

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**

БИСТРА СТАНИШЕВА МИХАЙЛОВА

**ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ УСТОЙЧИВОСТТА НА
ПИПЕРА КЪМ КРАСТАВИЧНОМОЗАИЧНИЯ ВИРУС И
СЪЗДАВАНЕ НА ЛИНИИ С КОМПЛЕКСНА УСТОЙЧИВОСТ КЪМ
ИКОНОМИЧЕСКИ НАЙ-ВАЖНИТЕ БОЛЕСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“

**научна специалност
01.06.06 генетика**

**София
2016 г.**

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**

БИСТРА СТАНИШЕВА МИХАЙЛОВА

**ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ УСТОЙЧИВОСТТА НА
ПИПЕРА КЪМ КРАСТАВИЧНОМОЗАИЧНИЯ ВИРУС И
СЪЗДАВАНЕ НА ЛИНИИ С КОМПЛЕКСНА УСТОЙЧИВОСТ КЪМ
ИКОНОМИЧЕСКИ НАЙ-ВАЖНИТЕ БОЛЕСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на образователната
и научна степен „Доктор“**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ
проф., д-р Елисавета Стоименова**

**РЕЦЕНЗЕНТИ
проф. д-р Йордан Тодоров
доц., д-р Росица Родева**

**научна специалност
01.06.06 генетика**

**София
2016 г.**

Дисертационният труд е написан на 157 страници, в него са включени 14 таблици и 51 фигури. В списъка на цитираната литература са посочени 347 източника, от които 33 на кирилица и 314 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на лаборатория „Приложна генетика и растителни биотехнологии“, Изследователско направление „Молекулярна биология и генетика“ към Института по физиология на растенията и генетика, БАН, г. София.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на _____ от _____ часа в заседателната зала на ИФРГ, БАН, г. София ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2, на открито заседание на специализираното научно жури, назначено от Директора на ИФРГ, БАН със заповед № 443/21.04.2016 г. в състав:

1. проф., д-р Йордан Тодоров – ИЗК Марица, г.Пловдив
2. проф., д-р Елисавета Стоименова – ИФРГ, БАН, г. София
3. доц., д-р Маргарита Топашка – ИБЕИ, БАН, г. София
4. доц., д-р Виолета Кондакова – АБИ, г. София
5. доц., д-р Росица Родева – ИФРГ, БАН, г. София

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на ИФРГ, БАН, г. София, ул. „Акад. Г.Бончев“, бл. 21, ет. 2, стая 225.

Използвани съкращения:

ИАСАС – Изпълнителна агенция по семеконтрол, апробация и семепроизводство
НБПМКК – Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури
Фиг.1 пр. – Фигура 1 приложение
C. annuum – *Capsicum annuum*
C. chacoense – *Capsicum chacoense*
C. chinense – *Capsicum chinense*
C. frutescens – *Capsicum frutescens*
C. pendulum – *Capsicum pendulum*
C. pubescens – *Capsicum pubescens*
DAS-ELISA (double antibody sandwich - enzyme linked immunosorbent assay) - сандвич от две антитела - ензимо свързан имуно-сорбентен анализ
dpi (day post inoculation) - дни след заразяване
HR (hypersensitive reaction) - свръхчувствителна реакция
MDA - malondialdehyde
N. glutinosa – *Nicotiana glutinosa*
N. sylvestris – *Nicotiana sylvestris*
N. tabacum - *Nicotiana tabacum*
ORF (open reading frame) – отворена рамка за четене
QTL (quantitative trait locus)
ROS- reactive oxygen species
S. lycopersicum – *Solanum lycopersicum*

Патогени:

CMV - Cucumber mosaic virus
PaMMV - Paprika mild mottle virus
PMMoV - Pepper mild mottle virus
TMV - Tobacco mosaic virus
ToMV – Tomato mosaic virus
P.capsici - *Phytophthora capsici*

**В памет на член-кореспондент,
доктор на биологическите науки
СТЕФАН ДАСКАЛОВ**

УВОД

Пиперът е една от най-важните зеленчукови култури, като в страната се отглеждат предимно български сортове сладък и лют пипер, които имат много добри вкусови качества, високо съдържание на сухо вещество и са подходящи както за прясна консумация, така и за преработка. Обаче, либерализацията на търговията увеличи драстично вноса на евтина земеделска продукция, в резултат производството на пипер след 2004 г. намалява над три пъти. Липсата на ефективно сортоподдържане и семепроизводство на кръстосаноопрашваща се култура като пипера, води до изместване на ценни български сортове от вносни, които ги превъзхождат по добив, но отстъпват по вкусови и хранителни качества. Друга причина за намаляване дела на българските сортове пипер в производството е факта, че те са чувствителни на CMV, тобамовируси и *P. capsici*, причиняващи икономически най-важните болести при тази култура. Болестите по културни растения са основен проблем при отглеждане и получаване на екологично чиста продукция за прясна консумация и промишлена преработка. Здравето на хората и от там качеството на живота им се определят в много голяма степен от здравословното хранене, което задължително включва консумирането на екологично чисти храни. Използването на устойчиви на болести сортове повишава икономическата конкурентноспособност на селскостопанските производители, което е изключително важно за стабилно, екологично чисто земеделско производство и за опазване на околната среда.

Настоящите изследвания отговарят на необходимостта от създаване на линии пипер с типичните за страната стопански характеристики, но притежаващи комплексна устойчивост на икономически най-важните болести.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Цел на настоящето изследване е установяване на източници и генетичния контрол на устойчивостта към CMV при пипера, и създаване на линии, притежаващи ценни стопански качества и комплексна устойчивост към икономически най-важните болести.

За реализацията на така поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Идентифициране на източници на устойчивост към CMV и създаване на неразпадащи по признака линии пипер.
2. Установяване на генетичния контрол на устойчивост към CMV и тобамовируси в новите линии пипер.
3. Пирамидизиране на устойчивостта към CMV, тобамовируси и *P. capsici* в няколко генотипа пипер.
4. Създаване на линии пипер тип капия, притежаващи комплексна устойчивост към икономически най-важните болести и добри стопански качества, които се различават по морфологични и биохимични показатели на плодовете.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Материал

1.1. Вируси и вирусни щамове

В експериментите са използвани 11 щамове от 4 тобамовируса и 4 щамове CMV. Страната и културата от която са изолирани, както най-важните характеристики са показани в Таблица 1. За тестиране на пипера са прилагани различни щамове, тъй като винаги съществува възможност при използването на един щам да се получи щамовоспецифична реакция или устойчивост. Определен е патотипа на всички

Табл. 1. Биологични свойства на използваните вирусни щамове

щам	стра на	вирус	изолиран от:	наличие на инфекция и симптоми на:					пато-тип*	№ на щама**
				N.tabascum Самсун NN	N.tabascum Самсун N'N'	N.tabascum Самсун	домати сорт. Идеал	пипер сорт Албена		
B	BG	TMV	пипер	H	3M	3M, ПР	3M	3M, ПР, ДП, ПП	2022	P0
№29	BG	ТоMV	пипер	H	H	3M, ПР	3M	3M, ПР, ДП, ПП	3297	P0
ТоGM	BG	ТоMV	тютюн	H	H	3M, ПР	3M	3M, ПР, ДП, ПП	3296	P0
GM-0	BG	ТоMV	домати	H	H	3M, ПР	3M	3M, ПР, ДП, ПП	2078	P0
P ₁₀₁	BG	РАММV	пипер	H	БС, ЛИЗЛ	БС, ЛИЗЛ	БС, СИ	МЗМ	2115	P1
P ₁₁	NI	РАММV	пипер	H	БС, ЛИ	БС, ЛИ	БС, ЛИ	МЗМ	2234	P1
№8	BG	РММов	пипер	H	БС, ЛИ	БС, ЛИ	БС, ЛИ	МЗМ	-	P1.2
РММов-S	ES	РММов	пипер	H	БС, ЛИ	БС, ЛИ	БС, ЛИ	МЗМ	3997	P1.2
GP2	ES	РММов	пипер	H	БС, ЛИ	БС, ЛИ	БС, ЛИ	МЗМ	3403	P1.2
РММов-I	IT	РММов	пипер	H	БС, ЛИ	БС, ЛИ	БС, ЛИ	МЗМ	3998	P1.2.3
GP3	ES	РММов	пипер	H	БС, ЛИ	БС, ЛИ	БС, ЛИ	МЗМ	3404	P1.2.3
CMV-PB	BG	CMV	пипер	3M, ПР, ДП	3M, ПР, ДП	3M, ПР, ДП	СЦ, ПП, ДП, ПП	Н, Ж, В, ДП, ПП	2156	-
CMV-MB	BG	CMV	домати	3M, ПР	3M, ПР	3M, ПР	СЦ, ПП, ДП, ПП	Н, Ж, ПР, ДП, ПП	2296	-
CMV-TB	BG	CMV	тютюн	3M, ПР, ДП	3M, ПР, ДП	3M, ПР, ДП	СЦ, ПП, ДП, ПП	Н, Ж, В, ДП, ПП	3298	-
CMV-CB	BG	CMV	красавици	3M, ПР, ДП	3M, ПР, ДП	3M, ПР	СЦ, ПП, ДП, ПП	Н, Ж, ПР, ДП, ПП	3299	-

BG – България, ES – Испания, IT – Италия, NI – Холандия, P – патотип, H – некрози, 3M – зелена мозайка, МЗМ – мека зелена мозайка, Ж – жълтеене, ПП – папратовидни листа, ДП – деформация на листата, ПР – потискане на развитието, В – вджуджаване, СЦ – стерилни цветове, ПП – прошарване на плодовете, ДП – деформация на плодовете, ЛИ – липса на инфекция, БС – липса на симптоми, ЛИЗЛ – локална инфекция в заразен лист, СИ – системна инфекция.

* При пипера, устойчивостта срещу тобамовирусите се управлява от алегна серия гени на локуса L в следния ред на доминиране: L4>L3>L2>L1>L+. Tobamovirusните щамове, заразяващи пипера са класифицирани в 4 субгрупи като патотипове с намаляваща патогенност P1.2.3>P1.2>P1>P0, на базата на тяхното взаимодействие със съответния алег на гена L. Вирусите от P0 предизвикват НР при всички растения L1-L4 и заразяват системно чувствителен L⁺ пипер; тези от патотип P1 преодоляват устойчивостта на гена L1 и индуцира НР при растения с гени L2-L4; вирусите, принадлежащи към патотип P1.2 заразяват системно L1 и L2 растения, но се локализира при L3 и L4 растения; а тези от патотип P1.2.3 заразяват системно пипери с гени L1-L3, предизвиквайки НР само в L4 растения. Щамове TMV и ТоMV принадлежат към патотип P0, щамове от РаММV са от патотип P1, а щамове от РММов са от патотип P1.2 или P1.2.3..

** регистрация на щама в НБПМКК,

тобамовируси, като е използвана схема от генотипи пипер, притежаващи съответните алелни гени за устойчивост към тобамовируси.

1.2. Растителен материал

C. annuum сорт Албена (L+) сорт Tisana (ген L1), *C. frutescens* сорт Tabasco (ген L2) и дивите видове *C. chinense* PI 159236 (ген L3) и *C. chacoense* PI 260429 (ген L4), притежаващи съответните гени за устойчивост към тобамовируси, както и *N. tabacum* линии Самсун, Самсун N'N', Самсун NN и *S. lycopersicum* сорт Идеал се използват за размножаване на тобамовируси и проверка чистотата на получените препарати (Табл. 2). В селекционната програма са прилагани линии Алфи и Залфи, като източник на устойчивост към *P. capsici* и унгарския сорт Novaris, устойчив на тобамовируси. Родителските генотипи, притежаващи ценни стопански качества, в които се интродуцира устойчивост към CMV, тобамовируси и *P. capsici* са линиите Златен медал ms-8, OKal, Алфи и Залфи. Стандартни сортове са изброените родителски генотипи пипер и сортовете Албена, Златен медал и Куртовска капия.

2. Методи

2.1 Размножаване и получаване на пречистени препарати на тобамовируси.

Тъй като тобамовирусите се разпространяват по механичен път, се прилагат специални мерки за предотвратяване на контаминацията от други щамове или вируси. Посочени са (Табл. 2) вирусните щамове и растителните видове, в които са размножавани. Щамовете от патотип P1 от PaMMV се размножават в пипер с ген L1, тези от P1.2 в пипер с ген L2 и щамове от P1.2.3 в L3 от PMMoV. Препаратите се използват главно за установяване наличието на устойчивост към тобамовируси и идентифициране на гена за устойчивост в генотипи пипер. При размножаването на щам от патотип P1 в чувствителни на вируса сортове пипер, той винаги съдържа и тобамовируси от патотип P0, а след последователни пасажии изцяло се замества от тях (Иванова, 1982). Препаратът на щам от патотип P1.2, получен от пипер с ген L2, не може да съдържа щамове от патотип P0 и P1, но в него биха могли да има известни количества вириони от P1.2.3. За да се изключи тази възможност се осъществява проверка като се заразява пипер с ген L3. Ако препаратът е чист, то трябва да се наблюдават само некрози по локалните листа. Ако се появи мека мозайка по системните листа, то препаратът е замърсен с щамове от патотип P1.2.3 и трябва да се бракува. Препарати на тобамовируси са пречиствани по метода на Стоименова и Куновски авторско свидетелство (1986).

Табл. 2. Растения, в които се размножават вирусните щамове и с които се определя чистотата и инфекциозността на вирусните препарати или лиофилизиран растителен материал

Растения за размножаване	щамове	растения индикатори
<i>C. annuum</i> сорт Зл.медал (L+)	B	<i>N. tabacum</i> линия Самсун NN
<i>C. annuum</i> сорт Tisana (L1)	P ₁₀₁ , P ₁₁	<i>C. frutescens</i> сорт Tabasco
<i>C. frutescens</i> сорт Tabasco (L2)	PMMoV-S, №8, GP2	<i>C. chinense</i> PI 159236
<i>C. chinense</i> PI 159236 (L3)	PMMoV-I, GP3	<i>C. chacoense</i> PI 260429 (L4)
<i>S. lycopersicum</i> сорт Идеал	ToGM, №29, GM-0	<i>N. tabacum</i> линия Самсун N'N'
<i>N. tabacum</i> линия Самсун NN	CMV-PB, CMV-MB, CMV-TB, CMV-CB	<i>N. tabacum</i> линия Самсун NN

2.2 Размножаване и получаване на пречистени препарати и подготовка на инфекциозен материал на CMV.

CMV се размножава в тютюн сорт Самсун NN (устойчив на всички тобамовируси), като растенията във фаза 4-ти - 5-ти лист се инокулират с препарат на съответния щам на CMV. След появата на първите симптоми в интервал до 5 дни най-късно, се събират локалните листа и тези със симптоми, които или се подлагат на лиофилизация или от тях се получава пречистен препарат на CMV. Не могат да се използват листа от заразени със CMV растения с тежки симптоми или след дълъг период от поява на първите симптоми. Концентрацията и особено инфекциозността на CMV падат много бързо и тези листа не са подходящи за лиофилизация и съхраняване

на вируса. Пречистените препарати на CMV са получавани по метода на Takamami (1981) и се съхраняват след лиофилизация във фиалки, съдържащи 0.02 mg вирус. За масово тестиране на пипера вирусният инокулум е приготвен от лиофилизиран листен материал.

2.3. Подготовка на инокулум и механично заразяване с вирус. При механичното заразяване обикновено се натрива листна повърхност, предварително напудрена със стерилизиран карборунд 400-600 меш, с инокулум на вируса. Преди инокулирането в течение на 12 часа растенията се държат на тъмно, за да се повиши чувствителността им. Веднага след заразяването листата се промиват с вода и растенията не се излагат на слънце поне 24 часа след заразяване. Нанасянето на вируса се осъществява със стъклена щпатула, като инокулумът се втрива леко по цялата повърхност на листа, като той се поддържа от долу с хартиена лента, за да е в хоризонтално положение. Този начин на заразяване осигурява стерилност, предотвратява протриване на листа и икономисва инокулум. Основните различия при заразяване с тобамовируси и CMV, са свързани с начина на приготвяне на инокулума.

Инокулумът от тобамовируси се подготвя чрез разреждане на препарат на вируса с дестилирана вода до концентрация ~ 5µg/ml. CMV губи инфекциозност много бързо при стайна температура, затова инокулумът се прави *ex tempore* и е годен за използване в течение на 10 минути. Леофилизираните листа се хомогенизират в 10mM K-Na фосфатен буфер с pH 7.0 с добавени 0.01% Na₂SO₃ и 0.01% аскорбинова киселина, като се използват буфер, стерилни хапан и пестик, охладени до 4°. Хомогенизирането се осъществява винаги в малко количество буфер и след това се добавя останалата част от буфера до разреждане 1:5 (w:v). Отворените флакони с леофилизираните листа трябва да се използват същия ден, защото сухите листа бързо абсорбират влага и губят инфекциозност.

2.4. Приготвяне на инокулум и заразяване с *P. capsici*. За инокулиране с *P. capsici*, са използвани различни агресивни раси, изолирани от пипер, отглеждан на полето в района на Петрич, Горна Оряховица, и др. Всички раси на *P. capsici* са получавани от колеги от ИЗР, гр. Костинброд. *P. capsici* е размножавана в петриеви блюда (9 см) върху овесен агар. Седемдневната култура се смива с 200 мл дестилирана вода, инокулумът (мицелно-спорангиална суспензия) престоива в хладилник при 4°C за 12 часа. Когато инокулирането на растенията с гъбата се осъществява в разсадна фаза, почвата в съответният съд се полива с 400 ml инокулум (2 петриеви блюда). Когато се заразяват растения, разсадени на фитофторния участък, след вкореняването всяко растение се полива със 100 ml инокулум (1/2 петриево блюдо).

Тестирането на растенията за устойчивост към патогените и отборът по устойчивост и стопански качества за всеки от експериментите е посочен в раздел резултати и обсъждане.

2.5. Анализи

Разпространението на CMV в устойчивите на вируса линии пипер е установено с DAS-ELISA по Clark and Adams (1977). Използвани са специфични за CMV-PB заешки IgG в разреждане 1:1000 и техния конюгат с алкална фосфатаза в разреждане 1:500. Определено е количеството на витамин С, редуциращи захари, β-каротин, ликопен и сухото вещество в плодовете по ръководството на Станчев и др. (1978).

Изчислена е стандартната грешка на оценяваните параметри. Данните са анализирани, използвайки Duncan's multiple range test at P<0.05 with the statistical package STATISTICA 11.0 (Stat-Soft, Inc., USA).

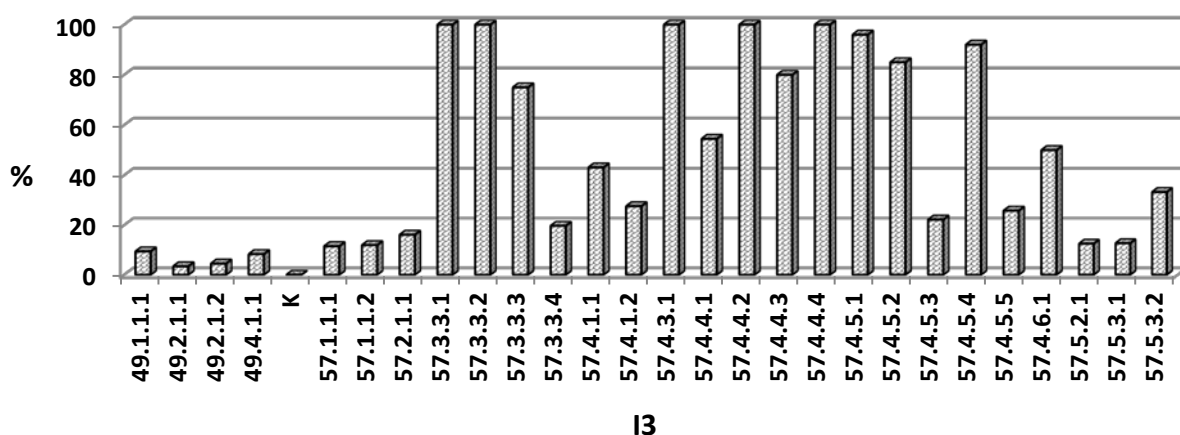
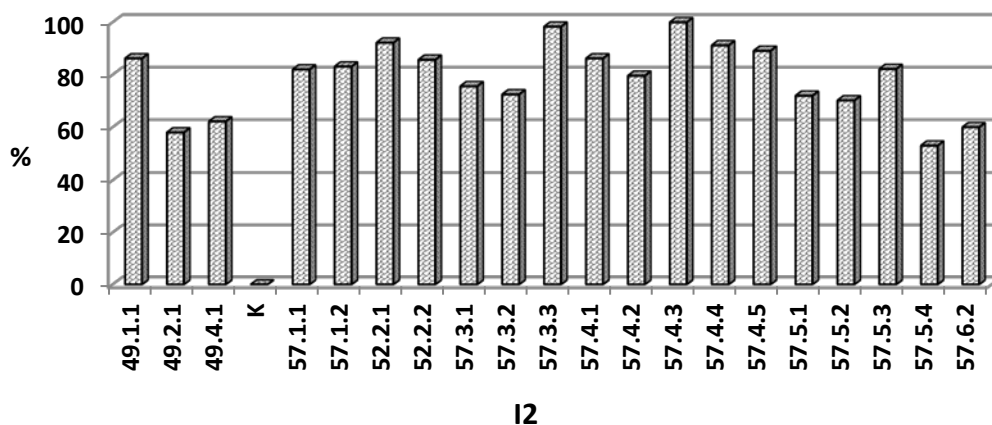
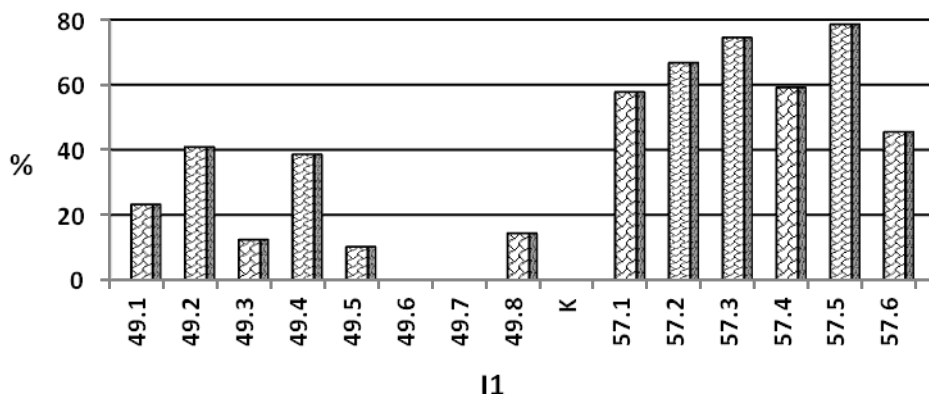
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Източници на устойчивост на CMV при пипера

1.1. Скрининг за устойчивост към CMV в местни форми пипер

Обследвайки зеленчукови градини, заразени в много висока степен (от 80 до 100%) от CMV в Горнооряховско, са събрани по 2-3 плода от видимо здрави растения

пипер. Получени са 78 проби от семена, всяка от тях, потомство на различно растение, които са тествани за наличие на устойчивост към CMV. Потомствата на 88,5% от растенията са чувствителни на вируса, в 7 има отделни здрави растения (под 5%) и само в два номера 49 (15.5%) и 57 (26.4%) е установен значим процент устойчиви растения. През следващите години е осъществен отбор по устойчивост към CMV.



Фиг. 1. Отбор по устойчивост към CMV в три поколения от самоопрашени потомства на № 49 и №57.

% - брой безсимптомни растения/общия брой заразени със CMV растения x 100, К – чувствителна на CMV контрола

Цветовите на здравите растения са самоопрашени и тяхното I1 потомство е заразено със CMV. Две I1 потомства на № 49 се оказват чувствителни на вируса, а броят на здравите растения в 4 потомства е от 10.2 до 23.2% и е по-нисък или близък до този на родителското растение I0 (Фиг. 1). Това е резултат от повишения инфекциозен натиск при второто тестиране, където растенията са заразени двукратно с интервал от 7 дни в сравнение с първото тестиране с еднократно инокулиране. Само при две потомства I1 49.2 (40.8%) и I1 49.4 (38.6%) се наблюдава реално повишаване процентът на устойчивите растения. След разсаждане на здравите растения, част от тях се разболяват. Достатъчно семена от самоопрашени плодове са получени само от 3 растения, които показват сравнително висок процент здрави растения в I2 (Фиг.1), но отново сред разсадените растения има заболели от краставична мозайка. Тестирането на I3 поколение съвпадна с период от няколко дни с дневни температури от 35⁰ C и процентът на здравите растения е по-нисък от този на I0 потомството на № 49. Това показва, че тази устойчивост зависи в значителна степен от инфекциозния натиск на вируса и се преодолява при по-високи температури, които не са рядкост в страната. Поради тази причина отборът по устойчивост в популацията на № 49 е преустановен.

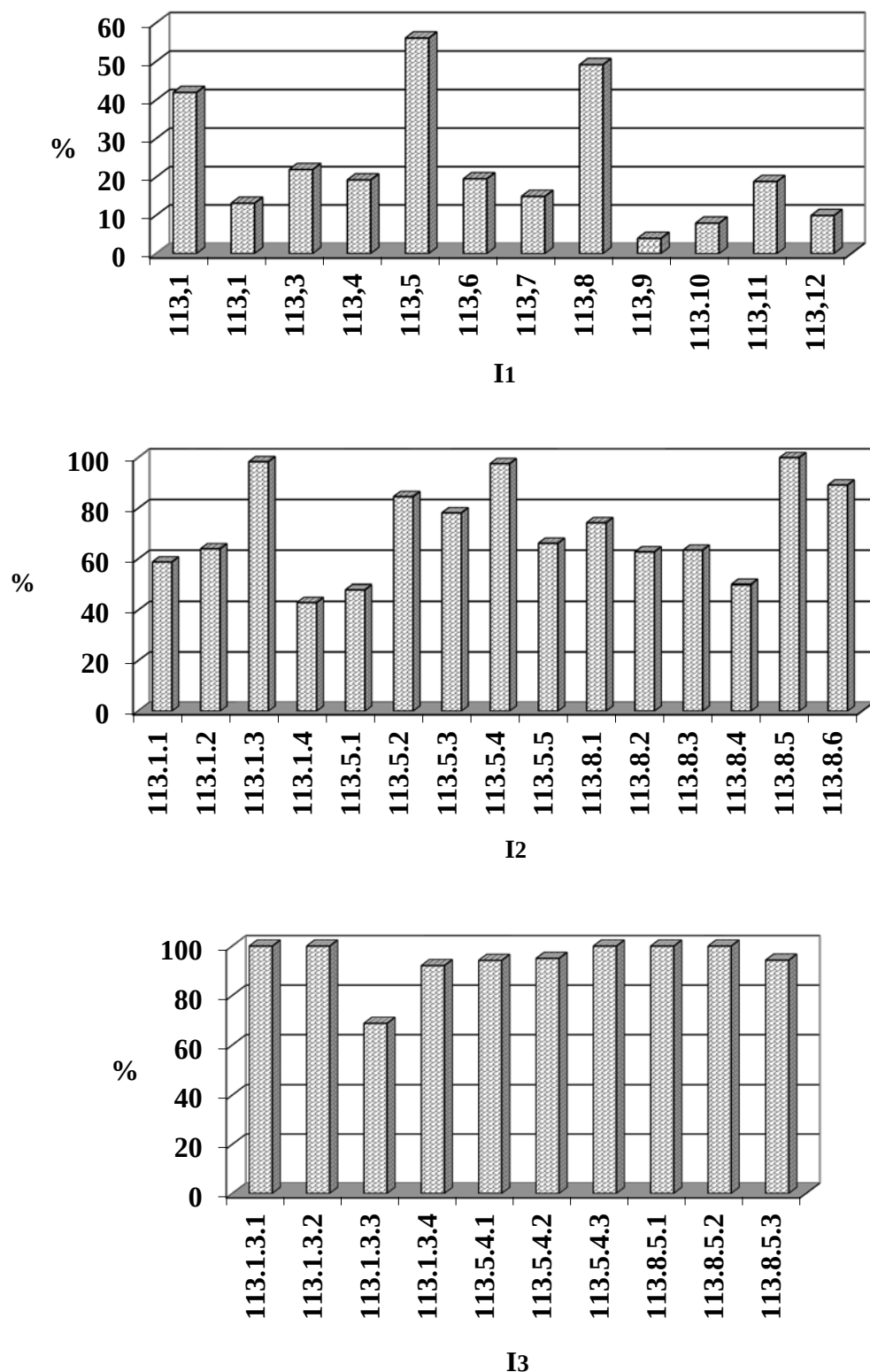
При отбора в № 57 са получени по-добри резултати, като % на здравите растения в I1 потомство е от 45.5 до 78.6%, а при I2 от 62 до 100% (Фиг. 1). Въпреки, че при разсадените I2 растения също има отделни болни растения, то се наблюдава общо повишаване на % здрави растения при всички тестирани потомства. Високите температури непосредствено след заразяването със CMV намаляват процента на здравите растения при част от I3 потомствата, но при 5 потомства (57.3.3.1, 57.3.3.2, 57.4.3.1, 57.4.4.2 и 57.4.4.4), всички растения остават здрави до края на отчитането, а тези които са разсадени също не се разболяват. Други две потомства 57.4.5.1 и 57.4.5.4 са с 96 и 94,2% здрави растения, но работа с тях е продължена, тъй като притежават и много добри стопански качества. През следващите две години е проследена устойчивостта към CMV в поколенията на тези 7 потомства, като здравите растения са 100% един месец след последното заразяване. Наблюдават се единични растения с меки мозаични симптоми, които се проявяват след формирането на 5-8 плода, т.е. към края на вегетацията. Отбрани са 15 бр устойчиви на CMV I5 потомства, които са оценени по стопански качества. От самоопрашени растения на 4 бр I5 потомства са събрани семена, които са получили името линия L57.

С напредване на отбора по устойчивост е установено, че инокулираните листа пожълтяват сравнително бързо и падат до 21 dpi. В годините, когато има дни след заразяването на растенията с дневна температура по-висока от 30⁰C, върху инокулираните листа се формират жълти петна и по-рядко концентрично разположени жълти пръстени. Тези листа много бързо пожълтяват и падат, а растенията остават видимо здрави до разсаждането. Част от тях обаче се разболяват по-късно, като се развиват типичните за краставичната мозайка симптоми без изразено вджуджаване на растенията. Появата, видът и размерите на петната зависят от температурата, като при по-висока температура се образуват по-ярки и по-големи петна. Редуването на дни с по-висока и по-ниска температура определя развитието на пръстеновидни петна.

1.2. Устойчивост към CMV в холандски селекционен материал.

Паралелно със скрининга по устойчивост към CMV на местни форми пипер, е тестирана и една проба семена от холандски пипер, който е получен от чл. кор., дбн С.Даскалов. От заразените със CMV над 200 растения, само 12 остават здрави и след самоопрашването им са получени семена (Фиг. 2). I1 потомството на 1-то, 5-то и 8-то растения показват от 42 до 56.1 % устойчиви на вируса растения и отборът продължава само при тях. През следващата година броят на здравите растения от 15 бр I2 потомства се повишава значително, като при три от тях 113.1.3 (98.4%), 113.5.4 (97.6%) и 113.8.5 (100%) са получени най-добри резултати и с тях е продължен отбора. От тестираните 10 бр I3 потомства само при едно е установен сравнително нисък процент здрави растения (68.8%), докато при останалите той е от 92.1% до 100%.

При заразените растения от I0, I1 и I2 потомства се наблюдават растения с безсимптомни, мозаични или некротични симптоми. С напредване на отбора, броят на



Фиг. 2. Отбор по устойчивост към CMV в три поколения от самоопрашени потомства на № 113.

% - брой безсимптомни растения/общия брой заразени със CMV растения x 100

растенията без симптоми и тези със системна некротизация се увеличават за сметка на растенията с мозайка. В I3 потомства преобладават здравите растения, а при останалите се развива системна некротизация, която понякога засяга растежния връх

и растенията загиват, а в други случаи се наблюдават некротични ивици по стъблото, отделни листа и/или клонки. В тези случаи останалите части на растението изглеждат видимо здрави, въпреки това тези растения се отчитат като болни.

При част от растенията в I2 и I3 потомствата върху инокулирания лист се образуват широки по-тъмнозелени пръстени по пожълтелите листа, като правило непосредствено преди окапването им. Върху тях обикновено от вътрешната страна се наблюдават тънки некротични пръстени или полукръгове, а в някои случаи се вижда и втори частичен или пълен некротичен пръстен, концентрично разположен спрямо първия пръстен. Размерите им варират в широки граници, като 2-3 пръстена могат да покрият от 1/3 до почти цялата листна петура. Рядко върху някои инокулирани листа се образуват по-дребни жълтозелени петна с тъмен пръстен в средата, който обикновено също некротизира преди окапването на листата. Обаче, тези петна се появяват още докато листата са все още зелени, т.е. няколко дни преди падането им. Развитието на системна некротизация и особено появата на некротични пръстени по инокулираните листа е показател за наличие на HR на растенията спрямо вируса. Тъй като HR е отличен диагностичен белег за наличие на устойчивост при вирусите и този тип устойчивост се счита за най-стабилна след имунитета, са отбирани растения с тази реакция. Постепенно, в резултат от този отбор, размерът на некрозите и времето, необходимо за тяхното появяване, намалява. Същото се отнася и за времето, нужно за падането на заразените листа.

През следващите две години е проследена устойчивостта към CMV в поколенията на 5-те потомства със 100% здрави растения. Съществени отклонения в този процент не са установени, но при отделни растения се наблюдават некротични ивици по стъблото, започващи от инокулирания лист и нарастващи в повечето случаи по посока на корена. В I5 са събрани семена от 3 поколения, които получават името линия L113.

Резултатите показват, че устойчивостта към CMV в № 113 се влияе в много по-малка степен от увеличения инфекциозен натиск на вируса и температурните условия на отглеждане на разсада, цъфтящи и плододоваци растения, в сравнение с №57.

2. Устойчивост на тобамовируси при линии пипер

Растенията от L57 (I6) и L113 (I6) във фаза 3-ти - 4-ти лист са заразени с щам В на TMV, за да се установи тяхната чувствителност към вируса. Всички растения от L57 се оказват чувствителни, докато тези от L113 са устойчиви на вируса. Особено изненадващ резултат от това тестиране е, че не се наблюдава разпадане по устойчивост към вируса при L113 въпреки, че отбор по устойчивост на тобамовируси не е провеждан.

За да се установи на кои тобамовируси е устойчив L113, е проведено заразяване с щамове на тобамовируси от различен патотип. В изследването са включени линия OKa1 и унгарския сорт Novaris, за който има сведения, че също притежава устойчивост към TMV (Табл. 3).

Табл. 3. Идентифициране на гени за устойчивост към тобамовируси в генотипи пипер

вирус линия	TMV В		ToMV №29		PaMMV P101		PMMoV GP2		PMMoV GP3		ген
	ЛЛ	СЛ	ЛЛ	СЛ	ЛЛ	СЛ	ЛЛ	СЛ	ЛЛ	СЛ	
OKa1	бс	м	бс	м	бс	мм	бс	мм	бс	мм	L+
L57	бс	м	бс	м	бс	мм	бс	мм	бс	мм	L+
L113	н	бс	н	бс	бс	мм	бс	мм	бс	мм	L1
Novaris	н	бс	н	бс	н	бс	н	бс	бс	мм	L3

ЛЛ – локални листа, СЛ – системни листа, бс – безсимптомни листа, м – мозайка, мм – мека мозайка, н - некрози

От литературата е известно, че пиперът, който се заразява системно от TMV е чувствителен на всички тобамовируси, разпространени по пипера и това се потвърждава от резултатите за L57 и OKa1, които се оказват чувствителни на

щамове от четирите патотипа. По листата на L113, инокулирани с TMV и ToMV щамове от патотип P0, се формират некротични петна, докато системните листа остават безсимптомни. Растенията, заразени с останалите щамове на тобамовирусите развиват мека мозайка, характерна за PaMMV и PMMoV. По локалните листа на сорт Novaris, инокулирани с щамове от патотип P0 (TMV B и ToMV №29) се появяват некротични петна 3-4 дни след заразяването, докато дребни некротични петна се развиват значително по-късно (5-7 dpi) по листата инокулирани с щам P₁₀₁ (PaMMV) от патотип P1 и щам GP2 (PMMoV) от патотип P1.2. Системните листа на тези растения остават безсимптомни до края на опита. Обаче, щам GP3 на PMMoV, който е от патотип P1.2.3 не предизвиква HR по локалните листа и заразява системно растенията от сорт Novaris, по които се развива мека зелена мозайка.

Известно е, че устойчивостта към тобамовируси при пипера се контролира от пет алелни гени разположени в локус L. Приложената схема на заразяване с щамове на тобамовируси с различен патотип позволява да се определи обхватът на устойчивостта към тези вируси в линия L113 и сорт Novaris.

От представените резултати следва, че L57 и OKal са чувствителни на всички тобамовируси, L113 е устойчив само на TMV (P0) и ToMV (P0) и чувствителен на останалите тобамовируси и вероятно притежава ген L1. Унгарският сорт Novaris е устойчив на всички щамове на TMV, ToMV и PaMMV (P1), и щамове от патотип P1.2 на PMMoV, но е чувствителен на тези от патотип P1.2.3. Тези резултати показват, че сорт Novaris би могъл да притежава ген L3.

3. Устойчивост на *P. capsici* при линии пипер

Различните произходи пипер, в които е доказана устойчивост към *P. capsici*, се различават в много висока степен по брой и локализацията на QTL-те, които я контролират. Доказано е, че наследяването може да е доминантно или рецесивно, а освен това са открити адитивни и епистатични взаимодействия. Едни от най-добре проучените гени са Phyt-2 и Phyt-5, картирани в хромозома 11, в клъстера където се намират гените за устойчивост към CMV и тобамовируси, съответно cmv 11.1 и алелната серия гени L.

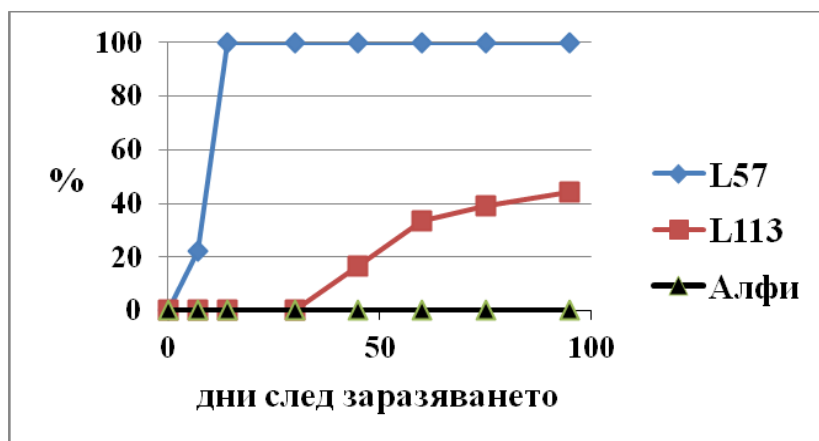
Установявайки, че в линия L113 гените, контролиращи устойчивостта към TMV, ToMV и CMV се наследяват като скачени гени, е решено да се изпитат двете линии устойчиви на CMV - L113 (I6) и L57 (I6) и за устойчивост към *P. capsici*. Като устойчива контрола са използвани линии Алфи и Залфи, а чувствителна контрола сорт Златен медал-ms.

Растенията са заразени в съдовете, където е отглеждан разсада. В чувствителната контрола и L57 на 10-я dpi са отчетени съответно 11 бр (22%) и 12 бр (24%) растения с почерняване и загиване на основата на стъблото и завяхване на листата, до 15-я dpi всички растения се разболяват. Първите две (4%) заболели растения от L113 се появяват на 45-я dpi и до края на опита (60-я dpi) се разболява още едно растение (6%). Останалите растения от L113 и всички растения от линии Алфи и Залфи остават здрави до края на опита. В резултат е потвърдено предположението, че L113 е устойчива на *P. capsici*, но L57 се оказва чувствителна на гъбата.

Проведен е втори опит, аналогичен на първия, но 10 дни след като всички растения от чувствителната контрола се разболяват, са разсадени по 12 здрави растения от L113, Алфи и Залфи в опитния участък. Целта е да се получат семена от доказано устойчиви на *P. capsici* растения от трите линии, които да се използват в опитите по създаване на линии пипер с комплексна устойчивост на болести. Всички разсадени растения от трите линии се разболяват от фитофтора в рамките на две седмици след разсаждането. Растенията, които не са разсадени и остават в съдовете, където са засяти, са здрави и от тях отново са разсадени в почвата по 12 растения. Тези растения също бързо се разболяват от *P. capsici* и не са получени семена от устойчиви на гъбата растения от L113, Алфи и Залфи.

През следващата година растения от L113 (I6), L57 (I6), Алфи и Залфи са заразени с *P. capsici* след тяхното вкореняване в почвата на опитния участък, т.е. 14 дни след засаждането. Две седмици след заразяването всички растения от линия L57, която е чувствителна контрола се разболяват от фитофтора (Фиг. 3). Първите симптоми на фитофтора са установени на 45-я дни като се наблюдава почерняване в основата на стъблото при 3 бр (16.7%) растения от L113. До края на вегетацията се разболяват общо 8 растения (44.4%) от същата линия. Всички растения от Алфи и Залфи остават здрави. Съществува съществена разлика между степента на пораженията при чувствителната линия L57 и заболелите от фитофтора растения от линия L113. При чувствителните растения от L57 болестта се развива много бързо, като растенията загиват (изсъхват) до 30 дни след появата на първите симптоми. При растенията от L113, които се разболяват от фитофтора, симптомите са свързани с почерняване на стъблото до няколко см над почвата, увисване на листата през най-горещите часове на деня и формиране на по-дребни плодове. Плодовете на растението не загиват и съзряват, а ако се откъснат и поставят във влажна среда, оптимална за развитието на гъбата, по тях не се образува мицел на *P. capsici*. Като цяло развитието на растенията не е видимо подтиснато, т.е. растенията, които са отчени като чувствителни на *P. capsici*, по същество са толерантни на заболяването. За целите на отбора, за устойчиви на *P. capsici* растения са приемани само тези, при които не се наблюдават никакви симптоми на болестта.

Данните представени на Фиг. 3 показват, че устойчивостта към фитофтора на L113 е по-слабо ефективна от тази на линиите Алфи и Залфи. След засаждането на разсад от доказано устойчиви линии пипер, отглеждан в заражена с *P. capsici* почва, всички растения заболяват. Несъмнено по време на изваждането на разсада от заразената почва се прекъсват много коренчета, което позволява на гъбата да проникне в проводящата система на растенията, независимо от това, че те притежават генетически обусловена устойчивост. Растенията от разсада, които остават в съдовете, където са отглеждани, не се разболяват от фитофтора въпреки неблагоприятните условия, голяма гъстота, малко почва, слабо развита коренова система и др., което показва, че те действително притежават гени за устойчивост на гъбата.



Фиг. 3. Динамика на появата на фитофтора при линии пипер L57, L113, Алфи и Залфи при полски условия.

Данните за Алфи и Залфи са идентични и на фигурата е показана само първата линия. Всеки вариант има 21 растения, заразяването с фитофтора е осъществено след вкореняването на разсада в почвата, а последното отчитане след узряване на плодовете.

4. Характеризиране на устойчивостта на линии пипер към CMV

4.1. Фенотипна експресия на устойчивостта към CMV.

По време на отбора по устойчивост към CMV при линии L57 и L113, тестирането се извършва в оранжерия, в която нощната температура пада до 15°C, а дневната температура често надвишава 30°C, т.е. при неконтролирани условия. За да се провери влиянието на температурата върху фенотипната експресия на устойчивостта, са проведени три експеримента при контролирана температура със стабилизирани по устойчивост линии L57 и L113.

При растенията от линии L57, L113 и Златен медал ms-8, отглеждани при постоянна температура от 25⁰ не се наблюдават симптоми по инокулираните листа. След 21-я dpi листата от линии L57 и L113 пожълтяват и падат, докато при чувствителната на вируса контрола Златен медал ms-8 рядко падат отделни листа. Растенията от устойчивите линии се развиват нормално и остават безсимптомни до края на опита. При чувствителната контрола се появява хлороза на младите листа до 14-я dpi и тяхното развитие е силно подтиснато.

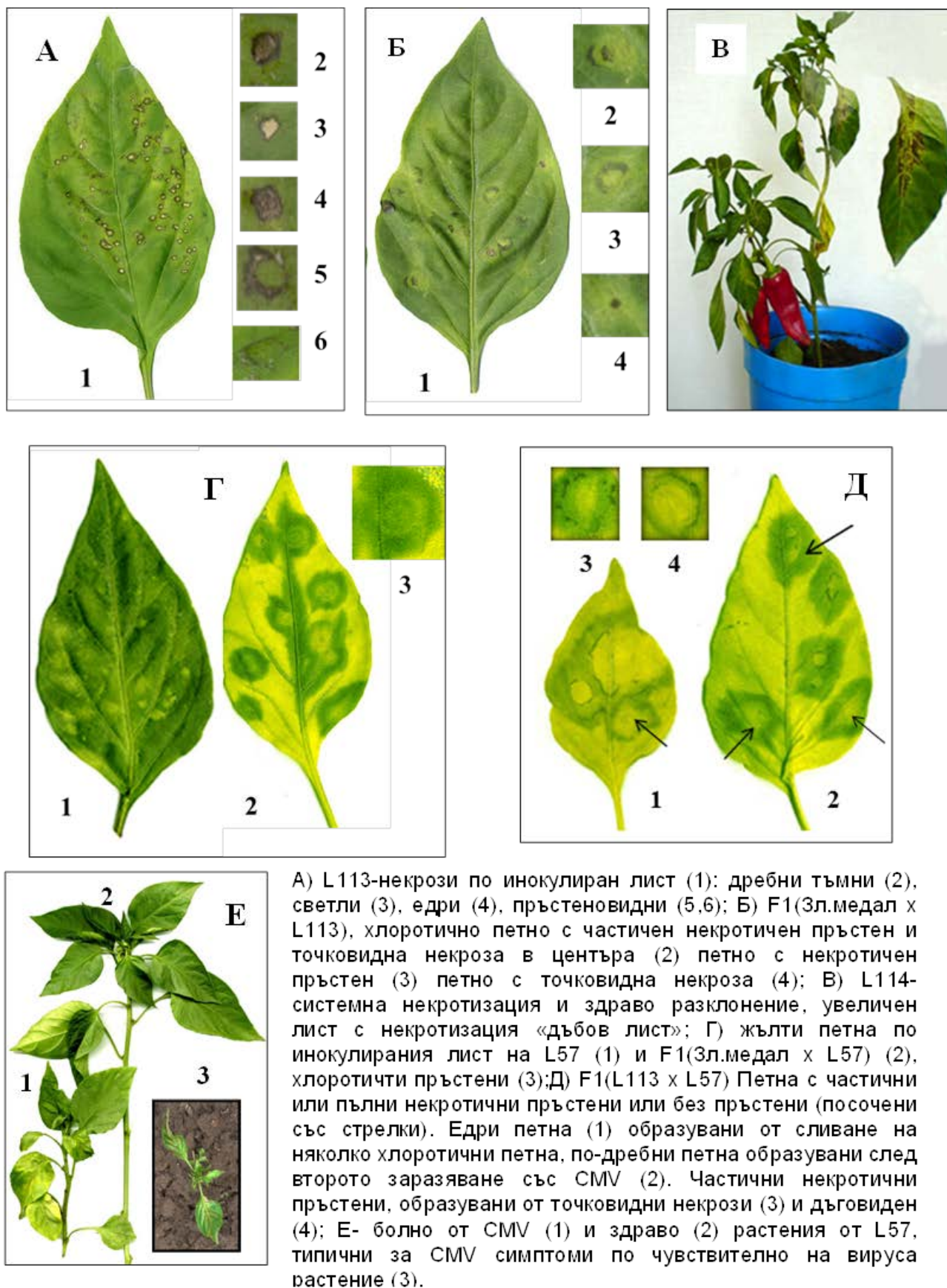
Същият експеримент е повторен, но растенията непосредствено след заразяването са поставени за 2 седмици при температура 39/25⁰ ден/нощ, след което са върнати при 25⁰. На инокулираните листа се развиват различни симптоми, които се появяват до 14-я dpi. При L57 се наблюдават жълти хлоротични петна, при L113 – черни некротични пръстени или петна, като в някои случаи некротизират части от листните жилки, а при чувствителната контрола – липсват симптоми (Фиг. 4 А1, Г1). Всички инокулирани листа от устойчивите линии падат преди 21-я dpi, а при Златен медал ms-8 – само отделни листа. Типична, за системното разпространение на вируса, хлороза се появява до 14-я dpi при всички растения от Златен медал ms-8 (Фиг. 4 Е3), а 7 дни по-късно се заразява системно и 1 растение от L57 (Фиг. 4 Е1). Системните листа на останалите растения от L57 и всички от L113 остават безсимптомни до края на опита.

Проведен е и трети експеримент, при който температурата е 30/16⁰ ден/нощ през цялото време на опита. Върху инокулираните листа на L113 се появяват дребни (2-3 мм в диаметър), черни некротични петна в интервала от 7-я до 10-я dpi (Фиг. 4 А). Тези листа падат 5 до 7 дни след появата на некрозите. При част от растенията на L57, върху инокулираните листа се развиват жълти петна с диаметър 2-4 мм след 14-я dpi (Фиг. 4 Г1). Листата също падат, но значително по-късно 2 до 3 седмици след заразяването.

Като част от този експеримент е инокулиран със CMV първи същински лист и след 5 дни и втори лист. Фазата на развитие и количеството на вирусния инокулум внесен при заразяването е еднакъв при двете части на опита, но в първата част двата листа са заразени едновременно. Некрозите по инокулирания първи лист на L113 се формират на 6-я - 8-я dpi, а на втория лист 3-4 дни след второто заразяване. Следователно, наблюдава се ускоряване развитието на HR на растенията от линия L113, което е особено отчетливо при второто заразяване. Окапването на инокулираните листа също се ускорява, като това е по-изразено при втория лист, който пада 2-3 дни след появата на симптомите по него.

По растенията, отглеждани при неконтролирани температурни условия, освен вече описаните, се наблюдават и други симптоми. Върху заразените листа на L113 могат да се появяват некрози със светла до жълта сърцевина, обградена от единичен черен пръстен, който може да е непълен. При L113 понякога се наблюдава системна некротизация, която се развива по следния начин. Първоначално се образува тясна некротична ивица, започваща от мястото на прикрепване на инокулирания лист, удължаваща се към корена. По-късно тя може да се удължи нагоре и ако достигне растежния връх - той загива. В този случай обикновено се наблюдава некротизация на дръжките и петурата на някои листа, започваща от основата, като понякога тя има формата на "дъбов лист" (Фиг. 4 В). В по-голямата част от случаите, когато растежния връх е некротизирал, се появяват 1-2 безсимптомни разклонения, които се развиват нормално (фиг. 4 В). В този случай растението се развива много добре и дава нормални плодове. След самоопрашване на цветовете от такива разклонения е получено потомството, което е тествано за устойчивост към CMV. Не се наблюдава разпадане по устойчивост и дори честотата на поява на системна некротизация не е по-висока от тази, която се наблюдава при потомствата на здрави растения.

Некротизацията на растенията може да се проявява в различна степен, като развитието ѝ може да спре на всеки от описаните етапи. Появата на некротични симптоми по неинокулираните части на растенията е свързана с високи дневни температури над 40⁰ по време на заразяването, последвани от по-хладни дни.



Фиг . 4. Експресия на устойчивостта на CMV в линии L113 и L57 и техните F1 хибриди

Несъмнено при тези условия, CMV понякога прониква в проводящата система на растението и навлиза в незаразените части, които след това некротизират. Критичният период за поява на системна некротизация при L113 и линиите, които са наследили неговата устойчивост към CMV, е времето от заразяването на растенията до падането на локалните листа. Високата температура благоприятства натрупването на по-високи концентрации на CMV в заразените листа, което увеличава инфекциозния натиск и вероятността от проникването на вируса в проводящата система.

При растенията от L57 некротични симптоми не се наблюдават, но може в резултат от влиянието на няколко неблагоприятни фактора да се появи мозайка по младите листа, тъй като CMV се разпространява системно (Фиг. 4 Е1). Заболяването в този случай се развива по-бавно и симптомите не са толкова тежки като при чувствителните на вируса растения. Следователно, при L57 за разлика от L113 не се наблюдава така наречения ефект - "оздравяване" на растенията.

4.2. Наследяване на устойчивостта към CMV на линии L57 и L113 пипер

За установяване начина наследяване на устойчивостта към CMV в линии L113 и L57 са проведени анализиращи кръстоски с чувствителна мъжкостерилна линия пипер Златен медал ms-8 и са получени F1, F2 и BC1 потомства. Осъществени са кръстоски между двете линии (L57 x L113) и (L113 x L57) и е получено F1 и F2 потомства. Опитът е проведен в оранжерийни условия, като растенията са инокулирани двукратно с щам CMV-PB. Дневната температура не превишава 32⁰, а нощната не е по-ниска от 15⁰. Последното отчитане на системните симптоми е проведено 40 дни след второто заразяване на растенията с вируса.

По локалните листа на всички растения от L113 и F1(Златен медал ms-8 x L113) се развиват некрози (Фиг. 4 А, Б), след което листата опадат. Същите симптоми се наблюдават по част от F2 и BC1 растенията, които по-късно са отчетени като устойчиви на вируса. Локалните листа на останалите растения, както и всички от Зл. медал ms-8 остават безсимптомни до края на опита, но по младите системни листа се появяват хлоротични симптоми в интервала между 7-я и 10-я ден след второто заразяване с вируса. По преобладаващата част от растенията с HR не се наблюдават системни симптоми, но част от тях (броят им е показан в скоби на Табл. 4) имат системни некротични ивици. И така, при L113 съществува ясно изразена корелация между появата на некротични симптоми по инокулираните листа и наличието на устойчивост към CMV.

Табл.4. Наследяване устойчивостта към CMV в линия пипер L113

Родители, F1 F2 и BC1	брой растения		R:S*	χ^2	P
	R	S			
Зл. медал ms-8	0	30	0:1		
I4 L113	110(3)	0	1:0		
F1 (Зл. медал ms-8 x L113)	36(6)	0	1:0		
F2 (Зл. медал ms-8 x L113)	131(11)	49	3:1	0.48	< 0.1
BC1 (Зл. медал ms-8 x L113)	63(14)	73	1:1	0.77	< 0.1

* - очаквано съотношение, R – устойчиви (брой растения със системни некротични симптоми) и S – чувствителни растения

На Табл. 4 са представени резултатите от тестирането за устойчивост към CMV на мъжкостерилната линия Зл. медал ms-8, самоопрашеното потомство I4 на линия L113, F1, F2 и BC1 на кръстоската (Зл. медал ms-8 x L113). По незначителен брой растения (2.7%) се появяват некротични ивици по стъблото, но те са включени в броят на устойчивите растения, тъй като тези симптоми показват, че растението притежава устойчивост към CMV. При F1 16.7% от растенията имат системни некротични ивици, а останалите са безсимптомни, като не се установяват растения с типичната за вируса хлороза. Съществува отчетлива разлика в експресията на HR по локалните листа на L113 (Фиг. 4 А) и F1 (Фиг. 4 Б). При F1 растенията дребните некротични петна се

срещат по-рядко като преобладават некротичните пръстени, които често са прекъснати и контурът им не е плътен. Некротичните петна и пръстени са разположени в средата на хлоротични петна, което означава, че HR не е ограничила изцяло вируса в некротизиралите клетки и в резултат понякога се появяват системни некротични ивици по стъблото.

Следователно, типът на наследяване е доминантен, но увеличеният брой растения със системни некротични симптоми показва, че дозата на гена влияе върху експресията на устойчивостта. В F2 и BC1 се наблюдава появата на устойчиви и чувствителни растения с типичните за вируса симптоми. Разпадането устойчиви:чувствителни растения в F2 е 3:1 и 1:1 в BC1, което отговаря на наличието на един доминантен ген, контролиращ устойчивостта към CMV.

При линия пипер L57, за разлика от L113, ясно изразена корелация между симптомите по локалните листа и устойчивостта липсва. Голяма част от локалните листа на L57, инокулирани по време на първото заразяване на растения остават безсимптомни, докато по останалата част и по тези от второто заразяване се развиват жълти петна (Фиг. 4 Г1). При F1(Зл. медал ms-8 x L57) растенията, локалните листа от първото заразяване са безсимптомни. По по-голямата част от листата от второто заразяване се образуват малко на брой жълтозелени до светлозелени едри петна, оградени с тъмнозелен пръстен (Фиг. 4 Г2). Симптомите по локалните листа на F1 растенията се появяват 2-4 дни преди листата да паднат. Понякога се образуват редуващи се концентрично разположени жълти и жълтозелени пръстени, обкръжени от тъмнозелен пръстен (Фиг. 4 Г3). При F2 растенията по локалните листа се наблюдават симптоми като при L57, F1, както и на чувствителния родител (безсимптомни листа), докато при BC1 липсват растения със симптоми по локалните листа идентични на тези на L57. F2 и BC1 растенията с безсимптомни локални листа и тези от Зл. медал ms-8, развиват първите симптоми на хлороза по системните листа едновременно, 14-17 дни след първото заразяване и една седмица по-късно има ясно изразено изоставане в развитието, водещо до вджуджаване. При F1 и част от F2 и BC1 растенията, хлорозата се появява най-рано 28 дни след първото заразяване, а изоставане в развитието се установява значително по-късно като липсва вджуджаване. Растенията, при които по системните млади листа се наблюдава хлороза са заразени системно от вируса и следователно са болни от краставична мозайка. Такива има при всички потомствата от кръстоската (Зл. медал ms-8 x L57) и дори 2% от растенията на устойчивия родител са с меки симптоми на заболяване (Табл. 5).

Табл. 5. Наследяване устойчивостта към CMV в L57

Родители, F1 F2 и BC1	брой растения			R:S*	χ^2	P
	H (R) **	Ch**	Ch, St (S) **			
Зл. медал ms-8	0		30	0:1		
I4 L57	98	2	0	1:0		
F1 (Зл. медал ms-8 x L57)	17	23	0	1:0		
F2 (Зл. медал ms-8 x L57)	94	62	64			
	156(62)		64	3:0	1.96	< 0.1
BC1 (Зл. медал ms-8 x L57)	42	56	122			
	98(56)		122	1:1	2.62	< 0.1

* - очаквано съотношение, ** - симптоми: H - безсимптомни, Ch - хлороза, Ch, St - хлороза и подтиснато развитие; в скоби е показан броят на растенията с хлороза, R – устойчиви и S – чувствителни растения

Устойчивостта към CMV се наследява непълно доминантно, тъй като в хетерозиготното F1 поколение се наблюдават болни и здрави растения. В F2 и BC1 поколенията отново има здрави и болни растения, като техният брой не отговаря на очакваното разпадане 3:1 за наличие на 1 доминантен ген (Табл. 5).

В конкретния случай, хомозиготните по чувствителност на CMV растения могат да бъдат идентифицирани, тъй като симптомите на заболяването се появяват рано и са много тежки, докато болните хетерозиготни растения имат по-меки симптоми, които

се появяват по-късно от тези при чувствителните растения. Когато броят на болните хетерозиготни по устойчивост растения се прибави към този на здравите се вижда, че устойчивостта към CMV в L57 се контролира от един доминантен ген (Табл. 5). Експресията на устойчивостта към вируса на L57 зависи в много висока степен от дозата на гена.

Експресията на устойчивостта към CMV и наследяването ѝ при двете линии пипер се различават съществено, което е основание да се предположи, че генетичния контрол се осъществява от два различни гена. Пирамидизирането им в един геном би могло да доведе до създаването на нов генотип с по-добри параметри на устойчивост.

За целта са хибридизирани двете линии, които са проведени в двете посоки (L57 x L113) и (L113 x L57). В случаите, когато L113 е използвана като майка, кръстоските се осъществяват по-трудно и техният брой е по-малък, но други съществени различия не са установени.

Симптомите по локалните листа на F₁ растенията са близки до тези от F₁(Зл. медал ms-8 x L57) растенията (Фиг. 4 Д). Всички локални симптоми се появяват непосредствено преди падането на листата. Голямата част листа от първото заразяване остават безсимптомни, а по останалите се образуват единични големи жълти петна обградени с тъмнозелен пръстен. При част от тях се формира тънък некротичен пръстен, обграждащ жълтото петно, който като правило е с прекъсвания. По листата от второто заразяване сравнително рядко се наблюдават по-дребни жълти петна с тъмнозелен пръстен, сходни с петната по растенията от F₁ (Зл. медал ms-8 x L57). Повечето листа имат петна подобни, но по-едри от тези по локалните листа на F₁(Зл. медал ms-8 x L113). Другата особеност е, че некротичните пръстени са непълни и не представляват цялостна ивица, а са съставени от единични некротични петънца и/или къси чертички. Преобладаващата част 59.2% от растенията развиват системни некротични симптоми, които често достигат растежния връх и няколко растения загиват.

Локалните листа на F₂ растенията притежават симптоми, покриващи целия спектър симптоми, описани за двете линии и на F₁ поколението от кръстоската между тях. Маркирани са растенията с локални симптоми типични за L113 (39 бр) и за L57 (33 бр), които общо представляват 48% от F₂ растенията. Останалите 78 растения имат локални симптоми характерни за хетерозиготните F₁ растения. От растенията с локални симптоми на L113 (39 бр) едно разви некротична ивица по стъблото, а при останалите не се появяват системни симптоми. При маркираните като L57, 31 растения остават здрави и две развиват меки симптоми на CMV. От растенията с локални симптоми, приличащи на тези по хетерозиготните F₁ растения, 29 бр остават здрави, а при 49 бр се появяват системни некротични симптоми. Тежестта на симптомите се различава съществено, от единични некротични ивици с различни размери, засягащи стъблото, до некротизиране на растежния връх и загиване на 4 растения.

Получени са 6 бр индивидуални F₃ потомства от F₂ растенията (29 бр) с локални симптоми като тези по хетерозиготните F₁ растения и липса на системни симптоми. Разпадането получено след заразяване със CMV на всяко едно от шестте индивидуални потомства е като това в F₂ потомството. От което следва, че шестте растения без системни некротични или хлоротични симптоми са хетерозиготни по устойчивост към CMV, т.е. притежават една хромозома с ген от L113 и една с ген от L57. Невъзможността да се пирамидизират двата гена най-вероятно е резултат от факта, че те са разположени в един клъстер и честотата на рекомбинация между тях е много ниска или дори невъзможна.

Нещо повече, наличието на ген за устойчивост от L57 в хетерозиготните растения, получени след кръстосването на двете линии, намалява ефективността на HR, свързвана с устойчивостта от L113. Симптомите по локалните листа на F₁(L57 x L113) се появяват много по-късно от тези на F₁(Зл. медал ms-8 x L113), HR е представена само от пръстени със силно нарушена цялост, често има и жълти петна без некротични пръстени, характерни за L57 (Фиг. 4Д). Количеството на растенията със системни некротични симптоми при F₁(L57 x L113) е значително по-високо, отколкото

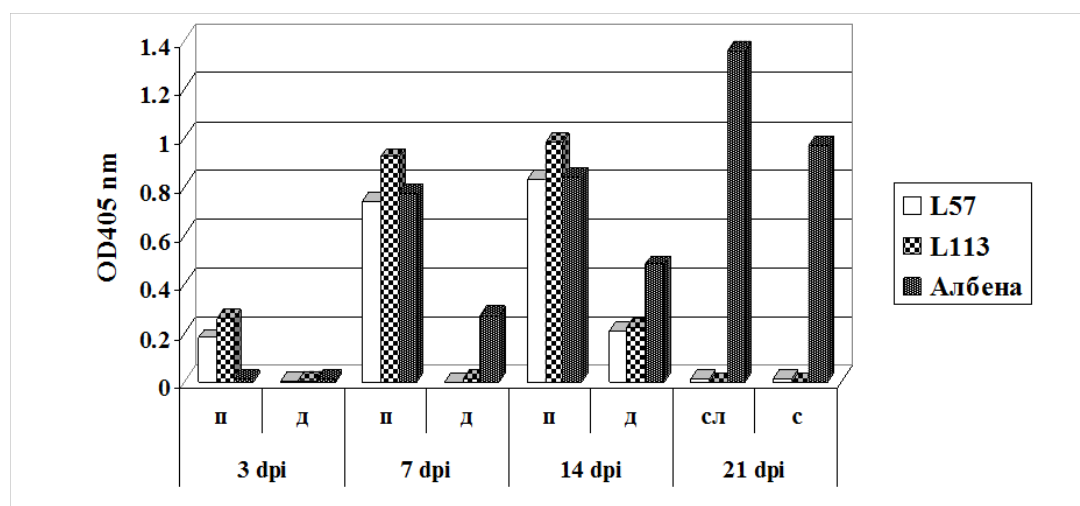
това при F1(Зл. медал ms-8 x L113), а една от причините за тяхната поява е резултат от недостатъчно ефективна HR.

4.3. Разпространение (транспорт) на CMV в устойчивите на вируса линии пипер

Веднага след установяване на фенотипно здрави растения пипер от L57 и L113, е проведено тестиране за наличие на CMV в локалните и системните листа с използване на DAS-ELISA. Установено е, че в локалните листа има вирус, който обаче липсва в системните листа. Тъй като това тестиране е задължително при всички експерименти и е провеждано многократно, са доказани и някои особености при двете линии.

В локалните листа на L57 независимо от това дали се появяват жълти петна или не, вирусът се доказва категорично с DAS-ELISA. Системните листа на същата линия като правило не съдържат вирус, а когато той се установява, по-късно по същите растения се развива макар и по-мека краставична мозайка, т.е. CMV се разпространява системно под влиянието на различни фактори (висока концентрация на вируса в инокулума, многократно заразяване, много висока дневна температура и др.).

Преди появата на некротични петна по локалните листа на L113 количеството на CMV е значително. След развитието на некротичните петна в пробите, взети от безсимптомните участъци на листата, не се установява вирус. Ако се тестват с DAS-ELISA само некротичните петна, резултатът за наличие на вирус също е отрицателен. Проверката за инфекциозност обаче доказва, че в петната има CMV, тъй като инокулумът, приготвен от тях заразява чувствителни на вируса растения като тютюн Самсун NN и пипер. В системните части на растенията от L113 не се доказва вирус по двата метода. При поява на системна некротизация по някои неинокулирани части на растението, в некротизиралите тъкани CMV може да се докаже само чрез проверка на инфекциозността, но не и с DAS-ELISA. В зелените (безсимптомни) части на системните листа с некротизация на дръжката и основата на листа, не се доказва вирус и по двата метода. Същото е установено и при листата на безсимптомните разклонения, на растения с некротизирало централно стъбло. Тези резултати показват, че в системните части на растението липсва вирус, а при развитието на HR безсимптомните участъци от локални и системни части с некротизация, също са свободни от CMV. Друг важен извод е, че HR при L113 възпрепятства серологичното доказване на вируса, без да инактивира инфекциозността му.



Фиг. 5. Наличие на CMV в инокулираните листа (3-ти, 7-ми и 14-ти dpi) и системните части (21-ви dpi) на растения от устойчивите на вируса линии пипер L57 и L113 и чувствителната контрола сорт Албена.

п – петура, д – дръжка, сл – системни листа, с – стъбло

Резултатите представени на Фиг. 5 потвърждават данните за разпространението на CMV в устойчивите линии пипер. В този експеримент се установява наличие на вирус и в дръжките на локалните листа. В устойчивите линии вирусът се появява в листната дръжка по-късно и се натрупва в по-ниски количества, отколкото в чувствителната контрола. Този резултат може да се обясни с различния начин на транспорт на вируса в дръжките на инокулираните листа на устойчивите линии, в сравнение с чувствителния сорт. При чувствителните растения е известно, че вирусът прониква бързо от жилките на петурата в проводящата система на дръжката на заразеня лист, а по-късно се заразяват и непроводящите тъкани чрез разпространението му от клетка в клетка. Липсата на вирус в дръжките на устойчивите линии на 7-я dpi предполага, че транспортът на дълги разстояния по флоема е възпрепятстван. CMV се доказва на 14-я dpi в невисоки концентрации, което се дължи на наличието на вирус в непроводящите тъкани, в които той се разпространява от клетка в клетка. В стъблото CMV е установен само в растенията на чувствителната контрола сорт Албена, но не и в устойчивите линии L57 и L113.

Тези данни се потвърдени и по метода на тъканния отпечатък от други автори. Отчетливо се наблюдава наличие на CMV във всички тъкани на напречния срез на листната дръжка и стъблото на сорт Албена, докато в устойчивите линии вирусът е установен само в най-външните слоеве клетки, но не и в проводящата система. Особено категоричен е резултатът от тестирането на надлъжния срез на стъблото през мястото на прикрепяне на заразените със CMV 1-ви и 2-ри лист, както и на напречните срези на стъблото над и под това място. В стъблото на устойчивите на вируса линии пипер не се доказва CMV, а в чувствителния сорт неговото количество е високо и вирусът е разпространен във всички тъкани.

Основното различие в експресията на устойчивостта към CMV при L113 и L57 е наличието на HR при първата линия. Наблюденията показват, че устойчивостта при L113 е много по-стабилна от тази при L57. Това се подкрепя от данните, че L113 е устойчива на 50 µg/ml, двойно по-висока концентрация на вируса в инокулума, в сравнение с 25 µg/ml при L57 (Stefanov *et al.*, 2011; Stoimenova *et al.*, 2005).

Значението на вида на некротичните петна за стабилността на устойчивостта се вижда най-добре като сравним експресията ѝ при линия L113, F1(Зл. медал ms-8 x L113) и особено F1(L57 x L113). По локалните листа на L113 (Фиг. 4 А) преобладават дребните некротични петна, докато при F1(Зл. медал ms-8 x L113) (Фиг. 4 Б) те се срещат рядко и са разположени в средата на хлоротични петна. Некротичните пръстени се срещат често, но контурът им не е плътен и често е прекъснат. Площта в некротичните пръстени и извън тях е жълтозелена до жълта, докато при L113 същите части от листата са зелени. Известно е, че вирусите не се разпределят равномерно в листата и жълтозелените площи съдържат висока концентрация на вируса, докато в тъмозелените участъци той липсва. Това означава, че HR не е имобилизирала изцяло вируса в локалните листа на F1 хибридните растения, което е предпоставка за проникването му в проводящата система и появата на HR (некротични ивици), засягаща системни части от растенията. Това е още по-очевидно, когато вирусът се разпространи и провикне в системните листа. При L113 се наблюдава така наречения дъбов лист (Фиг. 4 В), при който некротични ивици се образуват в близост до главните жилки и възпрепятстват вирусното разпространение в останалите части на листа. Липсата на HR в близост до второстепенните жилки се определя от факта, че вирусът излиза от проводящата система и навлиза в мезофилните клетки на листа само през главните жилките от класове I – III. Благодарение на HR при линия L113 се наблюдава локализиране на вируса в едно разклонение и появата на нови здрави разклонения, в които няма вирус и те се развиват нормално, и дават здрави плодове (Фиг. 4 В). При L57 вирусът веднъж проникнал в проводящата система на растението го заразява системно и симптомите на краставична мозайка не се различават съществено от тези по чувствителните генотипи пипер (Фиг. 4 Г,Е).

При F1(L57 x L113) растения се образуват големи жълти петна на локалните листа, като не се наблюдават ясно изразени некротични симптоми по границите на

петната (Фиг. 4 Д). Като сравним симптомите по локалните листа на F1(L57 x L113) и F1(Зл. медал ms-8 x L113) (Фиг. 4 Д,Б), се вижда отчетливо не само ефекта от дозата на гена, но и че L57 потиска експресията на гена на L113, контролиращ HR. Известно е, че елисатор на HR е авирулентният ген на CMV, чийто белтък се разпознава от продукти на растителните гени за устойчивост. Очевидно е, че при F1(L57 x L113) белтъкът на L57 пречи на ефективното разпознаване на аналогичния белтък на L113 и в резултат HR е забавена и неефективна. Колкото по-несъвършена е HR толкова по-голямо е количество на растенията, заразени системно от CMV.

При L113 разпознаването на авирулентния ген на вируса и генът за устойчивост на растението е специфично, но активираната HR е неспецифичен отговор на растенията на биотичен и абиотичен стрес. Установена е корелация между появата на симптоми и падането на локалните листа на устойчивите линии от една страна и натрупването на ROS и повишаване на активността на ензимите, свързани с неспецифичните защитни механизми при растенията от друга. HR при L113 се предшества от натрупване на водороден пероксид, а по време на формиране на некрозите се повишава пероксидазната активност и количеството на свободен пролин (Petrova *et al.*, 2008). Доказано е, че количеството на водородния пероксид и каталазната активност са най-високи в момента на падане на локалните листа и след това намаляват при двете линии. Тези биохимични промени водят до структурни изменения, доказващи ускорено стареене на петурата и дръжките на заразените със CMV листа на устойчивите линии пипер. Образоването на абцисна зона между стъблото и листната дръжка води до падането на локалните листа, което отстранява инфекциозния натиск на вируса и е важен фактор за стабилизиране на устойчивостта (Stoimenova *et al.*, 2009).

Освен това в системни листа на устойчивите линии в сравнение с чувствителния сорт е доказана високата пероксидазна активност и ниското съдържание на MDA. Така, устойчивите линии са защитени от неблагоприятното влияние на CMV, тъй като пероксидазите разграждат ROS, а ниското количество MDA показва, че няма деструктивни промени в системните листа на устойчивите линии (Petrova *et al.*, 2008; Petrova *et al.*, 2009). От тук може да се направи извод, че промените в локалните листа свързани с HR, ускорено стареене и др. остават локализирани в заразените листа и не се разпространяват в цялото растение.

Настоящите изследвания, както и тези на други автори (Stefanov *et al.*, 2011; Stoimenova *et al.* 2005) категорично доказват, че CMV заразява локалния лист и неговата дръжката, но не прониква в проводящата система на стъблото и не се разпространява системно в растенията. Основният механизъм на устойчивостта към CMV е свързан с ограничаване и предотвратяване транспорта на вируса на дълги разстояния и той най-вероятно е идентичен при двете линии пипер.

Наследяването на устойчивостта към CMV при L113 е доминантно, а при L57 непълно доминантно, като фенотипно експресията на устойчивостта зависи от дозата на гена, геномния бекграунд, концентрацията и количеството на внесения вирус, фазата от развитието на растенията и температурата на отглеждане, при която се осъществява заразяването.

5. Наследяване устойчивостта към тобамовируси в линии пипер

5.1. Генетичен контрол на устойчивостта към тобамовируси от патотип P0, произхождаща от L113

Както е показано в Табл. 3, L113 и L114 притежават устойчивост към TMV и ToMV, а Унгарският сорт Novaris е устойчив на TMV, ToMV, PaMMV и щамове от патотип P1.2 на PMMoV. Направено е предположение, че устойчивостта се контролира, съответно от гени L1 и L3, но не е доказан начина на наследяване.

Проследено е разпадането по устойчивост към ToMV на F1, F2 и BC1 на кръстоската (Зл.медал ms-8 x L113), на F1 и F2 кръстоските (Зл.медал ms-8 x L114) (Табл. 6). За тестирането е използван щам GM-0 на ToMV.

Табл. 6. Наследяване устойчивостта към ToMV в L113 и L114

Родители F ₁ , F ₂ и BC ₁	брой растения		R:S*	χ^2	P
	R	S			
L113	25	0	1:0		
Зл.медал ms-8	0	10	0:1		
F1(Зл.медал ms-8 x L113)	20	0	1:0		
F2 (Зл.медал ms-8 x L113)	95	25	3:1	1.10	< 0.1
BC1 (Зл.медал ms-8 x L113)	63	57	1:1	0.30	< 0.1
L114	22	0	1:0		
Зл.медал ms-8	0	10	0:1		
F1(Зл.медал ms-8 x L114)	20	0	1:0		
F2 (Зл.медал ms-8 x L114)	94	26	3:1	0.71	< 0.1

* - очаквано съотношение S – чувствителни и R – устойчиви на вируса растения.

Първи и втори същински листа са заразени с щам В на TMV във фаза от развитието на растения 4-ти -5-ти лист. Максималната температура на отглеждане на растенията е 25⁰ С. Количеството устойчиви и чувствителни растения е отчетено на 45-я dpi.

По всички растения от L113 и L114, както и по F1 от кръстоските с чувствителните родители, се образуват некротични петна от 3-я до 5-я dpi по локалните листа, които падат до 10-я dpi. Системните листа са безсимптомни и растенията се развиват нормално до края на опита. При F2 и BC1 се наблюдава разпадане, като по локалните листа на част от растенията се появяват некротични петна, листата падат и растенията остават здрави до края на опита. Другата част от растенията развива типичните мозаични симптоми за вируса 10 до 14 дни след заразяването, т.е. тези растения са чувствителни. Фактът, че всички растения в F1 са устойчиви показва, че типът на наследяване е доминантен, а разпадането 3:1 в F2 устойчиви:чувствителни растения доказва, че устойчивостта се контролира от един доминантен ген.

5.2. Генетичен контрол на устойчивостта към тобамовируси от патотип P1.2 в сорт Novaris

Установено е наследяването на устойчивостта към тобамовируси в сорт Novaris, като е осъществена кръстоска с линия L57 и са получени F1 и F2 потомства (Табл. 7). Заразяването е осъществено с щам RP2 от патотип P1.2 на PMMoV. Избран е този щам, тъй като сорт Novaris е устойчив на този патотип и е чувствителен на патотип P1.2.3 на PMMoV. Тези два щамата идентифицират фитопатологично наличието на ген L3.

Дребни тъмни некрози по локалните листа се появяват на 6-я до 8-я dpi, а листата падат на 17-я до 20-я dpi. Локалните некрози се наблюдават при всички растения от сорт Novaris и F1(L57 x Novaris), като системните листа остават безсимптомни до края на опита, т.е. растенията са устойчиви на този щам на PMMoV. В F2 се наблюдава разпадане, по част от локалните листа се появяват некрози, а системните листа са безсимптомни, докато при останалите растения локалните листа са безсимптомни, а по системните се появява мека зелена мозайка, характерна за вируса. По същото време от 16-я до 20-я dpi по младите листа на растенията от чувствителния родител L57, също се разви мека мозайка. Фактът, че всички растения в F1 са устойчиви на вируса, а в F2 е установено разпадане 3:1 устойчиви:чувствителни растения показва, че устойчивостта се контролира от 1 доминантен ген (Табл. 7). Експериментът е проведен при неконтролирани температурни условия, където температурата почти ежедневно надхвърля 30⁰С., но системни некротични симптоми не се развиват.

От кръстоската (L57 x Novaris) след отбор по устойчивост към щам от патотип P1.2 на PMMoV и CMV е получена линия L64, устойчива на CMV, TMV, ToMV, PMMoV и PMMoV патотип P1.2.

Табл. 7. Наследяване устойчивостта към PMMoV в сорт Novaris.

Родители F1 и F2	брой растения		R:S*	χ^2	P
	R	S			
L57	0	25	0:1		
Novaris	25	0	1:0		
F1(L57 x Novaris)	20	0	1:0		
F2(L57 x Novaris)	94	26	3:1	0.71	< 0.1

* - очаквано съотношение, S – чувствителни и R – устойчиви на вируса растения. Първи и втори същински листа са заразени с щам GP2 на PMMoV във фаза от развитието на растения 4-ти - 5-ти лист. Количеството устойчиви и чувствителни растения е отчетено на 45-я дп.

5.3. Диалелен анализ на гените, кодиращи устойчивост към тобамовируси в линия L114 и сорт Novaris.

Тези данни са още едно потвърждение, че L113, L114 и сорт Novaris най-вероятно притежават съответно, гени L1 (двете линии) и L3 (сорта). Най-сигурното доказателство, потвърждаващо тази теза, е диалелния анализ, който обаче е невъзможен, когато експресията на съответните гени е еднаква. Поради факта, че устойчивостта към ToMV и TMV в линия L114 е скачена с устойчивостта към CMV, а тази към тобамовируси в Novaris - не, и използвайки фитопатологичните методи за идентификация на тобамовирусите, може да се приложи диалелен анализ като се кръстоса L114 с Novaris и се проследи разпадането по устойчивост към различните вируси в поколенията. Ако устойчивостта към тобамовируси в двата родителя се контролира от неалелни гени, то би следвало с голяма честота да се получат растения с пирамидизирана устойчивост към CMV и PMMoV. Ако, както се предполага, устойчивостта в съответните генотипи се контролира от алелните гени L1 и L3, то съществува вероятност, в резултат от кросинговър, да се получат единични растения с пирамидизирана устойчивост. Този резултат е много желан, тъй като устойчивостта към CMV в линии L113 е значително по-стабилна от тази на линия L57.

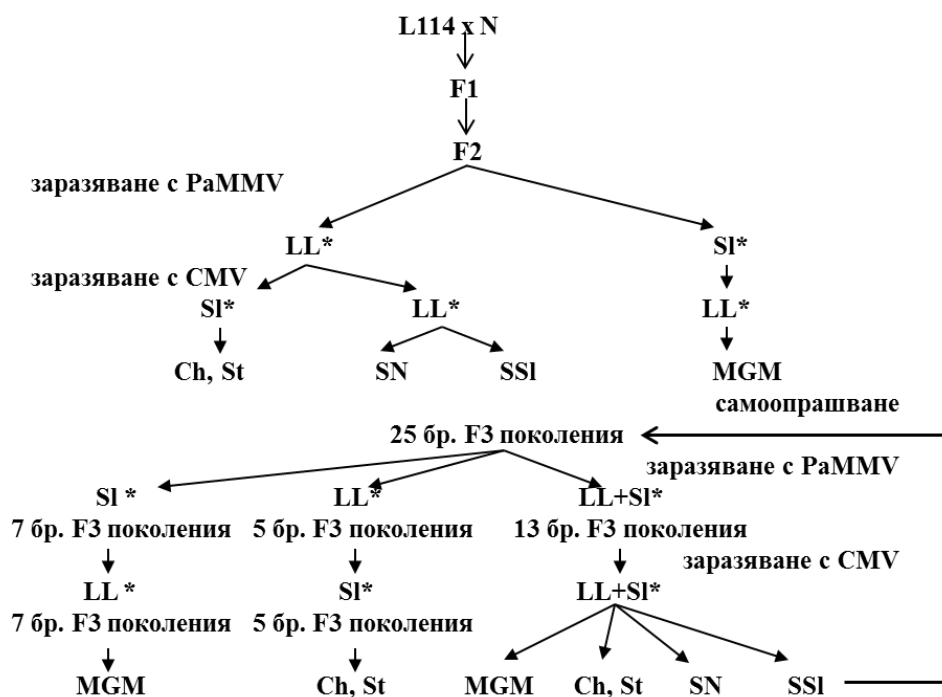
Осъществена е хибридизация между L114 (майчин родител) и сорт Novaris (бащин родител), след което са получени F1, F2, F3 и F4 поколения. За по-лесно възприемане на текста устойчивостта към тобамовируси в L114 е означена с L1, а тази в сорт Novaris с L3. Заразяването с PaMMV и CMV, и появата на съответните симптоми в F2 и F3 поколения е показано на Фиг. 6. Всички F2 пиперови растения след заразяване с ToMV реагират с HR, от което следва, че притежават устойчивост от единия и/или другия родител (не е показано на Фигурата). Заразени са 160 F2 растения с PMMoV патотип P1.2, като 117 растения реагират с HR и следователно са устойчиви на вируса.

Инокулираните листа на 43 растения остават безсимптомни, а по младите листа се появява мека зелена мозайка. Тези растения са чувствителни на PMMoV, но са устойчиви на ToMV, т.е. в тях липсва L3 ген, но притежават L1 ген. Следователно, по отношение на устойчивостта към PaMMV в F2 поколението се наблюдава очакваното разпадане 3:1 устойчиви към чувствителни растения. Групата от 43 растения е инокулирана със CMV, като всички реагират с HR и по-късно не развиват симптоми, характерни за този вирус (Фиг. 6), т.е. тези растения са устойчиви на CMV и чувствителни на PaMMV (мека зелена мозайка). Направена е проверка дали растенията са хомозиготни по отношение на устойчивостта към вирусите. Установено е, че заразени последователно с трите вируса, индивидуалните F3 потомства на тези растения, са устойчиви на ToMV (HR) и CMV (HR) и чувствителни на PMMoV, като не разпадат по посочените признаци (тестирането не е показано на Фиг. 6). В заключение групата от 43 растения притежава устойчивост към вируси, идентична с тази на родителската линия L114.

Устойчивите на PaMMV 117 растения реагират различно на заразяване със CMV. От тях около 1/3 (39 бр) са чувствителни на вируса, като развиват типичните симптоми – хлороза и издребняване на младите (системни) листа и изоставане в развитието. Хомозиготното наследяване на устойчивостта към PaMMV и

чувствителност към CMV е доказано в F3 потомството (тестирането не е показано на Фиг. 6). Следователно, устойчивостта на групата от 39 растения е еднаква с тази на бащиния родител сорт Novaris.

По инокулираните със CMV листа на 78 растения (около 2/3 от устойчивите на РаММV) се развиват локални некрози, след което на малка част от растенията се появява системна некротизация и някои от тях загиват. С висока степен на увереност можем да твърдим, че тези растения са хетерозиготни по устойчивост към CMV, тъй като е установено, че хетерозиготните L114 растения могат да развият системна некротизация (глава 4.1). До края на опита остават здрави 32 растения, които са устойчиви на CMV и РаММV, т.е. при тях имаме пирамидизиране на устойчивост към CMV и тобамовируси от двата родителя. Остава открит въпросът дали тези растения са хомозиготни по устойчивост към всички вируси. Проверката е осъществена като от здравите растения са получени 25 индивидуални F3 потомства, които са подложени на същата схема на заразяване като тази на F2 (Фиг. 6). В 7 потомства всички растения са чувствителни на РаММV и устойчиви на CMV и ToMV, т.е. няма разпадане по тези признаци (Фиг. 6). Липсва разпадане по чувствителност към CMV и устойчивост към ToMV и РаММV в други 5 потомства. Заедно тези 12 потомства, които не разпадат по устойчивост към вирусите са идентични по тези показатели на L114 и Novaris, съответно и представляват около 50% от тестираните поколения.



Фиг. 6. Наследяване на устойчивостта към PMMoV патотип P1.2 и CMV в кръстоска между L114 x Novaris (N).

* - симптоми по инокулираните листа, LL – локални некрози, SI – безсимптомни инокулирани листа, SSI - безсимптомни (здрави) растения, Ch –хлороза, St –подтиснато развитие, MGM – мека зелена мозайка, SN – системни некротични симптоми

Растенията от 13-те F3 потомства, показват разпадане по устойчивост първо към PMMoV, а след това и към CMV, като част от растенията реагират с HR, а на друга част по инокулираните листа липсват некрози. Растенията, които реагират на двата вируса с HR остават здрави до края на опита, а по две от тях се развива системна некротизация. Останалите растения имат мека мозайка, характерна за PMMoV или симптоми, типични за CMV. От здравите растения са получени семена и тестирането на техните потомства в F4 показва същото разпадане по устойчивост към вирусите

като това в F3. Не установихме нито едно потомство, в което всички растения да са здрави, т.е. да притежават хомозиготна устойчивост към CMV и PaMMV в един геном.

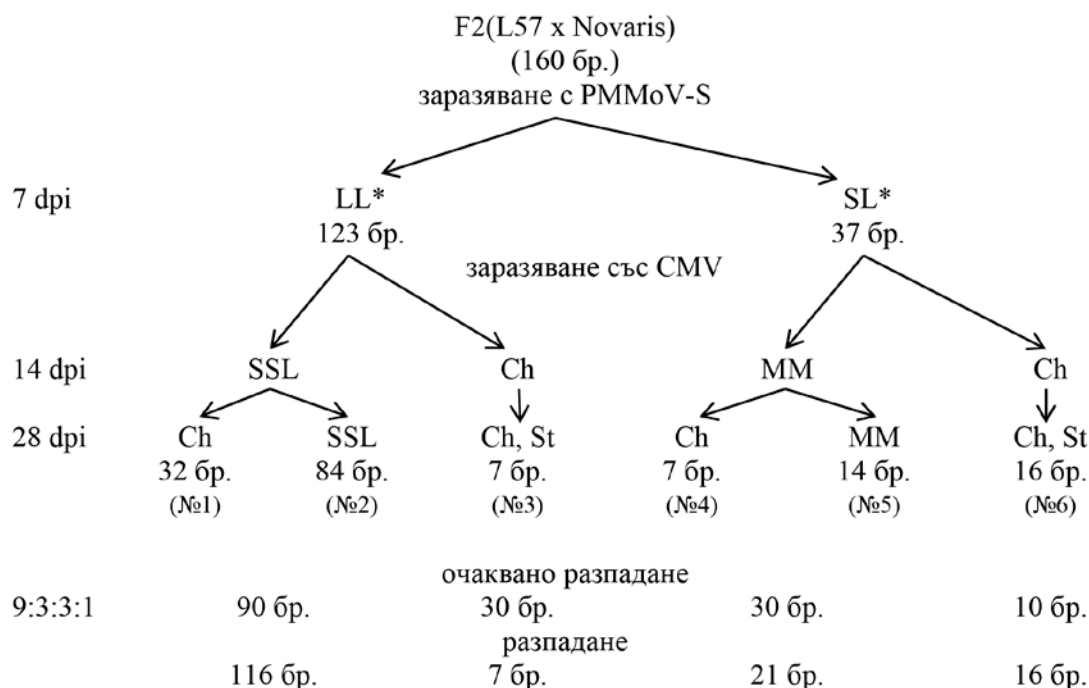
Невъзможността да се пирамидизира устойчивостта към CMV, която е скачена с тази към тобамовируси от патотип P0 и устойчивостта към щамове от патотип P1.2 показва, че гените, контролиращи двата патотипа устойчивост при тобамовирусите са алелни. Резултатите от настоящото изследване дават основание да се направи извода, че линия L114 притежава ген L1, а сорт Novaris - ген L3.

5.4. Пирамидизиране на устойчивостта към тобамовируси с произход сорт Novaris и тази към CMV от L57

При пирамидизирането на устойчивостта към тобамовируси от патотипове P0, P1 и P1.2 с произход сорт Novaris и тази към CMV от L57 в F2 е проведено последователно заразяване на 160 бр F2(L57 x Novaris) растения с щам PMMoV-S от патотип P1.2 и CMV-PB. Седем дни след заразяването на първи същински лист с PMMoV-S е отчетена появата на некрози по инокулираните листа на 123 растения, които са маркирани (Фиг. 7). Тези растения притежават гена L3 в хомозиготно или хетерозиготно състояние. Растенията (37 бр) с безсимптомни локални листа не са устойчиви на тобамовируси и не са маркирани. Маркирането е необходимо, тъй като всички листа с некрози и част от инокулираните, безсимптомни листа падат, а е важно да се знае при кои растения има HR. Четиринадесет дни след заразяването със CMV-PB е отчетена появата на първите симптоми на хлороза по най-младите листа на чувствителните на CMV растения. Разпадане по устойчивост към CMV е установено както при растенията с ген L3 (маркирани), така и при чувствителните на тобамовируси растения (немаркирани).

Ако е вярна хипотезата за тясно скачени гени за устойчивост към CMV и PMMoV, то не би следвало 7 бр от устойчивите на тобамовируса растения да се разболеят от CMV (№3). Същото важи за 21 растения, които не се заразяват от CMV (№5), или са хетерозиготни по устойчивост към вируса (№4), тъй като хлорозата се появява късно и няма изоставане в развитието на растенията. Тези 21 растения обаче са чувствителни на PMMoV, което се вижда от появата на мека мозайка на 14-я ден, а след заразяването и със CMV-PB, тези симптоми се запазват до 28-я ден (№5) или се маскират от хлороза (№4). Тъй като техният брой е значителен, то хипотезата за тясно скачени гени за устойчивост към CMV и PMMoV, при които кросинговърът протича рядко или е невъзможен, не е вярна.

Показана е хипотезата за независимо наследяващи се 2 доминантни гена. Разпадането 3:1 - 123 устойчиви : 37 чувствителни на PMMoV се вижда още по реакцията на локалните листа, но не може да се отчете в крайните резултати, поради факта, че симптомите на CMV са много по-тежки и маскират меката мозайка на PMMoV-S. Растенията, които на 14-я ден имат хлороза, са преустановили развитието си и изостават значително от другите растения, и това несъмнено са чувствителни на CMV растения (№3,6). Тези от тях, които са имали некрози по листата, заразени с PMMoV-S, са устойчиви на тобамовируса, но са чувствителни на CMV (№3). Растенията без некрози по листата, инокулирани с PMMoV-S и проявяващи типичните за CMV хлороза и изоставане в развитието, са чувствителни на двата вируса (№6), но се наблюдават само симптомите на CMV. Както вече е обяснено, част от хетерозиготните по устойчивост на CMV растения, развиват хлороза по-късно без съществено изоставане в развитието на растенията, като такива растения се наблюдават при растенията с некрози по локалните листа (№1) и растенията с мека мозайка, която по-късно се маскира от хлороза (№4). Малка част от растенията имат само мека зелена мозайка, това са чувствителни на PMMoV-S и устойчиви на CMV растения (№5). От селекционен интерес са само растенията, които 28 дни след заразяването със CMV остават безсимптомни (№2), те се разсаждат, цветовете се изолират и се получава следващото самоопрашено поколение.



Фиг. 7. Наследяване на устойчивостта към PMMoV патотип P1.2 и CMV в F2(L57 x материал Novaris).

* - симптоми по инокулираните листа, 7 dpi – 7 дни след заразяване с PMMoV-S, 14 dpi и 28 dpi – 14 и 28 дни след заразяването със CMV-PB, LL – некрози по локалните листа, SI – безсимптомни локални листа, SSL – безсимптомни (здрави) растения, Ch – хлороза, St – подтиснато развитие, MM – мека мозайка.

Установено е, че линия пипер L114 притежава устойчивост към CMV и тобамовируси от патотип P0, които се наследяват като скачени гени. Сорт Novaris е устойчив на тобамовируси от патотип P0, P1 и P1.2. Доказано е, че устойчивостта към тобамовируси в двата генотипа пипер се контролира от два алелни доминантни гена L1 и L3, съответно за линия L114 и сорт Novaris.

Липсват сведения за произхода и родителските форми на изходния холандски материал, от който е създадена линия L113. По време на отбора, устойчивостта се стабилизира, появи се отчетлива HR, която е отличен маркер за наличие на устойчивост към CMV. След като категорично е доказано, че L113, както всички линии, в които тя е донор на устойчивост, притежават ген L1 и ген за устойчивост към CMV, които са скачени и в добавка са частично устойчиви към *P. capsici*, то е възможно да се направи заключение за локализацията на тези гени. Известно е, че ген L е картиран в 11 хромозома, следователно генът, контролиращ устойчивостта към CMV е разположен на същата хромозома и то в непосредствена близост с него. В този район е картиран QTL cmv11.1, установен в сорт Perennial и сорт Vania (Caranta *et al.*, 2002; Chaïm *et al.*, 2001). Обаче, генът в линия L113 се различава от cmv11.1, тъй като устойчивостта, която той кодира е свързана и с HR, която я прави по-стабилна. Този ген е означен като Cmv11.3. Може да се предположи, че е алелен на гените (QTL cmv11.1), картирани в същия район с произход св. Perennial и сорт Vania, които се различават значително по своята експресия. Аналогични резултати са доказани при пипера, където гените за устойчивост L1, L2, L3 и L4 към тобамовирусите от различен патотип, са алелни гени и са разположени в един QTL, същото се отнася и за гените за устойчивост Tm-2 и Tm-2² към ToMV при домати.

Устойчивостта към CMV в линия L57 се различава от тази в L113 по това, че се наследява непълно доминантно и не е свързана с HR. Линия L57 е чувствителна на тобамовируси и в нея сравнително лесно е интродуциран ген L3 като в новополучената линия L64 устойчивостта към CMV и гена L3 не се наследяват като тясно скачени гени.

Следователно генът, контролиращ устойчивостта към CMV в L57 не може да е разположен много близко до локуса на L гена. Известно е, че св. Perennial е чувствителен на тобамовируси и интродуцирането на ген L в него не е осъществено, тъй като устойчивостта към CMV (cmv11.1) е тясно свързана с ген L+ и между тях не протича кросинговър, позволяващ заместването на гена L+ с един от гените за устойчивост L1-L4 (Caranta *et al.*, 2002). Все пак при L64 се наблюдава повишена честота на съвместно наследяване на устойчивостта към CMV и тобамовируси, което предполага, че гените са частично свързани. В сорт пипер Vania е картиран QTL cmv 11.2, кодиращ устойчивост към CMV и разположен в 11 хромозома в една свързана група с QTL cmv11.1 и ген L (в един клъстер), но разположен на значително разстояние от тях (Caranta *et al.*, 2002; Chaim *et al.*, 2001). Вероятно, генът, кодиращ устойчивост към CMV, произхождащ от българския локален генотип пипер L57, означен със Cmv11.4 е разположен именно в този район на хромозома 11.

Един допълнителен аргумент е, че гените за устойчивост към неродствени патогени могат да се намират в един клъстер, като този тип клъстери включват сравнително голям брой R гени и обхващат много дълги геномни секвенции. Друга особеност е, че всички гени в един клъстер са или доминантни или рецесивни (Kang *et al.*, 2005; Ritzenthaler, 2005). Grube *et al.*, (2000a) съставят сравнителна геномна карта на пипер, домати и картофи, където са показани клъстерите, един от които се намира именно в 11 хромозома и в него са картирани гени, контролиращи устойчивост към CMV, тобамовируси и *P. capsici* при пипера.

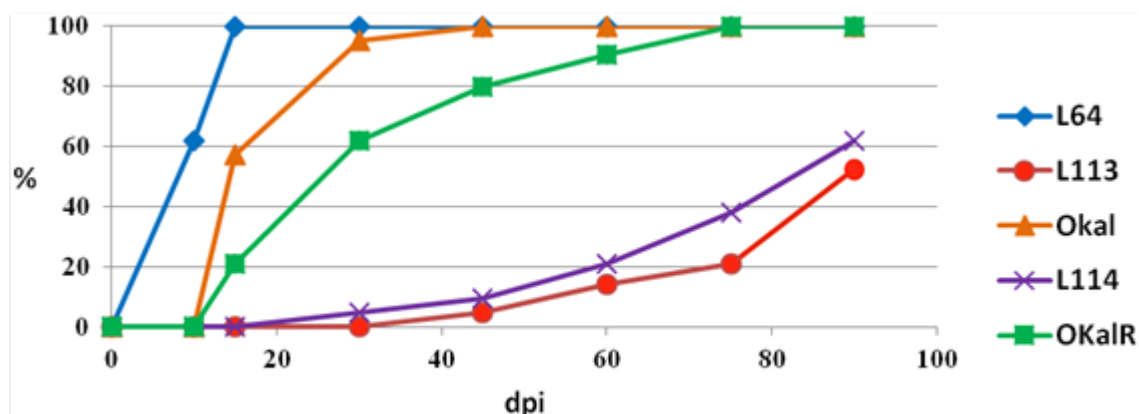
6. Пирамидизиране на устойчивостта към *P. capsici*, CMV и тобамовируси в генотипи пипер

След като е установено, че L113 притежава клъстер, който контролира устойчивостта към CMV, ToMV, TMV и частична устойчивост към *P. capsici*, които се интродуцират в чувствителните генотипи пипер като скачени, е решено да се провери устойчивостта към *P. capsici* в новосъздадените линии пипер L114 и OKalR. Линия L64 притежава устойчивост към CMV от чувствителната на гъбата L57, но не е известно дали другия родител сорт Novaris, притежаващ гена L3 не е устойчив на *P. capsici*.

Данните от тестирането показват, че L64 е чувствителна на *P. capsici*, като на 10-я dpi 61.9% от растенията имат почерняване в основата на стъблата, до 15-я dpi 100% от растения се разболяват, постепенно листата пожълтяват и до 45-я dpi всички изсъхват (Фиг. 8). Заболяването се развива малко по-бавно при OKal, 57.4% от растенията проявяват симптоми на 15-я dpi, 100% болни растения са отчетени на 45-я dpi, като постепенно всички растения изсъхват. Несъмнено тези две линии са чувствителни на *P. capsici*. Симптомите на болестта се проявяват като почерняване на основата на стъблото и гниене на корените и кореновата шийка. Кората на нападнатите части потъмнява и се бели лесно, болните растения завяхват, като първоначално запазват зеления си цвят, а по-късно изсъхват изцяло.

Кривата на развитие на заболяването от *P. capsici* при OKalR е подобна на тази на OKal, но броят на болните растения се увеличава значително по-бавно и 100% болни растения са установени на 75-я dpi (Фиг. 8). При двете линии L113 и L114 единични растения със симптоми на заболяване се появяват на 30-я (L114) и 45-я (L113) dpi, като техният брой нараства бавно до 75-я dpi. По-бързо увеличаване процентът на болни растения е отчетен в края на вегетацията, като на 90-я dpi достига 52.4% (L113) и 61.6% (L114). Симптомите на фитофтора при болните растения се различават съществено от тези по чувствителните (L64 и OKal) линии пипер. При линии L113, L114 и частично при OKalR основният симптом е увисване (завяхване) на листата и сравнително рядко потъмняване в основата на стъблото. Растенията цъфтят и плододат, като плодовете в ботаническа зрялост и семената не са заразени с фитофтора. Растенията, при които болестта се появява по-рано, имат малко по-дребни плодове, но те също са здрави. Две растения от OKalR изсъхват в края на сезона, всички останали имат по-малък брой и по-дребни, но здрави плодове. При тази линия,

част от листата пожълтяват и опадат по време на узряване на пипера, но останалите, макар и завяхнали остават зелени.



Фиг. 8. Динамика на развитие на фитофтората при линии пипер L64, OKal, L113, L114 и OKalR.

Всеки вариант има 21 растения, заразяването с фитофтора е осъществено след вкореняването на разсада в почвата, а последното отчитане е извършено след узряване на плодовете. Броят на болните растения е отчитан на 10-я, 15-я, 30-я, 45-я, 60-я 75-я и 90-я dpi. % - броят на болните растения/броя на тестираните растения x 100.

Данните показват, че линиите L113, L114 и OKalR притежават частична устойчивост към българските раси на *P. capsici*, като експресията на устойчивостта зависи от генетичния бекграунд на чувствителния родител (Фиг. 8). Тази устойчивост отстъпва по стабилност на създадените в България устойчиви на *P. capsici* линии пипер. Генетичният контрол на устойчивостта се осъществява от няколко гена, разположени в различни хромозоми, които произхождат от независими източници на устойчивост и притежават, разнородни по брой и взаимодействия гени (Ogundiwin *et al.*, 2005; Thabuis *et al.*, 2003; Truong *et al.*, 2012).

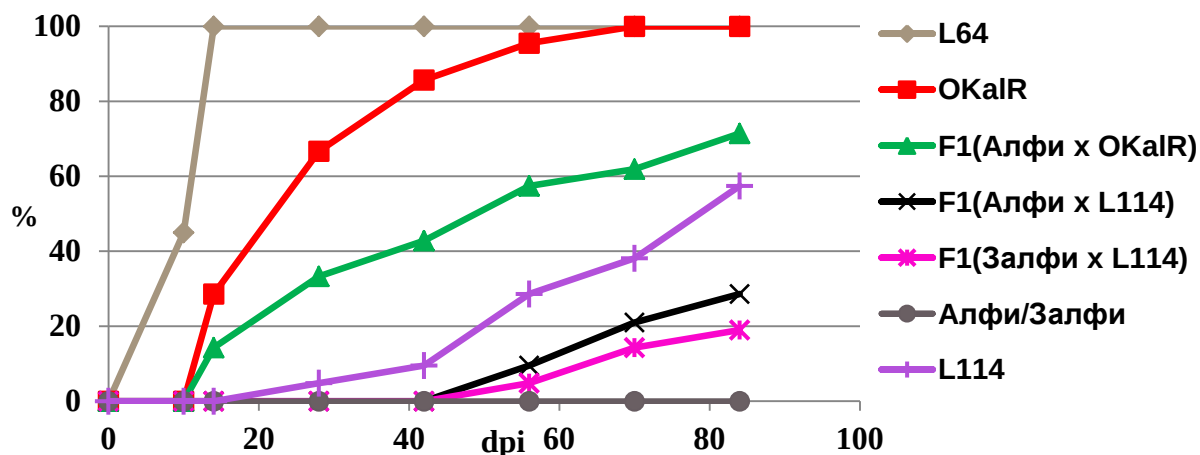
Въз основа на тези данни може да се предположи, че чрез хибридизация на линии L64, L114 и OKalR с Алфи и Залфи, които освен висока степен на устойчивост към *P. capsici*, притежават и ценни стопански качества, е възможно да се създадат линии пипер с комплексна устойчивост към CMV, тобамовируси и *P. capsici*.

При хибридизацията на L64 и L114 с Алфи и Залфи целта е да се получат сестрински линии на Алфи и Залфи, които да имат техните стопански характеристики, и пирамидизирана устойчивост към болести от двамата родители. OKalR е бяла двустранна капия с оранжев цвят на плодовете в ботаническа зрялост и при хибридизацията целта е да се запазят тези характеристики, и тъй като Алфи има по-светли плодове от Залфи, последната линия не е включена в хибридизационната схема.

Устойчивостта към *P. capsici* на F1 поколението от правите и обратни кръстоски между (L114 x Алфи/Залфи) и (OKalR x Алфи) не се различава съществено, затова на Фиг. 9 са показани само кръстоските, където Алфи и Залфи са майчиния родител. Всички растения на чувствителната линия L64 се разболяват до 14-я dpi, докато първото болно растение при L114 е установено на 28-я dpi и до края на вегетацията този брой е 12 (57%). Двете линии Алфи и Залфи са 100% устойчиви на заболяването. При F1(Алфи x L114), първото болно растение се появява на 56-я dpi и достига до 5 бр (21%). Броят на болните растения при кръстоската F1(Залфи x L114) е малко по-малък, но появата на първото заболяло растение е отчетено на същата дата, като кръстоските с Алфи. В края на вегетацията болните растения са 4 бр (19%). Когато като майка се използват Алфи и Залфи, броят на болните растения е малко по-нисък, от този на правите кръстоски (L114 майка). Разликата е минимална 1-2 растения, но е постоянна, винаги съответна крива е разположена по-ниско. Ако сравним резултатите

на Алфи и Залфи и като осредним правите и обратни кръстоски се вижда, че в края на вегетацията кръстоските със Залфи имат по-малък брой болни растения 9 бр (20%), докато тези с Алфи са 12 бр (27.2%).

Необходимо е да се уточни характера на заболяването от фитофтора при F1(L114 x Алфи/Залфи) поколенията. Като болни се отчитат растения, които са „завехнали“, т.е. листата увисват отначало само през най-горещите часове на деня, а към края на вегетацията непрекъснато. Почерняване в основата на стъблото липсва, но се вижда, че нормалното снабдяване с вода на растенията е нарушено. Растенията цъфтят, връзват и плодовете са здрави, но при растенията, заболели по-рано, те са по-дребни. От болни растения семена не се събират, дори ако има самоопрашени плодове, което се случва често, тъй като симптомите се появяват след формиране на повечето плодове.



Фиг. 9. Динамика на развитие на фитофтора при линии пипер L64, L114, OKaIR, Алфи и Залфи и тяхното F₁ поколение от кръстоските между тях.

Всеки вариант има 21 растения, заразяването с фитофтора е осъществено след вкореняването на разсада в почвата, а последното отчитане е извършено след узряване на плодовете. Броят на болните растения е отчитан на 10-я, 14-я, 28-я, 42-я, 56-я, 70-я и 84-я dpi. % - броят на болните растения/броя на тестираните растения x 100.

Резултатите показват, че F1 поколението от правите и обратни кръстоски между (L114 x Алфи/Залфи) има значително по-стабилна устойчивост към фитофтората, в сравнение с линия L114. По-ниските резултати по този показател в сравнение с двете линии Алфи и Залфи се дължи на факта, че това са хетерозиготни растения, т.е. след отбор можем да достигнем 100% устойчивост. Отборът в следващите поколения е провеждан първо по устойчивост към CMV и същите растения, вече на фитофторния участък са заразявани с *P. capsici*. От F2(L114 x Залфи) и F2(Залфи x L114) е получено по едно поколение, които в F3 и F4 не разпадат по устойчивост към фитофтора. От F2(Алфи x L114) също е получено едно поколение, което не разпада по този признак в F3 и F4.

Следователно, успешно е пирамидизирана устойчивостта на *P. capsici* от линии Алфи и Залфи с устойчивостта към CMV, TMV и ToMV. Паралелно е провеждан отбор по устойчивост към фитофтора и в линия L114 и след 5 години е повишено количеството на здравите растения до 92.6%.

Развитието на фитофтората при OKaIR е аналогично на това при сравняване устойчивостта на линиите пипер (Фиг. 8). В конкретният експеримент, 100% болни растения при линия OKaIR са отчетени 70 дни след заразяването с фитофтора (Фиг. 9). Първите болни растения се появяват на 14-я dpi, броят на болните растения в F1 поколението се увеличава по-бавно и в края на вегетацията има 5 бр (23.8%) видимо здрави растения. При линия OKaIR и F1 поколенията основният симптом е завяхване на листата, но при F1 сравнително по-рядко се наблюдава и потъмняване в основата на стъблото. Плодовете в ботаническа зрялост и семената не са заразени с

фитофтора, но плодове са малко по-дребни. Три от растенията от OKaIR и по 2 бр F1 растения, изсъхват в края на сезона. Част от листата на останалите растения пожълтяват и опадат по-време на узряване на пипера, но останалите, макар и завяхнали остават зелени.

От здравите F1 растения са събрани семена и е продължен отбора по устойчивост към фитофтора в следващите поколения. F2 поколенията от кръстоските на L114 и OKaIR с Алфи и Залфи се инокулират със CMV в разсадна фаза и само устойчивите на вируса растения се разсаждат във фитофторния участък, където се заразяват с *P. capsici*. От тук следва, че данните за броя болни и здрави растения, не могат да се използват за проучване начина на наследяването на устойчивостта към *P.capsici*. Първото неразпадащо поколение по устойчивост на CMV и *P. capsici* е получено в F4(Алфи х OKaIR), което не разпада и в F5.

През 2009 г. F6(L114 х Алфи/Залфи) и F6(Алфи х OKaIR), които съответно в три и две предходни поколения не са разпадали по устойчивост към *P. capsici*, е тествано с особено агресивна раса на гъбата и при атмосферни условия, много благоприятни за нейното развитие. Всички растения от F6(Алфи х OKaIR) се разболяват, голяма част загиват и само няколко растения успяват да завържат плодове.

Растенията от F6 поколенията на едно растение от F5(Алфи х L114) остават здрави до края на опита и от тях са получени семена. Това поколение е родоначалник на новата линия L16. При останалите F6 поколения от кръстоските между Алфи и L114 се наблюдава разпадане по устойчивост, или всички растения са болни.

Растенията от всичките осем бр отделни F6 поколения, произхождащи от едно растение F3(Залфи х L114) остават здрави до края на вегетацията и от тях е създадена линия L14. При останалите поколения е отчетено разпадане по устойчивост към *P. capsici*. През тази година климатичните условия са толкова благоприятни, че *P.capsici*, образува спори по чувствителната контрола, които се разпространяват по въздушен път и заразяват пипера от съседните участъци. Всички диви видове, линии и сортове, чувствителни на гъбата, загиват преди да узреят плодовете. Линиите L114, OKaIR и F6(Алфи х OKaIR), които се отглеждат без изкуствено заразяване, също се разболяват. Остават здрави две растения от L114 и част от F6 растенията от кръстоските между L114 и Алфи, докато само няколко F6 растения от кръстоските между L114 и Залфи се разболяват.

Тъй като линия L64 е чувствителна на *P. capsici*, F1 поколенията от кръстоските с линии Алфи и Залфи не са заразявани с патогени. Понеже генът L3 и устойчивостта към CMV в L64 не се наследяват като тясно скачени гени, разсадът (F2) е заразен последователно с щам №12 (патотип P1.2) на PMMoV и CMV. Устойчивите на двата вируса растения са разсадени, като част от тях са заразени с фитофтора.

В F2 поколенията от кръстоските L64 х Алфи/Залфи, заболяването от фитофтора се развива по-бавно от това при L64, но в края на вегетацията всички растения се разболяват. Преобладаващата част от растенията загиват в основата на стъблото и около половината изсъхват изцяло. Засяти са семена от F3 растения (които не са заразявани с фитофтора) и устойчивите на двата вируса растения са разсадени, като част от тях са заразени с фитофтора. Всички заразени с фитофтора растения загиват, а от останалите растения са получени семена. Приложена е същата схема на заразяване в F4, но отново всички растения се разболяват от фитофтора. Целият експеримент от кръстоските между L64 и Залфи, получаване на F1, F2 и F3 поколения и описаното по-горе тестване на последните две поколения е повторено отново, но резултатите са същите.

По 50 растения от кръстоските F2(L64 и Залфи) и F2(Залфи и L64) са инокулирани с щам PMMoV-S (патотип P1.2) и растенията с некрози по локалните листа са маркирани. Веднага след това са заразени всички растения с *P. capsici* без разсаждане. Всички маркирани растения, които са устойчиви на тобамовируси от патотип P0, P1 и P1.2 се разболяват от фитофтора, заболяват и част от немаркираните растения. До края на опита 2 и 3 растения, съответно за двете кръстоски, не се разболяват от фитофтора, но имат мека мозайка, характерна за

PMMoV. Следователно, не е постигнато пирамидизиране на гените за устойчивост към *P. capsici* и тобамовируси от патотип P1.2.

P. capsici предизвиква различни симптоми при пипера, загиване на корените и кореновата шийка, увяхване на листата и изсъхване на растенията, загиване на плодовете и др., като всяка от тези форми на болестта се контролира от различни гени. Според Sugita *et al.*, (2006) фитофторното увяхване при пипера се контролира от 3 гена, като Phyt-2 и Phyt-5 са разположени в 11-та, а Phyt-1 в 4-та хромозома. Растенията са устойчиви на патогена, ако Phyt-1 и Phyt-2 присъстват едновременно и са в хомозиготно състояние.

Тези факти обясняват неуспехът по пирамидизиране на устойчивостта към CMV, тобамовируси от патотипове P0, P1 и P1.2 и *P. capsici*, когато е хибридизирана чувствителна на гъбата линия L64 с устойчивите линии Алфи и Залфи. Тъй като единият от двата главни гени за устойчивост към *P. capsici* се намира в 11 хромозома, в същия клъстер, където са разположени гените за устойчивост към CMV и тобамовируси, то кросинговърът, който би могъл да доведе до пирамидизиране на гените за устойчивост от родителите е малко вероятен. Това е типичен случай, при който гените за устойчивост към CMV и тобамовируси от една страна и генът за устойчивост към *P. capsici* от друга, се намират в отблъскваща (repulsion) фаза. Несъмнено именно този ген, намиращ се в 11 хромозома, присъства в L114 и при кръстоските с Алфи и Залфи се пирамидизират гените, отговорни за устойчивостта към гъбата, разположени в други хромозоми. В резултат, сравнително лесно е постигнато много високо ниво на устойчивост към *P. capsici* в L14 и L16.

Линия L114 Fn(Зл.медал-ms-8 x L113) е създадена чрез отбор по устойчивост само към CMV и стопански качества близки да тези на чувствителния сорт Зл.медал-ms-8. Въпреки това L114 не се различава съществено по устойчивост към *P. capsici* от L113. Същият отбор е проведен и при OKalR Fn(OKal x L114), но линията се отличава значително по устойчивост към *P. capsici* от L114. При OKalR има забавяне развитието на фитофторното увяхване и почти пълна липса на кореново гниене. При отбора почти веднага изчезна кореновото гниене, но устойчивост към увяхването се постигна по-трудно. Плодовете на двете линии се оказват чувствителни на *P. capsici*, когато патогена се разпространява по въздушен път, което се среща рядко в България, само при климатични условия, изключително подходящи за развитието на гъбата. Несъмнено тези разлики са резултат от наличието на ген/гени в OKal, които потискат експресията на устойчивостта към *P. capsici* (епистаз), който липсва при Зл.медал ms-8.

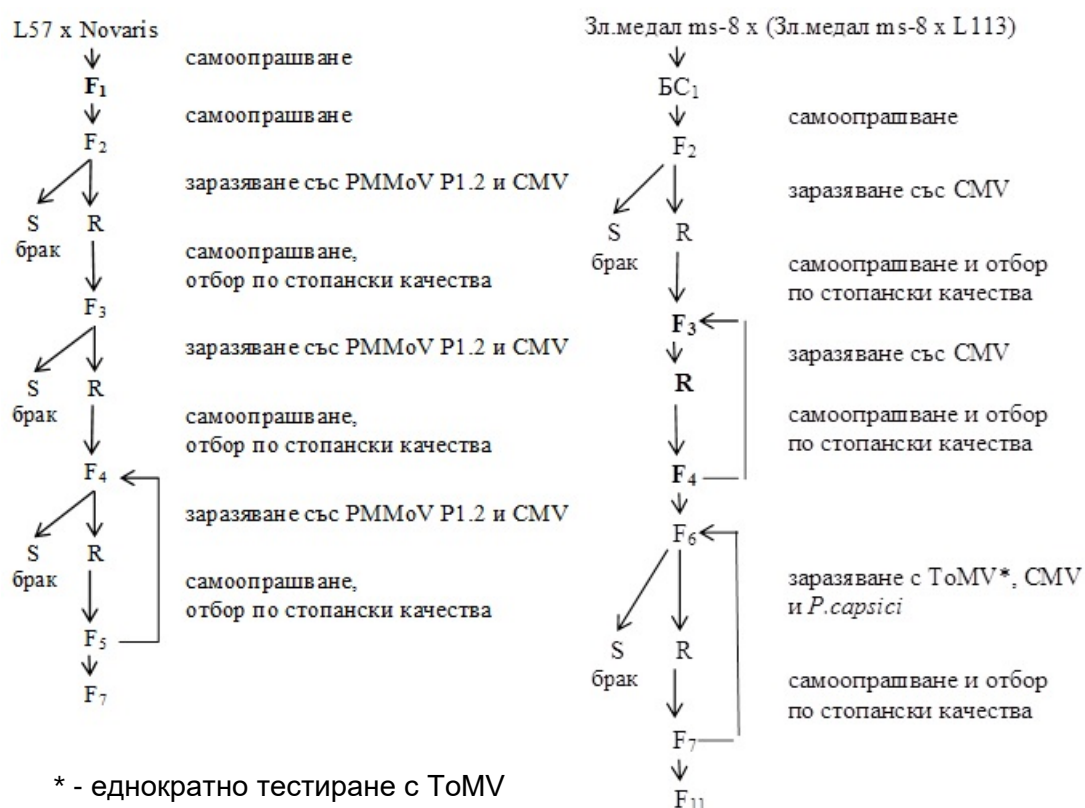
При L113 и L114 след отбор по устойчивост към *P. capsici*, практически липсва кореновото гниене, но част от растенията особено към края на вегетацията увяхват. Пирамидизирането на устойчивостта към *P. capsici* от Залфи и Алфи с тази от L114, доведе до създаване на две нови линии L14 Fn(Залфи x L114) и L16 Fn(Алфи x L114), които са не само устойчиви на кореново гниене и увяхване, но и плодовете им са устойчиви на загиване при разпространение на *P. capsici* по въздушен път. Несъмнено гените, кодиращи устойчивостта на плодовете на загиване и в голяма степен тези, предотвратяващи увяхването на растенията, произхождат от линии Алфи и Залфи.

7. Характеристика на новосъздадените линии пипер, устойчиви на икономически важни болести

Характеристика на линии L57 и L64. След получаване на 15 бр поколения от I5 на №57, които не разпадат по устойчивост към CMV, са оценени стопанските им качества. Установено е, че едно потомство притежава най-добрите стопански показатели, като превъзхожда по добив, дебелина на перикарпа, ширина и % стандартни плодове сорт Албена, отстъпва само по дължина на плодовете, а по останалите параметри ранозрелост, брой плодове, количество на сухо вещество, редуциращи захари и витамин С в плодовете, се изравнява със стандартния сорт Албена. Именно това поколение получи името линия L57.

Линия L64 е създадена чрез интродукция на ген L3 от сорт Novaris в линия L57, за да се пирамидизират устойчивостта към CMV с тази към тобамовируси от патотип

P0, P1 и P1.2. След хибридизацията на L57 и сорт Novaris е осъществен отбор по устойчивост към CMV и PMMoV P1.2. Отборът по стопански качества е провеждан при растения с комплексна устойчивост на упоменатите вируси, като целта е създаване на линия пипер, притежаваща показателите на L57 (Фиг. 10).



Фиг. 10. Педигре на линия L64 Fn(L57 x Novaris) и L114 Fn(3л.медал ms-8 x L113)

Проведен е двугодишен опит, при който са сравнени стопанските качества на двете линии и стандартни сортове Албена и Куртовска капия. За всеки вариант са използвани 10 растения, които се оценяват индивидуално. Извършени са две беритби на ботанически зрели плодове, нестандартните и късните зелени плодове не са отчитани. Беритбите на Куртовската капия са проведени 10 и 14 дни по-късно от тези на двете линии и сорт Албена.

Табл. 8. Сравнителна характеристика на стопанските качества на линии пипер L57 и L64

Линии сортове	морфологична характеристика на плодовете			добив	плодове
	дължина	ширина	дебелина на	кг	брой
	см	см	перикарпа мм		
L57	12.8±0.75 b	5.0±0.52 b	5.1±0.34 b	0.59±0.043 b	9.6±0.41 b
L64	12.4±0.62 ab	4.9±0.61 b	5.0±0.27 b	0.58±0.036 b	9.4±0.37 b
Албена	16.3±0.83 c	3.8±0.47 a	4.2±0.32 a	0.61±0.058 b	9.5±0.43 b
К.капия	11.5±0.68 a	4.0±0.39 a	4.1±0.25 a	0.55±0.027 a	8.2±0.29 a

Представени са средните резултати за стандартен плод в ботаническа зрялост и едно растение. Опитът е двугодишен и за всеки генотип са оценявани индивидуално 10 растения (n=20).

Плодовете на двете линии не се различават по размер на плода, те са по-дълги с 11.1% и 10.7% от сорт Куртовска капия, но са по-къси от Албена с 21.5% и 23.9%, съответно за L57 и L64. По средна ширина на плода и дебелина на перикарпа линиите превишават стандартните сортове. Средният добив и брой плодове за 1 растение на двете линии е по-висок от съответните стойности при сорт Куртовска капия и са равни с тези на сорт Албена (Табл. 8).

Табл. 9. Количество на ценни хранителни вещества в плодовете на линии пипер L57 и L64

Линии/ сортове	сухо вещество %	витамин С mg %	редуциращи захари %	ликопен mg %	β-каротен мг %
L57	12.0±0.73 a	248.7±4.5 b	5.5±0.26 b	20.1±0.61 c	7.3±0.27 b
L64	11.9±0.51 a	246.3±3.6 b	5.4±0.29 b	19.9±0.36 c	7.4±0.32 b
Албена	11.6±0.43 a	227.2±3.0 a	5.6±0.24 b	15.7±0.49 a	6.7±0.19 a
К.капия	11.3±0.54 a	231.9±5.3 a	4.9±0.18 a	17.3±0.38 b	7.5±0.22 b

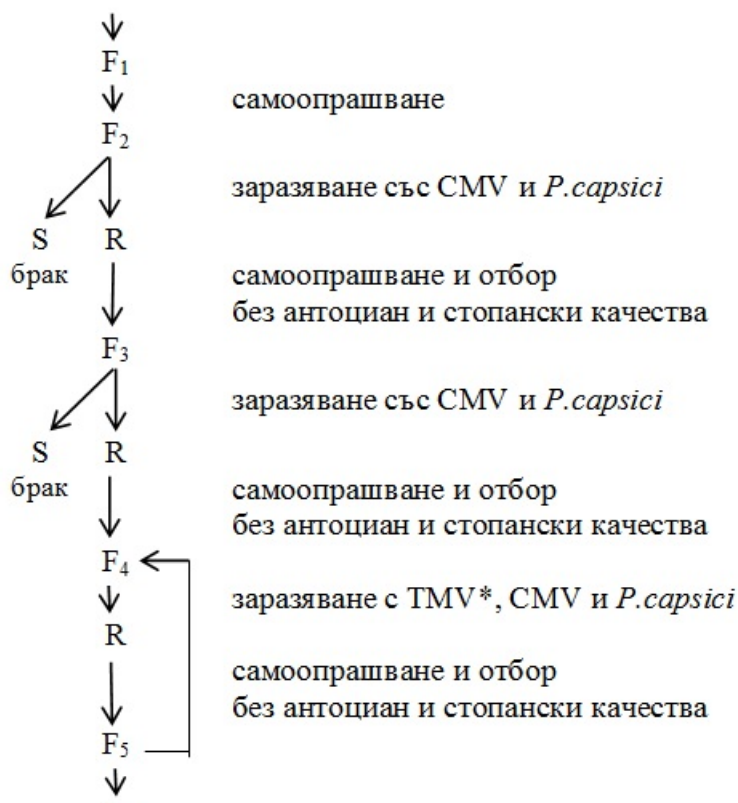
По два стандартни плода от първата беритба от растение (20 бр) са разделени на 4 групи и е анализирана средна проба за всяка група (n-8).

Няма съществено различие в количеството сухо вещество в плодовете на тестираните генотипи пипер (Табл. 9). По съдържание на витамин С, редуциращи захари и ликопен в ботанически зрели плодове, линиите L57 и L64 превъзхождат сорт Куртовска капия и с изключение на редуциращите захари, тези на сорт Албена. Особено значителна е разликата при ликопена, където плодовете на линия L57 съдържат 28.0% и 16.2% повече ликопен от този при Албена и Куртовска капия, същите разлики за L64 са съответно 26.8% и 15.0%. Плодовете на сорт Албена имат по-ниски концентрации β-каротен, докато при останалите три генотипа няма съществени различия. Ниските стойности на ликопен при Албена и Куртовска капия се обясняват с факта, че сортовете са светли капии и плодовете в ботаническа зрялост са червени, докато останалите генотипи са „черни“ капии с тъмночервени плодове, което определя високо съдържание на ликопен.

Характеристика на линии L114, L14 и L16. Линия L114 е създадена след хибридизация на Зл.медал ms-8 с L113 като целта е да се интродуцира устойчивостта към CMV от L113 в Зл.медал ms-8 (Фиг. 10). Линия L113, с храстовидния си хабитус и blocky type тъмнозелени плодове не отговаря на изискванията за отглеждане на полето и на българския пазар. Зл.медал ms-8 е мъжкостерилан аналог на сорт Златен медал. Той е средноранен сорт с висящи плодове, дву- и тристенна капия леко извита на върха с гладка гланцова повърхност. Цветът им е светлозелен до кехлибареножълт, често с антоцианов оттенък в техническа и червен в ботаническа зрялост. Растенията от BC₁(Зл.медал ms-8 x L113) притежават, различаващи се по форма плодове, като преобладава цилиндричната. Част от разсада, след тестиране за устойчивост към CMV е разсаден на полето и е осъществен отбор по стопански качества. Семената от най-едриите плодове, притежаващи форма близка до капия са събрани по отделно. Получените от тях растения са тествани за устойчивост към CMV, като плодовете на едно растение представляват едно отделно поколение. В резултат от отбора по стопански показатели е получена линия L114, която е тристенна тъмнозелена капия и по вкусови качества задоволява изискванията на пазара (Фиг. 13). При отбора по устойчивост към CMV се установи, че линия L114 притежава и гена L1, кодиращ устойчивост към ToMV и TMV, като двата типа устойчивост се наследяват скачено. След стабилизиране на устойчивостта към CMV са тествани растенията за устойчивост и към *P. capsici*. Установено е, че в F6 поколението има разпадане по устойчивост на гъбата. След отбор са получени, неразпадащи по устойчивост към CMV и *P. capsici*, F10 и F11 поколения. Устойчивостта към фитопфтора е към двете форми на болестта кореново гниене и листно увяхване, където инфектирането на пипера става от заразената с гъбата почва и вода, използвана за поливане.

Линия L114 наред с многото положителни качества притежава два основни недостатъка първият е, че не е устойчива на *P. capsici* при разпространение на гъбата по въздушен път и второ, съдържа значително количество антоциан, който влошава търговският вид на подовете. Една от целите на настоящето изследване е създаване на линии безантоцианови двустранни капии, които да се различават по цвят на плодовете в техническа и ботаническа зрялост.

L114 x Алфи/Залфи



Фиг.11. Педигре на линия L16 Fn(L114 x Алфи) и линия L14 Fn(L114 x Залфи)

Както вече е показано, линии Алфи и Залфи притежават устойчивост към характерните за страната популации на *P. capsici*, която не се влияе от начина на разпространение на гъбата. Тази устойчивост към *P. capsici*, успешно е пирамидизирана с устойчивостта към CMV, ToMV и TMV на линия L114 и са получени две нови линии L14 и L16. Паралелно с отбора по устойчивост е провеждан и отбор по стопански качества (Фиг. 11). Една от целите е да се получат линии с по-едри плодове, като се съчетае формата, цвета и дължината на плодовете от Алфи и Залфи с ширината на плода и дебелината на перикарпа от L114. Освен това е провеждан отбор по отсъствие на антоциан. Броят на плодовете при всички генотипи не се различава съществено, но

по-едрите плодове при линии L14 и L16 детерминират по-висок добив в сравнение с този на родителските генотипи и стандартния сорт Албена. Плодовете на двете нови линии са по-дълги от L114, изравняват се с Алфи и Залфи и отстъпват незначително на сорт Албена, за която са характерни дълги плодове (Табл. 10). По ширина на плодовете и дебелина на перикарпа се изравняват с L114 и превъзхождат останалите генотипи пипер.

Табл. 10. Сравнителна характеристика на стопанските качества на линии пипер L114, L14 и L16

Линии сортове	морфологична характеристика на плодовете			добив кг	плодове брой
	дължина см	ширина см	дебелина на перикарпа мм		
L114	11.9±0.75 a	5.0±0.32 b	5.4±0.34 b	0.63±0.025 a	8.3±0.32 a
L14	14.4±0.62 b	4.8±0.45 b	5.3±0.27 b	0.69±0.032 c	8.6±0.23 a
L16	14.2±0.55 b	4.7±0.41 b	5.1±0.32 b	0.66±0.026 b	8.4±0.31 a
Алфи	14.5±0.62 b	3.8±0.37 a	3.7±0.29 a	0.63±0.027 a	8.4±0.27 a
Залфи	14.8±0.43 bc	3.9±0.25 a	3.9±0.31 a	0.64±0.031 ab	8.5±0.33 a
Албена	15.4±0.49 c	4.0±0.33 a	3.9±0.25 a	0.61±0.030 a	8.7±0.28 a

Представени са средните резултати за стандартен плод в ботаническа зрялост и едно растение. Опитът е едногодишен и за всеки генотип са оценявани индивидуално 12 растения (n=12). Семената на сорт Албена са суперелит и са предоставени от чл. кор., дбн Ст. Даскалов.

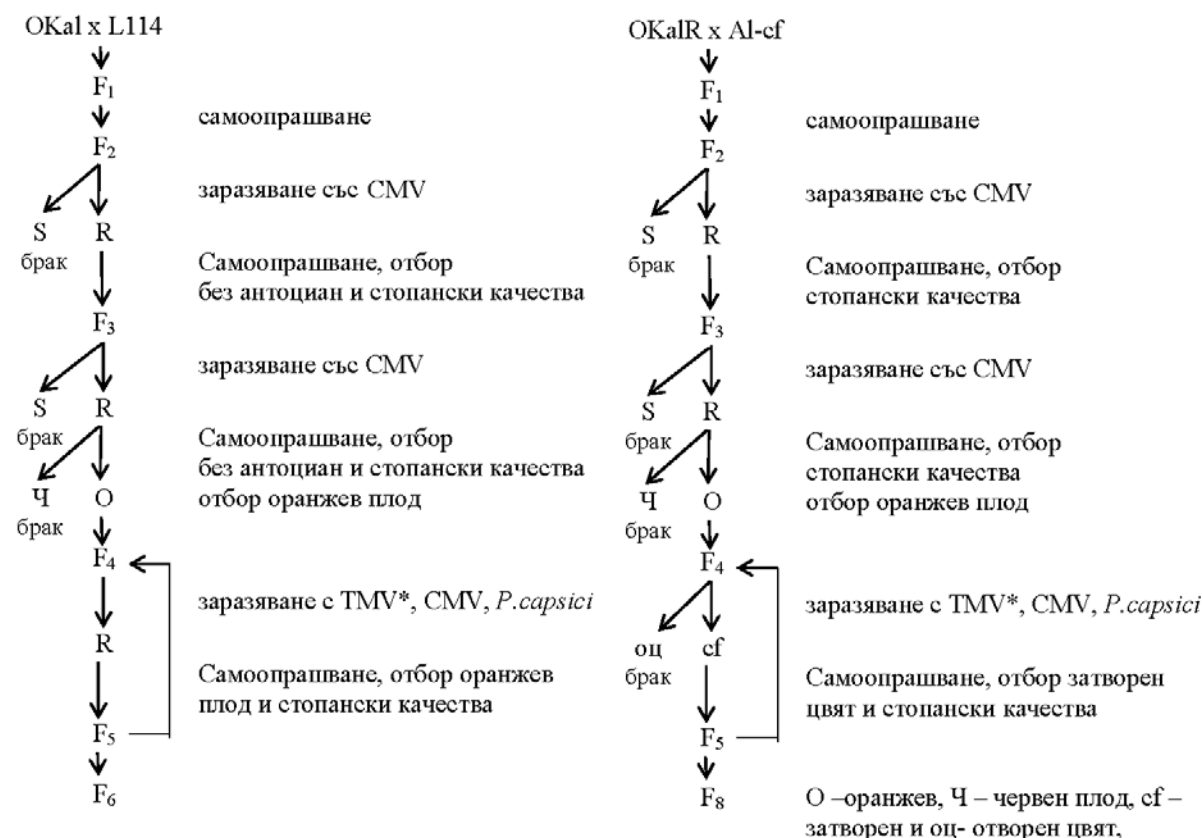
Табл. 11. Количество на ценни хранителни вещества в плодовете на линии L114, L14 и L16

Линии/ сортове	сухо вещество %	витамин С mg %	редуциращи захари %	ликопен mg %	β-каротен mg %
L114	12.2±0.38 b	246.3±5.37 b	5.7±0.33 b	16.6±0.44 b	6.8±0.37 b
L14	11.6±0.41 b	242.1±4.76 b	5.6±0.24 b	16.8±0.51 b	6.9±0.29 b
L16	11.9±0.36 b	240.6±6.62 b	5.3±0.37 a	16.2±0.41 b	6.7±0.24 b
Алфи	10.6±0.44 a	226.3±3.25 a	5.4±0.29 a	15.1±0.36 a	6.4±0.32 a
Залфи	10.8±0.52 a	227.2±3.64 a	5.6±0.26 b	15.7±0.49 a	6.7±0.19 b
Албена	10.9±0.59 a	217.5±4.57 a	5.7±0.34 b	14.9±0.35 a	6.8±0.31 b

По един стандартен плод от първата беритба от растение (12 бр) са разделени на 4 групи и е анализирана средна проба за всяка група (n=4).

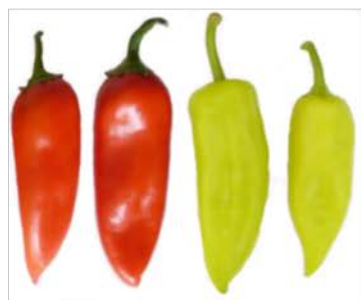
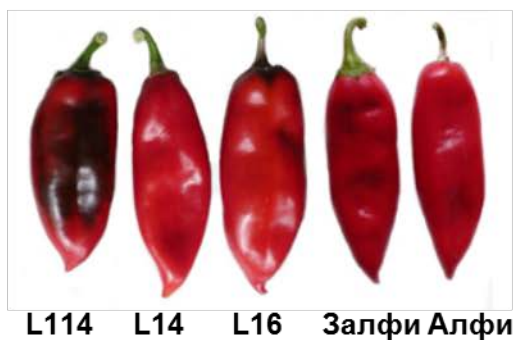
Линиите пипер L14 и L16 се изравняват с родителската линия L114 по съдържание на сухо вещество, витамин С и ликопен, и превъзхождат по тези показатели линии Алфи, Залфи и стандартния сорт Албена (Табл. 11). Съдържанието на редуциращи захари е по-ниско при двете по-светло червени линии, за линия Алфи това се отнася и за количеството на β-каротена. Трите линии, устойчиви на CMV превъзхождат по стойности на ценните хранителни вещества в плодовете, сорт Албена и родителските линии Алфи и Залфи.

Характеристика на линии OKalR и OKalR-cf. Линия OKal е типична двустранна капия с почти бели плодове в техническа зрялост и наситено оранжеви в ботаническа зрялост, но е чувствителна на всички болести. За да се интродуцира устойчивост към CMV, тобамовируси от патотип P0 и *P. capsici* в OKal, е осъществена кръстоската (L114 x OKal).



Фиг. 12. Педигре на линии OKalR Fn(OKal x L114) OKalR-cf Fn(OKalR x Al-cf)

Първите оранжеви плодове са получени в F₃ и отборът продължава само с поколението, получено от тях (Фиг. 12). Тъй като оранжевият цвят се кодира от взаимодействието на два рецесивни гена, то в поколението на оранжевите плодове не



Okal OKaIR OKaI



Фиг.13. Линии пипер, устойчиви на икономически важни болести

Напречен срез на плодове на три- и двустенни капии (1), плод на L114 с антоцианово оцветяване, плодове на Алфи, Залфи и Okal, родителски линии съответно на L16 и L14 и OKaIR.

се наблюдава разпадане по този признак. В F5 едно от растенията е с по-тъмно оранжеви, много на брой, едри плодове и при оценката на качеството, тези плодове бяха подложени самостоятелно на химическия анализ. Данните показват, че стойностите не се различават съществено с изключение на количеството на β -каротена. При другите тествани поколения този показател е от 19.5 до 22.3 мг %, докато при по-тъмно оранжевите плодове е 12.7 мг %. При отбора в следващите поколения се потвърди наблюдението, че в по-наситено оранжевите плодове количеството на β -каротена е по-ниско. Тъй като най-ценният показател на тази линия е именно много високото съдържание на β -каротен (провитамин А), в отбора е пренебрегнат по-добрият търговски вид за сметка на по-светло оранжевите плодове, притежаващи по-висококачествена хранителна стойност (Фиг. 13).

Създаването на линия OKalR-cf, която е аналог на OKalR и се различава от нея по наличието на ген cf, кодиращ опрашване в затворен цвят при пипера, е описано в следващия раздел 8 (Фиг. 14). Тук се сравняват стопанските показатели на 3-те линии с оранжеви плодове със стандартния сорт Албена.

Четири гено типа имат сходен брой плодове и добив (Табл. 12). По отношение на дължината на плода, сорт Албена превишава трите линии, които имат средна дължина 12.2 - 12.4 см. Линиите OKalR и OKalR-cf са наследили от родителската линия L114 по-широки плодове и по-дебел перикарп и тези показатели са по-високи от съответните за линия OKal и сорт Албена.

Табл. 12. Сравнителна характеристика на стопанските качества на линии пипер OKalR и OKalR-cf

Линии сортове	морфологична характеристика на плодовете дължина см	ширина см	дебелина на перикарпа мм	добив кг	плодове брой
OKal	12.3±0.75 a	3.9±0.32 a	3.8±0.34 a	0.60±0.035 a	8.9±0.32 a
OKalR	12.4±0.62 a	4.4±0.45 b	4.6±0.27 b	0.62±0.032 a	8.8±0.23 a
OKalR-cf	12.2±0.55 a	4.2±0.41 b	4.4±0.34 b	0.63±0.026 a	8.6±0.31 a
Албена	15.6±0.49 b	3.8±0.33 a	4.0±0.25 ab	0.62±0.030 a	8.9±0.28 a

Представени са средните резултати за стандартен плод в ботаническа зрялост и едно растение. Опитът е едногодишен и за всеки генотип са оценявани индивидуално 12 растения (n=12). Проведени са 2 беритби в ботаническа зрялост на плодовете.

Табл. 13. Количество на ценни хранителни вещества в плодовете на линии пипер OKalR и OKalR-cf

Линии/ сорт	сухо вещество %	витамин С mg %	редуциращи захари %	β -каротен мг %
OKal	11.2±0.49 ab	236.7±4.78 b	5.5±0.46 a	22.1±0.52 c
OKalR	11.5±0.45 b	237.6±5.42 b	5.4±0.57 a	21.9±0.49 c
OKalR-cf	10.9±0.31 a	239.1±5.33 b	5.5±0.48 a	21.2±0.66 b
Албена	10.7±0.36 a	224.3±4.49 a	5.6±0.61 a	6.6±0.32 a

По един стандартен плод от първата беритба от растение (12 бр) са разделени на 4 групи и е анализирана средна проба за всяка група (n=4).

По отношение на сухото вещество в плодовете, се забелязва по-висока стойност само при OKalR, но и трите оранжеви капии имат по-високо съдържание на витамин С от стандарта (Табл. 13). Няма статистическа доказана разлика в количеството редуциращи захари в плодовете на 4-те генотипа. По съдържание на β -каротен оранжевите плодове на линиите OKal и OKalR превъзхождат 3.3 пъти, а линия OKalR-cf – 3.2 пъти червените плодове на контролата сорт Албена.

8. Създаване на линии пипер със затворени цветове

Пиперът може да се размножава чрез самоопрашване на цветовете, но в природата преобладава кръстосаното опрашване (58-68%), където важна роля играят вятъра и насекомите. Възможността да се предотврати кръстосаното опрашване е

особено ценно за селекционерите и семепроизводителите, където чистотата на популацията на сорта или линията е изключително важна. Subramania & Ozaki (1984) описват появата на едно растение пипер, при което цветът остава затворен по време на антезиса. Те установяват, че това качество се контролира от един рецесивен ген, означен cf.

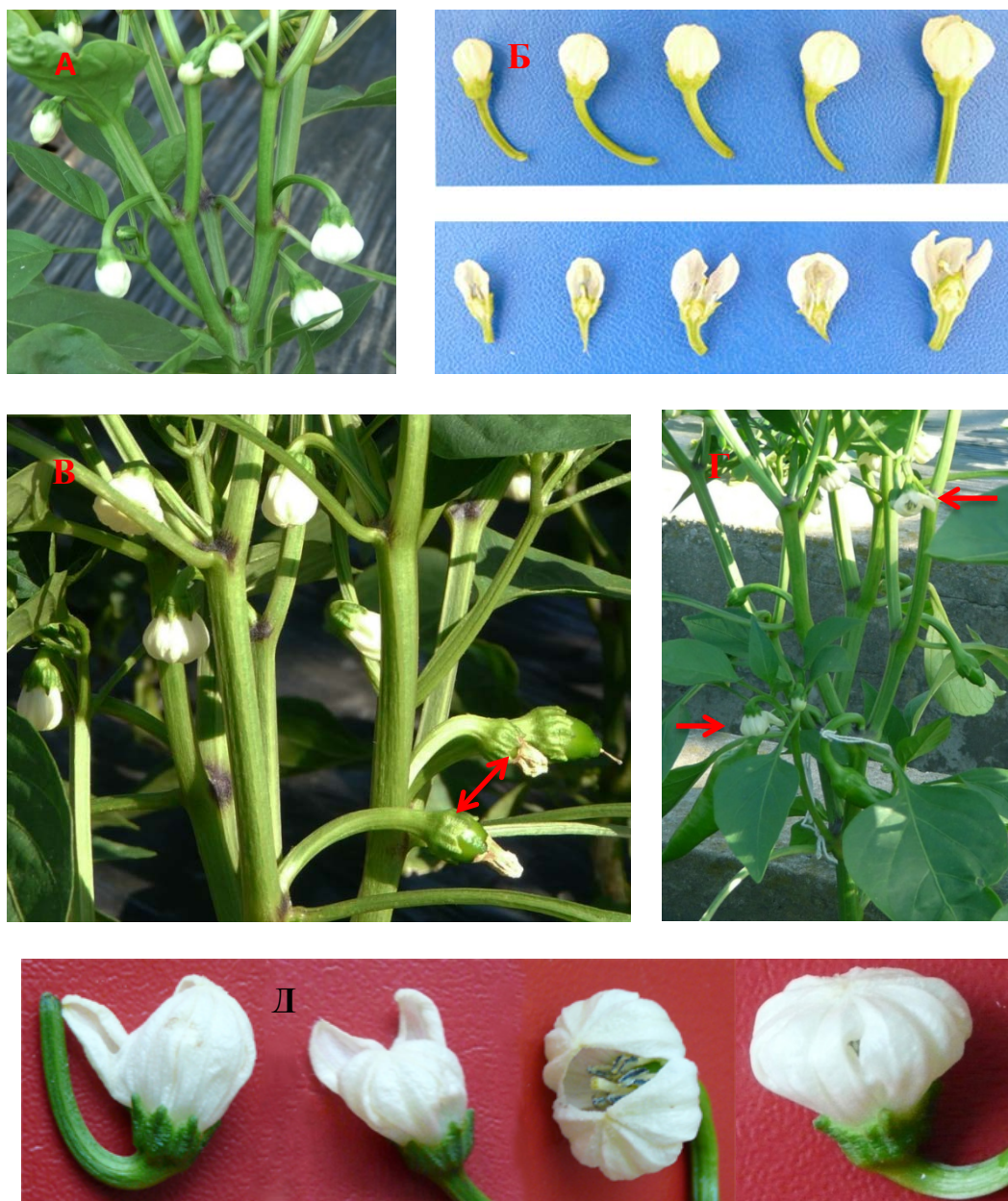
Селекцията и поддържането на чисти линии и сортове при кръстосано опрашването растения е изключително трудоемък процес, при който се получават деформирани в различна степен плодове с малък брой семена, често недостатъчно изхранени. За решаването на този проблем е осъществена интродукцията на гена cf в наши перспективни линии пипер. За целта са използвани, получените от чл. кореспондент, дбн Стефан Даскалов, F2 семена от кръстоската (Албена x L8209-1), където бащата притежава гена cf. Растенията, отгледани от тези семена в преобладаващата част имат отворени цветове и само при две растения отделни цветове, които се маркират, остават затворени до края на тяхното самоопрашване.

Затворените цветове имат балоновидна форма, като дисталният край на венчелистчетата остава скачен до тяхното изсъхване. Венчелистчетата плътно се припокриват странично и проникването на полен и насекоми във вътрешността на цвета е невъзможно, което гарантира самоопрашването на цветовете. От маркираните плодове, развиващи се от затворени цветове са събрани семена от всеки плод по отделно. Проведен е отбор от F2 до F6, до получаване на популация от безантоцианови растения със затворени цветове, по форма приближаващи се до тип капия. Така получената линия F6(Албена x L8209-1), означена като Ал-cf е използвана за прехвърляне на гена cf в линии OKalR, L14 и L16. Целта е да се получат аналози на трите линии, които да са със затворени цветове. В F2 поколението от кръстоските (OKalR x Ал-cf), (L14 x Ал-cf) и (L16 x Ал-cf) е проведен отбор по устойчивост към CMV и само устойчивите растения са разсаждани и при тях е продължен отборът по затворен цвят, размери, форма и цвят на плода и други стопански качества.

При кръстоската (OKalR x Ал-cf) първите оранжеви плодове от устойчиви на CMV растения са получени в F3, а растения с единични затворени цветове в F4. В F7 се появи потомство, в което всички растения са със затворен цвят, плодовете са оранжеви и растенията са устойчиви на ToMV и CMV. Тези качества се запазват и в F8 и това поколение получи името линия OKalR-cf. Цветовете на тази линия първоначално са топчести, после наедряват и се удължават до овални, а след формиране на тичинките и плодника придобиват балоновидна форма (Фиг. 14 А). Първоначално плодът се развива в цвета, след това нараства, като изсъхналите венчелистчета често остават на върха на плодовете, след което падат (Фиг. 14 Б, В).

При кръстоските (L14 x Ал-cf) и (L16 x Ал-cf) основният проблем се оказва получаването на растения със затворен цвят. Първите затворени цветове се наблюдават в F5, като формата на тези цветове се различава от тази при OKalR-cf. Цветовете отначало са топчести и при наедряването си запазват тази форма, след това се разширяват и придобиват камбановидна форма. Като правило това са затворени цветове, но често едно или две венчелистчета се отделят от върха на цвета (Фиг. 14 Г, Д) или връзката между две венчелистчета не е достатъчно здрава и се образува странична цепнатина (Фиг. 14 Д). При двете кръстоски, част от цветовете приемат овална форма, но венчелистчетата са свързани с дръжката в широката част на овала, като се образува широка напречна цепнатина от върха на венчелистчетата до най-широката част на цвета (Фиг. 14 Д). В момента при кръстоските на L14 и L16 с Ал-cf са получени потомства, в които липсват отворени цветове, но растенията имат освен затворени камбановидни цветове и такива с описаните по-горе деформации. Необходимо е да се намерят растения, в които всички цветове имат балоновидна форма, като тази на OKalR-cf, която очевидно е най-добра за осигуряване на изолация на тичинките и плодника на цвета.

Установените различия при получаването на растения със затворени цветове на 3-те линии могат да бъдат обяснени с разлики в генетическия бекграунд на OKal от една страна и L14 и L16 от друга. Обаче фактът, че и при трите линии първоначално



Фиг. 14. Растения OkalR-cf (А) със затворен цвят, откъснати цветове цели и надлъжен разрез (Б), плодове с изсъхнали венчелистчета на върха (В), растения от аналог на L14 със затворен камбановиден цвят (Г) и дефектни цветове (Д)

се получават растения със затворени, частично затворени (цвят под формата на камбана отворен отдолу) и напълно отворени цветове не може да се обясни с разлики в генома (Фиг. 14). Най-вероятно и онтогенетичното развитие на растенията влияе върху честотата на поява на затворени цветове. Първите цветове, които се развиват са затворени, в средния пояс на растенията имат отворени, частично отворени и затворени цветове, а най-късно появилите се цветове са отворени. След появата на растения с отворени и затворени цветове при (OKalR x Al-cf) е проведен тригодишен отбор и са получени растения, при които всички цветове са затворени. Subramania & Ozaki (1984), описват гена cf като рецесивен без да споменават едновременната поява

на отворени и затворени цветове на едно растение, нито за вариране във формата на цветовете.

В резултат на многогодишна работа са създадени две (L57 и L113) неразпадащи по устойчивост към CMV линии пипер с различен произход, генетичен контрол и експресия на устойчивостта. Линия L113 е източник на устойчивост към CMV, тобамовируси от патотип P0 (TMV, ToMV) и частична устойчивост към *P. capsici* при създаване на линии L114, L14, L16 и OKalR. Устойчивостта към *P. capsici* е повишена в много висока степен при линии L14 и L16, чрез пирамидизиране на гени от Залфи и Алфи. В линия L57 е интродуциран генът L3 и е създадена линия L64, устойчива на CMV и тобамовируси от патотип P0, P1 и P1.2 (TMV, ToMV, PaMMV и PMMoV). Всички нови линии притежават много добри стопански показатели и се различават по форма (дву- или тристранни капии), цвят на плодовете в техническа и ботаническа зрялост. Те могат да се включат в селекционните програми при пипера за създаване на устойчиви на болести сортове, без да влошават стопанските показатели, с което скъсяват значително времето, необходимо за успешна селекция. Тези линии обогатяват генофонда на пипера, с типична за страната форма дву- и тристранни капии с тъмнозелени, зелени, светлозелени и бели плодове в техническа зрялост и червени, тъмночервени и оранжеви плодове в ботаническа зрялост.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторът благодари на Държавния фонд за научни изследвания за финансовото подпомагане на изследванията, включени в настоящата дисертация по следните договори:

- Двустранно международно сътрудничество България-Македония - BM-1/05 (2005-2008)
- Национални научни програми - Б-603/96 (1996-2000) , СС-901/99 (2000-2005), СС-1610/06 (2006-2010) и Б-02/4 (2014, текущ)

ИЗВОДИ

1. Създадени са линии L57 и L113, устойчиви на CMV и произлизащи съответно от Българска и Холандска популация едроплоден пипер. L113 реагира с HR на заразяване със CMV и устойчивостта ѝ е по-стабилна от тази на L57.
2. Доказано е, че основният механизъм на устойчивост към CMV е свързан с предотвратяване проникването на вирионите във флоема и транспорта на вируса на дълги разстояния.
3. Показано е, че фенотипната експресия на устойчивостта зависи от дозата на гена, геномния бекграунд, температурата на отглеждане, концентрацията и количеството на внесения вирус и др. фактори.
4. Установено е, че устойчивостта към CMV в L113 се контролира от един доминантен ген *Smv11.3*, разположен в 11 хромозома в непосредствена близост с ген L1, контролиращ устойчивост към тобамовируси от патотип P0. Двата гена се наследяват като скачени и са частично свързани с ген за устойчивост към *P. capsici*, разположен в същия клъстер.
5. Доказано е, че в L57 устойчивостта към CMV се наследява непълно доминантно, кодира се от един ген *Smv11.4*, разположен в 11 хромозома, който е частично свързан с ген L+. Генът е скачен с локуса на един от гените за устойчивост към *P. capsici*, но в отблъскваща (repulsion) фаза.
6. Устойчивостта към патогени на линия L113 е интродуцирана в мъжкостерилната линия Златен медал ms-8 и е получена линия L114, която е устойчива на CMV, TMV, ToMV и *P. capsici* (разпространявана чрез почвата). Линия L114 е тристранна капия с тъмнозелени плодове, в ботаническа зрялост тъмночервени.
7. Пирамидизирана е устойчивостта към патогени от L114 и тази към *P. capsici* на линии Алфи и Залфи, съответно в линии L16 и L14. Те са устойчиви на CMV, TMV, ToMV и *P. capsici* (разпространена по почвен и въздушен път). Линии L16 и

L14 са безантоцианови двустенни капии, съответно със светлозелени и зелени плодове, които след узряване са червени.

8. Интродуцирана е устойчивостта към патогени от L114 в безантоциановата, оранжева двустенна капия OKal и е създадена линия OkalR, устойчива на CMV, TMV, ToMV и *P. capsici* (разпространена чрез почвата), която е аналог по вкусови и стопански качества на OKal.
9. За първи път генът за клейстогамия cf е интродуциран в едроплодна линия пипер и е получена линия OkalR-cf, която не се различава по устойчивост на болести и стопански показатели от родителската линия OkalR, но е със затворени цветове, което гарантира самоопрашване и улеснява нейното семепроизводство.
10. Устойчивостта към тобамовируси (ген L3) от сорт Novaris е пирамидизирана с тази към CMV на линия L57 и новосъздадената линия L64 е устойчива на CMV, TMV, ToMV, PaMMV и PMMoV от патотип P1.2. Линии L57 и L64 са ранозрели, тристранни капии с тъмозелени и тъмочервени плодове.
11. Всички новосъздадени линии не отстъпват на стандартните сортове пипер по добив, брой и морфологични показатели на плодовете, а по количество на сухо вещество, витамин С, ликопен и β -каротен в плодовете ги превъзхождат.
12. Линиите са подходящи за ранно и средноранно производство на пипер и са ценни източници на комплексна устойчивост към болести за селекционните програми при тази култура.

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. За първи път в България са получени два генотипа пипер с различен произход, генетичен контрол и експресия на устойчивостта към CMV, с които са създадени линии пипер, различаващи се по комбинация от гени за устойчивост към CMV, тобамовируси и *P. capsici*. Установен е генетичния контрол на устойчивостта към патогените на всички нови линии, което е необходимо условие за изработване на оптимална схема на хибридизация и отбор.
2. Новосъздадените линии пипер притежават много добри стопански показатели и използвани в програми по създаване на сортове пипер с комплексна устойчивост на икономически най-важните болести не влошават стопанските показатели, с което скъсяват значително времето, необходимо за успешна селекция.
3. Новите линии обогатяват генофонда на пипера с типичната за страната форма дву- и тристранни капии с тъмозелени, зелени, светлозелени и бели плодове в техническа зрялост и червени, тъмочервени и оранжеви плодове в ботаническа зрялост. Линиите са подходящи за ранно и средноранно производство на пипер и част от тях могат да бъдат предложени за изпитване в ИАСАС, и включени в сортовата листа на тази култура.

Списък на публикациите свързани с дисертацията

1. Mihailova B., Stoimenova E., Petrov P., Stoyanova-Bakalova E. 2013. Movement of cucumber mosaic virus in resistant pepper lines. C. R. Acad. Bulg. Sci 66 (6), 911-918.
2. Mihailova B, Stoimenova E., Ilieva E., Daskalov S. 2001. Breeding sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) lines with complex resistance to cucumber mosaic virus and *Phytophthora capsici*. XI EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Antalya, Turkey, 370-374.
3. Михайлова Б., Стоименова Е. 2015. Гени за устойчивост към тобамовируси в линии пипер. Science & Technologies, 5 (6), 55-59.

Участия в конференции

1. Mihailova B., Kartzeva T., Stoimenova E. 2014. Sweet pepper line with complex diseases resistance, good nutritional quality and cleistogamy. PPGAC CONFERENCE 2014: PLANT PHYSIOLOGY AND GENETICS Achievements and Challenges, Sofia, Bulgaria. Награда на международното жури