAA	24	A	3	43%
can-mir-f40a	CAAACCGAAGCTGAATCAACCGA	24	C	GGTTGGTTGATGTTGGTGGCT	24	G	6	36%
can-mir-f40b	CAAACCGAAGCTGAATCAACCGA	23	C	GATTTGGTTGATGTTGGTGGCT	24	G	1	36%
can-mir-f41	TTAGGATCAAGGAAGTACACAGC	24	T	CAGCTGTGCTCTCTTGTATCCT	24	C	3	37%
can-mir-f42	ACACCCGATTTTAGGAGGATCCT	24	A	ATAGGACCTCTCAAAATTCGGGT	24	A	1	38%
can-mir-f43	AGAGAGACTGTTCCGATGGACC	23	A	GTCTATCGGAAACAGCTTCTCTA	23	G	2	44%
can-mir-f44	TGAGTAGGAGCAGAAACAGTA	21	T	CTGTTCTCTCTACTCTA	21	C	2	30%
can-mir-f45	TTTGGCATAAACGTTACTGT	21	T	TAGAATCTGTTATGTCAGAC	21	T	2	33%
can-mir-f46	AGGACCTCATGAAGTTGGAAGT	24	A	CACCTCAACTTCACAGGGATCT	23	C	1	38%
can-mir-f47	AATCTAACTCAACGTGCGTGGT	24	A	ACACACATTTGTTAGTAGGAT	24	A	1	26%
can-mir-f48a	GCTCGGACTCTCAGAAATGTTGC	24	G	ATGACATTTTGAAGAGTTCGAGC	24	A	1	38%
can-mir-f48b	ACTGGACTCTCAGAAATGTTGT	24	A	ACAAAATTTTGAAGAGTCCGAGC	24	A	5	40%
can-mir-f49	AGGACAAGAAATAGCCACGTAGGA	24	A	ACGTCCTATGTGGCATAATACATG	24	A	8	36%
can-mir-f50	ATCCCTGAACTATGATCAAGAT	24	A	AGCAAAATTTGGTCATGTTACAGG	24	A	1	36%
can-mir-f51	CCTAACTACGGAAGAAATCGAGAA	24	C	CTCGATTTCTTCATGTTAGGAT	24	C	2	34%
can-mir-f52a	TATGACGGAAAGTATATACATA	24	T	TATGTATATACCTCCGTCATACT	24	T	4	36%
can-mir-f52b	TATGACGGAGATATATACATA	24	T	TAAGTATATACCTCCGTCATACT	24	T	6	34%
can-mir-f53	AGTTGACCTCTATTGACTGGCAC	24	A	GTGCAAGTCAAAGTAGGTCATT	23	G	5	28%
can-mir-f54	GTTGTCGGACTCTCAAAATGTC	24	G	ATTACATTTTGAAGAGTCCGAGC	24	A	1	40%
can-mir-f55	ATCCTTTGACTGTTGAGACTCA	24	A	GTGTCACATCAGTAAAAGGAT	23	G	2	32%
can-mir-f56	ATTCTATACCGCTCAGTAACTTGA	24	A	AGTTTACCTGATAGTGAATA	23	A	1	33%
can-mir-f57	CTAGAAGTCAATAGTTAAGTATT	24	C	TACTTAATTAATGACTCTAGAC	24	T	5	28%
can-mir-f58	ACTAACAAATTTGATCTGAGCT	23	A	TAGGCTCTGATACCAATGTAGGG	24	T	1	27%
can-mir-f59	GTGTCAGCTCGGCTAAAAGGATG	24	G	CACCTTTTGTGCTGAGCTGACAC	24	C	1	36%
can-mir-f60	ATTGGAACCCATAACTCTATGCT	24	A	GGCATAGACTTGGATCCCAAT	23	G	4	35%
can-mir-f61	GCAGAGGCGGAGGACACCGGAAT	24	G	ACTCCCGTCTCCGCTCTGC	24	A	4	55%
can-mir-f62	ACTTGGACTATGATCACAACTATG	24	A	CATAGATGTGATTTGAGACCAAGT	24	C	1	34%
can-mir-f63	ATTAACCTGAACTAATTAAGAT	24	A	CTTTTAAATGTTGAGGGGTAAT	24	C	2	36%
can-mir-f64	TACTTTGGTATTATATGCT	21	T	CATATGTTTCAAGATATG	21	C	3	31%
can-mir-f65	AAGTAGAAGTGTGCACATCCAAA	24	A	TTTGGATGTGCACAAGTAGACACT	24	T	1	36%

Habár a két program módszertanát tekintve sok hasonlóságot mutat, a tapasztalataink alapján ugyanazt a szekvenciakönyvtárat és referencia-genomot használva a két program jelentősen eltérő eredményeket generál. Ezért döntöttünk egy olyan megbízhatóbb folyamatsor

kidolgozása mellett, amely a két programot párhuzamosan alkalmazza és csak azokat az új miRNS-eket fogadja el, amelyeket mindkét program potenciális miRNS-eként azonosít.

A következő szűrési lépésben eltávolítottuk azokat a szekvenciákat, amik a 20 könyvtár leolvasásait összesítve nem érték el a 10 RPM-t, vagy nem szerepeltek legalább két könyvtárban. Ennek a rendszernek a felhasználásával 73 új, nagy megbízhatóságú miRNS-t tudunk azonosítani (6. táblázat), az így nyert szekvenciák jellemzéséhez meghatároztuk a szekvenciahosszakot (21-24 nt), a kezdő nukleotid eloszlást (G:6%, C:16, U:32%, A: 47%) és az átlagos GC tartalomértéket (0,46) is.



16. ábra Az általunk prediktált új miRNS-családok. A csoportosított szekvenciák a konszenzus-szekvencia logók alatt láthatóak. Fekete háttérrel az összes családtag esetén állandó, míg fehér háttérrel a családtagok között variabilitást mutató részeket jelöltük. Két család volt, ahol csak a szekvencia elején vagy végén volt különbség. A molekuláris funkció szempontjából kiemelt 9-11. nukleotid közti szakaszban gyakran találtunk különbségeket az egyes családtagok között.

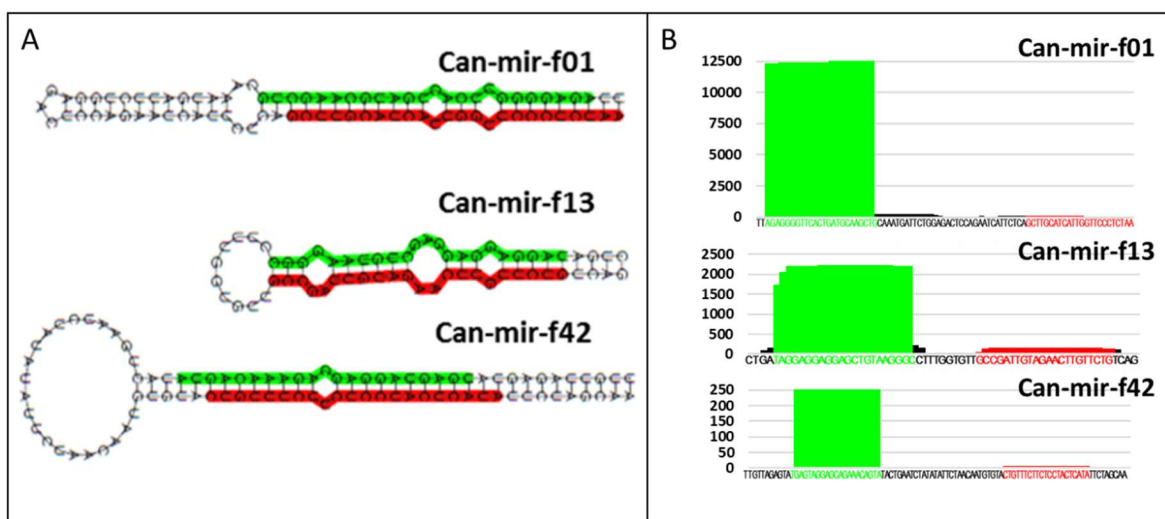
Továbbá a 73 feltételezett miRNS-hez hozzárendeltük a lehetséges prekursor-szekvenciákat, másodlagos prekursorszerkezeteket, az ezek alapján feltételezett miRNS*-szekvenciákat (6. táblázat) és ezek előfordulását a könyvtárainkban (17. ábra A, 5-6. mellékelt ábra, 2. mellékelt táblázat).

Az új miRNS-ek szekvencia alapú klaszterezése során 17 olyan miRNS-szekvenciát találtunk, ami hasonlóságot (cd-hit-est, threshold 0.8) mutatott valamely másikkal újonnan azonosított miRNS-sel, így ezekből 6 új miRNS-családot tudtunk kialakítani (16. ábra). A fennmaradó 56 szekvencia ebben a vizsgálatban egyedülállónak bizonyult.

Ezután a paprikaspecifikus és az új miRNS-ek közti hasonlóságot vizsgáltuk. 5 olyan szekvenciát találtunk (can-miR-f06, can-miR-f14, can-miR-f27, can-miR-f46, can-miR-f57), ami korábban leírt paprikaspecifikus miRNS-ekkel alkotott egy családot. Ezekben a családokban az volt a jellemző, hogy az egyes családtagok között gyakoribb volt az összetételbeli, mint a méretbeli különbség, ez arra utal, hogy az azonos családba tartozó különböző miRNS-ek feltehetően több, különböző prekuzorról érnek.

6.4.4. Prediktált miRNS-prekursorok tulajdonságai

Az újonnan azonosított 73 miRNS-hez 334 prekuzort találtunk, ezeknek a prekuzoroknak a hossza 90 és 250 nt között változott (2. mellékelt táblázat). A Ho és munkatársai által 2007-ben vizsgált 4 kétszikű faj közül az *A. thaliana* és a *Medicago truncatula* esetén a miRNS-prekuzorok GC tartalom vizsgálatánál 40% alatti értéket kaptak. Az általuk vizsgált 4 kétszikű fajnál (*A. thaliana*, *Glycine max*, *M. truncatula* és *P. trichocarpa*) a prekuzorok átlagos GC tartalma 41,6% az általuk vizsgált egyszikűeknél 50,8% lett. Az általunk azonosított miRNS-prekuzorokhoz tartozó GC tartalom értékek átlaga 38% lett, ez megfelel egy kétszikű növény esetén várható értéknek. Az érett szálak esetén a GC tartalom magasabb (46%), ami megerősíti a Ho és munkatársai (2007) által kétszikűeknél leírt GC tartalom túlsúlyt az érett szál esetén. Ez a jelenség alátámaszthatja, hogy a kétszikű növényekben működő DCL1 hasítás során a magas GC tartalmú szakaszok előnyt élveznek. A prekuzorokról specifikusan egy adott érett szál nagy mennyiségben érik (17. ábra B).



17. ábra Néhány újonnan azonosított miRNS-prekurzor másodlagos szerkezeti felépítése.

A: A prekurzorra jellemző előrejelzett másodlagos szerkezet (Mfold). Az érett (zölddel) és a csillagszálat (pirossal) kiemeltük. B: Leolvasások illesztése a választott miRNS-prekurzorokra. Az érett szálat zöld a csillag szálat piros színnel jelöltük. (Taller et al., 2018).

A minimális szabad energiát (MFE) általában az RNS-ek szekunder szerkezetére jellemző stabilitásának a mérésére használják, és kiemelt szerepe van a miRNS-előrejelzés során (Zhang et al., 2006a). A prekurzorok szabad energia (MFE) tartalma: -172,92 és -46,5 kcal/mol között mozgott, a számított átlag -86,45 kcal/mol (2. mellékelt táblázat). Ez az érték alacsonyabb a korábban más fajokban leírt átlagokhoz viszonyítva (szójában: -56.83 kcal/mol, lucernában: -67.73 kcal/mol, lúdfüben: -76.2 kcal/mol és rizsben: -71.57 kcal/mol). Alacsonyabb MFE érték esetén az RNS másodlagos szerkezete nagyobb valószínűséggel kialakul és stabilabb lesz (Bonnet et al., 2004).

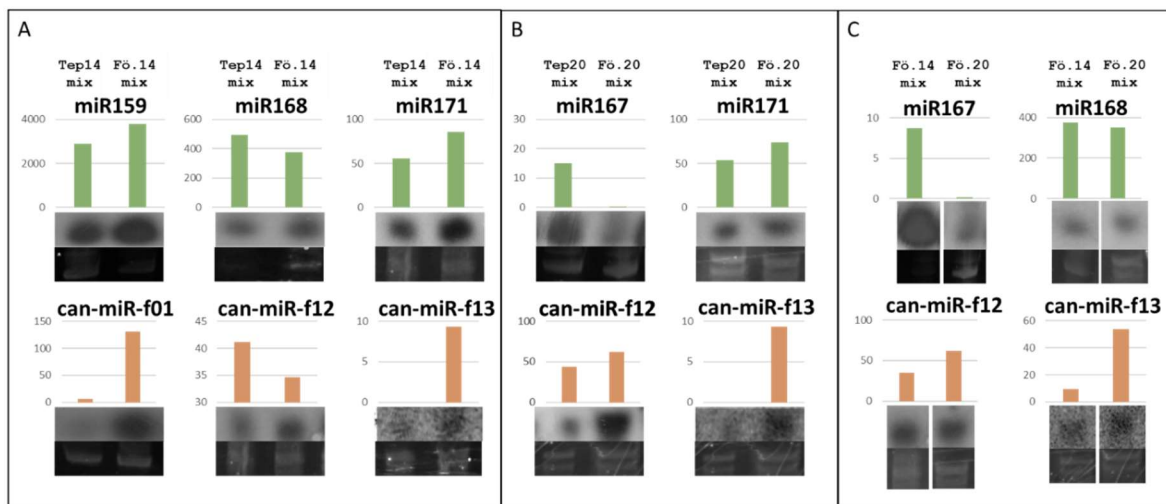
Ezt követően a miRNS és a hajtú másik karja közötti kapcsolódásokat vizsgáltuk; (1) a nem illeszkedő miRNS-bázisok öt vagy kevesebb, (2) a szimmetrikus és az aszimmetrikus szerkezeti kitüremkedések négy vagy kevesebb nukleotidot érintenek, és (3) az érett szálat érintő szakaszon négynél többször nem fordulnak elő. Mivel a miRNS-csillagszál jelenléte erős bizonyíték a pontos biogenezisre (Meyers, et al., 2008), ezért vizsgáltuk az új miRNS-jelöltekhez tartozó csillagszál-szekvenciák előfordulását a szekvenáló könyvtárakban. Minden általunk azonosított miRNS esetén sikerült valamelyik könyvtárban azonosítani potenciális csillagszál-szekvenciát is. A csillagszálak átlagos abundanciája 5,8 volt, a legmagasabb abundancia érték a 37 volt, ami a can-miR-f27*- hoz tartozott. A csillagszál alacsonyabb szinten expresszált az érett szállhoz képest, egyedül a can-miR-f10c

esetén egyezett meg a két szál abundanciája. A csillagszálak között az uracil kezdőnukleotid fordult elő a leggyakrabban (39,4%).

6.5. A kisRNS-könyvtárak validálása Northern hibridizációval

A szekvenálási eredményeket kisRNS Northern blot analízis segítségével validáltuk (18-19. ábra). A kiválasztott miRNS-ek expressziós mintázatainak kimutatásához (miR171, miR172, miR396, miR159 és miR167) DNS vagy ZLNS oligonukleotid-próbákat használtunk (18-19. ábra A, zöld sávok).

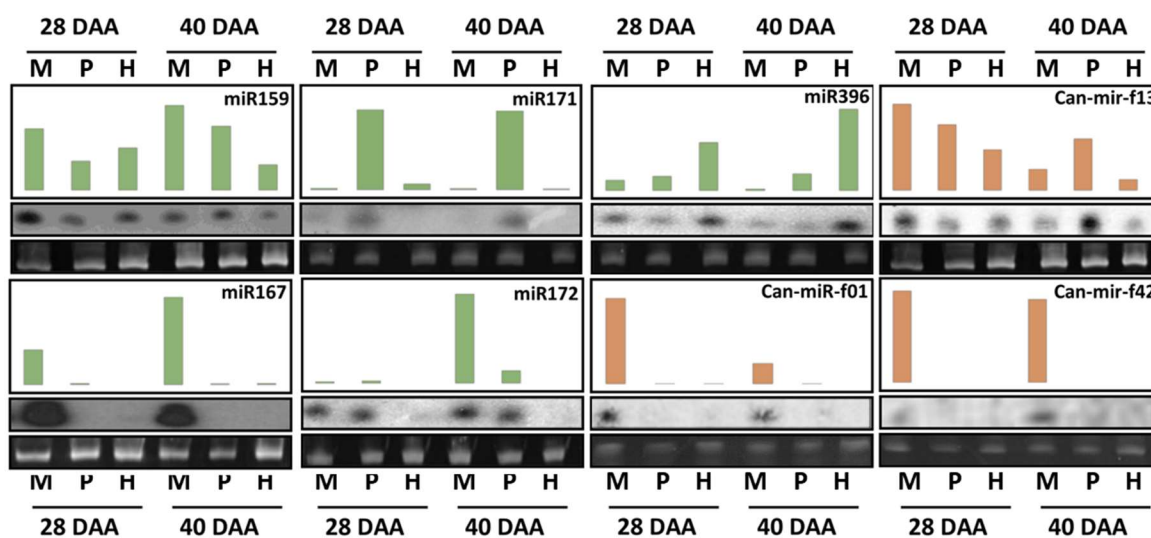
A validálás során külön vizsgáltuk a korai 14-20 DAA (18. ábra) termésekből és a későbbi 28-40 DAA (19. ábra) magból, placentából és termeshúsból készült RNS-kivonatokat. A szekvenálás során bizonyos miRNS-ek esetén nagymértékű különbséget találtunk az egyes mintákból származó leolvasások számában. A legtöbb vizsgált miRNS esetén a kisRNS Northern blot technika segítségével hibridizációs rendszerben is jól látható különbségeket láthattunk.



18. ábra A kisRNS Northern blot vizsgálat és a szekvenálás során kapott leolvasások a korai stádium mintáiban. **A:** A 14 napos ‘Tepin’ és ‘Fehér özön’ minták összehasonlítása **B:** A 20 napos ‘Tepin’ és ‘Fehér özön’ minták összehasonlítása **C:** A 14 és a 20 napos ‘Fehér özön’ minták összehasonlítása. Az oszlopdiaagramok (zöld konzervatív, narancs új miRNS-ek esetén) a szekvenálásból származó normalizált leolvasásokat mutatják. A felső gélkép a Northern blot, az alsó a géltre felvitt rRNS-szintet mutatja. Egyes membránokat a próbák lemosásával több specifikus próba hibridizációjára is használtunk.

A konzervatív miRNS-ekre (átlag 935 RPM) általánosan is jellemző az újaknál tapasztaltnál (átlag 14 RPM) magasabb expressziós szint, ami jelentősen növeli a kimutatás hatékonyságát és a kapott expressziós különbségek ismételhetőségét. Ezért a szekvenálási eredmények validálásához több konzervatív miRNS és néhány új, paprikaspecifikus miRNS-expressziós mintázatát is vizsgáltuk a leírt hibridizációs módszerrel.

Az új miRNS-ek között a szekvenálási adatok felhasználásával több olyat sikerült azonosítani, ami kifejezetten szövet-specifikus expressziót mutatott. Ezek közül több miRNS-re is elvégeztük a Northern hibridizációt, és ezzel sikeresen igazoltuk a specifikus expressziót, mivel a specifikus jel az markánsan megjelent az adott szövet mintáinál, a többi szövet esetén vagy egyáltalán nem vagy jóval alacsonyabb szinten jelent meg (18.ábra, 19.ábra).



19. ábra A konzervatív (zöld) és új (narancs) miRNS-ekre kapott normalizált leolvasások és a Northern hibridizáció összevetése (Taller et al., 2018). A kisRNS Northern blot vizsgálat és a szekvenálás során kapott leolvasások összevetése a 28 és a 40 napos stádium mintáiban. Az egyes szöveteket a kezdőbetűjükkel jelöltük (M:mag, P: placenta, H: hús) A kisRNS szekvenálás eredményét az oszlopdiagramok, a hibridizált membránok képét a felső gélképek, a gélre felvitt rRNS mennyiségeket az alsó gélképek mutatják be. Az alkalmazott specifikus próba eltávolítható, és az így megtisztított membrán újra hibridizálható egy másik miRNS-re specifikus próbával. (Az ábrán Bálint Jeannette gélképei is szerepelnek.)

A Northern hibridizációs vizsgálatok eredményei jó egyezést mutattak a szekvenálási adatokkal, bár egyes esetekben a két módszerrel kapott eredmények között jelentős eltéréseket (az alacsonyabb abundanciájú miRNS-eknél) is észleltünk. Ez feltehetően annak a ténynek tulajdonítható, hogy az NGS szekvenciaszintű eredményeivel szemben a

hibridizációs technika az eljárás paramétereitől függően egy heterogén miRNS-populáció mennyiségét (több, hasonló szekvencia együttes koncentrációját) mutatja ki. Összességében ezek az adatok azt mutatják, hogy a kapott sRNS szekvenálási adatok felhasználhatóak a miRNS-ek differenciálexpressziós analízisére a fejlődési folyamat során.

6.6. Differenciálexpressziós vizsgálatok a termésfejlődés megporzás utáni korai szakaszában (DAA 14-20)

A pollenzórást követő első 7-10 napban a termés intenzíven növekszik, viszont megmaradása még bizonytalan, ilyenkor sok tényező kiválthatja a termések növekedésének leállítását, „elrűgását”, ezért a mintagyűjtést a 14. napon kezdtük. A 2. és 3. hétben a termés hosszának és átmérőjének növekedése nem áll meg, és megfigyelhetővé válik a jellemző hosszmetzeti termésalak (hossz/átmérő). A termések felülete, színe és a csésze is jelentős változáson megy át ebben az időszakban (20. ábra A). A 20. napon elkülöníthetőek a termésben fejlődő magok és a placenta is, de mindkét szövet még lágy és fejletlen, szétválasztva hatékony RNS-kivonáshoz mennyiségük nem elegendő. Ez a fejlődési szakasz gazdasági szempontból kiemelt jelentőségű, az ebben a fázisban történő sérülések befolyásolhatják a növekedést, ezáltal méretcsökkenést és maradandó deformációt okozhatnak.

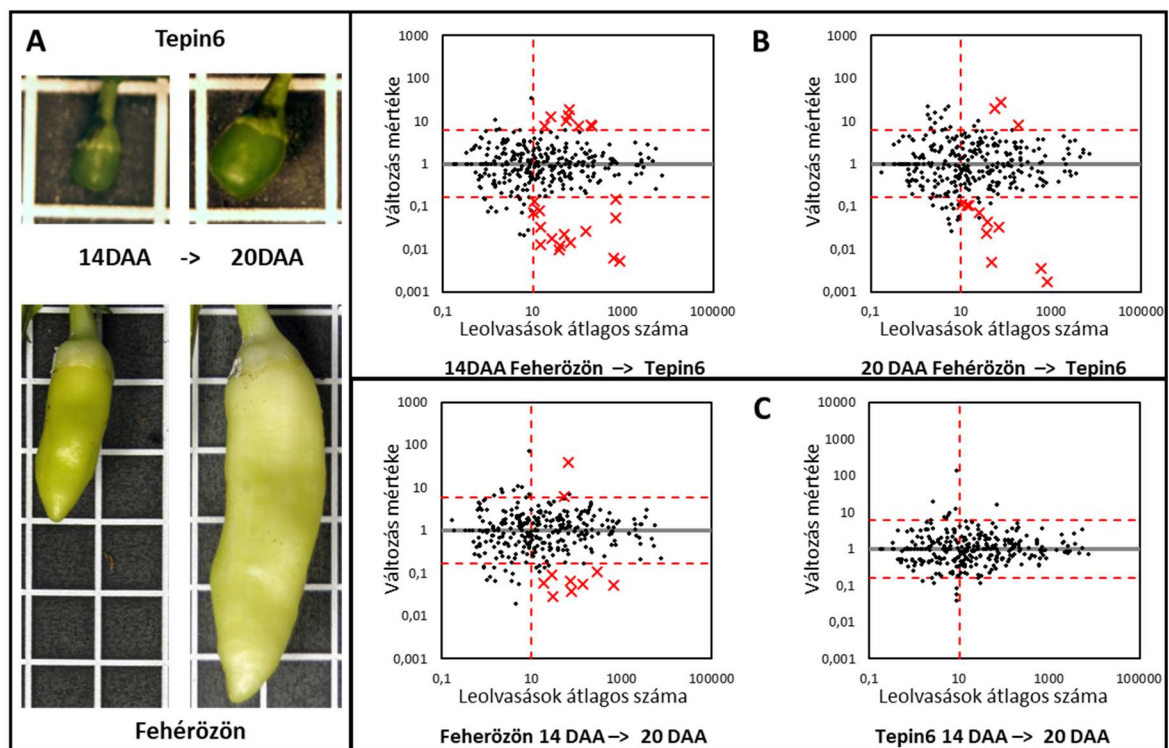
6.6.1. A miRNS-szintű eltérések a vad ('Tepin') és a jelenleg a természetben lévő változat ('Fehér özön') között

A kultúrevolúciós vizsgálatot olyan miRNS-ek keresésével kezdtük, melyek a vad vagy a termesztett típusra specifikusak. A konzervatív miRNS-családok között nem találtunk olyat, ami csak az egyikre vagy a másikra lett volna jellemző.

Az új és a paprikaspecifikus miRNS-ek között sem találtunk olyat a 'Tepin6' könyvtárainkban, ami ne fordult volna elő legalább egy 'Fehér özön' könyvtárban. 'Fehér özön' mintáknál 6 olyan új miRNS-t (can-miR-f14, can-miR-f18, can-miR-f24, can-miR-f33, can-miR-f36, can-miR-f52) is találtunk a szekvenálás eredményei alapján, ami minden 'Fehér özön' fázisban és szövettípusban jelen volt és egyetlen 'Tepin' mintában sem fordult elő. Ezeket a különbségeket hibridizációs vizsgálattal nem, de a Deseq2 alapú differenciálexpressziós vizsgálattal 5 miRNS esetén sikerült megerősíteni.

A differenciálexpressziós vizsgálat segítségével a két genotípus között a két stádiumot összesítve 25 szignifikáns változást mutató egyedi miRNS-t sikerült azonosítani (20. ábra

B). A változásokat csak akkor fogadtuk el megbízhatónak, ha az adott miRNS elért egy minimum expressziós szintet (leolvasások átlaga minimum: 10), a két minta között legalább hatszoros változást mutatott (foldchange 6 felett vagy 1/6 alatt) és a hozzá tartozó korrigált p-érték nem haladta meg a 0,05-öt.



20. ábra A korai termésfejlődési szakaszra jellemző termésstádiumok és az ezek közti miRNS-expressziós változásokat bemutató MA plotok. **A:** a két genotípushoz tartozó egy-egy termérről a két jelzett időpontban készült fotó. **B:** az azonos stádiumú két genotípus összehasonlítása Ma plotokon. **C:** az azonos genotípus két stádiumának az összehasonlítása. Az X tengelyen az adott miRNS-re számított átlagos leolvasásszámot („basemean”), míg az Y tengelyen a változás mértékét („Foldchange”) ábrázoltuk. A piros keresztek a szignifikánsan változó (basemean>10, foldchange>6; padj<0,05), a fekete pontok a nem változó miRNS-eket jelölik. Az egyes paraméterekre vonatkozó határértékeket (a padj kivételével) piros szagatott vonallal jelöltük.

A 14 napos stádiumnál több miRNS mutatott szignifikáns különbséget (20. ábra B), 15 miRNS a ‘Tepin’termésben alacsonyabb, 8 miRNS magasabb szinten fejeződött ki (21. ábra A). A ‘Tepin’-ben magasabb expressziót nagy arányban (6db) konzervatív miRNS-ek mutattak, a paprikaspecifikus és az általunk leírt új miRNS-ek 1-1 kivétellel a ‘Fehér özön’ terméseiben expresszáltak magasabb szinten.

A 20 napos stádiumban összesen 10 miRNS mutatott szignifikáns változást (20. ábra B), ezek közül 3 volt konzervatív, 2 paprikaszpecifikus és 5 új miRNS (21. ábra B). A tendencia hasonló volt a 14 naposnál már leírtakhoz: A konzervatív miRNS-ek a ‘Tepin’-ben, a paprikaszpecifikus és az új miRNS-szekvenciák a ‘Fehér özön’-ben kerültek többször leolvasásra. A két eredményt összevetve azt találtuk, hogy a 20 napos stádiumban talált 10 változó miRNS között 8 (can-miR393a-3p, can-miR396f, can-miR-f13, can-miR-f14, can-miR-f18, can-miR-f24, can-miR-f32, can-miR-n018, can-miR-n030) olyan volt, ami a 14 napos minták esetén is változott, ráadásul a változás iránya a két időpontban minden miRNS esetén megegyezett. Ezek alapján elmondható, hogy ezek a miRNS-ek szintjén talált nagy megbízhatóságú expressziós különbségek feltehetően biológiai szerepet játszanak a két genotípus termései között látható fenotípusos eltérések kialakításában.

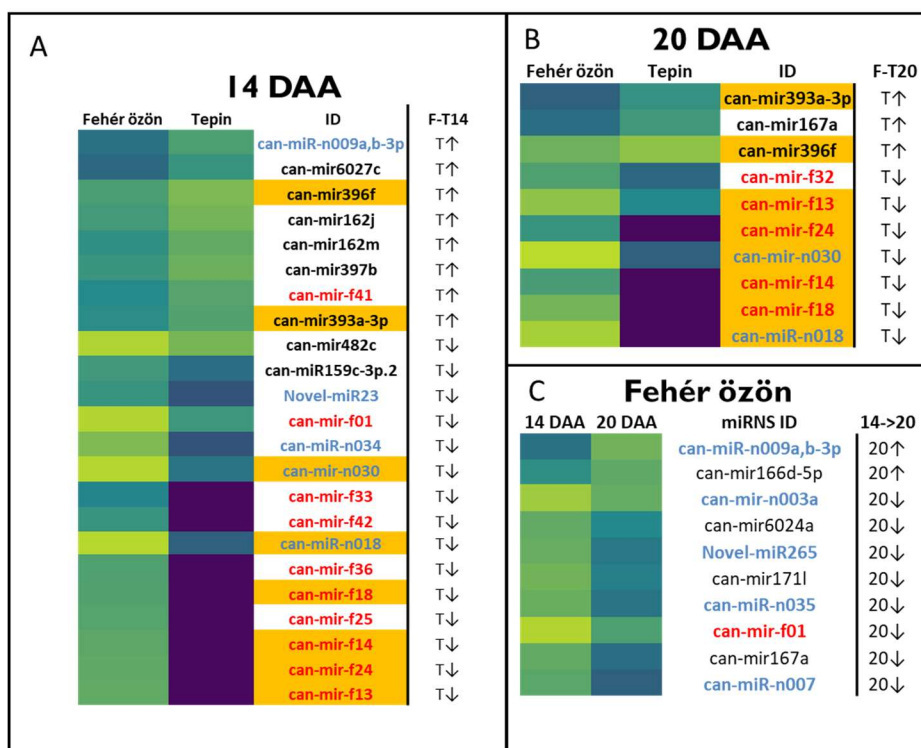
Az itt leírt tendenciák arra utalnak, hogy a domesztikáció során új miRNS-ek jelentek meg, és bizonyos konzervatív miRNS-ek expressziója és feltehetően a funkcionális szerepe is csökkent, miközben a vad fajban alacsony aktivitású miRNS-ek expressziójuk növekedésével meghatározóbbá váltak.

6.6.2. A miRNS-expressziós változások a pollenszórást követő 2. és 3. hét között

Mindkét típusról elmondható, hogy jelentős termésnövekedés és szövet-differenciáció történik ebben az időszakban (20. ábra A). A két genotípusban megjelenő miRNS rendszerének jobb megértése érdekében megvizsgáltuk, hogy milyen miRNS-mintázatbeli változások kísérik az egyes genotípusok 14 és 20 napos mintái között lezajló szöveti és méretbeli fejlődést.

A ‘Tepin’-re jellemző, hogy a termésnövekedés legnagyobb része ebben a fázisban történik és a huszadik napra a termés megközelíti a teljes méretét. Érdekes módon a ‘Tepin’ két stádiuma között nem találtunk szignifikáns változást mutató miRNS-eket (20. ábra C).

A ‘Fehér özön’ esetén 10 (can-miR167a-c, can-miR166d-5p, can-miR1711, can-miR6024a, can-miR-f01, can-miR-n003a, can-miR-n007, can-miR-n009a,b-3p, can-miR-n035, Novel-miR265) (21. ábra C) olyan miRNS-t találtunk, ami a két időpont között szignifikáns változáson, többségében (8 db) expressziócsökkenésen ment keresztül (20. ábra C). Ezek a változó miRNS-ek közül 5 a paprikaszpecifikus, 4 a konzervatív és 1 az új miRNS-ek közül került ki. Ez azért is érdekes, mert ez azt mutatja, hogy a ‘Tepin’-nel ellentétben a ‘Fehér özön’ termésben a miRNS-ek expressziós rendszere időben is változik.



21. ábra Összefoglaló hőtérkép a pollenzórás követő 2-3. hét miRNS-szintű változásairól.

A két genotípus ('Fehér özön' és a 'Tepin')(A-B) és a két időpont (14, 20 DAA) (C) között differenciálexpressziós vizsgálatot végeztük. Ezen az ábrán csak a kapott szignifikáns változásokat ábrázoltuk. A konzervatív (fekete), az ismert (kék) és az új (piros) miRNS-eket eltérő színnel jelöltük. A nyílak az iránynak megfelelő (↑) változást (↓) mutatnak a másik genotípushoz vagy a másik időponthoz viszonyítva (például a T↓ azt jelenti, hogy a megjelölt miRNS-expressziós szintje a 'Tepin'-ben alacsonyabb, mint a 'Fehér özön'-ben).

Az ebben a stádiumban végzett összehasonlító vizsgálataink megmutatták, hogy feltehetően a *Capsicum annuum*-ban a kultúrevolúció során a miRNS-ek szintjén több típusú változás is történt. Vannak miRNS-ek, amik a 'Tepin'-ben nem, de a 'Fehér özön' minden vizsgált stádiumában szekvenálással kimutathatóak. Vannak miRNS-ek, amiknek az expressziós szintje és ezzel feltehetően az általa szabályozott biológia funkciók fontossága is jelentősen változott. A 14-20 napos minták összehasonlítása rámutatott, hogy ebben a korai stádiumban a miRNS-alapú szabályozási rendszer a természetben lévő típusnál egy új elemmel, a miRNS-szintek jelentős időbeli változásával, gazdagodik.

6.7. Differenciálexpressziós vizsgálatok a termésfejlődés pollenszórás követő 4. és 6. hét közötti szakaszában

Ebben a fázisban a konzervált, a korábban leírt és az általunk azonosított miRNS-ek szerepének mélyebb, szövetszintű (placenta, hús, mag) megismerése lehetségessé válik, az így feltárható RNS-szintű különbségek megismerése gazdasági előnyökkel is kecsegtet.

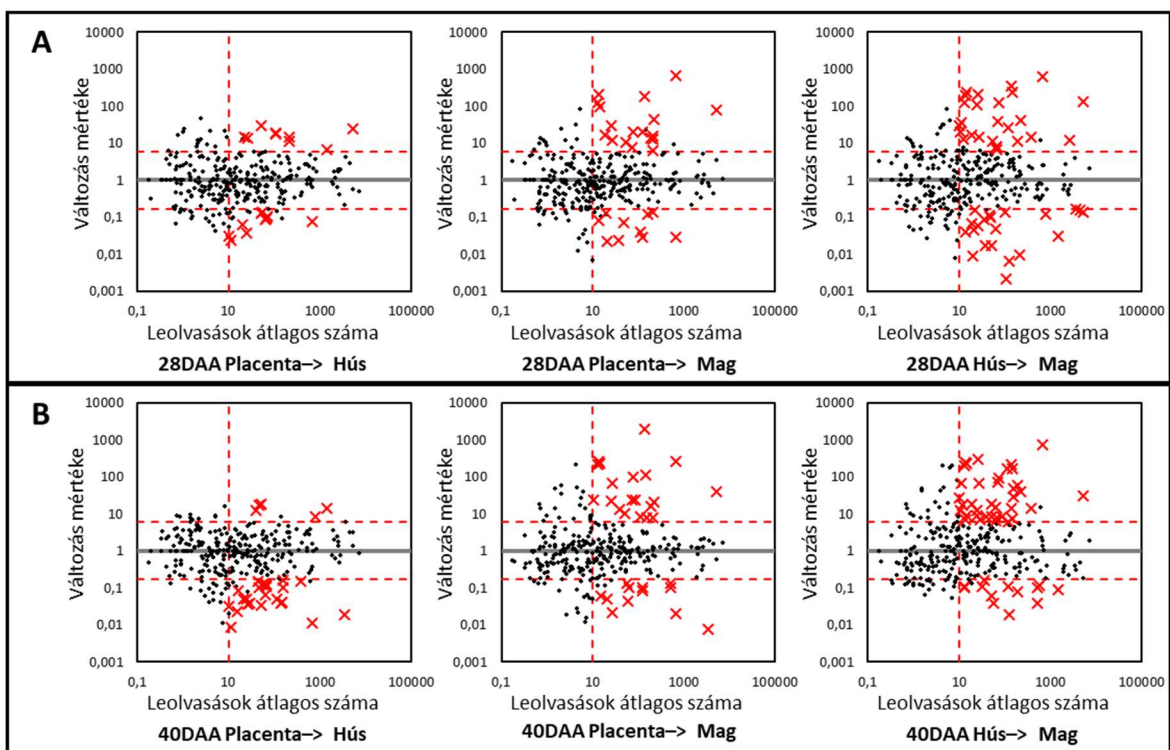
A fenológiai megfigyeléseink alapján a ‘Tepin6’ termések esetén ebben a stádiumban már csak minimális méretbeli növekedést és több esetben az érés kezdetét jelző színváltozást tapasztaltunk. Ezzel ellentétben a ‘Fehér özön’ terméseknél ebben az időszakban jelentős (20% feletti) terméshossznövekedést figyelhetünk meg. Ezért ebben a stádiumban az erőforrásainkat a ‘Fehér özön’-re összpontosítottuk.

A miRNS-ek sok esetben differenciációs folyamatok szabályozóelemei, ezért gyakran mutatnak szövetre, illetve fenológiai fázisra jellemző expressziós mintázatot. Ezek feltárásához a különböző fejlődési szakaszokból és a termés különböző szöveteiből származó mintákat differenciálexpressziós elemzéssel (DEseq2) hasonlítottuk össze. Először az egyes szövetek közötti miRNS-expressziós változásokat vizsgáltuk meg mindkét időpontban (28 DAA, 40 DAA), ezután az egyes szövetekben a miRNS-ek szintjén történő időbeli változásokra koncentráltunk.

6.7.1. Szövetszintű miRNS eltérések a 28 napos stádiumban

A 28 napos stádiumban a termés egyes részei jól elkülönülnek, de fejletlenek, a hús és a placenta vékony, a magok puhák, a maghéj még átlátszó. A 28 napos stádiumban az egyes szövetekre (hús, placenta, mag) jellemző miRNS-profilokat meghatároztuk és páronként elvégzett differenciálexpressziós összehasonlítások eredményeit a 22. ábra A részén MA-plotok formájában jelenítettük meg.

A placenta és a hús között ebben a stádiumban 19 szignifikáns eltérést mutató jelentős miRNS-t (minimum 10-es leolvasás átlag, minimum 6-szoros változás és 0,05 alatti korrigált p-érték) találtunk. Ezek közül 14 konzervatív miRNS, amik 5 miRNS-családba tartoznak (can-miR162, can-miR166, can-miR168, can-miR171, can-miR319), itt a változás iránya miRNS-családra jellemző volt. A can-miR162, can-miR166, can-miR168 a húsban, míg a can-miR171 és can-miR319 a placentában mutatott magasabb szintet. Két paprikaspecifikus (can-miR-n022a, Novel-miR23) és 3 új miRNS (can-miR-f22, can-miR-f35, can-miR-f41) mutatott eltérést, ezek mindegyike a húsban expresszált fokozottabban.



22. ábra Szövetek közötti differenciálexpressziós vizsgálatához tartozó MA plotok a 28 és a 40 napos paprikatermésekre vonatkozóan. Az X tengelyen az adott miRNS-re számított átlagos leolvasásszámot („basemean”), míg az Y tengelyen a változás mértékét („Foldchange”) ábrázoltuk. A piros keresztek a szignifikánsan változó (basemean>10, foldchange>6; padj<0,05), a fekete pontok a nem változó miRNS-eket jelölik. Az egyes paraméterekre vonatkozó határértékeket (a padj kivételével) piros szagatott vonallal jelöltük. **A:** A 28 napos termés szöveiteinek összehasonlító diagramjai. **B:** A 40 napos termés eltérő szöveiteinek az összehasonlítása.

A 28 napos placenta és a 28 napos mag között 29 szignifikáns eltérést tapasztaltunk (22. ábra A). Ezek között hasonló arányban fordultak elő konzervatív (12) és új miRNS-ek(11), míg a paprikában korábban leírtak közül 6 mutatott jelentős eltérést.

A konzervatívoknál itt is jellemző volt, hogy az egy családba tartozó miRNS-ek azonos irányú változást mutattak. A változó miRNS-ek közül a can-miR156, can-miR166 és a can-miR167 családtagok expressziója a magban, míg a can-miR162, can-miR171 és can-miR319 családba tartozó miRNS-ek expressziója a placentában volt magasabb.

Az új miRNS-ek közül 7 (can-miR-f01, can-miR-f06, can-miR-f16, can-miR-f25, can-miR-f34, can-miR-f39, can-miR-f42) a magban, 4 (can-miR-f04, can-miR-f14, can-miR-f18, can-miR-f33) a placentában, a paprikaspecifikusak (can-miRC18-5p, can-miR-n006, can-

miR-n021, can-miR-n025, can-miR-n029, can-miR-n035) mind a magban fordultak elő magasabb koncentrációban.

A két összehasonlítás után találtunk olyan konzervatív miRNS-eket amik mindkét másik szövethez viszonyítva magasabb (can-miR171a-e, can-miR171h) vagy alacsonyabb (can-miR166v) szinten expresszálnak a placentában.

A 28 napos mintáknál a hús és a mag összehasonlításánál (22. ábra A) találtuk a legtöbb szignifikáns eltérést mutató miRNS-t (47 db), ezek közül 21 konzervatív, 15 új és 11 paprikaspecifikus.

A konzervatív miRNS-családok közül a can-miR162 és a can-miR168 esetén 4-4 családtagnál találtunk különbséget, és mindegyik családtag a húsban mutatott magasabb expressziót. A can-miR166 és a can-miR319-es családba tartozó miRNS-ek közül egyesek a húsban, mások a magban fordultak elő jelentősen nagyobb leolvasási számmal. A további 4 család (can-miR167, can-miR171, can-miR5300, can-miR6027) esetén 1-1 miRNS-expressziójánál találtunk eltérést a 28 napos hús és mag között. A paprikaspecifikus és az új miRNS-ek közül 21-nél a magban, 5-nél a húsban tapasztaltunk fokozott expressziót.

13 olyan miRNS volt, ami a magban magasabb expressziót mutatott mind a húshoz, mind (a korábbi összehasonlítás alapján) a placentához viszonyítva. 5 olyan miRNS volt (can-miR319d, can-miR-f04, can-miR-f14, can-miR-f18, can-miR-f33), amiknek a magban mért expressziója a húshoz és a placentához viszonyítva is jelentősen alacsonyabb volt. A hús esetén 7 olyan miRNS-t (can-miR1711, can-miR319k, can-miR-f22, can-miR-f35, can-miR-f41, can-miR-n022a-C, Novel-miR23) találtunk, ami mind a placentához mind a maghoz viszonyítva alacsonyabb expressziót mutatott.

6.7.2. Szövetszintű miRNS-eltérések a 40 napos stádiumban

Az általunk biztosított feltételek között a pollenszórást követő 40. napra a 'Fehér özön' termései elérték a végleges méretüket, a hús és a placenta jelentősen megvastagodott, a mag megkeményedett. A 28 napos mintáknál végzett szöveti összehasonlítást ezeknél a mintáknál is elvégeztük (22. ábra B).

Ebben a stádiumban a hús és a placenta összehasonlításánál 30 szignifikáns eltérést találtunk. A változást mutató miRNS-ek többségének (25db) expressziós szintje a placentához viszonyítva a húsban jelentősen alacsonyabb volt. Ezek a miRNS-ek közül 16 a konzervatív,

2 (can-miR-n022a-c, Novel-miR23) a paprikában korábban leírt és 7 (can-miR-f03, can-miR-f08b, can-miR-f17a, can-miR-f17b, can-miR-f22, can-miR-f38, can-miR-f41) az új miRNS-ek közé tartozik. A placenta-hús összehasonlításban 4 konzervatív és 1 új (can-miR-f24) miRNS-t találtunk, ami a húsban emelt expressziós szintet mutatott.

A változó konzervatív miRNS-ek 7 miRNS-család (can-miR166, can-miR168, can-miR171, can-miR319, can-miR397, can-miR398, can-miR5303) tagjai. 3 olyan miRNS-család (can-miR319, can-miR397, can-miR398) is volt, ahol a legmagasabb átlagos expresszióval rendelkező családtagok mutattak szignifikáns változást, és az összes többi alacsonyabb átlagos leolvasásszámmal jellemezhető családtag is azonos tendenciát mutatott (nem szignifikáns szinten).

A legmarkánsabb változást a can-miR319 családban tapasztaltunk, ahol a 7 legnagyobb átlagexpresszióval rendelkező miRNS szignifikánsan magasabb szintű expressziót mutatott a placentában, ráadásul a fennmaradó 4 miRNS is a placentában expresszált (nem szignifikánsan, de több, mint 4,5-szer) magasabb szinten.

A 40 napos stádiumban mind a 4 konzervatív miRNS, ami (a placentához viszonyítva) a húsban jelentősen magasabb leolvasási számmal rendelkezett, a can-miR168-as családba tartozik.

A változást mutató új miRNS-eknél tapasztalt változások is hasonló képet mutattak. A can-miR-f24 kivételével mind a placentában fejeződött ki nagyobb mértékben. A két érintett új miRNS-család a can-miR-f08 és a can-miR-f17 esetén is azt tapasztaltuk, hogy nem minden családtag változott szignifikánsan, de mindegyiknek az expressziója a placentában legalább négyszerakkora volt, mint a húsban.

A placenta (40 DAA) és a mag (40 DAA) összehasonlítása során 12 miRNS a placentában 20 miRNS a magban mutatott fokozott expressziót. A változást mutató miRNS-ek között nagyjából azonos arányban voltak a konzervatív (13 db), a paprikaspecifikus (9 db) és az új miRNS-ek (10 db).

Ebben az összehasonlításban 4 konzervatív miRNS-család (can-miR171, can-miR319, can-miR397, can-miR398) esetén több családtag is mutatott jelentős különbséget. Ezek közül a can-miR397 és a can-miR398 esetén a legjelentősebb családtagok a placentában fordultak elő nagyobb mennyiségben, és a többi családtag esetén is azonos tendencia volt

megfigyelhető. A can-miR171 és a can-miR319 esetén családtagonként eltérően, vagy a magban, vagy a placentában mutattak fokozott expressziót.

A paprikában korábban leírt miRNS-ek két kivétellel (can-miR-n009a,b-3p, can-miR-n016ab) a magban expresszázódtak nagyobb mértékben. Az új miRNS-ek magasabb expressziója szintén két kivétellel (can-miR-f04, can-miR-f15) a magban volt jellemző.

A 40. napon a hús és a mag között 23 konzervatív, 12 paprikaszpecifikus és 16 új miRNS-expressziójában azonosítottunk jelentős eltérést. A mért expressziós szint 38 esetben a magban, 13 esetben a húspan volt magasabb.

A konzervatívoknál a 40 napos stádiumban itt találtunk változást a legtöbb (11) család esetén. A húspan magasabb szinten expresszáztak a mir168, mir393, mir396 és a mir4376 tagjai. A magban fokozott expressziót mutatott a mir167, mir171, mir319, mir390, mir399 és a mir5303 családba tartozó minden szignifikánsan változó miRNS. A mir166 esetén egyes családtagok a húspan, mások a magban fordultak elő nagyobb gyakorisággal a leolvasások között.

A változást mutató új és a paprikában korábban leírt miRNS-ekre is az volt a jellemző, hogy többségben (2-2 kivétellel) a magban szerepeltek szignifikánsan nagyobb leolvasási számmal. Az újak között a can-miR-f04 és a can-miR-f15 a magban jelentősen alacsonyabb mértékben fejeződtek ki, mind a húshoz, mind a (a korábbi összehasonlítás alapján) placentához viszonyítva.

A szövetek összehasonlító vizsgálatának segítségével sikerült azonosítanunk olyan miRNS-eket, amelyek szövethez köthetően fokozott vagy csökkent expressziót mutattak. Mostanra növényekben több olyan szövetdifferenciációs folyamatot is leírtak, ahol differenciáció szempontjából meghatározó egy miRNS-nek az adott sejtekben való megjelenése vagy kizáródása, esetleg egymáshoz viszonyított aránya (Válóczi et al., 2006)

Magas számban (16) találtunk olyan miRNS-eket (can-miR167a, can-miR171, can-miRC18-5p, can-miR-f01, can-miR-f06, can-miR-f25, can-miR-f34, can-miR-f39, can-miR-f42, can-miR-n006, can-miR-n014, can-miR-n021, can-miR-n025, can-miR-n029, can-miR-n034, can-miR-n035), amik mindkét vizsgált stádiumban, mind a placentához, mind a húshoz viszonyítva magasabb expressziós szintet mutattak a magban (24. ábra A M↑).

További 4 miRNS (can-miR319a, can-miR319bc, can-miR-f09, can-miR-n002ac) esetén ezt a szövetspecifikus, emelt expressziót kizárólag a 40 napos stádiumban tapasztaltuk.

A mag esetén egyetlen olyan miRNS-t (can-miR-f04) azonosítottunk, aminek a szintje a magban minden stádiumban és minden vizsgált szövethez képest jelentősen csökkent. Mindössze, néhány olyan miRNS, fordult elő a könyvtárainkban, ami vagy a 28 (can-miR-f14, can-miR-f18, can-miR-f33) vagy a 40 napos stádiumban (can-miR393a-3p, can-miR366d, can-miR-f15, can-miR-n016ab) a placentával és a hússal szemben is jelentősen alacsonyabb szinten expresszált a magban (24. ábra A M↓).

A vizsgálataink során sikerült azonosítani olyan miRNS-eket is, amelyek hússpecifikus expressziós változást mutattak, 2 miRNS-nek az expressziós szintje mindkét stádiumban mindkét szövethez képest jelentősen emelkedett (24. ábra A H↑), míg 8 miRNS-nek csökkent (24. ábra A H↓). Voltak olyan szövetre jellemző expressziós változások, amelyek vagy a 28 vagy a 40 napos stádiumhoz kötődtek. A 28 napos stádiumban egy kivétellel az expressziónövekedés, a 40 napos stádiumban az expressziócsökkenés volt a jellemző.

A placenta esetén volt a legkevesebb szövetspecifikus miRNS-expressziós változás. 7 esetben a placentában emelt expressziót (24. ábra A P↑), 2 esetben csökkent expressziót írtunk le (24. ábra A P↓). Ezek a változások nagy része (5) a 40 napos stádiumra volt jellemző, két esetben mindkét stádiumban és úgyszintén két esetben a 28 napos stádiumban volt szignifikáns az eltérés a többi szövethez viszonyítva.

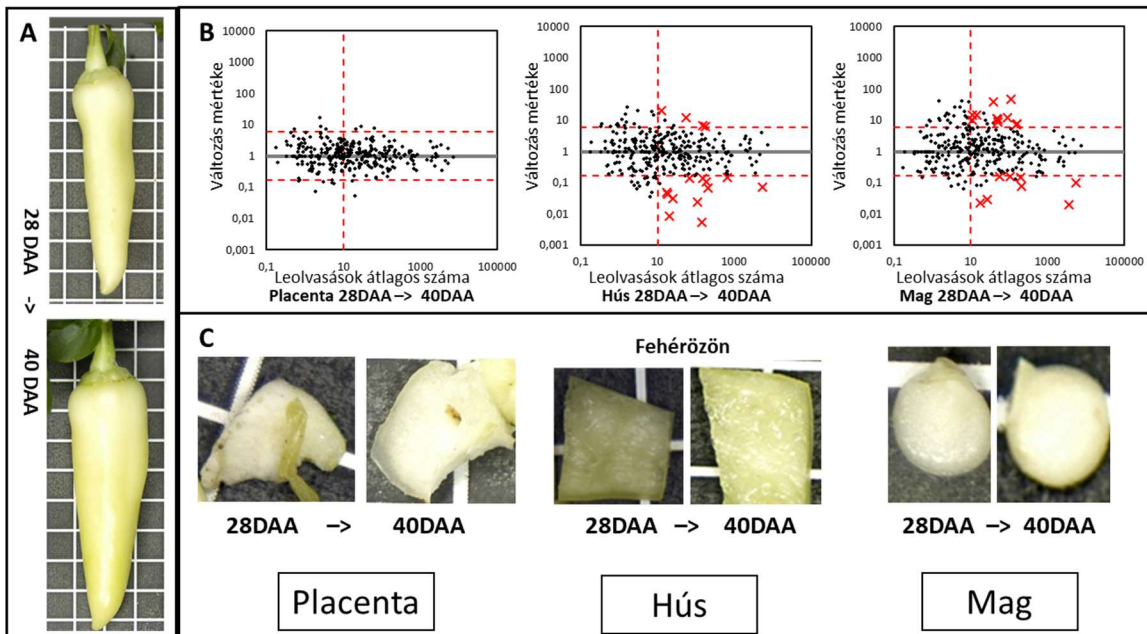
Ezek a markáns szövetspecifikus expressziós különbségek (24. ábra A) arra engednek következtetni, hogy ezek a miRNS-ek és az általuk szabályozott célmolekulák (target mRNS) fontos szerepet töltenek be a paprikatermés szöveteiben. Szintén felmerül a lehetőség, hogy valamely szövetspecifikus miRNS emelt vagy csökkent expressziója döntő fontosságú lehet a sejtek bizonyos irányú differenciációs útjának kijelölésében.

6.7.3. Az egyes szövetek miRNS-expressziós változásai a két vizsgált időpont között

A 28. és a 40. nap között a 'Fehér özőn' termései jelentős növekedésen, az egyes szövetek szabad szemmel is látható fejlődésen mennek keresztül (23. ábra A, C). Ezeket a szemmel látható változásokat jó eséllyel a miRNS-szinten is megjelenő expressziós változások kísérik, ezért az egyes szövetek két időpontban (28 DAA, 40 DAA) vett mintái között is elvégeztük

a differenciálexpressziós összehasonlításokat (23. ábra B). A 3 szövetet vizsgálva összesen 36 szignifikáns változást találtunk.

A két vizsgált időpont között a terméshús megvastagszik, és élénkebb sárga színűvé válik (23. ábra C). A terméshúsban 17 jelentős változást mutató miRNS-t azonosítottunk, ezek közül 11 konzervatív, 4 új és 2 paprikában korábban leírt miRNS-t találtunk (24. ábra B). Az így azonosított konzervatív miRNS-ek a can-miR393a-3p kivételével mind a 28 napos mintában mutattak jelentősen nagyobb mértékű expressziót. A 2 korábban leírt miRNS (can-miRC28-5p és can-miR-n010) expressziója a két mintavétel között jelentősen megnövekedett, ezzel ellentétben az új miRNS-ek többségénél (can-miR-f06 kivételével) jelentős expressziócsökkenést tapasztaltunk.



23. ábra A termés (A) és a vizsgált szövetek (C) a 28 és a 40 napos termések stádiumában, valamint a két időpont közti miRNS-expressziós változásokat bemutató MA plotok. Az X tengely a számított átlagos leolvasásszámra („basemean”), míg az Y tengely a változás mértékére („Foldchange”) vonatkozik. A szignifikánsan változó ($\text{basemean} > 10$, $\text{foldchange} > 6$; $\text{padj} < 0,05$) miRNS-eket piros x-ekkel, a nem változóakat fekete pontokkal jelöltük. A piros szagatott vonalak az x és az y tengelyen mért paraméterekre vonatkozó határértékeket mutatják.

A hártavastagságú, puha magok kitöltődnek, a maghéj szilárd és törtfehér színű lesz (23. ábra C). A két vizsgált időpont között a magban 19 miRNS-expressziója változott jelentősen, ezek a változások nagyrészt konzervatív (12 db), kisebb részt új (5 db) és korábban leírt (2 db) miRNS-eket érintettek (24. ábra B). Ebben a fejlődési szakaszban a változó konzervatív

Ezen adatok összesítésével 3 olyan miRNS-t sikerült azonosítani, ami mind a húspan, mind a magban változott a két időpont között. Ezek között két miRNS-expressziója az idő előrehaladtával mindkét szövetben csökkent, míg a can-miR-07-hez tartozó leolvasások száma jelentősen magasabb volt a 40 napos stádiumban. Olyan miRNS-t nem találtunk, ami eltérő irányú változást mutatott a két (hús, mag) szövet esetén.

6.8. A vizsgált miRNS-ek által szabályzott mRNS-ek, gének és funkciók

Az azonosított miRNS-ek célpont-RNS-einek az azonosításához referenciaként a 'Zunla-1' fajtán leírt és annotált génszettet használtuk. Az így azonosított gének funkciójának feltérképezéséhez a panther fehérjecsoporthozó vizsgálatot és a GO annotációt végeztünk.

Több tanulmány alátámasztja, hogy a növényi miRNS-ek olyan fontos szabályzó elemek, amelyek a bázispárosodás alapján felismert cél-mRNS-ek hasítását vagy transzlációs gátlását indukálják. Ezért a termésfejlődés és a szöveti differenciáció molekuláris hátterének feltérképezéséhez kiemelt fontosságú a termésfejlődésben résztvevő miRNS-szabályzás alatt álló gének azonosítása.

Az általunk vizsgált 315 miRNS-hez a PsRNATarget segítségével összesen 12685 egyedi annotált gént sikerült hozzárendelnünk. Ennek a programnak a segítségével minden listázott miRNS-hez sikerült nagyszámú potenciális célpontot azonosítani. A szoftver a can-miR-f57-höz rendelte hozzá a legtöbb mRNS-t (394). Az mRNS-ek közül a *Capana06g002983* gén bizonyult potenciális célpontnak a legtöbb általunk vizsgált miRNS esetén (29). Ez a gén a *Dictyostelium discoideum*, *mhcA* génjével van annotálva, amely egy a mikrotubulusok szerveződésében kulcsfontosságú miozin fehérjét kódol.

A célpont-miRNS párosodás alapján a program előrejelzést ad a szabályzó mechanizmusra is. A növények esetén a hasítás sokkal jellemzőbb a miRNS-célzott mRNS kapcsolatban. Az általunk kapott kapcsolatok esetén ezzel egybevágó eredményt kaptunk; a 83%-nál hasítást, 17%-nál transzlációs gátlást mutatott.

A konzervatív miRNS-ekhez összesen 8631 egyedi mRNS-t rendelt hozzá a program. A konzervatív miRNS-családok közül a mir166-os család esetén találtuk a legtöbb potenciálisan szabályzott mRNS-t. A legtöbb konzervált miRNS által potenciálisan szabályzott mRNS úgyszintén a *Capana06g002983* lett. A második legtöbb esetben azonosított célpont a *Capana01g004476*, ami az OXA1 fehérjével mutat nagy hasonlóságot.

Az OXA1-ről bizonyították, hogy egy mitokondriális belső membrán inzertáz, ami olyan pórusokat képez, amelyek alkalmasak a fehérjeszegmensek transzlokációjára.

A paprikaszpecifikus miRNS-ek esetén is minden miRNS-hez találtunk a 'Zunla' paprikafajta génjei között potenciális célpont-mRNS-eket. A paprikaszpecifikus miRNS-ek közül a legtöbb mRNS-t a Novel-miR23-hoz rendelte hozzá a program. Ebben a csoportban a leggyakoribb célgén a *Capana04g002761* volt, az annotáció során kapott fehérje (AT1G59740) az egyik fő facilitátor szupercsaládnhoz tartozó protonfüggő oligopeptid transzporter, amit *Arabidopsis* esetén a virágban, a becőben és a gyökerekben mutattak ki.

Az általunk azonosított 73 új miRNS-hez összesen 3590 egyedi célgént azonosítottunk. Kimagaslóan sok lehetséges célpontot a can-miR-f57 (394), a can-miR-f46 (328), can-miR-f41 (319) és a can-miR-f10b (310) miRNS esetén találtunk. Az újonnan azonosított miRNS-ek között az 5 leggyakoribb célgén, a *Capana10g000055* (egy etilén- és metil-jázmonát-kezeléssel egyaránt indukálható a káliumot és nátriumot áteresztő ciklikus nukleotid-függő (cAMP vagy cGMP) kapuzott ioncsatorna), a *Capana04g002761* (a paprikaszpecifikus miRNS célpontok között már említett oligopeptid transzporter), a *Capana06g003076* (egy miozin motorfehérje), a *Capana08g000099* (egy szabályozófehérje, ami a szalicilsav által közvetített programozott sejtpusztulást gátolja) és a *Capana05g000156* (egy a fehérjemódosításban résztvevő E3 ubiquitin ligáz) volt.

A két genotípus összevetése során azonosított miRNS változások között 8 (can-miR393a-3p, can-miR396f, can-miR-f13, can-miR-f14, can-miR-f18, can-miR-f24, can-miR-f32, can-miR-n018, can-miR-n030) olyan volt, ami mindkét időpontban változott, ráadásul a változás iránya a két időpontban minden miRNS esetén megegyezett. Ezek közül 2 (can-miR393a-3p, can-miR396f) a 'Tepin'-ben és 6 a 'Fehér özőn'-ben mutatott magasabb expressziót.

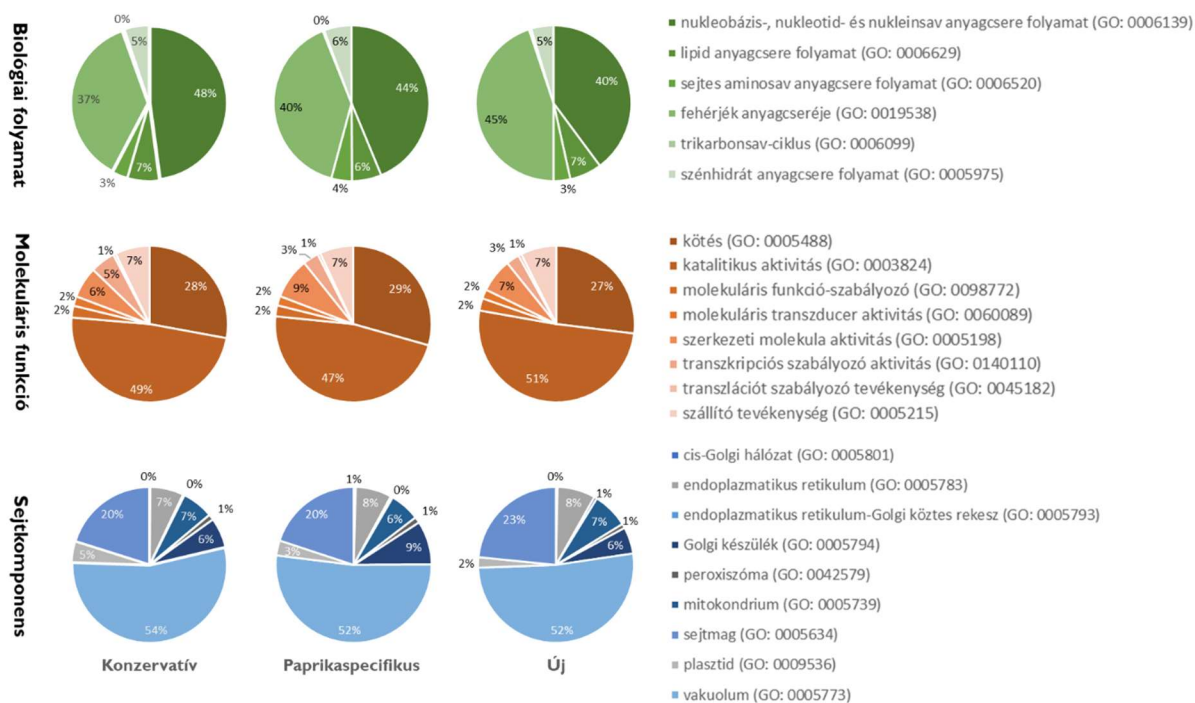
A 'Tepin'-ben magasabb expressziót mutató miRNS-ek célpontjai között a 3 leggyakoribb mRNS a *Capana08g001037*, a *Capana05g002476*, a *Capana00g004293* volt. Ezek között az annotáció alapján volt egy a liszharmat-rezisztenciában szerepet játszó (AT5G05190), egy a magas fényterheléssel indukált flavonoid bioszintézissel kapcsolatos gének indukációjához kapcsolódó transzkripció aktívátor (NAC078), valamint egy a fehérjemódosításban résztvevő E3 ubiquitin ligáz (PUB62).

A 'Fehér özön'-ben a 'Tepin'-hez képest mindkét vizsgált stádiumban emelt expressziót mutató miRNS-ek célpontjai között a leggyakoribb a MRS2-3 magnézium transzporterként annotált *Capana08g002224*, amely a magnézium beáramlását szabályozhatja.

A kapott mRNS-eket az annotációból származó génlisták segítségével besoroltuk a panther fehérjeosztályokba. A célgének között a konzervatív és a paprikaszpecifikus és az új miRNS-ek esetén is a leggyakoribb kategóriák a következők voltak: metabolit interkonverziós enzim (PC00262), nukleinsavat kötő fehérje (PC00171), fehérjét módosító enzim (PC00260), transzporter (PC00227) és transzlációs fehérje (PC00263). Mindhárom miRNS kategóriában a nukleinsavkötő fehérjék nagyobbik része RNS-kötő, kisebbik része DNS-kötő volt. Az RNS-kötő fehérjék között érdekes módon a konzervatív miRNS-ek célgénjeinél az általános transzkripció faktorok (PC00259)(41,8%), míg a paprikaszpecifikus (45,7%) és az újonnan azonosított (44,2%) miRNS-ek célgénjeinél az RNS processzási faktorok (PC00147) voltak többségben.

A feltételezett targetek esetén elvégeztük a gén ontológiai analízist is, ehhez a panther adatbázis Go Slim funkcióját alkalmaztuk. A molekuláris funkció kategórián belül mindhárom kategóriában (konzervatív, paprikaszpecifikus és új) az annotált gének kb egynegyede a katalitikus aktivitás (GO: 0003824) és a megközelítőleg 15%-uk a kötés (GO: 0005488) kifejezéshez tartozott (25. ábra).

A biológiai folyamatok közül a sejtes folyamat (GO: 0009987) (~33%), az anyagcsere folyamat (GO: 0008152) (~25%), a sejtkomponens-szerveződés vagy biogenezis (GO: 0071840) (~12%) és a biológiai szabályozás (GO: 0065007) (~11%) kifejezésekhez rendelt az analízis jelentős számú génterméket. Ezen a kategórián belül több szintet is megvizsgáltunk, például az elsődleges anyagcsere folyamatok szintjén az azonosított géneket a szoftver 6 kifejezéshez rendelte hozzá: nukleobázis-, nukleotid- és nukleinsav anyagcsere folyamat (GO: 0006139), lipid anyagcsere folyamat (GO: 0006629), sejtes aminosav anyagcsere folyamat (GO: 0006520), fehérjék anyagcseréje (GO: 0019538), trikarbonsav-ciklus (GO: 0006099), szénhidrát anyagcsere folyamat (GO: 0005975).



25. ábra Az összes általunk azonosított célpont gén ontológiai elemzése. Az elemzéshez a panther adatbázis GoSlim funkcióját használtuk. Az mRNS-ek annotációja során kapott fehérjéket a GO Slim fogalmakhoz rendeltük a biológiai folyamatok (zöld), molekuláris funkciók (narancssárga) és sejtkomponensek (kék diagramok) szempontjából. A számok jelzik az egyes GO Slim kifejezések százalékát a fő ontológiákon belül. A biológiai folyamatok közül az elsődleges anyagcsere folyamatok (GO:0044238) alá, a molekuláris funkció esetén a molekuláris funkció (GO:0003674) alá, míg a sejtkomponens esetén az intracelluláris membránnal kötött organelum (GO:0043231) alá sorolt kifejezéseket ábráztuk.

Ezek közül mindhárom kategóriánál a fehérje és a nukleinsav anyagcsere szerepelt a legnagyobb arányban. A konzervatív csoportnál a nukleinsav anyagcsere kifejezés fordult elő többször (48%-37%). A paprikaszpecifikus csoport esetén már közelebb volt egymáshoz a két kifejezés (44%-40%) találati gyakorisága. Az új miRNS-ek esetén (40-45%) a potenciálisan a fehérje anyagcserében szerepet játszó célpontok fordultak elő nagyobb arányban. Az ebben a csoportban szereplő többi kifejezés esetén csak kisebb (~1% körüli) különbségek fordultak elő (25. ábra).

A sejtkomponens főkategórián belül azt tapasztaltuk, hogy a legtöbb annotált gén a sejt, sejtalkotó és az organelum kifejezésekhez kapcsolódik. A fehérjekomplexek, a membránok, a plazmodezmák és az extracelluláris régiók jelentősen kevesebbszer fordultak elő. A célpontpredikcióban használt gének elhelyezkedésének jobb megismeréséhez az

intracelluláris membránnal kötött organelum kategórián belül is megvizsgáltuk a GO kifejezések előfordulását. Ezek alapján az derült ki, hogy az általunk vizsgált mRNS-ek többsége (>50%) a sejtmaghoz köthető, és viszonylag nagy arányban (>20%) fordulnak elő a vakolumban is (25. ábra). Az endoplazmatikus retikulum, a mitokondrium és a Golgi-készülék esetén még számottevő előfordulást jelez, hogy a gének 6-10%-a köthető volt ezekhez a kifejezésekhez. A plasztidot átlagosan a gének 3%-a esetén azonosította a program. A további 3 kategória 1% körüli arányban fordult elő.

A szövetszintű miRNS eltérések vizsgálata során sikerült azonosítani olyan miRNS-eket, amik mindkét stádiumban és mindkét másik szövethez képest szignifikáns szövetspecifikus expresszióváltozást mutattak. Öt ilyen csoportot tudtunk kialakítani: a húsban (H↑), a magban (M↑) és a placentában (P↑) emelt expressziót mutató, és a húsban (H↓) és a magban (M↓) csökkent expressziót mutató miRNS-ek csoportját. A legtöbb szövetspecifikus magas expressziót mutató miRNS-t (11) és legtöbb potenciális célpontot (1348) a magban sikerült azonosítani, míg a szövetspecifikus csökkent expressziót mutató miRNS-ek (4) és hozzájuk rendelt targetkapcsolatok (695) száma a húsban volt a legnagyobb.

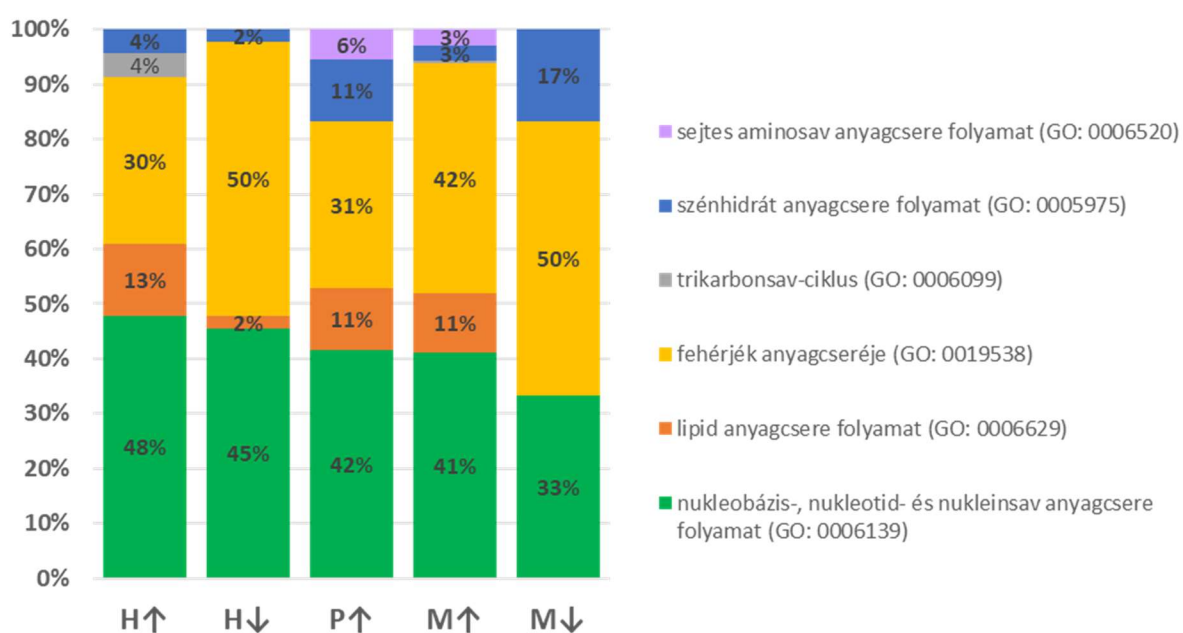
A szövetspecifikus miRNS-ek targetei esetén is elvégeztük a gén ontológiai vizsgálatot. Ezek közül a biológiai folyamatokra vonatkozó vizsgálat eredményeit mutatjuk meg részletesen (26. ábra). Itt is az elsődleges anyagcsere folyamatok szintjén vizsgáltuk a célgének funkcióját. Az általunk vizsgált öt csoport (H↑; H↓; P↑; M↑; M↓) esetén is a fehérje és a nukleinsav anyagcsere volt a két legfontosabb kategória, azonban ezek a csoportok között jelentős eltéréseket is tapasztaltunk.

A húsban emelt expressziót mutató miRNS-ek által szabályzott mRNS-ek főként a nukleobázis-, nukleotid- és nukleinsav anyagcseréhez köthetőek, és a fehérje anyagcseréhez mindössze az mRNS-ek 30%-a kapcsolódik, míg a lipidanyagcseréhez köthető célgének aránya (13%) ebben az esetben volt a legmagasabb. Érdekes módon a húsban csökkent működést mutató miRNS-ek esetén többnyire a fehérjeanyagcseréhez (50%) kapcsolódó mRNS-ek kerültek azonosításra potenciális célpontként, és ezek között a lipidanyagcseréhez köthető géntermékek aránya (2%) is jóval alacsonyabb volt.

A mag esetén azt figyelhettük meg, hogy mind a növelt expressziós, mind a csökkent expressziós csoportban a fehérjeanyagcsere volt a leggyakoribb GO kifejezés, mindkét csoportban ezt követte a nukleobázis-, nukleotid- és nukleinsav anyagcsere folyamat

kifejezés. Az M↑ csoport miRNS célpontjai között a lipidanyagcsere (13%), míg az M↓ miRNS célpontjai között a szénhidrát-anyagcsere (17%) jelent meg jelentős százalékban (26. ábra).

A placentában azonosított szövetspecifikus változást mutató miRNS-ek célpontjai között a legtöbb a nukleobázis-, nukleotid- és nukleinsav anyagcsere folyamathoz kapcsolható (42%), de nagy arányban fordultak elő a fehérjeanyagcserehez köthető célmolekulák is (31%). A lipid és a szénhidrát anyagcsérével összefüggő gének azonos arányban fordultak elő (11%). A szövetspecifikus csoportok közül a sejtes aminosav anyagcsere a placentában volt a legmagasabb (6%) (26. ábra).



26. ábra A szövetspecifikusan expresszáló miRNS-ekhez tartozó célgének GO Slim annotációja az elsődleges anyagcsere folyamatok szintjén. A betűk az egyes szöveteket: hús (H), placenta (P), mag (M), a nyílak a többi szövethez viszonyított magasabb (↑) vagy alacsonyabb (↓) expressziót jelölik. Ezeknél a célgéneknél is a nukleobázis és a fehérjék anyagcsereje a legfontosabb kategóriák, de itt az egyes szövetspecifikus csoportok között sokkal nagyobb mértékű különbségeket láthatunk.

A nukleinsav anyagcserehez köthető mRNS-ek a szövetspecifikusan magasabb (↑) expressziót mutató miRNS-ekhez tartozó célpontoknál nagyobb arányban (41%), míg az egyes szövetre jellemzően alacsonyabb (↓) expressziót mutató kisRNS-ek célpontjai között kisebb arányban (33%) fordultak elő. A lipid anyagcsere kifejezést az emelt expressziót mutató miRNS-ek esetén mindhárom szövetben (H↑, P↑, M↑) jelentős számú génhez (11%), a húsban csökkent expressziót mutató (H↓) miRNS-ek célgénjeinek mindössze 2

százalékához és a magban alacsonyabb abundanciát mutató (M↓) miRNS-ek célgénjeihez egyáltalán nem rendelte hozzá a szoftver ezt a kifejezést (26. ábra).

Ezek az eltérések, markánsabbak mint a konzervatív, új és fajspecifikus miRNS-ek csoportjai között bemutatott különbségek. Ennek oka lehet, hogy a szövetspecifitás sokkal meghatározóbb a funkció szempontjából, mint az evolúciós konzerváltság vagy a felfedezés ideje, módja. A másik ok lehet, hogy ezekben a csoportokban nagyságrendileg kisebb számú miRNS és célgén található.

Korábban igazolták, hogy az auxin döntő szerepet játszik a termésfejlődésben és több auxinválaszban résztvevő gén miRNS-szabályozás alatt áll. Például az *auxin válaszfaktor* (*ARF*) a can-miR160 szabályozása alatt áll (Hwang et al., 2013). Paradicsomban az *ARF* gének szabályozásában a miR167 szerepét is kimutatták. A mi vizsgálatunkban 12 különböző *ARF* gént (1,2,4,5,6,7,8,9,16,17,18,19) találtunk a prediktált targetek annotációja között, ezek vagy az *Arabidopsis thaliana* vagy az *Oryza sativa* fajhoz köthetőek voltak. Ezek közül az *ARF17*, és az *ARF18* szerepelt a can-miR160a és a can-miR160b, míg az *ARF6* és az *ARF8* szerepelt a can-miR167a-c, can-miR167d és can-miR167e családtagok potenciális célpontjai között.

Az *ARF6*-ot további konzervatív miRNS-családok tagjai, paprikaspecifikus és új miRNS-ek esetén is targetként azonosítottuk, ezek az mRNS eltérő részein mutattak szekvenciahasonlóságot. A miR397b és miR397c esetén az első 9 nukleotidnál teljes szekvenciakomplementaritást találtunk, de a 10. nukleotidnál a célzott helyen adenin, míg a miRNS-szekvenciában citozin áll, a 11. nt-nál G-U párosodás lehetséges. Mivel a 10 és a 11-es nukleotid helynél való kapcsolódás feltétele a hasításnak, ez esetben a szabályzás nagy eséllyel transzlációs gátlással valósul meg (27. ábra A).

A can-miR397b esetén szövetszintű és genotípusok közti expressziós eltéréseket is tapasztaltunk (27. ábra B.). Jelentősen magasabb expressziós szintet találtunk a csípős 'Tepin'-ben az édes 'Fehér özön'-höz viszonyítva. Szöveti szinten is hasonló dolgot figyeltünk meg, miszerint a kapszacin felhalmozódás fő helyén a placentában mindkét stádiumban magasabb expressziós szintet tapasztaltunk, bár a különbség csak a 40 napos stádiumban lett szignifikáns. Mivel mindkét esetben ott fordult elő jelentősen nagyobb mennyiségben, ahol a kapszaicin előfordulása is jellemző, ezért azt feltételezhetjük, hogy

7. Kitekintés

Az új miRNS-ek, az expressziós profiljuk és a prekurzoraik megismerése nem csak a termésfejlődés molekuláris hátterének megismerését és a meglévő fejlődésbiológiai és domesztikációs modellek pontosítását szolgálhatja, hanem a kapott információk felhasználhatóak lesznek már kidolgozott miRNS-alapú biotechnológiai módszerek (pl: miRNS-géncsendesítés, mesterséges miRNS, tranzien্স miRNS-expresszió, miRNS-célpontmimikri) fajra, termésfejlődési stádiumra, illetve szövetre specifikus változatának kialakításához is. A paprika termésfejlődés vizsgálatában a kisRNS-expressziós mintázatra vonatkozóan átfogó, genomszintű és szövetspecifikus információt gyűjtöttünk. A 21 nt hosszú kisRNS molekulának a termésfejlődésben játszott fontos szerepét, az általunk a terméshúsban tapasztalt kiugróan magas arányuk is alátámasztja.

A konzervatív miRNS-profilok meghatározásával lehetővé válik az azonosított paprikatermesre jellemző miRNS-szekvenciák, ezek expressziós szintjeinek és szabályzási feladatainak a rokonfajokkal történő összehasonlítása. Kézenfekvő lenne a paradicsommal, a termésfejlődés és a termésérés egyik gyakran használt modelnövényével való összehasonlító-vizsgálat, mivel a paradicsomra vonatkozóan több olyan tanulmány is született, ami a termésből készült könyvtárak kisRNS szekvenálását (Mohorianu et al., 2011, Moxon et al., 2008a, Karlova et al., 2013) vagy a termésben szerepet játszó miRNS-ek funkcióvizsgálatát (Zuo et al., 2012, Karlova et al., 2013) tűzte ki céljául.

Vizsgálatainkban nagyszámú korábban ismert miRNS a paprika különböző szöveteire jellemző expressziós profilját határoztuk meg, és számos új, magas expressziójú, szövet- és fajspecifikus kis RNS-t azonosítottunk, és mindegyikükhöz tudtunk potenciális prekurzor- és csillagszál-szekvenciát rendelni. Ezeknek a prekurzoroknak az expresszióját szabályozó irányítószekvenciák vizsgálatával jó esély van a termés adott szövettípusában vagy az adott fejlődési stádiumban specifikusan expresszázó promóterek azonosítására.

Továbbá lehetséges a prekurzor szekvenciák klónozását követően, azokat megfelelő vektorba építve és tranzien্স módon expresszálván (például *N. benthamiana* levélben agroinfiltrációval), a kiemelt prekurzorokról történő miRNS-ek érésének molekuláris vizsgálata. Ráadásul a prediktált célpont-mRNS-ek ko-expressziójával a miRNS-ek által kifejtett szabályzási kapcsolat is igazolható, sőt ebben a rendszerben a miRNS által indukált gátló hatás mechanizmusára (transzlációgátlás vagy mRNS-hasítás) adott bioinformatikai predikció is igazolható.

A vizsgált miRNS-ek által szabályzott mRNS-ek annotációjával képet kaphatunk, arról hogy a miRNS-ek mely biológiai folyamatokban, szabályzási ciklusokban játszanak döntő szerepet. A munka során gyűjtött összetett információk lehetővé teszik adott folyamatokban szerepet játszó miRNS-ek és célpont-mRNS-ek kiemelését. Ráadásul a választott géneknek a dolgozatban bemutatott TRV vektor konstrukcióba történő beépítésével lehetőség nyílik a kiemelt mRNS-eknek akár paprikatermésben történő funkcionális vizsgálatára is.

8. Összefoglalás

A közelmúltban felfedezett kisRNS-ek és az általuk kifejtett génexpressziós szabályzási útvonalak vizsgálata, napjainkban mind állati, mind növényi rendszerekben a kiemelt biológiai kutatási témák közé tartozik. Az újgenerációs mélyszekvenálási technológiák megjelenésével megnyílt a lehetőség a kisRNS-ek és az RNS-ek által szabályozott folyamatok átfogó, genomszintű megismerésére.

Ezek a szekvenálási projektek nagyszámú szekvenciaadattal gazdagítják biológiai ismereteinket, azonban az egyes gének és kisRNS-ek funkciójáról kevés információval szolgálnak. A szekvenciákhoz kapcsolt funkciók feltárásához és megértéséhez más biotechnológiai módszerek alkalmazásán keresztül juthatunk el. A legtöbb ilyen módszert modellorganizmusokra dolgozták ki, ezért a termesztett vagy a vadon termő növényeken való alkalmazásukhoz sok esetben jelentős módosításra van szükség.

A paprika (*Capsicum annuum L.*) az egyik legfontosabb, és legszélesebb körben termesztett zöldség és fűszernövény. A madárpaprika, másik nevén tepin a termesztett paprika vadon előforduló botanikai őse. Az általunk kapott tétéleken belül komoly morfológiai különbségekre lettünk figyelmesek, ezért 40 választott tulajdonság felvételezésével részletes leírást készítettünk a tétel egyes növényeiről. Az általunk vizsgált ‘Tepin’ növényekre általánosan jellemző volt, hogy pirosra érő, vékony terméshúsú, csípős, kétrekeszes terméseket hoztak.

Az elvégzett morfológiai vizsgálatok tükrében egyértelművé vált, hogy a 21569-es tétel nagyobb és megnyúlt terméseivel nem felel meg az elvárásainknak, míg a ‘Tepin6’ kiemelkedett a korábbi pulikációkban ősi, domesztikáció előtti jellemzőként leírt tulajdonságokban, és a mesterséges szabályozott környezetre is jól reagált. Az anyanövényként kiválasztott ‘Tepin6’ utódnemzedékében is megfigyelhettük a legtöbb számunkra kedvező tulajdonságot, mint a kis bogyó méret, kerek bogyóalak és a korai és folytonos virágzás.

A vírusok által indukált (VIGS) géncsendesítési módszer a gyorsasága, egyszerűsége és költséghatékonysága miatt sok növényfaj esetén előtérbe került a körülményes és költséges transzformációt igénylő megoldásokkal szemben.

A vizsgálni kívánt gén egy szakaszát rekombináns vírusba építve a megfertőzött növényekben a vírus szaporodása során az RNS-interferencián keresztül a célgén expressziója drasztikusan lecsökken és kialakul egy a gén alulműködésére (“knockdown”) jellemző fenotípus, és ezáltal megállapítható, igazolható a vizsgált célgén funkciója.

A legtöbb növényi VIGS vektort olyan vírusokból alakították ki, amelyek eredeti gazdanövényei a *Solanaceae* családba tartoznak. Az eredményeink megmutatták, hogy a *Capsicum annuum* különösen érzékeny a VIGS vektorokkal való fertőzésekre. A PVX-alapú vektor funkcióazonosításra az általa kiváltott súlyos nekrotikus tünetek miatt paprikán nem alkalmazható.

A TMV és a TRV esetén enyhébb tüneteket és hatékony géncsendesítést tapasztaltunk. Mindkét vírusalapú vektor esetén az általunk vizsgált háztartási gének expressziós szintje jelentősen megváltozott, ezért a VIGS vektorok paprikán való alkalmazása során az indukált változásokat a qPCR alapú vizsgálatok mellett javasolt más, hibridizáció alapú módszerrel is nyomonkövetni.

A kísérleteinkben a nagy áteresztőképességű szekvenálás módszerét alkalmaztuk, hogy meghatározzuk a a pollenszórás követő 14., 20., 28. és 40. napon vett paprikamintákra jellemző kisRNS-expressziós mintázatokat. Minden vizsgált stádium, szövet és genotípus esetén két biológiai ismétlésből készítettünk könyvtárakat. Az elkészült 20 kisRNS-könyvtár összesen több, mint 235 millió leolvasást tartalmazott.

A 235 millió nyers szekvenciából több szűrési lépés segítségével kizártuk az adapter, az invalid, az alacsony abundanciájú és az rRNS és tRNS adatbázisra illeszkedő szekvenciákat. A nyers szekvenciák 45,6 %-a átmegy az általunk felállított összes szűrési lépésen. Az összes kapott kisRNS-szekvencia 95,43%-a az elvárt 21-24 nt mérettartományba tartozott, a szekvenciák többsége (52,5 százaléka) más fajokban tapasztaltakkal megegyezően 24 nt hosszúságú volt.

A kisRNS-ek méreteloszlása jelentős eltéréseket mutatott az egyes mintákban, és minden szövet esetén tapasztaltunk a méreteloszlásban a szövetre jellemző tulajdonságokat. A terméshúsban a 21 nt-os szekvenciák kiugróan magas arányban fordultak elő. Ezek az eltérések alapján feltételezhető, hogy az egyes szövetek fejlődési folyamataiban specifikus, méretükben is különböző szabályozó kisRNS-ek vesznek részt.

Az általunk elkészített és szekvenált 20 kisRNS-könyvtárban a konzervatív miRNS-ek megtalálásához a MirProf nevű programot használtuk, ami a miRBase-re illeszti a szekvenciákat, és az illesztések során két nukleotid eltérést (mismatch) fogad el. Ezzel a módszerrel és néhány szűrési lépés alkalmazásával 40 konzervatív miRNS-családba tartozó, 217 egyedi szekvenciát azonosítottunk.

A miRBase adatbázis jelenleg nem tartalmaz *Capsicum* fajból származó szekvenciákat, ezért a korábban *Capsicum* mintákból leírt miRNS-szekvenciákból létrehoztunk egy ismétlődéseket nem tartalmazó 68 egyedi szekvenciából álló listát. A 68 szekvencia közül Patman illesztéssel (2 mismatch) 42-t találtunk meg a saját adatszettünkben.

Az új, eddig ismeretlen miRNS-ek felfedezéséhez a miRDeep-P és a miRCat párhuzamos használatával, és a megfelelő lépéseknél beiktatott, optimalizált szűrések alkalmazásával kialakított folyamatsor segítségével 73 új, nagy megbízhatóságú miRNS-t tudtunk azonosítani. Az új prediktált miRNS-ek közül 17 mutatott kellő hasonlóságot ahhoz, hogy belőlük 6 új miRNS-családot alakítsunk ki.

A szekvenálási eredményeket kisRNS Northern blot segítségével igazoltuk. A Northern hibridizációs vizsgálatok eredményei jó egyezést mutattak a szekvenálási adatokkal, bár egyes esetekben komoly eltérésekkel is találkoztunk. Az új miRNS-ek között több esetben a szekvenálás alapján feltételezett szövetspecifikus expressziót is sikerült ezzel a technikával alátámasztani.

A Northern hibridizáció és a szekvenálási adatok összevetése alapján a nagy áteresztőképességű módszerrel gyűjtött kisRNS-re és mintára jellemző leolvasásszámok felhasználhatóak a miRNS-ek differenciálexpressziós analízisére a fejlődési folyamat során. A *deseq2* alapú differenciálexpressziós vizsgálatot több megközelítésben is alkalmaztuk. A korai stádiumok esetén lehetőségünk volt a két genotípus és a két időpont összehasonlítására is.

A két genotípus összehasonlításához az abszcencia-prezencia és a *deseq2* módszert párhuzamosan használtuk. A differenciálexpressziós vizsgálat segítségével a két genotípus között a két stádiumot összesítve 25 szignifikáns változást mutató egyedi miRNS-t sikerült azonosítani. A változó miRNS-ek közül több esetben mindkét stádiumban azonos irányú szignifikáns változást tapasztaltunk. A két vizsgálat alapján azt találtuk, hogy a

természtésben lévő fajtában a vad változathoz képest új miRNS-ek jelentek meg és bizonyos konzervatív miRNS-ek expressziója és feltehetően a funkcionális szerepe is lecsökkent.

A két stádium összehasonlítása során a 'Tepin' esetén nem találtunk szignifikáns változást mutató miRNS-eket. A 'Fehér özön' esetén 10 változó miRNS-t találtunk, ami azt mutatja, hogy a 'Tepin'-nel ellentétben a 'Fehér özön' termésben a miRNS-alapú szabályzásban a miRNS-ek expressziójának az időbeli változása is szerepet játszik.

A miRNS-ek gyakran mutatnak szövetre jellemző expressziós mintázatot, ezek feltárásához a termés különböző szöveteiből származó mintákat mind a 28 mind a 40 napos stádiumban összehasonlítottuk. Több olyan miRNS-t is sikerült azonosítanunk, amelyek az egyes szövetekben jelentősen emelt vagy csökkent szinten expresszáltak. Kiugróan magas számban találtunk olyan miRNS-eket, amelyek mind a placentához, mind a húshoz viszonyítva emelkedett expressziós szintet mutattak a magban. A vizsgálataink során sikerült azonosítani, olyan miRNS-eket is amelyek hús, illetve placentaszpecifikus expressziós változást mutattak.

A két vizsgált időpont között mindhárom vizsgált szövettípus jelentős morfológiai változásokon megy keresztül. Ezeket a változásokat miRNS-szintű változások is kísérik, a terméshúsban 17, a magban 19 miRNS esetén azonosítottunk jelentős expressziós változásokat. Azonban a placentában egyetlen olyan miRNS-t sem találtunk, ami a két időpont összehasonlításában megfelelt volna a szignifikáns változás feltételeinek.

A PsRNATarget segítségével mind a konzervatív, a paprikaszpecifikus és az általunk prediktált miRNS-ekhez sikerült nagyszámú potenciális célpont-miRNS-t azonosítani. A prediktált célpont-miRNS kapcsolatok között több olyat találtunk, amit korábbi tanulmányok paradicsomban, illetve paprikában mint igazolt, vagy feltételezett miRNS-célpont kapcsolatként neveztek meg.

Ez a tanulmány az első, ami átfogó szövet szintű képet ad egy húsos termés, a paprika kialakulása során a kisRNS-ek expressziós mintázatáról. Kapott eredményeink alátámasztják, hogy a kisRNS-ek a termés növekedési fázisában több folyamat szabályzásában is fontos szerepet játszanak. A miRNS-ek által potenciálisan szabályzott mRNS-ek azonosítása segít mélyebben megérteni ezen molekulák funkcionális szerepét. Ezek az összetett információk lehetővé teszik a fontos miRNS-ek azonosítását, és ezeknek az ismereteknek a biotechnológiai felhasználása új lehetőséget nyit a paprika hozamának és termésminőségének javítására.

9. Tézispontok

9.1. Új tudományos eredmények

- I. Paprikatermésekből és a termés különböző részeiből 20 kisRNS-könyvtárat készítettem el, ezekből a könyvtárakból 217 konzervatív és 42 paprikából korábban leírt miRNS-t azonosítottam, közülük többet hibridizációs technikával is detektáltam.
- II. A kapott kisRNS-könyvtárak méreteloszlásának vizsgálatával megállapítottam, hogy eltérő méreteloszlás jellemző az egyes szövetekre (placenta, hús, mag). A húspan először figyeltem meg a 21 nt hosszú kisRNS-ek kiemelkedően magas arányát.
- III. Két korábban leírt növényi miRNS-ek előrejelzésére használt bioinformatikai eszköz (a miRDeep-P és a miRCat) felhasználásával, és a megfelelő lépéseknél szűrések beiktatásával létrehozott miRNS-azonosítási folyamatsor alkalmazásával 73 új, prekuzorral és csillagszál-szekenciával jellemzett miRNS-t azonosítottam.
- IV. A ‘Tepin’ és a ‘Fehér özön’ genotípusokra elkészült miRNS-profilok abszencia-prezencia vizsgálatával, 6 olyan miRNS-t azonosítottam, ami minden vizsgált ‘Fehér özön’ fázisban és szövettípusban megtalálható volt, és a ‘Tepin’ minták közül egyikben sem fordult elő. A 6-ból 5 miRNS esetén a genotípusok közti különbséget differenciálexpressziós vizsgálatokkal is sikerült megerősítenem.
- V. A differenciálexpressziós vizsgálat segítségével szövetek, genotípusok és fejlődési stádiumok között változó expressziót mutató miRNS-eket azonosítottam. A magban 17, a húspan 11 a placentában 2 miRNS-t találtam, ami mindkét stádiumban és mindkét másik szövethez képest is eltérő szinten expresszált. 3 miRNS-t írtam le, aminek az expressziója a két stádium között mind a húspan mind a magban jelentősen megváltozott.
- VI. 3 különböző vírus alapján készült VIGS vektort felhasználva megállapítottam, hogy a *Capsicum annuum* gazdanövény rendkívül érzékeny a VIGS fertőzésekre. A VIGS módszer vektortól függően más-más hatást gyakorolhat a növény expressziós rendszerére, de minden esetben látható tüneteket és az általam vizsgált, gyakran alkalmazott háztartási gének expressziójának jelentős megváltozását tapasztaltam.
- VII. Az általam alkalmazott TRV-VIGS vektorkonstrukció az infiltrált *N. benthamiana*-ról történő átfertőzéssel felhasználható a paprika növények esetén a termésben való géncsendesítésre is.

9.2. New scientific results

- I. I created 20 small RNA sequencing libraries from pepper fruits and different fruit tissues. From these libraries, 217 conservative miRNAs, and 42 previously described pepper miRNAs were identified, and several were confirmed with hybridization techniques.
- II. I observed that different tissues (placenta, seed, flesh) have different small RNA size distribution. The 21 nt long sRNAs occurred at the highest rate in the flesh samples, especially at 40 DAA.
- III. A new miRNA prediction pipeline was developed by combining two existing bioinformatic tool (miRDeep-P and miRCat) with some tested, additional filtering steps. With this system, I was able to identify 73 new, reliable, individual miRNA sequences with their precursors and star-strands from pepper fruits.
- IV. With testing the absence and presence in the two tested genotypes ('Tepin' and 'Fehér özön') 6 miRNA was identified 'Fehér özön' specific, I found it in every stage and tissue of it, while have not found in any sample from 'Tepin'. From this six, five has been validated by differential expression analysis (deseq2).
- V. In the differential expression analysis, I identified miRNAs with seed-specific (17), flesh specific (11) and placenta specific (2) expression changes, which was significant in both stages, and it was also significant compared to both other tissue, from the same stage. We found 3 miRNA, which expression changed drastically between the two time-points.
- VI. With the testing of 3 different viruses (TMV, PVX, TRV) based VIGS constructs I realized, that *Capsicum annuum* is really sensitive to VIGS infections. VIGS can have different effects on pepper plants, depends on the used virus, but in all tested cases visible symptoms emerged and the expression of usually used qPCR reference genes altered drastically.
- VII. I used TRV VIGS vector constructs for *N. benthamiana* agroinfiltration, and with the mechanical transfer, I was able to infect pepper plants with high efficiency. In some cases, these constructs were able to provide functional gene silencing also in the fruits of the infected pepper plants.

10. Mellékletek

10.1. Irodalomjegyzék

1. Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C., & Harberd, N. P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, *131*(14), 3357–3365. <https://doi.org/10.1242/dev.01206> PMID:15226253
2. Adams, M. J., Antoniw, J. F., & Kreuze, J. (2009). Virgaviridae: A new family of rod-shaped plant viruses. *Archives of Virology*, *154*(12), 1967–1972. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0506-6> PMID:19862474
3. Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P. L., Roose, M. L., & Kim, S. C. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany*, *96*, 1190–1202. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800155> PMID:21628269
4. Alcalá-Rico, J. S. G. J., López-Benítez, A., Vázquez-Badillo, M. E., Sánchez-Aspeytia, D., Rodríguez-Herrera, S. A., Pérez-Rodríguez, M. Á., & Ramírez-Godina, F. (2019). Seed Physiological Potential of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* Genotypes and Their Answers to Pre-Germination Treatments. *Agronomy (Basel)*, *9*(6), 325. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060325>
5. Allshire, R. (2002). Molecular biology. RNAi and heterochromatin—A hushed-up affair. *Science*, *297*(5588), 1818–1819. <https://doi.org/10.1126/science.1075874> PMID:12193643
6. Anderson, H. A. (2016). *Chillies: A Global History*. Reaktion Books.
7. Andrews, J. (1984). *Peppers: the domesticated Capsicums*. Univ. of Texas Press.
8. Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
9. Angeli, L. (1957). Heterózis paprikatermesztési kísérletek. (Experiments on heterosis for paprika production.) *Kert. Kutató Intézet Évkönyv*, *2*, 131–140.
10. Angeli, L. (1959). *Paprikatermesztés. (Paprika production.)*. Mezőgazdasági Kiadó.
11. Angenent, G. C., Linthorst, H. J., van Belkum, A. F., Cornelissen, B. J., & Bol, J. F. (1986). RNA 2 of tobacco rattle virus strain TCM encodes an unexpected gene. *Nucleic acids research*, *14*(11), 4673–4682. <https://doi.org/10.1093/nar/14.11.4673>
12. Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Maslenin, L., & Rosner, A. (2008). A new pathotype of Pepper mild mottle virus (PMMoV) overcomes the L4 resistance genotype of pepper cultivars. *Plant Disease*, *92*, 1033–1037. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1033> PMID:30769534
13. Argout, X., Salse, J., Aury, J. M., Guiltinan, M. J., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M., Chaparro, C., Legavre, T., Maximova, S. N., Abrouk, M., Murat, F., Fouet, O., Poulain, J., Ruiz, M., Roguet, Y., Rodier-Goud, M., Barbosa-Neto, J. F., Sabot, F., . . . Lanaud, C. (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, *43*(2), 101–108. <https://doi.org/10.1038/ng.736> PMID:21186351
14. Ashrafi, H., Hill, T., Stoffel, K., Kozik, A., Yao, J., Chin-Wo, S. R., & Van Deynze, A. (2012). De novo assembly of the pepper transcriptome (*Capsicum annuum*): A benchmark for in silico discovery of SNPs, SSRs and candidate genes. *BMC Genomics*, *13*(1), 571. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-571> PMID:23110314
15. Atkinson, R. G., Gleave, L. R. F. B. A. P., Janssen, B. J., & Morris, B. A. M. (1998). Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus-based episomal vector. *The Plant Journal*, *15*(5), 593–604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00211.x> PMID:29368805
16. Axtell, M. J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 137–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120043> PMID:23330790
17. Baenas, N., Belović, M., Ilic, N., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2019). Industrial use of pepper (*Capsicum annuum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food Chemistry*, *274*, 872–885. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.047> PMID:30373022
18. Bakker, J. C. (1989). The effects of air humidity on flowering, fruit set, seed set and fruit growth of glasshouse sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, *40*(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90002-2)
19. Baksa, I., Nagy, T., Barta, E., Havelda, Z., Várallyay, É., Silhavy, D., Burgyán, J., & Szittyá, G. (2015). Identification of *Nicotiana benthamiana* microRNAs and their targets using high throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics*, *16*(1), 1025. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2209-6> PMID:26626050
20. Barbero, G. F., de Aguiar, A. C., Carrera, C., Olachea, Á., Ferreira-González, M., Martínez, J., Palma, M., & Barroso, C. G. (2016). Evolution of capsaicinoids in peter pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) during fruit ripening. *Chemistry & Biodiversity*, *13*(8), 1068–1075. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500503> PMID:27416068

21. Barboza, G. E., & De Bem, B. (2005). Three new species of *Capsicum* (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. *Systematic Botany*, 30(4), 863–871. <https://doi.org/10.1600/036364405775097905>
22. Barchi, L., Pietrella, M., Venturini, L., Minio, A., Toppino, L., Acquadro, A., Andolfo, G., Aprea, G., Avanzato, C., Bassolino, L., Comino, C., Molin, A. D., Ferrarini, A., Maor, L. C., Portis, E., Reyes-Chin-Wo, S., Rinaldi, R., Sala, T., Scaglione, D., . . . Rotino, G. L. (2019). A chromosome-anchored eggplant genome sequence reveals key events in Solanaceae evolution. *Scientific Reports*, 9(1), 11769. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47985-w> PMID:31409808
23. Bartel, B., & Bartel, D. P. (2003). MicroRNAs: At the root of plant development? *Plant Physiology*, 132(2), 709–717. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023630> PMID:12805599
24. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281–297.
25. Baulcombe, D. C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 109–113. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80022-3) PMID:10322199
26. Berke, T. G. (2000). Hybrid seed production in *Capsicum*. *Journal of New Seeds*, 1(3–4), 49–67. https://doi.org/10.1300/J153v01n03_02
27. Bertin, N. (2005). Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication. *Annali di Botanica*, 95, 439–447. <https://doi.org/10.1093/aob/mci042> PMID:15582899
28. Bolger, M. E., Weisshaar, B., Scholz, U., Stein, N., Usadel, B., & Mayer, K. F. (2014). Plant genome sequencing - applications for crop improvement. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.019> PMID:24679255
29. Bollman, K. M., Aukerman, M. J., Park, M. Y., Hunter, C., Berardini, T. Z., & Poethig, R. S. (2003). HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*, 130(8), 1493–1504.
30. Bologna, N. G., & Voinnet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728> PMID:24579988
31. Bombarely, A., Rosli, H. G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L. A., & Martin, G. B. (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(12), 1523–1530. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-12-0148-TA> PMID:22876960
32. Bonnet, E., Wuyts, J., Rouzé, P., & Van de Peer, Y. (2004). Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(17), 2911–2917. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth374> PMID:15217813
33. Bosland, P. W. (1996). *Capsicums: Innovative uses of an ancient crop*. Progress in new crops. ASHS Press.
34. Bosland, P. W., Votava, E. J., & Votava, E. M. (2012). *Peppers: vegetable and spice capsicums* (Vol. 22). Cabi. <https://doi.org/10.1079/9781845938253.0000>
35. Boswell, V. R. (1937). Improvement and genetics of tomatoes, peppers and eggplant. Improvement and genetics of tomatoes, peppers and eggplant.
36. Boukema, I. W. (1980). Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L. *Euphytica*, 29(2), 433–439. <https://doi.org/10.1007/BF00025143>
37. Boukema, I. W. (1984). Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by allele of the L-locus. *Capsicum Newsl*, 3, 47–48.
38. Brigneti, G., Martín-Hernández, A. M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D. C., Baker, B., & Jones, J. D. (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *The Plant Journal*, 39(2), 264–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02122.x> PMID:15225290
39. Brunt, A., Crabtree, K., & Gibbs, A. (1990). *Viruses of tropical plants: descriptions and lists from the VIDE database*. CABI.
40. Buckler, E. S., IV, Thornsberry, J. M., & Kresovich, S. (2001). Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genetical Research*, 77(3), 213–218. <https://doi.org/10.1017/S0016672301005158> PMID:11486504
41. Burch-Smith, T. M., Schiff, M., Liu, Y., & Dinesh-Kumar, S. P. (2006). Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(1), 21–27. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084624> PMID:16815951
42. Camacho-Villasana, Y. M., Ochoa-Alejo, N., Walling, L., & Bray, E. A. (2002). An improved method for isolating RNA from dehydrated and nondehydrated chili pepper (*Capsicum annum* L.) plant tissues. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(4), 407–414. <https://doi.org/10.1007/BF02772128>
43. Cambrón-Crisantos, J. M., Rodríguez-Mendoza, J., Valencia-Luna, J. B., Alcasio-Rangel, S., García-Ávila, C. J., López-Buenfil, J. A., & Ochoa-Martínez, D. L. (2018). First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 185–192.
44. Capoor, S. (1950). A mosaic disease of Sunn Hemp in Bombay. *Current Science*, 19(1).

45. Carra, A., Mica, E., Gambino, G., Pindo, M., Moser, C., Pè, M. E., & Schubert, A. (2009). Cloning and characterization of small non-coding RNAs from grape. *The Plant Journal*, *59*(5), 750–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03906.x> PMID:19453456
46. Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035> PMID:19239886
47. Chapman, S., Kavanagh, T., & Baulcombe, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal*, *2*(4), 549–557. PMID:1344890
48. Chávez Montes, R. A., de Fátima Rosas-Cárdenas, F., De Paoli, E., Accerbi, M., Rymarquis, L. A., Mahalingam, G., Marsch-Martínez, N., Meyers, B. C., Green, P. J., & de Folter, S. (2014). Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. *Nature Communications*, *5*, 3722. <https://doi.org/10.1038/ncomms4722> PMID:24759728
49. Chen, J. C., Jiang, C. Z., Gookin, T. E., Hunter, D. A., Clark, D. G., & Reid, M. S. (2004). Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Molecular Biology*, *55*(4), 521–530. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0590-7> PMID:15604697
50. Cheniclet, C., Rong, W. Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J. P., & Renaudin, J. P. (2005). Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiology*, *139*, 1984–1994. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068767> PMID:16306145
51. Choi, B., Kwon, S. J., Kim, M. H., Choe, S., Kwak, H. R., Kim, M. K., Jung, C., & Seo, J. K. (2019). A plant virus-based vector system for gene function studies in pepper. *Plant Physiology*, *181*(3), 867–880. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00836> PMID:31481630
52. Choi, H. W., & Hwang, B. K. (2012). The pepper extracellular peroxidase CaPO2 is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens. *Planta*, *235*(6), 1369–1382.
53. Chung, E., Seong, E., Kim, Y. C., Chung, E. J., Oh, S. K., Lee, S., Park, J. M., Joung, Y. H., & Choi, D. (2004). A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Molecules and cells*, *17*(2), 377–380. PMID:15179058
54. Clinton, (1909): Rep. Conn. Agric. Exp. Stn. 1907–1908, 854.
55. Cochran, H. L. (1938). A morphological study of flower and seed development in pepper. *Journal of Agricultural Research*, *56*, 395–419.
56. Cooper, J. I., & Mayo, M. A. (1972). Some properties of the particles of three tobnavirus isolates. *The Journal of General Virology*, *16*(3), 285–297. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-16-3-285>
57. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, *14*(6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004> PMID:15173120
58. Crosby, K. M. (2008). In J. Prohens, F. Nuez, & M. J. Carena (Eds.), *VegetablesII* (pp. 221–248). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74110-9_6
59. Csilléry Gábor. (2013) Rezisztencianemesítési programok. A magyar paprika napja A Zöldség-Gyümölcs Piac és Technológia augusztus különszám, p. 6.
60. Csilléry, G. (2006). Pepper taxonomy and the botanical description of the species. *Acta Agronomica Hungarica*, *54*(2), 151–166. <https://doi.org/10.1556/AAgr.54.2006.2.5>
61. Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell*, *23*(2), 431–442.
62. Czibulya, F. (1987). *Bolgárkertészet magyar földön: történetek és módszerek az adatközlő bolgárkertész tollából. Mezőgazdasági Kiadó.*
63. Da Fonseca, B. H. R., Domingues, D. S., & Paschoal, A. R. (2019). mirtronDB: A mirtron knowledge base. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *35*, 3873–3874. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz153> PMID:30874795
64. Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: A plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W49–W54. <https://doi.org/10.1093/nar/gky316> PMID:29718424
65. De la Rosa, M., Arce, L., Villarreal, J. A., Ibarra, L., & Lozano, J. (2012). Germination of simojovel pepper seeds (*Capsicum annuum* L.) previously exposed to NaCl and gibberellic acid. *Phyton*, *81*, 165–168. <https://doi.org/10.32604/phyton.2012.81.165>
66. Dehio, C., & Schell, J. (1994). Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(12), 5538–5542. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5538> PMID:8202523
67. Dinesh-Kumar, S. P., & Voytas, D. F. (2020). Editing through infection. *Nature Plants*, *6*, 738–739. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0716-1> PMID:32601418
68. Ding, S. W., & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, *130*(3), 413–426.
69. Ecker, J. R., & Davis, R. W. (1986). Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(15), 5372–5376. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.15.5372> PMID:16593734

70. Edwardson, J. R., & Christie, R. G. (1997). Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Volume 1. Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Volume 1.
71. El-Adawy, T. A., & Taha, K. M. (2001). Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, 74(1), 47–54. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00337-X)
72. Erickson, A. N., & Markhart, A. H. (2002). Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell & Environment*, 25(1), 123–130. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00807.x>
73. Escaler, M., Aranda, M. A., Thomas, C. L., & Maule, A. J. (2000). Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. *Virology*, 267(2), 318-325.
74. Eshbaugh, W. H. (1993). Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. *New crops*.
75. Estrada, B., Bernal, M. A., Diaz, J., Pomar, F., & Merino, F. (2000). Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6234–6239. <https://doi.org/10.1021/jf000190x> PMID:11141281
76. Eyre-Walker, A., Gaut, R. L., Hilton, H., Feldman, D. L., & Gaut, B. S. (1998). Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4441–4446. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4441> PMID:9539756
77. Faivre-Rampant, O., Gilroy, E. M., Hrubikova, K., Hein, I., Millam, S., Loake, G. J., Birch, P., Taylor, M., & Lacomme, C. (2004). Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant Physiology*, 134(4), 1308–1316. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037507> PMID:15084725
78. Fajtajegyzők, N. (2019). Zöldségnövények, Paprika (*Capsicum annuum* L.) - Chilli, pepper. NÉBIH.
79. Fang, Y., & Spector, D. L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Current Biology*, 17(9), 818–823. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.005> PMID:17442570
80. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (Eds.). (2005). Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
81. Faure, J. E., Rotman, N., Fortuné, P., & Dumas, C. (2002). Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: Developmental stages and time course. *The Plant Journal*, 30, 481–488. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01305.x> PMID:12028577
82. Feldman, J. M., & Oremianer, S. (1972). An unusual strain of tobacco mosaic virus from pepper. *Phytopathologische Zeitschrift*, 75(3), 250–267. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1972.tb02622.x>
83. Finger, F. L., & Pereira, G. M. (2016). Physiology and Postharvest of Pepper Fruits. Production and Breeding of Chilli Peppers (*Capsicum* Spp.), 27–40. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06532-8_2
84. Ferreira e Silva, G. F., Silva, E. M., Azevedo, M. S., Guivin, M. A. C., Ramiro, D. A., Figueiredo, C. R., Carrer, H., Peres, L. E., & Nogueira, F. T. S. (2014). microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. *The Plant Journal*, 78(4), 604–618. <https://doi.org/10.1111/tpj.12493> PMID:24580734
85. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806-811.
86. Fribourg, C. E., & Fernandez-Northcote, E. N. (1972). Potato virus X and tobacco mosaic in *Capsicum* species grown in Peru. *Fitopatologia*, 7(1/2), 23-29.
87. Fu, D. Q., Zhu, B. Z., Zhu, H. L., Jiang, W. B., & Luo, Y. B. (2005). Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *The Plant Journal*, 43(2), 299–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02441.x> PMID:15998315
88. Gai, W. X., Ma, X., Qiao, Y. M., Shi, B. H., Ul Haq, S., Li, Q. H., Wei, A. M., Liu, K. K., & Gong, Z. H. (2020). Characterization of the bZIP transcription factor family in pepper (*Capsicum annuum* L.): CabZIP25 positively modulates the salt tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 11, 139. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00139> PMID:32174937
89. Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078> PMID:18618437
90. Gao, C., Ju, Z., Cao, D., Zhai, B., Qin, G., Zhu, H., Fu, D., Luo, Y., & Zhu, B. (2015). MicroRNA profiling analysis throughout tomato fruit development and ripening reveals potential regulatory role of RIN on microRNAs accumulation. *Plant Biotechnology Journal*, 13(3), 370–382. <https://doi.org/10.1111/pbi.12297> PMID:25516062
91. Ge, A., Shangguan, L., Zhang, X., Dong, Q., Han, J., Liu, H., Wang, X., & Fang, J. (2013). Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in strawberry (*Fragaria×ananassa*). *Physiologia Plantarum*, 148(3), 387–396. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01713.x> PMID:23061771
92. Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Reviews*, 24(2), 1–44.

93. Gergerich, R. C., & Dolja, V. V. (2006). Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The Plant Health Instructor.*, <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2006-0414-01>
94. Gilardi, P., García-Luque, I., & Serra, M. T. (2004). The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L2 and L4 gene-mediated resistance in Capsicum. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 7), 2077–2085. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80017-0> PMID:15218193
95. Gillaspay, G., Ben-David, H., & Gruissem, W. (1993). Fruits – a developmental perspective. *The Plant Cell*, 5, 1439–1451. <https://doi.org/10.2307/3869794> PMID:12271039
96. Goelet, P., Lomonosoff, G. P., Butler, P. J., Akam, M. E., Gait, M. J., & Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 5818–5822. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.5818> PMID:6964389
97. Góngora-Castillo, E., Fajardo-Jaime, R., Fernández-Cortes, A., Jofre-Garfias, A. E., Lozoya-Gloria, E., Martínez, O., Ochoa-Alejo, N., & Rivera-Bustamante, R. (2012). The capsicum transcriptome DB: A “hot” tool for genomic research. *Bioinformatics*, 8(1), 43–47. <https://doi.org/10.6026/97320630008043> PMID:22359434
98. González-Jara, P., Moreno-Letelier, A., Fraile, A., Piñero, D., & García-Arenal, F. (2011). Impact of human management on the genetic variation of wild pepper, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. *PLoS One*, 6(12), e28715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028715> PMID:22163053
99. Govindarajan, V. S., & Sathyanarayana, M. N. (1991). Capsicum—Production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29(6), 435–474. <https://doi.org/10.1080/10408399109527536> PMID:2039598
100. Govindarajan, V. S., Rajalakshmi, D., Chand, N., & Salzer, U. J. (1987). Capsicum—Production, technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25(3), 185–282. <https://doi.org/10.1080/10408398709527453> PMID:3297498
101. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2007). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D154-D158.
102. Guzmán, F. A., Ayala, H., Azurdia, C., Duque, M. C., & De Vicente, M. C. (2005). AFLP assessment of genetic diversity of Capsicum genetic resources in Guatemala. *Crop Science*, 45(1), 363–370. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0363>
103. Gyúros, J. (2004). Étkezési paprika. In Hódossy, Kovács, Terbe, Zöldségtermesztés szabadföldön (pp. 140–144). Mezőgazda Kiadó.
104. Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950–952. Hanssen, I. M., Lapidot, M., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 539–548.
105. Hanssen, I. M., Lapidot, M., & Thomma, B. P. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(5), 539-548.
106. Harrison, B. D., & Nixon, H. L. (1959). Separation and properties of particles of tobacco rattle virus with different lengths. *Microbiology*, 21(3), 569–581. <https://doi.org/10.1099/00221287-21-3-569> PMID:14400024
107. Harrison, B. D., & Robinson, D. J. (1986). Tobravirus. In *The plant viruses* (pp. 339–369). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7026-0_17
108. Havelda, Z., & Maule, A. J. (2000). Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible Cucurbita pepo cotyledons. *The Plant Cell*, 12(10), 1975-1985.
109. He, H., Yang, T., Wu, W., & Zheng, B. (2015). Small RNAs in pollen. *Science China. Life Sciences*, 58(3), 246–252. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4800-0> PMID:25634522
110. Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., Green, P. J., & Jacobsen, S. E. (2006). Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature genetics*, 38(6), 721-725.
111. Hernández-Verdugo, S., Luna-Reyes, R., & Oyama, K. (2001). Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 226(3-4), 129–142. <https://doi.org/10.1007/s006060170061>
112. Herr, A. J., & Baulcombe, D. C. (2004). RNA silencing pathways in plants. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 69, pp. 363-370). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
113. Hiriart, J. B., Aro, E. M., & Lehto, K. (2003). Dynamics of the VIGS-mediated chimeric silencing of the *Nicotiana benthamiana* ChlH gene and of the tobacco mosaic virus vector. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(2), 99–106. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.2.99> PMID:12575743
114. Ho, L. C., & Hewitt, J. D. (1986). Fruit development. In J. G. Atherton & J. Rudich (Eds.), *The Tomato Crop. The Tomato Crop (A scientific basis for improvement)*. Springer., https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_5

115. Ho, T., Wang, H., Pallett, D., & Dalmay, T. (2007). Evidence for targeting common siRNA hotspots and GC preference by plant Dicer-like proteins. *FEBS Letters*, *581*(17), 3267–3272. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.022> PMID:17597620
116. Honig, A., Marton, I., Rosenthal, M., Smith, J. J., Nicholson, M. G., Jantz, D., Zuker, A., & Vainstein, A. (2015). Transient expression of virally delivered meganuclease in planta generates inherited genomic deletions. *Molecular Plant*, *8*(8), 1292–1294. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.001> PMID:25863166
117. Hou, B. Z., Li, C. L., Han, Y. Y., & Shen, Y. Y. (2018). Characterization of the hot pepper (*Capsicum frutescens*) fruit ripening regulated by ethylene and ABA. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1377-3> PMID:30097017
118. Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L., Gu, X., Fan, W., Lucas, W. J., Wang, X., Xie, B., Ni, P., Ren, Y., Zhu, H., Li, J., Lin, K., Jin, W., Fei, Z., Li, G., Staub, J., Kilian, A., . . . Li, S. (2009b). The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics*, *41*(12), 1275–1281. <https://doi.org/10.1038/ng.475> PMID:19881527
119. Huang, Y., Ji, L., Huang, Q., Vassilyev, D. G., Chen, X., & Ma, J. B. (2009a). Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature*, *461*(7265), 823–827. <https://doi.org/10.1038/nature08433> PMID:19812675
120. Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., & Li, W. (2010). CD-HIT Suite: A web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *26*(5), 680–682. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq003> PMID:20053844
121. Huh, S. U., Kim, K. J., & Paek, K. H. (2012). *Capsicum annuum* basic transcription factor 3 (CaBtf3) regulates transcription of pathogenesis-related genes during hypersensitive response upon Tobacco mosaic virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *417*(2), 910–917. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.074> PMID:22209846
122. Hulse-Kemp, A. M., Maheshwari, S., Stoffel, K., Hill, T. A., Jaffe, D., Williams, S. R., Weisenfeld, N., Ramakrishnan, S., Kumar, V., Shah, P., Schatz, M. C., Church, D. M., & Van Deynze, A. (2018). Reference quality assembly of the 3.5-Gb genome of *Capsicum annuum* from a single linked-read library. *Horticulture Research*, *5*(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s41438-017-0011-0> PMID:29423234
123. Hwang, D. G., Park, J. H., Lim, J. Y., Kim, D., Choi, Y., Kim, S., Reeves, G., Yeom, S. I., Lee, J. S., Park, M., Kim, S., Choi, I. Y., Choi, D., & Shin, C. (2013). The hot pepper (*Capsicum annuum*) microRNA transcriptome reveals novel and conserved targets: A foundation for understanding MicroRNA functional roles in hot pepper. *PLoS One*, *8*(5), e64238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064238> PMID:23737975
124. ICTV. (2018) Virus Taxonomy: 2018b Release. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
125. Idrees, S., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Hanif, A., & Ansari, T. M. (2020). Chili Pepper. In *Medicinal Plants of South Asia* (pp. 113-124). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00009-4>
126. Igarashi, A., Yamagata, K., Sugai, T., Takahashi, Y., Sugawara, E., Tamura, A., Yaegashi, H., Yamagishi, N., Takahashi, T., Isogai, M., Takahashi, H., & Yoshikawa, N. (2009). Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. *Virology*, *386*(2), 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.039> PMID:19243807
127. Ince, A. G., Karaca, M., & Onus, A. N. (2009). Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *56*(2), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9356-4>
128. Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M., & Depicker, A. (1994). Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(22), 10502–10506. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10502> PMID:7937983
129. Initiative, A. G. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature* *408*.
130. Inui, M., Martello, G., & Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*, *11*(4), 252-263.
131. Iwahori, S. (1966). High temperature injuries in tomato. V. Fertilization and development of embryo with special reference to the abnormalities caused by high temperature. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *35*, 55–62.
132. Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular cell*, *39*(2), 292-299.
133. Jain, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. *Briefings in Functional Genomics*, *11*(1), 63–70. <https://doi.org/10.1093/bfgp/blr038> PMID:22155524

134. Jang, S. J., Jeong, H. B., Jung, A., Kang, M. Y., Kim, S., Ha, S. H., Kwon, J. K., & Kang, B. C. (2020). Phytoene synthase 2 can compensate for the absence of PSY1 in the control of color in Capsicum fruit. *Journal of Experimental Botany*, *71*, 3417–3427. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa155> PMID:32219321
135. Jeong, H. B., Jang, S. J., Kang, M. Y., Kim, S., Kwon, J. K., & Kang, B. C. (2020). Candidate Gene Analysis Reveals That the Fruit Color Locus *Cl* Corresponds to *PRR2* in Pepper (*Capsicum frutescens*). *Frontiers in Plant Science*, *11*, 399. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00399> PMID:32328078
136. Jones-Rhoades, M. W., & Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, *14*(6), 787–799. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.027> PMID:15200956
137. Jorgensen, R. A., Cluster, P. D., English, J., Que, Q., & Napoli, C. A. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, *31*(5), 957–973. <https://doi.org/10.1007/BF00040715> PMID:8843939
138. Karlova, R., van Haarst, J. C., Maliepaard, C., van de Geest, H., Bovy, A. G., Lammers, M., Angenent, G. C., & de Maagd, R. A. (2013). Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Journal of Experimental Botany*, *64*(7), 1863–1878. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert049> PMID:23487304
139. Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W.-S., & Hughes, J. (2014). Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Advances in Virus Research*, *90*, 297–354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8> PMID:25410105
140. Khah, E. M., & Passam, H. C. (1992). Flowering, fruit set and development of the fruit and seed of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivated under conditions of high ambient temperature. *Journal of Horticultural Science*, *67*(2), 251–258. <https://doi.org/10.1080/00221589.1992.11516245>
141. Kim, H. J., Baek, K. H., Lee, S. W., Kim, J., Lee, B. W., Cho, H. S., Kim, W. T., Choi, D., & Hur, C. G. (2008). Pepper EST database: Comprehensive in silico tool for analyzing the chili pepper (*Capsicum annuum*) transcriptome. *BMC Plant Biology*, *8*(1), 101. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-101> PMID:18844979
142. Kim, J. Y., Lee, H. J., Jung, H. J., Maruyama, K., Suzuki, N., & Kang, H. (2010). Overexpression of microRNA395c or 395e affects differently the seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Planta*, *232*(6), 1447–1454. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1267-x> PMID:20839006
143. Kim, S., Park, J., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Seo, E., Kim, K. T., Kim, M. S., Lee, J. M., Cheong, K., Shin, H. S., Kim, S. B., Han, K., Lee, J., Park, M., Lee, H. A., Lee, H. Y., Lee, Y., Oh, S., Lee, J. H., . . . Choi, D. (2017). New reference genome sequences of hot pepper reveal the massive evolution of plant disease-resistance genes by retroduplication. *Genome Biology*, *18*(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1341-9> PMID:29089032
144. Kim, S., Park, M., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Lee, J. M., Lee, H. A., Seo, E., Choi, J., Cheong, K., Kim, K. T., Jung, K., Lee, G. W., Oh, S. K., Bae, C., Kim, S. B., Lee, H. Y., Kim, S. Y., Kim, M. S., Kang, B. C., . . . Choi, D. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*, *46*(3), 270–278. <https://doi.org/10.1038/ng.2877> PMID:24441736
145. Kosuge, S., & Furuta, M. (1970). Studies on the pungent principle of *Capsicum*: Part XIV Chemical Constitution of the Pungent Principle. *Agricultural and Biological Chemistry*, *34*(2), 248–256.
146. Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D68–D73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181> PMID:24275495
147. Kraft, K. H., Brown, C. H., Nabhan, G. P., Luedeling, E., Luna Ruiz, J. J., Coppens d' Eeckenbrugge, G., Hijmans, R. J., & Gepts, P. (2014). Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(17), 6165–6170. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308933111> PMID:24753581
148. Kumagai, M. H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., & Grill, L. K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(5), 1679–1683. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1679> PMID:7878039
149. Kumar, S., Kumar, R., & Singh, J. (2006). Cayenne/American pepper. *Handbook of Herbs and Spices*, 299–312. doi:10.1533/9781845691717.3.299
150. Kurth, E. G., Peremyslov, V. V., Prokhnevsky, A. I., Kasschau, K. D., Miller, M., Carrington, J. C., & Dolja, V. V. (2012). Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine. *Journal of Virology*, *86*(11), 6002–6009.
151. Lee, W. S., Rudd, J. J., & Kanyuka, K. (2015). Virus induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of wheat genes involved in *Zymoseptoria tritici* susceptibility and resistance. *Fungal Genetics and Biology*, *79*, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.006> PMID:26092793

152. Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., ... & Rothan, C. (2005). Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiology*, 139(2), 750-769.
153. Lewandowski, D. J., & Dawson, W. O. (2000). Functions of the 126- and 183-kDa proteins of tobacco mosaic virus. *Virology*, 271, 90–98. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0313> PMID:10814574
154. Li, C., & Zhang, B. (2016). MicroRNAs in control of plant development. *Journal of Cellular Physiology*, 231(2), 303–313. <https://doi.org/10.1002/jcp.25125> PMID:26248304
155. Li, C., Hirano, H., Kasajima, I., Yamagishi, N., & Yoshikawa, N. (2019). Virus-induced gene silencing in chili pepper by apple latent spherical virus vector. *Journal of Virological Methods*, 273, 113711. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113711> PMID:31404574
156. Li, H., Mao, W., Liu, W., Dai, H., Liu, Y., Ma, Y., & Zhang, Z. (2013). Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in wild type and a white-flesh mutant strawberry. *Planta*, 238(4), 695–713. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1917-x> PMID:23807373
157. Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., & Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current Biology*, 15(16), 1501–1507. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.029> PMID:16111943
158. Lim, C. W., & Lee, S. C. (2014). Functional roles of the pepper MLO protein gene, CaMLO2, in abscisic acid signaling and drought sensitivity. *Plant molecular biology*, 85(1-2), 1-10.
159. Lim, J. H., Park, C. J., Huh, S. U., Choi, L. M., Lee, G. J., Kim, Y. J., & Paek, K. H. (2011). Capsicum annum WRKYb transcription factor that binds to the CaPR-10 promoter functions as a positive regulator in innate immunity upon TMV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(3), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.002> PMID:21771584
160. Limaye, V. A., & Patil, V. P. (1989). Karyomorphological studies in the genus Capsicum Linn. *Cytologia*, 54(3), 455-463.
161. Lippert, L. F., Smith, P. G., & Bergh, B. O. (1966). Cytogenetics of the vegetable crops. garden pepper, capsicum sp. *Botanical Review*, 32(1), 24–55. <https://doi.org/10.1007/BF02858584>
162. Liu, C., Ma, N., Wang, P. Y., Fu, N., & Shen, H. L. (2013a). Transcriptome sequencing and de novo analysis of a cytoplasmic male sterile line and its near-isogenic restorer line in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *PLoS One*, 8(6), e65209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065209> PMID:23750245
163. Liu, S., Chen, C., Chen, G., Cao, B., Chen, Q., & Lei, J. (2012). RNA-sequencing tag profiling of the placenta and pericarp of pungent pepper provides robust candidates contributing to capsaicinoid biosynthesis. [PCTOC]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(1), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0135-8>
164. Liu, S., Li, W., Wu, Y., Chen, C., & Lei, J. (2013b). De novo transcriptome assembly in chili pepper (*Capsicum frutescens*) to identify genes involved in the biosynthesis of capsaicinoids. *PLoS One*, 8(1), e48156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048156> PMID:23349661
165. Liu, Y., Schiff, M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, 31(6), 777–786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x> PMID:12220268
166. Liu, Z., Zhang, Y., Ou, L., Kang, L., Liu, Y., Lv, J., Wei, G., Yang, B., Yang, S., Chen, W., Dai, X., Li, X., Zhou, S., Zhang, Z., Ma, Y., & Zou, X. (2017). Identification and characterization of novel microRNAs for fruit development and quality in hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Gene*, 608, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.020> PMID:28122266
167. Loaiza-Figueroa, F., Ritland, K., Cancino, J. A. L., & Tanksley, S. D. (1989). Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 165(3-4), 159–188. <https://doi.org/10.1007/BF00936000>
168. Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology; AMB*, 6(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26> PMID:22115189
169. Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> PMID:25516281
170. Lu, B. Y., Cheng, G. X., Zhang, Z., Sun, J. T., Ali, M., Jia, Q. L., Luo, D.-X., Gong, Z.-H., & Li, D. W. (2019). CaMYC, a novel transcription factor, regulates anthocyanin biosynthesis in color-leaved pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 574–585. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9871-2>
171. Lu, F. H., Cho, M. C., & Park, Y. J. (2012). Transcriptome profiling and molecular marker discovery in red pepper, *Capsicum annum* L. TF68. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 3327–3335. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1102-x> PMID:21706160
172. Luo, S. (2012). MicroRNA expression analysis using the Illumina microRNA-Seq Platform. In *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology* (pp. 183–188). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-427-8_12

173. Ma, X., Gai, W. X., Qiao, Y. M., Ali, M., Wei, A. M., Luo, D. X., Li, Q. H., & Gong, Z. H. (2019). Identification of CBL and CIPK gene families and functional characterization of CaCIPK1 under *Phytophthora capsici* in pepper (*Capsicum annuum* L.). *BMC Genomics*, *20*(1), 775. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6125-z> PMID:31653202
174. Ma, X., Zhang, X., Liu, H., & Li, Z. (2020). Highly efficient DNA-free plant genome editing using virally delivered CRISPR-Cas9. *Nature Plants*, *6*, 773–779. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0704-5> PMID:32601419
175. Marcelis, L. F. M., & Baan Hofman-Eijer, L. R. (1993). Cell-division and expansion in the cucumber fruit. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, *68*, 665–671. <https://doi.org/10.1080/00221589.1993.11516398>
176. Marcelis, L. F. M., & Baan Hofman-Eijer, L. R. (1995). GROWTH ANALYSIS OF SWEET PEPPER FRUITS (*CAPSICUM ANNUUM* L.). *Acta Horticulturae*, *470*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.412.56>
177. Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M., Finnegan, E. J., & Waterhouse, P. M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, *580*(10), 2442–2450. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.072> PMID:16638569
178. Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M., & Gilad, Y. (2008). RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, *18*(9), 1509–1517. <https://doi.org/10.1101/gr.079558.108> PMID:18550803
179. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, *17*(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
180. Martin, R. C., Liu, P. P., Goloviznina, N. A., & Nonogaki, H. (2010). microRNA, seeds, and Darwin?: Diverse function of miRNA in seed biology and plant responses to stress. *Journal of Experimental Botany*, *61*(9), 2229–2234. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq063> PMID:20335408
181. Martínez-López, L. A., Ochoa-Alejo, N., & Martínez, O. (2014). Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development. *BMC Genomics*, *15*(1), 143. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-143> PMID:24555715
182. Martín-Hernández, A. M., & Baulcombe, D. C. (2008). Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *Journal of Virology*, *82*(8), 4064–4071. <https://doi.org/10.1128/JVI.02438-07> PMID:18272576
183. Marton, I., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., Ovadis, M., Tzfira, T., & Vainstein, A. (2010). Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiology*, *154*(3), 1079–1087. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164806> PMID:20876340
184. Mathioni, S. M., Kakrana, A., & Meyers, B. C. (2017). Characterization of plant small RNAs by next generation sequencing. *Current Protocols in Plant Biology*, *2*(1), 39–63. <https://doi.org/10.1002/cppb.20043> PMID:31725976
185. Matsumoto, K., Chun, J. P., Nakata, N., & Tamura, F. (2008). Rapid mesocarp cell elongation enhances gumming syndrome in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) fruit. *Journal of Food Quality*, *31*, 205–215. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00193.x>
186. Matthews, R. E. F., & Hull, R. (2002). Matthews' plant virology. Gulf Professional Publishing.
187. Mayer, A. (1886). Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Landwirtsch. Vers. Sta.*, *32*, 451–467.
188. McKinney, H. H. (1929). Mosaic diseases in Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research*, *39*, 557–558.
189. McKinney, H. H. (1952). Two strains of tobacco mosaic virus, one of which is seed-borne in an etch-immune pungent pepper. *The Plant Disease Reporter*, *36*, 184–187.
190. McLeod, M. J., Guttman, S. I., Eshbaugh, W. H., & Rayle, R. E. (1983). An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, *37*, 562–574. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1983.tb05573.x> PMID:28563296
191. Meyers, B. C., Axtell, M. J., Bartel, B., Bartel, D. P., Baulcombe, D., Bowman, J. L., Cao, X., Carrington, J. C., Chen, X., Green, P. J., Griffiths-Jones, S., Jacobsen, S. E., Mallory, A. C., Martienssen, R. A., Poethig, R. S., Qi, Y., Vaucheret, H., Voinnet, O., Watanabe, Y., . . . Zhu, J. K. (2008). Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *The Plant Cell*, *20*(12), 3186–3190. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064311> PMID:19074682
192. Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., & Thomas, P. D. (2019). PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D419–D426. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1038> PMID:30407594
193. Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G. J., & Qi, Y. (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, *133*(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.034> PMID:18342361
194. Mohorianu, I., Schwach, F., Jing, R., Lopez-Gomollon, S., Moxon, S., Szittyá, G., Sorefan, K., Moulton, V., & Dalmay, T. (2011). Profiling of short RNAs during fleshy fruit development reveals stage-specific sRNAome

- expression patterns. *The Plant Journal*, 67(2), 232–246. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04586.x> PMID:21443685
195. Molnár, V., Beáta, B., Hargita, H., & András, F. (2008). Nem kódoló genom és mikro-RNS-ek: Új fejezet a genetika történetében. *Lege Artis Medicinæ*, 18(8-9), 591–597.
196. Morozov SYU., Denisenko, O. N., Zelenina, D. A., Fedorkin, O. N., Solovyev, A. G., Maiss, E., Casper, R., & Atabekov, J. G. (1993). A novel open reading frame in tobacco mosaic virus genome coding for a putative small, positively charged protein. *Biochimie*, 75(8), 659–665. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(93\)90096-B](https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90096-B) PMID:8286438
197. Moscone, E. A., Lambrou, M., Hunziker, A. T., & Ehrendorfer, F. (1993). Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 186(3-4), 213–229. <https://doi.org/10.1007/BF00940799>
198. Moxon, S., Jing, R., Szittyá, G., Schwach, F., Rusholme Pilcher, R. L., Moulton, V., & Dalmay, T. (2008a). Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome Research*, 18(10), 1602–1609. <https://doi.org/10.1101/gr.080127.108> PMID:18653800
199. Moxon, S., Schwach, F., Dalmay, T., Maclean, D., Studholme, D. J., & Moulton, V. (2008b). A toolkit for analysing large-scale plant small RNA datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(19), 2252–2253. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn428> PMID:18713789
200. Mueller, E., Gilbert, J., Davenport, G., Brigneti, G., & Baulcombe, D. C. (1995). Homology-dependent resistance: Transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *The Plant Journal*, 7(6), 1001–1013. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.07061001.x>
201. Munting, A. J. (1974). Development of flower and fruit of *Capsicum annuum* L. *Acta Botanica Neerlandica*, 23(4), 415–432. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1974.tb00959.x>
202. Nabhan, G. P. (1985). *Gathering the Desert*. Tucson. University of Arizona Press. 1985b Native crop diversity in Aridoamerica: Conservation of regional gene pools. *Economic Botany*, 39, 387–399. <https://doi.org/10.1007/BF02858746>
203. Nag, A., King, S., & Jack, T. (2009). miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22534–22539.
204. Nagy, Z., Daood, H., Ambrózy, Z., & Helyes, L. (2015). Determination of polyphenols, capsaicinoids, and vitamin C in new hybrids of chili peppers. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 102125. <https://doi.org/10.1155/2015/102125> PMID:26495153
205. Naing, A. H., Kyu, S. Y., Pe, P. P. W., Park, K. I., Lee, J. M., Lim, K. B., & Kim, C. K. (2019b). Silencing of the phytoene desaturase (*PDS*) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes. *Plant Methods*, 15(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0491-z> PMID:31592162
206. Naing, A. H., Song, H. Y., Lee, J. M., Lim, K. B., & Kim, C. K. (2019a). Development of an efficient virus-induced gene silencing method in petunia using the pepper phytoene desaturase (*PDS*) gene. [PCTOC]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 138(3), 507–515. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01646-y>
207. Nakanishi, K. (2016). Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins?. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 7(5), 637–660.
208. Naves, E. R., de Ávila Silva, L., Sulpice, R., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Peres, L. E. P., & Zsögön, A. (2019). Capsaicinoids: Pungency beyond *Capsicum*. *Trends in Plant Science*, 24(2), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.001> PMID:30630668
209. Nemes, K., & Salánki, K. (2020). A multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of prevalent viruses infecting pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Virological Methods*, 278, 113838. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113838> PMID:32061842
210. Nielsen, T. H., Skjærbae, H. C., & Karlsen, P. (1991). Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Physiologia Plantarum*, 82(2), 311–319. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00099.x>
211. Nitsch, J. P. (1970). *The biochemistry of fruits and their products* (Vol. 2). Academic Press.
212. Nixon, H. L., & Harrison, B. D. (1959). Electron microscopic evidence on the structure of the particles of tobacco rattle virus. *Microbiology*, 21(3), 582–590. <https://doi.org/10.1099/00221287-21-3-582> PMID:14427402
213. Nyakas, A. (2006) A növényi szövetek szövettana, in: Turcsányi: Mezőgazdasági növénytan, Szaktudás Kiadóház, Budapest, 2006, p. 106–114.
214. Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M., & Lai, E. C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.028> PMID:17599402

215. Ortiz, R., de la Flor, F. D., Alvarado, G., & Crossa, J. (2010). Classifying vegetable genetic resources—A case study with domesticated *Capsicum* spp. *Scientia Horticulturae*, *126*(2), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.007>
216. Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W. H., & Granell, A. (2006). Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology*, *140*, 3–11. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068221> PMID:16403736
217. Osorio-Guarín, J. A., García-Arias, F. L., Yockteng, R., & Salcedo-Reyes, J. C. (2019). Virus-induced gene silencing (VIGS) in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L., Solanaceae). *Universitas Scientiarum*, *24*(1), 111–133. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC24-1.vigs>
218. Oyama, K., Hernandez-Verdugo, S., Sanchez, C., González-Rodríguez, A., Sanchez-Pena, P., Garzon-Tiznado, J. A., & Casas, A. (2006). Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *53*(3), 553–562. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-2363-1>
219. Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, *425*(6955), 257–263. <https://doi.org/10.1038/nature01958> PMID:12931144
220. Pall, G. S., & Hamilton, A. J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nature Protocols*, *3*(6), 1077–1084. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.67> PMID:18536652
221. Panno, S., Caruso, A. G., Blanco, G., & Davino, S. (2020). First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting sweet pepper in Italy. *New Disease Reports*, *41*, 20. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.020>
222. Paran, I., & van der Knaap, E. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*, *58*(14), 3841–3852. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm257> PMID:18037678
223. Parent, J. S., Martínez de Alba, A. E., Vaucheret, H., & Vaucheret, H. (2012). The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 179. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00179> PMID:22908024
224. Park, M. Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., & Poethig, R. S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(10), 3691–3696.
225. Pereira-Dias, L., Vilanova, S., Fita, A., Prohens, J., & Rodríguez-Burruezo, A. (2019). Genetic diversity, population structure, and relationships in a collection of pepper (*Capsicum* spp.) landraces from the Spanish centre of diversity revealed by genotyping-by-sequencing (GBS). *Horticulture Research*, *6*(1), 54. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0132-8> PMID:31044080
226. Pernezny, K. L., Roberts, P. D., Murphy, J. F., & Goldberg, N. P. (Eds.). (2003). *Compendium of pepper diseases*. APS Press.
227. Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., ... & Raymond, J. S. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *science*, *315*(5814), 986–988.
228. Pérez-Pastrana, J., Islas-Flores, I., Bárány, I., Álvarez-López, D., Canto-Flick, A., Canto-Canché, B., ... & Santana-Buzzy, N. (2018). Development of the ovule and seed of Habanero chili pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Anatomical characterization and immunocytochemical patterns of pectin methyl-esterification. *Journal of plant physiology*, *230*, 1–12.
229. Pflieger, S., Blanchet, S., Camborde, L., Drugeon, G., Rousseau, A., Noizet, M., Planchais, S., Jupin, I. (2008). Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a 'one-step' TYMV-derived vector. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *56*, 678–690
230. Pickersgill, B. (1971). Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, *25*(4), 683–691. PMID:28564789
231. Pickersgill, B. (1977). Chromosomes and evolution in *Capsicum*. *Capsicum* *77*.
232. Pickersgill, B. (1988). The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. No. RESEARCH.
233. Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, *96*(1), 129–133. <https://doi.org/10.1023/A:1002913228101>
234. Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany*, *100*(5), 925–940. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm193> PMID:17766847
235. Pickersgill, B. (1991). Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*, part B. Elsevier.
236. Pozzobon, M. T., Schifino-Wittmann, M. T., & De Bem Bianchetti, L. (2006). Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: Do $x=12$ and $x=13$ represent two evolutionary lines? *Botanical Journal of the Linnean Society*, *151*(2), 259–269. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00503.x>

237. Pretel, M. T., Serrano, M., Amoros, A., Riquelme, F., & Romajoro, F. (1995). Non-involvement of ACC and ACC oxidase activity in pepper fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, *5*, 295–302. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(94\)00025-N](https://doi.org/10.1016/0925-5214(94)00025-N)
238. Prince, J. P., Loaiza-Figueroa, F., & Tanksley, S. D. (1992). Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of Capsicum. *Genome*, *35*(5), 726–732. <https://doi.org/10.1139/g92-112>
239. Prüfer, K., Stenzel, U., Dannemann, M., Green, R. E., Lachmann, M., & Kelso, J. (2008). PatMaN: Rapid alignment of short sequences to large databases. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *24*(13), 1530–1531. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn223> PMID:18467344
240. Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., Cheng, J., Zhao, S., Xu, M., Luo, Y., Yang, Y., Wu, Z., Mao, L., Wu, H., Ling-Hu, C., Zhou, H., Lin, H., González-Morales, S., Trejo-Saavedra, D. L., . . . Zhang, Z. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into Capsicum domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(14), 5135–5140. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400975111> PMID:24591624
241. Qin, L., Mo, N., Zhang, Y., Muhammad, T., Zhao, G., Zhang, Y., & Liang, Y. (2017). CaRDR1, an RNA-dependent RNA polymerase plays a positive role in pepper resistance against TMV. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01068> PMID:28702034
242. Quan Yu, J., Li, Y., Qian, Y. R., & Zhu, Z. J. (2001). Cell division and cell enlargement in fruit of Lagenaria leucantha as influenced by pollination and plant growth substances. *Journal of Plant Growth Regulation*, *33*, 117–122. <https://doi.org/10.1023/A:1017502816250>
243. Rai, V. P., Kumar, R., Kumar, S., Rai, A., Kumar, S., Singh, M., Singh, S. P., Rai, A. B., & Paliwal, R. (2013). Genetic diversity in Capsicum germplasm based on microsatellite and random amplified microsatellite polymorphism markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *19*(4), 575–586. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0185-3> PMID:24431527
244. Rast, A. Th. B. (1979). Pepper strains of TMV in the Netherlands. *Med. Fac. Landb. Wet. Rijksuvin. Gent.*, *44*, 617–622.
245. Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M., & Baulcombe, D. C. (2001). Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, *25*(2), 237–245. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x> PMID:11169199
246. Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development*, *16*(13), 1616–1626.
247. Reyes-Escogido, M. L., Gonzalez-Mondragon, E. G., & Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *16*(2), 1253–1270. <https://doi.org/10.3390/molecules16021253> PMID:21278678
248. Ripoll, J., Bailey, L. J., Mai, Q. A., Wu, S. L., Hon, C. T., Chapman, E. J., Ditta, G. S., Estelle, M., & Yanofsky, M. F. (2015). microRNA regulation of fruit growth. *Nature Plants*, *1*(4), 15036. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.36> PMID:27247036
249. Robinson, D. J., & Harrison, B. D. (1989). Tobacco rattle virus. AAB Descriptions of Plant viruses, 346(6).
250. Rodriguez, J. M., Berke, T., Engle, L., & Nienhuis, J. (1999). Variation among and within Capsicum species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *99*(1-2), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s001220051219>
251. Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, *25*(7), 2383–239
252. Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: Transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, *6*(22), 3343–3353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x> PMID:1484489
253. Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y. W., Ruan, Y., & Breitbart, M. (2009). Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environmental Microbiology*, *11*(11), 2806–2820. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01964.x> PMID:19555373
254. Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, *448*(7149), 83–86. <https://doi.org/10.1038/nature05983> PMID:17589500
255. Ruiz, M. T., Voinnet, O., & Baulcombe, D. C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell*, *10*(6), 937–946. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.937> PMID:9634582
256. Rylski, I. (1986). Pepper (capsicum). CRC handbook of fruit set and development, 341–354.
257. Rylski, I., & Spigelman, M. (1982). Effects of different diurnal temperature combinations on fruit set of sweet pepper. *Scientia Horticulturae*, *17*(2), 101–106. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(82\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(82)90001-2)
258. Salamon, P., & Némethy, Zs. (1988). Identification, some properties of and distribution of odontoglossum ring spot virus in Hungary. Abst. 5th Internat. Congress of Plant Pathology. Kyoto, Japan. 1988. August. 20–27. P. 1–35.

259. Salamon, P., Beczner, L., & Hamilton, R. I. (1987): Dulcamara yellow fleck virus (DYFV): a new member of the tobamovirus group isolated in Hungary. VIIth International Congress of Virology. Edmonton, National Res. Council, Ottawa, Canada, pp. 329.
260. Saltveit, M. E., Jr. (1977). Carbon dioxide, ethylene, and color development in ripening mature green bell peppers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*.
261. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
262. Schmelzer, K. (1957). Untersuchungen über den Wirtspflanzenkreis des Tabakmauche-Virus. *Phytopathologische Zeitschrift*, 30, 281–314.
263. Scoville, W. L. (1912). Note on Capsicums. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 1(5), 453–454. <https://doi.org/10.1002/jps.3080010520>
264. Senthil-Kumar, M., Ajith, A., Uppalapati, S. R., & Mysore, K. S. (2008). Virus-induced gene silencing and its applications. *CAB Rev Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Res*, 3, 1–18.
265. Seymour, G. B., Taylor, J. E., & Tucker, G. A. (Eds.). (1993). *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman & Hall. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1584-1>
266. Sha, A., Zhao, J., Yin, K., Tang, Y., Wang, Y., Wei, X., Hong, Y., & Liu, Y. (2014). Virus-based microRNA silencing in plants. *Plant Physiology*, 164(1), 36–47. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231100> PMID:24296072
267. Shi, J., Choi, D., Kim, B. D., & Kang, B. C. (2008). Study on inheritance of Potato virus X Resistance in *Capsicum annuum*. *Plant Pathology Journal*, 24, 433–438. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2008.24.4.433>
268. Shulaev, V., Sargent, D. J., Crowhurst, R. N., Mockler, T. C., Folkerts, O., Delcher, A. L., Jaiswal, P., Mockaitis, K., Liston, A., Mane, S. P., Burns, P., Davis, T. M., Slovin, J. P., Bassil, N., Hellens, R. P., Evans, C., Harkins, T., Kodira, C., Desany, B., . . . Folta, K. M. (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, 43(2), 109–116. <https://doi.org/10.1038/ng.740> PMID:21186353
269. Sierró, N., Battey, J. N., Ouali, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M. C., & Ivanov, N. V. (2014). The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications*, 5, 3833. <https://doi.org/10.1038/ncomms4833> PMID:24807620
270. Silva, L. R., Azevedo, J., Pereira, M. J., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2013). Chemical assessment and antioxidant capacity of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.036> PMID:23238236
271. Simms, D., Cizdziel, P. E., & Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus (San Francisco, Calif.)*, 15(4), 532–535.
272. Singh, A., Gautam, V., Singh, S., Sarkar Das, S., Verma, S., Mishra, V., Mukherjee, S., & Sarkar, A. K. (2018). Plant small RNAs: Advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta*, 248(3), 545–558. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2927-5> PMID:29968061
273. Singh, R. K., Gase, K., Baldwin, I. T., & Pandey, S. P. (2015). Molecular evolution and diversification of the Argonaute family of proteins in plants. *BMC Plant Biology*, 15(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0364-6> PMID:25626325
274. Slezák, K. A. (2001). Fehér termésű paprika sóútérése (Doctoral dissertation, Szent István Egyetem).
275. Smith, C. J. S., Watson, C. F., Bird, C. R., Ray, J., Schuch, W., & Grierson, D. (1990). Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Molecular and General Genetics MGG*, 224(3), 477–481. <https://doi.org/10.1007/BF00262443> PMID:2266949
276. Smith, K. M. (1931). On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 109(762), 251–267. <https://doi.org/10.1098/rspb.1931.0080>
277. Smith, P. G., & Heiser, C. B., Jr. (1951). Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. *American Journal of Botany*, 38, 362–368. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1951.tb14835.x>
278. Soni, N. K. (2010). *Fundamentals of botany* (Vol. 2). Tata McGraw-Hill Education.
279. Souza-Macedo, V. D., García-Dávila, M. A., Castro, G. R. D., Garzón-Bautista, Y. M., & Caetano, C. M. (2017). Cytogenetic evaluation of chili (*Capsicum* spp., Solanaceae) genotypes cultivated in Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronomica*, 66(4), 612–617. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n4.59162>
280. Spence, N. J., Sealy, I., Mills, P. R., & Foster, G. D. (2001). Characterisation of a tobamovirus from trailing petunias. *European Journal of Plant Pathology*, 107(6), 633–638. <https://doi.org/10.1023/A:1017980712521>
281. Stocks, M. B., Moxon, S., Mapleson, D., Woolfenden, H. C., Mohorianu, I., Folkes, L., Schwach, F., Dalmay, T., & Moulton, V. (2012). The UEA sRNA workbench: A suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(15), 2059–2061. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts311> PMID:22628521

282. Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences.
283. Sulzinski, M. A., Gabard, K. A., Palukaitis, P., & Zaitlin, M. (1985). Replication of tobacco mosaic virus. VIII. Characterization of a third subgenomic TMV RNA. *Virology*, *145*(1), 132–140. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90208-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90208-9) PMID:18640547
284. Sunkar, R., Li, Y. F., & Jagadeeswaran, G. (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, *17*(4), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.010> PMID:22365280
285. Taitano, N., Bernau, V., Jardón-Barbolla, L., Leckie, B., Mazourek, M., Mercer, K., McHale, L., Michel, A., Baumler, D., Kantar, M., & van der Knaap, E. (2018). Genome-wide genotyping of a novel Mexican Chile Pepper collection illuminates the history of landrace differentiation after *Capsicum annuum* L. domestication. *Evolutionary Applications*, *12*(1), 78–92. <https://doi.org/10.1111/eva.12651> PMID:30622637
286. Taller, D., Bálint, J., Gyula, P., Nagy, T., Barta, E., Baksa, I., ... & Havelda, Z. (2018). Expansion of *Capsicum annuum* fruit is linked to dynamic tissue-specific differential expression of miRNA and siRNA profiles. *PLoS one*, *13*(7), e0200207.
287. Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, *17*(1), 49–63. <https://doi.org/10.1101/gad.1048103> PMID:12514099
288. Tanksley, S. D., & McCouch, S. R. (1997). Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science*, *277*(5329), 1063–1066. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1063> PMID:9262467
289. Tewksbury, J. J., & Nabhan, G. P. (2001). Seed dispersal. Directed deterrence by capsaicin in chilies. *Nature*, *412*(6845), 403–404. <https://doi.org/10.1038/35086653> PMID:11473305
290. Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., Maule, A.J. (2001). Size constraints for targeting posttranscriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *25*, 417-425.
291. Tian, S. L., Li, L., Chai, W. G., Shah, S. N. M., & Gong, Z. H. (2014). Effects of silencing key genes in the capsanthin biosynthetic pathway on fruit color of detached pepper fruits. *BMC plant biology*, *14*(1), 1-12.
292. Tiwari, A., Vivian-Smith, A., Ljung, K., Offringa, R., & Heuvelink, E. (2013). Physiological and morphological changes during early and later stages of fruit growth in *Capsicum annuum*. *Physiologia Plantarum*, *147*(3), 396–406. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01673.x> PMID:22889158
293. Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, *485*(7400), 635–641. <https://doi.org/10.1038/nature11119> PMID:22660326
294. Tong, N. (1997). Meiotic chromosome study of *Capsicum lanceolatum*, another 13 chromosome species. *Capsicum Eggplant Newsl.*, *16*, 42–43.
295. Tong, N., & Bosland, P. W. (2003). Observations on interspecific compatibility and meiotic chromosome behavior of *Capsicum buforum* and *C. lanceolatum*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *50*(2), 193–199. <https://doi.org/10.1023/A:1022986615694>
296. Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., ... & Schein, J. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *science*, *313*(5793), 1596-1604.
297. ul Haq, S., Khan, A., Ali, M., Gai, W. X., Zhang, H. X., Yu, Q. H., ... & Gong, Z. H. (2019). Knockdown of CaHSP60-6 confers enhanced sensitivity to heat stress in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Planta*, *250*(6), 2127-2145.
298. Uschdraweit, H. A., & Valentin, H. (1956). Das tabakmauchevirus an zierpflanzen. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)*, *8*, 132.
299. Válóczy, A., Várallyay, E., Kauppinen, S., Burgyán, J., & Havelda, Z. (2006). Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *The Plant Journal*, *47*(1), 140–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02766.x> PMID:16824182
300. van Belkum, A., Cornelissen, B., Linthorst, H., Bol, J., Pley, C., & Bosch, L. (1987). tRNA-like properties of tobacco rattle virus RNA. *Nucleic Acids Research*, *15*(7), 2837–2850. <https://doi.org/10.1093/nar/15.7.2837> PMID:3645545
301. van der Krol, A. R., & Immink, R. G. (2016). Secrets of the world’s most popular bedding plant unlocked. *Nature Plants*, *2*, 16082. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.82> PMID:27255845
302. van der Krol, A. R., Lenting, P. E., Veenstra, J., van der Meer, I. M., Koes, R. E., Gerats, A. G., Mol, J. N. M., & Stuitje, A. R. (1988). An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*, *333*(6176), 866–869. <https://doi.org/10.1038/333866a0>
303. van Kammen, A. (1997). Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science*, *2*(11), 409-411.
304. Várallyay, E., Burgyán, J., & Havelda, Z. (2008). MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nature Protocols*, *3*(2), 190–196. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.528> PMID:18274520

305. Várallyay, É., Oláh, E., & Havelda, Z. (2014). Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 599–608. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt846> PMID:24062160
306. Varga, A., & Bruinsma, J. (1976). Roles of seeds and auxins in tomato fruit growth. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 80(2), 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(76\)80146-8](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(76)80146-8)
307. Vaucheret, H. (2008). Plant argonauts. *Trends in plant science*, 13(7), 350–358.
308. Vazquez, F. (2006). Arabidopsis endogenous small RNAs: Highways and byways. *Trends in Plant Science*, 11(9), 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.07.006> PMID:16893673
309. Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S. K., Troggo, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., . . . Viola, R. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42(10), 833–839. <https://doi.org/10.1038/ng.654> PMID:20802477
310. Velásquez, A. C., Chakravarthy, S., & Martin, G. B. (2009). Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. [Journal of Visualized Experiments]. *JoVE*, (28), e1292. PMID:19516240
311. Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669–687.
312. Votava, E. J., Nabhan, G. P., & Bosland, P. W. (2002). Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an in situ population and ex situ accessions of chil' Tepin' (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Conservation Genetics*, 3(2), 123–129. <https://doi.org/10.1023/A:1015216504565>
313. Wang, J. E., Li, D. W., Gong, Z. H., & Zhang, Y. L. (2013). Optimization of virus-induced gene silencing in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 2492–2506. <https://doi.org/10.4238/2013.July.24.4> PMID:23979884
314. Watkins, J. T., & Cantliffe, D. J. (1983). Mechanical Resistance of the Seed Coat and Endosperm during Germination of *Capsicum annuum* at Low Temperature. *Plant Physiology*, 72(1), 146–150. <https://doi.org/10.1104/pp.72.1.146> PMID:16662948
315. Wetter, C. (1986). Ribgrass mosaic virus. In *The plant viruses* (pp. 221–232). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7026-0_11
316. Wu, J., Wang, D., Liu, Y., Wang, L., Qiao, X., & Zhang, S. (2014). Identification of miRNAs involved in pear fruit development and quality. *BMC Genomics*, 15(1), 953. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-953> PMID:25366381
317. Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., & Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2(5), E104. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020104> PMID:15024409
318. Xin, C., Liu, W., Lin, Q., Zhang, X., Cui, P., Li, F., Zhang, G., Pan, L., Al-Amer, A., Mei, H., Al-Mssallem, I. S., Hu, S., Al-Johi, H. A., & Yu, J. (2015). Profiling microRNA expression during multi-staged date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit development. *Genomics*, 105(4), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.01.004> PMID:25638647
319. Xu, H., Xu, L., Yang, P., Cao, Y., Tang, Y., He, G., Yuan, S., & Ming, J. (2018). Tobacco rattle virus-induced *PHYTOENE DESATURASE* (*PDS*) and *Mg-chelatase H subunit* (*ChlH*) gene silencing in *Solanum pseudocapsicum* L. *PeerJ*, 6, e4424. <https://doi.org/10.7717/peerj.4424> PMID:29576941
320. Xu, Q., Liu, Y., Zhu, A., Wu, X., Ye, J., Yu, K., Guo, W., & Deng, X. (2010). Discovery and comparative profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type. *BMC Genomics*, 11(1), 246. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-246> PMID:20398412
321. Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., Orjeda, G., Guzman, F., Torres, M., Lozano, R., Ponce, O., Martinez, D., De la Cruz, G., Chakrabarti, S. K., Patil, V. U., . . . Visser, R. G., & the Potato Genome Sequencing Consortium. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), 189–195. <https://doi.org/10.1038/nature10158> PMID:21743474
322. Yadegari, R., & Drews, G. N. (2004). Female gametophyte development. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S133–S141.
323. Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., & Huang, H. (2006). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 47(6), 841–850.
324. Yang, X., & Li, L. (2011). miRDeep-P: A computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plants. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(18), 2614–2615. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr430> PMID:21775303
325. Yanik, H., Turktas, M., Dundar, E., Hernandez, P., Dorado, G., & Unver, T. (2013). Genome-wide identification of alternate bearing-associated microRNAs (miRNAs) in olive (*Olea europaea* L.). *BMC Plant Biology*, 13(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-10> PMID:23320600
326. Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R., & Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307(5711), 932–935. <https://doi.org/10.1126/science.1107130> PMID:15705854

327. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, *101*(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0) PMID:10778853
328. Zatykó, L. (2006). Pepper (*Capsicum annum*L.) breeding methods at the turn of the century. *Acta Agronomica Hungarica*, *54*(2), 179–202. <https://doi.org/10.1556/AAgr.54.2006.2.7>
329. Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006b). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal*, *46*(2), 243–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02697.x> PMID:16623887
330. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006a). Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology*, *289*(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.10.036> PMID:16325172
331. Zhang, X., Zou, Z., Zhang, J., Zhang, Y., Han, Q., Hu, T., Xu, X., Liu, H., Li, H., & Ye, Z. (2011). Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. *FEBS Letters*, *585*(2), 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.036> PMID:21187095
332. Zhigila, D., Abdulrahman, A.-A., Kolawole, O. S., & Oladele, F. (2014). Research Article Fruit Morphology as Taxonomic Features in Five Varieties of *Capsicum annum* L. Solanaceae. *Le Journal de Botanique*, *2014*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1155/2014/540868>
333. Zou, Y., Ma, K., & Tian, M. (2015). Chemical composition and nutritive value of hot pepper seed (*Capsicum annum*) grown in Northeast Region of China. *Food Science and Technology (Campinas)*, *35*(4), 659–663. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6803>
334. Zuo, J., Zhu, B., Fu, D., Zhu, Y., Ma, Y., Chi, L., Ju, Z., Wang, Y., Zhai, B., & Luo, Y. (2012). Sculpting the maturation, softening and ethylene pathway: The influences of microRNAs on tomato fruits. *BMC Genomics*, *13*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-7> PMID:22230737

10.2. Publikációs jegyzék

Előadások idegen nyelven

1. **Taller Denes, Bálint Jeannette, Nagy Tibor, Endre Barta, Éva Várallyay, Zoltán Havelda (2015): Genome wide investigation of differential expression of sweet pepper (*Capsicum annuum*) micro RNAs during fruit development. HUNGARIAN MOLECULAR LIFE SCIENCES 2015, Eger (Hungary), p. 233**
2. **Bálint, Jeannette ; Gyula, Péter ; Taller, Dénes ; Dalmadi, Ágnes ; Hamar, Éva ; Kis, András ; Szittyá, György ; Várallyay, Éva ; Taller, János ; Havelda, Zoltán (2017): Investigation of the regulation and activity of RNA interference executor complexes in model and crop plants In: Molekuláris Élettudományi Konferencia 2017(2017) p. 171**

Idegen nyelvű impakt faktoros cikk

3. **E. Oláh, R. Pesti, D. Taller, Z. Havelda, É. Várallyay (2016): Non-targeted effects of virus-induced gene silencing vectors on host endogenous gene expression. Archives of Virology (2016) 161:2387–2393 DOI 10.1007/s00705-016-2921-9**
4. **Hegedűs A.*, Taller D.*, Papp N., Szikriszt B., Ercsli S., Halász J., Stefanovits-Bányai É. (2013): Fruit antioxidant capacity and self-incompatibility genotype of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars highlight their breeding prospects Euphytica, Vol. 191, Issue 1, pp 153-164.**
5. **Taller, D., Bálint, J., Gyula, P., Nagy, T., Barta, E., Baksa, I., ... & Havelda, Z. (2018). Expansion of *Capsicum annuum* fruit is linked to dynamic tissue-specific differential expression of miRNA and siRNA profiles. PloS one, 13(7), e0200207.**
6. **Taller, D., Bálint, J., Gyula, P., Nagy, T., Barta, E., Baksa, I., ... & Havelda, Z. (2018). Correction: Expansion of *Capsicum annuum* fruit is linked to dynamic tissue-specific differential expression of miRNA and siRNA profiles. PloS one, 13(8), e0203582.**

Előadások magyar nyelven

7. Taller D., Bálint J., Nagy T., Várallyay É., Havelda Z., MikroRNS-ek azonosítása a paprika (*Capsicum annuum*) termésfejlődése során, PSAK XII. Pro Scientia Aranyérmesek XII. konferenciája. Absztraktkötet. pp: 35.
8. Taller D., Bálint J., Nagy T., Várallyay É., Havelda Z., *Capsicum annuum* szabályozó kisRNS-ek azonosítása új generációs szekvenálással, MBK napok 2014, Gödöllő
9. Taller D., Bálint J., Nagy T., Taller J., Barta E., Várallyay É., Havelda Z., Termésspecifikus mikroRNS-ek azonosítása paprikában, Magyar Növénybiológiai Társaság Fialat Növénybiológusok 2015 Konferenciája, 2015. február 6. Pécs
10. Taller D., Bálint J. Havelda Z., A paprika genomszintű megismerése új generációs szekvenálási módszerekkel, Innovatív Kertészeti Kutatások a Pannon Régióban című MTA PAB Kertészeti Munkabizottsága tudományos ülése, 2014. május 14., Keszthely
11. Taller D. Az RNS-ek titokzatos világa, célkeresztben a paprika mikroRNS-ek! Festetics Imre Mezőgazdasági Biotechnológia Szakkollégium, 2013. 12.03., Gödöllő.
12. Oláh E, Pesti R, Taller D, Várallyay É, Havelda Z, Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája 2014 március 7., Szeged
13. Oláh E., Pesti R., Taller D., Havelda Z., Várallyay É. (2014): Vannak-e a VIGS-nek nem kívánt mellékhatásai? (2014) előadás: MBK Napok, 2014, Gödöllő, 2014. 12. 11.

Magyar nyelvű előadás teljes terjedelemben megjelentetve

14. Taller Dénes, Bálint Jeannette, Nagy Tibor, Várallyay Éva, Havelda Zoltán, MikroRNS-ek azonosítása a paprika (*Capsicum annuum*) termésfejlődése során, PSAK XII. Pro Scientia Aranyérmesek XII. konferenciája. Tanulmánykötet. Líceum Kiadó 2015. pp: 134-138.

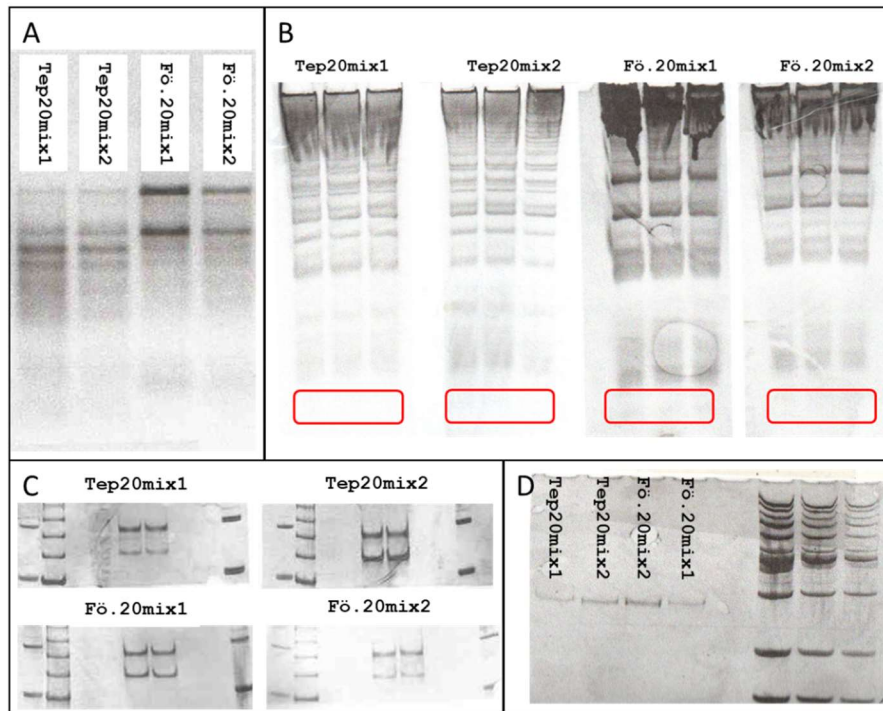
Magyar nyelvű szakcikk

15. Bálint Jeannette , Kis András , Taller Dénes , Nagy Tibor , Barta Endre , Molnár János, Tusnády E. Gábor, Marincs Ferenc és Havelda Zoltán.(2015), Az RNS-interferencia szerepe a növények patogénekkal szembeni védekezésében és a fejlődésbiológiai folyamatokban, Növényvédelem 51 (12), 2015 p. 539-549.

Magyar nyelvű ismeretterjesztő cikk

16. Oláh E, Taller D, Várallyay É, Vírusok a biológia szolgálatában, TermészetBúvár 2014/5 12-14.

10.3. Mellékelt ábrák



1. Mellékelt ábra A könyvtárkészítés folyamatának 4 példán való bemutatása lépésről-lépésre. **A:** RNS-kivonás után az RNS-ek minőségellenőrzése gélelektroforézissel. **B:** RNS-kivonatok futtatása a kisRNS-frakció izolálásához. (Pirossal jelölve az izolálendő gélrészek) **C:** Az elkészült kisRNS-könyvtárak futtatása méretellenőrzés és gélből kivágással való visszaizolálásához. **D:** A gélből visszanyert kisRNS-könyvtárak és a koncentráció ellenőrzése marker hígítási sor segítségével.

```

ANNCCNNNNNTAGGGCGATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATCTTCTCTGCAAGCAGTTGCCACGGGCG
CCAATGCTGCACAAGCCAGCATGATTGCATCCTTCAATGGCCCTTAAATCCGCAGCCCTTTCCTGTTACAAGAAAGCAAGACCTTGACATCACCTCCATTGCTAGCAATGGTG
GAAGAGTCCAATGCATGCTGGTATGGCCACCAATTAACAAGAAGAAGTACGAGACTTTTACCTTCTGATTTGTCCGACGAGCAATTGCTCAAGGAAATGAGTACCTT
TTGCAAAAGGGATGGGTTCTTGTGGAAATCGAGACTGAGCACGGATTTGTACCGTGAGCACCACAGGTCACCTGGATACTACGATGGCAGGTAAGTGGACCATGTGG
AAGTTGCCATGTTCCGGGTACTGATGCTACCCAGGTCTTGAATGAAGTCCAGGAGGCAAAAGAGGCTTACCCACAGGCTGGATCCGTATCATCGGATTCGACAAACGTGC
GTCAAGTGATCAAGCTTATCGATACCGTGCACCTCGAGGGGGGGCCGGTACCCAGCTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
TGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCAAAATCCACACAACATACGAGCCGGGAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATGGCG
TTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCCGGAAACCTGTCTGCGAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGATTTGGGCGCTCTCCGCTTCTC
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAANCGCGGTAATANNNTTATCCACAGAATCANNGGGATAACGCNNNAAAGAAC
ATGTGAGCAAAANGCCAGCAAANNCCAGGAANCGTAAAGCNCNNNTTGGCGTTTTNNNNNNNTCCNNCCCNACGAANNATCNAANNCCNNNNNNNNAN
NCCNNNNNNNNNNNNNNNAANNCCNCNCN

```

2. Mellékelt ábra A *RUBISCO* mRNS-ek kimutatásához felszaporított szakasz szekvenálási eredménye.

B.

Blast: 75-574 Solanaceae

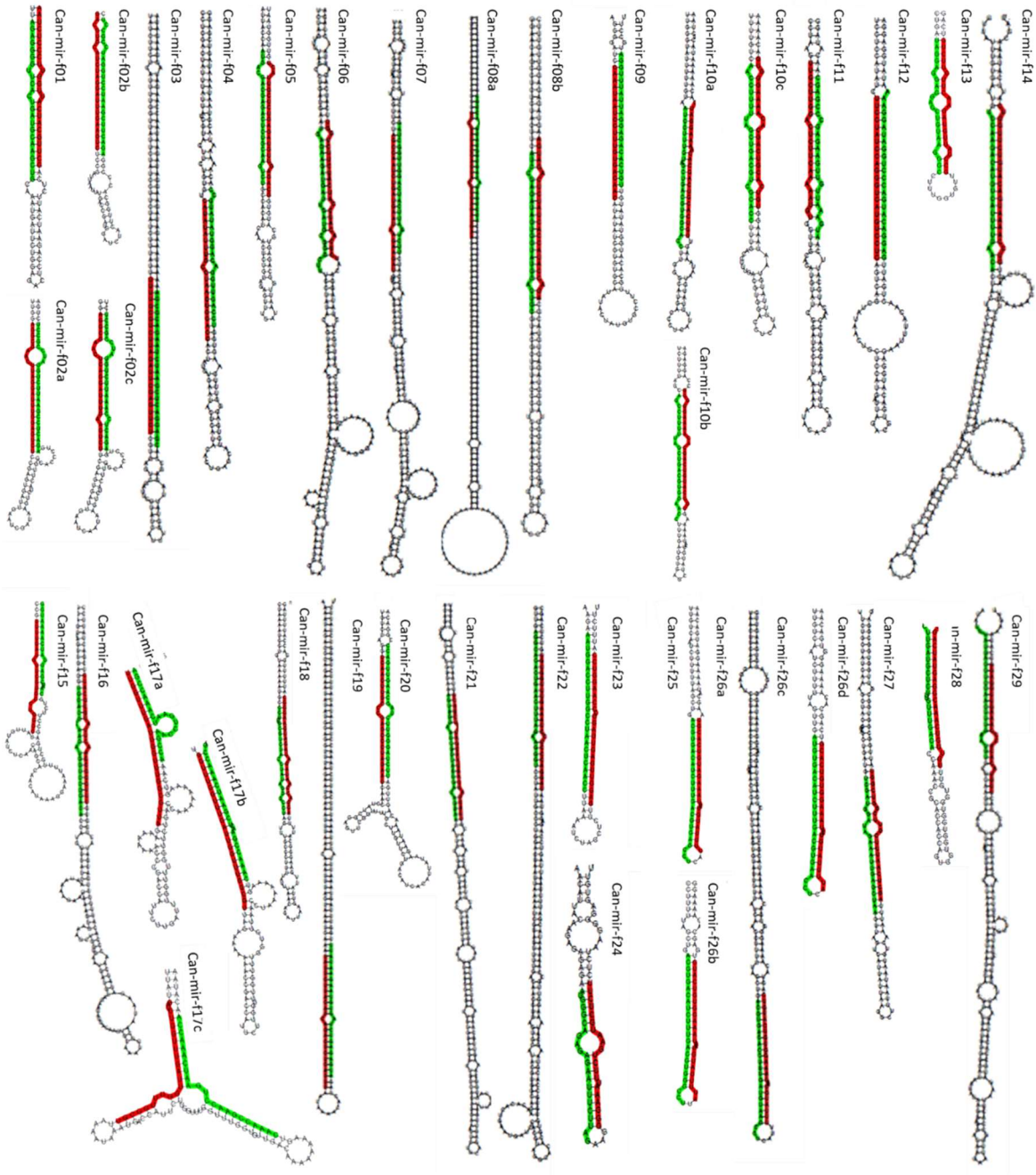
Capsicum annuum ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit mRNA, complete cds

```
TCCTCTGCAGCAGTTGCCACCGGCGCCAATGCTGCACAAGCCAGCATGATTGCATCCTTC 72
|||||
Sbjct 78 TCCACAGCAACTGTTGCCACCGGCGCCAATGCTGCACAAGCCAGCATGATTGCATCCTTC 137
Query 73 AATGGCCTTAAATCCGCAGCCTCTTCCCTGTTACAAGAAAGCAAGACCTTGACATCACC 132
|||||
Sbjct 138 AATGGCCTTAAATCCGCAGCCTCTTCCCTGTTACAAGAAAGCAAGACCTTGACATCACC 197
Query 133 TCCATTGTAGCAATGGTGAAGAGTCCAATGCATGCTGGTATGGCCACCAATTAACAAG 192
|||||
Sbjct 198 TCCATTGTAGCAATGGTGAAGAGTGAATGCATGCTGGTATGGCCACCAATTAACAAG 257
Query 193 AAGAAGTACGAGACTCTTTCATACCTCCTGATTGTCCGACGAGCAATTGCTCAAGGAA 252
|||||
Sbjct 258 AAGAAGTACGAGACTCTTTCATACCTCCTGATTGTCCGACGAGCAATTGCTCAAGGAA 317
Query 253 ATTGAGTACCTTTGCAAAAGGGATGGGTCCTTGTGGAAATTCGAGACTGAGCACGGA 312
|||||
Sbjct 318 ATTGAGTACCTTTGCAAAAGGGATGGGTCCTTGTGGAAATTCGAGACTGAGCACGGA 377
Query 313 TTTGTGTACCGTGAGCACCACAGGTCACCTGGATACTACGATGGCAGGTAAGTGGACCATG 372
|||||
Sbjct 378 TTTGTGTACCGTGAGCACCACAGGTCACCTGGATACTACGATGGCAGGTAAGTGGACCATG 437
Query 373 TGGAAAGTGGCCATGTTCCGGGTGACTGATGCTACCCAGGTCCTGAATGAAGTCCAGGAG 432
|||||
Sbjct 438 TGGAAAGTGGCCATGTTCCGGGTGACTGATGCTACCCAGGTCCTGAATGAAGTCCAGGAG 497
Query 433 GCAAAGAAGGCTTACCCACAGGCCTGGATCCGTATCATCGGATTCGACAACGTGCGTCAA 492
|||||
Sbjct 498 GCAAAGAAGGCTTACCCACAGGCCTGGATCCGTATCATCGGATTCGACAACGTGCGTCAA 557
Query 493 GTGCA 497
|||||
Sbjct 558 GTGCA 562
```

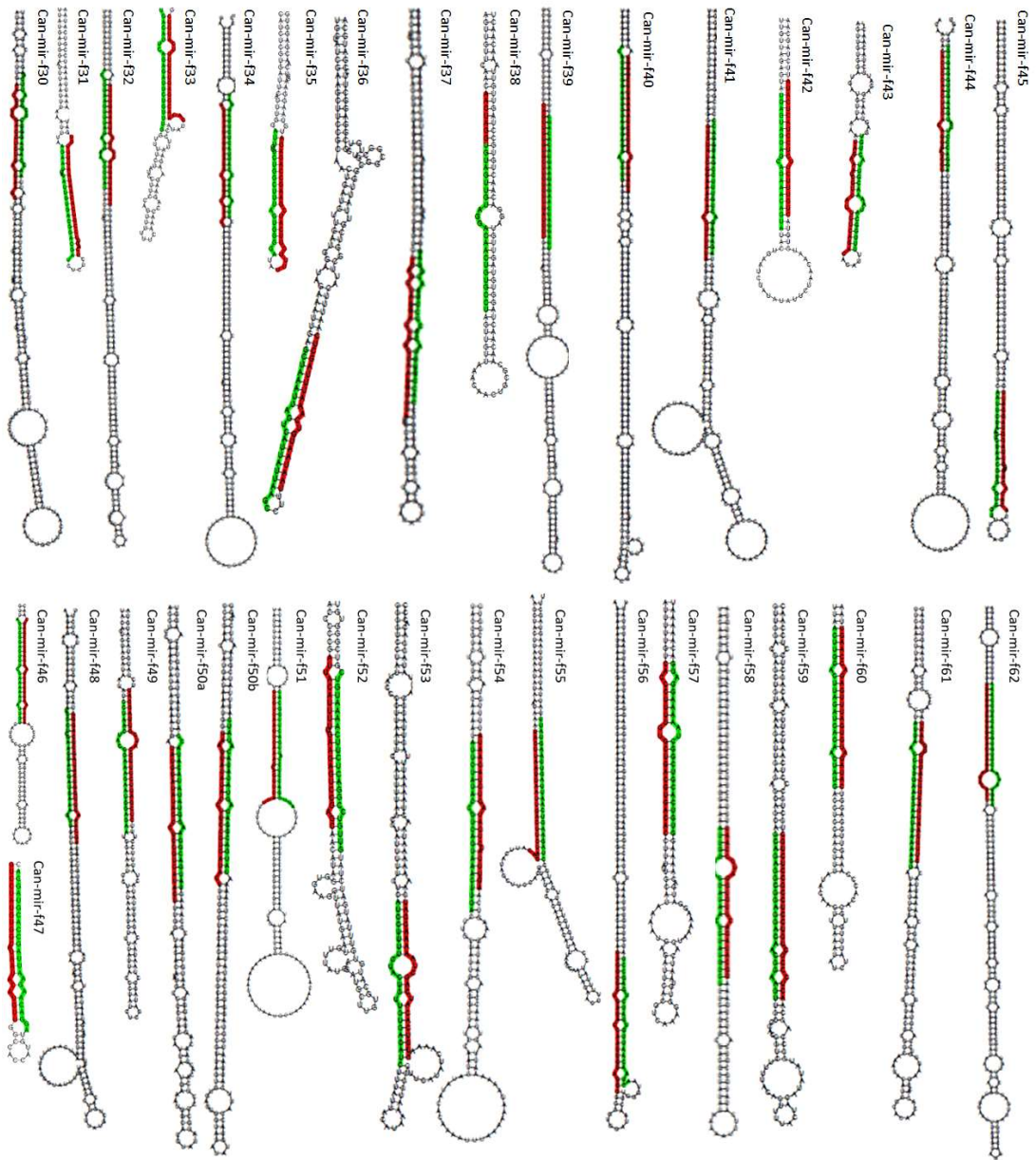
3. Mellékelt ábra A RUBISCO mRNS-ek kimutatásához használt szakasz illesztése a paprika Rubisco mRNS-re.



4. Mellékelt ábra Vírusátvitel a TRV-PDS reakciót szektorosan mutató paprikáról. A: A szektoros tünetet mutató termés hosszmetsete B: A TRV specifikus próbával végzett Northern blot képe (i: inokulálás napján, 1: első mintavétel, 2. második mintavétel).



5. Mellékelt ábra Az újonnan azonosított miRNS-ekhez (can-miR-f01-től a can-miR-f29-ig) tartozó prekurzorok másodlagos szerkezete I.



6. Mellékelt ábra Az újonnan azonosított miRNS-ekhez (can-miR-f30-tól a can-miR-f65-ig) tartozó prekurzorok másodlagos szerkezete II.

10.4. További mellékletek

1. Mellékelt táblázat A vad paprikatételekről felvett morfológiai tulajdonságok a jellemző átlagok és szórások feltüntetésével.

Típus	Tulajdonság	Átlag	Medián	Szórás
Binomiális tulajdonságok	Magonc hipokotil antociánossága	6,818182	9	3,736795
	Csokrosság	7,666667	9	3,113996
	Noduszok antociánossága	9	9	0
	Portok antociánosság	9	9	0
	Termés antociánosság	1	1	0
	Csípősség	9	9	0
Bonitált tulajdonságok	Habitus	1,5	1,5	0,522233
	Első virág és a csokrok távolsága	2,5	2,5	0,522233
	Antocián intenzitása	5	5	2,132007
	Szörözöttség	2,916667	2,5	2,151462
	Levélszín	3,916667	3	1,880925
	Levélalak	1,916667	2	0,288675
	Levélszélhullámossága	4	5	2,174229
	levél keresztmetszeti profil	4,25	5	1,13818
	Levélcsillogás	2,5	3	1,243163
	Bimbóállás	1	1	0
	Éretlen termésszín	3	3	0
	Színintenzitás	6,333333	6	1,302678
	Bogyóállás	1	1	0
	Termés: Alak	3,833333	3	1,898963
	Termés: Metszetalak	2,75	3	0,621582
	Termés: Alapi hullámozás	1,333333	1	0,778499
	Termés: Nem alapi hullámozás	2	1	1,537412
	Felületi textúra	1,416667	1	0,514929
	Érett termésszín	3	3	0
	Színintenzitás	4,916667	5	0,668558
	Fényesség	6	7	1,595448
	Kocsányüreg	1	1	0
	Csúcs alakja	2,833333	3	0,834847
	Kamrák száma	1	1	0
Húsvastagság	1,25	1	0,452267	
Kocsányvastagság	1,166667	1	0,57735	
Mért/ számított tulajdonságok	Szárhossz	24,5	24	9,060403
	Magasság	41,75	42	13,64568
	Levélhossz	34,68333	35,35	9,971672
	Levélszélesség	19,65	18,9	4,982971
	Terméshossz	10,725	10	3,875828
	Termésátmérő	6,216667	6,4	1,39077
	Termésarány	1,712086	1,67272	0,384741
	Kocsányhossz	17,07917	16,4	5,159081

1. Mellékelt szkript: intersection.py

```
# -*- coding: utf-8 -*-
'''
Created on Thu Jan 15 16:47:35 2015

@author: taller
'''

#####loading in mircat ids and sequences
with open("mymirID.txt") as a:
    r = a.readlines()
    r = r[8:]
    mymir=[]
    mymirID = {}
    for row in r:
        row=row.replace('\n',"")
        row=row.replace('\r',"")
        mymirlist= (row.split('\t'))
        mymir.append(mymirlist[1])
        mymirID.update({mymirlist[1]:mymirlist[8]})

#####loading in mirdeep sequences
with open ("*.filter.prediction") as f:
    set1=set()
    r = f.readlines()
    r = r[8:]
    sequences=[]
    for row in r:
        lista= row.split('\t')
        if lista[6] not in sequences:
            sequences.append(lista[6])
            set1.add(lista[6])

#####sorting
set1_result=[]
set1_new=[]
for i in range(8,len(mymir)):
    if mymir[i] in set1:
        set1_result.append(mymir[i])
    else:
        set1_new.append(mymir[i])

#####creating text file

mymir_result=[]
txt=""

for i in range(8,len(set1_result)):
    mymir_result.append(mymirID[set1_result[i]])
    txt=""
    txt=str(mymirID[set1_result[i]])
    txt+"\n"
    txt=str(set1_result[i])
    txt+"\n"

#print txt

#####write to file

fl=open('./intersec.fasta', 'w')
fl.write(txt)
fl.close()
print "done"
```

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a témavezetőmnek, **Dr. Havelda Zoltánnak**, a kísérletek szakmai vezetését, megosztott tudását, a laborban és a publikációkon végzett közös munkát, és azt, hogy tagja lehettem a csoportjának.

Köszönöm **Dr. Taller Jánosnak**, hogy mint témavezetőm, mind szakmai, mind emberi szempontból végig mellettem állt és lehetőségeihez mértén maximálisan segítette a doktori munkámat.

Köszönettel tartozom **Dr. Kocsis Lászlónak**, és **Dr. Anda Angélának**, a doktori iskola vezetőinek, a kutatási témám és a Phd képzésben való részvételem támogatásáért.

Köszönöm **Dr. Burgyán Józsefnek**, **Dr. Bősze Zsuzsának** és **Dr. Olasz Ferencnek**, az intézet főigazgatóinak, hogy támogatták a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban folytatott kísérleteimet és figyelemmel kísérték munkámat.

Külön köszönetet érdemel **Dr. Várallyay Éva** és segítő tanácsai, ötletei, bátorítása, és a rengeteg idő és figyelem, amit a témának, szakmai és személyiségbeli fejlődésemnek szentelt.

Köszönettel tartozom **dr. Oláh Enikőnek** azért a rengeteg mindenért, amit a laborban Tőle tanulhattam meg, és a közösen végzett munka öröméért is.

Köszönöm **Bálint Jeannettenek**, a kisRNS-ek kimutatásában végzett munkáját és azt, hogy együtt dolgozhatunk ezen a témán.

Hálás vagyok **dr. Nagy Tibornak**, **black007**-nek, akinek vitathatatlan szerepe volt az adatok bioinformatikai feldolgozásában és neki köszönhetem, hogy bevezetett a python és a Unix programozási nyelvek bioinformatikai felhasználásába. Biztosan tudom, hogy nézőpontom formálásában is komoly szerepe volt.

Köszönöm **Tallerné Barna Piroskának**, hogy a Phd képzés adminisztratív labirintusán keresztül vezetett, külön köszönöm kedvességét, segítőkészségét és a baráti hangvételű beszélgetéseket.

Itt szeretném köszönetemet kifejezni **Kósa Árpádné Erzsébetnek** a laborban nyújtott technikai segítségéért és a laborban töltött idő vidám hangulatúvá varázsolásáért

Köszönöm **dr. Salamon Pálnak** a doktori munkát megelőző közös munkát. A vírusológiai munkák során nyújtott szakmai segítségét., hogy általa tapasztalva ismerhettem meg növény-vírus kapcsolatokat, és színes elmondásaiból az emberi és kutatási háttértörténeteket. A munkám során készített rengeteg csodás fényképet, valamint mindenkori biztatását és az évek során tanusított kifinomult kritikai és esztétikai érzékét.

Földes Lászlónak is jár a köszönet az üvegházi munkákban nyújtott segítségével és az ott elhelyezett kísérleti növényeim fejlődéséért tett fáradozásaiért.

Köszönettel tartozom **Bakó Attila, dr. Mozsár József és dr. Szamosi Csaba** nemesítő uraknak is, akikkel a doktori témától eltérő területen dolgozva rugalmasságukkal és bátorító szavaikkal támogattak a doktori munka folytatásában és befejezésében.

Köszönöm az **MBK Fejlődésbiológia és Diagnosztika csoport** minden tagjának az együtt töltött időt, türelmüket és minden apró segítségüket, azt hogy egy csapatként dolgozhatunk, vehettünk részt az MBK napokon és más rendezvényeken is.

Köszönöm minden dolgozatban szereplő társszerzőnek, hogy készségesen és rendkívül rövid időn belül eljutatták hozzám a társszerzői nyilatkozatokat.

Köszönöm öcsémnek, **Taller Balázs Bonifácnak**, hogy elolvasta és lelkiismeretesen bejelölte az elütéseket, nyelvtani és stílisztikai hibákat.

Köszönöm **szüleim** ösztönzését, és elmondhatatlanul hálás vagyok **feleségemnek** a támogatásáért, kitartásáért, valamint, hogy a doktori munkával járó viszontagságok közepette mindvégig a támaszom volt.

A kutatást az NKFI-OTKA-K-109438 pályázat támogatta.