

SZAKDOLGOZAT

Pogácsás Kata

2025



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Kertészettudományi Intézet

Kertészmérnök alapképzés

Tojásgyümölcs foltos törpeség vírus azonosítása paprikán

Belső konzulens: Dr. Benyóné György Zsuzsanna
Egyetemi tanár

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** Genetika és Biotechnológia
Intézet, Növénybiotechnológia Tanszék, Kertészeti
Genetika Csoport

Külső konzulens: Dr. Salánki Katalin, Tudományos
Tanácsadó Dsc

Demián Emese, Tudományos
segédmunkatárs

Készítette: **Pogácsás Kata**

Budai Campus

2025.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Célkitűzés.....	8
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1 A paprika termesztésének jelentősége Magyarországon	9
3.2 Vírusok általános jellemzése	10
3.2.1 Méretük.....	10
3.2.2 A vírusok életrajza	10
3.2.3 A vírusok szerkezete	11
3.3 Vírusdiagnosztikai módszerek	11
3.3.1 Polimeráz láncreakció (PCR)	12
3.3.2 Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR).....	12
3.3.3 Reverz transzkriptáz kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR).....	13
3.3.4 Enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat (ELISA)	13
3.4 Paprika vírusok és terjedésük.....	14
3.5 Tojásgyümölcs foltos törpeség vírus	15
3.5.1 Földrajzi előfordulása	15
3.5.2 Gazdanövényköre.....	16
3.5.3 Vírusvektorok	16
3.5.4 Taxonómia	16
3.5.5 Morfológia	17
3.5.6 Genom szerkezet és replikáció.....	17
4. Anyag és módszertan	19
4.1 Mintagyűjtés.....	19
4.2 RNS kivonás	19
4.3 Nukleinsav sorrend meghatározás	20
4.4 Komplementer DNS előállítás RNS-ből.....	20
4.5 PCR vizsgálat.....	20
4.5.1 PCR termék tisztítása.....	22
4.6 Ligálás	22
4.7 Transzformálás	22
4.8 Plazmid izolálás.....	23
4.9 Emésztés.....	23

4.10 Sanger szekvenálás.....	24
4.11 Nukleinsav sorrend elemzés.....	24
5. Eredmények és értékelésük.....	25
5.1 RNS izolálás és minőségellenőrzés.....	25
5.2 EMDV kimutatása RT PCR módszerrel.....	26
5.3 Klónozott EMDV fragmentumok.....	27
5.4 Nukleinsav sorrend elemzés.....	29
5.5 Filogenetika.....	29
6. Következtetések és javaslatok.....	32
7. Összegzés.....	34
8. Irodalomjegyzék.....	35
Köszönetnyilvánítás.....	40
9. Nyilatkozatok.....	41
9.1 Konzulensi nyilatkozat.....	41
9.2 Hallgatói nyilatkozat.....	42
9.3 Mesterséges intelligencia használati nyilatkozat.....	43

Rövidítések

cDNS	complementary DNS - komplementer DNS
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
dsRNS	Double-stranded RNS – duplaszálú RNS
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay - Enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat
EMDV	eggplant mottled dwarf virus, tojásgyümölcs foltos törpeség vírus
FDE	formamid–formaldehid–EDTA
HTS	High Throughput Sequencing – nagy áteresztőképességű szekvenálás
LB	Lauria-Broth
NC	nucleocapsid – nukleokapszid
ORF	Open reading frame – Nyitott leolvasási keret
PCR	Polymerase Chain Reaction - polimeráz láncreakció
PMMoV	pepper mild mottle virus – paprika enyhe foltos vírusa
PVY	potato virus Y – burgonya Y vírus
RNP	ribonukleoprotein
RNS	ribonukleinsav
RT-PC	Reverse transcriptase polymerase chain reaction - Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction - Reverz transzkriptáz kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
ssRNS	Single-stranded RNA – egyszálú RNS
TBE	Tris-borate EDTA - Tris-Bórsav-EDTA
TMGMV	tobacco mild green mosaic virus – dohány enyhe zöld mozaik vírus

TMV tobacco mosaic virus – dohány mozaikvírus
ToMV tomato mosaic virus – paradicsom mozaikvírus
TSWV tomato spotted wilt virus – paradicsom bronzfoltosság vírus

1. Bevezetés

A paprika (*Capsicum annuum* L.) a világon és Magyarországon is jelentős zöldségnövény, mind gazdasági, mind táplálkozási szempontból. Magyarországon jelentős területen termesztik szabadföldön, valamint hajtattott körülmények között is. Az átlagos termésmennyiséget és minőséget számos biotikus és abiotikus tényező/stressz befolyásolja, például a növényi vírusfertőzések, melyek tünetmentesen vagy változó súlyosságú tünetekkel is jelentkezhetnek. A vírus fertőzések komoly anyagi és gazdasági károkat okozhatnak (Tóbiás *et al.*, 2017).

A világon egyre több vírushajt detektálnak, melyek fertőzik a paprikát. A hagyományos diagnosztikai módszerek, mint ELISA és PCR, megbízhatóak, azonban csak már ismert kórokozók kimutatására nyújtanak megoldást. A mára már elterjedt nagy átérésztőképességű szekvenálás (High-Throughput Sequencing, HTS) lehetővé teszi a minták teljes nukleinsav-állományának elemzését, ezáltal korábban ismeretlen, vagy rejtett vírusok azonosítását. A HTS kiemelkedő jelentőségűvé vált a növényvirologiában (Boonham *et al.*, 2014).

A Tojásgyümölcs foltos törpeség vírus (*Eggplant mottled dwarf virus*, EMDV) a *Rhabdoviridae* családba tartozó, *Alphanucleorhabdovirus* nemzetségbe sorolt negatív szálú RNS-vírus. A vírust először padlizsán növényekben írták le, azonban később megtalálták paprikában és paradicsomban is, valamint dísznövényeket és gyomnövényeket is képes fertőzni. A fertőzött növények megfigyelhető tünetei a mozaikos és klorotikus foltok, valamint törpeség és torzulások. Az EMDV terjesztésében kiemelkedő szerepet játszanak a vírusvektorok, köztük főként a kabócafajok (*Agallia ssp.*), melyek gyorsan terjesztik a vírust a termesztési körülmények között (Pappi *et al.*, 2015).

Magyarországon eddig nem detektálták az EMDV jelenlétét, esetleges megjelenése komoly kihívást is jelenthet a paprika, valamint a padlizsán termesztők számára az országban. Ezek az adatok felhívják a figyelmet a növényegészségügyi megfigyelések, és a vírusdiagnosztikai módszerek fejlesztésének fontosságára.

2. Célkitűzés

A dolgozat célja az EMDV előfordulásának vizsgálata vírustüneteket mutató paprikanövényekben, és molekuláris módszerekkel történő jellemzése. A HTS adatok elemzése a vírus jelenlétére utalt, ezért célunk az volt, hogy a vizsgálatban szereplő paprikanövényekben RT-PCR-rel igazoljuk a vírus jelenlétét. A PCR-termékek klónozását és nukleinsav sorrendjének meghatározását követően filogenetikai elemzéssel kívántuk meghatározni, hogy a magyar izolátum hogyan illeszkedik az ismert nemzetközi törzsekhez. A vizsgálat célja, hogy elsőként szolgáltatson adatot az EMDV hazai előfordulásáról, és támpontot adjon a vírus további felderítéséhez hazánkban.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A paprika termesztésének jelentősége Magyarországon

A paprika (*Capsicum annuum* L.) termesztése meghatározó szerepet tölt be Magyarország kertészeti ágazatain belül a zöldségtermesztésben. Kiemelkedő agronómiai és gazdasági jelentőségét a biológiai sajátosságai és sokoldalú felhasználhatósága adja. A paprika nem csak friss fogyasztásra alkalmas, hanem fűszerpaprika formában is fontos szerepet játszik az élelmiszeriparban. Hazánkban a fűszer- és étkezési paprika termesztése egyaránt elterjedt. A kedvező éghajlati és talajadottságokat miatt elsősorban az észak- és dél-alföldi területeken jellemző, különösen Szeged és Kalocsa környékén, ahol a fűszerpaprika-termesztésnek régi hagyományai vannak (Mártonffy, 1999).

Az elmúlt években jelentős változások figyelhetők meg a paprika termesztésében strukturális és mennyiségi szempontokból is. A magyar piros paprika betakarított mennyisége ugyan csökkent, de a hektáronkénti termésátlagában jelentős növekedést mutat, ami a korszerűbb termesztési technológiák, a hajtás elterjedése és a precíziós öntözési rendszerek alkalmazásának köszönhető (Somogyi 2009; KSH, 2024). Ezzel párhuzamosan a zöldpaprikatermesztési terület és a betakarított termésmennyiség is emelkedett. 2023-ban az étkezési paprika termése megközelítette a 90,6 ezer tonnát, míg a fűszerpaprika országos termésmennyisége 13,4 ezer tonna volt. Mindez a folyamatosan változó piaci igényeket, illetve a termesztési technológiák fejlődését tükrözi (KSH, 2024).

Jelenleg Magyarországon a paprika termesztés két fő rendszere különíthető el: a szabadföldi és a hajtattott termesztés. A szabadföldi termesztés a paprika termesztett területeinek jelentős részét lefedi, főként az Alföld melegebb éghajlatú régióban jellemző, ám az éghajlatváltozás következtében egyre nagyobb kihívásokkal szembesül a gyakori és hosszan tartó aszályos időszakok, valamint hirtelen hőmérsékletingadozások miatt. Ezzel szemben a hajtásban végzett termesztés, amely fóliasátrakban és üvegházakban zajlik, lehetőséget biztosít a környezeti hatások enyhítésére a kontrollált termesztő terület biztosításával. Habár kisebb arányt képvisel a szabadföldivel szemben, az éghajlatváltozás és a piaci igények hatására növekvő tendenciát mutat. Megfelelő hajtási technológiával kialakítható a termesztési szezon hosszabbítása, a termelés időzítése, valamint a kiszámíthatóbb termésminőség (Bene és Marselek, 2009, KSH, 2024).

A paprika termesztésének jelentős gazdasági értéke miatt különösen fontos a növényegészségügyi problémák, azon belül a vírusos megbetegedések kutatása és diagnosztizálása.

3.2 Vírusok általános jellemzése

A vírusok sajátos tulajdonságaik révén a természet egy rendkívül különleges csoportját alkotják, és ezen tulajdonságok miatt nehezen illeszthetők be az élőlények hagyományos rendszertani besorolásába. Különös természetüket jól mutatja, hogy számos tekintetben az élő és élettelen világ határán helyezkednek el, mind méretük, mind szerkezetük alapján (Gergerich *et al.*, 2020).

3.2.1 Méretük

A növényi vírusok más víruscsoportokhoz hasonlóan, jelentős méret- és szerkezetbeli változatosságot mutatnak. A legkisebb vírusok mindössze körülbelül 20 nm-esek, mely az egyik legapróbb lépték a biológiai világban. Nagyjából 100 nm nagyságú több, általánosan ismert kórokozó, mint az influenzavírus, illetve a humán immundeficiencia-vírus, vagyis a HIV. 400 nm körül vannak a himlővírusok, másnéven a poxvírusok. Az Ebola és a Marburg-vírus pedig akár az egy μm hosszúságot is elérheti fonalszerű formában. Utóbbi években fedeztek fel óriásvírusokat, melyeket pandoravírusnak és megavírusnak neveznek, amelyek mérete akár kisebb baktériumokkal is összevethető (Louten, 2016). A legkisebb, gömb alakú növényi vírusok átmérője körülbelül 30 nm, míg a fonál alakú virionok hossza elérheti a 2000 nm-t is (Gergerich *et al.*, 2020).

3.2.2 A vírusok életciklusa

Működésüket tekintve a vírusok szintén rendkívül egyediek. Egy úgynevezett obligát intracelluláris parazita csoportot alkotnak, vagyis életben maradásuk, valamint szaporodásuk kizárólag egy élő sejtben mehet végbe és maradhat fent. Saját anyagcserére nem képesek, így teljes mértékben a gazdasejt belső környezetére támaszkodnak, az önálló energianyerés, valamint fehérjeszintézisre nem képesek (Cassedy *et al.*, 2021). A fertőzés során a vírus bejut a gazdasejtbe, majd a genetikai anyaga felszabadulás módosítja a gazdasejt működési folyamatait. A vírus genomja irányítja az új vírusfehérjék és vírusgenomok szintézisét, amelyekhez a gazdasejt enzimszisztémáját használja. Az újonnan létrejövő nukleinsavak és fehérjék összeépülnek és de novo módon képződnek az új virionok. Tehát a szaporodásuk nem a sejtosztódáshoz hasonlóan történik (Louten, 2016). A növényi vírusok növényen belüli terjedésében nagy szerepet játszanak a sejtközötti kapcsolatok, a plazmodezmák, valamint a

vírus un mozgásfehérjéi, amelyek lehetővé teszik a vírusok számára sejtről sejtre történő terjedést. A mozgásfehérjék ezenkívül a vírus genomot is védik, megakadályozzák a nukleinsav degradációját. Emellett a vírusok gyakran használják a sejtvázas (aktinfilamentumok, mikrotubulusok) elemeit a sejten belüli transzportoz. Ez elősegíti, hogy a vírus a fertőzés korai szakaszában gyorsan terjedjen a szomszédos sejtekbe (Heinlein, 2015).

3.2.3 A vírusok szerkezete

A vírusok genetikai anyagukban is különböznek a sejtekkel rendelkező élőlényektől. A szervezetek többségének genetikai állománya kettős szálú DNS-ből (dsDNS) áll, a vírusok genomját alkotják DNS vagy RNS molekulák is, egyszálú (ss) vagy kétszálú (ds) formában is, azonban minden vírus genomban csak egyfajta nukleinsav található (Louten, 2016). Genomméretüket tekintve is nagy változatosságot mutatnak, a legkisebb vírusok genom mérete csak néhány ezer bázispár, míg az óriásvírusoké több millió bázispár méretű is lehet (Gergerich *et al.*, 2020). A virionok a genetikai anyagukat a sejten kívüli, kedvezőtlen környezetben egy speciális fehérjeburokkal, a kapsziddal védik. A kapszid felépítése ismétlődő fehérjeegységekből áll, ami szilárd, mégis rugalmas burkot képezve biztosítja a nukleinsav védelmét. A fehérjeburok és a benne elhelyezkedő nukleinsav együttesen alkotja a nukleokapszidot, amely a növényi vírusok esetében leggyakrabban helikális (henger) vagy ikozaéderes (gömbszerű) szerkezetet mutat (Shtykova *et al.*, 2024). Előfordulnak olyan vírusok is, amelyek esetében a kapszidot egy lipidburokkal (envelope) is körülveszi, mely a gazdasejt membránjából származik, annak a folyamatnak a során mikor elhagyják a sejtet. A lipidburok kulcsfontosságú vírusfehérjéket tartalmaz, melyek a gazdasejt felismerésében és fertőzés folyamatában nélkülözhetetlenek. Ugyanakkor ezek a vírusok érzékenyebbek a környezeti hatásokra, mint például a hőre, szárazságra vagy fertőtlenítőszerre ((Kormelink *et al.*, 2011; Heinlein, 2015).

3.3 Vírusdiagnosztikai módszerek

A növényi vírusok gyors és pontos azonosítása kiemelt jelentőségű a növénykórtan területén. A fertőzés következtében kialakult tünetek ugyanis gyakran hasonlítanak más kórokozókhoz, például gombák vagy baktériumok által okozott elváltozásokhoz, továbbá sok fertőzés látens, vagyis tünetmentes formában zajlik (Kanapiya *et al.*, 2024). A járványok megelőzésében valamint a terjedés visszaszorítása érdekében elengedhetetlenek a megbízható diagnosztikai módszerek alkalmazása (Kutnjak *et al.*, 2021). Emellett a diagnosztika módszerek fontos szerepet töltenek be a rezisztencianemesítési programokban, valamint a növényegészségügyi helyes intézkedések kialakításában (Boonham *et al.*, 2014). A

hagyományos diagnosztikai eszközöket, mint a növényi tünetek vizsgálatát és az elektronmikroszkópos megfigyelést, ma már inkább kiegészítő módszerként alkalmazzák. A korszerű molekuláris és immunológiai technikák ugyanis gyors, specifikus és érzékeny eredményeket biztosítanak (Kanapiya *et al.*, 2024). A modern növényvirológiában a molekuláris technikák közül kiemelten alkalmazott eljárások közé tartozik a polimeráz láncreakció (PCR), a reverz transzkripció PCR (RT-PCR), a valós idejű PCR (RT-qPCR), valamint az enzimhez kapcsolt immunszorbens assay- (ELISA) (Boonham *et al.*, 2014).

3.3.1 Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR egy molekuláris biológiai technika, amely során a DNS egy specifikus szakaszát mesterségesen sokszorozzák fel laboratóriumi körülmények között. Célja, hogy a célszekvencia pontosan és gyorsan kimutathatóvá váljon, ami nagymértékben megkönnyíti az elemzést és az azonosítást (Mumford *et al.*, 2006). A folyamat első lépése a vizsgálni kívánt minta izolálása a fertőzött vagy fertőzés gyanús növényi részből. Ehhez specifikus primereket használnak, melyek a célszekvenciához kötődnek, valamint egy hőstabil DNS-polimeráz enzimet és nukleotidokat. A reakció egy termociklusos készülékben történik, melyben három fő szakasz ismétlődik: denaturáció, annealáció és extenzió. A ciklusok ismétlődése során nagyszámú ampikon, vagyis sokszorosított DNS-fragmentum keletkezik, amennyiben a vizsgált nukleinsav is jelen van a mintában. Ezeket leggyakrabban agaróz gélelektroforézissel vizsgálják, ahol a fragmentumokat méret alapján, elektromos áram segítségével választják szét. A DNS-sávokat etidium-bromiddal festik meg, amely a kettős szálú DNS bázispárjai közé ékelődik be (interkalál), így a fragmentumokat UV-fény alatt fluoreszcens jelet adva láthatóvá teszi. Az így megjelenő sávok igazolják a PCR-termék jelenlétét és méretét (Boonham *et al.*, 2014).

3.3.2 Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az RT-PCR egy olyan molekuláris diagnosztikai módszer, melyre az RNS-alapú vírusok kimutatására alkalmazzák, így kiemelt szerepet kap a növényvirológiában, különösen olyan kórokozóknál, melyek RNS alapú genetikai állománnyal rendelkeznek. A folyamat első lépése a komplementer DNS (cDNS) előállítás a vírus RNS-ből reverz transzkriptáz enzim segítségével. Ez elengedhetetlen lépés, mivel a DNS-polimeráz közvetlenül nem képes RNS-templárról új szálakat szintetizálni (Jeong *et al.*, 2014). A cDNS elkészítése után a hagyományos PCR technikával amplifikálják a célszekvenciát (Mumford *et al.*, 2006). A módszer pontosságát az biztosítja, hogy a primereket a vírusgenom egy specifikus régiójára tervezik, ami nagy érzékenységet és megbízhatóságot eredményez (Jeong *et al.*, 2014). Ugyanakkor nehézséget

jelent, hogy az RNS molekulák rendkívül instabilak, ezért a minták megfelelő kezelésére különös figyelmet kell fordítani. Emellett a vírusok gyors mutációs képessége miatt előfordulhat, hogy a specifikus primerkötő helyek változása csökkenti a kimutatások hatékonyságát (Mumford *et al.*, 2006).

3.3.3 Reverz transzkriptáz kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

Az RT-qPCR diagnosztikai módszerek legmodernebb és széles körben alkalmazott technikája. A reverz transzkripció és a valós idejű polimeráz láncreakció kombinációja lehetővé teszi az RNS-genommal rendelkező vírusok kimutatása mellett a vírusrészlet pontos meghatározását is. A módszer első lépéseként cDNS készül a vírus RNS-ből, majd amplifikáció és detektálás fluoreszcens jelzőanyaggal történik, speciális termociklusos gépben. A fluoreszcencia mérése többféle módon megoldható, a legegyszerűbb módja a SYBR Green festék alkalmazása, amely a kettős szálú DNS-hez kötődve bocsát ki jelet, ám hátránya, hogy nem specifikus, így nem kívánt PCR-termékekhez is kapcsolódhat. Pontosabb eredményt biztosít a TaqMan próba, ami fluoreszcens festéket és kioltót is tartalmaz. A reakció során a polimeráz exonukleáz aktivitása segítségével aktiválja a fluoreszcens jelet (Rubio *et al.*, 2020). Az RT-qPCR nem csak érzékeny és specifikus, hanem rendkívül gyors eredményt ad, továbbá multiplex reakciók is végezhetők, amelyek során egyszerre több vírus is kimutatható. Ez különösen előnyös a komplex fertőzések vizsgálatában és a vírusrészlet meghatározásában (Costa *et al.*, 2022).

3.3.4 Enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat (ELISA)

Az ELISA az egyik leggyakrabban alkalmazott immunológiai diagnosztikai módszer a növényvirologiában, amely által a vírusok és a szervezet által termelt antivirális antitestek is kimutathatók (Boonham *et al.*, 2014). Alapját az antigén és az antitestek közötti kölcsönhatás adja, amely során egy enzimhez kapcsolt antitest kötődik a célmolekulához, ha az jelen van a mintában. Amennyiben a fertőzés fennáll és az antitest képes kapcsolódni, egy színes terméket állít elő a szubsztrátból, az enzimhez hozzáadott színtelen kromogén segítségével. A szín intenzitása arányos az antigén vagy antitest mennyiségével, és spektrofotométerrel mérhető (Mehetre *et al.*, 2021). Az ELISA diagnosztikai módszer használata bár speciális laboratóriumi körülményeket igényel, de gyors, megbízható és költséghatékony módszer, emellett alkalmas nagyszámú minta párhuzamos vizsgálatára is, ezért sokáig az egyik legfontosabb eszköz volt a növényi vírusok diagnosztikájában (Boonham *et al.*, 2014).

3.4 Paprika vírusok és terjedésük

A paprika (*Capsicum annuum* L.) termesztése jelentős gazdasági szerepet tölt be Magyarországon. Termesztése során azonban a gazdálkodók számos nehézséggel néznek szembe, amelyek közül kiemelkedő szerepet töltenek be a vírusos megbetegedések. Ezen fertőzések komoly mennyiségi és minőségi problémákat okoznak a termelőknek (Tóbiás *et al.*, 2017). A vírus okozta megbetegedések ellen nehéz időben és megfelelő technikával fellépni, mivel a tünetek nem mindig egyértelműek és felismerhetők, mivel előfordulhat, hogy a növények már fertőzöttek, de tüneteket még nem mutatnak. Emellett a vírusok rendkívül gyors terjedése sem kedvező a termesztek számára, különösen az intenzív termesztési körülmények között (Ojinaga *et al.*, 2022).

A paprikaállományokban a fertőzések az esetek többségében nem egyetlen kórokozóhoz köthetők, hanem több vírus együttes jelenlétéhez, ami tovább nehezíti a diagnosztikát és a védekezést egyaránt. Magyarországi és nemzetközi vizsgálatok alapján az állományokban leggyakrabban előforduló vírusok a burgonya Y vírus (potato virus Y - PVY), a dohány mozaik vírus (tobacco mosaic virus - TMV), a paradicsom mozaik vírus (tomato mosaic virus - ToMV), a paradicsom bronzfoltosság vírus (tomato spotted wilt virus - TSWV), illetve a paprika enyhe foltos vírus (Pepper mild mottle virus - PMMoV) (Blanchard *et al.*, 2008; Moury és Verdin, 2012; Çulal-Kılıç *et al.*; 2019; Antignus *et al.*, 2008;). Ezek a vírusok a növény fertőzése során különböző vírustüneteket indukálnak, gyengítik annak életfolyamatait, ami jelentős termésveszteséget, minőségi romlást és súlyos esetben az állomány teljes pusztulását is okozhatják (Ojinaga *et al.*, 2022).

A vírusos megbetegedések terjedését számos összetett tényező befolyásolja. Egyes vírusokat rovarvektorok, például a levéltetvek vagy tripszek közvetítenek, mások mechanikai úton, sérülések, növényápolási munkák során kerülnek a növényre (Ng és Falk, 2006). Emellett előfordulhat, hogy fertőzött szaporítóanyaggal kerül be a vírus az állományba (Kenyon *et al.*, 2014). A fertőzések súlyosságát nagymértékben befolyásolja, hogy a paprikát szabadföldi vagy zárt rendszerben termesztik, valamint milyen termesztési technológiát alkalmaznak (Ojinaga *et al.*, 2022). Szabadföldi termesztésben leggyakrabban megjelenő vírus a CMV amelyet elsődlegesen a levéltetvek terjesztenek nem-perzisztens módon, vagyis már rövid táplálkozás során átadhatják a kórokozót, ugyanakkor fertőzőképességük gyorsan megszűnik (Moury és Verdin, 2012). A vírusok terjedését elősegítik a környezeti tényezők is, például a mérsékelt, párás klíma, illetve a gyomnövények, melyek rezervoárként szolgálva termesztési szezonok között is fenntartják a vírusokat (Kenyon *et al.*, 2014). A védekezés alapja a megelőzés,

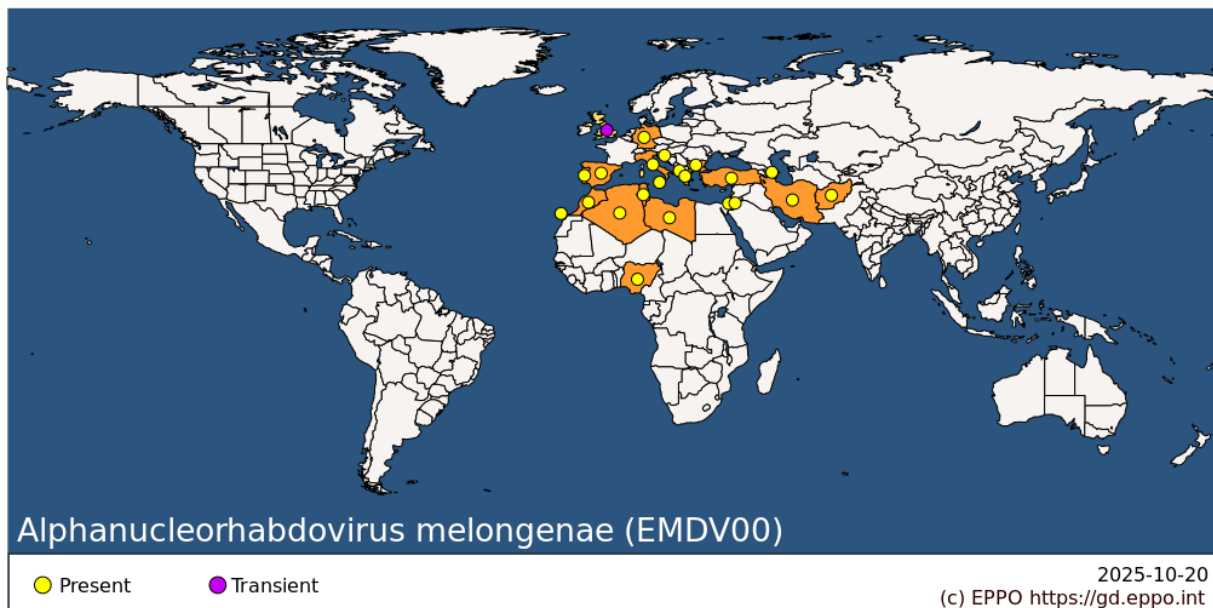
amelyben kiemelt jelentősége van a vektorok elleni célzott védekezésnek, a rendszeres gyomirtásnak és a növényi maradványok eltávolításának. Szabadföldi termesztésben a rovarhálók alkalmazása szintén hatékonyan csökkentheti a vírusfertőzések kockázatát (Legarra *et al.*, 2010).

A zárt termesztési környezetben, fóliasátrakban és üvegházakban, más vírusok dominálnak. Gyakoriak a tobamovírusok (TMV, ToMV, PMMoV), amelyek magról terjedhetnek, ezért különös figyelmet igényel a szaporítóanyag ellenőrzése. Emellett mechanikai úton és emberi munkafolyamatok során is könnyen átvihetők, amit tovább súlyosbíthat az üvegházi melegebb mikorklíma és a sűrű növényállomány (Moury és Verdin, 2012). A TSWV is gyakran előfordul, aminek fő vektora egy behurcolt kártevő, a nyugati virágtripsz (*Frankliniella occidentalis*). Ez a rovar perzisztens módon terjeszti a vírust, vagyis csak lárva korban válik vírushordozóvá, de ezután fertőzőképességét élete végéig megőrzi (Rotenberg *et al.*, 2015). Hidroponikus üvegházi termesztésben a tobamovírusok, köztük a TMV és rokon fajai, a közös, recirkulált tápoldaton keresztül is terjedhetnek, amit paprikán is igazoltak (Park *et al.*, 1999). A vízzel terjedő vírusok általánosságban is jelentős kockázatot jelentenek a recirkulációs rendszerekben, ahol a fertőzés gyorsan elérheti a teljes állományt (Mehle és Ravnikar, 2012). A védekezés legfontosabb eleme ebben az esetben is a megelőzés, amely magában foglalja a rezisztens fajták termesztését, a vírusmentes szaporítóanyag használatát és a szigorú higiéniai szabályok betartását (Kenyon *et al.*, 2014).

3.5 Tojásgyümölcs foltos törpeség vírus

3.5.1 Földrajzi előfordulása

A Tojásgyümölcs foltos törpeség vírus leggyakoribb elterjedése a Földközi-tenger térségében figyelhető meg, azonban világszerte több régióban is kimutatható. Európán belül kimutatták számos országban: Albániában, Bulgáriában, Horvátországban, Franciaországban, Németországban, Görögországban, Olaszországban, Portugália, Törökország, Szlovéniában, Spanyolországban, Egyesült Királyságban. Ázsiában leírták Azerbajdzsánban, Afganisztánban, Iránban, Izraelben, Jordániában, valamint Afrikában is detektálták Algériában, Líbiában, Marokkóban, Nigériában, Tunéziában. A vírus előfordulását a világon az EPPO térképe alapján látható (1. ábra). Ezen kívül Tang és munkatársai (2014) kimutatták a vírust egy fertőzött *Hibiscus syriacus* növényen, mely Ausztráliából származott.



1. ábra: EMDV elterjedése a világon (EPPO, 2025)

3.5.2 Gazdanövényköre

A vírus gazdanövény köre széles, főként mezőgazdasági és dísnövény fajokat fertőz, valamint megfigyelték vadon élő fajokon is. Gazdaságilag jelentős fajok közül a *Solanaceae* család egyes tagjaira van jelentős hatással, köztük a tojásgyümölcs (*Solanum melongena*), paradicsom (*Solanum lycopersicum*), burgonya (*Solanum tuberosum*), valamint a paprika (*Capsicum annuum*) növényekre. Ezen kívül előfordul uborka (*Cucumis sativus*) és dohány (*Nicotiana tabacum*) növényeken is. Dísnövények közül találtak fertőzött egyedeket kínai enyvesmag (*Pottisporum tobira*), japán lonc (*Lonicera japonica*), kínai hibiszkusz (*Hibiscus rosa-sinensis*), kerti mályvacserje (*Hibiscus syriacus*), tövises kapri (*Capparis spinosa*), valamint kerti hortenzia (*Hydrangea macrophylla*) fajokon is (Pappi *et al.*, 2015).

3.5.3 Vírusvektorok

A vírus átvitelében hordozó és közvetítőként elsődlegesen a mezei kabóca-félék (*Cicadellidae*) családja szerepel, melyek közül néhány kulcsfontosságú faj emelhető ki, az *Agallia vorobjevi*, az *Anaceratagallia ribauti*, valamint az *Anaceratogallia laevis*. Ezen fajok nem csak hordozói a vírusnak, hanem perzisztens módon képesek tovább is adni, amely hozzájárul a vírus széles körű terjedéséhez (Babaie és Izadpanah, 2003).

3.5.4 Taxonómia

A Tojásgyümölcs foltos törpeség vírus (Eggplant mottled dwarf virus - EMDV) taxonómiai besorolása alapján az *Alphanucleorhabdovirus melongenae* fajhoz tartozik, amely az *Alphanucleorhabdovirus* nemzetség tagja (*Rhabdoviridae*, *Mononegavirales*) (ICTV, 2023).

A *Rhabdoviridae* család rendkívül diverz és változatos csoportot alkot, amely egyaránt képes gerincesek, gerinctelenek és növények fertőzésére is. A család tagjainak jelentős részét ízeltlábú vektorok terjesztik gerinces vagy növényi gazdaszervezetbe (Dietzgen *et al.*, 2017).

3.5.5 Morfológia

A rhabdovírusok negatív irányultságú, egyszálú RNS (ssRNS) genommal rendelkeznek. Virionjaik burkkal rendelkeznek, többnyire gömbölyded vagy pálcika (bacilliform) alakúak, külső lipidburkukat a gazdasejt nukleáris membránjából történő bimbózással szerzik. A lipoproteinből álló burok alatt a helikális szerkezetű nukleokapszid helyezkedik el, amely a vírus genomját és a kapcsolódó fehérjéket tartalmazza. A növényeket fertőző rhabdovírusok rendszerint bacilliform alakúak, 100–430 nm hosszúság és 45–100 nm átmérő tartományban (Dietzgen *et al.*, 2017). Az EMDV esetében azonban a tisztított víruspreparátumokban elsősorban gömbölyded virionok figyelhetők meg, átmérőjük átlagosan 90 nm, hosszúságuk pedig 120 és 180 nm. A preparátumok glutaraldehides fixálása után megfigyelhetővé váltak a pálcika alakú virionok is, melyek hosszúsága 220 és 230 nm között volt (DPV, 2000).

3.5.6 Genom szerkezet és replikáció

Az EMDV teljes genomszekvenciáját egy Iránból származó fertőzött tojásgyümölcs izolátumból határozták meg (Babaie, 2015). A *Rhabdoviridae* család genomja általában öt kanonikus gént tartalmaz: nukleoproteint (N), foszfo proteint (P), mátrixfehérjét (M), glikoproteint (G), és RNS-függő RNS polimerázt (L). Ezek a gének a vírus alapvető funkcionális, strukturális egységeit alkotják, valamint a róluk átíródó fehérjék elengedhetetlenek a vírus életciklusához. Az rhabdovírusok genomja az alapgének mellett gyakran tartalmaz járulékos géneket is, melyek nyitott leolvasási keretekben (ORF) helyezkednek el, ezek száma legtöbbször 5 és 10 közé esik. Ezek befolyással vannak a transzkripció szabályozására, a gazdanövény patogenitására, valamint a rovarvektorokon keresztüli vírusátvitel folyamatára (Dietzgen *et al.*, 2017). Az EMDV genomja hét ORF-et tartalmaz (2. ábra), a következő sorrendben: N (nukleokapszid), X (ismeretlen funkciójú fehérje), P (foszfo proteint, polimeráz kofaktor), Y (feltételezett mozgásfehérje), M (mátrixfehérje), G (glikoprotein) és L (RNS függő RNS polimeráz) (Babaie *et al.*, 2015). Ezek a gének a genom 3' végétől az 5' vég felé íródnak át a csökkenő gyakorisággal. A genom végein található a nem transzlálódó szekvenciák (leader és trailer), melyek szabályozó szerepet töltenek be a transzkripcióban és a replikációban (Dietzgen *et al.*, 2017).



2. ábra EMDV genom szerveződése (Babaei *et al.*, 2021)

A vírusrészecskék szerkezetét az RNS-genom és az azt körülvevő ribonukleoprotein komplex (RNP) alkotja, amelynek fő komponensei a nukleoprotein (N), a foszfoprotein (P) és az RNS-függő RNS-polimeráz (L). Ezek a fehérjék helikálisan rendeződnek, és együtt hozzák létre a nukleokapszid magfehérje-komplexet, amely a vírus replikációjához és transzkripciójához elengedhetetlen (Riedel *et al.*, 2020). A nukleokapszidot a gazdasejt membránjából származó lipidburok alatt elhelyezkedő mátrixfehérje (M) veszi körül, amely kulcsszerepet játszik a virion szerkezetének stabilizálásában és a nukleokapszid–lipidburok kapcsolat kialakításában. Az M fehérje ön-asszociációs képessége szintén hozzájárul a részecske szerkezeti integritásához (Graham *et al.*, 2008).

A vírus replikációjához és transzkripciójához, mint negatív szálú RNS-vírus, egy aktív ribonukleoprotein (RNP) komplex szükséges, amelyet az N, P és L fehérjék alkotnak. A folyamat szabályozásában cisz-elemként a genom 3' leader és 5' trailer nem kódoló régiói játszanak szerepet, míg transz-elemként a vírus által kódolt alapfehérjék biztosítják a polimeráz-komplex működését (Dietzgen *et al.*, 2017; Babaie *et al.*, 2015). A nukleorhabdovírusokra jellemzően a replikáció a sejtmagban zajlik, ami a fertőzött sejtekben a sejtmagok jelentős megnagyobbodásához vezet (Jackson *et al.*, 2005).

4. Anyag és módszertan

4.1 Mintagyűjtés

A jelen vizsgálatokhoz használt minták korábban, 2020. június 5-én Szentesen kerültek begyűjtésre és a 45-ös 46-os sorszámot kapták (3. ábra). A tünetek dokumentálását követően a bogyó- és levélminták lefagyasztásra kerültek, majd a későbbi felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on voltak tárolva.



3. ábra 45-ös, 46-os paprika mintákról készült képek. A leveleken érsárgulás, sárga foltok, és torzulás figyelhető meg. Bogyókon deformitás és a rücskös mintázat volt jellemző (Fotó: Dr. Almási Asztéria)

4.2 RNS kivonás

Az RNS-ek kivonását a Zymo Direct-Zol Kit-tel (Zymo Research, USA) végeztük a gyártó utasításai alapján. Az tisztított RNS-ek minőségellenőrzéséhez etídium-bromid (EtBr), fluoreszkáló festék tartalmú 1%-os agaróz 1xTBE gélt használtunk. Az elválasztáshoz/ RNS minőségének ellenőrzéséhez $3\text{ }\mu\text{l}$ RNS-t $2\text{ }\mu\text{l}$ FDE (formamid–formaldehid–EDTA) denaturáló

pufferben hődenaturáltuk 65°C-on 5 percre. A nukleinsav koncentráció és -tisztaság meghatározása NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, USA) történt. Mivel az RNS-ek rendkívül instabilak, a mintákat -70°C-on tároltuk.

4.3 Nukleinsav sorrend meghatározás

A nagy átteresztőképességű szekvenáláshoz (HTS – High Throughput Sequencing) öt paprika egyedi RNS-éből összeállított keverék készült. Ez tartalmazta a 45. és 46. mintákat és még további három paprika növény RNS-ét. Mindegyik mintából 1,5 µg-ot mértünk bele a keverékbe. A hosszú, nem kódoló RNS-ek szekvenálása a Novogene lncRNA-seq szolgáltatásával történt, amely Illumina NovaSeq 6000 platformon, páros végű 150 bp hosszú olvasási stratégiával végezte el a minták szekvenálását. A kapott szekvenciaadatok bioinformatikai elemzése a Geneious Prime 2025.2 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand) szoftver segítségével történt.

4.4 Komplementer DNS előállítás RNS-ből

A komplementer DNS (cDNS) szintézisét két lépésben végeztük a RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) segítségével. Első lépésként a denaturálást végeztük, amely során 500 ng RNS-hez adtunk 1 µl 100 µM-os Random Hexamer Primert, majd kiegészítettük annyi nukleáz mentes vízzel, hogy a végtérfogat 4,5 µl legyen. Az így kapott elegyet hőblokkba helyeztük 5 percre 65°C-ra, hogy az indító szekvenciák be tudjanak kötődni a denaturált RNS-hez. Ezután azonnal jégre helyeztük a mintákat, ezzel stabilizálva az RNS-primer hibridet. Következő lépésben a reverz transzkripcióhoz reakció elegyet mértünk össze az alábbiak szerint: 2 µl 5X Reaction Buffer-t, 1 µl 10 mM-os dNTP-t, 0,5 µl 20 U/µl RiboLock RNase Inhibitor-t és 1 µl 200 U/µl RevertAid RT reverz transzkriptázt mértünk össze. Az így kapott reakció keveréket az előzőekben előkészített RNS-primer hibridhez adtuk, majd 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubálást követően 42°C-ra tettük 60 percre az enzim megfelelő működésének biztosítására. Az elkészült cDNS-t hosszabb időre való tároláshoz -20°C-ra helyeztük.

4.5 PCR vizsgálat

A polimeráz láncreakció vizsgálat elvégzéséhez az 1. táblázatban látható Alfaro-Fernández *et al.* (2024) által leírt primerpárt használtunk, mely a vírus L génjére lett tervezve, ami egy konzervált régió és az RNS függő RNS polimerázt (RdRP) kódolja. A PCR reakció

elvégzéséhez a Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit enzimeit használtuk, melyhez az elegyet a 2. táblázatban leírtak alapján állítottuk össze 50 μ l végtérfogatra számítva.

1. táblázat EMDV kimutatásához használt primerek szekvenciái

Vírus neve	Eggplant mottled dwarf virus
Forward primer	EMDV-PL1a: ATGGGGGCATCCTATCATAGA
Reverse primer	EMDV-PL2b: GCGACGTACTTTATATCACACACTGTCAT
Referencia genomi pozíció	8165-8185 és 9189-9216 között
PCR termék hossza	1053 bp
Anneálás hőmérséklet	60°C

2. táblázat. A PCR során használt reagensek és mennyiségük.

Reagens	Mennyiség
5X Phusion HF Buffer	10 μ l
20 μ M Forward Primer	1,25 μ l
20 μ M Reverse Primer	1,25 μ l
10 mM dNTP	1 μ l
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ μ l)	0,5 μ l
Nukleáz mentes víz	35 μ l
Templát (cDNS)	1 μ l

A reakció az alábbi protokoll alapján ment végig: a kezdeti denaturálást 98°C-on 30 másodpercig végeztük, hogy a kettős szálú DNS teljesen szétváljon. Ezt követően 30 ciklusban ismételtük a denaturálás, anneálás, extenziós lépéseket. A denaturálás 98°C-on 10 másodpercig, az anneálás 60°C-on 10 másodpercig történt a primerek specifikus kötődésének biztosítására, majd az extenzió 72°C-on 30 másodpercig zajlott. Végül a 30 ciklus után egy

plusz extenziós lépést iktattunk be ismét 72°C-on 5 percig, hogy az enzimek az befejezzék a megkezdett szálak átírását. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen elektroforézis segítségével ellenőriztük.

4.5.1 PCR termék tisztítása

A termékek tisztítását a GeneJET PCR Purification Kit-tel (Thermo Scientific, USA) végeztük és a gyártó utasításai szerint jártunk el. A visszaoldást 25 µl Elution Buffer-ben végeztük.

4.6 Ligálás

A megtisztított PCR termék klónozásához a CloneJET PCR Cloning Kit-et (Thermo Scientific, USA) alkalmaztuk. A készletben található pJET 1.2/blunt klónozó vektor olyan letális gént tartalmaz, amelyet a DNS-inzert beillesztése a klónozási helyen megszakít, így kizárólag azok a sejtek képesek felszaporodni, melyek rekombináns plazmidot hordoznak, tehát a vektorba sikeresen beépült a vírus eredetű DNS szekvencia. A folyamat elvégzéséhez az elegyet a 3. táblázatban leírtak alapján állítottuk össze.

3. A ligálás során használt reagensek és mennyiségük 10 µl végtérfogatra.

Reagens	Mennyiség
2x Reaction Buffer	5 µl
pJET 1.2/blunt Cloning Vektor (50ng/µl)	0,5 µl
T4 DNA Ligase	0,5 µl
PCR termék	4 µl

A mintákat rövid ideig kevertük (3-5 másodperc), majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, míg végbement a reakció.

4.7 Transzformálás

A kész ligátumból 5 µl-t adtunk a jégen felolvasztott 100 µl *Escherchia coli* DH5α kompetens sejtekhez. Az így kapott elegyet 20 percig inkubáltuk jégen. A hősokkhoz 42°C-on tartottuk 1 percig, majd rögtön jégre helyeztük. Ezután steril fülkében az elegyre ráértünk 500

μl folyékony Luria-Broth (LB) táptalajt és 37°C -on 1 órán keresztül rázattuk a keveréket a baktériumok regenerálódása és a szelekciós marker gén expressziójának elősegítése miatt. Ezt követően lecentrifugáltuk a mintánkat és a töményítés érdekében $300 \mu\text{l}$ felülúszót (táptalajt) eltávolítottunk, majd a maradék $200 \mu\text{l}$ -rel óvatosan szuszpendáltuk a baktériumokat. A szélesztéshez ampicillin tartalmú szilárd LB táptalajt készítettünk. A táptalajhoz $17,5 \text{ g}$ LB Agar high salt-ot (Duchefa Biochemie, Netherlands), 500 ml steril vízben oldottunk fel melegítve, folyamatos kevertetés mellett. A homogén oldatot kuktában sterilizáltuk, majd hagytuk hűlni kézmeleg hőmérsékletűre és hozzáadtunk az 50 mg/ml töménységű ampicillinből 1 ml -t. A táptalajt sterilfülkében műanyag Petricsészékbe osztottuk, majd amint megszilárdult a baktériumos elegyből $150 \mu\text{l}$ -t szélesztettünk ki egy Petricsészébe. Egy éjszakán keresztül inkubáltuk 37°C -on. Az így felnőtt baktériumtelepekből kiválasztottuk azt a hármat, amelyek a legerőteljesebben növekedtek és steril fülkében 3 ml ampicillin tartalmú folyékony LB táptalajba oltottuk. A kolóniák leoltását steril pipettaheggyel végeztük, majd 37°C -on rázattuk egy éjszakán át.

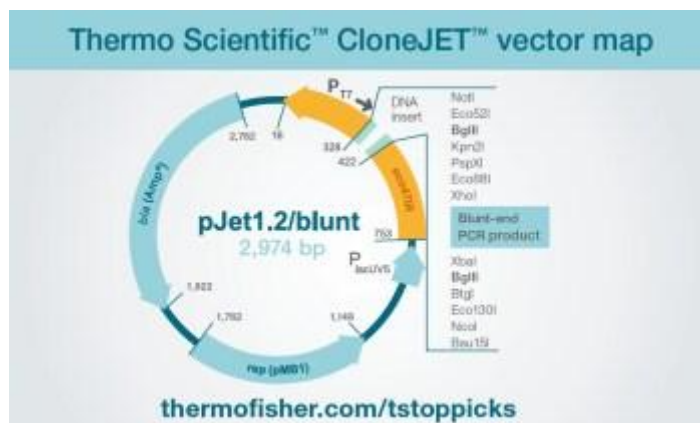
4.8 Plazmid izolálás

A folyékony táptalajban felszaporított baktériumokat lecentrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük. A plazmidizoláláshoz a GeneJET Plazmid Miniprep Kit-et (Thermo Scientific, USA) használtuk a gyártó előírása szerint. A folyamat végén a plazmidot $50 \mu\text{l}$ elúciós pufferrel eluáltuk az oszlopról.

4.9 Emésztés

A tisztított plazmidokat restrikciós enzimekkel emésztettük meg, hogy leellenőrizzük, melyik tartalmazza a megfelelő méretű DNS fragmentet.

Az emésztéshez $2 \mu\text{l}$ plazmidot használtunk, amihez $2 \mu\text{l}$ $10\times$ Tango puffert, $0,2 \mu\text{l}$ XhoI és $0,4 \mu\text{l}$ XbaI enzimet ($10\text{U}/\mu\text{l}$, Thermo Scientific, USA) mértünk össze, majd a reakcióelegyet $10 \mu\text{l}$ végtérfogatra egészítettük ki nukleázmentes víz hozzáadásával. Az emésztés eredményét EtBr tartalmú, 1% agaróz gélen ellenőriztük. A megfelelő méretű inszerttel rendelkező plazmidokból mindkét minta esetében egyet kiválasztottunk és elküldtük Sanger szekvenálásra.



4. ábra. A pJET1.2/blunt vektor térképe (forrás: Thermo Fisher Scientific).

Azért Xho1 és Xba1 enzimeket választottuk, mert a Tango pufferben optimálisan tudnak együttműködni és a restrikciós hasító helyeik a vektoron az inszert két oldalán helyezkedik el így a beépült az inszert kivágódik (4. ábra).

4.10 Sanger szekvenálás

A szekvenálást az Eurofins BIOMI Kft. végezte, két irányból, amihez a pJet 1.2 forward sequencing primert (5'-d(CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC)-3') és a pJet 1.2 reverse sequencing primert (5'-d(AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG)-3') használták.

4.11 Nukleinsav sorrend elemzés

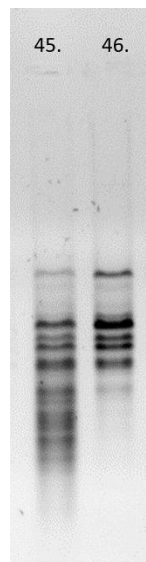
Az elkészült szekvenciák ellenőrzéséhez és összeállításához a Cromas programot (Technelysium Pty Ltd) alkalmaztuk. A méretre vágott, tisztított vírus szekvenciákat az NCBI Blastn programmal elemeztük a hasonló szekvenciák azonosítása céljából. A filogenetikai elemzéshez és a törzsfá elkészítéséhez a MEGA12 programot használtuk (Kumar *et al.*, 2024).

5. Eredmények és értékelésük

Az alábbiakban bemutatom a paprika mintákból izolált RNS-ek minőségi vizsgálatának, az EMDV kimutatásának és szekvencia-analízisének eredményeit, valamint a filogenetikai elemzés főbb megállapításait.

5.1 RNS izolálás és minőségellenőrzés

Az RNS izolálása során alapvető követelmény, hogy a kapott RNS tiszta legyen, és ne tartalmazzon genomiális DNS-t. Ez különösen fontos abban az esetben, ha a minták nagy áteresztőképességű szekvenálásra (HTS) kerülnek, hiszen a DNS jelenléte torzíthatja az eredményeket. A genomiális DNS eltávolítását protokollnak megfelelően végeztük DNáz I. enzimmel, amely hatékonyan lebontotta az esetlegesen jelenlevő DNS-t, ezzel biztosítva, hogy a további vizsgálatokhoz megbízható, tiszta RNS mintákat kapjunk. Az RNS kivonás során Trizol alapú módszert alkalmaztunk oszlopos tisztítással kiegészítve, amely lehetővé tette az alkalmazott oldószerek maradványainak eltávolítását, ami által az RNS-ek tisztasága tovább javult. A folyamat célja az volt, hogy tiszta, ép, tehát nem bomlott RNS-eket kapjunk, melyet agaróz gélelektroforézissel ellenőriztünk. A gélen jól látható riboszómális RNS sávok igazolták a minták jó minőségét, ugyanakkor a 45-ös minta esetében enyhe degradáció megfigyelhető volt (5. ábra).



5. ábra. 45-ös és 46-os paprika minta izolált RNS mintázata. Az elválasztáson FDE denaturáló mintapuffert alkalmaztunk, és a vizsgálathoz 2 μ l RNS-t használtunk fel. Mindkét mintában megfigyelhetők a riboszómális RNS-ek, amely az izolátumok megfelelő integritását jelzik.

A sikeres HTS vizsgálat előfeltétele az RNS megfelelő tisztasága és mennyisége. Ennek mérésére az optikai denzitás (OD) arányokat határoztuk meg NanoDrop 2000 spektrofotométerrel. A mérések során az OD260/280 és a OD260/230 értékeknek van jelentősége, mivel RNS esetében szükséges elérniük a 2,0 értéket. Ez mutatja, hogy a minták fehérje- és egyéb szennyeződésektől mentesek. A kapott mérési eredményeket a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat. Paprika minták RNS-einek mennyiségi és minőségi ellenőrzése NanoDrop 2000 készülékkel.

Sorszám	Koncentráció ng/μl	OD (260/280)	OD (260/230)
45. minta	794,4	2,02	2,22
46. minta	373,3	2,03	2,03

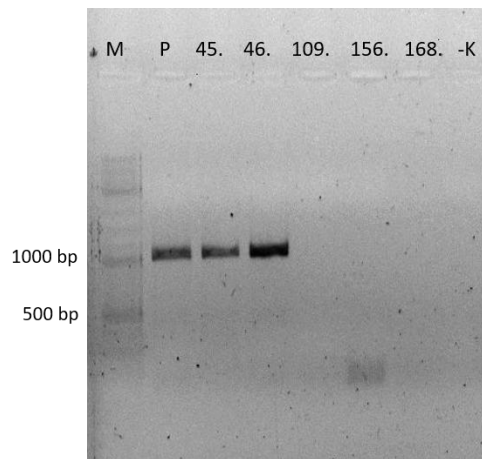
A mérési eredmények alapján a koncentrációk és tisztasági értékek minden esetben megfelelőek voltak.

A vizsgálat során a laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően legfeljebb tíz különböző minta egyedi RNS-ét vonhatjuk össze, amely tapasztalatok szerint nem befolyásolja hátrányosan az eredmények megbízhatóságát. A vizsgálatunkban előállított keverékünk a 45-ös és 46-os minták mellett további három olyan vírustüneteket mutató paprika egyed RNS-ét is tartalmazta, amelyekről korábban nem sikerült ismert paprikavírust kimutatni hagyományos módszerekkel. Mind az öt mintából 1,5 μg RNS-t használtunk a keverék elkészítéséhez. A kevert minta bioinformatikai elemzése egyértelműen kimutatta az EMDV jelenlétét. A vírus azonosításának további megerősítésére RT-PCR vizsgálatot végeztünk, amely nemcsak a kimutatás megbízhatóságát növelik, hanem lehetőséget ad a vírus pontos azonosítására.

5.2 EMDV kimutatása RT PCR módszerrel

A HTS adatok bioinformatikai elemzésének eredménye alapján az öt paprika minta RNS keverékében egyértelműen kimutatható volt az EMDV jelenléte. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a keverékben levő egyedi minták közül melyek fertőződtek EMDV-vel, RT-PCR vizsgálatot végeztünk.

Az RT-PCR vizsgálatot EMDV-specifikus primerrel végeztük. A PCR termékeket 1,2%-os agaróz gélben választottuk szét (6. ábra),



6. ábra. Paprika minták vizsgálata RT-PCR technikával agaróz gélen. Az ábrán a minták sorszámai, a DNS létra (M), a keverék (P), valamint a negatív kontroll (-K) látható. A gélelektroforézis során a GeneRuler DNA Ladder Mix-et (Thermo Scientific, USA) használtuk. A vizsgálat pozitív kontroll hiányában történt, mivel Magyarországon eddig nem volt jelen a vírus. Negatív kontrollként templát nélküli reakciót alkalmaztunk, amely a PCR specifitásának és tisztaságának ellenőrzésére szolgált.

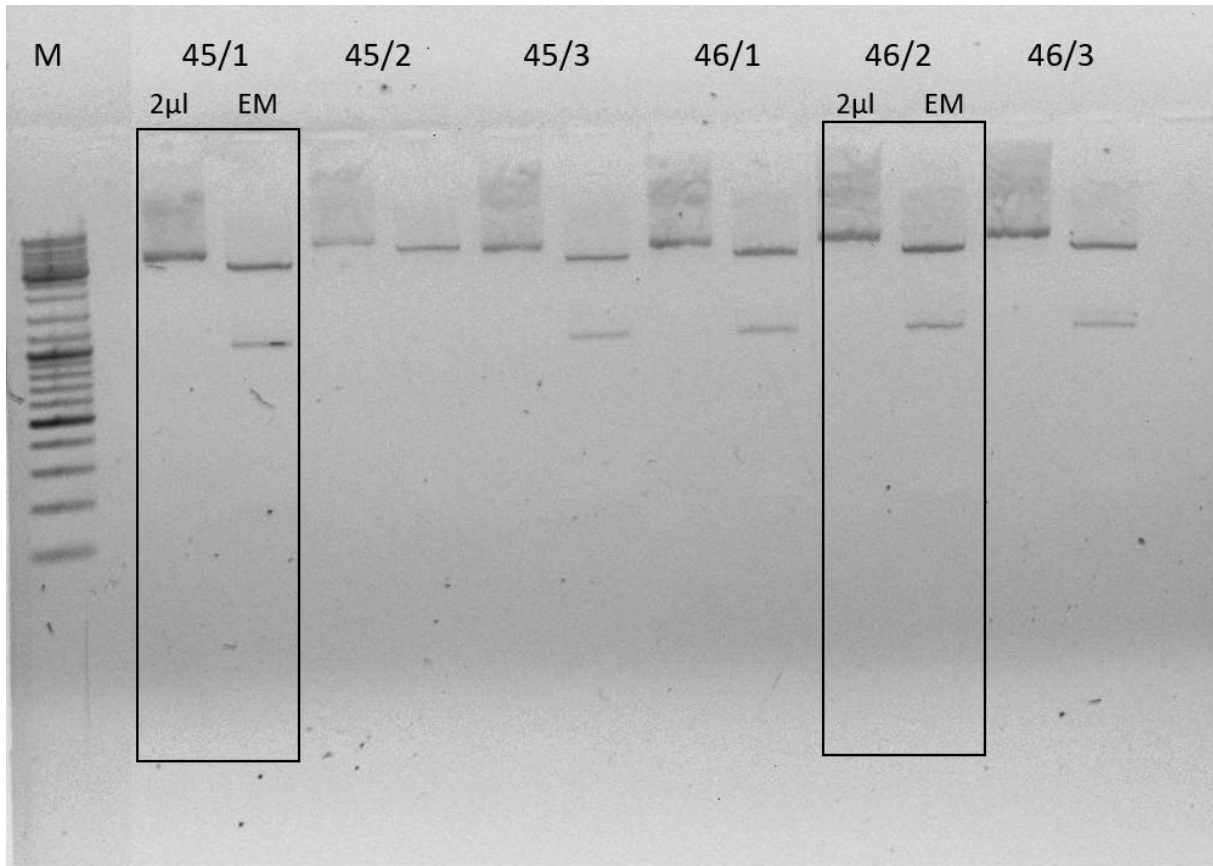
Az eredmények alapján a 45-ös és 46-os mintákban egyértelműen jelen volt a 1053 bázispár hosszúságú fragmentum, amely megerősítette a vírus jelenlétét ezekben a növényekben.

5.3 Klónozott EMDV fragmentumok

A klónozás célja egy homogén templát létrehozása volt a nukleinsav sorrendmeghatározásához, valamint annak biztosítása, hogy a szekvenálás során a mintában ne jelenjen meg más víruspopuláció. A ligálási reakcióhoz a 45-ös és 46-os minták PCR termékeit kitisztítottuk, hogy a primerek jelenléte ne zavarja a folyamatot. A ligáláshoz a CloneJET PCR Cloning Kit-et (Thermo Scientific, USA) használtuk, amelyben a vektorban található szelekciós gén akkor aktiválódik, ha az inszert nem épül be a klónozó helyre. Ennek köszönhetően nem volt szükség kék-fehér szelekció alkalmazására, amelynél nagyobb az álpozitív klónok megjelenésének kockázata. A klónozás mindkét minta esetében sikeres volt.

Egyéjszakás baktériumtenyésztés után több telep is megjelent, amelyek közül három-három (45/1, 45/2, 45/3, és 46/1, 46/2, 46/3) erőteljesebb növekedést mutató kolóniát választottunk ki. Ezekről feltételeztük, hogy tartalmazzák a megfelelő inszertet. A folyékony táptalajra oltás előtt a kiválasztott telepeket szilárd, ampicillin tartalmú táptalajra oltottuk, hogy biztosítsuk a további munkákhoz szükséges tartalék tenyészetet is.

A folyékony táptalajban felszaporított/tenyésztett baktériumokból plazmidot izoláltunk, majd restrikciós endonukleáz emésztéssel ellenőriztük az inszert jelenlétét. Az elvárt eredmény egy 1053 bázispár hosszú fragmentum és linearizált plazmid megjelenése volt agaróz gélen (7. ábra).



7. ábra. Plazmid emésztésének eredményei agaróz gélen. Konrollként 2 µl nem-emésztett plazmid izolátumot használtunk. EM az emésztett plazmidokat jelöli. Az M a GeneRuler DNA Ladder Mix-et (Thermo Scientific, USA) jelöli.

Az emésztés eredményeként a 45-ös minta esetében három kolóniából kettő, míg a 46-os mintánál mindhárom vizsgált kolónia tartalmazta a megfelelő inszertet. A laboratóriumi tapasztalatokra támaszkodva előzetesen nem tartottuk szükségesnek kolónia PCR vizsgálatot. Az emésztés eredményei visszaigazolták, hogy ez a megközelítés helyes volt, és a várakozásoknak megfelelő arányban sikerült inszertet hordozó klónokat nyerni.

A nukleinsav sorrend meghatározáshoz mindkét mintából egy-egy plazmid izolátumot (45/1 és 46/2) választottunk ki, melyeket Sanger szekvenálásra küldtünk. A nukleinsav sorrend meghatározást két irányból végeztettük el, mivel a Sanger-módszerrel egy futtatás során megbízhatóan 700-800 nukleotid hosszúságú szakaszt képes lefedni. Az 1053 bázispár

hosszúságú inszert teljes lefedéséhez szükséges volt a két irányból történő szekvenciák összeillesztésére, amely így biztosította a vírusfragmentum pontos és egyértelmű meghatározását.

5.4 Nukleinsav sorrend elemzés

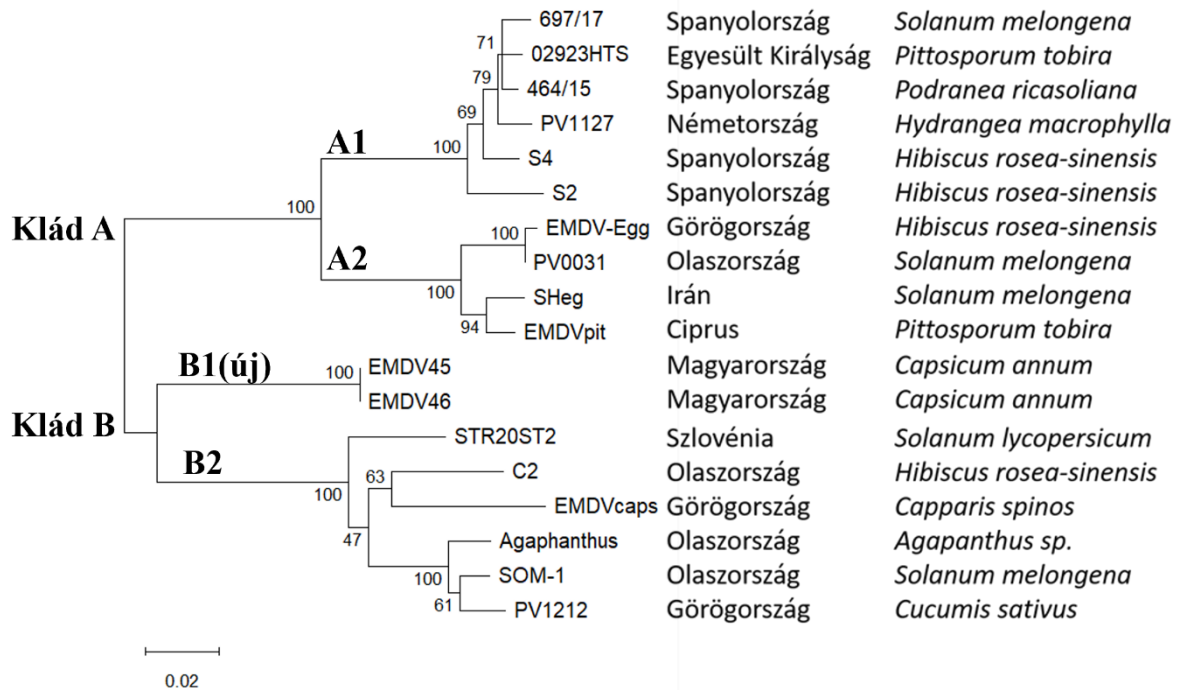
Az Eurofins BIOMI Kft.-től kapott nyers szekvenciákat először az NCBI BLASTn programmal azonosítottuk, amely minden esetben EMDV-eredetű genomrészleteket jelzett. A szekvenciák összeillesztéséhez és szerkesztéséhez a SnapGene 8.1.1 (GSL Biotech, USA) szoftvert használtuk. A programból FASTA formátumban exportáltuk a szekvenciákat. A reverz primerrel amplifikált szekvenciák esetében a reverz komplementer szekvenciát használtuk, ezzel biztosítva a helyes irányt és a folyamatos nukleotidsorrendet az összeillesztés során. A vírus-specifikus primereket azonosítottuk és a primer kötő helyek közötti szakaszt tekintettük a további elemzésre alkalmas, ún. tiszta virális szekvenciának.

A páronkénti evolúciós távolságokat (p-distance) a MEGA12 programmal (Kumar *et al.*, 2024) számoltuk. Az elemzés során a 45-ös és 46-os minta szekvenciái között 0,000 p-distance érték adódott az 1053 bázispár hosszú szakasz összehasonlításakor, amely 100%-os nukleotid-azonosságot jelent. Ez az eredmény megerősíti, hogy a két magyar izolátum azonos nukleotidsorrendet hordoz az adott génrégióban. A továbbiakban a szekvenciák filogenetikai összehasonlítását végeztük el, hogy meghatározzuk a magyar variánsok elhelyezkedését a nemzetközi izolátumok között.

5.5 Filogenetika

A magyar izolátumok rokonsági viszonyainak vizsgálatához filogenetikai elemzést végeztünk, amelynek eredményeként törzsfát generáltunk a MEGA12 szoftver segítségével. Az elemzés alapjául az Alfaro-Fernández *et al.*, (2024) által publikált cikk adatai szolgáltak, amelyben a vírus több régiójáról is készítettek törzsfát, köztük az L1 génről is. Erről a régióról származik az általunk jellemzett szekvencia részlet is, ezért ebből a régióból választottunk ki 16 referencia szekvenciát, amelyek a GenBank adatbázisban megtalálhatóak. A kiválasztott szekvenciák a különböző földrajzi régiókból származó izolátumokat képviselték, valamint a törzsfá valamennyi fő kládját reprezentálták. A magyar variánsokkal együtt így összesen 18 szekvencia került az elemzésbe.

Az Alfaro-Fernández *et al.* (2024) által közölt filogenetikai elemzésben az L1 gén régió alapján az EMDV izolátumok két fő kládba (klád A és klád B) sorolódtak, és ezeken belül további alkládokat (A1, A2, B1, B2) különítették el.



8. ábra. Maximum Likelihood törzsfa az EMDV L1 gén régiója alapján. A törzsfa a magyar izolátumok (EMDV45, EMDV46) és a GenBankból származó referenciavírusok filogenetikai kapcsolatait mutatja. Az elemzést a MEGA12 programban végeztük, a Maximum Likelihood módszer és a Tamura–Nei (1993) nukleotid-helyettesítési modell alkalmazásával. A bootstrap értékeket (1000 ismétlés) az ágak mellett tüntettük fel. Az ábrán a fő kládok (Klád A, Klád B) és alkládok (A1, A2, B1, B2) láthatók, Alfaro-Fernández *et al.* (2024) besorolása szerint. A minták kódja mellett feltüntettük az izolátumok földrajzi származását és a gazdanövényfajt is. A magyar izolátumok 100%-os bootstrap értékkel önálló kládot alkottak a Klád B csoporton belül (B1 új alklád).

Eredményeink szerint a két magyar izolátum (EMDV45 és EMDV46) a klád B főcsoporton belül helyezkedett el (8. ábra). A minták egy új, 100%-os bootstrap értékkel alátámasztott kládot alkottak, amely a korábban B1 alkládhoz sorolt izolátumoktól elkülönült. Ennek következtében a C2 és STR20ST2 izolátumok, amelyek az Alfaro-Fernández-féle törzsében még a B1 kládba tartoztak, a mi elemzésünkben inkább a B2 klád egyik

ágcsoportjaként jelentek meg. Ez az átrendeződés arra utal, hogy a magyar izolátumok genetikai sajátosságai új filogenetikai információt nyújtanak az EMDV variabilitásáról.

A magyar izolátumok legközelebbi rokonai az olasz C2 és a szlovén STR20ST2 izolátumok voltak, ugyanakkor ezektől is elkülönülve jelentek meg egy önálló ágon. Az klád A-ba sorolt mediterrán (spanyol, görög) és közel-keleti izolátumoktól pedig egyértelműen elkülönültek.

6. Következtetések és javaslatok

A vizsgálataink során az EMDV jelenlétét két fertőzött paprika növényben sikerült kimutatni Magyarországon. Tudomásunk szerint ez az első ilyen eset hazánkban és jelenleg nem ismert, hogy a vírus jelen van-e más régiókban, esetleg más növényfajokban. Emiatt nem lehet biztosan megítélni, hogy egy elszigetelt esetről van szó, vagy szélesebb körű fertőzés is fennáll.

A paprika növényeken megfigyelt tünetek, mint az erek mentén kialakuló sárgulás, a klorotikus foltok és a levéllemezek torzulása, valamint a termés felszínének rücskösödése hasonlóak az irodalomban található EMDV fertőzött paprikán okozott tünetekhez. Roggero *et al.*, (1995) Olaszországban az apikális levelek érsárgulását és klorózisát, valamint a bogyókon rücskös, márványozott felszín figyeltek meg. Kostova *et al.*, (2001) szintén kimutatták paprikában a vírust, de a tüneteket nem ismertették. Alfaro-Fernández *et al.*, (2024) két paprika növényből is kimutatták az EMDV-t, azonban a fertőzött növények tüneteit nem írták le.

A paprikán kívül más *Solenaceae* családba tartozó növényfajokat is képes megfertőzni az EMDV, köztük a tojásgyümölcsöt, a paradicsomot és a dohányt. Ezekben a növényekben hasonlóak a tünetek, jellemző az erek átlátszósága vagy sárgulása, leveleken megjelenő klorotikus foltok és mozaikos elszíneződés, valamint a levéllemezek torzulása és ráncosodása, helyenként varangy-bőr jellegű a felszínük. A tojásgyümölcs esetében nagyon jellegzetes a növények törpülése, a rövid internóduszok, valamint a fiatal levelek hullámos, ráncos felszíne. Paradicsomban és dohányban hasonló klorotikus mintázat, enyhe levélgödrösödés és növekedés-visszamaradást figyelhető meg a fertőzés következtében (Lecoq és Desbiez, 2012).

Az általunk paprikán megfigyelt legjellegzetesebb tünet, a bogyó felületén kialakuló rücskös felszín összhangban áll Roggero *et al.*, (1995) által paprikán leírt szemölcsszerűen érdes és márványos termésfelület, valamint Lecoq és Desbiez (2012) uborka leveleken megfigyelt varangy-bőr szerű jellemzésével.

A szekvenciaelemzés alapján a magyar izolátum az eddig ismert európai EMDV-izolátumokhoz képest egy különálló szubkládba sorolódik. Ez arra utalhat, hogy egy genetikai szempontból eltérő változat jelen lehet hazánkban, mely akár visszavezethető egy korábbi észrevétlenül maradt fertőzésre, vagy egy új behurcolásra is. Az evolúciós távolságok meghatározásához használt p-distance elemzést a MEGA12 szoftver segítségével végeztük, a hasonlósági mátrix a 9. ábrán látható (Kumar *et al.*, 2024). A szekvenciák közötti átlagos nukleotid diverzitás 0,106858 volt, vagyis a vizsgált izolátumok átlagosan 10,7%-ban

különböztek egymástól. Az egyedi p-distance értékek 0,11-0,14 tartományba estek, ami arra utalhat, hogy a vizsgált régió mérsékelten konzervált.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. EMDV45		0.000	0.011	0.010	0.011	0.011	0.012	0.011	0.011	0.012	0.011	0.012	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011
2. EMDV46	0.000		0.011	0.010	0.011	0.011	0.012	0.011	0.011	0.012	0.011	0.012	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011
3. STR20ST2	0.112	0.112		0.008	0.008	0.008	0.012	0.011	0.011	0.012	0.008	0.012	0.012	0.009	0.011	0.011	0.011	0.011
4. C2	0.112	0.112	0.061		0.008	0.008	0.012	0.012	0.012	0.012	0.008	0.012	0.012	0.009	0.012	0.012	0.012	0.012
5. Agaphanthus	0.119	0.119	0.057	0.065		0.005	0.012	0.011	0.012	0.012	0.005	0.012	0.012	0.009	0.011	0.011	0.012	0.011
6. SOM-1	0.119	0.119	0.058	0.064	0.022		0.012	0.011	0.011	0.011	0.005	0.011	0.011	0.008	0.011	0.011	0.011	0.011
7. EMDV-Egg	0.134	0.134	0.148	0.148	0.143	0.147		0.010	0.010	0.007	0.012	0.002	0.006	0.012	0.009	0.010	0.010	0.009
8. S2	0.135	0.135	0.140	0.155	0.147	0.139	0.102		0.006	0.010	0.012	0.010	0.010	0.012	0.006	0.006	0.006	0.006
9. S4	0.136	0.136	0.135	0.148	0.143	0.134	0.098	0.033		0.010	0.012	0.010	0.010	0.011	0.005	0.005	0.005	0.005
10. SHeg	0.138	0.138	0.148	0.148	0.144	0.142	0.037	0.098	0.094		0.011	0.006	0.004	0.012	0.009	0.009	0.009	0.009
11. PV1212	0.122	0.122	0.059	0.065	0.026	0.021	0.143	0.147	0.140	0.139		0.012	0.012	0.008	0.011	0.011	0.012	0.011
12. PV0031	0.130	0.130	0.147	0.147	0.142	0.144	0.003	0.100	0.097	0.033	0.142		0.006	0.012	0.009	0.009	0.009	0.009
13. EMDVpit	0.139	0.139	0.150	0.150	0.150	0.150	0.034	0.098	0.094	0.018	0.147	0.031		0.012	0.009	0.009	0.009	0.009
14. EMDVcaps	0.126	0.126	0.071	0.067	0.072	0.071	0.155	0.146	0.139	0.153	0.071	0.155	0.151		0.012	0.012	0.012	0.012
15. 464/15	0.136	0.136	0.136	0.148	0.138	0.131	0.086	0.032	0.019	0.088	0.138	0.084	0.088	0.140		0.004	0.004	0.003
16. 697/17	0.139	0.139	0.138	0.154	0.143	0.136	0.097	0.035	0.023	0.092	0.143	0.096	0.094	0.144	0.013		0.004	0.004
17. PV1127	0.134	0.134	0.138	0.150	0.145	0.134	0.096	0.038	0.023	0.094	0.143	0.095	0.094	0.142	0.015	0.018		0.004
18. 02923HTS	0.137	0.137	0.135	0.153	0.139	0.132	0.091	0.033	0.021	0.089	0.139	0.090	0.089	0.142	0.010	0.013	0.016	

9. ábra. Az EMDV izolátumok közötti genetikai különbségek (p-distance értékek, fekete számok) és a hozzá tartozó standard error (SE) értékek (kék számok). Az elemzést a MEGA 12 programmal (Kumar *et al.*, 2024) végeztük 1000 bootstrap ismétléssel.

A 876 nukleotid hosszúságú szekvenciák többszörös illesztése alapján kizárólag egy pontos nukleotid polimorfizmusokat (SNP) találtunk. A magyar izolátumokban, amelyek nukleotid sorrendje azonos, 20 olyan egyedi SNP-t azonosítottunk, amelyek a többi szekvenciában nem fordultak elő. Ezek közül 16 esetben szinonim mutációról volt szó, ami nem eredményezett aminosav cserét, azonban 4 pozíciónál nem szinonim mutációt azonosítottunk. A 151. pozícióban egy T-G csere szerint helyett alanint kódol, a 169. pozícióban a G-A csere a kodonban valinból izoleucint, a 236. pozícióban ugyancsak G-A csere argininből glutamint, míg a 472. pozícióban egy A-G nukleotid csere aszparaginból aszparaginsavat eredményezett. Az izolátumok közötti különbségeket leginkább a szinonim mutációk adják, így a magyar izolátumokban jelen levő eltérések leginkább neutrális változások, amelyek evolúciós szempontból azonban jelzik a populáció sajátosságait.

Pontosabb kép érdekében fontos lenne további növények vizsgálata, kifejezetten olyanoké, melyek hasonló tüneteket mutatnak, mint érsárgulás és termés rücskösödés. Ezen vizsgálatok eredményei segítenének felmérni, mennyire elterjed a vírus Magyarországon, valamint van-e szükséges növényegészségügyi intézkedésekre a terjedés megakadályozására.

7. Összegzés

A kutatásunk célja a tojásgyümölcs foltos törpeség vírus (Eggplant mottled dwarf virus, EMDV) magyarországi előfordulásának vizsgálata volt paprikában, valamint filogenetikai elhelyezése a jelenleg ismert vírus-szekvenciákhoz képest. A mintagyűjtést tünetes paprikákról végeztük, majd az RNS-ek izolálása után spektrofotometriával és agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük azok minőségét. A vírus kimutatására és meghatározására nagy áteresztőképességű szekvenálást (HTS) alkalmaztunk, ami lehetővé tette a teljes nukleinsav állomány vizsgálatát. A HTS adatok alapján valószínűsíthető volt az EMDV jelenléte, amelyet RT-PCR-rel erősítettük meg. A kapott PCR-termékeket klónoztuk, majd a két mintából hármat-hármat restriktions enzimekkel emésztettük. A megfelelő inszerttel rendelkező plazmidokból mindkét minta esetében egyet-egyet kiválasztottunk és Sanger szekvenálásra küldtük. A kétirányú szekvenálás lehetővé tette az 1053 bázispár hosszú fragmentumok pontos nukleotid sorrendjének meghatározását. Az elkészült szekvenciaadatok bioinformatikai és filogenetikai elemzésével határoztuk meg a magyar izolátumok evolúciós kapcsolatait.

A kapott eredmények alapján két paprikamintában sikerült kimutatni az EMDV jelenlétét. Az általunk vizsgált két magyar izolátum nukleotid sorrendje 100%-os egyezést mutatott, ami a vírus genetikai homogenitására utal. A filogenetikai elemzés során a magyar izolátumok a Klád B csoportba kerültek, azonban egy új, 100%-os bootstrap értékkel alátámasztott, önálló kládot alkotva. Az izolátumok jól elkülönültek a korábbi B1-es referenciaizolátumoktól, amiből arra következtethetünk, hogy hazánkban egy eddig nem ismert, genetikailag elkülönülő EMDV-változat fordul elő.

Kutatásunk elsőnek azonosította Magyarországon az EMDV jelenlétét. A magyar izolátumok genetikai sajátosságai új információval szolgálnak a vírus populációs változatosságáról, valamint felhívják a figyelmet az EMDV potenciális veszélyeire a hazai paprika- és padlizsántermesztésében. Jelenleg nem tudni, hogy a vírus jelen van-e az ország más régióiban, vagy esetleg más termesztett vagy vadon élő növényfajokban. Ezért az eredmények alapján szükség lenne további mintagyűjtésekre és populációgenetikai vizsgálatokra, amelyek hozzájárulhatnak az EMDV hazai és európai terjedésének és evolúciójának jobb megértéséhez.

8. Irodalomjegyzék

1. Alfaro-Fernández, A., Taengua, R., Font-San-Ambrosio, I., Sanahuja-Edo, E., Peiró, R., Galipienso, L., Rubio, L., 2024. Genetic Variation and Evolutionary Analysis of Eggplant Mottled Dwarf Virus Isolates from Spain. *Plants* 13, 250. <https://doi.org/10.3390/plants13020250>
2. 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>
3. Babaei, G., Massah, A., Koochi Habibi, M., 2021. Efficient translation of Eggplant mottled dwarf nucleorhabdovirus N and X genes requires both 5' and 3' UTRs. *Virol J* 18, 129. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01601-4>
4. Babaie, G., Kouhi Habibi, M., Massah, A., Dizadji, A., Izadinejad, L., Simon, A., 2015. Complete Genome Sequence and Genome Analysis of Eggplant mottled dwarf virus-Iranian Isolate. *Journal of Phytopathology* 163, 331–341. <https://doi.org/10.1111/jph.12256>
5. Babaie, Gh., Izadpanah, K., 2003. Vector Transmission of Eggplant Mottled Dwarf Virus in Iran. *Journal of Phytopathology* 151, 679–682. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00788.x>
6. Bene, C., Marselek, S., 2009. The growing of vegetables, one of the strategic possibility of the Hungarian agricultural improvement. *GAZDÁLKODÁS: Scientific Journal on Agricultural Economics* 53, 1–12.
7. Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., Mumford, R., 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research, Plant Virus Epidemiology Symposium Ecology, evolution and control of plant viruses and their vectors* 186, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>
8. Cassedy, A., Parle-McDermott, A., O’Kennedy, R., 2021. Virus Detection: A Review of the Current and Emerging Molecular and Immunological Methods. *Front Mol Biosci* 8, 637559. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.637559>
9. Costa, L.C., Atha, B., Hu, X., Lamour, K., Yang, Y., O’Connell, M., McFarland, C., Foster, J.A., Hurtado-Gonzales, O.P., 2022. High-throughput detection of a large set of viruses and viroids of pome and stone fruit trees by multiplex PCR-based amplicon sequencing. *Front. Plant Sci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1072768>

10. Çulal-Kiliç, H., 2019. Biological, serological and molecular detection of tomato mosaic virus infecting pepper plants from Turkey. *Appl. Ecol. Env. Res.* 17. https://doi.org/10.15666/aeer/1703_63376347
11. Dietzgen, R.G., Kondo, H., Goodin, M.M., Kurath, G., Vasilakis, N., 2017a. The family *Rhabdoviridae*: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Research* 227, 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.010>
12. Graham, S.C., Assenberg, R., Delmas, O., Verma, A., Gholami, A., Talbi, C., Owens, R.J., Stuart, D.I., Grimes, J.M., Bourhy, H., 2008. Rhabdovirus Matrix Protein Structures Reveal a Novel Mode of Self-Association. *PLOS Pathogens* 4, e1000251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000251>
13. Heinlein, M., 2015. Plant virus replication and movement. *Virology*, 60th Anniversary Issue 479–480, 657–671. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.025>
14. Gergerich, R.C., and V. V. Dolja. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01
15. Jackson, A.O., Dietzgen, R.G., Goodin, M.M., Bragg, J.N., Deng, M., 2005. Biology of Plant Rhabdoviruses*. *Annual Review of Phytopathology* 43, 623–660. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.011205.141136>
16. Jeong, J.-J., Ju, H.-J., Noh, J., 2014. A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease* 20, 173–181. <https://doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>
17. Kanapiya, A., Amanbayeva, U., Tulegenova, Z., Abash, A., Zhangazin, S., Dyussebayev, K., Mukiyanova, G., 2024. Recent advances and challenges in plant viral diagnostics. *Front. Plant Sci.* 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1451790>
18. Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W.-S., Hughes, J. d’A., 2014. Virus Diseases of Peppers (*Capsicum* spp.) and Their Control, in: Loebenstein, G., Katis, N. (Eds.), *Advances in Virus Research, Control of Plant Virus Diseases*. Academic Press, pp. 297–354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8>
19. Kormelink, R., Garcia, M.L., Goodin, M., Sasaya, T., Haenni, A.-L., 2011. Negative-strand RNA viruses: The plant-infecting counterparts. *Virus Research, Negative Strand RNA Viruses: To mark the retirement of Dr Brian WJ Mahy, Founder and Editor-in-Chief, 1984–2011* 162, 184–202. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.028>
20. Központi Statisztikai Hivatal [KSH]. 2024. A fontosabb zöldségfélék és a fűszerpaprika betakarított termésmennyisége vármegye és régió szerint [tonna]. Letöltve 2025. október 23-án, a https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0084.html

21. Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., Tamura, K., 2024. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Mol Biol Evol* 41, msae263. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>
22. Kutnjak, D., Elena, S.F., Ravnika, M. 2017. Time-Sampled Population Sequencing Reveals the Interplay of Selection and Genetic Drift in Experimental Evolution of Potato Virus Y. *J Virol.* 27;91(16):e00690-17. doi: 10.1128/JVI.00690-17.
23. Lecoq, H., Desbiez, C., 2012. Chapter 3 - Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region: An Ever-Changing Picture, in: Loebenstein, G., Lecoq, H. (Eds.), *Advances in Virus Research, Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin*. Academic Press, pp. 67–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00003-8>
24. Legarrea, S., Karnieli, A., Fereres, A., Weintraub, P.G., 2010. Comparison of UV-absorbing Nets in Pepper Crops: Spectral Properties, Effects on Plants and Pest Control. *Photochemistry and Photobiology* 86, 324–330. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00657.x>
25. Louten, J., 2016a. Chapter 2 - Virus Structure and Classification, in: Louten, J. (Ed.), *Essential Human Virology*. Academic Press, Boston, pp. 19–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8>
26. Louten, J., 2016b. Chapter 7 - Detection and Diagnosis of Viral Infections, in: Louten, J. (Ed.), *Essential Human Virology*. Academic Press, Boston, pp. 111–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00007-7>
27. Mártonffy, B. 1999. *A paprika termesztése és feldolgozása Magyarországon*. Mezőgazda Kiadó, Budapest
28. Mehetre, G.T., Leo, V.V., Singh, G., Sorokan, A., Maksimov, I., Yadav, M.K., Upadhyaya, K., Hashem, A., Alsaleh, A.N., Dawoud, T.M., Almaary, K.S., Singh, B.P., 2021. Current Developments and Challenges in Plant Viral Diagnostics: A Systematic Review. *Viruses* 13, 412. <https://doi.org/10.3390/v13030412>
29. Mehle, N., Ravnika, M., 2012. Plant viruses in aqueous environment – Survival, water mediated transmission and detection. *Water Research* 46, 4902–4917. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.027>
30. Moury, B., Verdin, E., 2012. Chapter 4 - Viruses of Pepper Crops in the Mediterranean Basin: A Remarkable Stasis, in: Loebenstein, G., Lecoq, H. (Eds.), *Advances in Virus Research, Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin*. Academic Press, pp. 127–162. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00004-X>

31. Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., Barker, I., 2006. Advances in molecular phytodiagnosics – new solutions for old problems. *Eur J Plant Pathol* 116, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9037-0>
32. Ng, J.C.K., Falk, B.W., 2006. Virus-Vector Interactions Mediating Nonpersistent and Semipersistent Transmission of Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology* 44, 183–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325>
33. Ojinaga, M., Guirao, P., Larregla, S., 2022. A Survey of Main Pepper Crop Viruses in Different Cultivation Systems for the Selection of the Most Appropriate Resistance Genes in Sensitive Local Cultivars in Northern Spain. *Plants* 11, 719. <https://doi.org/10.3390/plants11060719>
34. Pappi, P.G., Chaintoutis, S.C., Dovas, C.I., Efthimiou, K.E., Katis, N.I., 2015. Development of one-tube real-time qRT-PCR and evaluation of RNA extraction methods for the detection of Eggplant mottled dwarf virus in different species. *Journal of Virological Methods* 212, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.11.001>
35. Pappi, P.G., Maliogka, V.I., Amoutzias, G.D., Katis, N.I., 2016. Genetic variation of eggplant mottled dwarf virus from annual and perennial plant hosts. *Arch Virol* 161, 631–639. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2705-7>
36. Park, W.M., Lee, G.P., Ryu, K.H., Park, K.W., 1999. Transmission of tobacco mosaic virus in recirculating hydroponic system. *Scientia Horticulturae* 79, 217–226. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00215-5)
37. Riedel, C., Hennrich, A.A., Conzelmann, K.-K., 2020. Components and Architecture of the Rhabdovirus Ribonucleoprotein Complex. *Viruses* 12, 959. <https://doi.org/10.3390/v12090959>
38. Roggero, P., 1995. First Reports of Eggplant Mottled Dwarf Rhabdovirus in Cucumber and in Pepper. *Plant Dis.* 79, 321. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0321C>
39. Rotenberg, D., Jacobson, A.L., Schneewis, D.J., Whitfield, A.E., 2015. Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinion in Virology*, SI: 15 Virus–vector interactions•Viral immunology 15, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.003>
40. Rubio, L., Galipienso, L., Ferriol, I., 2020. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Front. Plant Sci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>
41. Shtykova, E.V., Dubrovin, E.V., Ksenofontov, A.L., Gifer, P.K., Petoukhov, M.V., Tokhtar, V.K., Sapozhnikova, I.M., Stavrianidi, A.N., Kordyukova, L.V., Batishchev, O.V., 2024.

Structural Insights into Plant Viruses Revealed by Small-Angle X-ray Scattering and Atomic Force Microscopy. *Viruses* 16, 427. <https://doi.org/10.3390/v16030427>

42. Somogyi, N. 2009. Hibrid fűszerpaprika nemesítés és hajtatasos termesztéstechnológiák [Doktori disszertáció, Pannon Egyetem Georgikon Kar]. Pannon Egyetem Könyvtár
43. Tóbiás, I., Almási, A., Csilléry, G., Nemes, K., Salánki, K., 2017. Virus diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.) in Hungary. *Agriculture and Food* 5, 294-301

Köszönetnyilvánítás

Szaktervezéshez elkészítéséhez nyújtott támogatásokért és segítségért szeretném őszinte köszönetemet kifejezni.

Elsősorban Dr. György Zsuzsannának, aki konzulensemként iránymutatásaival és szakmai tanácsaival hozzájárult a dolgozatomhoz.

Köszönettel tartozom az ATK-HUN-REN Növényvédelmi Kutatóintézet Virologiai Csoportjának is, akikkel mindig jó hangulatú környezetben dolgozhattam és naponta új ismeretekkel gazdagítottak.

Külön köszönet illeti a Virologia Csoport vezetőjét, Dr. Salánki Katalint, aki külső konzulensemként szakértelmével és folyamatos támogatásával segítette munkámat.

Végül, különösen hálás vagyok külső konzulensemnek Demián Emesének, aki kitartásával és iránymutatásaival mindvégig motivált, mellettem állt, és segítséget nyújtott a dolgozat megírása során.

9. Nyilatkozatok

9.1 Konzulensi nyilatkozat

MATE Szervezeti és Működési Szabályzat

III. Hallgatói Követelményrendszer

111.1. Tanulmányi és Vizsgaszabályzat

6.13. sz. függelék: A MATE egységes szakdolgozat / diplomadolgozat / záródolgozat / portfólió készítési útmutatója

4.1. sz. melléklete: Konzulensi nyilatkozat

NYILATKOZAT

Pogácsás Kata (név) (hallgató Neptun azonosítója: G8TIHS) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom !.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz:

igen nem *2

Kelt: Budapest, 2025 év November hó 3. nap



belső konzulens

9.2 Hallgatói nyilatkozat

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Pogácsás Kata
A Hallgató Neptun kódja: G8TIHS
A dolgozat címe: Tojásgyümölcs foltos törpeség vírus
azonosítása paprikán
A megjelenés éve: 2025
A konzulens intézetének neve: Genetika és Biotechnológia Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Növénybiotechnológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Továbbá kijelentem, hogy a dolgozat elkészítése során alkalmazott mesterséges intelligencia-eszközök (pl. szöveggenerálás, nyelvi javítás, fordítást adatelemzés) használata nem helyettesítette a saját kutatási és alkotói munkámat, azok alkalmazását a források között vagy a módszertani részben feltüntettem, és a szakmai-etikai elvárásoknak megfelelően jártam el.

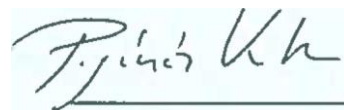
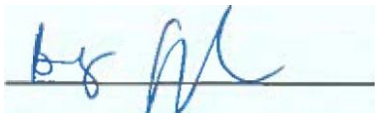
Ha a fenti nyilatkozattal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és
- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2025 év November hó 3. nap



Hallgató aláírása

9.3 Mesterséges intelligencia használati nyilatkozat

Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

1. Általános adatok

Hallgató neve:	Pogácsás Kata
Neptun-kódja:	G8TIHS
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	<input checked="" type="checkbox"/> BSc/BA <input type="checkbox"/> MSc/MA <input type="checkbox"/> Doktori (PhD) <input type="checkbox"/> Egyéb: TDK
Tantárgy neve/kódja*:	Szakdolgozat készítés/ KERTU073N
A munka címe:	Tojásgyümölcs foltos törpeség vírus azonosítása paprikán

* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

- A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.
(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)
- B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást. (Kérjük, töltse ki a vonatkozó táblázatokat!)

3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

I. TÁBLÁZAT: Asszisztensi vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrektúra, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)
nyelvi korrektúra, mondszerkezelemzés, fordítás	ChatGPT, Perplexity AI	

II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka **mellékletében való csatolása szükséges.**)

A felhasználás célja	Alkalmazott eszköz verziója, elérhetősége	MI-neve, Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma

3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....

.....

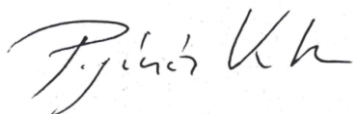
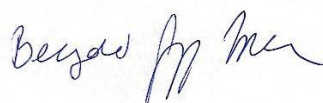
.....

.....

4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: .Budapest, 2025. november hó 3. nap

.....

Hallgató aláírása

.....

Konzulens/Témavezető aláírása