



Doktori értekezés tézisei

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

**A doktori iskola megnevezése: Festetics Doktori Iskola
Iskolavezető:**

Dr. habil Anda Angéla, D.Sc.
egyetemi tanár
SZIE-Georgikon
Meteorológia és Vizgazdálkodás Tanszék

Témavezetők:

Dr. habil Taller János, Ph.D
egyetemi tanár, tanszékvezető
SZIE-Georgikon
Növénytudományi és Biotechnológiai Tanszék
Dr. Havelda Zoltán, D.Sc.
csoportvezető, tudományos tanácsadó
NAIK-MBK Növényi Fejlődésbiológia Csoport

1. A munka előzményei

A közelmúltban felfedezett RNS-interferencia jelenség és az ezzel összefüggő nem kódoló RNS-ek által kifejtett szabályzási útvonalak napjaink kiemelt, biológiai kutatási témái közé tartoznak. A nem kódoló RNS-ek rendszerezésénél, a mikroRNS-eket, népszerűségüknek is köszönhetően, gyakran sorolják önálló kategóriába.

A miRNS-ek rövid, fehérjét nem kódoló RNS-ek, melyek általában saját promóterrel rendelkező endogén génekről (MIR gének) keletkeznek és általában endogén gének poszt-transzkripciós gátlásáért felelősek. A miRNS-eket kódoló gének száma nagyságrendileg megegyezik a transzkripciós faktorok számával. A nagyhatású miRNS-ekre jellemző, hogy alapvető funkciók vagy növényi hormonok szabályozói és több szövet fejlődésében is fontos szerepet játszanak.

Az új generációs mélyszekvenálási technológiák megjelenésével nemcsak a genomok, de a nem kódoló RNS-ek és a kisRNS-ek szekvenálásának költség- és időigénye is jelentősen lecsökkent, és lehetségessé vált az RNS-ekre vonatkozó szekvenciainformációk tömeges gyűjtése. Számos növényi miRNS-t azonosítottak kísérletesen vagy jósltak meg a kisRNS-adatbázisok bioinformatikai vizsgálatával. A közzétett miRNS-szekvenciák és annotációk összegyűjtésére, MirBase néven külön adatbázist is létrehoztak.

A különböző növényfajok miRNS-szintű összehasonlításával azonosítottak ún. konzervatív miRNS-eket, amiknek a szekvenciája, célmolekulája és funkciója is megőrződött a növényi evolúció során. Több miRNS-re jellemző a növény családra, fajra, szövetre vagy stádiumra specifikus expressziós mintázat vagy a környezeti hatásra bekövetkező aktivitásváltozás.

Az átfogó szekvenálási projektek nagyszámú szekvenciaismerettel gazdagítják biológiai ismereteinket, azonban az egyes gének és kisRNS-ek funkciójáról kevés információval szolgálnak. A szekvenciákhoz

kapcsolt funkciók feltárásához és megértéséhez más biotechnológiai módszerek alkalmazásával juthatunk el.

A vírusok által indukált (VIGS) géncsendesítési módszer a gyorsasága, egyszerűsége és költséghatékonyasága miatt sok növényfaj esetén előtérbe került a körülményes és költséges transzformációt igénylő megoldásokkal szemben. A specifikus VIGS vektorok előállításához a vizsgált gén egy szakaszát egy jól jellemzett növényi vírus genomjába építik be. Az így előállított rekombináns vírus képes a gazdanövényt megfertőzni, sejteiben elterjedni és a célgén expressziójában szekvens-specifikus gátlást indukálni. Az indukált RNS interferencia jelenség, olyan mértékű expressziócsökkenést okoz, ami képes a gén csökkent működésére jellemző ún. „knock-down” fenotípus kialakítására.

A VIGS kísérleti rendszer mindig függ a vizsgált növényfaj és a felhasznált vírus közti kapcsolattól, ezért ha egy meglévő vektort új fajban, szövetben, vagy fejlődési stádiumban szeretnénk felhasználni, először egy riportergént tartalmazó konstrukcióval célszerű letesztelni a rendszert.

A paprika (*Capsicum annuum L.*) az egyik legfontosabb és legszélesebb körben termesztett zöldség és fűszernövény. A paprika termésfejlődés korábbi vizsgálataiban során a metabolitok szintjében és az enzimaktivitásban is jelentős stádium-, szövet- és fajtaspecifikus eltéréseket találtak, de ezt a folyamatot kevesen vizsgálták az mRNS-ek és még kevesebben a miRNS-ek szintjén. A közelmúltban elérhetővé vált paprikagenom jelentősen megkönnyíti a nagy mennyiségű RNS-leolvasások feldolgozását és annotációját.

2. Célkitűzések

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-kivonás, kisRNS-könyvtár készítés, kisRNS-hibridizáció, vírus indukálta géncsendesítés) adaptáljuk paprika növényekre.

3. Ezeknek az adaptált módszereknek a felhasználásával tervezzük meghatározni a paprika természöveiből (hús, mag, placenta) különböző időpontokban vett minták kisRNS-profilját. Az így nyert szekvenciák felhasználásával képet kapunk a konzervatív, korábban publikált, paprikaszpecifikus 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. Célunk, hogy a miRNS-szintű vizsgálatainkba a termesztett paprika (*C. annuum* var. *annuum*) és vadon élő őse, a madárpaprika (*C. annuum* var. *aviculare*) faj egyedeit bevonjuk és meghatározzuk a rájuk jellemző miRNS-profilokat. Ezek 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.

3. Anyag és módszer

Növényanyag

A miRNS alapú vizsgálatainkhoz a 'Fehér özön' fajtát és a *Capsicum annuum* var. *aviculare* fajhoz tartozó, a 'Tepin' és Pequin néven szereplő tételeket használtuk. Az általunk vizsgált vadpaprika tételek esetén komoly morfológiai különbségekre lettünk figyelmesek, ezért több tulajdonság figyelembevételével egy anyanövényt jelöltünk ki. A VIGS vizsgálatokban a 'Fehér özön' és a 'Javított Bogysiszlói' fajta növényeit fertőztük meg. A TRV-VIGS konstrukciókat fertőzött *Nicotiana benthamiana* növények nedvét felhasználva passzáltuk a paprika növényekre.

Vírus indukálta géncsendesítési rendszer elemei

A TMV és a PVX alapú vektorok esetén in vitro transzkriptumot állítottunk elő, és a növények fertőzéséhez 2-2 levelet inokuláltunk. A TRV-VIGS vektorok esetén a TRV1 és TRV2 konstrukciót C58C1 agrobaktérium törzsből szaporítottuk fel, és ennek segítségével is juttattuk be fiatal *Nicotiana benthamiana* növények levelébe. A tünetek és a *PDS* reakció megjelenése után a kiválasztott dohánylevelek nedvét felvittük a paprikanövényeink karburundummal beszórt leveleire.

RNS-kivonás és könyvtárkészítés

A pollenszórás időpontját követően 4 különböző időpontban vett biológiai mintákból a TRI® Reagent RNA Isolation oldat használatán alapuló kivonási módszerrel megbízhatóan, megfelelő mennyiségű és tisztaságú RNS-t sikerült kivonni. 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. A kiválasztott, jó minőségű RNS-kivonatokat akrilamid gélen futtattuk meg, és a kisRNS-tartományt a gélen kijelöltük és szike segítségével kivágtuk. A kivágott gélből visszanyert és tisztított RNS-eket használtuk a könyvtárak elkészítéséhez. A kisRNS-könyvtárakat a

Truseq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina, CA, US) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint hoztuk létre. A cDNS könyvtárak minőségét és koncentrációját gélelektroforézissel újraellenőriztük és a jól sikerült könyvtárakat 8-8 indexelt mintát tartalmazó csoportban küldtük el Illumina HiSeq 2000 platform-on való szekvenálásra.

Bioinformatikai analízis eszköztára

A mikroRNS-vizsgálathoz, a szűrt tiszta leolvasásokat a *Capsicum annuum* cv. CM334 genomra illesztettük. A konzervatív miRNS-eket a MirProf segítségével azonosítottuk a miRNS ek online adatbázisában szereplő szekvenciákhoz való hasonlóságuk alapján. Az új miRNS-ek bioinformatikai azonosításához, a MirCat és miRDeep-P szoftvereket párhuzamosan használtuk. A két adatszett egyesítését és a szükséges szűréseket Phyton szkriptek segítségével végeztük el.

A nyers expressziós értékek meghatározásához a Patman programot használtuk. A differenciálexpressziós vizsgálatokhoz a DESeq2 t alkalmaztuk a nyers abundancia mátrixon. A differenciálexpressziós vizsgálat eredményeinek megjelenítéséhez MA-diagramokat és összesített hőtérképeket készítettünk.

A vizsgált miRNS ek célpont-RNS einek az azonosításához a PsRNATarget programot használtuk, és a 'Zunla 1' fajtán leírt és annotált génszettet adtuk meg referencia génlistaként. A génekre vonatkozó panther fehérjeosztályok és a GO Slim gén ontológiai analízishez a legújabb panther adatbázist használtuk.

RNS-ek kimutatása, vizsgálata

Northern blot hibridizációs technikákat alkalmaztunk a szekvenálási adatok megerősítésére, az endogén növényi gének expressziós szintjeinek meghatározására és a vírusvektorok kimutatására is.

Mindhárom esetben szükséges volt az RNS-ek méret szerinti elválasztása, ezt a kis-RNS-eknél 8M urea tartalmú 12%-os

polyakrilamid gélen végeztük el. A VIGS vektorokkal fertőzött növények vizsgálata során 1,2% os agaróz gélt és 100 V körüli gyorsítófeszültséget alkalmaztunk. Az endogén gének vizsgálata során a gélelektroforézist 1,2%-os, formaldehides, denaturáló gélen, 4 C° on és 80 V gyorsítófeszültséggel hajtottuk végre.

Az RNS-eket a gélből membránra vittük és a szükséges előkezelések után a protokollnak megfelelő hőmérsékleten hibridizáltuk. A hibridizáció után, a nem kötődött próbák eltávolításához több lépésben, eltérő koncentrációjú SSC oldattal mostuk a membránokat. A membránokat exponáló kazettába helyeztük és a kibocsátott radioaktív jeleket X-RAY röntgen film segítségével tettük láthatóvá. Az exponálási idő a membránon mért radioaktív sugárzás intenzitásától függően pár perctől, több napig változott.

A miRNS-ek kimutatásához specifikus radioaktívan jelölt DNS- vagy ZLNS- oligókat használtunk. Az endogén gének egy darabját cDNS ből kiindulva PCR reakcióval szaporítottuk fel és klónozó vektorba ligáltuk. A kiválasztott baktériumtelepekből izolált plazmidokat restriktációs emésztéssel és szekvenálással is ellenőriztük, és a későbbiekben ezeket használtuk templátként a specifikus PCR-termékek előállításán

4. Eredmények

Morfológiai felvételezés

Az általunk vizsgált tételek esetén komoly morfológiai különbségekre lettünk figyelmesek, ezért 40 morfológiai tulajdonságot felvételeztünk, és részletes leírást készítettünk a kapott genetikai anyag egyes növényeiről. A 'Tepin' genotípusból 11 növényt neveltünk fel termésérésig és vonalkialakítás céljából kiválasztottunk egy az ősi tulajdonságokat leginkább hordozó vadpaprika egyedét.

Vírus indukálta géncsendesítés lehetőségei paprikában

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 kisRNS-könyvtárakból kapott szekvenciák

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 átment 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.

KisRNS-ek azonosítása és csoportosítása

A 20 kisRNS-könyvtárból származó szűrt és genomra illesztett szekvenciákat a MirProf program segítségével illesztettük a miRBase adatbázisra. Az illesztés során 2033 miRNS-azonosítóval mutattunk ki egyezést. Több szűrési lépés alkalmazása után az általunk elfogadott konzervatív miRNS-lista 40 konzervatív miRNS-családba tartozó, 217 egyedi szekvenciát tartalmazott.

A *Capsicum*-specifikus miRNS-ek közé azokat a szekvenciákat soroltuk, melyek korábbi, paprikával foglalkozó tanulmányokban új miRNS-ként kerültek leírásra. Ezekből a szekvenciákból egy 68 egyedi szekvenciát tartalmazó listát hoztunk létre. A 68 szekvencia közül Patman illesztéssel 42-t találtunk meg a saját adatszettünkben.

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. A mi adatainkkal összevetve négy olyan miRNS-t találtunk, ami mindkét adatszettben 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.

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 potenciális miRNS-t tudtunk azonosítani. Ezek jellemzéséhez meghatároztuk a szekvenciahosszakát, a kezdő nukleotid és az átlagos GC tartalomértéket is. Az új prediktált miRNS-eken belül szekvenciahasonlóság alapján 6 új legalább kéttagú miRNS-családot tudtunk kialakítani.

KisRNS szekvenálás eredményeinek validálása

A validálás során külön vizsgáltuk a korai termésekből és a későbbi magból, placentából és termeshúsból készült RNS-kivonatokat. A validáláshoz a kisRNS Northern blot módszerét és jelölt DNS és ZLNS oligoprobákat alkalmaztunk.

A vizsgált minták között bizonyos miRNS-ek esetén a leolvasások számában nagymértékű eltérést találtunk. A legtöbb vizsgált miRNS esetén a kisRNS Northern blot technika segítségével, a vizsgált minták közötti mennyiségbeli különbségeket hibridizációs rendszerben is ki tudtuk mutatni. Az általunk vizsgált miRNS-ek közül a vonatkozó leolvasások mennyisége alapján 36-ra volt jellemző a markáns szövetspecifikus expresszió. Több, ilyen miRNS esetén a feltételezett specifikus expressziót hibridizációval is igazoltuk. A Northern hibridizációs vizsgálatok eredményei jó egyezést mutattak a szekvenálási adatokkal, bár egyes esetekben komoly eltérésekkel is találkoztunk.

A Northern és a szekvenálási adatok összevetése alapján a nagyáteresztőképességű módszerrel gyűjtött kisRNS-re és mintára jellemző leolvasások mennyisége, felhasználható a fejlődési folyamat során a miRNS-ek differenciális expressziós analízisére. A deseq2 alapú differenciális expressziós vizsgálatot több megközelítésben is alkalmaztuk.

Differenciális expressziós vizsgálatok a termésfejlődés korai szakaszában

A korai stádiumok esetén lehetőségünk volt a két genotípus és a két stádium összehasonlítására is.

A két genotípus összehasonlításához az abszcencia-preszcencia és a deseq2 módszert párhuzamosan használtuk. A differenciális expressziós 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 természetben 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 Tepinnel ellentétben a 'Fehér özön' termésben a miRNS alapú szabályzásban a miRNS-ek expressziójának az időbeli változása is szerepet játszik.

Differenciálexpressziós vizsgálatok a termésfejlődés későbbi szakaszában

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. A vizsgálataink során . kiugróan magas számban találtunk olyan miRNS-eket, amelyek emelt expressziós szintet mutattak a magban de sikerült azonosítani, olyan miRNS-eket is amelyekre a hús, illetve placentaszpecifikus expressziós változás volt a jellemző.

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 vizsgált miRNS-ek által szabályzott mRNS ek, gének és funkciók

A PsRNATarget segítségével mind a konzervatív, a paprikaszpecifikus és az általunk prediktált miRNS-ekhez sikerült nagyszámú potenciális célpont mRNS-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.

5. Következtetések és a javaslatok

A paprika termésfejlődés vizsgálatában a kisRNS-expressziós mintázatra vonatkozóan átfogó, genomszintű és szövetspecifikus információt gyűjtöttünk. A 21 nt hosszú kisRNS molekuláknak a termésfejlődésben játszott fontos szerepét, az általunk a terméshúsban tapasztalt kiugróan magas arányuk is alátámasztja.

A konzervatív miRNS-profilok meghatározásával lehetővé vált az azonosított paprikatermesre jellemző miRNS-szekvenciák, és ezek expressziós szintjeinek és szabályzási feladataiknak a rokonfajokkal történő összehasonlítása.

Nagyszámú paprikaspecifikus és új miRNS-t azonosítottunk az általunk vizsgált mintákban. Az új miRNS-ek, az expressziós profiljuk és a prekursoraik 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 fajra, termésfejlődési stádiumra, illetve szövetre specifikus változatának kialakításához is.

Az általunk azonosított miRNS-ek mindegyikéhez tudunk potenciális prekursor- és csillagszál-szekvenciát rendelni. Ezeknek a szekvenciainformációknak a felhasználásával lehetséges a kiválasztott prekursorokról történő miRNS-ek érésének, biogenezisének molekuláris vizsgálata.

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 paprikatermesben történő funkcionális vizsgálatára is.

6. 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 húsban 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 vizsgálattal 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.

7. Publikációs jegyzék

Előadások idegen nyelven

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

Bálint, Jeannette ; Gyula, Péter ; Taller, Dénes ; Dalmadi, Ágnes ; Hamar, Éva ; Kis, András ; Szittya, 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

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

Hegedús A.*, Taller D.*, Papp N., Szikriszt B., Ercisli 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.

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 iRNA and siRNA profiles. PloS one, 13(7), e0200207.

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

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.

Taller D., Bálint J., Nagy T., Várallyay É., Havelda Z., *Capsicum annuum* szabályozó kisRNS-ek azonosítása új generációs szekvenálással, MBK napok 2014, Gödöllő

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

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

Taller D. Az RNS-ek titokzatos világa, célkeresztben a paprika mikroRNS-ek! Festetics Imre Mezőgazdasági Biotechnológia Szakkollégium, 2013. 12.03., Gödöllő.

Oláh E, Pesti R, Taller D, Várallyay É, Havelda Z, Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája 2014 március 7., Szeged

**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**

**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

**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

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

