

DIPLOMADOLGOZAT

Allaga Dávid

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Georgikon Campus

Mezőgazdasági biotechnológus MSc

Rezisztenciagének vizsgálata paprikában

Belső konzulens: Dr. Taller János

egyetemi tanár

Külső konzulens: Dr. Frank Krisztián

tudományos munkatárs

Készítette: **Allaga Dávid**

PRD7Y7

nappali tagozat

Intézet/Tanszék: **Genetika és Biotechnológia**

Intézet, Mikrobiológia és Alkalmazott Biotechnológia Tanszék

Készthely

2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés és célkitűzés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. Étkezési paprika (<i>Capsicum annuum</i>)	7
2.1.1. Étkezési paprika (<i>Capsicum annuum</i>) megjelenése Magyarországon	7
2.1.2. Botanikai jellemzése	7
2.2. Paprika termesztése	9
2.2.1. Paprika növényvédelme	10
2.3. A Dohány mozaik vírus (<i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV)	11
2.3.1. TMV tünetei paprikán	11
2.3.2. TMV biológiája	11
2.3.3. TMV rezisztencia	12
2.4. Az Uborka mozaik vírus (<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV)	13
2.4.1. CMV tünetei paprikán	13
2.4.2. CMV biológiája	13
2.4.3. CMV rezisztencia	14
2.5. A paprika nemesítése	15
2.5.1. Genetikai ismereteink a paprikáról	15
2.5.2. A paprika nemesítés géntartalékai	17
2.5.3. A paprika vírusrezisztencia forrásai	17
2.5.4. Molekuláris markerek használata a paprika vírusrezisztencia nemesítésben	19
2.5.5. A paprika vírusrezisztencia nemesítésében felhasznált leggyakoribb marker típusok	20
2.6. Újgenerációs szekvenálási technológia (NGS)	25
2.6.1. NGS folyamata SbS technológiával	25
2.6.2. Transzkriptomika	26
3. Anyag és módszer	27

3.1. Növényanyag	27
3.2. Fertőzési tesztek	27
3.3. Molekuláris vizsgálatok	27
3.3.1. RNS tisztítás és könyvtár készítés	27
3.3.2. Szekvenciaadatok feldolgozása	28
4. Vizsgálati eredmények és értékelésük	29
5. Következtetések, javaslatok	37
6. Összefoglalás	38
7. Köszönetnyilvánítás	40
8. A szakirodalom jegyzéke	41

Rövidítések jegyzéke

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
C.	Capsicum
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CMV	Cucumber Mosaic Virus
DNS	deoxiribonukleinsav
Gbp	giga bázispár
InDel	Insertion/Deletion polymorphisms
kDa	kilodalton
KSH	Központi Statisztikai Hivatal
MAS	marker alapú szelekció
mRNS	messenger RNS
mtsai	munkatársai
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-Generation Sequencing
nm	nanométer
ORF	Open Reading Frame
QTL	Quantitative Trait Locus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGA	resistance gene analogue
RIN	RNA integrity number
RNS	ribonukleinsav
rRNS	riboszomális RNS
SBS	sequencing by synthesis
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sp	species
SSR	Simple Sequence Repeats
TMV	Tobacco Mosaic Virus
tRNS	transzfer RNS
ZKI	Zöldségtermesztési Kutató Intézet Zrt.

1. Bevezetés és célkitűzés

A *Solanaceae* családba tartozó paprika (*Capsicum sp.*) világszerte az egyik legjelentősebb zöldségnövény, amelyet elsősorban tápértéke miatt termesztnek (PARISI et al., 2020).

Kiemelkedő szerepe hazánkban is vitathatatlan, KSH adatok alapján elmúlt öt év átlagában (2017-2021) a zöldpaprika országos termésmennyisége 100 649 tonna, míg a fűszerpaprikáé 17254,6 tonna (KSH, 2023).

Hazánk agroökológiai adottságai miatt csak korlátozottan alkalmas a szabadföldi árupaprika előállításra, ilyen termesztési körülmények közül többnyire az ipari alapanyagul szolgáló termék származik. A magasabb minőséget képviselő frisspiaci paprikát a jelentősebb költségekkel járó hajtattott technológiával termesztik (TOMPOS, 2006).

Általánosságban elmondható, hogy a fogyasztók által támasztott minőségi és mennyiségi igények csak a nagy ráfordítással járó magas termelési színvonalon valósíthatók meg.

További növekedés várható a magas tápértékű termékek iránti fogyasztói kereslet miatt. A paprika valóban gazdag forrása az olyan vegyületeknek, amelyek fontos táplálkozásbéli és rákellenes tulajdonságokkal rendelkeznek. Azonban a kedvező tendencia ellenére világszerte számos kártevő és betegség fenyegeti a termesztést, ami korlátozza a termelékenységet. A változó körülmények és az emelkedő energiaárak mellett a fogyasztási trend fenntartásához új, ellenálló és jó termőképességű fajták kifejlesztése szükséges (PARISI et al., 2020).

A paprika betegségei közül a vírusok szerepe tagadhatatlan, mivel a termés kiesés mértéke és a védekezés nehézsége miatt jelentős gondot okoznak (BENNER – KUHN, 1985).

A hazánkban, paprikában a Dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) és az Uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) bizonyult a leggyakoribbnak, és a legnagyobb termésvesztést is ez a két vírus okozta (TÓBIÁS – MOLNÁR, 1983).

A vírusok okozta problémákra egyértelműen a marker alapú rezisztencia nemesítés jelentene megoldást. A marker alapú rezisztencia nemesítéssel kapcsolatban meg kell említeni számos nehezítő tényezőt. A felmerülő akadályok közül az egyik legösszetettebb a paprika genom tulajdonságaiban keresendő. Nem elég a paprika genom nagy mérete (~3,2 Gbp), amely a burgonya genom méretének négyszerese, még az ismételt szekvenciák, illetve mobilis genetikai elemek is jelentős arányban (~80 %) vannak jelen a genomban, ami nagymértékben nehezíti a gének azonosítását (KIM et. al., 2014).

A vírusok oldaláról is számos tényező nehezíti az eredményes marker alapú rezisztencianemesítést. Az uborka mozaik vírus hiába az egyik legfontosabb a paprikát fertőző vírusok közül, de a CMV rezisztenciával kapcsolatos jelenlegi tudásunk a paprika vonatkozásában

még csekély (GUO et al., 2017). Többek között a paprika CMV fertőzés transzkripció szinten adott válaszairól is korlátozottak az ismereteink (ZHU et al., 2018).

A TMV esetében a különféle rasszokkal szemben rasszspecifikus, de nagyon hasonló (97,5%–98,9% azonosságú) szekvenciájú gének (L gének) ismertek ugyan, de ezek marker alapú elkülönítése nem könnyű feladat, mivel a paprika genom nagy számban tartalmaz L-gén analógokat. Mind az L gének hasonlósága, mind az analóg szekvenciák megnehezítik a megfelelő detektálási rendszerek kifejlesztését (KALAPOŠ et al., 2021).

A bemutatott nehézségeket és a téma jelentőségét szem előtt tartva, jelen dolgozat célja a paprika TMV és CMV rezisztencia molekuláris genetikai hátterének vizsgálata. Ehhez transzkriptom alapú megközelítést alkalmazunk, melynek során a fertőzéssel előidézett génexpressziós változások elemzésével tervezzük az ismert rezisztenciagénekkel nagyfokú hasonlóságot mutató géneket rezisztens vonalakban azonosítani.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Étkezési paprika (*Capsicum annuum*)

A *Capsicum* nemzetség egy a több mint kilencven *Solanaceae* családba tartozó nemzetség közül. A *Solanaceae* család a paprika mellett olyan kereskedelmi szempontból fontos zöldségeket foglal még magába, mint a paradicsom, a burgonya vagy a tojásgyümölcs (PARISI et al., 2020).

A *Capsicum* nemzetség fajai általában lágyszárúak és sokmagvú termést hoznak. Géncentrumuk Közép- és Dél-Amerika. Fagyérzékenyek, így csak trópusi körülmények között képesek többéves növényekké fejlődni (BOSLAND, 1996).

PARISI és munkatársai (2020) munkájukban több mint 30 *Capsicum* fajra hivatkoznak, amelyek közül kettőt (*C. annuum* és *C. frutescens*) Közép-Amerikában, hármat (*C. chinense*, *C. baccatum* és *C. pubescens*) pedig Dél-Amerikában vonhattak termesztésbe.

2.1.1. Étkezési paprika (*Capsicum annuum*) megjelenése Magyarországon

A *Capsicum annuum* a legelterjedtebb és a legintenzívebben termesztett az öt házasított paprika faj közül. Feltehetően az erőteljes borsos ízének köszönhetően került Európába a nagy földrajzi felfedezések idején (IDREES et al., 2020). Spanyolországi térhódítása után terjedt el általánosan Európa nyugati felén. Magyarországon a XVI. századból már írásos bizonyíték van az első növények behozataláról, de a nagyobb arányú termesztésbe vételét csak a XIX. századra teszik. Először Szeged környékén termesztették, majd innen fokozatosan terjedt el az egész országban. Az első világháborút követő behozatali blokádnak serkentette a termesztését, majd a második világháborút követően a fűszerpaprika termesztés mellett a friss fogyasztásra szánt paprika termesztése is fejlődő pályára állt (SOMOS, 1975).

2.1.2. Botanikai jellemzése

Főgyökerének tengelye erősen fejlett orsógyökér, oldalgyökerei egyenletes eloszlásban helyezkednek el. Sekélyen gyökerezik, jellemzően 30-40 cm mélységben. Hajtásrendszerére jellemző az alul fürtösen, felül bogasan elágazó oldalhajtások megléte és a kezdetben lágy, később fásodó szár (SOMOS, 1975). A növekedés típusa szerint lehetnek folytonos növekedésű (indeterminált) fajták, melyek a folyamatos termésképződés miatt a hajtási időszak hosszának megnövekedését eredményezik, valamint determinált fajták, melyek előnye a korai generatív szakaszba lépés és az időzíthető betakarítás (SOMOS, 1980). Levelei egyszerű, ép szélűek és nyéllel kapcsolódnak a hajtásokhoz. A törtfehér virágok 10-15 mm átmérőjűek, többnyire hat szirmlevéllel rendelkeznek, egyedül állnak a bogas oldalágak csúcsán és kocsánnyal illeszkednek a

hajtáshoz (SOMOS, 1975). Virágok általában önbeporzók, de történhet 17% keresztbeporzás szél, illetve rovarok által (IDREES et al., 2020).



1.ábra Paprika és bogyó változatai.

(Forrás: INTERNET 1)

A sokmagvú bogyótermés formai és színbeli variabilitása számottevő. Alakjuk szerint lehetnek blocky, gömb, lapított gömb, kúpos, hosszú és hegyes termések. Színük alapján léteznek fehér, zöld, sárga, narancs, barna, rózsaszín, lila és fekete bogyójú fajták (1. ábra). A kapszaicin tartalom függvényében lehetnek édes és magas kapszaicin tartalmú csípős termést hozók (CSILLÉRY, 2006). A felfújott bogyótermésben a magok maglécen (placenta) ülnek és köldökzsinórral (funiculus) kapcsolódnak hozzá (NYAKAS, 2006). Magjai lapított vese alakúak, sárgás-fehéres színűek és sima felületűek (SOMOS, 1975).

2.2. Paprika termesztése

A paprika termesztésével kapcsolatos főbb tudnivalókat az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat Összefoglaló táblázat a paprika termesztéséről.

(Forrás: HELYES *et al.* (2006); SOMOS (1975, 1980) és KOCSISNÉ *et al.* (2013) nyomán)

	Fűtött hajtatus	Szabadföldi termesztés
Magvetés	palántaneveléshez: december vége, augusztus	palántaneveléshez: március közepe helyre vetéshez: április 10-20., 10- 12 °C-os talajhőmérsékletnél
Palánta kiültetés	április vége, szeptember	május közepe
Termesztő közeg	kőgyapot, perlit, kókuszrost, talaj, tőzeg	laza szerkezetű, könnyen melegedő talajok
Elővetemény	-	jó: bab, gyökérzöldségek, káposztafélék, őszi kalászosok rossz: burgonyafélék, kabakosok
Öntözés típusai	csepegtető rendszer	esőztető vagy csepegtető rendszer
Tápanyag ellátás	folyékony műtrágyák, tápoldatok	szervestrágya, műtrágya, levéltrágyák, tápoldatok
Növényápolási munkák	kötözés, metszés (vegetatív – generatív egyensúly fenntartása), árnyékolás, szellőztetés, termésritkítás, levelezés, beporzók (<i>Bombus sp.</i>) betelepítése	rendszeres növényápolás, támrendszer mellett nevelt növényeknél metszés
Növényvédelem	folyamatos szedés miatt főleg biológiai módszerek	talajfertőtlenítés, gyomtalanítás
Szedés	folyamatos szedés, kézi betakarítás	időzített betakarítás, kézi vagy gépi
Átlagos terméshozam	16,5 kg/m ²	7 kg/m ²
Munkaerőigény	munkacsúcsok mellett folyamatos élőmunka igény	munkacsúcsok: palántázás, betakarítás

2.2.1. Paprika növényvédelme

A paprikatermesztést nehezítő tényezők közül fontos megemlíteni a talajos termesztési technológia esetén a polifág talajlakó kártevőket, melyek a gyökérzetet károsítják, és előrejelzésre alapozott talajfertőtlenítéssel védekezhetünk ellenük. Ilyen kártevők a cserebogarak (*Melolonthidae*) lárvái a pajorok, a pattanóbogarak (*Elateridae*) lárvái a drótférgek, a fénykerülő bagolylepkék (*Noctuidae*) hernyói és a lőtücsök (*Gryllotalpa gryllotalpa*). Szintén a termesztőközegeből eredő kártevők a gyökérgubacs fonálférgek (*Meloidogyne hapla* és *M. incognita*), és a szár fonálféreg (*Ditylenchus dipsaci*). A levélen károsító rovarok közül kiemelten fontosak a levéltetű fajok, melyek a szívogatásukon kívül több vírus bizonyított vektorszervezetei. Elsősorban hajtatott körülmények között jelentős az üvegházi molytetű (*Trialeurodes vaporarum*) és a kétfoltos takácsatka (*Tetranychus urticae*) kártétele (PARISI et al., 2020).

A generatív részek károsítója a nyugati virágtripsz (*Frankliniella occidentalis*), mely a szívogatása mellett a paradicsom bronzfoltosság vírus vektora (VISSCHERS et al., 2023). A termésbe rágó gyapottok bagolylepke (*Helicoverpa armigera*) hernyója is jelentős károkozásra képes, valamint kórtani eredetű problémák indikátora lehet (TANPURE et al., 2017).

A paprika baktériumos megbetegedései közül a paprika pszeudomonaszos betegsége (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) és a xanthomonaszos betegsége (*Xanthomonas vesicatoria*) okozhat kellemetlenséget a termelőknek. Gombás betegségei közül a palántanevelés során fellépő *Rhizoctonia solani* és a *Phytophthora* sp. által okozott palántadőlés tünetegyüttes, a paprika lisztharmat (*Leveillula taurica*), a fehérpenészes hervadás (*Sclerotinia sclerotiorum*) és az alternáriás magházpenész (*Alternaria alternata*) emelendő ki (GLITS - FOLK, 2000).

A paprika termesztés egyik kulcskérdésének tekinthetőek a paprikát fertőző vírusok. A paprikakultúrák vírusfertőzöttsége tág határok között mozoghat és a száz százalékot is elérheti (BENNER – KUHN, 1985). A vírusfertőzés által kiváltott elváltozások sokfélék lehetnek. Az enyhe levélklorózis és hullámosodáson át a lokális nekrózis, hervadás, sőt a növények teljes pusztulása sem ritka. Mivel több vírusfaj is okozhat hasonló tüneteket, így csak a tünetekre hagyatkozva korlátozottan lehetséges a vírus pontos diagnosztizálása (KENYON et al., 2014).

2.3. A Dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV)

A *Tobamovirus* nemzetség tagjai mechanikai úton terjednek, és a fóliasátorban vagy üvegházban termesztett paprika számára legkártékonyabb vírusok. Egyik legelterjedtebb képviselője a *Tobacco mosaic virus* (TMV), mely különösen stabil vírus, ezért fertőzőképes marad a szennyezett növényi maradványokban, komposztban, talajban és öntözővízben. Gyakran terjed magvakkal, amelyek lehetnek kívülről vagy ritkábban belsőleg (endospermium) fertőzöttek (PARISI et al., 2020).

2.3.1. TMV tünetei paprikán

A fertőzött paprika növények különböző mértékű elsősorban erek közötti mozaikosságot, illetve nekrózist mutatnak a leveleken, száron, esetleg a bogyón. Ezen kívül a növények fejlődésének visszamaradása figyelhető meg, a levelek, termések és az egész növény kisebb marad. A nagyobb érzékenységet mutató fajtáknál előfordulhat a nekrotikus termésesíkség, a szár nekrózis, esetleg a virágok elsárgulása. További tünet a növények szárazanyagának, vegetatív tömegének, valamint a klorofil a és b termelésének csökkenése. Megfigyelték a prolin tartalom növekedését levelekben, de ez valószínűleg fajtánként eltérő értékeket mutat (PAZARLAR et al., 2013).

2.3.2. TMV biológiája

A virionok merev pálcika alakúak, nem borítja őket lipid membrán és többnyire egyenesek, 300 nm hosszúak és 18 nm szélesek (KLUG, 1999). A vírus genomja egyszálú RNS, amely 6395 nukleotidból épül fel. Az RNS spirál a virion központi tengelyétől 6,6 nanométer távolságra a kapszomerekbe ágyazódva található. A kapszid 2130 kapszomérből áll, mindegyik 17,5 kDa molekulatömegű és 158 aminosavból épül fel (SCHOLTHOF et al., 2011). A dohánymozaik vírus RNS-ének 3' vége tRNS-re hasonlító másodlagos szerkezetű, hisztidin kötéseire képes. Az 5' végen 7-metil guanozin sapka (m⁷G50pppG) található (ADAMS et al., 2017).

A tobamovírusok és így a TMV genomja 4 nem átfedő nyitott leolvasási szakaszt (ORF) tartalmaz. Az első leolvasási szakasz egy 126 kDa nagyságú fehérje szintéziséért felel, melyben két funkcionális domén szerepét bizonyították. Az egyik domén a metiltranszferáz aktivitásért, így közvetve a sapka formálódásáért, a másik pedig RNS helikáz aktivitásért felelhet. Egy amber stopkodon (UAG) követi az első leolvasási szakaszt, és azon keresztül történik meg egy 183 kDa nagyságú fehérje szintézise. Ebben a fehérjében 4 domént azonosítottak és RNS függő RNS polimeráz (RdRp) aktivitással rendelkeznek. Két további fehérje íródik át az RNS 3' végének közelében. Egy 17.5 kDa, illetve egy 30 kDa méretű mozgási fehérje. Ezek a fehérjék nem

közvetlenül a teljes hosszúságú genomi RNS-ről, hanem szubgenomi RNS-ekről (I2 és LMC) transzlálódnak (BEACHY - ZAITLIN, 1977). A 17.5 kDa-os köpenyfehérje az egyetlen strukturális fehérje, melyet a TMV genomja kódol. Egy további 54 kDa-os fehérjét mutattak ki, amely átíródása is egy szubgenomi RNS-ről történik, de kimutatása csak *in vitro* kísérletekben sikerült (SULZINSKI et al., 1985).

MOROZOV et al. (1993) a bázissorrend adatokból arra következtettek, hogy többek között a TMV genomján is egy 4.8 kDa-os fehérjét kódoló nyílt leolvasási keret (ORF6) található. Ez a leolvasási keret átfedi a 30 kDa-os és a 17.5 kDa-os fehérjét kódoló géneket. CANTO et al. (2004) igazolták, hogy a TMV ORF6 által kódolt 4.8 kDa-os fehérje befolyásolja a vírus patogenitását *N. benthamiana* tesztnövényen.

2.3.3. TMV rezisztencia

A *Capsicum* fajokban a tobamovírusok elleni rezisztenciát az L lókuszon található gén 4 eltérő allélja biztosítja (L1, L2, L3 és L4), amelyek hatékonysága növekszik a különböző tobamovírusok ellen (RAST, 1988). A jelölés HOLMES (1934) munkájából ered, aki a paprika és a tobamovírusok közötti lokális kompatibilitást vizsgálta mesterséges fertőzéssel. A kutatása során bebizonyította, hogy a *C. frutescens* cv. *Tabasco* fajta inokulált levelein hiperszenzitív reakciót okoz, ami a nekrotikus lokális léziók megjelenését követően gyors levélhullást eredményez, így a vírus a növényben nem képes szintetizálódni. Munkája során megállapította, hogy a vírusfertőzés lokalizálásáért felelős gén dominánsan öröklődik és „L” betűvel jelölte, míg a recesszív fogékonyságért felelős allélt „l” betűvel.

A patogenitás és a rezisztencia gének közötti kölcsönhatás alapján a paprikát fertőző tobamovírusokat az alábbi patotípusokba sorolták: P0 (TMV és ToMV), P1 (PaMMV), P1, 2 (PMMoV), P1, 2, 3 (PMMoV), P1, 2, 3, 4 (2. táblázat) (BOUKEMA, 1980; BOUKEMA, 1984; GILARDI et al., 2004; ANTIGNUS et al., 2008).

2. táblázat A rezisztencia alakulása a rezisztencia gének és a patotípusok között.

(Forrás: ANTIGNUS et al., 2008 nyomán)

Rezisztencia gén	Vírus patotípusa					
		P ₀	P ₁	P _{1,2}	P _{1,2,3}	P _{1,2,3,4}
	L ⁺	F	F	F	F	F
	L ¹	R	F	F	F	F
	L ²	R	R	F	F	F
	L ³	R	R	R	F	F
	L ⁴	R	R	R	R	F

F= fogékony, R= rezisztens

2.4. Az Uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

A *Cucumber mosaic virus* a *Bromoviridae* családon belül a *Cucumovirus* nemzetség fő képviselője. Egy növényi RNS vírus, amely gyakran jelentős veszteségeket okoz kétszikűekben (BARKA – LEE, 2020). A vírust először 1934-ben írták le mozaikos tüneteket mutató uborkában, innen ered az elnevezése. Azóta kiderült, hogy sok más növényt is fertőz (FERREIRA – BOLEY, 1992). Jelenlétét minden kontinensen megerősítették, így az Antarktiszon is (POLISCHUK, 2007). Főként a zöld őszibarack-levéltetű (*Myzus persicae*) és az uborka-levéltetű (*Aphis gossypii*) terjeszti nem perzisztens úton, ennek következtében a vírus könnyen terjed, és világszerte megtalálható. A CMV minőségromlást és a termés hozam csökkenését eredményezheti, különösen, ha a fertőzés korai fejlődési stádiumban történik. Ilyenkor a termésveszteség akár a 80%-ot is elérheti. A természetben a CMV más szinergikus hatású vírusokkal kevert fertőzésben is előfordulhat, és ez csökkentheti a növények más vírusokkal szembeni rezisztenciáját (PARISI et al., 2020).

2.4.1. CMV tünetei paprikán

A CMV 1200 fajt fertőz meg több, mint 100 növény családban és jelentős gazdasági veszteségeket okozhat számos zöldség- és dísnövényben. A CMV a legtöbb gazdanövényben szisztémás fertőzést okoz, de egyes kultúrákban, például a lucernában tünetmentes maradhat. A CMV okozta tünetek nagymértékben változhatnak annak függvényében, hogy a termés és a növény, milyen fejlődési stádiumban van, amikor a fertőzés bekövetkezik. A paprika növények tünetei a fertőzés kezdeti stádiumától függően változnak. A szisztémás tünetek kezdeti megnyilvánulása jellemzően a fiatal levelek klorózisával jár, amely a levél bazális részén vagy az egész levélen előfordulhat. A növény öregedésével ezeken a leveleken gyűrűfoltos mintázat alakulhat ki. Amikor új levelek jelennek meg, ezek a levelek klorotikus mozaikmintázatot fejlesztenek, amely hajlamos az egész levelet behálózni. A klorózt és a klorotikus mozaik tüneteit kifejező levelek után fejlődő levelek különböző mértékű deformációt mutatnak. Ezek a levelek is tompa világoszöld megjelenésűek, szemben az egészséges paprika növények sötétzöld, meglehetősen fényes leveleivel. Ezeknek a tüneteknek a súlyossága a növény fertőzőskori életkorától függően változik, és a súlyosabb tünetek jellemzően akkor jelentkeznek, amikor a növények a fertőzés idején fiatalok (ZITTER – MURPHY, 2009).

2.4.2. CMV biológiája

A CMV három gömb alakú részecskéből áll, amelyek mindegyike körülbelül 28 nm átmérőjű. Genomja három egyszálú mRNS molekulából áll, melyeket RNS 1-nek (~3350 nukleotid), RNS 2-nek (~3050 nukleotid) és RNS 3-nak (~2200 nukleotid) nevezünk. Mindegyik

RNS molekula egy különálló, gömb alakú fehérjeburokba van zárva. Így egy érett CMV három részből áll, melyek mindegyike az egyik RNS-t tartalmazza. A harmadik rész tartalmaz egy negyedik RNS szálát, amelyet RNS 4-nek neveznek (~1030 nukleotid) és a köpenyfehérje gént kódolja.

Az RNS 1 egyetlen fehérjét kódol, amelyet 1a-nak neveznek és amelyről kimutatták, hogy szükséges a vírusgenom replikációjához. Az 1a fehérjének két funkcionális doménje van: az N-terminális és a C-terminális domén. Az N-terminális domén metiltranszferáz aktivitással rendelkezik, amivel egy cap szerkezetet ad a genomiális és szubgenomiális RNS-ek 5' végéhez, míg az 1a fehérje C-terminális doménje feltételezhetően egy helikáz, amely a kettősszálú RNS „kitekerésére” szolgál.

Az RNS 2 két fehérjét kódol, amelyeket 2a és 2b fehérjéknek nevezünk. A 2a fehérje szükséges a CMV replikációjához és jellegzetes RNS függő RNS polimeráz motívumokkal rendelkezik, azaz egy RNS szálát használ templátként egy komplementer RNS szál előállításához. A 2b fehérje egy különálló (szubgenomiális) RNS szálból transzlálódik, amelyet RNS 4A-nak neveznek. A 2b fehérje gátolja a gazdaszervezet poszttranszkripció géncsendesítő mechanizmusát.

Az RNS 3 két fehérjét kódol, amelyeket 3a-nak és köpenyfehérjének neveznek. A 3a fehérje egy mozgási fehérje, amely nélkülözhetetlen a vírus sejt-sejt mozgásához. Kimutatták, hogy a 3a fehérje a növényen belüli nagy távolságú mozgással is összefüggésbe hozható. A köpenyfehérje az RNS 4-nek nevezett szubgenomikus RNS-ből expresszálódik. Ez az egyetlen fehérje, amely a vírusrészecskékhez kapcsolódik, és ez az egyedüli meghatározója a levéltetű vektorok általi átvitelének. A köpenyfehérje részt vesz a vírus sejt-sejt mozgásában, bár feltételezik, hogy közvetett szerepet játszik ebben a mozgási formában, és közvetlenül vesz részt a növényen belüli nagy távolságú mozgásban (ZITTER – MURPHY, 2009).

2.4.3. CMV rezisztencia

Az egyetlen CMV elleni domináns rezisztenciagén (Cmr1), amelyet a *C. annuum* cv. *Bukangból* azonosítottak, a paprika második kromoszómájának (Chr 2) centromer régiójában helyezkedik el. A közelmúltban egy új recesszív gént, a cmr2-t azonosították. A *Capsicum* sp.-ben azonosított CMV rezisztencia források szinte mindegyike több gén által szabályozott részleges rezisztenciát mutatnak (PARISI et al., 2020).

2.5. A paprika nemesítése

Nemesítésnek nevezzük azt a tudományos és gyakorlati tevékenységet, amely a növényi öröklöttség megváltoztatására és javítására törekszik az egymástól különböző változatok vagy formák kiválogatásával. Célja a jelenlegi termesztésben lévő növényfajtáknál termékenyebb, ellenállóbb, jobb termésbiztonságú, magasabb minőségű, esetleg a változó igények kielégítésére alkalmasabb fajták előállítása (PEPÓ, 2010).

A nemzetközi paprikanemesítés négy fő célja:

- Kedvező agronómiai tulajdonságok kialakítása, mint a termés mennyiség növelése, bogyó alak és szín változatok, növény tulajdonságok, és terméskötés javítása.
- Abiotikus stressz tolerancia növelése, például a sok helyen a termesztést limitáló tényezőként jelentkező aszály és só-tűrés tekintetében.
- Rezisztencianemesítés a számtalan baktériumos, gombás és vírusos eredetű betegségekkel szemben.
- Minőségi igények kielégítése, beltartalmi értékek javítása, mint kapszaicinoidok, izoprenoidok, flavonoidok és C-vitamin.

A négy fő irány közül kiemelkedik a rezisztencianemesítés, az új kórokozó-rezisztens genotípusok fejlesztése, hogy a termelés olyan agroökológiai körzetekben is megvalósulhasson, ahol eddig a kórokozó jelenléte miatt nem volt lehetséges. Ezen felül a rezisztens fajták termesztése csökkenti a termésvesztést, csökkenti a növényvédőszer felhasználást és a kijuttatásból származó környezetterhelés is elmarad. A megtermelt élelmiszerek fogyasztói szempontból is biztonságosabbak, olcsóbbak és környezetkímélőbbek lehetnek (RAMALHO DO RÊGO et al., 2016).

A vírusokkal szembeni sikeres védekezéshez számos tényezőt kell figyelembe venni, melyek a termelők részéről plusz költségekként lépnek fel. Ilyen lehet a vektorok elleni izoláció, az eszközök fertőtlenítése, vírusmentes szaporítóanyag beszerzése. Emellett kijelenthető, hogy paprikát fertőző vírusfajok száma és a fertőzések gyakorisága meredek ütemben emelkedett az elmúlt 30 évben, így a vírusokkal szembeni rezisztenciára nemesítés kérdése elengedhetetlen a termelési színvonal fenntartásához (KENYON et al., 2014).

2.5.1. Genetikai ismereteink a paprikáról

A *Capsicum* nemzetség többnyire diploid fajokat foglal magába, melyek alap kromoszómaszáma 12 ($2n = 2x = 24$). A nemzetségen belül azonban található 13 kromoszómával ($2n = 2x = 26$) rendelkező faj és egy tetraploid is ($2n = 4x = 48$). A tetraploid faj *C. annuum* var.

glabriusculum, amely a termesztett paprika vad alakja. A paprika fajokat a főbb morfológiai bélyegek és genetikai kapcsolatok alapján 11 csoportra (clad) bontották (CARRIZO GARCÍA et al., 2016).

A kétezer-tíz évek között számos kutatócsoport publikált genomszekvenciákat, mind termesztett mind vad *Capsicum* fajokból. A kutatások célja többnyire azon lókusztok megtalálása volt, amelyek a biotikus vagy abiotikus stressz rezisztenciához, vagy a minőségi mutatókhoz köthetők. Az első átfogó vizsgálat a *Capsicum annuum* CM334 és a *Capsicum chinense* PI159236 teljes genomszekvenálására irányult, amelyet azóta széles körben alkalmaznak populációk tulajdonságainak felméréséhez, valamint fontos betegség rezisztencia tulajdonságokat tartalmaznak. A következő kész genomszekvenciák a *C. annuum* Zunla-1-hez és a vad Chiltepinhez (*C. annuum* var. *glabriusculum*) tartoztak. Mindkét tanulmány a paprika genom méretét 3-3.5 Gbp körülre tette, jelentős (80 % körüli) ismétlődőelemekkel, közel 35 ezer génnel. A CM334 és a *C. chinense* PI159236, valamint a háziasított *C. baccatum* génszekvenciájának ismeretében képesek voltak a *Capsicum* nemzetség evolúciós kapcsolatait tisztázni és divergencia időket becsülni. Linked read sequencing technológiával szekvenáltak egy újabb *C. annuum* hibridet, amely a CM334 és egy nem csípős paprika F1 generációjába tartozott (3. táblázat) (TRIPODI et al., 2019).

3. táblázat Összefoglaló táblázat a *Capsicum* nemzetség elérhető genomszekvenciáiról.

(Forrás: TRIPODI et al., 2019 nyomán)

	<i>C. annuum</i> CM334 (v1.55)	<i>C. chinense</i> PI159236	Zunla- 1	Chiltepin	<i>C. baccatum</i> PBC81	<i>C. chinense</i> PI159236	CM334 F1
A teljes szekvencia hossza (Gbp)	650.2	289.6	477.37	295.85	526.7	425.7	104.7
Szekvencia mélysége	186.6	83.2	146.43	96.37	136.1	132.2	56
Genom- méret (Gbp)	3.48	3.14	3.26	3.07	3.9	3.2	3.2
Scaffold no.	37.989	239.495	28,149	30,293	2.083	1.557	83.391
Ismétlődő elemek (%)	76.4	79.6	80.9	81.4	85	85	na
Gének száma	34.903	33.788	35.336	34.476	35.874	35.009	na
Forrás	KIM et al., (2014)		QIN et al., (2014)		KIM et al., (2017)		HULSE- KEMP et al., (2018)

2.5.2. A paprika nemesítés géntartalékai

Alapvetően a nemesítésnek mindig fontos forrásai lesznek a kultúrnövénnyel rokon vad fajok és azok változatai, a természetes populációk, a konkrét agroökológiai környezethez alkalmazkodott helyi, illetve tájfajták, a mesterséges populációk, nemesített fajták, mutáns vonalak, poliploid egyedek, dihaploid vonalak, és ha törvényi feltételek engedik, akkor a transzgenikus hibridek (PEPÓ, 2010). Nincs ez máshogy a paprika esetében sem, a *Capsicum* nemzetségbe tartozó vad fajok mellett a termesztett fajok egyes változatai is megtalálhatóak és általánosan elterjedtek az amerikai földrészen Texitól egészen Argentínáig. A *C. annuum* elsődleges géncentruma Mexikó, emellett számos változata fordul elő Közép- és Dél-Amerikában. A nagy földrajzi felfedezéseket követve alakult ki az étkezési paprika következő másodlagos centruma a mediterrán régióban, majd Délkelet-Ázsiában. A változatos termesztési környezethez adaptálódva széles spektruma alakult ki a tájfajtáknak, meghódították az alacsonyan és magasan fekvő termesztő régiókat egyaránt. A termesztésbe vont fajok közül *C. pubescens* esetében találtak jelentős genetikai variabilitást Bolívia és Peru magasan fekvő régióiban. Az ott felfedezett változatok alkalmazkodtak legjobban az alacsonyabb hőmérséklethez. A többi faj trópusi környezetben érzi otthon magát, és nagy változatosságban találhatóak meg Amazóniában és a Karib szigetvilágban a vad és kultúrflórában egyaránt. A génbanki tevékenység és a genetikai erőforrások megőrzésére irányuló programok közül a paprika tekintetében kiemelkednek az alábbiak: USDA-ARS-GRIN, (Amerikai Egyesült Államok), INRA (Franciaország), Aegean Agriculture Research Institute (Törökország), University of Torino (Olaszország) (PROHENS – NUEZ, 2008).

2.5.3. A paprika vírusrezisztencia forrásai

A paprika kórokozóinak köre nagyon széles, magában foglalja a gombákat, vírusokat, baktériumokat és rovarokat. A 4. táblázat átfogó képet ad a paprika vírusainak széles skálájával szembeni rezisztencia forrásokról. A tobamovírusok mechanikai úton terjednek és a hajtított termesztésben a paprika számára a leginkább káros vírusok. Egyik legelterjedtebb képviselője a TMV. A *Capsicum sp.*-ben azonosított CMV rezisztencia források szinte mindegyike (4. táblázat) több gén által szabályozott részleges rezisztenciát mutat (PARISI et al., 2020).

4. táblázat Paprika vírusrezisztencia forrásai.

(Forrás: PARISI et al., 2020 nyomán)

Fajok (vírus)	Rezisztencia/tolerancia források		
	Vonalak/genotípusok	Paprika fajok	Források
Genus: Orthotospovirus			
<i>Tomato spotted wilt orthotospovirus</i> (TSWV)	PI 152225, PI 159234, PI 159236, 7204, CNPH-275, AC09-207, 7204, PI -15, C00943, ECU-973	<i>C. chinense</i>	BLACK et al., (1991) BOITEUX - DE AVILA, (1994) CEBOLLA-CORNEJO et al., (2003) HOANG et al., (2013)
	PIM26-1, C-153	<i>C. baccatum</i>	SOLER et al., (2015)
	PI 264281	<i>C. annuum</i>	BLACK et al., (1991)
<i>Capsicum chlorosis orthotospovirus</i> (CaCV)	PI 90972	<i>C. chinense</i>	PERSLEY et al., (2009)
Genus: Potyvirus			
<i>Pepper mottle virus</i> (PepMoV)	Tabasco (CGN 21546)	<i>C. frutescens</i>	GREEN – KIM, (1994)
	Avelar, 9093	<i>C. annuum</i>	VENKATESH et al., (2018) PARRELLA et al., (2002)
<i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV)	UENF 1624, UENF 1732, UENF 1764, UENF 1770	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	BENTO et al., (2013)
<i>Potato virus Y</i> (PVY)	Perennial (partially resistant)	<i>C. annuum</i>	CARANTA et al., (1996)
	Pen 3.4, CGN 17015 (Amarillo)	<i>C. baccatum</i>	GREEN – KIM, (1994)
<i>Potato virus Y pathotype 0</i> (PVY-0); <i>Tobacco etch virus</i> (TEV); <i>Pepper mottle virus</i> (PepMoV)	PI 159236, PI 152225	<i>C. chinense</i>	KYLE – PALLOIX, (1997)
<i>Potato virus Y pathotype 0</i> (PVY-0)	Yolo Y	<i>C. annuum</i>	RUFFEL et al., (2002)
<i>Potato virus Y pathotypes 0 and 1</i> (PVY-0-1) <i>Tobacco etch virus</i> (TEV)	PI 264281, SC46252, Florida VR2	<i>C. annuum</i>	KYLE – PALLOIX, (1997)
<i>Potato virus Y pathotypes 0, 1 and 2</i> (PVY-0-1) <i>Pepper mottle virus</i> (PepMoV)	CM334	<i>C. annuum</i>	KYLE – PALLOIX, (1997) DOGIMONT et al., (1996)
<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)	Agronomico 10C-5, Delray Bell, VR4	<i>C. annuum</i>	GREEN – KIM, (1994)
<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV)	Perennial	<i>C. annuum</i>	CARANTA et al., (1996)
Genus: Cucumovirus			
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Perennial, Bukang, Lam32, Vania, Sapporo-onnaga, Nanbu-onnaga, BJ0747	<i>C. annuum</i>	CARANTA et al., (1997) CARANTA et al., (2002) CHOI et al., (2018) KANG et al., (2010) SUZUKI et al., (2003) YAO et al., (2013)
	BG2814-6, Tabasco (CGN 21546), LS1839-2-4	<i>C. frutescens</i>	GREEN – KIM, (1994) GRUBE et al., (2000)
	PI 439381-1-3	<i>C. baccatum</i>	SUZUKI et al., (2003)

Genus: <i>Begomovirus</i>			
<i>Pepper leaf curl virus</i> (PepLCV)	BS-35, GKC-29, Bhut Jolokia	<i>C. annuum</i>	RAI et al., (2014)
<i>Chilli leaf curl virus</i> (ChiLCV)	DLS-Sel-10, WBC-Sel-5, PBC-142, PBC-535	<i>C. annuum</i>	SRIVASTAVA et al., (2017)
<i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV)	PP1037-7644-1, PBC148, PBC149, PBC502, PBC518, PBC601, PP99	n.a.	BARCHENGER et al., (2019)
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i> (PHYVV)	UAS12	<i>C. annuum</i>	RETES-MANJARREZ et al., (2018)
<i>Pepper golden mosaic virus</i> (PepGMV)	BG-3821	<i>C. chinense</i>	GARCÌA et al., (2011)
Genus: <i>Tobamovirus</i>			
	PI 315008, PI 315023, PI 315024, PI 159236, PI 152225, KC667	<i>C. chinense</i>	GARCÌA et al., (2011) TOMITA et al., (2011)
	Bruinsma Wonder, Verbeterde Glas, KC780, Nanbu-Ohnaga	<i>C. annuum</i>	TOMITA et al., (2011) SAWADA et al., (2004)
	Tabasco	<i>C. frutescens</i>	TOMITA et al., (2011)
	PI 260429	<i>C. chacoense</i>	TOMITA et al., (2011)
	PI 439381-1-3	<i>C. baccatum</i>	TOMITA et al., (2011)

2.5.4. Molekuláris markerek használata a paprika vírusrezisztencia nemesítésben

Az elmúlt évtizedekben a molekuláris markerek használata általánosan elterjedté vált a növénynemesítők körében. Ez egyfajta direkt szelekciós módszer, amikor a molekuláris markereket figyelve kapunk információt a markerekkel szoros összefüggésben lévő általunk azonosítani kívánt tulajdonságokkal. A marker alapú szelekció (MAS) meggyorsítja a szelekciós folyamatot és a kívánt tulajdonságokra történő direkt szelektálást tesz lehetővé, az eredeti genetikai információ megváltoztatása nélkül (SINGH et al., 2021; PEPÓ, 2010).

A MAS alkalmazásával a betegségrezisztencia gének gyors felhalmozását lehet elérni. A közelmúltban a betegségrezisztencia génekhez kapcsolódó egyponos nukleotid-polimorfizmus (SNP) markerek gyors kimutatása a nagy áteresztőképességű genotipizálási módszerekkel kombinálva az újgenerációs szekvenálási (NGS) technológiával jelentősen lerövidítette a genetikai térkép elkészítéséhez, a kvantitatív tulajdonság lokusz (QTL) analízishez és a jelölt gén azonosításához szükséges időt a növényi molekuláris nemesítésben (BARKA – LEE, 2020).

2.5.5. A paprika vírusrezisztencia nemesítésében felhasznált leggyakoribb marker típusok

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Az AFLP markerek 80-500 bp méretű DNS fragmentek, amelyek restrikciós enzim emésztés során keletkeztek. Ezután oligonukleotid adaptereket kapcsolnak a restrikciós fragmentekhez, majd szelektív PCR technológia segítségével amplifikálják azokat. A kapott PCR termékek csak azokat a fragmenteket tartalmazzák, amelyek komplementer nukleotidjaik túlnyúlnak a restrikciós felismerési helyen. A PCR termékeket denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézissel elemzik, hogy feltárják a genetikai polimorfizmusokat. A módszer egyik legfontosabb lépése a kiváló minőségű DNS izolálása a vizsgált szervezet szövetmintáiból. A restrikciós enzimek magasfokú specifitásának köszönhetően az eljárás reprodukálhatósága is igen nagy.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A restrikciós hasításon alapuló módszer lényege, hogy a restrikciós enzimek egy véletlenszerű, de specifikus helyen felismerik a genomi DNS szekvenciát és ott hasítják a molekulát. Így különböző hosszúságú szakaszok (fragmentek) jönnek létre, amelyek ezután gélelektroforézissel elválaszthatóak. A restrikciós endonukleázok baktériumokból izolált enzimek, melyek mindegyike különböző, 4-6 bp hosszúságú restrikciós hasítási helyet ismer fel. A restrikciós helyek ismétlődéseinek száma és az enzim felismerési helyének egyedek közötti eloszlásának véletlenszerűségei, különböző számú és hosszúságú fragmentumot generálnak a restrikciós emésztés során. Az enzim emésztés után keletkező véletlenszerű DNS fragmentumok hossza ezért az egyes szervezetekben eltérő. Az RFLP sávok általában 2-10 kb méretű DNS fragmenteknek felelnek meg.

A tiszta DNS-t általában a vizsgálandó növények levélszövegeiből izolálják. A hatékony RFLP analízishez fontos, hogy elegendő mennyiségű DNS álljon rendelkezésre. Ennek eléréséhez egyes esetekben PCR-t használnak a kérdéses DNS szakasz amplifikálására. Az izolált DNS-t restrikciós enzimek alkalmazásával emésztjük. Az eljárás nagyszámú, változó hosszúságú fragmentumot eredményez a reakcióoldatban. Ezután a kapott DNS fragmenteket agaróz- vagy poliakrilamid-gélelektroforézissel elemezzük. A DNS szálak negatív töltésűek, így elektroforézissel méretük alapján elkülöníthetők.

Az RFLP markerek közepesen polimorfak, erősen lókuszspezifikusak és nagymértékben reprodukálhatók. Szintén nagy mennyiségben vannak jelen a genomban, és véletlenszerűen oszlanak el. Az RFLP elemzés azonban munkaigényes, időigényes és magas technológiai

felszereltséget igénylő eljárás. Nagy mennyiségű és nagy molekulatömegű tisztított DNS-t igénylő eljárás. Ezenkívül az RFLP markerelemzés nem automatizálható. Az RFLP mára elavult módszer a kisebb technológiai felszereltséget igénylő és olcsóbb polimeráz láncreakción (PCR) alapuló DNS marker profilalkotási technológiák kifejlesztése miatt.

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)

A CAPS technológia az RFLP módszer kiterjesztése. A CAPS vizsgálat amplifikált DNS fragmenteket használ, amelyeket restriktációs endonukleázzal emésztünk. Az RFLP-hez hasonlóan a CAPS is azon az elven működik, hogy az egyedek közötti genetikai különbségek restriktációs endonukleáz hasítási helyeket hozhatnak létre vagy szüntethetnek meg, és ezek a különbségek az emésztés utáni DNS fragmentum hosszában is kimutathatók.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

A RAPD protokoll tetszőleges, általában 8-15 nukleotid hosszúságú, rövid oligonukleotid primereket használ, amelyek PCR segítségével véletlenszerűen amplifikálják a genomi DNS egyes szakaszait. A RAPD analízisben az előzetes DNS szekvencia információ nem fontos követelmény tetszőleges primerek használata miatt. Amennyire lehetséges, a RAPD-hez kiválasztott primerszekvenciának legalább 40%-os (de inkább 50-80%) GC-tartalommal (guanin és citozin) kell rendelkeznie. Ennél a GC tartalomnál a primer képes lesz hatékonyan működni azon a hőmérsékleten, amelyen a PCR végbe megy. Ezenkívül a primerben nem lehet palindrom szekvencia. A PCR termékek könnyen elválaszthatók agaróz-gélelektroforézissel. A gélt etidium-bromiddal megfestik és ultraibolya megvilágítással teszik láthatóvá.

A RAPD széles körben alkalmazott, alacsony költségigényű technika. Az eljárás automatizálható és gyors. A véletlenszerű primerek használata miatt nincs szükség előzetes szekvencia információkra. Csak kis mennyiségű tisztított, nagy molekulatömegű DNS-re van szükség. Közepesen polimorfak, azonban nem lókuszspezifikusak. Rendkívül fontos, hogy elkerüljük a minta DNS templatokkal történő szennyeződését. Ez azért fontos, mert a RAPD eljárás során használt rövid random primerek könnyen amplifikálják a különféle organizmusokból származó DNS fragmenteket. A RAPD profilok reprodukálhatósága azonban nagyon problematikus, ezért elengedhetetlen a nagyon szigorú és következetes PCR reakciókörülmények fenntartása.

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

A SCAR a RAPD továbbfejlesztett változata. Egy PCR alapú technika, amely egyetlen lókuszon azonosít egy DNS szakaszt egy pár specifikus, 15-30 bp hosszúságú oligonukleotid primer

segítségével, amelyeket klónozott, polimorf RAPD fragmentekből származó nukleotid szekvenciákból terveztek.

A SCAR marker eljárások technikailag egyszerűek és könnyen végrehajthatók. A RAPD primerekhez képest a SCAR primerek hosszabbak, ezért kevésbé érzékenyek a reakciókörülményekre, így a folyamat reprodukálhatósága is nagyobb. Csak kis mennyiségű DNS-re van szükség. Legnagyobb hátrányuk azonban az, hogy a RAPD-k polimorf fragmentumából származó szekvencia adatokra van szükség a SCAR PCR primerek tervezéséhez.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Az SNP-k olyan genetikai polimorfizmusok, amelyek egy vagy több különböző fajok egyedei között a DNS szekvenciák egy bázispáros különbségeiből erednek. Más genetikai markerekhez képest az SNP a DNS szekvencia-polimorfizmusok leggyakrabban előforduló formája az organizmusokban. Az SNP-k a genom kódoló és nem kódoló régióiban is megtalálhatóak változó mennyiségben, általában 100-300 bázispáronkénti gyakorisággal. Az egy nukleotid az alapvető és legkisebb öröklődő genetikai egység az organizmusokban. Az SNP-k jelenléte vagy hiánya mutációs események, például transzlációk vagy transzverziók, valamint inszerciók vagy deléciók előfordulásán keresztül következik be. Így az SNP-k restrikciós enzim felismerési helyeket hozhatnak létre vagy szüntethetnek meg a DNS különböző pontjain, ami eltérő hosszúságú DNS fragmenteket eredményez a gélekben az enzimes emésztés után történő elektroforetikus elválasztás során. Az SNP-ket gyakran restrikciós emésztés helyett kvantitatív PCR eljárással detektálják.

SSR (Simple Sequence Repeats)

Az egyszerű szekvencia ismétlődések (SSR), olyan DNS szakaszok, amelyek rövid, tandem ismétlődő mono-, di-, tri-, tetra-, penta- vagy hexanukleotid motívumokból állnak. A leggyakrabban előforduló motívumok a mono-, di-, tri- és tetranukleotidok. Az SSR markereket széles körben alkalmazzák a növénygenetikai kutatásokban. Jelen vannak a fehérjét kódoló génekben. Fő előnye a magas szintű polimorfizmus és a megbízhatóság. Hátránya, hogy az SSR elemzés költséges és időigényes folyamat, különösen akkor, ha könyvtár létrehozására van szükség (AMITEYE, 2021).

Az 5. táblázat a paprika vírusrezisztencia nemesítésében felhasznált markerek listáját tartalmazza.

5.táblázat Vírusrezisztencia markerek listája.

(Forrás: BARKA – LEE, 2020 nyomán)

Betegség	Rezisztencia lókusza	Kromoszóma	Marker/gén	Marker típusa	Szülők	Öröklés	Forrás
CMV	CMV	12	A5.1	RAPD	Perennial' × 'Yolo Wonder	Single dominant	PFLIEGER et al., (1999)
	cmv11.1	11	E35/M48-101	AFLP	'Maor' × 'Perennial'	QTL	BEN CHAIM et al., (2001)
	cmv12.1	12	E33/M48-132, E40/M47-262	AFLP	'H3' × 'Vania'	QTL	CARANTA et al., (2002)
	Cmr1	2	CaTm-int3-HRM, CaT1616BAC, 240H02sp6	SNP	'Bukang'	Single dominant	KANG et al., (2010)
	qcmv.hb-8.2	11	UBC829	RAPD	'BJ0747' × 'XJ0630'	QTL	YAO et al., (2013)
	qCmr11.1	11	Indel-11-64	InDel	'PBC688' × 'G29'	QTL	GUO et al., (2017)
	qcmv11.1 qcmv11.2 qcmv12.1	11	Marker6201026 Marker5409028 Marker1765200	SNP	BJ0747' × 'XJ0630'	QTL	LI et al., (2018)
	cmr2	8	Affy4, IBP160, cmvAFLP	SNP	'Lan32' × 'Jeju'	Single recessive	CHOI et al., (2018)

Betegség	Rezis- tencia lókusza	Kromo- szóma	Marker/gén	Marker típusa	Szülők	Öröklés	Forrás
PepMoV	pvr1 (= pvr2)	4	Pvr1-S, pvr1-R1, pvr1-R2	CAPS	R and S accessions	Single recessive	YEAM et al., (2005)
			eIF4E-A614G, -G325A, -T236G, -T200A	ARMS-PCR	Yolo Wonder' × 'CM334', 'Perennial' × 'Yolo Y', 'Perennial' × 'Florida VR2'	Single recessive	RUBIO et al., (2008)
			KASP_pvr1	KASP	'Habanero' × 'PI159234'	Single recessive	HOLDSWORTH - MAZOUREK, (2015)
	Pvr4 (= Pvr7)	10	Pvr4-CAPS	CAPS	'Yolo Wonder' × 'CM334'	Single dominant	CARANTA et al., (1999)
			SCUBC19	SCAR	'SCM334' × 'Yolo Wonder'	Single dominant	ARNEDO-ANDRÉS et al., (2002)
			HpmsE031	SSR	CM334' × 'Chilsungcho	Single dominant	KIM et al., (2011)
			MY1421	SNP	'SR-231' × 'CM334'	Single dominant	DEVTRAN et al., (2015)
			SNP-H2.4, SNP-H1.5, SNP-H1.6	SNP	'9093' × 'Jeju'	Single dominant	VENKATESH et al., (2018)
PVMV	pvr6	3	eIF(iso)4E gene-based marker	InDel	DH218' × 'F'	Single recessive	RUFFEL et al., (2006)
			Pvr6-SCAR	SCAR	'Dempsey' × 'Perennial'	Single recessive	HWANG et al., (2009)
PMMoV (TMV családba tartozik)	L3	11	21L24M, A339, 197AD5R, 253A1R	SCAR, SNP	KOS' × 'NDN' PI159236' × 'LS1839-2-4'	Single dominant	TOMITA et al., (2008)
	L3, L4	11	L3-SCAR, L4-SCAR	SCAR	Cultivars	Single dominant	LEE et al., (2012)
			L3-HRM, L4-HRM	SNP	Cultivars 'Special', 'Myoung-sung'	Single dominant	YANG et al., (2012)
TSWV	Tsw	10	SCAC568	CAPS	'Cupra' × 'Baltasar'	Single dominant	KIM et al., (2008)

2.6. Újgenerációs szekvenálási technológia (NGS)

Sanger és kutatótársai az 1970-es években fejlesztették ki a fragmentáción és lánctermináción alapuló DNS szekvenálási technikát, amely lehetővé tette eleinte teljes gének, majd teljes genomok vizsgálatát. Az eredményeik meghatározták a molekuláris biológia irányvonalát és számos kutatócsoport igyekezett a Sanger-szekvenálás áteresztőképességét növelni. A jelenleg elérhető újgenerációs szekvenálási technológiák (next generation sequencing - NGS) a DNS szekvenálás eddig még nem tapasztalt korszakát hozták el. Az NGS módszerek közös jellemzője a párhuzamosítás, mely lehetővé teszi az egyidőben történő bázissorrend meghatározást akár százezres, milliós nagyságrendben is. A sorrend meghatározás közvetlen detektálással, azaz gélelektroforézis nélkül történik. A megnövelt áteresztőképesség miatt nagyméretű genomi területek vizsgálata is gyorsabban zajlik, miközben a költségek jelentősen csökkentek. Az NGS technológiák alkalmazásával egyszerűbbé vált többek között a fenotípus és genotípus kapcsolatának vizsgálata, új gének, markerek és ritka allélok azonosítása populációkból (SINGH et al., 2021).

Mind az NGS, mind a Sanger-szekvenálás során a DNS polimeráz nukleotidokat ad hozzá a növekvő DNS templát szálhoz. A különbség viszont a szekvenálási mennyiség. A Sanger módszer egyszerre csak egy DNS fragmentumot képes szekvenálni, míg az NGS esetében ez a szám több millió is lehet. Az NGS lehetővé teszi több minta költséghatékony szűrését és több variáns kimutatását a genom célzott területein - ez a megközelítés a Sanger-szekvenálással költséges és időigényes lenne (CHENG et al., 2023).

2.6.1. NGS folyamata Sbs technológiával

A minták előkészítése kulcsfontosságú az NGS munkafolyamat sikeréhez. Ez a lépés a DNS vagy RNS mintákat úgy készíti elő, hogy azok kompatibilisek legyenek a szekvenáló eszközzel. A szekvenáló könyvtárakat jellemzően a DNS fragmentálásával és speciális adapterek hozzáadásával hozzák létre. Az Illumina szekvenálási munkafolyamatában ezek az adapterek komplementer szekvenciákat tartalmaznak, amelyek lehetővé teszik a DNS fragmentumok kötődését az áramlási cellához. A fragmentumok ezután felerősíthetők és tisztíthatók. Az erőforrás takarékosági szempontból több könyvtárat is össze lehet vonni és egy menetben szekvenálni. Fontos a könyvtárak egyedi jelölése a megkülönböztethetőség érdekében. Az NGS munkafolyamat szekvenálási lépése során a könyvtárakat egy áramlási cellába töltik, és a szekvenálóba helyezik. A DNS fragmentumok klasztereit a klasztergenerálásnak nevezett folyamat során felerősítik, ami az egyszálú DNS több millió példányát eredményezi. A szintézissel történő szekvenálásnak (sequencing by synthesis - SBS) nevezett folyamat során a kémiaiailag módosított nukleotidok természetes komplementaritás révén kötődnek a

DNS templát szálhoz. Minden nukleotid tartalmaz egy fluoreszcens címkét és egy reverzibilis terminátort, amely blokkolja a következő bázis beépülését. A fluoreszcens jel jelzi, hogy melyik nukleotid került hozzáadásra, a terminátor pedig lehasad, így a következő bázis meg tud kötődni. Az előremenő DNS szál leolvasása után a leolvasott adatokat kimossuk, és a folyamat megismétlődik a fordított szál esetében. Ezt a módszert páros végű szekvenálásnak nevezik. A szekvenálás után a műszer szoftvere azonosítja a nukleotidokat, valamint a bázishívások (base calling) előre jelzett pontosságát (MCCOMBIE et al., 2019).

2.6.2. Transzkriptomika

Transzkriptomnak nevezzük egy adott sejt, szövet vagy szervezet RNS készletét (beleértve az mRNS-t, rRNS-t, tRNS-t és bármilyen más, nem kódoló RNS-t is) egy időpillanatra vetítve. A transzkriptom összetétele folyamatosan változik az egyes gének megnyilvánulásának függvényében. A transzkriptomika a transzkriptom elemeinek strukturális és funkcionális vizsgálata, mely segítségével azonosíthatóvá válnak a szervekben, szövetekben különböző mértékben megnyilvánuló gének. Akár az eltérő környezeti-, és élettani körülmények közötti helyzetre adott RNS szintű válasz is (KAHL, 2015).

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

Minden növényanyag a Zöldségtermesztési Kutató Intézet Zrt. (ZKI) kecskeméti telephelyén, üvegházi körülmények között lett felnevelve. A vizsgálatokhoz használt fajták és genotípusok a ZKI tulajdonát képezték. A CMV rezisztencia vizsgálatokhoz a Kárpát és Temes rezisztens fajtákat használtuk. A TMV rezisztencia vizsgálatokhoz az L3 TMV rezisztenciagént tartalmazó 62894 és 62560 nemesítési vonalat, illetve az L4 TMV rezisztenciagént tartalmazó 62917 nemesítési vonalat és a Century nevű fajtát használtuk. Minden genotípus vizsgálata két ismétlésben történt.

3.2. Fertőzési tesztek

A fertőzések a ZKI dohányban fenntartott izolátumaival történtek. A fertőzésekhez 6-8 hetes növények kifejllett leveleit használtuk. Ehhez, fél gramm előzetesen fertőzött és tüneteket mutató dohánylevél 1 mL 50 mmol/L (pH 7,5) koncentrációjú kálium-foszfát pufferrel mozsárban történő zúzása után, az oldat két réteg gézen át lett szűrve, majd karborundummal meghintett levelek színén üvegspatulával finoman bedörzsölve.

3.3. Molekuláris vizsgálatok

A molekuláris vizsgálatokhoz közvetlenül a fertőzések előtt, illetve a fertőzések után 2, 24 és 48 órával történt mintavétel a fertőzött levéllel átellenes levélről. A fertőzés előtt vett minta szolgál kontrollnak, melyhez a fertőzés utáni minták transzkripció adatait viszonyítjuk (7. táblázat). A kísérletek során mock típusú fertőzési eljárást alkalmaztunk, vagyis a kontroll növények ugyanolyan körülmények között, ugyanazon reagenssekkel lettek kezelve, mint a fertőzött növények, kivéve, hogy nem voltak kitéve a vírusnak.

A levélminták alufóliába csomagolva folyékony nitrogénben le lettek fagyasztva, majd felhasználásukig -80°C-on lettek tárolva.

3.3.1. RNS tisztítás és könyvtár készítés

A kontroll és fertőzött levélmintákból 50 mg-ot 100 µL TRIzol reagenssel (Invitrogen, USA) 2 mL-es reakciócsövekben egy DNS malom (Retsch, Németország) segítségével zúztunk, majd 400 µL TRIzol hozzáadása után a Direct-zol RNA Miniprep kittel (Zymo Research, USA) a gyártó útmutatása szerint végeztük a teljes RNS tisztítást. A 3 fertőzési időpontban szedett levélmintákból genotípusonként bulkot készítve végeztük az RNS tisztítást. A teljes RNS-ből

Poly(A) RNA Selection kit (Lexogen, Ausztria) segítségével végeztük a mRNS-ek izolálását. Az RNS integritását (RIN (RNA integrity number) érték) Labchip készüléken teszteltük.

A gyakorlatban csak RIN 5 feletti értékeknél (6. táblázat) várható az expressziós különbségek összehasonlítására is alkalmas minőségű szekvenálás. Mivel esetünkben ezt az értéket néhány mintánál nem sikerült elérni, ezért a rendelkezésre álló levélminták erejéig többször, - a fent leírtak mellett két másik módszert is alkalmazva, - megismételtük az RNS tisztítást. Eredményeink arra utaltak, hogy a könnyen degradálódó RNS a levelekben még a minták folyékony nitrogénbe kerülése előtt részben fragmentálódhatott, azaz már nincs jelen ép formában a szövetekben. Ennek ellenére az összes mintánál az RNS szekvenálások elvégzése mellett döntöttünk, mivel bár az expressziós szintek hiteles összehasonlítása nem lesz lehetséges, azonban a leolvasásokból rekonstruálható transzkriptek szekvenciája továbbra is lehetővé teszi a szekvenciaszintű gén, illetve motívum azonosítást, ami a további vizsgálatok szempontjából értékes információ.

A szekvenáló könyvtárakat NEXTFLEX Rapid Directional RNA-Seq kit 2.0 (PerkinElmer, USA) kittel végeztük el a gyártó útmutatásai szerint.

A szekvenálást egy NextSeq 500 (Illumina, USA) típusú szekvenálón végeztük. A szekvenálásokhoz High Output 150 kiteket (Illumina, USA) használtunk, 20 millió read-re állítva be az egyes minták leolvasási számát.

3.3.2. Szekvenciaadatok feldolgozása

A rezisztencia gének azonosításához a nyilvános NCBI GenBank adatbázisban keresést végeztünk *Capsicum* fajokból azonosított TMV és CMV rezisztencia gén szekvenciákra. Az elérhető rezisztenciához kötődő gének szekvenciáját letöltve és összefűzve kialakítottunk egy génszekvencia-referenciát. A paprika fajták RNS szekvenálási adataiban BWA (LI és DURBIN, 2009) program 'mem' algoritmusa segítségével szűrtük a rezisztencia referenciánkhoz illeszkedő szekvencia leolvasásokat (readek), amiket illesztettünk a génszekvenciákhoz. Az illeszkedő readeket SAMtools (LI et al., 2009) program segítségével rendeztük és fűztük össze. Az illesztésből a SAMtools (LI et al., 2009) program 'consensus' opciójával nyertük ki a fajtákra jellemző konszenzus szekvenciát. Végül ezen konszenzus szekvenciákat hasonlítottuk össze a GenBank adatbázisból letöltött génszekvenciákkal az BLAST+ programcsomag 'BLASTN' program (ALTSCHUL et al., 1990) segítségével.

4. Vizsgálati eredmények és értékelésük

Az anyag és módszer részénél leírtaknak megfelelően, azokat a genotípusokat, ahol az egyes izolátumok RIN értékei 5 alattiak, - akár a kontroll (K), akár a fertőzött (B) - nem tudtuk felhasználni további vizsgálatokhoz. A 6. táblázat adatai alapján a Kárpát és a Century fajtáknál felelt meg mind a kontroll, mind a kezelt a minimum feltételeknek, így csak e fajták transzkriptom adatainak elemzését tudtuk elvégezni.

6. táblázat A vizsgálatokhoz használt növényanyagból tisztított RNS RIN értéke és koncentrációja.

(Forrás: saját munka)

legjobb izolátumok összesítése	RIN	koncentráció (ng/μl)
Karpat_K	5,8	47,98
Karpat_B	7,2	85,43
Temes_K	4,8	66,59
Temes_B	5,5	84,98
62894_K	4,8	48,88
62894_B	6,3	73,77
62560_K_2	5,2	53,66
62560_B_2	4,80	107,32
62917_K_2	4,70	81,30
62917_B	7	74,44
Century_K_2	5,10	43,09
Century_B	6,2	79,15

Mivel sem az internetes adatbankokban, sem pedig a szakirodalomban nem találtunk izolált CMV rezisztencia gén szekvenciákat, így az előbb említett mindkét paprika fajta transzkriptom adataiban csak TMV rezisztencia génekkel kapcsolatos szekvencia motívumokat kerestünk. Az általunk szekvenált és az elemzésekhez felhasznált transzkriptomok főbb statisztikai adatait a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat A transzkriptomok főbb statisztikai adatai.

(Forrás: saját munka)

Azonosító	Fajta	Könyvtár	Szekvencia (Gbp)	Readok száma
Century_B_L001	Century	L001	2,15	14 491 586
Century_B_L002	Century	L002	2,15	14 219 108
Century_B_L003	Century	L003	2,18	14 453 360
Century_B_L004	Century	L004	2,16	14 287 226
Century_K_2_L001	Century	L001	1,88	12 448 008
Century_K_2_L002	Century	L002	1,84	12 198 864
Century_K_2_L003	Century	L003	1,87	12 397 770
Century_K_2_L004	Century	L004	1,85	12 243 288
Karpat_B_L001	Kárpát	L001	2,04	13 525 500
Karpat_B_L002	Kárpát	L002	2,00	13 277 708
Karpat_B_L003	Kárpát	L003	2,04	13 495 304
Karpat_B_L004	Kárpát	L004	2,01	13 338 794
Karpat_K_L001	Kárpát	L001	2,32	15 338 478
Karpat_K_L002	Kárpát	L002	2,27	15 008 770
Karpat_K_L003	Kárpát	L003	2,31	15 289 216
Karpat_K_L004	Kárpát	L004	2,28	15 087 708

Az azonosítók elnevezéseiben a B a fertőzött, a K a kontroll növények transzkriptjeit jelöli.

Az NCBI adatbázisában 4 annotált TMV rezisztenciagént, és 45 feltételezett TMV rezisztenciagén analógot találtunk. Ezen gének szekvencia adatait illesztettük az általunk szekvenált Kárpát és Century transzkriptomok szekvencia adataira. Az eredményeket táblázatokban foglaltuk össze. Az egyes gének az első oszlopban génbanki azonosítójukkal vannak feltüntetve.

A 8. táblázatban a fertőzött Century fajta transzkriptomjára illesztett L gének adatai láthatók.

8. táblázat Összefoglaló táblázat az L génekkel (génbanki azonosító) való hasonlóságkeresés eredményeiről a fertőzött Century (Century_B) fajta transzkriptom adataiban.

(Forrás: saját munka)

génbanki azonosító (gén)	lefedettség (%)	hasonlóság (%)	hossz (bp)	mismatchek száma	deléciók száma
AB523372.1 (L1)	97	93,369	3874	214	8
AB523375.1 (L2)	85	93,976	3372	245	4
AB523370.1 (L3)	84	92,235	3523	247	3
AB523377.1 (L4)	99	96,191	3938	144	1

A 9. táblázat a fertőzött Kárpát fajta transzkriptomjára illesztett L gének adatait tartalmazza. Az AB523370.1 azonosítójú L3 génnel azonos méretű és csaknem teljesen megegyező szekvenciájú

transzkriptünk feltehetően az L3 gén, vagy pedig annak egy analógja. A Kárpát fajta transzkriptom adatait eredetileg CMV rezisztencia génekkel kapcsolatos vizsgálatokhoz szerettük volna felhasználni, azonban az eredményekből látszik, hogy TMV rezisztenciához kapcsolható génekkel és rezisztenciagén analógokkal is jó egyezést mutat. Ennek magyarázata, hogy a hagyományos nemesítés során valószínűleg már beépítették az említett géneket, illetve a velük hasonló szekvenciájú gének bősége miatt kaptuk ezen eredményeket. A 8. és 9. táblázatban bemutatottak szerint, a transzkriptjeink és az adatbázisokban szereplő L1-L4 szekvenciák között teljes azonosságot nem találtunk.

9. táblázat Összefoglaló táblázat az L génekkel (génbanki azonosító) való hasonlóságkeresés eredményeiről a fertőzött Kárpát (Karpát_B) fajta transzkriptom adataiban.

(Forrás: saját munka)

génbanki azonosító (gén)	lefedettség (%)	hasonlóság (%)	hossz (bp)	mismatchek száma	deléciók száma
AB523372.1 (L1)	99	92,546	3944	271	7
AB523375.1 (L2)	59	94,077	3867	237	3
AB523370.1 (L3)	100	98,219	3987	65	1
AB523377.1 (L4)	64	92,804	3741	273	4

Ugyanakkor, a 10-13. táblázatokban felsorolt, a transzkriptjeinkkel nagyfokú hasonlóságot mutató feltételezett TMV rezisztenciagének bősége - illetve közülük a vírusfertőzés hatására indukálódó gének - arra enged következtetni, hogy a paprikában eddig még nem bizonyított funkciójú gének is részt vesznek a vírusfertőzésre adott stresszválaszban. A Century fajtánál néhány feltételezett, TMV rezisztenciát biztosító gén (XM_016700798.2, XM_016704817.2 és XM_016704813.2) csak a fertőzött transzkriptek között szerepel (10-11. táblázat). Ebből arra következtethetünk, hogy ezek a gének a fertőzés hatására expresszáldóhattak. Az UniProt BLAST funkcióját használva mindhárom szekvenciára lefuttattunk egy keresést. Az XM_016704813.2 azonosítójú, 4244 bp hosszúságú szekvencia, amely 100%-os hasonlóság mellett 98%-os lefedettséget mutat az adatbankból gyűjtött szekvenciával, a jövőben további vizsgálatok tárgyát képezheti. Az eredmények azt mutatják, hogy az említett szekvencia a második kromoszómán helyezkedik el és egy *C. annuum* eredetű TMV rezisztenciában szerepet játszó fehérjét kódol, mely a stresszválaszban szignál-transzdukciós funkciót végez. Szerepe van még az abiotikus és a biotikus stresszválasz kialakulásában is. A másik két szekvencia által kódolt molekula is ugyan ezen funkciók betöltésében vesz részt. Az XM_016700798.2 kódú transzkript egy a hatodik kromoszómán elhelyezkedő, *C. baccatum* eredetű, az XM_016704817.2 jelzésű transzkript pedig egy a második kromoszómán elhelyezkedő, *C. annuum* eredetű fehérjét kódol. Azonban a szekvencia rövidege és a gyenge lefedettség miatt nem alkalmasak további vizsgálatok elvégzésére.

A Kárpát transzkripteknél is találtunk szekvenciákat (XM_016700798.2 és XM_047394940.1), amelyek csak a fertőzött mintákban fejeződtek ki (12-13. táblázat). Azonban a rövid szekvenciaméret és kis lefedettség miatt, ezek az adatok csak korlátozottan használható információt nyújtanak a további kutatásokhoz.

10. táblázat Összefoglaló táblázat a feltételezett L. génekkel (génbanki azonosító) való hasonlóságkeresés eredményeiről a fertőzött Century (Century_B) fajta transzkriptom adataiban.
(Forrás: saját munka)

génbanki azonosító	lefedettség (%)	hasonlóság (%)	hossz (bp)	mismatchek száma	deléciók száma
XM_047396683.1	96	99,803	5077	10	0
XM_047396655.1	82	99,000	2970	63	3
XM_016684783.2	n.a.	97,804	758	16	1
XM_016684790.2	n.a.	93,592	932	58	0
XM_016700798.2	18	100,000	226	0	0
XM_016700800.2	73	99,599	3750	16	0
XM_047413669.1	99	99,474	1902	10	0
XM_016700824.2	n.a.	98,896	6816	34	1
XM_016700883.2	100	99,632	2172	8	0
XM_047408888.1	n.a.	97,982	892	15	1
XM_016704817.2	27	99,890	1137	1	0
XM_016704813.2	98	100,000	4244	0	0
XM_047401712.1	n.a.	92,710	345	27	0
XM_047401487.1	n.a.	94,444	72	4	0
XM_047401049.1	n.a.	96,000	125	4	1
XM_016696219.2	97	100,000	3824	0	0
XM_047400584.1	61	100,000	667	0	0
XM_016717069.2	n.a.	91,717	3123	223	10
XM_047400583.1	n.a.	93,903	1258	66	9
XM_047400582.1	n.a.	94,127	1348	77	1
XM_047400580.1	n.a.	95,251	1537	63	2
XM_047400579.1	n.a.	93,871	1134	56	2
XM_047394940.1	2	100,000	62	0	0
XM_047405852.1	n.a.	97,797	5539	112	3
XM_047405846.1	n.a.	97,784	2076	43	2
XM_047405191.1	n.a.	98,463	556	12	0
XM_047405172.1	n.a.	96,121	1059	51	1
XM_047404776.1	91	100,000	1271	0	0
XM_047403849.1	100	99,607	1272	5	0
XM_047403848.1	100	99,431	1405	4	1
XM_047402976.1	n.a.	95,622	2330	88	5
XM_047402975.1	n.a.	95,550	2382	92	5
XM_047402853.1	n.a.	96,106	642	25	0
XR_007043061.1	n.a.	93,982	4108	23	8
XR_001676811.2	n.a.	94,091	4584	21	8
XR_001674168.2	n.a.	91,784	2029	146	6
XM_016704818.2	4	99,338	187	2	0

n.a. = nincs adat

11. táblázat Összefoglaló táblázat a feltételezett L génekkel (génbanki azonosító) való hasonlóságkeresés eredményeiről a kontroll Century (Century_K_2) fajta transzkriptom adataiban.

(Forrás: saját munka)

génbanki azonosító	lefedettség (%)	hasonlóság (%)	hossz (bp)	mismatchek száma	deléciók száma
XM_047396683.1	100	99,354	5262	34	0
XM_047396655.1	n.a.	97,748	1951	37	3
XM_016684783.2	36	99,720	1747	6	1
XM_016684790.2	n.a.	97,626	414	17	0
XM_016700800.2	71	99,025	3207	44	0
XM_047413669.1	93	99,337	1791	16	0
XM_016700824.2	n.a.	98,894	6754	22	2
XM_016700883.2	99	99,676	2162	7	0
XM_047408888.1	n.a.	98,444	900	11	1
XM_016704813.2	98	99,976	4253	1	0
XM_047401712.1	n.a.	89,904	380	36	0
XM_047401487.1	n.a.	93,056	72	5	0
XM_047401049.1	n.a.	96,000	125	4	1
XM_016696219.2	98	99,974	3803	1	0
XM_047400584.1	n.a.	98,913	708	3	0
XM_016717069.2	n.a.	91,137	3081	250	4
XM_047400583.1	n.a.	92,040	872	71	6
XM_047400582.1	n.a.	91,040	1144	100	2
XM_047400580.1	n.a.	92,893	956	47	6
XM_047400579.1	n.a.	92,056	957	47	2
XM_047394940.1	21	100,000	585	0	0
XM_047405852.1	84	99,314	5840	106	1
XM_047405846.1	97	99,292	2120	12	1
XM_047405191.1	n.a.	98,364	434	7	0
XM_047405172.1	n.a.	94,601	1218	64	0
XM_047404776.1	87	100,000	1208	0	0
XM_047403849.1	100	99,607	1272	5	0
XM_047403848.1	100	99,431	1405	4	1
XM_047402976.1	n.a.	95,648	2321	96	3
XM_047402975.1	n.a.	95,382	2382	96	5
XM_047402853.1	n.a.	96,094	512	20	0
XM_047402412.1	n.a.	96,522	115	4	0
XR_007043061.1	n.a.	94,072	4052	23	8
XR_001676811.2	n.a.	90,485	4697	60	8
XR_001674168.2	n.a.	92,957	1892	111	3

n.a. = nincs adat

12. táblázat Összefoglaló táblázat a feltételezett L. génekkel (génbanki azonosító) való hasonlóságkeresés eredményeiről a fertőzött Kárpát (Karpát_B) fajta transzkriptom adataiban.
(Forrás: saját munka)

génbanki azonosító	lefedettség (%)	hasonlóság (%)	hossz (bp)	mismatchek száma	deléciók száma
XM_047396683.1	97	99,374	5110	30	1
XM_047396655.1	n.a.	96,779	2342	115	4
XM_016684783.2	n.a.	98,515	1618	25	3
XM_016684790.2	n.a.	95,851	1187	57	0
XM_016725232.2	99	99,983	5978	1	0
XM_016700798.2	7	100,000	97	0	0
XM_016700800.2	91	99,528	3603	17	0
XM_047413669.1	100	99,948	1921	1	0
XM_016700824.2	n.a.	98,783	6854	57	1
XM_016700883.2	96	99,142	2098	18	0
XM_047408888.1	n.a.	95,531	895	37	1
XM_016704817.2	13	100,000	564	0	0
XM_016704813.2	98	100,000	4237	0	0
XM_047401712.1	n.a.	94,514	759	42	0
XM_047401049.1	n.a.	93,074	403	7	8
XM_016696219.2	99	99,974	3836	1	0
XM_047400584.1	n.a.	98,146	809	14	1
XM_016717069.2	n.a.	94,682	3328	196	8
XM_047400582.1	n.a.	92,953	1117	51	5
XM_047400581.1	n.a.	95,620	788	21	3
XM_047400580.1	n.a.	91,063	1262	101	0
XM_047400579.1	n.a.	95,135	991	24	2
XM_047394940.1	n.a.	98,237	708	8	0
XM_047405852.1	83	99,398	5755	91	2
XM_047405846.1	n.a.	97,648	2083	34	5
XM_047405191.1	n.a.	92,699	765	35	1
XM_047405172.1	n.a.	96,375	1464	64	1
XM_047404776.1	n.a.	96,854	672	32	0
XM_047403849.1	100	99,607	1272	5	0
XM_047403848.1	100	99,431	1405	4	1
XM_047402976.1	n.a.	95,923	2330	81	5
XM_047402975.1	n.a.	96,012	2382	81	5
XM_047402853.1	n.a.	96,689	604	20	0
XM_047402412.1	n.a.	96,491	114	4	0
XR_007043061.1	n.a.	90,956	4095	35	8
XR_001676811.2	n.a.	93,047	4615	34	2
XR_001674168.2	n.a.	92,679	1798	119	3

n.a. = nincs adat

13. táblázat Összefoglaló táblázat a feltételezett L. génekkel (génbanki azonosító) való hasonlóságkeresés eredményeiről a kontroll Kárpát (Karpát_K) fajta transzkriptom adataiban.

(Forrás: saját munka)

génbanki azonosító	lefedettség (%)	hasonlóság (%)	hossz (bp)	mismatchek száma	deléciók száma
XM_047396683.1	93	99,548	4941	25	0
XM_047396655.1	n.a	97,720	2392	95	3
XM_016684783.2	n.a	98,155	1945	50	0
XM_016684790.2	n.a	93,154	481	28	0
XM_016700800.2	56	99,888	2353	3	0
XM_047413669.1	99	100,000	1907	0	0
XM_016700824.2	n.a	98,947	6830	24	1
XM_016700883.2	100	99,401	2172	13	0
XM_047408888.1	n.a	97,877	895	16	1
XM_016704817.2	16	99,799	699	2	0
XM_016704813.2	97	100,000	4208	0	0
XM_047401712.1	n.a	88,462	208	24	0
XM_047401487.1	n.a	98,113	53	1	0
XM_016696219.2	94	100,000	3654	0	0
XM_047400584.1	97	99,622	1058	4	0
XM_016717069.2	n.a	92,943	2833	191	8
XM_047400583.1	n.a	94,630	1103	38	2
XM_047400582.1	n.a	95,663	1113	52	0
XM_047400581.1	n.a	93,267	1247	60	5
XM_047400580.1	n.a	93,881	1079	42	2
XM_047400579.1	n.a	96,276	879	15	2
XM_047405852.1	80	99,395	5596	59	1
XM_047405846.1	n.a	97,069	2115	46	6
XM_047405191.1	n.a	95,288	1204	49	1
XM_047405172.1	n.a	98,065	2304	32	0
XM_047404776.1	34	99,792	481	1	0
XM_047403849.1	100	99,607	1272	5	0
XM_047403848.1	100	99,431	1405	4	1
XM_047402976.1	n.a	96,079	2321	86	3
XM_047402975.1	n.a	95,634	2382	90	5
XM_047402853.1	n.a	96,510	573	20	0
XM_047402412.1	n.a	96,262	107	4	0
XR_007043061.1	n.a	91,124	4124	22	8
XR_001676811.2	n.a	91,126	4671	22	8
XR_001674168.2	n.a	92,486	1841	125	3

n.a. = nincs adat

5. Következtetések, javaslatok

A paprika L1 gén (GenBank ID: AB523372.1) szekvenciája csak részlegesen ismert. Ezen ismert, 3.947 bp méretű kódoló szekvenciát 100%-ban lefedő és azzal 100%-os hasonlóságot, azaz szekvencia azonosságot mutató, de szintén csak részlegesen ismert szekvenciájú, viszont pontosan nem ismert funkciójú paprika rezisztenciagént összesen 16 darabot találtunk az NCBI adatbázisban. Emellett, több mint száz olyan rezisztencia fehérjét azonosítottunk, melyek hosszukat tekintve 100%-ban fedték le az általunk szekvenált transzkripteket, 98%-ot meghaladó hasonlóság mellett. Többek között ilyenek voltak az L1c gén (AB523374.1), valamint a szintén csak részlegesen ismert szekvenciájú L2 (AB523375.1), L2b (AB523376.1) és L4 (AB523377.1) gének, valamint a már teljes hosszában izolált L3 (AB523370.1) gén. A rokon termesztett *Solanaceae* fajok, például a paradicsom vagy a burgonya genom méretének többszöröse a paprika genom. Ugyanakkor ismert, hogy a paprika genom 80%-ot meghaladó mértékben ismételt szekvenciákból áll. A hasonló szekvenciák e bősége lehet igaz a paprika rezisztenciagénekre is, mely megállapítást jól illusztrálja az L gének nagyfokú hasonlósága. Az L gének szekvencia különbségei feltehetőleg a TMV vírussal párhuzamos evolúció termékei. E feltételezés érvényes a nagyszámú és az L génekkel nagyfokú hasonlóságot mutató, de pontosan nem ismert funkciójú, fentebb említett rezisztencia fehérjékre is.

Az Eredmény fejezet táblázataiban bemutatott L gének és azok analógjaival hasonlóságot mutató transzkriptek tényleges szekvenciáját célzott kísérletekkel lehetne megállapítani. Bár az itt alkalmazott SbS szekvenálási technológia előnye a nagyfokú pontosság, azonban a vizsgált RNS mintáink szekvenálhatósági határérték közeli minőségéből fakadó RNS rekonstruálási pontatlanságok is lehetnek okai az L génektől való szekvencia szintű eltéréseknek. Tekintettel a TMV rezisztenciagén minimális szekvencia eltéréseire, és a velük igen hasonló rezisztenciagén analógok bőségére a paprikában, természetesen, nem zárható ki, hogy a vizsgált transzkriptjeink újabb, eddig nem azonosított génanalógokat, izoformákat reprezentálnak. E kérdés tisztázása további, elsősorban kapilláris szekvenáláson és kvantitatív PCR eljárásokon alapuló vizsgálatokat igényel.

A CMV rezisztens Kárpát fajta transzkriptjeit rezisztenciagénekre jellemző szekvencia motívumokra tervezzük szűrni, amihez *Solanaceae* rezisztenciagéneket és RGA-kat (resistance gene analogue) fogunk használni.

6. Összefoglalás

Dolgozatom fő célkitűzése volt a TMV és CMV rezisztencia molekuláris genetikai hátterének vizsgálata paprikában, a fertőzéssel előidézett génexpressziós vizsgálatok elemzésével.

Munkánk során elvégeztük a ZKI-ből származó növényanyag RNS tisztítását. Sajnos arra a következtetésre jutottunk, hogy a minták egy részében az RNS degradálódhatott, így korlátozottan alkalmas további vizsgálatokhoz való felhasználásra. A transzkriptom szekvenálást a rendelkezésre álló összes mintán elvégeztük, azonban a továbbiakban csak a rezisztens Kárpát és a Century paprika fajták transzkriptom adatait vizsgáltuk. A kapott adatokat bioinformatikai módszerek segítségével elemeztük, mely során TMV rezisztencia génekkel kapcsolatos szekvencia motívumokat kerestünk. Az ismert rezisztenciagénekkel nagyfokú hasonlóságot mutató géneket szerettünk volna a rezisztens vonalakban azonosítani. Ehhez a nyilvános NCBI GenBank adatbázisában megtalálható rezisztencia gén szekvenciákat használtunk. Néhány szekvenciát igen nagy pontossággal sikerült azonosítanunk az általunk szekvenált transzkriptomokban, azonban teljesen azonos, százszázalékos lefedettségű szekvenciát nem találtunk. Ennek egyik oka lehet a vizsgált mintákból izolált RNS-ek nem megfelelő minősége. Továbbá néhány feltételezett TMV rezisztenciagén analógot csak a fertőzött minták transzkriptomjaiban azonosítottunk, amiből arra következtetünk, hogy a fertőzés hatására expresszáldóhattak. Ennek és a többi kérdésnek a tisztázásához további részletes és átfogó vizsgálatok elvégzésére van szükség.

Az elmúlt években a genomika gyors növekedése lehetővé tette új megközelítések megvalósítását a kórokozókkal szembeni rezisztenciát megalapozó molekuláris mechanizmusok megértésére. A következő generációs szekvenálási technológiák alkalmazhatók a kórokozók teljes genom szekvenálásának biztosítására, valamint nagy áteresztőképességű molekuláris markerek fejlesztésére QTL-térképezéshez és génfelderítéshez. A hagyományos molekuláris megközelítések fáradságosak és időigényesek. A technológia fejlődésével a nemesítési programok hatékonyabbak lehetnek a pontosság és az eredmények elérésének gyorsasága tekintetében. Az NGS alapú genotipizálás több ezer SNP-t hoz létre, amelyek lehetővé teszik a kórokozókkal szembeni rezisztenciában részt vevő lókuszok kimutatását. A genomi alapú nemesítés mellett az NGS alkalmazható a kórokozó törzsek genomszekvenciáinak sokféleségének feltárására, specifikus virulencia gének azonosítására. Ezenkívül alkalmazható a kórokozó virulenciájához kapcsolódó szekvenált transzkriptomok nagy adathalmazának előállítására vagy az effektor fehérjék expressziójának vizsgálatára a fertőzés korai szakaszában. Az NGS jövője a teljes genom szekvenálása felé tolódik el, lehetővé téve a virulencia gének működésével, a rezisztencia mechanizmusával és a kórokozók evolúciójával kapcsolatos kulcskérdések megoldását. A

platformokhoz való hozzáférés, valamint az adatok egyszerűbb elemzése és kezelése megfizethetővé teszi ezen technológiák használatát a genetikusok és nemesítők számára.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom...

...Dr. Taller Jánosnak, hogy lehetővé tette, hogy dolgozatomat a MATE Georgikon kampuszának, Genetika és Biotechnológia Intézet, Mikrobiológia és Alkalmazott Biotechnológia Tanszékén elkészíthessem, és konzulensként végig segítette és támogatta munkámat...

...Dr. Frank Krisztiánnak a bioinformatikában nyújtott segítségéért és konzulensként való közreműködéséért...

...a ZKI nemesítőinek, Varró Péternek és Sebesi Csabának, valamint a ZKI termékfejlesztési igazgatójának Nagypál Barnabásnak, hogy vizsgálati célból a Georgikon Biotechnológia csoportja számára rendelkezésre bocsátották a dolgozathoz használt növényanyagot...

...Czachesz Zsófiának, a ZKI növénypatológusának, hogy elvégezte a fertőzéseket és a mintavételeket...

...és Kondics Dávidnak segítőkészségéért, akihez bármikor bizalommal fordulhattam a dolgozattal kapcsolatban felmerült kérdéseimmel.

8. A szakirodalom jegyzéke

ADAMS, M. J. – ADKINS, S. – BRAGARD, C. – GILMER, D. – LI, D. – MACFARLANE, S. A. – WONG, S. M. – MELCHER, U. – RATTI, C. – RYU, K. H. (2017): ICTV Report Consortium ICTV virus taxonomy profile: Virgaviridae. J Gen Virol, 98: 1999–2000.

ALTSCHUL, S. F. – GISH, W. – MILLER, W. – MYERS, E. W. – LIPMAN, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403-410.

AMITEYE, S. (2021): Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. Heliyon, 7(10): e08093.

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.

ARNEDO-ANDRÉS, MS. - GIL-ORTEGA, R. - LUIS-ARTEAGA, M. – HORMAZA, J. I. (2002): Development of RAPD and SCAR markers linked to the Pvr4 locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). Theor. Appl. Genet., 105: 1067-1074.

BARCHENGER, D. - JEEATID, N. - YULE, S. - LIN, S. W. - WANG, Y. W. - KENYON, L. (2019): Novel sources of resistance to *Pepper leaf curl virus* disease (Begomovirus). In Proceedings of the 17th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Avignon, France, 11–13 September 2019; Lefebvre, V., Editor Daunay, M.C., Eds.; Institut National de la Recherche Agronomique (INRA): Avignon, France, RS-P/14. pp. 78–79.

BARKA, G. D. – LEE, J. (2020): Molecular Marker Development and Gene Cloning for Diverse Disease Resistance in Pepper (*Capsicum annuum* L.): Current Status and Prospects. Plant Breed. Biotech, 8(2): 89-113.

BEACHY, R. N. - ZAITLIN, M. (1977): Characterization and in vitro translation of less- than full-length, virus related, nucleoprotein rods present in *Tobacco mosaic virus* preparations. Virology, 81: 160-169.

BEN CHAIM, A. – GRUBE, R. C. – LAPIDOT, M. – JAHN, M. – PARAN, I. (2001): Identification of quantitative trait loci associated with resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Capsicum annuum*. Theor. Appl. Genet., 102: 1213-1220.

- BENNER, C. P. - KUHN, C. W. (1985): Identification and incidence of pepper viruses in Northeast Georgia. *Plant Disease*, 69: 999-1001.
- BENTO, C. S. - RODRIGUES, R. - GONÇALVES, L. S. - OLIVEIRA, H. S. - SANTOS, M. H. - PONTES, M. C. - SUDRÉ, C. P. (2013): Inheritance of resistance to *Pepper yellow mosaic virus* in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genet. Mol. Res.*, 12: 1074–1082.
- BLACK, L. L. - HOBBS, H. A. - GATTI, J. M. (1991): *Tomato spotted wilt virus* resistance in *Capsicum chinense* PI152225 and 159236. *Plant Dis.*, 75: 863.
- BOITEUX, L. S. - DE AVILA, A. C. (1994): Inheritance of a resistance specific to *Tomato spotted wilt tospovirus* in *Capsicum chinense* 'PI 159236'. *Euphytica* 75: 139–142.
- BOSLAND, P. W. (1996): *Capsicums: Innovative uses of an ancient crop*. Progress in new crops. ASHS Press
- BOUKEMA, I. W. (1980): Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L. *Euphytica*, 29 (2): 433–439.
- BOUKEMA, I. W. (1984): Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by allele of the L-locus. *Capsicum Newsl*, 3: 47–48.
- CANTO, T. - MACFARLANE, S. A. - PALUKAITIS, P. (2004): ORF6 of *Tobacco mosaic virus* is a determinant of viral pathogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.*, 85: 3123-3133.
- CARANTA, C. - PALLOIX, A. - GEBRE-SELASSIE, G. - LEFEBVRE, V. - MOURY, B. - DAUBEZE, A. M. (1996): A complementation of two genes originating from susceptible *Capsicum annuum* lines confers a new and complete resistance to *Pepper veinal mottle virus*. *Phytopathology*, 86: 739–743.
- CARANTA, C. - PALLOIX, A. - LEFEBVRE, V. - DAUBÉZE, A. M. (1997): QTLs for a component of partial resistance to *Cucumber mosaic virus* in pepper: Restriction of virus installation in host-cells. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 431–438.
- CARANTA, C. - PFLIEGER, S. - LEFEBVRE, V. - DAUBÉZE, A. M. - THABUIS, A. - PALLOIX A. (2002): QTLs involved in the restriction of *Cucumber mosaic virus* (CMV) long-distance movement in pepper. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 586–591.

CARANTA, C. – THABUIS, A. – PALLOIX, A. (1999): Development of a CAPS marker for the Pvr4 locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genome* 42: 1111-1116.

CARRIZO GARCIA, C. - BARFUSS MICHAEL, H. J. – SEHR, E. M. – BARBOZA, G. E. – SAMUEL, R. - MOSCONE A. E. – EHRENDORFER, F. (2016): Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, *Solanaceae*). *Ann. Bot.*, 118: 35–51.

CEBOLLA-CORNEJO, J. - SOLER, S. - GOMAR, B. - SORIA, M.D. - NUEZ, F. (2003): Screening *Capsicum* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Ann. Appl. Biol.*, 143: 143–152.

CHENG, C. – FEI, Z. – XIAO, P. (2023): Methods to improve the accuracy of next-generation sequencing. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 11: 1-10.

CHOI, S. - LEE, J. H. - KANG, W. H. - KIM, J. - HUY, H. N. - PARK, S. W. - SON, E. H. - KWON, J. K. - KANG, B. C. (2018): Identification of *Cucumber mosaic resistance 2* (*cmr2*) that confers resistance to a new *Cucumber mosaic virus* isolate P1 (CMV-P1) in pepper (*Capsicum* spp.). *Front. Plant Sci.*, 9: 1106.

CSILLÉRY, G. (2006): Pepper taxonomy and the botanical description of the species. *Acta Agronomica Hungarica*, 54(2): 151–166.

DOGIMONT, C. - PALLOIX, A. - DAUBÈZE, A. M. - MARCHOUX, G. - GÈBRE-SELASSIE, K. - POCHARD, E. (1996): Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyviruses using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*, 88: 231–239.

FERREIRA, S. A. – BOLEY, R. A. (1992): *Cucumber mosaic virus*. University of Hawaii at Manoa.

GARCÌA-NERIA, M. A. - RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. (2011): Characterization of geminivirus resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Mol. Plant Microbe.*, 24: 172–182.

GILARDI, P. - GARCÍA-LUQUE, I. - SERRA, M. T. (2004): The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L2 and L4 gene-mediated resistance in *Capsicum*. *The Journal of General Virology*, 85 (Pt 7): 2077–2085.

GLITS, M. – FOLK, GY. (2000): Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó, Budapest; pp. 304-320.

- GREEN, S. K. - KIM, J. S. (1994): Source of resistance to viruses of pepper (*Capsicum* spp.): A catalog. *Tech. Bull. Avrdc.*, 20: 5–64.
- GRUBE, R. C. - BLAUTH, J. R. – ARNEDO-ANDRÉS, M. S. - CARANTA, C. - JAHN, M. K. (2000): Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus resistance gene cluster in *Capsicum*. *Theor. Genet.*, 101: 852–859.
- GUO, G. – WANG, S. – LIU, J. – PAN, B. – DIAO, W. – GE, W. – GAO, C. – SNYDER, J. C. et al., (2017): Rapid identification of QTLs underlying resistance to *Cucumber mosaic virus* in pepper (*Capsicum frutescens*). *Theor. Appl. Genet.*, 130: 41-52. DOI:[10.1007/s00122-016-2790-3](https://doi.org/10.1007/s00122-016-2790-3)
- HELYES, L. – OMBÓDI, A. – PÉK, Z. (2006): Zöldségtermesztés I. Jegyzet, Gödöllő
- HOANG, N. - YANG, H. B. - KANG, B. C. (2013): Identification and inheritance of a new source of resistance against *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Capsicum*. *Sci. Hortic.*, 161: 8–14.
- HOLDSWORTH, W. L. – MAZOUREK, M. (2015): Development of userfriendly markers for the pvr1 and Bs3 disease resistance genes in pepper. *Mol. Breed.*, 35: 28.
- HOLMES, F. O. (1934): Inheritance of ability to localize *Tobacco mosaic virus*. *Phytopathology* 24: 984-1002.
- HWANG, J. N. – LI, J. – LIU, W. Y. – AN, S. J. – CHO, H. – HER, N. H. et al., (2009): Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to *Chili veinal mottle virus* in pepper. *Mol. Cells*, 27: 329-336.
- IDREES, S. - HANIF, M. A. - AYUB, M. A. - HANIF, A. - ANSARI, T. M. (2020): Chili Pepper. In *Medicinal Plants of South Asia*, pp. 113-124.
- INTERNET 1: <https://mek.oszk.hu/05100/05178/html/> (2023.01.04)
- KAHL, G. (2015): Dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics, Fifth, Greatly Enlarged Edition; pp. 2428- 2430.
- KALAIPOS, B. – JUHÁSZ, CS. – BALOGH, E. – KOCSY, G. – TÓBIÁS, I. – GULLNER, G. (2021): Transcriptome profiling of pepper leaves by RNA-Seq during an incompatible and a compatible pepper-tobamovirus interaction. *Sci. Rep.* 11: 20680 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00002-5>

- KANG, W. H. – HOANG, N. H. – YANG, H. B. – KWON, J. K. – JO, S. H. – SEO, J. K. et al., (2010): Molecular mapping and characterization of a single dominant gene controlling CMV resistance in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.*; 120: 1587-1596.
- KANG, W.-H. - HOANG, N. - YANG, H. B. - KWON, J. K. - JO, S. H. - SEO, J. K. - KIM, K. H. - CHOI, D. - KANG, B. C. (2010): Molecular mapping and characterization of a single dominant gene controlling CMV resistance in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 120: 1587–1596.
- KENYON, L. - KUMAR, S. - TSAI, W. S. - HUGHES, J. (2014): Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Advances in Virus Research*, 90: 297-354.
- KIM, H. J. – HAN, J. H. – KIM, S. – LEE, H. R. – SHIN, J. S. – KIM, J. H. et al., (2011): Trichome density of main stem is tightly linked to PepMoV resistance in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.*; 122: 1051-1058.
- KIM, H. J. – YANG, H. B. – CHUNG, B. N. – KANG, B. C. (2008): Survey and application of DNA markers linked to TSWV resistance. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.*; 26: 464-470.
- KIM, S. – PARK, M. – YEOM, S. I. et al., (2014): Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat. Genet.*, 46: 270–278. <https://doi.org/10.1038/ng.2877>
- KLUG, A. (1999): The *Tobacco mosaic virus* particle: structure and assembly. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 354 (1383): 531–535.
- KOCSISNÉ, M. G. – KOCSIS, L. – KOVÁCS, J. – PEPÓ, P. – TÓTH, Z. (2013): Növénytermesztési és kertészeti termékek termelése. Elméleti jegyzet, Debrecen. pp. 167.,169.
- KSH (2023) https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0016.html (2023.01.03)
- KYLE, M. M. - PALLOIX, A. (1997): Proposed revision of nomenclature for *potyvirus* resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica*, 97: 183–188.
- LEE, J. – HAN, J. H. – YOON, J. B. (2012): A set of allele-specific markers linked to L locus resistant to *Tobamovirus* in *Capsicum* spp. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.*, 30: 286-293.
- LI, H. – DURBIN, R. (2009): Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14): 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>

LI, H. – HANDSAKER, B – WYSOKER, A. – FENNELL, T. – RUAN, J. – HOMER, N. – MARTH, G. – ABECASIS, G. – DURBIN, R. - 1000 GENOME PROJECT DATA PROCESSING SUBGROUP. (2009): The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16): 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

LI, N. – YIN, Y. – WANG, F. – YAO, M. (2018): Construction of a high-density genetic map and identification of QTLs for *Cucumber mosaic virus* resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.) using specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq). *Breed. Sci.*, 68: 233-241.

MCCOMBIE, W. R. – MCPHERSON, J. D. – MARDIS, E. R. (2019): Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 9(11): 1-5.

MOROZOV, S. YU. - DENISENKO, O. N. - ZELENINA, D. A. - FEDORKIN, O. N. - SOLOVYEV, A. G. - MAISS, E. - CASPER, R. - ATABEKOV, J. G. (1993): A novel open reading frame in *Tobacco mosaic virus* genome coding for a putative small, positively charged protein. *Biochimie*, 75: 659.

NYAKAS, A. (2006): A növényi szervek szövettana, in: Turcsányi: Mezőgazdasági növénytan, Szaktudás Kiadóház, Budapest, pp. 106-114.

PARISI, M. – ALIOTO, D. – TRIPODI, P. (2020): Overview of Biotic Stresses in Pepper (*Capsicum* spp.): Sources of Genetic Resistance, Molecular Breeding and Genomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 1., 14-15., 17-18.

PARRELLA, G. - RUFFEL, S. - MORETTI, A. - MOREL, C. - PALLOIX, A. - CARANTA, C. (2002): Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 855–861.

PAZARLAR, S. – GUMUS, M. – OZTEKIN, G. B. (2013): The effects of *Tobacco mosaic virus* infection on growth and physiological parameters in some pepper varieties (*Capsicum annuum* L.). *Not. Bot. Hort. Agrob.*, 41: 427–433.

PEPÓ, P. (2010): Növénynevelés. Az Agrármérnöki MSc szak tananyagfejlesztése, p. 1.

PERSLEY, D. M. - MCGRATH, D. - SHARMAN, M. - WALKER, I. O. (2009): Breeding for *tomovirus* resistance in a package of disease resistances for *Capsicum* and tomato. *J. Insect Sci.*, 141: 36–37.

PFLIEGER, S. – LEFEBVRE, V. – CARANTA, C. – BLATTES, A. – GOFFINET, B. – PALLOIX, A. (1999): Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome*, 42: 1100-1110.

POLISCHUK, V. – BUDZANIVSKA, I. – SHEVCHENKO, T. – OLIYNIK, S. (2007): Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2): 409-417.

PROHENS, J. – NUEZ, F. (2008): Handbook of Plant Breeding, Vegetables II. Springer, pp. 221-249.

RAI, V. P. - KUMAR, R. - SINGH, S. P. - KUMAR, S. - KUMAR, S. - SINGH, M. - RAI, M. (2014): Monogenic recessive resistance to *Pepper leaf curl virus* in an interspecific cross of *Capsicum*. *Sci. Hortic.*, 172: 34–38.

RAMALHO DO RÊGO, E. - MONTEIRO DO RÊGO, M. – FINGER, F. L. (2016): Production and Breeding of Chilli Peppers (*Capsicum* spp.). Springer International Publishing

RAST, A. T. B. (1988): Pepper tobamoviruses and pathotypes used in resistance breeding. *Capsicum Newsl.*, 7: 20–23.

RETES-MANJARREZ, J. E. - HERNÁNDEZ-VERDUGO, S. - PARIAUD, B. HERNÁNDEZ-ESPINAL, L. A. - PARRA-TERRAZA, S. - TREJO-SAAVEDRA, D. L. - RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. - GARZÓN-TIZNADO, J. A. (2018): Resistance to *Pepper huasteco yellow vein virus* and its heritability in wild genotypes of *Capsicum annuum*. *Bot. Sci.*, 96: 52–62.

RUBIO, M. – CARANTA, C. – PALLOIX, A. (2008): Functional markers for selection of potyvirus resistance alleles at the pvr2-eIF4E locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR. *Genome*, 51: 767-771.

RUFFEL, S. - DUSSAULT, M. H. - PALLOIX, A. - MOURY, B. - BENDAHDMANE, A. - ROBAGLIA, C. - CARANTA, C. (2002): A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.*, 32: 1067–1075. 155-206.

RUFFEL, S. – GALLOIS, J. L. – MOURY, B. – ROBAGLIA, C. – PALLOIX, A. – CARANTA, C. (2006): Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent *Pepper veinal mottle virus* infection of pepper. *J. Gen. Virol.*, 87: 2089-2098.

- SAWADA, H. - TAKEUCHI, S. - HAMADA, H. - KIBA, A. - MATSUMOTO, M. - HIKICHI, Y. (2004): A new tobamovirus-resistance gene, L-1a, of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 73: 552–557.
- SCHOLTHOF, K.-BG. - ADKINS, S. - CZOSNEK, H. – PALUKAITIS, P. – JACQUOT, E. – HOHN, T. – HOHN, B. – SAUNDERS, K. – CANDRESSE, T. – AHLQUIST, P. – HEMENWAY, C. - FOSTER, A. G. D. (2011): Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, 12: 938–954.
- SINGH, D. P. - SINGH, A. K – SINGH, A. (2021): *Plant Breeding and Cultivar Development*. Academic Press
- SOLER, S. - DEBRECZENI, D. E. - VIDAL, E. - ARAMBURU, J. - LÓPEZ, C. - GALIPIENSO, L. - RUBIO, L. (2015): A new *Capsicum baccatum* accession shows tolerance to wild-type and resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Ann. Appl. Biol.*, 167: 343–353.
- SOMOS, A. (1975): Zöldségtermesztés. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp. 237-272.
- SOMOS, A. (1980): A paprika. p. 223-253. In: SOMOS, A. – KORÓDI, L. – TÚRI, I. (Szerk.): Zöldségajtatás. Budapest, Mezőgazda Kiadó, p. 394.
- SRIVASTAVA, A. - MANGAL, M. - SARITHA, R. K. - KALIA, P. (2017): Screening of chilli pepper (*Capsicum* spp.) lines for resistance to the begomoviruses chilli leaf curl disease in India. *Crop Prot.*, 100: 177–185.
- SULZINSKI, M. A. - GABARD, K. A. - PALUKAITIS, P. - ZAITLIN, M. (1985): Replication of *Tobacco mosaic virus*. VIII. Characterization of a third subgenomic TMV RNA. *Virology*, 145: 132-140.
- SUZUKI, K. - KURODA, T. - MIURA, Y. - MURAI, J. (2003): Screening and field trials of virus resistant sources in *Capsicum* spp. *Plant Dis.*, 87: 779–783.
- TANPURE, R. S. – BARBOLE, R. S. – DAWKAR, V. V. – WAICHAL, Y. A. – JOSHI, R. S. – GIRI, A. P. – GUPTA, V. S. (2017): Improved tolerance against *Helicoverpa armigera* in transgenic tomato over-expressing multi-domain proteinase inhibitor gene from *Capsicum annuum*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 3: 597-604.

TÓBIÁS, I. – MOLNÁR, B. (1983): Az étkezési paprikán előforduló vírustünetek és víruskórokozók Magyarországon. Kertgazdaság, 15: 49-54.

TOMITA, R. – MURAI, J. – MIURA, Y. – ISHIHARA, H. – LIU, S. – KUBOTERA, Y. et al., (2008): Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene L3 of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences. Theor. Appl. Genet., 117: 1107-1118.

TOMITA, R. - SEKINE, K. T. - MIZUMOTO, H. - SAKAMOTO, M. - MURAI, J. - KIBA, A. - HIKICHI, Y. - SUZUKI, K. - KOBAYASHI, K. (2011): Genetic basis for the hierarchical interaction between *Tobamovirus spp.* and L resistance gene alleles from different pepper species. Mol. Plant Micr. Interact., 24: 108–111.

TOMPOS, D. (2006): A közetgyapotos paprikahajtás egyes technológiai elemei és ökonómiai összefüggései. Doktori értekezés, Budapest. pp. 16-18.

TRIPODI, P. – ACQUADRO, A. - LANTERI, S. - D'AGOSTINO, N. (2019): Genome Sequencing of *Capsicum* Species: Strategies, Assembly, and Annotation of Genes. In: Ramchiary, N. – Kole, C. (eds.): The Capsicum Genome. Springer Nature, Switzerland, pp. 139-150.

VENKATESH, J. – AN, J. – KANG, W. H. – JAHN, M. – KANG, B. C. (2018): Finemapping of the dominant potyvirus resistance gene Pvr7 reveals a relationship with Pvr4 in *Capsicum annuum*. Phytopathology, 108: 142-148.

VISSCHERS, I. G. S. – MACEL, M. – PETERS, J. L. – SERGEEVA, L. – BRUIN, J. – VAN DAM, N. M. (2023): Exploring Thrips Preference and Resistance in Flowers, Leaves, and Whole Plants of Ten Capsicum Accessions. Plants (Basel), 12(4): 825.

YANG, H. B. – LIU, W. Y. – KANG, W. H. – KIM, J. H. – CHO, H. J. – YOO, J. H. et al., (2012): Development and validation of L allele-specific markers in *Capsicum*. Mol. Breed., 30: 819-829.

YAO, M. - LI, N. - WANG, F. - YE, Z. (2013): Genetic analysis and identification of QTLs for resistance to *Cucumber mosaic virus* in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Euphytica, 193: 135–145.

YEAM, I. – KANG, B. C. – LINDEMAN, W. – FRANTZ, J. D. – FABER, N. – JAHN, - M. M. (2005): Allele-specific CAPS markers based on point mutations in resistance alleles at the pvr1 locus encoding eIF4E in *Capsicum*. Theor. Appl. Genet., 112: 178-186.

ZHU, C. – LI, X. – ZHENG, J. (2018): Transcriptome profiling using Illumina- and SMRT-based RNA-seq of hot pepper for in-depth understanding of genes involved in CMV infection. *Gene*, 666: 123–133. doi:10.1016/j.gene.2018.05.004

ZITTER, T. A. – MURPHY, J. F. (2009): *Cucumber mosaic virus*. The Plant Health Instructor, DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Atlagi Dávid
A Hallgató Neptun kódja: PRD 414
A dolgozat címe: Rezisztenciagének vizsgálata pászlikában
A megjelenés éve: 2023
A konzulens intézetének neve: Genetika és Biotechnológia Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Mikrobiológia és Alkalmazott Biotechnológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

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 mindenkori 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 eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2023. év 11. hó 09. nap

Atlagi Dávid
Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Allaga Dávid (hallgató Neptun azonosítója: PRD7Y7) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Keszthely, 2023. november 09.



belső konzulens