



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2023. május 12.

Tobamovírus fertőzés különleges esete paprikán (*Capsicum annuum* L.)

Unusual infection of pepper (*Capsicum annuum* L.) by tobamovirus

Készítette: Oláh Anett
CVLOVN
Növényorvosi mesterképzés
Nappali tagozat
Budai Campus

Témavezető: Koós Dr. Szathmáry Erzsébet, egyetemi adjunktus,
Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék, Budai Campus

Dr. Salamon Pál, Önkéntes kutató, Genetika és Biotechnológiai
Intézet, Alkalmazott Növénygenomikai Csoport, Szent István Campus

Dr. Szabó Zoltán, Csoportvezető, Tud.főmunkatárs, Genetika és
Biotechnológiai Intézet, Alkalmazott Növénygenomikai Csoport, Szent István
Campus

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi Szekció

**Budapest
2023**

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	6
1.1. Célkitűzés.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2.1. A paprika jellemzése és jelentősége.....	8
2.2. A paprika, mint vírus gazdanövény.....	11
2.3. A paprikát fertőző tobamovírusok és a paprika enyhe foltosság vírus (<i>Pepper mild mottle virus</i> , PMMoV) jellemzése.....	12
2.4. A paprikát fertőző vírusok elleni védekezés	16
3. ANYAG-ÉS MÓDSZER	17
3.1. A vizsgálatok helye és ideje	18
3.2. A vizsgálatok anyaga.....	18
3.2.1. A vizsgált paprika minták származása és kezelése	18
3.2.2. Tesztnövények.....	18
3.2.3. Felhasznált eszközök, vegyszerek, enzimek, kitek, műszerek	19
3.2.4. Felhasznált primerek (indítószekvenciák)	19
3.3. A vizsgálatok módszere	19
3.3.1. A vizsgálatba vont paprika minták kezelése	19
3.3.2. Növények nevelése és gondozása	20
3.3.2. Mechanikai vírusátvitel és biotesztek.....	20
3.3.3. Gazdanövénykör vizsgálata és biotesztek	20
3.3.4. Keresztvédetség	20
3.3.5. Vetőmag preparálás és csávázás	20
3.3.6. Vírusok magátvitelének vizsgálata	21
3.3.7. Molekuláris vizsgálatok	21
4. EREDMÉNYEK.....	25
4.1. Különleges vírusos megbetegedés paprika növényeken: előfordulás és betegségtünetek	25
4.2. Vírusok kimutatása biotesztekkel különböző növényi részekből	26
4.3. A vírusizolátumok tulajdonságai.....	28
4.3.1. Gazdanövénykör és szimptomatológia.....	28
4.3.2. Keresztvédetség	30
4.3.3. A vetőmag szennyezettségének és különböző csávázó szerek hatékonyságának vizsgálata	31
4.3.4. Magátvitel vizsgálata	32
4.3.5. Molekuláris vizsgálatok	32
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	35

6. ÖSSZEFOGLALÁS	37
7. IRODALOMJEGYZÉK	39

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMV= *Alfalfa mosaic virus*, lucerna mozaik vírus

bp =bázispár

cDNS= komplementer DNS, RNS-ről másolt DNS

CMV= *Cucumber mosaic virus*, uborka mozaik vírus

CP = coat protein, köpenyfehérje

CTAB=cetil-trimetil-ammónium-bromid

DNS= dezoxiribonukleinsav

dNTP= dezoxiribonukleotid

fw= forward

HeMV = *Henbane mosaic virus*, beléndék mozaik vírus

HR = hypersensitive reaction, hiperszenzitív reakció

ICTV = International Committee on Taxonomy of Viruses, Nemzetközi Vírus Taxonómiai Bizottság

MATE= Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

MP = movement protein, mozgásfehérje

NaOH= Nátrium-hidroxid

NCBI= National Center for Biotechnology Information

nt= nukleotid

ObPV = *Obuda pepper virus*, óbuda paprika vírus

ORF= nyílt leolvasási keret (Open Reading Frame)

PCR= polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)

PMMoV= *Pepper mild mottle virus*, paprika enyhe foltosság vírus

PVY= *Potato virus Y*, bugronya Y vírus

rev= reverse

RNS= ribonukleinsav

rpm= Revolutions Per Minute – percentkénti fordulatszám

RT= reverz transzkripció/reverz transzkriptáz

RT-PCR= reverz transzkripció-polimeráz láncreakció

TBE= Tris-borate-EDTA

TEV= *Tobacco etch virus*, dohány karcolatos vírus

TMV= *Tobacco mosaic virus*, dohány mozaik vírus

TNS= össznukleinsav (totálnukleinsav)

TSWV= *Tomato spotted wilt virus*, paradicsom foltos hervadás vírus

1. BEVEZETÉS

A burgonyafélékhez (*Solanaceae*) tartozó Közép és Dél-Amerikai eredetű paprika (*Capsicum annuum* L.) magas C, B, A és P vitamin, karotinoid és ásványi anyag tartalma, valamint kedvező élettani hatása miatt az emberiség táplálkozásában fontos szerepet tölt be. Frissen vagy tartósított zöldségként (étkezési paprikák), illetve fűszernövényként hasznosítjuk, de jelentős szerepe van a gyógyászatban is. A paprika különböző kórokozókkal szemben különösen fogékony kultúrnövény, termesztésének sikere sokszor az ellenük való védekezés eredményességétől függ.

A paprika termesztésben világszerte súlyos károkat okoznak a növényvírusok, melyek ellen a védekezés sokszor nem megoldott. Hatékony viricidek hiányában a vírussal fertőzött növény gyógyítására nincs lehetőség, így a védekezés a megelőzésre, a vektorok elleni növényvédő szeres kezelésre, valamint az ellenálló, rezisztens fajták termesztésére korlátozódik.

A paprikát közel 100 vírusfaj képes megfertőzni, melyek közül a termesztésben kb. 20 faj okoz jelentős kártételt (Edwardson és Christie, 1997; Moury és Verdin, 2012; Ojina et al., 2022). Közülük különösen figyelemre méltók a tobamovírusok, amelyek súlyos minőségi és mennyiségi veszteséget okoznak. A tobamovírusok ellen van lehetőségünk genetikai védekezésre, ami a leghatékonyabb és egyúttal környezetkímélő védekezési lehetőségnek bizonyult (Salamon, 2004).

A tobamovírusokkal szembeni genetikai védekezés a hiperszenzitív reakción (HR) alapul, ami a fertőzés helyén gyors szöveti elhalással ún. nekrotikus lokális léziók kialakulásával és a vírus lokalizálásával jellemezhető. A HR-el reagáló paprikákkal ellentétben a rezisztenciával nem rendelkező, fogékony paprikákon látens lokális fertőzés vagy klorotikus lokális foltok figyelhetők meg, és ezt követően a vírus a növényben szisztemizálódik, ami súlyos betegség tünetek kialakulását eredményezheti (Salamon, 2004).

A tobamovírusok közül az elmúlt 30-35 évben a paprika enyhe foltosság vírus (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV¹) vált a legveszélyesebb kórokozóvá részben, mert rezisztencia törő

¹ A pepper mild mottle vírus magyar nyelvű megnevezése a szakirodalomban nem egységes. Egyes szerzők (pl. Kálmán, 2003) a vírus nevében a „mottle” angol szót „tarkulásnak”, mások „foltosságnak” (pl. Horváth, 1999; Salamon, 2006) fordítják. Munkánkban Salamon (2006) javaslatait követve a vírus magyar megnevezésére a „paprika enyhe foltosság vírus” nevet használjuk.

törzsei is ismertek, illetve azért is, mert fertőzése gyakran csak nehezen ismerhető fel az enyhe levéltünetek miatt, ugyanakkor a bogyón súlyos tüneteket okozhat.

Ilyen különleges, tobamovírus fertőzésre utaló elváltozások jelentek meg egy hibrid vetőmag előállításával foglalkozó üzemben, melyek kóroktani vizsgálata nem csak a kórokozók pontos azonosítása, hanem a hasonló esetek megelőzése szempontjából is indokolt volt.

1.1. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki, hogy

- a) dél-magyarországi gazdaságból a MATE Szent István Campus, Genetikai és Biotechnológiai Intézet, Alkalmazott Növénygenomikai Csoportjához küldött vírusos bogyótüneteket mutató paprika növények vírushatásosságát igazoljuk,
- b) az izolált vírusokat patológiai és molekuláris tulajdonságai alapján jellemezzük és meghatározzuk,
- c) ismereteink alapján javaslatokat tegyünk a jövőbeni védekezés lehetőségeire, módszereire.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A paprika jellemzése és jelentősége

A paprika, tudományos nevén *Capsicum annuum*, a *Solanaceae* (burgonyafélék) családjába tartozó zöldségnövény, származási helye Közép- és Dél Amerika. Amerika felfedezését követően először Spanyolországban jelent meg Európában 1493-ban, majd Ázsiában, később az egész világon elterjedt (Somos, 1966).

Hazánkban az étkezési célra termesztett paprika meghonosodása szorosan kapcsolódik a török terjeszkedés elől Magyarországra vándorló bolgárokhoz. A bolgárokat megszálló török sereg élelmezésének tetemes részét a fejlett bolgár zöldségkertészet biztosította. Ezt a kiemelkedő zöldségkertészeti szaktudást tovább erősítette a magyar kertészeti gyakorlat, amiből később létrejött a világon példátlan bolgárkertészeti technológia (Zatykó, 2006).

Az étkezési paprika rendszertani helye Soó (1963) által kidolgozott növényrendszer alapján:

Spermatophyta (magvas növény)

XIV.törzs: *Angiospermae* (zárvatermők)

- A osztály: *Dicotyledones* (kétszikűek)

2. ágazat: *Malvales-Tubiflorae*

XXI. sorozat: *Personatae*

1. család: *Solanaceae*

Nemzetség: *Capsicum*

Az étkezési paprikák Amerikában, a kontinens középső- és déli tájain őshonos *C. annuum* var. *annuum*, illetve *C. annuum* var. *aviculare* vadpaprika fajok nemesített, később termesztésbe vont változatai (Lantos, 2018).

A *Capsicum* nemzetséghez Barboza (2022) legújabb monográfiája szerint 42 faj tartozik, melyek közül öt fajt (*C. annuum* – étkezési paprika), (*C. frutescens* - cserjés paprika), (*C. chinense* - kínai paprika), (*C. baccatum* - bogyós paprika) és a (*C. pubescens* - szőrös paprika) vont az emberiség termesztésbe.

A *C. annuum* gyökérzete jól fejlett orsógyökérből, és egyenletesen elosztott oldalgyökerekből áll. A gyökerek a talaj felszínéhez közel, 30-40 cm mélységben helyezkednek el (Gyúrós és Szöriné, 2005). A hajtásnövekedés módja alapján a folytonos és a fürtös (determinált) növekedésű típusokat lehet megkülönböztetni (Terbe et al., 2005).

A különböző paprikafajták és hibridek eltérő számú levelet nevelhetnek. A levelek rendszerint tojás- vagy lándzsa alakúak. A levelek a szárhoz levélnyéllel kapcsolódnak, felületük sima, a levéllemez ép szegélyű (Lantos, 2018). A levelek mérete és alakja fajtabélyeget is jelenti.

A paprika egylaki növény, virágai kétivarúak, a virágok átmérője 10-15 mm, melyben általában öt szirmlevél és öt porzó található (Munting, 1974, Bosland et al., 2012). A virágok az ágvillákon egyesével képződnek. A szirmlevél leggyakrabban fehér színű, vajsárga, de lila változatok is előfordulnak (Somos, 1966). Egy paprikanövényen akár 100 virág is fejlődhet (Bosland et al., 2012). A virágok nagyrészt öntermékenyülők, vagyis a paprika virágának megporzása autogám módon zajlik, a növény saját virágporával termékenyül. Idegentermékenyülés is történhet (Gyúros és Szöriné, 2005). Jellemzően kb. 17% az idegen beporzás aránya, szél vagy rovarok révén (Idrees et al., 2020). A virág megtermékenyülése 20-28 órával a megporzás után történik (Tiwari et al., 2013).

A termés felfújtt bogyó, amire a nagymértékű formai változatosság jellemző. A bogyó gazdasági érettségi állapotban sárgás-fehér vagy zöld színű, ritkán lila, biológiai érettségben általában piros vagy narancssárga (Lantos, 2018).

Az étkezési paprika számos mediterrán országban az egyik legfontosabb kertészeti kultúra (Fallik és Ilic, 2014). Magyarországon magas C-vitamin-tartalmáról ismert, de ezenfelül fontos vitaminokat és ásványi anyagokat, valamint számos alapvető tápanyagot is tartalmaz **(1. táblázat)**. A C-vitamin-tartalom fajtánként és érettségi fokonként változik, jellemzően 150-250 mg/100 g között van (Zatykó, 1999)

Ásványi anyagok és vitaminok	Éretlen termés		Érett termés
	nyers	főtt	nyers
Ca (mg)	9	9	13
P (mg)	22	16	30
Fe (mg)	0,7	0,5	0,6
Na (mg)	13	9	-
K(mg)	213	149	-
B1 vitamin	0,08	0,06	0,08
B2 vitamin	0,08	0,07	0,08
A-vitamin	420	420	4450
Nikotinsav	0,5	0,7	0,6
Aszkorbinsav	125	96	204

1. táblázat. A paprika ásványi anyag- és vitamintartalma (Lorenz és Maynard, 1980)

Európában évente 3,8-4 millió tonna paprikát termesztnek, míg a világon termesztett mennyiség eléri a 25 millió tonnát. A világ paprika termésének több, mint 50%-át Kína termeli és fogyasztja is el. Európában a legnagyobb termelők: Törökország, Spanyolország, Olaszország, Hollandia, Románia (FruitVeb, 2020).

A paprikatermesztés hazánkban több, mint 150 évre tekint vissza. A felhasználás alapján két csoportot különböztetünk meg az étkezési és fűszer paprikát. Az étkezési paprikán belül további csoportosítás alakul ki termés színe és az alakja szerint (Terbe, 1999). Magyarországon étkezési paprikából 200-205 ezer tonnát, fűszerpaprikából 17-20 ezer tonnát termesztünk évszázadtól függően.

Az 1960-as évek második felétől hazánkban is elterjedt a fóliás berendezések alkalmazása, és ezzel nagy minőségi fejlődés vette kezdetét a paprikatermesztésében. A paprikát ma már legnagyobb területen hajtató berendezésekben termesztjük (Terbe, 2005). A frisspiaci fogyasztásra termesztett paprikát főként hajtadják, az ipari feldolgozásra szánt paprikát intenzív körülmények között, szabadföldön termesztik (FruitVeb, 2019). Szabadföldön a fehér tölteni való paprika termesztése megszűnni látszik, ezen a területen 40%-ban kápia típusú paprikát, 40%-ban almapaprikát, valamint a maradék 20%-ban a feldolgozás számára termesztnek (FruitVeb, 2020).

A paprika Magyarországon egész évben hajtatható, a téli hónapokban nehezítő tényező a megfelelő fényellátás biztosítása. A paprikahajtásra igénybe vett terület csaknem 1500-1550 ha. A technológiai és technikai előrehaladást jelzi, hogy a termőterület csökkenése ellenére a teljes hozam nem változik. A talajnélküli termesztés is teret hódít, a területek több, mint a felén már ezt a technológiát alkalmazzák. Napjainkra előtérbe került az integrált biológiai növényvédelem, melyet a művelt területek csaknem 70%-án alkalmaznak (FruitVeb, 2020).

Az utóbbi időben a szabadföldön termesztett étkezési paprika termőterülete csökkent. A fél évtizeddel ezelőtti 1000 hektáros termőterület mára már 600 hektár alá esett vissza. Ennek következtében az öt évvel ezelőtti 30 ezer tonna termésmennyiség 16,5 ezer tonnára csökkent (FruitVeb, 2020).

A paprika termesztéséhez nélkülözhetetlen a kézi munkaerő, így a termőterület csökkenésében feltehetően a munkaerőhiány is szerepet játszott (Nagy, 2021).

2.2. A paprika, mint vírus gazdanövény

A paprika a legtöbb burgonyafélééhez hasonlóan a vírusokkal szemben különösen fogékony (virofil) növényfaj. A paprikát mintegy 70 vírusfaj fertőzi, melyek közül 20 faj okoz a termesztés során jelentős károkat hajtásban és szabadföldön is (Pernezny et. al, 2003; Moury és Verdin, 2012).

Ezek közül egyes vírusok kozmopoliták [pl. paradicsom foltos hervadás vírus (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV)], míg mások csak egy-egy földrészen okoznak kárt (Kenyon et al., 2014).

Az egyes vírusfajok jelentősége és az általuk okozott veszteség eltérő mértékű a világ különböző országaiban. Egy Hawaii-on végzett felmérés szerint a burgonya Y vírus (*Potato virus Y*, PVY), a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV), a dohány karcolatos vírus (*Tobacco etch virus*, TEV) és a TSWV (Milbrath és Cook, 1971), az USA-ban végzett tanulmány során a PVY és a TEV bizonyult gyakorinak (Makkuak és Gumpf, 1974). Észak-Nyugat Olaszországban termesztési módtól függően eltérő vírusfajokat találtak dominánsnak a paprikán. Hajtásban a TMV, szabadföldön a CMV volt a leggyakoribb (Conti és Masenga, 1977). Tóbiás és Molnár (1983) tanulmánya szerint hazánkban is a TMV és a CMV fordultak elő leggyakrabban, míg Gáborjányi és munkatársai felmérései alapján szabadföldön az AMV, a CMV és a beléndek mozaik vírus (*Henbane mosaic virus*, HeMV), hajtásban a paradicsom mozaik vírus (*Tomato mosaic virus*, ToMV), a CMV, a PVY és a TSWV voltak a leggyakoribbak (Gáborjányi et al., 1997, 1998a, 1998b). Salánki et. al. (2021) Szentes környéki mintákból leggyakrabban a TSWV-t, a CMV-t és a PMMoV-t mutatták ki.

A különböző vírusok fertőzése következtében kialakuló tünetek a paprikán lehetnek enyhék pl. levél klorózis, levél hullámosodás, vagy súlyosak pl. nekrosis, hervadás, teljes pusztulás. A vírusok pontos azonosítása azonban csak a tünetek alapján legtöbbször nem lehetséges, mivel több vírusfaj is okozhat nagyon hasonló tüneteket, másrészt mert egyazon vírusfaj különböző törzsei ugyanazon növényfajon nagyon eltérő tüneteket idézhetnek elő (Salamon et al., 1983; Kenyon et al., 2014). Idősebb növényeken előfordulhat, hogy az un. késői fertőzések esetében a vírus szisztemizálódása után a levélzeten tünetek nem alakulnak ki, de a bogyókon különböző, a vírusok fertőzésére jellemző tünetek jelennek meg (Salamon et. al, 2008).

2.3. A paprikát fertőző tobamovírusok és a paprika enyhe foltosság vírus (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) jellemzése

A *Tobamovirus* nemzetséget egymással közeli rokonságban álló növényi vírusfajok alkotják, melyek a virion és vírusgenom tulajdonságaiban különböznek a többi vírusnemzetségtől (Faquet et al., 2005). A nemzetség a nevét a dohány mozaik víusról (*Tobacco mosaic virus*) kapta, amely az elsőként felfedezett növényvírus, a virológia egyik fontos modell vírusa (Knapp és Lewandowski, 2001). Gibbs (1999) szerint a tobamovírusok és a zárvatermő gazdáik közös evolúciós múlttal rendelkeznek, amelynek becsült kora 120-140 millió év.

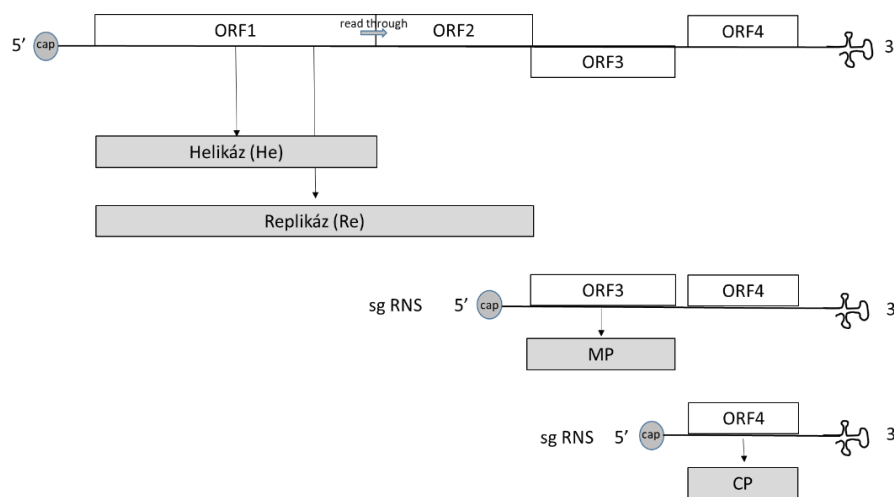
A *Tobamovirus* nemzetség fajainak száma az utóbbi években lényegesen megnőtt. 2005-ös adatok szerint 22 vírusfajt soroltak a tobamovírusokhoz (Faquet et al., 2005), míg ez a szám 2009-ben már 25 volt (Adams et al., 2009). Jelenleg a Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 37 vírus fajt sorol a tobamovírusokhoz (ICTV, 2023).

A *Tobamovirus* nemzetség rendszertani helye az ICTV legújabb besorolása szerint:

- Birodalom: *Riboviria*
- Királyság: *Orthornavirae*
- Törzs: *Kitrinoviricota*
- Osztály: *Alsuviricete*
- Rend: *Martellivirale*
- Család: *Virgaviridae*
- Nemzetség: *Tobamovirus*

A tobamovírusok virionjai helikális szimmetriával rendelkeznek, merev pálcika alakúak, 290-310 nm hosszúak és 17-18 nm szélesek (Brunt et al., 1996). A virionok összetételüket tekintve 95% fehérjéből és 5 % RNS-ből állnak (Lewandowski, 2008). A virionok belül üregesek, közepükön egy csatorna látható az elektronmikroszkópos felvételeken (Hull, 2002).

A tobamovírusok genomját egyetlen, 6,3 - 6,6 kb méretű, pozitív értelmű, egyszálú RNS (+ssRNS) alkotja. A genomi RNS három nem strukturális és egy strukturális fehérjét kódol. A vírusreplikációban fontos szerepet betöltő helikáz (He) és replikáz (Re) fehérjék közvetlenül a virális RNS-ről, a mozgási fehérje (MP) és a strukturális köpenyfehérje (CP) szubgenomi RNS-ekről íródik át (**1. ábra**). A tobamovírusok strukturális és funkcionális genomi elemzését részletesebben Hull (2002) munkájában találjuk.



1. ábra A tobamovírusok genomszerveződése

A tobamovírusok rendkívül stabil növényvírusok, szövetnedvben szobahőmérsékleten legalább 50 évig fertőzőképesek (Silber és Burk, 1965). Mechanikailag könnyen átvihetők és fennmaradnak magokban, növényi maradványokban, valamint üvegház felületén (Spence et al., 2001). Kötődnek a talajkolloidokhoz (Blanco-Sanches et al., 1986), de kimutathatók felszíni álló és folyóvizekből, felhőkből, ködből valamint glaciális jégből (ToMV) (Juretic et al., 1986; Castello et al., 1995; Castello et al., 1999). A PMMoV fertőzőképesen fennmarad az ételekben és az emberi székletben (Zhang et al., 2006).

A paprikát természetes körülmények között 12 tobamovírus fertőzi (**2. táblázat**). Világszerte legjelentősebb paprikapatogén tobamovírus a PMMoV (Lozovay et al., 2022), melyet először 1952-ben McKinney izolált Dél-Karolinában és a TMV „dohány látens” törzsének tartotta (McKinney, 1968). Később biológiai tulajdonságai, szerológiai rokonsága, valamint a CP aminosav sorrendje alapján új fajként való elkülönítését javasolták (Wetter et al., 1984). A PMMoV virionja, más tobamovírushoz hasonlóan merev pálcika alakú, kb. 312 x 18 nm méretű (McKinney, 1952; Wetter, 1984). Genomja kb. 6357 nukleotid (nt) hosszúságú, pozitív értelmű, egyszálú RNS (Alonso et al., 1991).

2. táblázat A paprikát természetes körülmények között fertőző tobamovírusok

Vírusfaj	Gazdanövények	Elterjedés	Hivatkozás
<i>Bell pepper mottle virus</i> (BPeMV), csemegepaprika foltosság vírus	paprika, tojásgyümölcs	Argentína, Hollandia	Wetter et al., 1987
Chilli pepper mild mottle virus (CPMMoV)* Csilipaprika enyhe foltosság vírus	paprika	Peru	Vélez-Olmedo, 2020
<i>Obuda pepper virus</i> (ObPV) Óbuda paprika vírus	ebszőlőcsucsor (<i>Solanum. dulcamara</i>) paprika	Magyarország	Csilléry és Ruskó, 1980 Salamon et al., 1987
<i>Paprika mild mottle virus</i> (PaMMV) fűszerpaprika enyhe foltosság vírus	paprika	Hollandia, Japán, Bulgária	Rast, 1979; Hamada et al.; 2003; Stoimenova és Jordanova, 2005
<i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV) paprika enyhe foltosság vírus	paprika	világszerte	McKinney, 1952; Wetter, 1984
<i>Tobacco mild green mosaic virus</i> (TMGMV) dohány enyhe zöld mozaik vírus	dohány, paprika, <i>Nicotiana glauca</i>	világszerte	McKinney, 1929 Wetter, 1984 Wetter, 1986
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) dohány mozaik vírus	több, mint 100 gazdanövény	világszerte	Mayer, 1886
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i> (ToBRFV) paradicsom barna termésráncosodás vírus	paradicsom, paprika gyomnövények	világszerte	Salem et al., 2016
<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV) paradicsom mozaik vírus	több, mint 100 gazdanövény	világszerte	Hollings és Huttinga, 1976
<i>Tomato mottle mosaic virus</i> (ToMMV) paradicsom foltos mozaik vírus	paradicsom, paprika borsó	Mexikó Kína Kína	Li et al., 2013 Li et al., 2014 Zhang et al., 2022
<i>Rehmannia mosaic virus</i> (ReMV) Rehmannia mozaik vírus	paprika, paradicsom, dohány	Kína, Japán, Dél- Korea, USA	Kubota et al., 2011
<i>Yellow pepper mild mottle virus</i> (YPMMoV)* Sárga termésű paprika enyhe foltosság vírus	paprika	Peru	Vélez-Olmedo, 2020

*Megjegyzés: A kórokozók javasolt magyar nevét a tudományos név alatt tüntettük fel. A Peruban felfedezett két új faj (CPMMoV és YPMMoV) még nem szerepel az ICTV adatbázisban a tobamovírusok között.

A PMMoV mind a szabadföldi, mind a hajtattott paprikatermesztésben jelentős gazdasági károkat okozhat (Berzal-Herranz et al., 1995). A PMMoV által okozott tünetek a paprika leveleken általában enyhék, a termésen azonban súlyosak lehetnek (Caciagli, 2008). Előfordul, hogy a levélen elváltozás nem látható, azonban a termésen klorotikus foltokat, ráncosodást, deformációt, valamint akár nekrozist is megfigyelhetünk. A növények gyengén fejlődnek, illetve a termések kisebbek. A szabadföldi kultúrákban a fertőzöttség elérheti a 100%-ot, ami drasztikusan csökkenti a piacképes termés mennyiségét (Wetter és Conti, 1988; Green, 2003).

A PMMoV patogenitását különböző növényfajokon és a vírus által okozott tüneteket Wetter és mtsai. (1984) tanulmányozták. Vizsgálataik szerint a PMMoV különbözött más tobamovírusoktól többek között abban, hogy az általa okozott nekrotikus lokális léziók a hiperszenzitív reakcióval válaszoló dohány fajokon (*Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi-nc) fehérebb színűek, és szignifikánsan kisebbek voltak más tobamovírusok okozta lézióknál. Megállapították továbbá, hogy a PMMoV nem fertőzte a paradicsomot, valamint a *Nicotiana glauca*, a *N. tabacum* 'Cavala', a *N. africana* és az *Eryngium planum* növényeket. A PMMoV biotesztekben a különböző indikátor növényeken okozott tünetek alapján egyértelműen elkülöníthető a TMV-től és ToMV-től, mert eltérően a TMV-től és a ToMV-től, nem fertőzi szisztémikusan a *N. tabacum* cv. Samsun dohány fajtát, csak az inokulált leveleken okoz tünetmentes fertőzést. A PMMoV-re jellemző, hogy dohányban felszaporítva a TMV-hez és a ToMV-hez viszonyítva lényegesen alacsonyabb koncentrációt ér el (Wetter et al., 1984; García-Luque et al., 1990).

A PMMoV a tobamovírusokra jellemzően mechanikai úton, vagyis mechanikai sérüléseket okozó állatok, és az emberi tevékenységek (pl. metszés, kötözés) által terjed (Wetter és Conti, 1988). Specifikus rovar vektora nem ismert. A tobamovírusokra általában jellemző, hogy vetőmaggal átvihetők (Dombrovky és Smith, 2017). A PMMoV-re külső és belső magátvitel is jellemző (Demski, 1981; Nagai, 1988; Tanzi et al., 1989; Beczner et al., 1997). A vírus Európába való behurcolása is feltételezhetően fertőzött vetőmaggal történt. A külsőleg szennyezett paprikamag felületéről a vírus a csíranövényeket apró sebeken keresztül fertőzheti (Beczner et al., 1997). Több tobamovírus, köztük a PMMoV fertőzőképesen kimutatható a paprika pollenről, ezért pollennel való terjedése is valószínűsíthető (Salamon és Kaszta, 2000).

2.4. A paprikát fertőző vírusok elleni védekezés

A vírussal fertőzött növény gyógyítására alkalmas növényvédő szerek (viricidek) nem állnak rendelkezésre, ezért a vírusok elleni védekezés alappillére a fertőzések megelőzése.

Ezért fontos a vírusmentes vetőmag használata, a fertőzési forrásként szolgáló gyomnövények irtása, valamint az általános higiéniai rendszabályok betartása. Utóbbi esetében fontos a fóliasátrak, vödörök, ládák és esetleg a termesztő közeg (kókuszrost) fertőtlenítése, melyhez az utóbbi években új fertőtlenítő szereket ajánlanak pl. Ecowian HIGÉN+99 (Anonymus, 2022).

A vírusok elleni biológiai védekezés történhet a keresztvédettség (cross protection) felhasználásával, melynek alapja, hogy a vírus enyhe megbetegedést okozó gyenge törzsével végzett fertőzés védelmet biztosít egy későbbi, súlyos megbetegedést okozó vírustörzs fertőzésével szemben (Horváth, 1999). A keresztvédettség gyakorlati felhasználása azonban problémás lehet, mivel a célzott gazdanövényen „gyenge” vírus más növényfajokon súlyos betegség tüneteket okozhat (Gáborjányi, 1986).

A paprikát fertőző tobamovírusok elleni védekezés eddigi legsikeresebb módja a rezisztens fajták nemesítése és termesztésbe vonása (Salamon, 2004). A tobamovírusokkal szembeni rezisztenciát a *Capsicum* nemzetségben az L gén különböző alléljai biztosítják (Boukema et al., 1980; Daskalov és Poulos, 1994). A rezisztencia a hiperszenzitív reakción alapszik, ami abban nyilvánul meg, hogy a primer fertőzött sejtek és a velük közvetlen (szöveti kapcsolatban álló) sejtcsoport rövid időn belül elhal, a leveleken nekrotikus lokális léziók alakulnak ki, ahol a vírus lokalizálódik (Salamon, 2004).

A tobamovírus patotípusok megkülönböztetése annak alapján történik, hogy az izolátumok az L gén mely alléljével rendelkező *Capsicum*-fajokat, -fajtákat fertőzik szisztemikusan. Jelenlegi ismereteink szerint a tobamovírusok öt paprika patotípusba (P_0 , P_1 , $P_{1,2}$, $P_{1,2,3}$, $P_{1,2,3,4}$) sorolhatók (Boukema, 1980; Boukema, 1984; Gilardi et al., 2004; Antignus et al., 2008; **3. táblázat**). Az L^+ allélt hordozó *Capsicum*-fajok valamennyi patotípusba tartozó tobamovírral szemben fogékonyak, az L^1 allél rezisztenciát biztosít a P_0 , az L^2 a P_0 és P_1 , az L^3 a P_0 , a P_1 és a $P_{1,2}$, az L^4 a P_0 , a P_1 , a $P_{1,2}$ és a $P_{1,2,3}$ patotípussal szemben. A PMMoV három patotípusa közül Magyarországon a $P_{1,2}$ (Kálmán, 2003) és a $P_{1,2,3}$ (Salamon, 1993; Kiss et al., 2007) fordul elő. A modern étkezési paprika fajták ma már hibridek (Zatykó, 2006), ahol a rezisztencia géneket a keresztezések alkalmával valamelyik szülőből viszik be a hibridbe. A vetőmag cégek a fajták ismertetőjében Tm jelzéssel megjelölik a fajták tobamovírus rezisztencia szintjét, amit a fajtaválasztásnál a termelő figyelembe vehet.

3. táblázat. A paprikát fertőző tobamovírusok patotípusainak osztályozása a különböző L allélekkel rendelkező paprikák fogékonysága és/vagy rezisztenciája alapján (Salamon, 2006 után módosítva)

Tobamovírus fajok és izolátumok	Vírus patotípus	Az L gén különböző alléljeivel rendelkező paprika növények fogékonysága vagy ellenállósága				
		L ⁺	L ¹ , 1C, 1a	L ²	L ³	L ⁴
<i>Bell pepper mottle virus</i>	P ₀	F	R	R	R	R
Chilli pepper mild mottle virus (CPMMoV)	P ₀	F	R	R	R	R
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	P ₀	F	R	R	R	R
<i>Tobacco mild green mosaic virus</i> (TMGMV)	P ₀	F	R	R	R	R
<i>Tomato brown rugose fruitvirus</i> (ToBRFV)	P ₀	F	R	R	R	R
<i>Tomato mottle mosaic virus</i> (ToMMV)	P ₀	F	R	R	R	R
<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	P ₀	F	R	R	R	R
Yellow pepper mild mottle virus (YPMMoV)	P ₀	F	R	R	R	R
<i>Obuda pepper virus</i> (ObPV)	P ₁	F	F	R	R	R
<i>Paprika mild mottle virus</i> (PaMMV)	P ₁	F	FL1/RL1a	R	R	R
<i>Rehmannia mosaic virus</i> (ReMV)	P ₁	F	FL1/RL1a	R	R	R
<i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV)	P _{1.2}	F	F	F	R	R
	P _{1.2.3}	F	F	F	F	R
	P _{1.2.3.4}	F	F	F	F	F

Megjegyzés: F=fogékony, R=rezisztens.

3. ANYAG-ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgálatok helye és ideje

Patológiai vizsgálatainkat Gödöllőn a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE) Szent István Campus, Genetikai és Biotechnológiai Intézet, Alkalmazott növénygenomikai csoport üvegházában, a molekuláris vizsgálatokat a MATE Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük. A nukleotid sorrend meghatározását Hollandiában a BaeClear B.V. cég végezte.

3.2. A vizsgálatok anyaga

3.2.1. A vizsgált paprika minták származása és kezelése

Dél-Magyarország hibridpaprika előállító gazdaságból 2022 júliusában két olyan beteg anyanövényt kaptunk, melyekről feltételeztük, hogy vírussal fertőzöttek. A két növény már bogyókat kötött 8-10 leveles hajtásait (jelölésük: Ap1 és Ap2) a vizsgálatokig laboratóriumi viszonyok között csapvízben tartottuk.

3.2.2. Tesztnövények

A kísérleteinkhez az alábbi tesztnövényeket használtuk:

- *Capsicum annuum* cvs. Fehérözön, Kéra (különböző rezisztenciájú paprika fajták)
- *Capsicum chinense* PI 159236
- *Chenopodium murale*
- *Chenopodium quinoa*
- *Chenopodium amaraticolor*
- *Solanum dulcamara*
- *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker
- *Nicotiana clevelandii*
- *N. glutinosa*
- *N. tabacum* cv. Xanthi-nc
- *N. tabacum* cv. Samsun
- *Nicotinia benthamiana*
- *Nicotinia glauca*

3.2.3. Felhasznált eszközök, vegyszerek, enzimek, kitek, műszerek

A vizsgálatainkhoz alkalmazott eszközeink, vegyszereink az üvegházban: különböző méretű cserép, szaporítóláda, Klassmann-Deilman Traysabstra talaj, öntözőkanna, rovarfogó lapok, kézi permetezőgép, hurkapálcák, nádpálca, csávázószer (NaOH, Ecowian HIGÉN+99), növényvédőszer (Mospilan, Previcur), műtrágya (Volldünger).

Az össznukleinsav-kivonáshoz kereskedelmi forgalomba kapható (AppliChem, Merck – EMSURE) vegyszereket alkalmaztunk. A reverz transzkripció során Thermo Fisher Scientific termékeket használtuk, többek között RevertAid reverz transzkriptáz enzimet, RiboLock ribonukleáz inhibitor, 5x RT puffert és 5 mM-os dNTPs-t. A PCR eljárás során szintén a Thermo Fisher Scientific által forgalmazott DreamTaqGreen PCR Master Mix-et (DreamTaq DNA Polymerase, 2X DreamTaqGreen buffer, dNTPs, 4 mM MgCl₂), valamint nukleázmentes vizet használtunk. PCR termékeinket a gyártó (Roche) utasításainak megfelelően a High Pure PCR Product Purification Kittel (11732668001) tisztítottuk.

A reverz transzkripció és a PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) készülékben zajlott. A tisztított PCR termékeink koncentrációját NanoDrop Spectrophotometerrel (Thermo Fisher Scientific) mértük meg.

3.2.4. Felhasznált primerek (indítószekvenciák)

Tobamovírusok kimutatására az RT-PCR tesztekhez az alábbi primer párokat használtuk: Unitobamo 5' for G(AT)CGC(GC)GA(GT)C(GT)GATTCGT(AT)TTAAATATG; Unitobamo 3' rev TGGGCC(GC)CTACC(GC)G(GC)GG (Kálmán et al. 2001). Kontrollként használtuk a *C. annuum* actin for AGGGATGGGTCAAAAGGATGC és *C. annuum* actin rev GAGACAACACCGCCTGAATAGC primereket. A reverz transzkripcióhoz random hexamert használtunk.

3.3. A vizsgálatok módszere

3.3.1. A vizsgálatba vont paprika minták kezelése

A levélzeten és a bogyókon megfigyelhető tüneteket feljegyeztük. A növényekről a tüneteket mutató és tünetmentes bogyókat leszedtük és a további vizsgálatokhoz szobahőmérsékleten érleltük azokat. A két növény (jelölésük: Ap1 és Ap2) már bogyókat kötött 8-10 leveles hajtásait laboratóriumi viszonyok között csapvízben tartottuk.

3.3.2. Növények nevelése és gondozása

A kísérletben felhasznált tesztnövények magjait növényházban szaporítótálcákba Klassmann-Deilman Traysabstra talajba elvetettük. Tűzdeléses palántanevelést alkalmaztunk. A növényeket 2-3 leveles korban 6-8 cm átmérőjű cserepekbe ültettük. Fertőtlenített csipeszt tűzdeléskor, illetve fertőtlenített tálcákat és csepeket használtunk az ültetésekkor. A palántadőlés ellen Previcur növényvédőszeres kezelést alkalmaztunk. A vektorok ellen rendszeresen védekeztünk Mospilan készítménnyel. A hőmérsékletet 22-26 °C között tartottuk.

3.3.2. Mechanikai vírusátvitel és biotesztek

A mechanikai vírusátvitelhez a vizsgálati növények leveleit és magjait hűtött dörzsmozsárban steril desztillált víz hozzáadása után (1/ 5-10 v/w) homogenáltuk. Az így nyert présnedvekkel az előzőleg karborundum porral (400 mesh) enyhén leszórt tesztnövények 2-3 levelét dörzsöltük be.

3.3.3. Gazdanövénykör vizsgálata és biotesztek

A gazdanövényköri vizsgálatokhoz *Solanaceae*, valamint *Amaranthaceae* növény családkhoz tartozó 13 növényfaj egyedeit inokuláltuk az A1 és az A2 izolátumokkal. Az inokulált növények reakciót 3-4 héten keresztül folyamatosan figyelemmel kísértük és feljegyeztük. A szisztemikus tüneteket nem mutató növények csúcsi és inokulált leveleiről visszafertőzési kísérletet végeztünk lokális léziókkal reagáló *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv Xanthi -nc növényekre. A *Ch. murale* fogékonyságát az A2 izolátummal szemben többszöri fertőzési kísérletben tanulmányoztuk.

3.3.4. Keresztvédetség

A keresztvédetség tanulmányozásához *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc indikátor növény egyik levelének felét mechanikailag inokuláltuk az ObPV-XM izolátumot tartalmazó növény présnedvével, majd 4. nap múlva ugyanennek a levélnek az egész felületét fertőztük a vizsgált vírust tartalmazó inokulummal. Az eredményt tüneti vizsgálattal ellenőriztük.

3.3.5. Vetőmag preparálás és csávázás

A biológiai érettségben lévő, tünetet mutató (Ap1 és Ap2) és az Ap2 tő tünetmentes bogyójából kinyertük a magokat. Szárítás után minden magtételből 10-10 magot eppendorf

csőbe helyeztünk, melyekhez, 2-2 ml 2%-os NaOH, illetve Ecowian HIGÉN+99 vegyszereket külön-külön, mint csávázószereket adtunk. Kontrollként 10 szem magot desztillált vízzel kezeltünk. 10 perc ráztatás után a vegyületeket a magokról leöntöttük. A kezelt magokhoz 2 ml desztillált vizet adtunk és ráztatás után a felülúszóval vírus kimutatáshoz lokális léziókkal reagáló tesztnövényeket inokulálunk.

3.3.6. Vírusok magátvitelének vizsgálata

A magátviteli vizsgálathoz egy szaporító láda egyik felébe 58 db NaOH-val kezelt, míg a másik felébe 64 db csávázatlan paprika magot vetettük el soronként 12 maggal. A kelést követően nyomon követtük a betegség tünetek kialakulását a palántákon, és soronként feljegyeztük a tüneteket mutató növényeket. A vírusfertőzésre utaló tüneteket mutató növények közül 5 egyedet, míg a tünetmentes növények közül 3 palántát cserépbe átültettünk, és 4-5 hétig figyeltük fejlődésüket. Az Ap1 növény esetében a csávázatlan magból, az Ap2 növényenél a magátvitel után tüneteket mutató palántáról vettünk mintát a PCR vizsgálatokhoz.

3.3.7. Molekuláris vizsgálatok

3.3.7.1. Össznukleinsav (TNS) kivonása a növényi mintákból

Az össznukleinsav (TNS) kinyerésére módosított CTAB módszert alkalmaztunk (Xu et al., 2004).

- Fertőzött és egészséges paprika növényekről vettünk Kb. 2 cm² levélmintát illetve beteg és tünetmentes paprika bogyóból származó nem csávázott 5- 5 db magot jégen hűtött dörzsmozsárban eldörzsöltünk, roncsoltuk a sejtfalat. Ezzel egyidejűleg β -mercaptoetanolt adtuk a lízispufferhez.
- 1 ml lízis puffert mértünk a dörzsmozsárba, majd a homogenátumot 2,0 ml-es Eppendorf csövekbe töltöttük, majd 10 percenkénti invertálás mellett vízfürdőben tartottuk 30 percig, 65 C-on.
- A következő mérést vegyifülkében végeztük. Hozzáadtunk 800 μ l kloroform:izo-amilalkohol 24:1 arányú keverékét, valamint 100 μ l 5M K-acetátot, ezután vortex-szel intenzíven homogenizáltuk, végül centrifugáltuk az elegyet (8000rpm/5 perc).

- A következő lépésként egy új steril 2,0 ml Eppendorf csőbe pipettával leszívtuk a teljes felülúszót (800-850 µl). Vegyi fülkében hozzáadtunk az elegyhez 800 µl kloroform:izo-amilalkoholt (24:1), majd ismételten intenzíven homogenizáltuk a vortex segítségével, azután centrifugálás következett (8000 rpm/5 perc).
- Egy új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe átpipettáztuk a felülúszót (~750 µl), amit gondos odafigyeléssel az interfázis nélkül leszívtunk. Hozzáadtunk először 80 µl 3M Na-acetátot, majd utána hozzámértük a 750 µl izo-propanolt. Óvatos forgatással összekevertük az elegyet, míg a homogén állapotot el nem érte. Ezután 20-30 perc szobahőmérsékleten állni hagytuk. Vegyifülkében végeztük ezeket a lépéseket is.
- A mintáinkat 8 percig maximális fordulatszámon (13.000 rpm) centrifugáltuk, ezután a felülúszót fokozott figyelemmel elöntöttük. Az össznukleinsav üledéket körültekintően kétszer átmostuk teljes térfogat hozzávetőleg 1,5 ml 70%-os etanollal. A mosások között 60 másodperc időtartam erejéig 13 000 rpm fordulatszámon centrifugálást végeztünk. Végezetül a megmaradt etanolt rövid (30 mp), teljes fordulatú (13 000 rpm) centrifugálással leüleptítettük, továbbá 0,2 ml-es hegyes pipettavéggel leszívtuk.
- A mintáinkat nyitott tetővel 10-20 percig laminárban szárítottuk, ezt követően 30 µl mennyiségű steril desztillált vízben visszaoldottuk. A mintákat -70 °C-on tároltuk a soron következő munkafolyamatig.

3.3.7.2. Reverz transzkripció (cDNS szintézis)

Reverz transzkripció folyamán állítottuk elő a vizsgált vírusaink RNS molekuláival komplementer DNS (cDNS) első szálát. A cDNS szintéziséhez az elkészített össznukleinsav-kivonatot használtuk fel, amely tartalmazta a vírus RNS-eket is. A reakcióhoz random hexamer primert (SO142 Thermo Scientific) alkalmaztuk.

A 10µl végtérfogatú reakcióelegy az alábbi komponensekből állt:

- 3 µl TNS
- 1 µl, 100 pmol/µl koncentrációjú random hexamer primer
- 1 µl, 5mM konc. dNTPs
- 2 µl H₂O
- 2 µl, 5x reverz transzkriptáz (RT) puffer
- 0,5 µl, 200 U/µl konc. RevertAid reverz transzkriptáz enzim
- 0,5 µl, 40 U/µl konc. RiboLock ribonukleáz inhibitor

A TNS kivonatot a primerrel PCR csövekbe összemértük, és 65 °C-on 5 percig inkubáltuk. Ezt követően a PCR csöveket 2 percig 4 °C-on tartottuk, majd a reakcióelegy egyéb összetevőit is hozzáadtuk.

A cDNS szintézis 10 percig 25 °C-on, majd 60 percig 42 °C-on ment végbe, majd utolsó lépésként az enzim inaktivitása 10 percig 70 °C-on történt. Ily módon elkészült cDNS-eket -20 °C -on tároltuk.

3.3.7.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

25 µl végtérfogatú reakcióelegyeket készítettünk az alábbi összetevőkből:

- 1,5 µl cDNS
- 12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix
- 10 µl nukleáz-mentes H₂O
- 0,5 µl forward primer, 20 pmol/µl konc.
- 0,5 µl reverz primer, 20 pmol/µl konc.

A PCR eljárás első lépése, az elődenaturáció 94 °C-on 3 percig tartott, majd 35-ször ismételtük a következőket: denaturáció 94 °C -on fél percig, a primerek kapcsolódása 60 °C -on fél percig, majd a lánchosszabbítás 72 °C -on 1 percig. A legutolsó lépés a végső lánchosszabbítás volt, ami 72 °C 10 perc alatt ment végbe.

3.3.7.4. Gélelektroforézis

A kapott össznukleinsav-kivonatokat, illetve PCR terméket 1%-os TBE agaróz gélben futattuk meg. A hozzáadott GelRed festéknek köszönhetően a fragmentumokat UV fényben láthatóvá tudtuk tenni. A fragmentumok hosszának meghatározásához tömegmarkert alkalmaztunk, melyet mindig az első mintahelyre vittük fel.

3.3.7.5. A PCR-termékek tisztítása

A 10 vizsgált mintánk közül 2 mintát (Ap1 mag, Ap2 palánta pozitív magátvitel) tisztítottunk szekvenáláshoz. A PCR termékek tisztítását a High Pure PCR Product Purification Kittel (Roche) a gyártó utasításai alapján végeztük az alábbiak szerint:

- A PCR termékeket 100 µl végtérfogatra egészítettük ki nukleáz mentes vízzel, majd az elegyhez 500 µl Binding Buffer-t adtunk, és intenzíven homogenizáltuk.
- A mellékelt szűrőket a gyűjtőcsövekbe helyeztük, és az elegyeket átmértük a szűrőkbe, majd 5 perc centrifugálás következett.

- A gyűjtőcsövekbe átfolyt folyadékot a szűrőket kiemelve előtöttük, majd visszahelyeztük azokat a csövekbe.
- Rámértünk a szűrőre 500 µl Wash Buffer mosópuffert, azután 1 percig maximum fordulatszámon centrifugáltuk a csöveket.
- Ismét előtöttük az átfolyt folyadékot a gyűjtőcsövekből a szűrők kielemlésével, és ismét visszahelyeztük a szűrőket a gyűjtőcsövekbe. Hozzáadtunk 200 µl Wash Buffer-t, majd ismét 1 percig centrifugáltuk maximális fordulatszámon.
- Ismét előtöttük az átfolyt folyadékot a gyűjtőcsövekből a szűrők kielemlésével, és ismét visszahelyeztük a szűrőket a gyűjtőcsövekbe, majd ismét 1 percig centrifugáltuk a csöveket maximális fordulatszámon.
- A gyűjtőcsöveket az átfolyt folyadékkal együtt eldobtuk, a szűrőket pedig új, tiszta 1,5 ml Eppendorfofokba helyeztük.
- A szűrőkre 30 µl Elution Buffer-t mértünk, majd 1 percig teljes fordulatszámon centrifugáltuk a csöveket.
- Gélelektroforézissel vizsgáltuk, hogy a számunkra szükséges tiszta nukleinsavat ténylegesen tartalmazza-e az elegyünk.
- A tisztított mintákat -20 °C-on tároltuk.

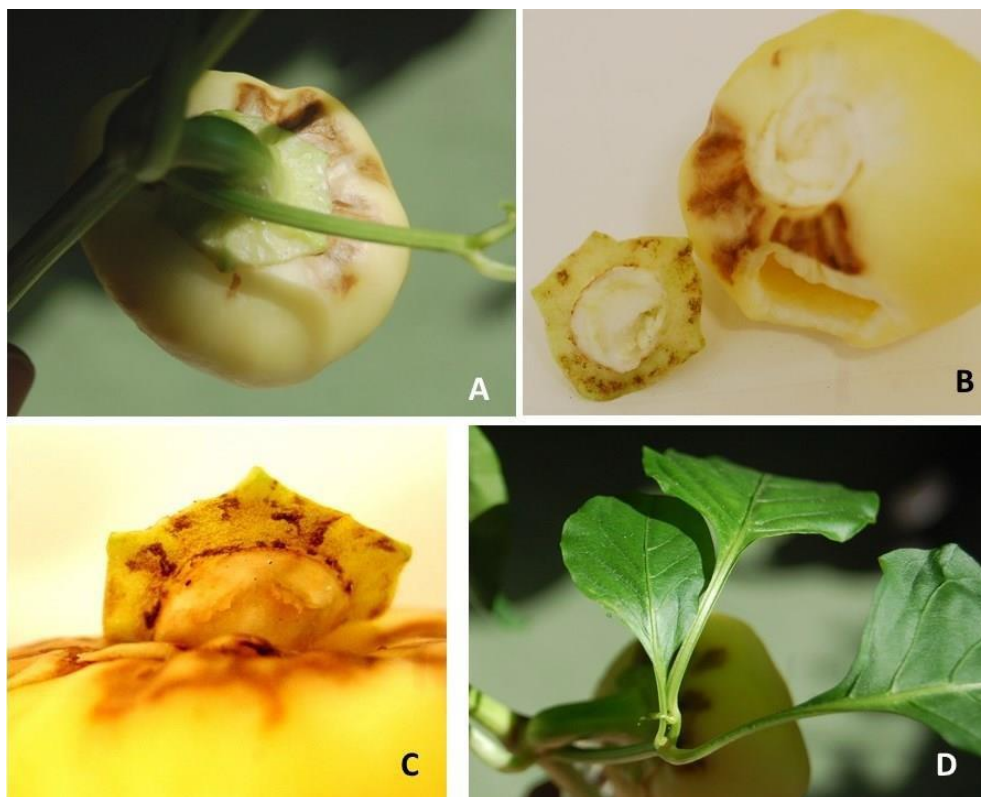
3.3.7.6. Nukleotid szekvenciák meghatározása és elemzése

A tisztított PCR termékek koncentrációját NanoDrop Spectrophotometerrel meghatároztuk, a szekvenáláshoz szükséges reakcióelegyet összemértük, és azt a hollandiai székhelyű BaseClear B.V. céghez küldtük szekvenálásra. A szekvenciák elemzéséhez a Chromas (version 2.6.6) és a CLC SequenceViewer 8.0 programokat használtuk. A saját szekvenciáinkat a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisában fellelhető szekvenciákkal az NCBI Basic Alignment Search Tool (BLAST) programját használva összehasonlítottuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Különleges vírusos megbetegedés paprika növényeken: előfordulás és betegség tünetek

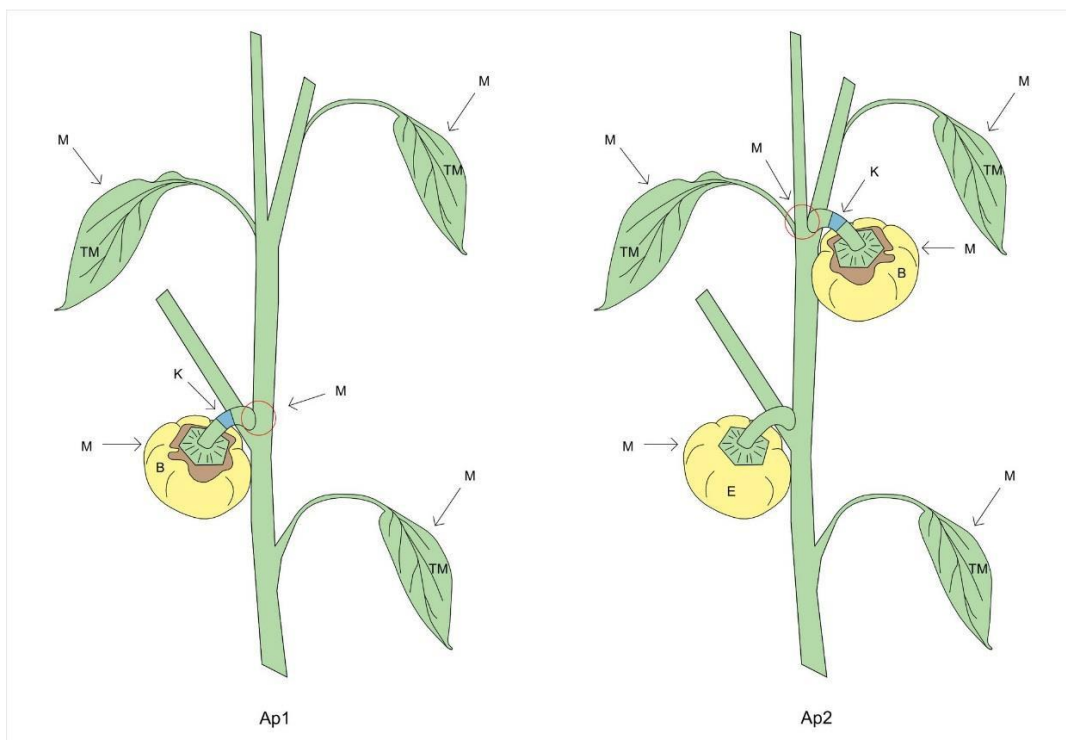
2022 nyarán paprika hibrid vetőmagot előállító hajtató üzemből olyan beteg paprika növényeket (jelzésük: Ap1 és Ap2) küldtek a MATE Szent István Campus, Genetikai és Biotechnológiai Intézet, Alkalmazott Növénygenomikai Csoporthoz, melyek biológiai érés előtt álló kifejlett bogyóin barna elhalásos tüneteket figyeltünk meg. A vírusfertőzésre utaló tünetek főként a kocsányhoz közeli szövetrészekben alakultak ki (**2. A ábra**). Az elhalások főként a bogyó héjára terjedtek ki, a bogyóhúsban csak elvétve fordultak elő (**2. B ábra**). A csészelevelet a bogyóról leválasztva azt tapasztaltuk, hogy a csészelevél bogyóhússal érintkező belső részén szintén elhalt foltok jelentek meg, azonban sem a csésze külső részén sem a kocsányon elhalások nem fordultak elő (**2. C ábra**). A beküldött két paprika növényen tüneteket csak a terméseken figyeltünk meg, lombozatuk és száraik teljesen tünetmentesek voltak (**2. D ábra**). A beteg bogyók mindegyikének (5 bogyó) kocsányán a keresztezésre utaló festékfolt fordult elő. Egy bogyó tünetmentes volt keresztezésre utaló jelzés nélkül.



2. ábra Vírusfertőzésre utaló betegség tünetek paprika bogyókon és tünetmentes levelek a beteg bogyókat nevelő növényen

4.2. Vírusok kimutatása biotesztekkel különböző növényi részekből

A vírusok jelenlétének kimutatására az Ap1 és Ap2 paprika minták különböző részeiből (1-1 bogyó hús szelete, 3-3 tünetmentes levél, a beteg bogyókhoz közeli szárrész) vettünk szövetmintát (3. ábra), és az ezekből nyert szövetnedvvel minden esetben *Nicotiana glutinosa* növényeket, illetve a bogyóminták esetében ezen kívül *C. annuum* cv Fehérözön, *Ch. murale*, *Ch. amaraticolor* *N. clevelandii*, *N. tabacum*. Xanthi-cn teszt növényeket inokuláltunk (4. ábra)



3. ábra Ap1 és Ap2 növényi minták vázlatos rajza

Jelmagyarázat: M = Mechanikai átvitel (bioteszt); Tm = tünetmentes; K = keresztezés jelzése a kocsányon; B = beteg; E = tünetmentes bogyó

Megállapítottuk, hogy beteg bogyók szövetnévével inokulált *N. glutinosa* és *N. tabacum* cv. Xanthi-nc levelein 4-5 nappal az inokuláció után nagyszámú (>50) pontszerű, fehér nekrotikus lokális lézió jelent meg melyek később jelentősen nem nőttek.



4. ábra Vírusizolálási kísérletek különböző tesztnövényeken az Ap1 és Ap2 paprika minták beteg bogyóiról

A *Chenopodium* fajok közül a *Ch. amaranticolor*-on klorotikus-nekrotikus léziókat figyeltünk meg, míg a *Ch. murale* tünetmentes maradt. A *N. clevelandii* és a *C. annuum* cv. Fehérözön szisztemikus mozaik foltosságot és deformációt mutattak. Az Ap1 és Ap2 növényekről származó izolátumok között a tesztnövények reakcióit tekintve jelentős különbséget nem tudtunk kimutatni, eltekintve attól, hogy a Fehérözön paprika fajtán az Ap1 izolátum enyhébb mozaik tüneteket okozott, később kigyógyult, majd az újabb leveleken

ismételten enyhe tüneteket okozott. A beteg bogyók közeléből, a növények szárából vett szövetmintából készített inokulumokkal bedörzsölt *N. glutinosa* leveleken az Ap1 minta esetében nagy koncentrációban mutattunk ki nekrotikus léziókat előidéző vírust, míg hasonló teszt az Ap2 minta esetében negatív eredményt hozott. Az Ap1 és Ap2 paprika minták leveiből készült szövetnedvek a *N. glutinosa* biotesztek alapján vírusfertőzésre jellemző tüneteket nem okoztak. Nem tudtunk bioteszttel fertőző vírust kimutatni az Ap2 növény szárából és a tünetmentes bogyó húsaiból sem.

4.3. A vírusizolátumok tulajdonságai

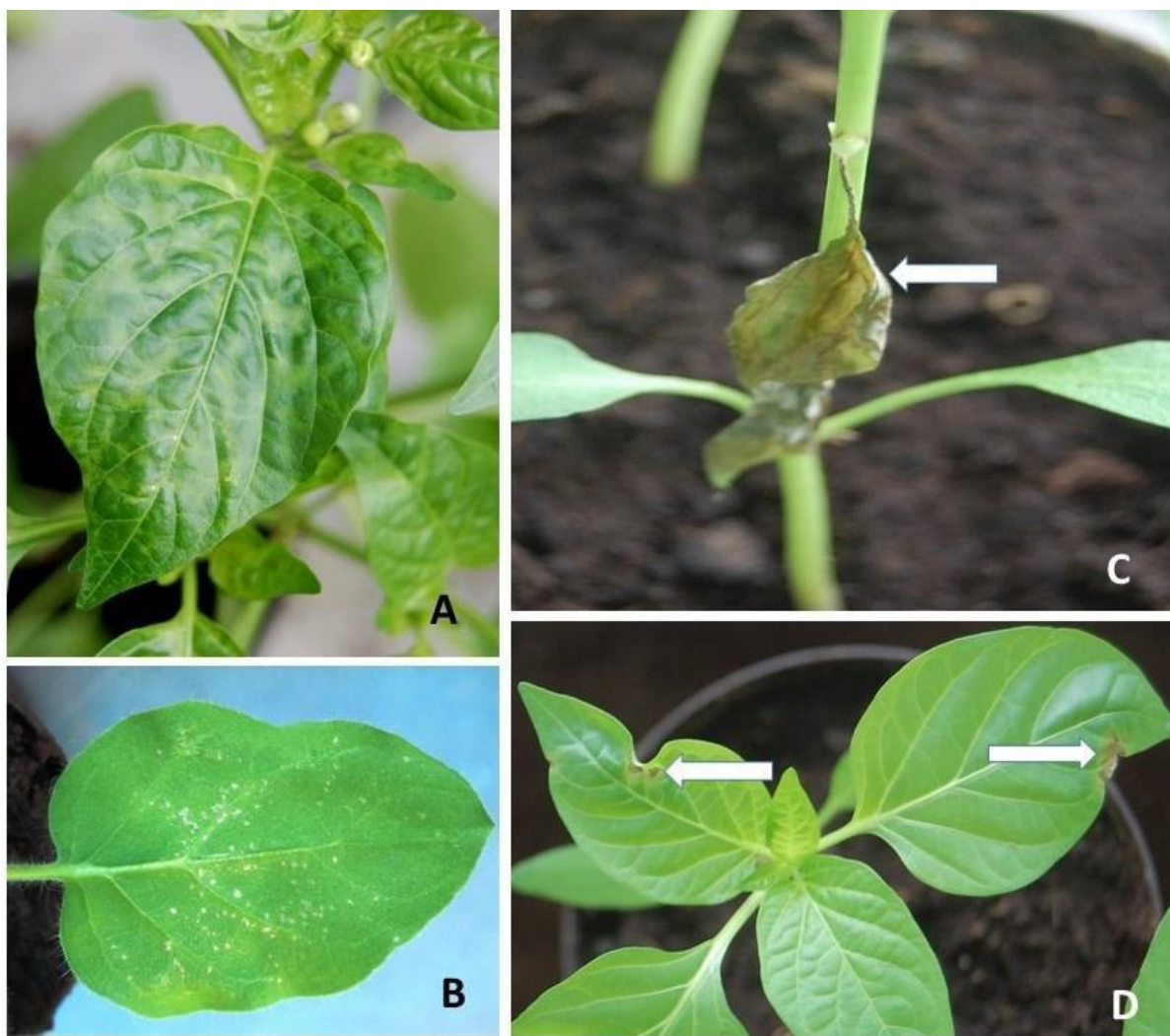
4.3.1. Gazdanövénykör és szimptomatológia

A gazdanövénykör tanulmányozásakor 14 különböző növényfaj és fajta fogékonyságát és/vagy ellenállóságát vizsgáltuk (**4. táblázat**). A 14 növényből három növény (*Ch. murale*, *S. dulcamara* és *S. lycopersicum*) bizonyult ellenállónak. Hét növényfaj (*C. annuum* cv. Kéra; *Ch. amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *N. glutinosa*, *N. sylvestris* és *N. tabacum* cvs. Samsun és Xanthi nc) csak lokális fogékonyságot mutatott. A *Ch. amaranticolor* és *Ch. quinoa* fajok inokulált levelein klorotikus léziók és foltok alakultak ki, míg a *N. glutinosa*, *N. sylvestris* és *N. tabacum* cv. Xanthi-nc gyorsan megjelenő (2-3 nap) nekrotikus lokális léziókkal reagáltak (**5. B ábra**). A *N. tabacum* cv. Samsun nem mutatott tüneteket, azonban inokulált leveiből *N. glutinosa* léziókat előidéző vírust mutattunk ki. A lokális léziókkal és az inokulált levelek lehullásával reagáló Kéra paprika fajtán olykor elszórtan szisztemikus elhalt foltok jelentek meg (**5. C ábra és 5. D ábra**). Ezekből a foltokból *N. glutinosa* bioteszttel nekrotikus léziókat okozó vírust mutattunk ki. Négy növényfaj (*N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *C. annuum* cv. Fehérözön és *C. chinense* P.I 159236) szisztemikus mozaik, törpülés és deformáció tüneteket mutatott (**5. A ábra**). Néhány növényfaj fogékonyságának vagy rezisztenciájának ellenőrzéséhez a fertőzési kísérleteket különböző évszakokban többször megismételtük. Így pl. három független fertőzési kísérletet végeztünk a *Ch. murale* növényeken és mindhárom alkalommal a növény magas szintű rezisztenciáját („immunitás”) állapítottuk meg.

4. táblázat Különböző növényfajok reakciói az Ap2 izolátummal végzett inokulációra

Inokulált növényfaj	IL	NIL
<i>Capsicum annuum</i> cv. Fehérözön	tm	kl, mo, tö, d
<i>Capsicum annuum</i> cv. Kéra	nf, lh	(nf), tm
<i>Capsicum chinense</i> 159236	kl	mo
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	kl	tm
<i>Chenopodium murale</i>	tm	tm
<i>Chenopodium quinoa</i>	kl	tm
<i>Nicotiana benthamiana</i>	tm	mo
<i>Nicotiana clevelandii</i>	tm	kl, d, tö
<i>Nicotiana glutinosa</i>	nll > 50	tm
<i>Nicotiana sylvestris</i>	nll	tm
<i>Nicotiana tabacum</i> cv Xanthi-nc	nll	tm
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	tm	tm
<i>Solanum dulcamara</i>	tm	tm
<i>Solanum lycopersicon</i>	tm	tm

Jelmagyázat: IL = inokulált levelek (lokális reakciók); NIL = nem inokulált (csúcsi) levelek (szisztémikus reakciók); d = deformáció; kl = klorózis; kll = klorotikus lokális lézió; lh = levélhullás; nf = nekrotikus foltok; () = esetenként; nll = nekrotikus lokális lézió; mo = mozaik; tm = tünetmentes; tö = törpülés



5. ábra Szimptómák az Ap2 izolátummal inokulált növényeken

Megjegyzés: Lokális (B, C) és szisztémikus (A, D) tünetek a *C. annuum* cv. Fehérözön (A), *N. glutinosa* (B), valamint a *C. annuum* cv. Kéra (C, D) növényeken.

4.3.2. Keresztvédettség

A keresztvédettségi teszt értékelésekor megállapítottuk, hogy a *N. tabacum* Xanthi-nc növényeken ObPV-XM izolátum 4 nappal az inokuláció után vírusfertőzésre jellemző tüneteket nem okozott. Az Ap2 izolátummal történt felülfertőzést követően a Xanthi-nc növények inokulált levelein nagyszámú nekrotikus lézió alakult ki az ObPV-XM izolátummal nem előfertőzött levélfeleken, míg az előfertőzött levélfelek tünetmentesek maradtak (6. ábra).



6 ábra Az Ap2 izolátum által okozott nekrotikus lokális léziók a Xanthi-nc dohány ObPV izolátummal nem inokulált levélfelén

4.3.3. A vetőmag szennyezettségének és különböző csávázó szerek hatékonyságának vizsgálata

Az Ap1 és Ap2 növények utóérlelt beteg bogyóiból (7. ábra) származó 10-10 nem csávázott vetőmagról nagy mennyiségű vírust mutattunk ki *N. glutinosa* tesztnövényen. A NaOH-os és Ecovian HIGÉN +99 kezelések után *N. glutinosa* bioteszttel a magokról vírust nem tudtunk kimutatni.



7. ábra Az Ap2 növényről származó utóérlelt beteg (balra) és tünetmentes (jobbra) bogyó

4.3.4 Magátvitel vizsgálata

A NaOH oldattal kezelt 72 magból összesen 58 kelt ki. Egy hónappal a kelés után (4-6 leveles állapotban) vírusfertőzés tüneteit a kezelt állomány egyedein nem figyeltünk meg. A nem kezelt 72 magból 64 kelt ki, melyek közül 8 egyeden (12,5%) figyeltünk meg elhalásos és mozaik tüneteket (**8. ábra**). A beteg növényekről sikeres biotesztet végeztünk *N. glutinosa* teszt növényekre.

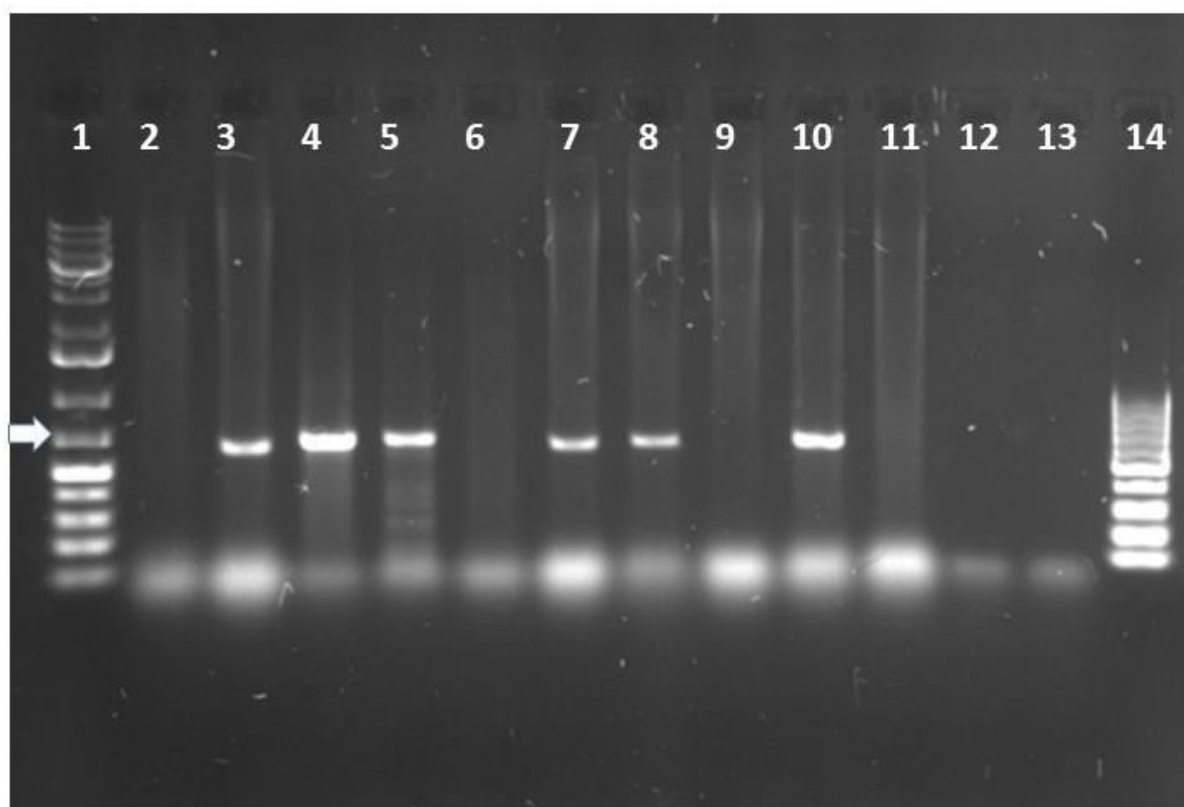


8. ábra Sárgulás, törpülés és enyhe mozaik tünet (jobbra) a beteg Ap2 bogyó nem csávázott magjáról nevelt palántán

4.3.5 Molekuláris vizsgálatok

4.3.5.1 Tobamovírusok kimutatása különböző növényi részekből RT-PCR módszerrel

Az RT-PCR vizsgálatokkal tobamovírusokra jellemző kb. 700 bp hosszúságú amplifikált termékeket mutattunk ki az Ap2 izolátummal inokulált Fehérözön paprika teszt növény, az Ap2 magátviteli kísérletből származó beteg palánták, valamint a ToBRFV-vel fertőzött paradicsom leveleiből (**9. ábra**). Hasonló terméket kaptunk az Ap1 és Ap2 növények beteg bogyóinak magjairól. Nem kaptunk amplifikált terméket az Ap2 magátviteli kísérletből származó tünetmentes palántáról, továbbá az Ap2 növény tünetmentes bogyójának magjáról és a negatív kontroll paradicsom leveléről, valamint a vízmintákról. Nem kaptunk terméket az Ap1 izolátummal inokulált, fertőződött Fehérözön paprika leveléről.



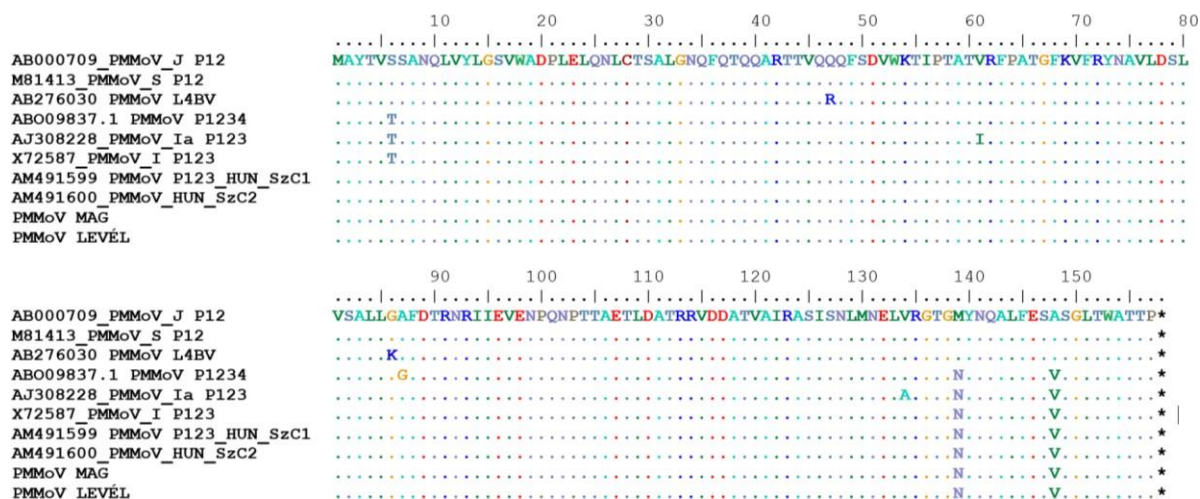
9. ábra Különböző növényi részek totál nukleinsav mintáiról Unitobamo primerek használatával amplifikált RT-PCR termékek elektroforetikus képe

Jelmagyarázat: 1 = GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder nukleinsav méretmarker (a nyíl 700 bp-t jelöl); 2 = Ap1 növény levele; 3 = Ap2 növény levele; 4 = Ap1 mag beteg bogyóból; 5 = Ap2 mag beteg bogyóból; 6 = Ap2 tünetmentes bogyó magja; 7-8. = Ap2 beteg palánták magátviteli kísérletből; 9 = Ap2 tünetmentes palánta magátviteli kísérletből; 10 = pozitív kontroll, ToBRFV-vel fertőzött paradicsom levele; 11 = negatív kontroll, egészséges paradicsom levele; 12-13. = víz minták; 14 = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder nukleinsav méretmarker

4.3.5.2 Nukleotid szekvenciák meghatározása és a szekvencia adatok elemzése

Megállapítottuk, hogy az Ap1 beteg bogyó magjairól és az Ap2 magátviteli kísérletből származó beteg palántáról készült PCR termékek a tobamovírusokra jellemző molekula tömegű, 158 aminosavból álló, teljesen azonos aminosav sorrendű fehérjét kódolnak (**10. ábra**). A GenBanki adatokat elemezve (BLAST) megállapítottuk, hogy mindkét amplikon a PMMoV izolátumok CP gén bázissorrend adataival mutat >99 %-os hasonlóságot. Az általunk vizsgált amplikonok aminosav szinten teljes szekvencia azonosságot mutattak két korábban szekvenált

magyar PMMoV izolátummal. Hasonlóan P_{1.2.3} patotípusú ismert izolátumokhoz a 139. és a 148. aminosav pozícióban különböznek a P_{1.2} patotípusú PMMoV izolátumoktól, valamint a P_{1.2.3.4} patotípusú L4BV izolátumtól.



10. ábra Az Ap1 beteg bogyó magjairól és az Ap2 magátviteli kísérletből származó beteg palántáról készült PCR termékek (PMMoV mag és PMMoV levél) aminosav szintű szekvencia adatainak összehasonlítása ismert PMMoV izolátumok CP génjeinek aminosav sorrendjével

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgált Ap1 és Ap2 paprika növényeken megfigyelt tünetek, különösen a bogyókon tapasztalt elhalások vírus(ok) fertőzésére utaltak, annak ellenére, hogy a lombozaton betegségi tünetek nem alakultak ki. Ez az eset hasonlított Salamon és mtsai. (2008) által közölt kóresetekhez, melyekben idősebb, már kifejlett paprikáknak csak a bogyóin jelentek meg tünetek a CMV vagy a TSWV fertőzése után. Ennek alapján feltételezhető, hogy az Ap1 és Ap2 paprika tövek fertőződése sem fiatal korban történt. Az Ap2 tövön három paprika bogyót találtunk, melyek közül kettő beteg volt egy bogyó pedig tüneteket nem mutatott. Feltűnő volt, hogy az Ap1 és Ap2 tövek beteg bogyóinak kocsányain keresztezésre utaló festést találtunk, míg a tünetmentes bogyón ilyen festés nem volt.

A vírusfertőzöttség kimutatásához végzett mechanikai átviteli kísérletek különböző tesztnövényekre az Ap1 és Ap 2 növények beteg bogyóinak szövetnedvével sikeresek voltak, míg a tövek tünetmentes leveiből és a tünetmentes Ap2 bogyóból nem tudtunk fertőző vírust kimutatni. Az átvitt vírusok nagyszámú nekrotikus lokális léziót okoztak az N-gént tartalmazó

N. glutinosa-n, klorotikus foltokat a *Ch. amaranticolor*-on és szisztemikus mozaik foltosságot és deformációt az L¹ allélt tartalmazó Fehérözön paprikafajta egyedein. Ezek a tünetek, valamint az ObPV-XM izolátummal végzett keresztvédetség teszt pozitív eredménye egyértelműen tobamovírus jelenlétére utaltak. A *N. glutinosa*-n a kisméretű és fehér lokális léziók, valamint az L¹ allél áttörése a paprikán a PMMoV-re vagy a PaMMV-re jellemző (Wetter, 1984). A vírusizolálást két beteg bogyó kocsányának közeli szárrészből is megkíséreltük, de pozitív eredményt csak egy esetben értünk el. Ez arra utalt, hogy a fertőző vírus nem mindig jutott be a szárba, azaz egyes bogyók megbetegedése nem általános szisztemikus fertőzés eredménye volt. Erre utalt az is, hogy a biotesztekkel sem a levelekből, sem az Ap2 töv tünetmentes első kötésű bogyójából sem tudtunk vírust kimutatni. Annak ellenére, hogy a pollennel történő átvitelt a paradicsomon a ToBRFV esetében nem sikerült igazolni (Avni et al. 2022), a PMMoV esetében a szennyezett pollen fertőző vírust hordozhat (Salamon és Kaszta, 2000) és nem kíméletes keresztezéskor sérüléseken keresztül a növények fertőződhetnek. Ennek igazolásához azonban további kísérletekre lenne szükség.

Az Ap1 és Ap2 izolátumok gazdanövény köre és szimptomatológiai tulajdonságai azonosak voltak és megegyeztek a PMMoV-re jellemző, az irodalomból ismert eredményekkel (Wetter 1984; Wetter et al, 1986; Kálmán, 2003; Tóbiás et al., 1982). Mindkét izolátum fontos jellemzője volt, hogy az L3 alléll rendelkező *Ch. chinense* vonalat szisztemikusan fertőzte, de

csak lokális léziókat idéztek elő az L4 allélel rendelkező Kéra paprika fajtán. Ezek az izolátumok ezért a P1.2.3 patotípusú tobamovírusokhoz sorolhatók.

A két izolátum és a PMMoV azonosságát a molekuláris vizsgálatok megerősítették, mivel CP génjük bázissorrendje és az erről számított aminosav sorrendje >99 %-os homológiát mutatott a jól ismert PMMoV izolátumokkal. Az aminosav sorrend összehasonlító vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az Ap1 és Ap2 izolátumok két korábbi hazai PMMoV izolátummal azonosak. Mindkét izolátumunkon kimutatható volt a P_{1.2,3}patotípusú PMMoV izolátumok köpenyfehérjéjére jellemző és a P1.2 izolátumoktól eltérő aminosav változás a 139. és a 148. pozícióban.

A patológiai és a molekuláris vizsgálatok alapján az általunk vizsgált két tobamovírus izolátumot a PMMoV-val azonosíthatjuk és jelölésükre a PMMoV-Ap1 és PMMoV-Ap2 akronímák használatát javasoljuk. Mindkét izolátum különleges patológiai tulajdonságának bizonyult, hogy más tobamovírusoktól (pl. TMV, ToMV, ToBRFV) eltérően nem fertőzte a *Ch. murale* növényfaj egyedeit.

A PMMoV-Ap2 izolátummal végzett vizsgálataink hasonlóan mások eredményeihez (McKinney, 1952; Wetter és Conti, 1988; Beczner et al., 1997; Salamon és Kaszta, 2001) azt igazolták, hogy a vírus a vetőmagról fertőzőképesen kimutatható és a nem csávázott paprika maggal könnyen átvihető. 2%-os NaOH-val történő csávázás után a magról fertőző vírust már nem tudtunk kimutatni és Beczner és mtsai. (1997) kanadai eredményeivel ellentétben magátvitelt sem tapasztaltunk. Először végeztünk vírusok elleni magkezelési kísérletet Ecowian HIGÉEN+ 99 készítménnyel (Anonymous, 2022), melyet töményen alkalmazva a magok infektív vírusszennyezettségét megszüntette. Előzetes vizsgálataink szerint a készítménnyel kezelt paprika mag gyorsabban csírázott és erőteljesebben fejlődött.

Munkánk felhívja a figyelmet arra, hogy a PMMoV jelentősége a paprika hajtásban és a vetőmag előállításban nem szűnt meg, sőt új, nem várt problémákat okozhat. Ezek pl. olyan esetekben fordulhatnak elő, amikor a hibrid vetőmag előállításakor az apanövények fertőzöttsége miatt az anyaállomány egyedei a keresztezéskor fertőződnek és a megbetegedés a bogyón tapasztalható. Ezért ajánlott a pollengyűjtéskor az apanövények tüzetes tünettani vizsgálata és a legkisebb gyanú esetén a fertőzött egyedek eltávolítása. Nem hagyható el a vetőmagvak csávázása sem, amelyhez a fertőtlenítésre ajánlott Ecowian HIGÉEN 99+ készítmény is alkalmasnak tűnik, de ezzel kapcsolatban még további megerősítő kísérleteket kellene végezni.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A paprika termesztésben világszerte súlyos károkat okoznak a növényvírusok, melyek ellen a védekezés sokszor nem megoldott. Hatékony viricidek hiányában a vírussal fertőzött növény gyógyítására nincs lehetőség, így a védekezés a megelőzésre, a vektorok elleni növényvédő szeres kezelésre, valamint az ellenálló, rezisztens fajták termesztésére korlátozódik.

A paprika kórokozói közül különös jelentőségűek a tobamovírusok, melyek közül az elmúlt 30-35 évben a paprika enyhe foltosság vírus (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV¹) vált a legveszélyesebbé, mert rezisztencia törő törzsei is ismertek és fertőzése gyakran csak nehezen ismerhető fel az enyhe levéltünetek miatt ugyanakkor a bogyón súlyos tüneteket okozhat.

Tobamovírus fertőzésre utaló különleges megbetegedések léptek fel egy hibrid paprika előállítással foglalkozó üzemben, ahol a beteg növények levelei tünetmentesek voltak, a keresztezett virágokból fejlődő bogyókon azonban feltűnő elhalások jelentek meg.

Különböző tesztnövényekre végzett átviteli kísérletekkel igazoltuk, hogy két paprikatő (Ap1 és Ap2) beteg bogyói mechanikailag átvihető vírussal fertőződtek. A két paprika növény leveleiből ugyanakkor bioteszttel vírust nem tudtunk kimutatni és a beteg bogyókhoz közeli szárrész sem tartalmazott mindig fertőző vírust.

A gazdanövényköri vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az Ap1 és Ap2 vírusizolátumok egymással azonosan viselkedtek és a tobamovírusok közül a PMMoV izolátumaival mutattak nagy hasonlóságot. A tobamovírusokkal való rokonságot az Obuda paprika vírus XM izolátumával végzett keresztvédeztési tesztek is megerősítették. Mindkét izolátum paprikán az L³ rezisztencia gén áttörő P_{1.2.3} patotípusnak bizonyult.

Unitobamo primerek használatával az Ap1 és Ap2 izolátumokkal fertőzött paprika levelekből és szennyezett paprika magból RT-PCR módszerrel a tobamovírusokra jellemző méretű DNS-t amplifikáltunk. Egy fertőzött paprika leveléből végzett PCR vizsgálat negatív eredménnyel járt, ami feltehetően a vírus egyenetlen szisztemizálódásából adódott. Az amplifikált Ap1 és Ap2 DNS-ek szekvenciái azonosak voltak és nagy (> 99%) hasonlóságot mutattak a GenBank-ban található PMMoV CP gén szekvenciákkal. A CP gén szekvencia adatok a PMMoV P_{1.2.3} patotípusokra jellemző motívumokkal rendelkező vírusokkal azonosak voltak.

A patológiai és molekuláris tulajdonságok alapján mindkét izolátumot a PMMoV-val azonosítottuk és jelölésükre a PMMoV-Ap1 -és Ap2 akronímák használatát javasoljuk.

A PMMoV Ap2 izolátumal szennyezett, nem csávázott vetőmaggal a vírus átvihetőnek bizonyult, míg a 2 %-os NaOH-val végzett csávázás után magátvitelt nem tapasztaltunk. Előzetes kísérleteink alapján az Ecovian HIGÉN 99+ készítmény is hatékony csávázószernek minősült.

Munkánk eredményei rámutattak arra, hogy paprikán a PMMoV fertőzés eseténként csak a bogyón okoz betegség tüneteket. Feltételezésünk szerint a fertőzés hibridelőállítás esetén szennyezett pollenről is származhat. Emiatt a pollent adó apaállományokban célszerű minden töre kiterjedő folyamatos és fokozott tüneti vizsgálatokat végezni és a beteg növényeket azonnal eltávolítani. A maggal történő vírusátvitel miatt a vetőmag tételek csávázása elengedhetetlen.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adams, M. J., Antoniw, J. F., Kreuze, J. 2009. Virgaviridae: A new family of rod-shaped plant viruses. Archives of Virology, 154. kötet. 1967–1972.
2. Adams, M. J., Antoniw, J. F., & Kreuze, J. 2009. Virgaviridae: A new family of rod-shaped plant viruses. Archives of Virology, 154 évf. 1967– 1972.
3. Alonso, E., García-Luque, I., De la Cruz, A., Wicke, B., Avila-Rincón, M. J., Serra, M. T., Castresana, C., Díaz-Ruíz, J. R. 1991. Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. J. Gen. Virol. 72 évf. p. 2875-2884.
4. Anonymus 2022. Elképesztő károkat okoz a paradicsomot pusztító vírus – érkezik a magyar megoldás?https://www.agroinform.hu/kerteszeti_szoleszet/paradicsom-paprika-magyar-innovacio-vedhet-virusfertozestol-56546-001
5. 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 évf. p. 1033–1037.
6. Avni, B.; Gelbart, D.; Sufrin-Ringwald, T.; Zemach, H., Belausov, E.; Kamenetsky-Goldstein, R.; Lapidot, M. 2022. ToBRFV Infects the Reproductive Tissues of Tomato Plants but Is Not Transmitted to the Progenies by Pollination. Cells, 11, 2864. <https://doi.org/10.3390/cells11182864>.
7. Barboza GE, García CC, Bianchetti LB, Romero MV, Scaldaferrro M 2022. Monograph of wild and cultivated chili peppers (*Capsicum* L., Solanaceae). PhytoKeys 200 p. 1-423.
8. Beczner, L., Rochon, D.M., and Hamilton, R. I. 1997. Characterization of an isolate of pepper mild mottle tobamovirus occurring in Canada. Can. J. Plant Pathol. 19 évf. p. 83-88.
9. Berzal-Herranz, A., De la Cruz, A., Tenllado, F., Díaz-Ruíz, J. R., Lopez, L., Sanz, A. I., Vaquero, C., Serra, M. T., García-Luque, I. 1995. The Capsicum L 3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. Virology 209 évf. p. 498-505
10. Blanco-Sanches, N., Crespo, J., Gonzales G. 1986. Adsorption of tobacco mosaic virus (TMV) in five soils of Cuba., Ciencias de la Agr. p. 9-14
11. Bosland, P. W., Votava, E. J., & Votava, E. M. 2012. Peppers: vegetable and spice capsicums 22 köt.
12. Boukema, I. W. 1980. Allelism of genes controlling resistance to TMV in Capsicum L. Euphytica, 29 évf. p. 433–439.
13. Boukema, I. W. 1984. Resistance to TMV in Capsicum chacoense Hunz. is governed by allele of the L-locus. Capsicum Newsl, 3 évf. p. 47–48.
14. Brunt, A. - Crabtree, K. - Dallwitz, M. - Gibbs, A. - Watson, L. 1996. Viruses of Plants: Descriptions and Lists from the VIDE Database. CAB International. p.1-1484.
15. Caciagli P. 2008. Encyclopedia of Virology (Third Edition).
16. Castello J. D. - Lakshman, D. K. - Tavantzis, S. M. - Rogers S. O. - Bachand, G. D. - Jagels, R. - Carlisle, J. - Liu, Y. 1995. Detection of infectious tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds. Phytopathology 85 évf. p. 1409- 1412.

17. Castello, J. D. - Rogers, S. O. - Starmer W. T- Catranis, C. M. - MA, L. - Banchard, G. D. - Zhao, Y. - Smith, J. E. 1999. Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient Glacier ice. *Polar Biol.* 22 évf. p. 207-212
Characterization of Paprika mild mottle virus first isolated in Japan. *Journal of General Plant Pathology* évf. 69. p. 199–204
18. Conti, M., Masenga, V. 1977. Identification and prevalence of pepper viruses in Northwest Italy. *Phytopath. Z.* 90 kötet. p. 212-222.
19. Csilléry G., Ruskó J. 1980. The control of a new Tobamovirus strain by a resistance linked to anthocyanin deficiency in pepper / *Capsicum annuum* /. EUCARPIA Capsicum Working Group IVth Meeting. 14-16. October, 1980. Institute for Horticultural Plant Breeding, Wageningen, The Netherlands, p. 40-43.
20. Daskalov S. – Poulos J. M. 1994. Updated Capsicum gene list. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 13 évf. p. 15-26.
21. Demski J.W. 1981. Tobacco mosaic virus is seedborne in pimiento pepper. *Plant Disease.* 65 évf. p. 723-724.
22. Dombrovky és Smith 2017. Seed Transmission of Tobamoviruses. *Aspects of Global Disease Distribution.*
23. Edwardson, J. R. - Christie, R. G. 1997: Viruses infecting peppers and other Solanaceous crops. Monograph 18-I. Univ. Florida, Agric. Expt. Sta.
24. Fallik, E., Ilic, Z. 2014. Grafted vegetables – the influence of rootstock and scion on postharvest quality. In: *Folia Horticulturae.* 26 évf. 2 sz. p. 79-90.
25. Fauquet, C. M. - Mayo, M. A. - Maniloff, J. - Desselberger, U. - Ball, L. A. (EDS) 2005. Virus taxonomy. VIIth Report of the ICTV. Elsevier/Academic Press, London.
26. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. - Ball, L. A. (EDS) 2005. Virus taxonomy. VIIth Report of the ICTV. Elsevier/Academic Press, London.
27. FruitVeb 2019. A hidegfóliás és a szabadföldi paprikatermesztés gazdaságossága
28. FruitVeb 2020. FruitVeB Bulletin 2019. – Zöldségtermesztés I.
29. Gáborjányi R. 1986. Biológiai védekezés a növényi vírusok ellen: Elméleti lehetőségek és gyakorlati eredmények. *Növénytermelés* 35 évf. p. 561-568
30. Gáborjányi R., Pogány M., Horváth J. 1997. A vírusok szerepe a paprikapusztulásban. *Növényvédelem* 33 évf. p. 181-185.
31. Gáborjányi, R., Horváth, J., Kovács, J., Kazinczi, G. 1998a. Role of viruses in pepper decline in Hungary. *Eucarpia*, X th Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Avignon, France, p. 129-132
32. Gáborjányi, R., Horváth, J., Kovács, J., Kazinczi, G. 1998b. Role of virus- and phytoplasma infections in pepper decline in Hungary: an overview. *Acta Phytopath. et Entomol. Hung.* 33 évf. p. 261-268.
33. García-Luque, I., Serra, M. T., Alonso, E., Wicke, B., Ferrero, M. L., Díaz-Ruiz, J. R. 1990. Characterization of a Spanish strain of pepper mild mottle virus (PMMV-S) and its relationship to other tobamoviruses. *J. Phytopathology* 129 évf. p. 1-8.
34. Gibbs A. 1999. Evolution and origins of tobamoviruses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354 évf. p. 593-602.
35. Gibbs A. 1999. Evolution and origins of tobamoviruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 354. kötet, p. 593-602.

36. 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 évf. p. 2077– 2085
37. Green SK. 2003. Pepper mild mottle virus. In Pernezny et al. (eds) Compendium of pepper diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. p: 32-33
38. Gyúró J., Szóriné Z. A. Paprika. In: Terbe I., Hodossi S., Kovács A. (szerk.) 2005. Zöldségtermesztés termesztőberendezésekben. Budapest. Mezőgazda Kiadó. p. 93-109.
39. Hamada, H., Takeuchi, S., Morita, Y., Sawada, H., Kiba, A., Hikichi, Y. 2003.
40. Hollings, M., Huttinga, H. 1976. Tomato mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses sz. 156. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. p. 6
41. Horváth J. 1999. Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek Budapest. Mezőgazda Kiadó.
42. Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology. Fourth Edition. Academic Press. London.
43. Idrees, S., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Hanif, A., & Ansari, T. M. 2020. Chili Pepper. In Medicinal Plants of South Asia p. 113-124.. Elsevier.
44. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV. 2023. Taxonomy Browser. <https://ictv.global/taxonomy>
45. Juretic, N. - Horváth, J. -Krajic, M 1986. Occuring of ribgrass mosaic virus in water of Hungarian river Zala. Acta Phytopath. et Entomol. Hung. 21 évf. p. 291-295.
46. Kálmán D. 2003. Paprika enyhe tarkulás vírus (Pepper mild mottle virus, PMMoV) izolátumok patológiai, szerológiai és molekuláris biológiai jellemzése. Doktori (PhD) értekezés, Veszprémi Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar
47. Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W. S., Hughes, J. d 2014. Virus diseases of peppers (Capsicum spp.) and their control. Advances in virus research, 90 évf. p. 297–354.
48. Kiss L., Salánki K., Csilléry G. és Palkovics L. 2007. A paprika enyhe tarkulás vírus (Pepper mild mottle virus, PMMoV) L3 rezisztenciát áttörő patotípusának előfordulása Magyarországon, a kórokozó molekuláris jellemzése. Növényvédelem, 43 évf. 11.sz. p. 509–514
49. Knapp, E. - Lewandowski, D. 2001. Tobacco mosaic virus, not just a single component virus anymore. Mol. Plant Pathol. 2.évf. p.117-123.
50. Knapp, E. - Lewandowski, D. 2001. Tobacco mosaic virus, not just a single component virus anymore. Mol. Plant Pathol. 2 kötet., p. 117-123.
51. Kubota K., Usugi T., Tomitaka Y., Higashiyama M., Kosaka Y., Tsuda S. 2011. Characterization of Rehmannia mosaic virus isolated from chili pepper (Capsicum annuum) in Japan. Journal of General Plant Pathology. 78. évf.
52. Lantos F. (szerk) 2018. Capsicum genus A paprika fajok eredete. Szentes Városért Közalapítvány, és a duna-R Vetőmag Kft.
53. Lewandowski D.J. 2008. Tobamovirus. Encyclopedia of Virology (Third Edition) Academic Press, p. 68-72.
54. Li R, Gao S, Fei ZJ, Ling KS. 2013. Complete genome sequence of a new tobamovirus naturally infecting tomatoes in Mexico. Genome Announc. 1 évf. 5 sz. p. 794–13.
55. Li, Y. Y., Wang, C. L., Xiang, D., Li, R. H., Liu, Y., & Li, F. 2014. First Report of Tomato mottle mosaic virus Infection of Pepper in China. Plant disease, 98 évf. p.1447.

56. Lorenz, O.A., Maynard, D.N. 1980. Knott's handbook for vegetable growers. 2d ed. Wiley Interscience
57. Lozovaya E. ;Prihodko Y.;Zhivaeva T.;Shneyder Y.;Karimova E. 2022. The diagnostics of tobamoviruses infecting Solanaceae crops. 2022. Acta Horticulturae, 1351 sz. p. 119-124.
58. Mayer A. 1886. Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. Landwirtsch. Vers. Sta. 32 évf. p. 451-467.
59. McKinney, H. H. 1929. Mosaic diseases in Canary Islands, West Africa and Gibraltar. J. Agric. Res. 39 évf. p.557-558.
60. McKinney, H. H. 1952. Two strains of tobacco mosaic virus, one of which is seed-borne in an etch-immune pungent pepper. Plant Dis. Rep., 36 évf. p. 184–187
61. McKinney, H. H. 1968. Further study of the latent strain of the tobacco mosaic virus. Plant Dis. Rep. 52 évf. p. 919-922.
62. Moury, B., Verdin, E. 2012. Viruses of pepper crops in the Mediterranean basin: a remarkable stasis. Advances in virus research, 84 évf. p. 127–162.
63. Moury, B.,Verdin, E. 2012. Viruses of pepper crops in the Mediterranean basin: a remarkable stasis. Advances in virus research, 84 évf. p. 127–162.
64. Munting, A. J. 1974 . Development of flower and fruit of *Capsicum annuum* L. Acta Botanica Neerlandica, 23 évf. 4 sz. p. 415–432.
65. Nagai, Y. 1988. Control of seed-borne tobacco mosaic on tomato and sweet pepper by chemical and physical treatments. Proceedings of the 5 th International Congress of Plant Pathology, Kyoto, Japan, 1988. p. 405.
66. Nagy Z. R. 2021. Zöldségtermesztés erősségeink és gyengeségeink Magyar mezőgazdaság.hu
67. Ojinaga, M., Guirao, P., & Larregla, S. 2022. A Survey of Main Pepper Crop Viruses in Different Cultivation Systems for the Selection of the Most Appropriate Resistance Genes in Sensitive Local Cultivars in Northern Spain. Plants (Basel, Switzerland), 11 évf. 6 sz. p. 719.
68. Pernezny K., Roberts P.D., Murphy J.D., Goldberg N.P. 2003. In: Compendium of Pepper Diseases. Pernezny K., Roberts P.D., Murphy J.D., Goldberg N.P., editors. APS Press; St. Paul, MN, USA. p. 88.
69. Rast, A. Th. B. 1979. Pepper strains of TMV in the Netherlands. Med. Fac. Landb. Wet. Rijksuniv. Gent., 44 évf. p. 617–622.
70. Salamon P. 2006. Növények és vírusok kapcsolatai a paprika (*Capsicum*) – tobamovírus patoszisztémákban. Doktori (PhD) értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar.
71. Salamon P., Beczner L. 1987. Dulcamara yellow fleck virus (DYFV): a tobamovirus csoport új, *Solanum dulcamara* populációkban elterjedt, Magyarországon endemikus tagja. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 1987.évf. p. 83.
72. Salamon P., Hirka J., Horváth J., Juhász Z., Varró P. ésMilotay P. (2008): Késői vírusfertőzések hajtottpaprikán (*Capsicum annuum* L.) és paradicsomon(*Solanum lycopersicum* L.) – tünetek a bogyón.13. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum, Debrecen, 2008. október 15–16. Proceedings, p. 59–65.

73. Salamon, P. - Kaszta, M. 2000. Investigations on the transmission of some Tobamoviruses by pollen and seed in pepper (*Capsicum annuum* L.) *Internat. J. Hort. SCI.* 6 évf. 3 sz. p.127-131
74. Salamon, P. - Sági, Zs. 2004: A paprikát (*Capsicum* spp.) fertőző tobamovírusok patotípusai és a tobamovirus rezisztenci allélek közötti összefüggések. 9. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum, 2004. október 20-24. p. 256-263.
75. Salamon, P. 1993. Tobamovirus rezisztencia gének a *Capsicum* nemzetségben és a paprika rezisztencia-nemesítés hazai eredményei. *Integrált termesztés a kertészetben* 14 köt.p.104-113
76. Salánki K., Tóbiás I., Almási A., Sáray R., Pinczés D., Bulecza Cs., Csilléry G. 2021. Szentesen üvegházban termesztett paprikaminták virológiai vizsgálata a 2019–2021 közötti időszakban. *Növényvédelem* 82 évf. p. 453-459.
77. Silber, G., and Burk, L. G., 1965, Ineffectivity of tobacco mosaic virus stored for fifty years in extracted 'unpreserved' plant juice, *Nature (London)* 206 kötet. p. 740–741.
78. Somos A. 1966. A paprika. Budapest. Akadémiai Kiadó.
79. Spence, N. J., Sealy, I., Mills, P. R., & Foster, G. D. 2001. Characterisation of a tobamovirus from trailing petunias. *European Journal of Plant Pathology*, 107 kötet, p. 633–638.
80. Stoimenova, E., Yordanova, A. 2005. Tobamovirus strain P101 isolated from pepper in bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19 évf. p. 30-35.
81. Tanzi, M., Betti, L., Canova, A. 1989. PepMV infection in pepper seeds. Biological characterization of some strains and their localisation in the seed. *Phytopath. Medit.* 28 évf. p. 204-209.
82. Terbe I. 1999. Termesztési tanácsok paprikatermesztőknek Blondy és Társa Kft. Debrecen.
83. Terbe I., Hodossy S., Kovács A. 2005. Zöldségtermesztés termesztőberendezésben. Mezőgazda Kiadó
84. Tiwari, A., Vivian-Smith, A., Ljung, K., Offringa, R., & Heuvelink, E. 2013. Physiological and morphological changes during early and later stages of fruit growth in *Capsicum annuum*. *Physiologia Plantarum*, 147 évf. 3 sz. p. 396–406
85. Tóbiás I., Molnár B. 1983. Az étkezési paprikán előforduló vírustünetek és víruskórokozók Magyarországon. *Kertgazdaság* 15 évf. p. 49-54.
86. Tóbiás I., Molnár B., 1983. Az étkezési paprikán előforduló vírustünetek és víruskórokozók Magyarországon. *Kertgazdaság*. 15 évf. p.49-54.
87. Tóbiás, I., Rast, A.T.B. Maat, D.Z. 1982. Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: Comparative host reactions and serological relationships. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88 évf. p. 257–268.
88. Vélez-Olmedo, J., Fribourg, C., Melo, F., Nagata, T.,Oliveira A., Resende R. 2020. Tobamoviruses of two new species trigger resistance in pepper plants harbouring functional L alleles. 102 évf. webnet.
89. Wetter, C., Cont, M. 1988. Pepper mild mottle virus. CMI/AAB descriptions of plant viruses: sz. 330: p. 4.
90. Wetter, C. - Dore, I. - Bernard, M. 1987. Bell pepper mottle virus, a distinct tobamovirus infecting pepper. *J. Phytopathology* 119 évf. p. 333-344

91. Wetter, C. 1986. Tobacco Mild Green Mosaic Virus. In: Van Regenmortel, MHV, Fraenkel-Conrat, H. (eds) The Plant Viruses. Springer, Boston, MA. p. 205-219.
92. Wetter, C., 1984. Antigenic relationships between isolates of mild dark-green tobacco mosaic virus and the problem of host-induced mutation, *Phytopathology* 74 évf. p.1308.
93. Wetter, C., Conti, M., Altschuh, D., Tabillon, R., Van Regenmortel, M. H. V. 1984. Pepper mild mottle virus, a Tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology*. 74 évf. p.405-410.
94. Xu, Q., Wen, X., Deng, X. 2004. A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii*tratt) for RFLP and PCR analyses. In: *Plant Molecular Biology Reporter*. 22 évf. 3 sz. p.301-302.
95. Zaitlin, M. 2000. Tobacco mosaic virus. *Description of Plant Viruses*. sz. 370 DPV
96. Zatykó L. Étkezési paprika. In: Balázs S. (szerk.) 2004. *Zöldségtermesztők kézikönyve*. Budapest. Mezőgazda Kiadó. p. 197-232.
97. Zatykó, L. 2006. Selection of paprika in ancient times and today. *Acta Agronomica Hungarica*, 54 évf. 2 sz. p. 167–178.
98. Zatykó, L. 2006. Pepper (*Capsicum annum*L.) breeding methods at the turn of the century. *Acta Agronomica Hungarica*, 54 évf. 2. sz. p. 179–202.
99. Zhang, S.,Tan, G., Li, L. 2022. First Report of Pea as a Natural Host of Tomato mottle mosaic virus in China. *Plant Disease*. 106 évf. 2 sz. p. 775.
100. Zhang, T. - Breitbart, M. - Lee, W. H. et al. 2006. RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. *PLoS Biol* 3. évf.

