



**SZENT ISTVÁN
EGYETEM**

GÖDÖLLŐ

**BÚZA TÖRPÜLÉS VÍRUS REZISZTENCIA
KIALAKÍTÁSA ÁRPÁBAN MESTERSÉGES
miRNS FELHASZNÁLÁSÁVAL**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

KIS ANDRÁS

Gödöllő
2018.

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudomány ága: Növénytermesztési- és kertészeti tudományok

vezetője: **Dr. Helyes Lajos, PhD**
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezetők: **Dr. Jenes Barnabás, PhD**
főosztályvezető
MTA Titkársága, Kutatóintézeti Főosztály

Dr. Bán Rita, PhD
egyetemi docens
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Növényvédelmi Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása A témavezetők jóváhagyása

BEVEZETÉS

A szántóföldi növénytermesztés számára napjainkban is kihívást jelent a különböző növényi vírusok elleni küzdelem. Az ellenük való védekezés főként a vírusvektorok irtására korlátozódik, mert a növénynemesítők számára nem minden esetben állnak rendelkezésre megfelelő hatékonyságú rezisztencia gének részben a beszűkülő genetikai források, részben a vírusok gyors genetikai adaptációs képessége miatt. Mind az árpa (*Hordeum vulgare* L.), mind a búza (*Triticum aestivum* L.) sárgulást és törpülést okozó vírusbetegségeinek fő kórokozója a búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus* - WDV), ami akár 80%-os termés kiesést is okozhat számára kedvező feltételek esetén. Több évre kiterjedő magyarországi szántóföldi vizsgálatok bizonyítják, hogy mindkét gabona faj esetében a sárgulásos tüneteket mutató, vírusfertőzött növények 88-100%-ában jelen volt a WDV.

A WDV terjesztője a csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus* Dhalbom; Hemiptera, Cicadellidea), mely cirkulatív, perzisztens módon terjeszti a kórokozót. A helyes vetésidő megválasztással és a megfelelő idejű inszekticidus állománypermetezéssel részben visszaszoríthatjuk a vírusos megbetegedések esélyét, bár hozzá kell tennünk, hogy a vektorok száma és mobilitása miatt az utóbbi védekezési mód nem elég hatékony. Így a növénytermesztés számára kiutat jelentenének a vírusrezisztens gabonafajták, de ez idáig csak kevés WDV toleráns gabonavonalról adott hírt az irodalom.

Az RNS interferencia felfedezésével új fejezet nyílt a növényi vírusrezisztencia kialakítás tekintetében. A különbözőképpen létrehozott RNS csendesítési módszerek közül – hatékonyságát és megbízhatóságát tekintve – a mesterséges miRNS technológia a legkiemelkedőbb. A módszer alapját képező, a növény genomjából izolált ún. miRNS prekursorok szerkezete nagyban meghatározza a belőlük kialakuló miRNS-ek

menyiségét, ezért az új miRNS prekursorok keresése ebben a témakörben is nagy jelentőséggel bír.

Célkitűzések

- I. RNS interferenciára alapozott búza törpülés vírus (WDV) rezisztenciát kialakítani árpa növényben mesterséges miRNS technológiával,
 - Ennek elérése érdekében magas miRNS expressziót biztosító árpa miRNS prekursor keresése és átalakítása WDV specifikus mesterséges miRNS-t tartalmazó prekursorokká,
 - Egy gyors, tranziens rendszer kidolgozása a mesterséges miRNS-ek biológiai aktivitásának vizsgálatára,
 - A hatékonynak ítélt mesterséges miRNS-ekből előállított, policisztronikus mesterséges miRNS konstrukcióval az árpa növény genetikai transzformációja,
 - Megbízható WDV fertőzési rendszer kialakítása a létrehozott árpa vonalak tesztelésére,
- II. Búza kis RNS könyvtár adatokból olyan miRNS prekursorok azonosítása, amelyek alkalmasak lehetnek mesterséges miRNS létrehozására

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényi anyagok

A különböző agroinfiltrációs kísérletekhez, két-három hetes *Nicotiana benthamiana* növényeket használtunk, melyeket növénynevelő kamrákban (Versatile Environmental Test Chambers; Sanyo, Tokyo Japan) 23 °C-on, 14 órás nappali ($50 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényerősség) és 10 órás éjszakai ciklus alkalmazásával neveltünk Jiffy tápkockákban.

Az agrobaktériumos transzformációhoz használt árpa növényeket (*Hordeum vulgare* cv. 'Golden promise') szintén Sanyo növénynevelő kamrákban neveltük 15 °C-os nappali (16 óra, $50 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényerősség), 12 °C-os éjszakai (8 óra, sötét) hőmérsékleten.

A búza kis RNS könyvtárak előállításához felhasznált növényeket (*Triticum aestivum* cv. 'Bánkúti B35 és B52'; *Triticum spelta*) üvegházban neveltük fel 23-28 °C-os hőmérsékleten tartva. A megtermékenyülés időpontját kalászonként az első portokok megjelenésétől számoltuk. 10-20-30 napos magokat szedtünk le, amiket -80 °C-on tároltunk a felhasználásig.

Vírusvektorok nevelése

Az árpaföldekről begyűjtött, kifejlett csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus* Dhalbom) populációt 23 °C hőmérsékletű növénynevelő kamrában több nemzedéken át neveltük árpa növényeken (*H. vulgare* cv. 'MV Jubilant') 14 órás nappali ($50 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fény) és 10 órás éjszakai periódust váltakoztatva. A rovarokat a külvilágtól egy vékony, 0,1 mm falvastagságú hálóval választottuk el.

***Nicotiana benthamiana* növények agroinfiltrációja**

A dohány (*Nicotiana benthamiana*) növények levelit *Agrobacterium tumefaciens* C58C1-es törzsével infiltráltuk, amikbe azt megelőzően hőkompetens módon transzformáltuk az egyes a bináris vektorokat. A megfelelő koncentrációra ($OD_{600}=1$) hígított baktérium oldatokat egy 1 ml-es fecskendő segítségével dohány növények levéllemezébe préseltük. Az infiltrált levelekben a GFP expressziót 3 nap elteltével vizsgáltuk UV lámpa alatt.

Árpa Agrobacterium-közvetített transzformáció

Az árpa transzformációhoz 1,5-2 mm átmérőjű 'Golden promise' éretlen árpa embriókat alkalmaztunk. A hajtáskezdemény (axis) eltávolítását követően a célgén-tartalmazó bináris vektort (pCUBiVirusBuster171) AGL-1 *A. tumefaciens* baktérium segítségével juttattuk be a növényi sejtekbe. Az *Agrobacterium*-ot $OD_{600}=1$ koncentrációban használtuk. A kalluszosítás során a transzformáns sejteket hygromicinnel (50 mg/l) szelektáltuk.

WDV fertőzés kabóca vektorral

WDV fertőzött 4-5 hetes növényekre mikroizolátorokat helyeztünk, majd a két végét a levelet átölelő szivacs korongokkal zártuk le. Az izolátorokba 3-3 kabócát helyeztünk el. A kabócákat egy hétig hagytuk táplálkozni a WDV fertőzött növényeken, majd szintén egy hetes időintervallumra áthelyeztük őket az egészséges transzgenikus vonalainkra. Ezt követően PCR-rel mutattuk ki a vírus jelenlétét a növényekből és a kabócékból is egyaránt.

RNS izolálás, northern és kis RNS northern hibridizáció

Az infiltrált dohánylevelekből és a transzgenikus árpa növényekből a totál RNS-t TRI® Reagent RNA Isolation oldat segítségével vontuk ki a gyártó utasításait követve (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

A folyékony nitrogénben porított búzamazagokból (~100 mg) a totál RNS-t Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research Corp, Tustin, USA) felhasználásával izoláltuk a gyártó által előírt protokoll alapján.

A WDV replikáz RNS-ét a laborunkban használt protokoll alapján northern hibridizációval detektáltuk. Mintánként 5 µg RNS-t használtunk, amit 1,2%-os formaldehides 1x MAE agaróz gélben futtattuk meg. Majd a nitrocellulóz membránra blottolt RNS-eket radioaktívan jelölt specifikus PCR (replikáz gén) termékkel hibridizáltattuk 65 °C-on Church pufferben.

A kis RNS northern hibridizációhoz 10 µg totál RNS-t használtunk fel mintánként mind az infiltrált dohánylevelek, mind a transzgenikus árpa növények és mind a búzamazag minták esetében, amiket 8 M ureát tartalmazó 12%-os polyakrilamid 1x TBE gélen futtattunk meg. Az RNS-t kapilláris blot segítségével nitrocellulóz membránra blottoltuk. Ezt követően kémiai keresztkötést alkalmazva stabilan rögzítettünk az RNS-eket membránhoz.

A hibridizációt követően (ULTRAHyb-Oligo pufferben) a próba által kibocsátott radioaktív jelet X-RAY röntgen filmmel detektáltuk.

Búza (*Triticum aestivum* L.) kis RNS könyvtárak előállítása

A beporzástól számítva 10-20-30 napos búzamazagokból két biológiai ismétlésben készítettük el a kis RNS könyvtárakat Illumina TruSeq® Small RNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, USA) segítségével. A könyvtárakat kétféleképpen hoztuk létre, szimplán totál RNS-ből (T könyvtárak) (UD-GenoMed, Debrecen által létrehozva), illetve a kis RNS frakció (15-30 nukleotid) visszaizolálásával (P könyvtárak). Mindent

egybevetve összesen 36 könyvtárat szekvenáltattunk meg, amiket a két eljárás tekintetében minőségi jellemzésnek vetettünk alá.

A kis RNS könyvtárak bioinformatikai analízise

A megszekvenált kis RNS könyvtárak minőségét FastQC programmal leellenőriztük. A nyers adatokból eltávolítottuk az adaptereket (Cutadapt 1.2.1) megszűrtük a 16-28 nukleotid hosszúságú leolvasásokat, az alacsony abundanciájú (<3), illetve a transzfer- és riboszómális RNS eredetű szekvenciákat eltávolítottuk (Python scripts, Rfam adatbázis). Az így kapott szekvenciákat a búza genomra illesztettük (Bowtie). A feltételezett miRNS-ek másodlagos szerkezetét ViennaRNA Package program segítségével prediktáltuk. Ezt követően miRDeep-P program segítségével kiválogattuk a potenciális pre-miRNS-eket. A miRBase Release 21 adatbázisban azonosítottuk a már ismert és a potenciónálisan új miRNS-eket.

Az egyes kis RNS leolvasásokat az alábbi képletekkel normalizáltuk: leolvasás száma/összes nyers leolvasások száma $\times 10^6$ vagy leolvasás száma/összes szűrt leolvasások száma $\times 10^6$.

EREDMÉNYEK

A felhasznált miRNS prekursor izolálása, tesztelése

Az árpa *hvu-MIR171*-es (miRBase accession number: MI0016461; NCBI accession number: JX195502, 138 nukleotid) prekursorát 'Golden promise' árpafajtából izoláltuk és CaMV 35S expressziós kazettába klónoztuk (pC61K vektor). A prekuzoron pontmutációk létrehozásával egyedi hasítóhelyeket (BstEII-MluI) hoztunk létre az amiRNS prekuzorrá történő átalakítás megkönnyítése érdekében. A *Nicotiana benthamiana* növényeken végzett agroinfiltrációt követően northern hibridizációval vizsgáltuk meg a túltermeltetett prekuzorról (*hvu-miR171MOD*) érő miRNS mennyiséget.

Az amiRNS-ek célszekvenciáinak kiválasztása

A WDV h07-es törzs szekvenciája (NCBI: FM210034) alapján kiszűrtük a lehetséges amiRNS célhelyeket a vírus *replikáz és mozgási fehérje* génjeire. Az előbbi esetében 136, az utóbbi esetében 31 db, a szempontoknak megfelelő célszekvenciát tudtunk kijelölni.

A tervezés további kritériumai a következők voltak:

- Az amiRNS megfelelő végrehajtó komplexbe (AGO1) történő beépüléséhez szükséges az 5'- U kezdő nukleotid.
- Az amiRNS 3'-végén G vagy C nukleotidok legyenek. Itt erősebb bázispárosodás kell, hogy létrejöjjön a csillag szállal.
- A cél RNS-sel az 5'- 2. és 12. pozícióban fontos a bázispárosodás.
- A cél RNS-sel az 5'- 10. és 11. pozícióban is fontos a bázispárosodás

Az amiRNS-ek nem kívánt hatásait (OFF-target) az árpa transzkriptomra vonatkozóan egy internetes alkalmazás

(<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>) segítségével vizsgáltuk meg. Az OFF-target-mentes amiRNS-eket szekvencia összehasonlításnak vetettük alá a WDV árpa és búza törzseivel (5-5 db) és kiválasztottunk 8 db-ot a *replikáz*, 2 db-ot pedig a *mozgási fehérje* génekre.

Az amiRNS prekursorok létrehozása

A tervezés során első körben a 171-es miRNS helyére beillesztettük az adott amiRNS szekvenciát, majd a vele szemben elhelyezkedő miR171* szál szekvenciáját úgy módosítottuk, hogy az amiRNS prekursor másodlagos szerkezet megegyezzen az eredetivel.

Az amiRNS prekursorokat PCR-mutagenézissel hoztuk létre, templátként a pC61Khvu-miR171MOD vektort használva. Majd a 110 nukleotid hosszú PCR termékeket BstEII-MluI restriktív enzimek segítségével pC61Khvu-miR171MOD vektorba klónoztuk.

Policisztronikus amiRNS expressziós vektorok

A három kiválasztott amiRNS prekuzort közvetlenül egymás után rendezve (amiR1-amiR6-amiR8) megszintetizáltattuk (GeneArt®, Life Technologies) és a pC61K vektor 35S kazettájába klónoztuk (pC61KVirusBuster171).

Az egyszikűek transzformálására alkalmas konstrukciót (pCUbiVirusBuster171) pCUbiNOS vektorban hoztuk létre, ami az egyszikű-specifikus, kukorica *Ubi1* polyubiquitin gén promóterét tartalmazta.

Az amiRNS-ek validálása és tesztelésük tranziens rendszerben

Az amiRNS prekursorokat tartalmazó vektorokat (amiR1-10) *Agrobacterium*-ba klónoztuk, majd dohánylevél agroinfiltrációt követően northern hibridizációval megvizsgáltuk a mesterséges miRNS prekursorokról történő amiRNS érést. Tízből hét esetben tudtunk kimutatni

amiRNS felhalmozódást, három esetben (amiR4, amiR5, amiR7) viszont nem sikerült detektálnunk.

Az amiRNS-ek biológiai aktivitásának vizsgálatára a létrehoztunk két GFP-szenzor konstrukciót. Az *mgfp5* gén 3' nem transzlálódó, de átíródo régiójába helyeztük el az amiRNS-ek célszekvenciáit ötösével. A szenzorokat az amiRNS-eket egyenként tartalmazó konstrukciókkal dohány növények levelében expresszáltattuk. Az agroinfiltrációkat 15 és 23 °C-on végeztük el 2-2 ismétlésben. A vizsgálatban a 10 amiRNS-ből 6 bizonyult biológiailag aktívnek. Mindkét hőmérsékleten azonos eredményt kaptunk, amiből arra következtethetünk, hogy az amiRNS-ek valóban a miRNS és nem a siRNS útvonalon jönnek létre.

Árpa transzformáció policisztronikus amiRNS konstrukcióval

Az *Agrobacterium*-közvetítette, éretlen embrióra alapozott árpa transzformáció során a policisztronikus amiRNS konstrukciót tartalmazó *Agrobacterium*-mal 365 db éretlen embriót fertőztünk meg. Összesen 77 db hygromicin génre PCR pozitív egyedet tudtunk regenerálni 20 különböző kalluszból. Az egy kalluszból nevelkedett növényeket azonos vonalként tartottuk számon.

Transzgenikus árpa vonalak tesztelése WDV fertőzéssel

Négy vonalat választottunk ki, melyek különböző mértékben expresszálták az amiRNS-eket. A VB8-as vonal relatív magas expresszióval rendelkezett, a VB9 és VB10-es vonal közepessel és végül a VB20-as vonal, ami a többiekhez képest jóval kevesebb amiRNS-t termelt. A növényeket kabóca vektorok segítségével fertőztük meg a WDV h07-es törzssel. Az állatok a vírust az általunk mesterségesen (agro-fertőző konstrukcióval) előállított WDV fertőzött növényekről vették fel. A növénynevelés hőmérsékletét (12-15 °C) úgy állítottuk be, hogy a növény endogén, RNS interferencián alapuló

(siRNS) védekező rendszere gátolva legyen, előidézve ezzel a szántóföldön kora ősszel jelentkező klimatikus viszonyokat. Az egy hetes fertőzési időszakot követően a kabócákból PCR-rel kimutattuk a WDV DNS-t, majd négy időpontban (42, 56, 77, 112 nappal fertőzés után (DPI)) molekuláris eszközökkel megvizsgáltuk a WDV jelenlétét a növényekben is. Mind a PCR alapú, mind a northern hibridizációs vírusdiagnosztika eredménye bizonyítja, hogy a WDV specifikus amiRNS-ek hatással vannak a vírus szaporodására.

Míg az első időpontban (42 DPI) a kontroll fertőzött növények esetében meglehetősen magas WDV replikáz szintet tudtunk detektálni, addig a transzgenikus vonalak esetében a vírus jelenlétét csak a VB20-as vonalnál sikerült PCR-rel kimutatni, ami egyébként fenotípusát tekintve is inkább hasonlított a fertőzetlen kontroll növényre (Mock), mint a fertőzött kontrollokra (WDV1, WDV2). A későbbi időpontokban (56, 77, 112 DPI) már a *replikáz* RNS is kimutatható volt a növényben, amit a növény fenotípusa is erősen tükrözött. A VB9-es és VB10-es vonal, amik megközelítően egyenlő mértékben expresszálták az amiRNS-eket, a vírushatásra is hasonlóan reagáltak. Habár 56 nappal a fertőzést követően már PCR technikával kimutatható volt bennük a WDV, ennek ellenére a northern hibridizáció még 112 nappal (kalászos állapot) a fertőzést követően sem volt képes kimutatni a *replikáz* RNS-t. A VB8-as vonal, ami a VB9-es és VB10-es vonalokhoz képest megközelítően dupla akkora amiRNS expressziót produkált, teljes rezisztenciát mutatott a WDV fertőzésre. A teljes vegetációs időszak alatt sem a vírus DNS-t, sem a vírus replikáz RNS-t nem tudtuk kimutatni a növényből. A növény, fenotípusát tekintve teljes mértékben megegyezett a vad típusú fertőzetlen kontrolléval. A VB9-es és VB10-es növények az első 2-3 kalászatukat képesek voltak kinevelni, de az újonnan jövő kalászok a megnövekedett vírus szint miatt már nem értek be, vagy a magok nem telítődtek ki megfelelően.

Az amiRNS-ek expresszióját a VB8-as vonal utódaiban is igazoltuk.

Kis RNS könyvtár létrehozása totál RNS-ből és tisztított kis RNS frakcióból

A totál RNS-ből (T) illetve a visszaizolált kis RNS-ből (P) készített könyvtárak a teljes leolvasások számának tekintetében nem mutattak nagy eltérést a szekvenálás során (átlagosan: 9,192,098 (T), 9,244,612 (P) leolvasás). Az adatok variabilitását tekintve már nagyobb különbségeket tapasztaltunk a két módszerrel létrehozott könyvtáraknál, mind a nyers adatokat tekintve, mind a normalizálást követően. A különböző szűrési lépéseket követően ~30%-kal több leolvasást kaptunk „P” könyvtárak esetében. A miRBase adatbázisra történő illesztésnél is lényegesen több leolvasást kaptunk a már ismert miRNS-ek esetében. A T könyvtáraknál 1934 egyedi, potenciális miRNS szekvencia illett fel a búza genomra, a P könyvtárak esetében pedig 3247.

Új búza miRNS azonosítása amiRNS felhasználásra

A könyvtárakban találtunk egy olyan, eddig leíratlan, 21 nt-os miRNS-t (tae-2187, 5'-CGCGGCTCCGTCGACTGGTGC-3'), amely az összes mintában a legmagasabb, vagy a második legmagasabb leolvasási értéket képviselte. A miRNS prekursorát a búza két genomján is megtaláltuk (B és D genom), az egyik 63 a másik 89 nukleotid hosszúságú. A miRNS-t kis RNS northern hibridizációval is kimutattuk.

Új tudományos eredmények:

1. Először alakítottunk ki (WDV) vírusrezisztenciát árpa növényben mesterséges miRNS technológiával, amelyet policisztronikus konstrukcióban hoztunk létre.
2. Létrehoztunk egy árpa eredetű mesterséges miRNS prekuzort (hvu-miR171MOD), amely egyszerű átalakíthatósága és hatékony processziója révén kiválóan alkalmas árpában (vagy esetlegesen más növényben) történő géncsendesítés kivitelezésére.
3. Bebizonyítottuk, hogy a kis RNS könyvtárak készítése során jelentős információ nyereséget eredményez, ha a könyvtárakat gélből visszaizolált kis RNS frakcióból készítjük és nem közvetlenül totál RNS-ből.
4. Búza kis RNS könyvtár szekvenálás során azonosítottunk egy nagy leolvasási számmal rendelkező, eddig ismeretlen miRNS-t, melynek expresszióját kísérletesen is igazoltuk és prekuzorait a búza két genomján (B és D) is megtaláltuk, amik szerkezetük alapján alkalmasak lehetnek mesterséges miRNS prekuzorként történő felhasználásra.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Árpa hvu-miR171, mint mesterséges miRNS prekursor

Az amiRNS technológia vírusokkal szemben történő felhasználásának egyik sarkalatos pontja a miRNS prekursor kiválasztása.

Az árpa *hvu-MIR171*-es miRNS gén prekursora kísérleteink alapján kiválóan alkalmasnak bizonyult a mesterséges miRNS-ként történő felhasználásra. A 10 átalakított prekursor közül 7-nél tudtunk mérhető amiRNS jelet kimutatni a northern hibridizációk alkalmával, 6 esetben pedig az amiRNS-ek biológiai aktivitását is bebizonyítottuk. Hozzá kell tennünk, hogy nem minden működő amiRNS-t tudtunk kimutatni kis RNS northern hibridizációva.

Eredményeink azt igazolják, hogy az árpa *hvu-miR171*-es miRNS prekursor kiválóan alkalmas akár három különböző amiRNS egyszerre történő expresszáltatására policisztronikus konstrukcióban, ami a vírusokkal szembeni felhasználás szempontjából fontos szempont.

Az amiRNS-ek által nyújtott rezisztencia korlátai

Az eredményeinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a policisztronikus konstrukcióról kialakuló amiRNS-ek expressziója negatív korrelációt mutat a WDV szisztemizálódás mértékével. Mivel a bejutott vírus DNS genomokat a rendszer nem képes degradálni, csupán a róluk képződő *replikáz* RNS-eket, ezért bizonyos idő elteltével magasabb kezdeti amiRNS szint mellett is (VB9, VB10 vonalak) képes lehet a vírus a szisztemizálódásra.

Érdemes lenne a jövőben a növényeket a szántóföldön is kipróbálni, természetes fertőzési és időjárási körülmények között. De tekintve, hogy ezek a vonalak többszörösen is a GMO-k hatáskörébe tartoznak

(policisztronikus amiRNS és a hygromycin rezisztencia gén), valószínűleg hazánkban nem lesz kivitelezhető ez a kísérlet a közeljövőben.

Búza kis-RNS könyvtárak előállítása

A búza (*Triticum aestivum* L.) kiváló alany arra, hogy új miRNS prekursorokat keressünk, mivel genomja ($2n=6x=42$, AABBDD) három különböző faj kromoszóma készletéből tevődik össze, aminek következtében potenciálisan több különböző miRNS prekuzort is tartalmazhat.

A két módszerrel (totál RNS-ből (T) és tisztított kis RNS frakcióból (P)) elkészített kis RNS könyvtárak között meglehetősen nagy minőségi különbségeket tapasztaltunk. Ezek az eltérések főként abból adódhatnak, hogy a 15-30 nukleotid nagyságú kis RNS-ek gélből történő visszaizolálásával a rendszerből eltávolítottuk a különböző kis sejtmagi RNS-eket (>60 nukleotid), illetve a különböző méretű RNS törmelékek nagy részét, melyek lekötik a könyvtárak készítése során használt adapter szekvenciákat. Ezt tükrözi, hogy a tisztítással készített könyvtárak (P) esetében mintegy 68%-kal több potenciális, egyedi miRNS szekvenciát tudtunk azonosítani, mint a közvetlenül totál RNS-ből készített könyvtáraknál (T).

Új búza miRNS prekuzor amiRNS expresszálatásra

Az amiRNS-ek expresszióját két fő tényező befolyásolhatja: a transzkripció szintjét és helyét meghatározó promóter szekvencia, illetve a felhasznált miRNS prekuzor szekvencia, amely az adott amiRNS processzióját határozza meg. Ezért érdemes olyan miRNS prekuzort választani, amely hatékony processziója révén adott transzkripció mellett is magasabb amiRNS szintet biztosít.

A tae-2187-es azonosítóval ellátott miRNS szintje minden egyes könyvtárunkban a második vagy a harmadik helyet foglalta el, amely azt is feltételezheti, hogy egy igen jól processzálódó prekurzorról alakul ki. A miRNS prekurzorait azonosítottuk a búza két genomján (B és D). A jövőben szeretnénk a két prekurzort DNS szinten izolálni, megvizsgálni az általuk biztosított kis RNS felhalmozódás szintjét 35S promóterrel meghajtott konstrukcióban, illetve meg szeretnénk vizsgálni amiRNS átalakításra való alkalmasságukat.

Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a prekurzorról érő miRNS szekvencia 'C' kezdő nukleotiddal rendelkezik, amely tulajdonságából fakadóan nagyobb eséllyel épül be a szintén PTGS útvonalat kiszolgáló AGO5 fehérjébe, ami főként az antivirális géncsendesítésben, de különböző fejlődési folyamatok szabályozásában is szerepet játszik. Az amiRNS technológiában ilyen irányú megközelítésről ez idáig még nem adtak hírt.

Nemzetközi tudományos lapokban megjelent publikációk

1. **Tibor Nagy*, András Kis*, Szilárd Poliska, Endre Barta, Zoltán Havelda, and Ferenc Marincs (2016)**, Comparison of small RNA next-generation sequencing with and without isolation of small RNA fraction. *BioTechniques*, Vol. 60, No. 6, June 2016, pp. 273–278, Impact Factor: 2.95
2. **Kis, A., Tholt, G., Ivanics, M., Várallyay, É., Jenes, B. and Havelda, Z. (2015)**, Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to *Wheat dwarf virus* in barley is highly efficient at low temperature. *Molecular Plant Pathology*. 17: 427–437. doi: 10.1111/mpp.12291 Impact Factor: 4.72

Hazai tudományos lapokban megjelent publikációk

3. **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): 539-549
4. **Ivanics Milán, Kis András, Tóth Gábor & Jenes Barnabás (2010)**, Rozsdagombák (*Puccinia* spp.) elleni rezisztencia kialakításának lehetősége búzában transzgénikus technológiák alkalmazásával. *NÖVÉNYVÉDELEM*, 46 (5): 202-208

Egyéb tudományos művek

Konferencia kiadványok

1. **Kis, András; Ivanics, Milán; Havelda, Zoltán & Jenes, Barnabás (2015)**, Polycistronic artificial miRNAs mediated resistance to Wheat dwarf virus in barley is highly efficient at low temperature, *Poster at Hungarian Molecular Life Sciences 2015, Eger, 27-29 March 2015* ISBN: 978-6155270-15-4
2. **Kis András; Ivanics Milán; Várallyay Éva; Jenes Barnabás & Havelda Zoltán (2015)** - Wheat dwarf virus rezisztencia kialakítása árpában mesterséges miRNS felhasználásával, *XXI. Növénynevelési Tudományos Napok, Martonvásár, 2015. március 12.* ISBN: 978-963-8351-43-2

3. **Salamon Pál, Pájtli Éva, Nemes Katalin, Kis András, Salánki Katalin és Palkovics László (2014)**, Újabb adatok a *Physalis* fajokat spontán fertőző vírusokról Magyarországon, *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, MTA Székház, 2014. február 18.* ISSN 0231 2956
4. **Kis András, Bán R., Eitel G., Ivanics M., Havelda Z., Jenes B. (2013)**, MikroRNS alapú vírusrezisztencia kialakítása árpában, *Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest 2013. február 19.* ISSN 0231 2956
5. **Kis, András; Eitel, Gabriella; Ivanics, Milán; Bán, Rita; Havelda, Zoltán & Jenes, Barnabás (2013)**, Artificial miRNA-mediated virus resistance in barley, *Poster at Hungarian Molecular Life Sciences 2013, Siófok, 5-7 April 2013* ISBN: 978-615-5270-02-4
6. **Kis András, Bán R., Havelda Z., Jenes B. (2012)**, MikroRNS alapú vírusrezisztencia kialakítása árpában, *XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2012. március 6.* ISBN: 978-963-8351-38-8
7. **Ivanics Milán, Kis András, Tóth Gábor, Balogh Andrea, Takács Krisztina, Barna Balázs, Manninger Klára, Fodor József, Jenes Barnabás (2012)** Szövet-specifikus szabályozású transzgen expressziójának vizsgálata búzán, *XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2012. március 6.* ISBN: 978-963-8351-38-8

Konferencia absztraktok

8. **Kis András; Ivanics Milán; Várallyay Éva; Jenes Barnabás & Havelda Zoltán (2015)** - Wheat dwarf virus rezisztencia kialakítása árpában mesterséges miRNS felhasználásával, *Magyar Növénybiológiai Társaság, Fiatal Növénybiológusok Előadásai, Pécs, 2015. február 6.*
9. **Kis András; Eitel Gabriella; Ivanics Milán; Várallyay Éva; Bán Rita; Jenes Barnabás; Havelda Zoltán (2014)** - Wheat dwarf geminivirus rezisztencia indukálása árpában mesterséges policisztronikus miRNS felhasználásával, *FIBOK, Szeged, 2014. március 7.*

10. **Kis András, Bán R., Eitel G., Ivanics M., Jenes B., Havelda Z. (2013)**, Mesterséges miRNSre alapozott vírusrezisztencia indukálása árpában, *Gödöllő, MBK Napok 2013. november 21-22.*
11. **Kis András, Bán R., Eitel G., Ivanics M., Havelda Z., Jenes B. (2012)**, MikroRNS alapú vírusrezisztencia kialakítása árpában, *Gödöllő, MBK Napok 2012. december 4-5.*
12. **Ivanics M, Kis A, Tóth G, Balogh A, Takács K, Barna B, Manninger K, Fodor J, Jenes B (2012)**, Investigation of tissue specific transgene expression in wheat, *Advances in Plant Breeding and Biotechnology in Central Europe: Pannonian Plant Biotechnology Workshops, University of Debrecen, Centre of Agricultural Sciences, 2012.06.04-2012.06.06.*
13. **Ivanics M, Kis A, Tóth G, Jenes B (2011)**, Immature inflorescence as a new target explant for gene delivery/ transformation experiments in wheat, *Workshop of the Pannonian Plant Biotechnology Association, Tulln, Austria, 2011.05.16-2011.05.18.*
14. **Ivanics M, Kis A, Tóth G, Jenes B (2011)**, Immature inflorescence as a new target explants for gene delivery/ transformation experiments in wheat, *Plant Transformation Technologies II – International Conference, Vienna, 2011.02.19-2011.02.22.*
15. **Kis András, Bán R., Havelda Z., Jenes B. (2011)**, MikroRNS alapú vírusrezisztencia kialakítása árpában, *Gödöllő, MBK Napok 2011. november 10-1*
16. **Ivanics M, Kis A, Tóth G, Balogh A, Takács K, Barna B, Manninger K, Fodor J, Jenes B (2011)**, Szövetspecifikus szabályozású transzgén expressziójának vizsgálata búzában, *Gödöllő, MBK Napok 2011. november 10-1*
17. **Tóth Gábor, Kis András, Ivanics Milán & Jenes Barnabás, (2009)** Rozsdarezisztens transzgenikus búza. Előadás, „*MBK Napok 2009*”, *Gödöllő, 2009. november 30. - december 1.*,
18. **Ivanics, M., Balogh, A., Kis, A., Giczey, G., González-Coronel A-S., and Jenes, B. (2009)**, *Poszter at 8th International Symposium on “New development in green gene technology”, 2009. 09. 1-4., Szeged, Hungary*

19. **Kis A., Ivanics M., Csóti I., Felföldi F., Gárdonyi M., Tamás L., Jenes B. (2008)** Harmadik Generációs transzgenikus búza, „*Fiatal Kutatók az Élhető Földért*“ című tudományos konferencián, *FVM Színházterem, 2008. november 24.*
20. **Kis A., Ivanics M., Csóti I., Felföldi F., Gárdonyi M., Tamás L., Jenes B. (2008)** 3. Generációs transzgenikus búza, *MBK napok 2008, november 26-27, Gödöllő, 2008. november 17-18.*
21. **Ivanics M., Kis A., A. S. Gonzalez, Balogh A., Oreifig A., Giczey G., Tamás L., Gelencsér É., Jenes B. (2008)** Rozsdarezisztens transzgenikus búza, *MBK napok, Gödöllő, 2008. november 17-18.*