

Detekcia DNA markerov viazaných ku  
génom rezistencie rajčiaka jedlého  
a papriky ročnej voči vybraným  
*Tobamovírusom*

Metodická príručka

Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Prenos efektívnych postupov selekcie a identifikácie rastlín do šľachtenia ITMS : 26220220142, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

**Názov:** Detekcia DNA markerov viazaných ku génom rezistencie rajčiaka jedlého a papriky ročnej voči vybraným Tobamovírusom

**Autor:** Mgr. Martina Hudcovicová, PhD.

**Autori fotografií:** Mgr. Martina Hudcovicová, PhD., Ing. Erika Korbelová

**Vydal:** Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum,

Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky

**Rok vydania:** 2015

Kontakt na autora: [hudcovicova@vurv.sk](mailto:hudcovicova@vurv.sk)

## Obsah

1. Úvod.....	4
2. Vlastná metodika.....	8
2.1. Izolácia DNA.....	8
2.2. Detekcia DNA markerov pre alely <i>tm-2</i> a <i>Tm-2</i> .....	10
2.2.1. Amplifikácia PCR produktov.....	10
2.2.2. Separácia a vizualizácia PCR produktov.....	12
2.2.3. Vyhodnotenie výsledkov.....	13
2.3. Detekcia DNA markera pre alely génu <i>L<sup>3</sup></i> .....	15
2.3.1. Amplifikácia PCR produktov.....	15
2.3.2. Separácia a vizualizácia PCR produktov.....	17
2.3.3. Vyhodnotenie výsledkov.....	19
3. Záver.....	21
4. Zoznam použitej literatúry.....	22

## 1. Úvod

Tobamovírusy ako tomato mosaic virus (*ToMV*), tobacco mosaic virus (*TMV*), pepper mild mottle virus (*PMMoV*) a paprika mild mottle virus (*PaMMV*) spôsobujú výrazné straty na úrode rajčiaka a papriky ovplyvňovaním ich rastu a kvality plodov. Celosvetové rozšírenie týchto vírusov vyplýva z ich vysokej infekčnej schopnosti, sú veľmi ľahko mechanicky prenosné, mnohé aj semenami, prežívajú v pôde v rastlinných zvyškoch aj niekoľko rokov a sú stabilné aj za nepriaznivých podmienok prostredia. Dôležitá je preto tvorba nových rezistentných genotypov rastlín, a to najmä využitím génov rezistencie pochádzajúcich z divých príbuzných kultúrnych plodín. Selekcia rezistentných línií sa vykonáva inokuláciou patogénom a následnou vizuálnou selekciou rastlín, ktoré nemajú špecifické symptómy. Tento proces je zdĺhavý a prácny a výsledky môžu byť ovplyvnené enviromentálnymi faktormi a rastovým štádiom rastlín. Proces šľachtenia môže byť výrazne urýchlený a spresnený markermi podporenou selekciou (MAS), teda požitím molekulárnych markerov viazaných ku génom rezistencie. V prípade rajčiaka a papriky boli DNA

markery úspešne použité pri selekcii na rezistenciu voči rôznym ochoreniam (Foolad & Sharma 2005; Yang *et al.* 2012).

Rezistenciu odrôd rajčiaka (*Lycopersicon esculentum* L.) voči ToMV ovplyvňuje prítomnosť resp. neprítomnosť génov rezistencie, ktoré boli prenesené z divých druhov rajčiaka (Pelham 1966; Hall 1980) :

- *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum* - gén *Tm-1*
- *Lycopersicon peruvianum* L. - gény *Tm-2*, *Tm-2<sup>2</sup>*

Gén *Tm-1* zabezpečuje rezistenciu voči ToMV kmeňu 0 a 2 (Ohmori *et al.* 1996; Levesque *et al.* 1990). Gény *Tm-2* a *Tm-2<sup>2</sup>* sú považované za alelické a alela *Tm-2* zabezpečuje rezistenciu voči ToMV kmeňu 0 a 1, zatiaľ čo alela *Tm-2<sup>2</sup>* zabezpečuje rezistenciu voči ToMV kmeňu 0, 1 a 2 (Hall 1989; Lanfermeijer *et al.* 2003). V rajčiaku boli oskvenované tri alely *Tm-2*, *Tm-2<sup>2</sup>* a *tm-2* (senzitívna) (GenBank accessions AF536199, AF536200, AF536201) a na ich rozlíšenie boli vyvinuté CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) markery (Lanfermeijer *et al.* 2005). Neskôr Shi *et al.* (2011) vyvinuli štyri alelicky špecifické PCR markery pre *Tm-2*, *Tm-2<sup>2</sup>*, a dva pre senzitívnu alelu *tm-2*. Vyvinuli aj tri špecifické SNP markery pre detekciu rezistentných alel *Tm-2* a *Tm-2<sup>2</sup>*.



Rezistenciu voči tobamovírusom v paprike (rod *Capsicum*) zabezpečuje *L* lokus, v ktorom je známych päť alel (Tomita *et al.* 2011):

- alela  $L^0$  – senzitívna
- alela  $L^1$  identifikovaná v *Capsicum annuum* L. (e.g. cv. Bruinsma Wonder and Verbeterde Glas) – zabezpečuje rezistenciu voči TMV patotypu  $P_0$
- alela  $L^2$  identifikovaná v *Capsicum frutescens* L. (cv. Tabasco)- zabezpečuje rezistenciu voči patotypu  $P_0$  a voči PaMMV patotypu  $P_1$ , ktorý prekonáva  $L^1$  rezistenciu
- alela  $L^3$  identifikovaná v *Capsicum chinense* Jacq. (PI159236)- zabezpečuje rezistenciu voči patotypu  $P_0$ ,

P<sub>1</sub> a voči PMMoV patotypu P<sub>1,2</sub>, ktorý prekonáva L<sup>2</sup> rezistenciu,

- alela L<sup>4</sup> identifikovaná v *Capsicum chacoense* Hunz. (PI260429) - zabezpečuje rezistenciu voči patotypu P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>1,2</sub>, a voči PMMoV patotypu P<sub>1,2,3</sub>, ktorý prekonáva L<sup>3</sup> rezistenciu



Neskôr bol identifikovaný patotyp P<sub>1,2,3,4</sub> vírusu PMMoV, ktorý prekonáva L<sup>4</sup> rezistenciu (Antignus *et al.* 2008; Genda *et al.* 2007). Vyvinuté boli rôzne molekulárne markery viazané k L lokusu, napr. RAPD (Sugita *et al.* 2004), AFLP (Tomita *et al.* 2008), SCAR odvodené z RAPD a AFLP markerov (Kim *et al.* 2008; Matsunaga *et al.* 2003), a SNP (Yang *et al.* 2009; Yang *et al.* 2011).

Detekcia DNA markerov viazaných ku génom rezistencie rajčiaka jedlého a papriky ročnej voči TMV (Tobacco Mosaic Virus), ToMV (Tomato Mosaic Virus) a PMMoV (Pepper Mild Mottle Virus) a overenie ich funkčnosti pre selekciu v procese šľachtenia rezistentných genotypov.

Overenie funkčnosti DNA markerov viazaných ku génom rezistencie a ich zavedenie do procesu selekcie šľachtiteľského materiálu umožní vyššiu efektívnosť tvorby nových genotypov rajčiaka jedlého a papriky ročnej odolných voči tobamovírusom.

## 2. Vlastná metodika

### 2.1. Izolácia DNA

Z rastlín rajčiaka a papriky sa odoberie cca 0,05 - 0,1 g čerstvých mladých listov, ktoré sa homogenizujú v plastových skúmavkách o objeme 1,5 ml pomocou tekutého dusíka, malého množstva sterilizovaného morského piesku a sklenej tyčinky. Následne sa DNA izoluje pomocou kitu Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen):



1. pridať 400  $\mu$ l Buffer AP1 a 4  $\mu$ l Rnase A. Vortexovať a inkubovať 15 min pri 65°C. Prevrátiť 2-3 krát počas inkubácie.
2. pridať 130  $\mu$ l Buffer AP2. Premiešať a inkubovať 5 min na ľade. Centrifugovať 5 min pri 14000 rpm.
3. prepipetovať lyzát – roztok do QIAshredder Mini spin column s 2 ml skúmavkou (cca 400  $\mu$ l) . Centrifugovať 2 min pri 14000 rpm.
4. premiestniť tekutú frakciu do novej 2 ml skúmavky bez zvierania sedimentu. Pridať 1.5 objemu (teda 600 $\mu$ l) Buffer AP3/E, premiešať pipetovaním.
5. premiestniť 650  $\mu$ l zmesi do Dneasy Mini spin column s 2 ml skúmavkou tube. Centrifugovať 1 min pri viac ako 8000 rpm. Roztok vyliť. Opakovať tento krok so zostávajúcou vzorkou.
6. umiestniť spin column (filter) do novej 2 ml skúmavky. Pridať 500  $\mu$ l Buffer AW, centrifugovať 1 min pri viac ako 8000 rpm. Roztok vyliť.
7. pridať znovu 500  $\mu$ l Buffer AW. Centrifugovať 2 min pri 14000 rpm. Upozornenie: odstrániť filter zo skúmavky tube opatrne tak aby sa filter nedotkol roztoku.

8. premiestniť filter do novej 1,5 ml skúmavky, pridať 100  $\mu$ l Buffer AE na vyplavenie DNA. Inkubovať 5 min pri izbovej teplote. Centrifugovať 1 min pri viac ako 8000 rpm. Tento krok zopakovať.

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA sa kontroluje spektrofotometricky pomocou prístroja Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc.). Následne sa vzorky nariaďia na rovnakú výslednú koncentráciu 20 ng/ $\mu$ l a uskladnia sa v mrazáku alebo hlbokomraziacom boxe.

## **2.2. Detekcia DNA markerov pre alely *tm-2* a *Tm-2***

### **2.2.1. Amplifikácia PCR produktov**

Prítomnosť alebo neprítomnosť senzitivnej alely *tm-2* v rajčiaku jedlom sa deteguje dominantným alelicky špecifickým PCR markerom, ktorý sa amplifikuje pomocou dvoch párov primer - Tm2S-f1/Tm2S-r1 a Tm2S-f2/Tm2S-r2 navrhnutých z nukleotidovej sekvencie GenBank accessions AF536199 (Shi et al 2011). Prítomnosť alebo neprítomnosť rezistentnej alely *Tm-2* sa deteguje dominantným alelicky špecifickým PCR

markerom, ktorý sa amplifikuje pomocou páru primerov Tm2R-f1c/Tm2R-r3 navrhnutých zo sekvencií GenBank accessions AF536200 a AF536201 (Shi et al., 2011).

Názov primeru	Sekvencia (5' -> 3')	Tm (°C)
Tm2S-f1	CAGTGATCCGAGTGAGCAAA	60
Tm2S-r1	TTCCGATAAACTGATCCGC	60
Tm2S-f2	CTCCTTCTGGTGTGGGA	60.1
Tm2S-r2	CAGAACCTTAGCGCCTTG	60
Tm2R-f1c	CTCCTTCTGGTGTGGGAG	59.7
Tm2R-r3	CGGTCTACCGTAAAGTTGGC	59.6

Polymerázové reťazové reakcie (PCR) – amplifikácie PCR produktov sa uskutočňujú na prístroji PTC-200 thermal cycler (MJ-Research).

Zloženie 25 µl PCR reakčnej zmesi:

- 1 × PCR pufo (Invitrogen™),
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen™),
- 0,5 µM každého primeru (forward a reverse),
- 0,2 mM dNTP (Invitrogen™),
- 0,6 U of *Taq* DNA polymeráza (Invitrogen™),
- 1 µl template DNA.

Podmienky PCR pre páry primerov - Tm2S-f1/Tm2S-r1 a Tm2S-f2/Tm2S-r2:

- úvodná denaturácia pri 94°C, 4 min.
- 36 cyklov :
  - 94°C, 15 s.
  - 56°C, 25 s.
  - 72°C, 40 s.
- záverečný krok : 72°C, 5 min.

Podmienky PCR pre pár primerov - Tm2R-f1c/Tm2R-r3:

- úvodná denaturácia pri 94°C, 4 min.
- 36 cyklov :
  - 94°C, 20 s.
  - 56°C, 25 s.
  - 72°C, 55 s.
- záverečný krok : 72°C, 5 min.

### 2.2.2. Separácia a vizualizácia PCR produktov

Po ukončení amplifikácie sa nanese 20 µl reakčnej zmesi do 1,5% agarózového gélu s pridanou farbičkou GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Nasleduje elektroforetická

separácia amplifikovaných fragmentov v horizontálnych elektroforetických aparatúrach GNA-100 a GNA-200 (Pharmacia-Biotech) v tlmivom systéme TBE (90 mmol.l<sup>-1</sup> TRIS-HCl, pH 8,0; 90 mmol.l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8,0). Separácia prebieha pri 2-4 V/cm dĺžky gélu. Ako štandard veľkosti DNA fragmentov sa používa DNA  $\lambda$ -fágu štiepená s *EcoRI* a *HindIII*. Fragmenty sa detegujú na UV lampe (Pharmacia-LKB) pri 254 nm a zaznamenajú sa vo fotografickej forme.

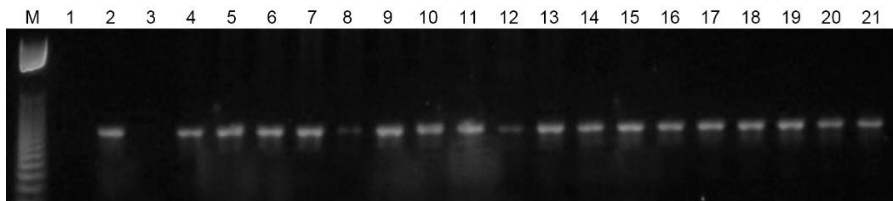
### 2.2.3. Vyhodnotenie výsledkov

Odrody rajčiaka Moperou a Monalbo sa používajú ako kontrolné genotypy nesúce rezistentnú alelu *Tm-2* resp. senzitívnu alelu *tm-2*. Jednotlivé páry primerov použité pre detekciu týchto alel amplifikujú fragment DNA v genotypoch, ktoré nesú alelu v homozygotnom aj heterozygotnom stave. Jednotlivo teda nedokážu rozlíšiť homozygotov od heterozygotov, avšak kombinácia týchto dominantných markerov – jedného pre senzitívnu alelu a druhého pre rezistentnú alelu to umožňuje.

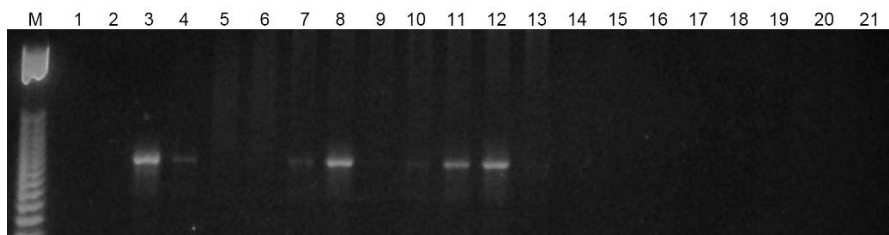
Amplifikujú sa tri typy fragmentov :

- fragment s veľkosťou 393 bp pre senzitívnu alelu *tm-2* amplifikovaný pomocou primerov Tm2S-f1/Tm2S-r1 (obr. 1),
- fragment s veľkosťou 284 bp pre senzitívnu alelu *tm-2* amplifikovaný pomocou primerov Tm2S-f2/Tm2S-r2,
- fragment s veľkosťou 444 bp pre rezistetnú alelu *Tm-2* amplifikovaný pomocou primerov Tm2R-f1c/Tm2R-r3 (obr. 2).

Obr. 1. Amplifikovaný fragment s veľkosťou 393 viazaný k senzitívnej alele *tm-2* v rajčiaku jedlom (M – štandard veľkosti, 1 – negatívna kontrola, 2 – cv. Monalbo, 3 – cv. Moperou, 4-21 – testované šľachtiteľské línie rajčiaka)



Obr. 2. Amplifikovaný fragment s veľkosťou 444 bp viazaný k rezistentnej alele *Tm-2* v rajčiaku jedlom (M – štandard veľkosti, 1 – negatívna kontrola, 2 – cv. Monalbo, 3 – cv. Moperou, 4-21 – testované šľachtiteľské línie rajčiaka)



## 2.3. Detekcia DNA markera pre alely génu *L<sup>3</sup>*

### 2.3.1. Amplifikácia PCR produktu

Prítomnosť rezistentnej a senzitivnej alely génu *L<sup>3</sup>* v paprike ročnej sa deteguje kodominantnými SCAR markermi PMFR11<sub>269</sub> a PMFR11<sub>283</sub>, ktoré sú odvodené z RAPD markerov E18<sub>272</sub> a E18<sub>286</sub>, a ktoré sa amplifikujú pomocou páru primerov PMF1/PMR1 (Sugita *et al.* 2004).

Názov primeru	Sekvencia (5' -> 3')
PMF1	CTGCAGAACAAATGGCACG
PMR1	GGA CTGCAGAGGAGGAAGC

Polymerázové reťazové reakcie (PCR) – amplifikácie PCR produktov sa uskutočňujú na prístroji PTC-200 thermal cycler (MJ-Research).

Zloženie 20  $\mu$ l PCR reakčnej zmesi:

- 1  $\times$  PCR pufor (Invitrogen™),
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen™),
- 0,2  $\mu$ M každého primeru (forward a reverse),
- 0,2 mM dNTP (Invitrogen™),
- 1 U of *Taq* DNA polymeráza (Invitrogen™),
- 1  $\mu$ l template DNA.
- 

Podmienky PCR pre pár primerov - PMF1/PMR1 :

- úvodná denaturácia pri 95°C, 1 min.
- 35 cyklov :  
94°C, 30 s.  
55°C, 20 s.  
72°C, 40 s.
- záverečný krok : 72°C, 7 min.



### 2.3.2. Separácia a vizualizácia PCR produktov

Po ukončení amplifikácie sa produkty separujú v 6% polyakrylamidovom géli (31 cm x 38 cm x 0,4 mm) denaturovanom močovinou.

Príprava gélového roztoku :

- 11 ml 40 % akrylamid/bis (19 : 1)
- 3 ml 10 x TBE (107,8 g Tris - bázy, 7,44 g EDTA a 55 g kyseliny boritej v 1 litri roztoku, pH 8,3)
- 12 ml vody
- doplniť horúcim roztokom močoviny na objem 60 ml
- pridať 50  $\mu$ l TEMED a 500  $\mu$ l 10 % persíranu amónneho

Po naliatí a polymerizácii gélového roztoku sa gélový povrch zahreje pri 40 W na teplotu približne 50 °C.

Príprava vzoriek DNA :

- K 5  $\mu$ l PCR vzorky pridať v pomere 1 : 0,8 tlmivý roztok (4,8 g močoviny, 10 ml vody, 0,05 g

brómfenolovej modrej, 10  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$   
hydroxidu sodného)

- Vzorky denaturujeme zahriatím na 100°C, 2 min.  
a ihneď preniesieme do ľadu.

Do gélu nanášame 5  $\mu\text{l}$  pripravených vzoriek. Do prvej línie každého gélu nanášame 4,5  $\mu\text{l}$  STR 3X roztoku (marker) obsahujúceho 10  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaOH, 95% formamid, 0,05% brómfenolovej modrej, 0,05% xylén cyanol FF. Separácia amplifikovaných produktov prebieha v elektroforetickej aparátúre SCIE-PLAS pri 40 W v tlmivom systéme 0,5 x TBE 3-4 hodiny. Po ukončení elektroforetickej separácie oddelíme sklenené platne a gél fixovaný na malej sklenej platni farbíme striebrom.

Farbenie DNA striebrom podľa Bassama et al. (1991) :

- sklenú platňu s gélom ponoríme do fixačného roztoku 10 % kyseliny octovej minimálne na 20 min. za intenzívneho premiešavania pri laboratórnej teplote
- premyjeme 2-3 krát v ultračistej vode po 5 minút

- ponoríme do čerstvo pripraveného farbiaceho roztoku (2 g dusičnan strieborný, 3 ml 37 % formaldehydu a 2 000 ml vody) na 30 minút a znova intenzívne premiešavame
- v chladiacej miestnosti preložíme gél do vody maximálne na 10 – 15 sekúnd a intenzívne vymývame
- gél preložíme do nádoby s vývojkou a po 2-10 min. sa objavia DNA fragmenty
- gél preniesieme do fixačného roztoku a nakoniec sušíme pri laboratórnej teplote.

Ako štandard veľkosti DNA fragmentov sa používa DNA  $\lambda$ -fágu štiepená s *EcoRI* a *HindIII*. Fragmenty sa detegujú na lampe (Hoefer Macro Vue VIS-45) a zaznamenajú sa vo fotografickej forme.

### 2.3.3. Vyhodnotenie výsledkov

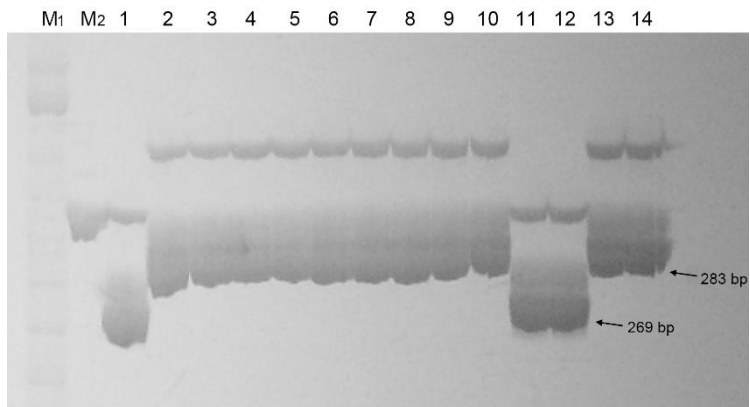
Amplifikujú sa dva typy fragmentov (obr. 3) :

- fragment s veľkosťou 283 bp (PMFR11<sub>283</sub>) pre senzitivnu alelu génu  $L^3$

- fragment s veľkosťou 269 bp (PMFR11<sub>269</sub>) pre rezistentnú alelu génu  $L^3$

Odroda papriky Hurricane sa používa ako kontrolný genotyp nesúci rezistentnú alelu génu  $L^3$ . Odrody papriky Piperade a Yolo wonder sa požívajú ako kontrolné senzitivne genotypy. Použité kodominantné markery amplifikované pomocou páru primerov PMF1/PMR1 rozlišujú homozygotov od heterozygotov.

Obr. 3. Fragменты DNA амплификованые в паприке ро́чной – 283 bp вязаный к сензитивней аэле гёну  $L^3$  а 269 bp вязаный к резистентней аэле гёну  $L^3$  (M1 а M2– стандарты ве́лкости, 1-11 – тестованые ш́лэхтител́ские л́иние паприки, 12 – cv. Hurricane, 13 – cv. Yolo Wonder, 14 – cv. Piperade)



Sugita *et al.* (2004) však zistili obmedzenie použitia týchto markerov, nakoľko fragment PMFR11<sub>269</sub> nebol detegovaný v niektorých genotypoch papriky nesúcich gén rezistencie  $L^3$ . Príčinou môže byť iný zdroj génu  $L^3$  (iný než PI159236) alebo rekombinácia medzi markerom PMFR11<sub>269</sub> a  $L^3$  génom.

### 3. Záver

V metodike použité DNA markery na detekciu génu rezistencie *Tm-2* voči *ToMV* kmeňu 0 a 1 v rajčiaku jedlom a na detekciu génu rezistencie  $L^3$  voči TMV patotypu P<sub>0</sub>, PaMMV patotypu P<sub>1</sub> a voči PMMoV patotypu P<sub>1,2</sub> v paprike ročnej sa môžu využiť v šľachtiteľských programoch. Tieto markery umožňujú identifikovať genotypy, ktoré by sa mohli použiť ako donory pre prenos efektívnych génov rezistencie voči tomabovírusom do elitných odrôd rajčiaka a papriky a zároveň umožňujú skríning stoviek krížencov na prítomnosť génov rezistencie v procese selekcie, čo značne urýchľuje tvorbu nových rezistentných odrôd. Zavedením týchto metodík sa zvyšuje konkurencieschopnosť slovenských šľachtiteľov v medzinárodnom meradle.

#### **4. Zoznam použitej literatúry**

ANTIGNUS, Y. - LACHMAN, O. - PEARLSMAN, M. - MASLENIN, L., AND ROSNER, A. 2008. A new pathotype of Pepper mild mottle virus (PMMoV) overcomes the L4 resistance genotype of pepper cultivars. In *Plant Disease.*, vol. 92, 2008, no. 7, pp. 1033-1037. DOI: 10.1094/PDIS-92-7-1033.

BASSAM, B.J. – CAETANO-ANOLLES, G. – GRESSHOFF, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. In *Analytical Biochemistry*, vol. 196, 1991, no. 1, pp. 80–83. DOI: 10.1016/0003-2697(91)90120-I.

FOOLAD, M. R. – SHARMA,, A. 2005. Molecular markers as selection tools in tomato Breeding. In *ISHS Acta Horticulturae*, vol. 695, 2005, pp. 225-240.

GENDA, Y. - KANDA, A. - HAMADA, H. - SATO, K. - OHNISHI, J. - TSUDA, S. 2007. Two amino acid substitutions in the coat protein of Pepper mild mottle virus are responsible for overcoming the L4 gene-mediated resistance in *Capsicum* spp.. In *Phytopathology*, vol. 97, 2007, no. 7, pp. 787-793. DOI: 10.1094/PHYTO-97-7-0787.

HALL, T. J. 1989. Resistance at the Tm-2 Locus in the tomato to Tomato Mosaic Virus. In *Euphytica*, vol. 29, 1989, no. 1, 1989, pp. 189-197. DOI: 10.1007/BF00037266.

LANFERMEIJER, F. C. – WARMINK, J. - HILLE, J. 2005. The Products of the Broken Tm-2 and the Durable Tm-2 Resistance Genes from Tomato Differ in Four Amino Acids. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, 2005, no. 421, pp. 2925-2933. DOI:10.1093/jxb/eri288.

LANFERMEIJER, F. C. - DIJKHUIS, J.- STURRE, M. J. G. - DE HAAN, P.- HILLE, J. 2003. Cloning and Characterization of the Durable Tomato Mosaic Virus Resistance Gene Tm-2 from *Lycopersicon esculentum*. In *Plant Molecular Biology*, vol. 52, 2003, no. 5, pp. 1037-1049. DOI: 10.1023/A: 1025434519282.

LEVESQUE, H. - VEDEL, F. – MATHIEU, C. - DE COURCEL, A. G. L. 1991. Identification of a Short Rdna Spacer Sequence Highly Specific of a Tomato Line Containing Tm-1 Gene Introgressed from *Lycopersicon Hirsutum*. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 80, 1990, no. 5, pp. 602-608. DOI: 10.1007/BF00224218.

KIM, H.J. – HAN, J.H. – YOO, J.H. – CHO, H.J. – KIM, B.D. 2008. Development of a sequence characteristic amplified region

marker linked to the L4 locus conferring broad spectrum resistance to Tobamoviruses in pepper plants. In *Molecules and Cells*, vol. 25, 2008, no. 2, pp. 205–210.

MATSUNAGA, H. – SAITO, T. – HIRAI, M. – NUNOME, T. – YOSHIDA, T. 2003. DNA markers linked to Pepper mild mottle virus (PMMoV) resistant locus (L4) in *Capsicum*. In *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 72, 2003, no. 3, pp. 218-220. DOI: XP008044666 ISSN: 0013-7626

OHMORI, T. – MURATA, M. - MOTOYOSHI, F. 1996. Molecular Characterization of RAPD and SCAR Markers Linked to the Tm-1 Locus in Tomato. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 92, 1996, no. 2, pp. 151-156. DOI: 10.1007/BF00223369.

PELHAM, J. 1966. Resistance in Tomato to Tobacco Mosaic Virus. In *Euphytica*, vol. 15, 1966, no.2, pp. 258-267. DOI: 10.1007/BF00022331.

SHI, A. - VIERLING, R. - GRAZZINI, R. - CHEN, P. - CATON H. - PANTHEE, D. 2011. Molecular Markers for Tm-2 Alleles of Tomato Mosaic Virus Resistance in Tomato. In *American Journal of Plant Sciences*, vol. 2, 2011, no. 2, pp. 180-189. DOI: 10.4236/ajps.2011.22020.



SUGITA, T. – YAMAGUCHI, K. – SUGIMURA, Y. – NAGATA, R. – YUJI, K. – KINISHITA, T. – TODOROKI, A. 2004. Development of SCAR markers linked to L3 gene in Capsicum. In *Breeding Science*, vol. 54, 2004, no. 2, pp. 111–115. DOI: 10.1270/jsbbs.54.111.

TOMITA, R. - MURAI, J. - MIURA, Y. - ISHIHARA, H. - LIU, S. - KUBOTERA, Y. - HONDA, A. - HATTA, R. - KURODA, T. - HAMADA, H. - SAKAMOTO, M. - MUNEMURA, I. - NUNOMURA, O. - ISHIKAWA, K. - GENDA, Y. - KAWASAKI, S. - SUZUKI, K. - MEKSEM, K. - KOBAYASHI, K. 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. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 117, 2008, no. 7, pp. 1107-1118. DOI: 10.1007/s00122-008-0848-6.

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. In *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 24, 2011, no. 1, pp. 108–117. DOI: 10.1094/MPMI-06-10-0127.

YANG, H.B. – LIU, W.Y. – KANG, W.H. – JAHN, M. – KANG, B.C. 2009. Development of SNP markers linked to the L locus in *Capsicum* spp. by a comparative genetic analysis. In *Molecular Breeding*, vol. 24, 2009, no. 4, pp. 433–446. DOI: 10.1007/s11032-009-9304-9.

YANG, H.B. – LIU, W.Y. – KANG, W.H. – KIM, J.H. – CHO, H.J. – YOO, J.H. – KANG, B.C. 2012. Development and validation of L allele-specific markers in *Capsicum*. In *Molecular Breeding*, vol. 30, 2009, no. 2, pp. 819–829. DOI 10.1007/s11032-011-9666-7.

