GOMBAREZISZTENS SZŐLŐ GENOTÍPUSOK MOLEKULÁRIS AZONOSÍTÁSA

Doktori értekezés

Katuláné Debreceni Diána

Gödöllő

2011

Doktori iskola: Növénytudományi Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Heszky László
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet

Tudományterület: 4. Agrártudományok

Tudományága: 4.1. Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Témavezető: Dr. Kiss Erzsébet
Intézetigazgató egyetemi tanár, a mezőgazdasági tudomány kandidátusa

Társtémavezető: Dr. Kozma Pál
Tudományos főmunkatárs, a mezőgazdasági tudomány kandidátusa
PTE Szőlészeti és Borászati Intézete, Pécs

…… ……
Dr. Kiss Erzsébet Dr. Kozma Pál
témavezető társtémavezető

…….
Dr. Heszky László
a Doktori Iskola vezetője

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke ... **4**
1. Bevezetés és célkitűzés ... **5**
2. Irodalmi áttekintés ... **9**
2.1 A szőlő eredete, származása (*Vitis vinifera* L.) ... 9
2.2. A *Muscadinia* Planch. alnemzetség: *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small ... 11
2.3. Molekuláris filogenetikai vizsgálatok ... 12
2.4. A liszthármat és a peronoszpóra kártétele és biológiája ... 14
2.4.1. Liszthármat [*Erysiphe* (syn. *Uncinula*) *necator* (Schwein.) Burrill] ... 14
2.4.2. Peronoszpóra [*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni] ... 16
2.5. A kórokozókkal szembeni rezisztencia típusai ... 18
2.5.1. Az *mlo* rezisztencia ... 19
2.6. A szőlő hagyományos rezisztencianemesítése ... 20
2.7. Molekuláris rezisztencianemesítés szőlőben ... 24
2.7.1. Amerikai *Vitis* fajok alkalmazása a rezisztencia nemesítés során ... 28
2.7.2. Ázsiai *Vitis* fajok és *V. vinifera* fajták alkalmazása a rezisztencia nemesítés során ... 34
3. Anyag és módszer ... **43**
3.1. Növényanyag ... 43
3.2. DNS izolálás ... 49
3.3. PCR körülmények és a vizsgálatokban szereplő markerek ... 50
3.4. Az ALF-Express II. készülék ... 54
3.5. A mikroszatellit allélméretek meghatározása ... 55
3.6. Mikroszatellit allélméretek statisztikai értékelése és dendrogram szerkesztése ... 57
4. Eredmények és megvitatásuk ... **59**
4.1. Marker alapú szelekció alkalmazása különböző hibridpopulációkban ... 59
4.1.1. 06-1-es populáció: VRH 3082-1-42 BC_4 x ‘Kismis vatkana’ ... 59
4.1.1.1. A *Ren1* génnel kapcsolt markerek ... 61
4.1.1.2. A *Run1* génnel kapcsolt markerek ... 62
4.1.1.3. Az *Rpv1* génnel kapcsolt markerek ... 65
4.1.1.4. Multiplex PCR és agaróz gélelektroforézis ... 69
4.1.2. 06-3-as populáció: *Vitis vinifera* ‘Génuai zamatos’ x *Vitis vinifera* ‘Kismis vatkana’ ... 73
4.1.3. 07-12-es populáció: (*Vitis vinifera* ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’) x (*Vitis vinifera* ‘Katta kurgán’ x *Vitis vinifera* ‘Perlette’) ... 74
4.2. PM QTL analízis ... 76
4.2.1. Liszthármat QTL-lel kapcsolt SSR markerek alkalmazása ... 76
4.2.2. Liszthármat QTL-lel kapcsolt SCAR marker alkalmazása ... 79
4.2.2.1. Magyar nemesítésű rezisztens fajták jellemzése a ScORA7-760 markerrel ... 81
4.3. Különböző fajták jellemzése rezisztencia génekkel kapcsolt markerekkel ... 84
4.4. Ázsiai származású fajták mikroszatellit analízise ... 86
4.5. *V. vinifera* specifikus markerrendszer kidolgozása ... 90
4.5. Új tudományos eredmények ... 95
5. Következtetések, javaslatok ... **97**
6. Összefoglalás ... **99**
MELLÉKLETEK ... **105**
Irodalomjegyzék ... **108**
Köszönetnyilvánítás ... **121**

Rövidítések jegyzéke

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
ALF: Automated Laser Fluorometer
BAC: Bacterial Artificial Chromosome
BC: back cross
Bp: Bázispár
BSA: Bulk Segregant Analysis
CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CC: coiled coil
DM: downy mildew
DNS: Dezoxiribonukleinsav
dNTP: Dezoxiribonukleotid trifoszfat
EST: Expressed Sequence Tag
GENRES 081: European Network for Grapevine Genetic Resources, Conservation and Characterisation of Grape Genetic Resources
HR: hiperszenzitív reakció
IGGP: International Grape Genome Program
INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, Franciaország - www.international.inra.fr
LG: linkage group
LOD: logarithms of odds
LRR: Leucine-Rich Repeat
LTR: Long Terminal Repeat
MAS: Marker Assisted Selection
MGR: major-gene-resistance
Mla: mildew resistance locus-*a*
mlo: mildew resistance locus-*o*
NBS: Nucleotide-Binding Site
PCR: Polymerase Chain Reaction
PM: powdery mildew
PR: pathogenesis related
OIV: Office International de la Vigne et du Vin
QR: quantitative resistance
QTL: Quantitative Trait Locus
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
rDNS: riboszomális DNS
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RGA: Resistance Gene Analog
Ren: Resistance to *Erysiphe necator*
Rpv: Resistance to *Plasmopara viticola*
Run: Resistance to *Uncinula necator*
SCAR: Sequence Characterised Amplified Region
SSR: Simple Sequence Repeat
TIR: *Toll*-interleukin1 receptor
UPGMA: Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Means
VMC: Vitis Microsatellite Consortium
VRH: *Vitis x rotundifolia* hibrid

1. Bevezetés és célkitűzés

A szőlő ültetvények termésbiztonságát biotikus (vírusok, baktériumok, gombák és kártevők) és abiotikus (pl. szárazság, fagy) tényezők egyaránt veszélyeztethetik. Ezek közül leginkább a gombás fertőzések csökkentik a terméshozamot, valamint a bogyók és a bor minőségét, ezért a szőlő termesztése megfelelő és hatékony növényvédelem nélkül ma nem oldható meg. A kijuttatott nagy mennyiségű fungicid terheli a környezetet, ártalmas az ember egészségére és nagyon költséges (Magyarországon 1 ha szőlőültetvény növényvédelmének költsége 100 000 Ft, amiben nincsen benne a gép és eszközhasználat üzemi költsége). Rezisztens és kiváló minőségű fajták előállításával ez a probléma kiküszöbölhető vagy legalábbis csökkenthető, aminek nemcsak gazdasági jelentősége kiemelkedő, hanem a környezetvédelem szempontjából is rendkívül fontos.

A szőlő gomba betegségei közül a lisztharmat veszélyezteti a termést a legnagyobb mértékben, ennek oka, hogy a fertőzéshez nem igényel specifikus időjárási körülményeket, pl. megfelelő páratartalmat és hőmérsékletet, mint például a peronoszpóra. A mai szőlőtermesztés számára nélkülözhetetlen a kéntartalmú vagy a szterol bioszintézis gátló fungicidek használata. A legtöbb szőlőtermesztő minimum 6-10 alkalommal permetezni kénytelen, hogy megvédje termését a lisztharmat kártételétől, ami akár 90% termésveszteséget is okozhat. Franciaországban évente 75 millió euro-t költenek csak lisztharmat elleni gombaölőszerekre, amelyekkel szemben ráadásul ellenálló törzsek megjelenése is várható.

A nagy károkat okozó gombabetegségekkel szemben rezisztens új szőlőfajták előállítása azonban idő- és forrásigényes folyamat, mivel a keresztezéseket követően az utódnemzedék fenntartása nagy területet vagy üvegházat igényel, művelése és gondozása költséges, továbbá szigorú művelési technológiára és mesterséges fertőzésekre van szükség. A rezisztencia génekkel kapcsolt DNS alapú markerek alkalmazása jelentősen csökkentheti az üvegházi és a szabadföldi kísérletek volumenét, mivel korán, már a csírázást követően lehetővé teszi a kívánt gént hordozó magoncok kiválogatását, ezáltal az utódpopuláció méretének csökkentését. Az utóbbi években jelentős előrehaladás történt azoknak az eszközöknek a kifejlesztésében, amelyek lehetővé teszik a markerekre alapozott szelekciót (MAS) a szőlőben. A szőlő genom telítése molekuláris markerekkel, kapcsoltsági térképek szerkesztése, és a kívánt genotípusra történő direkt szelekció ma már mind megvalósítható.

Végül a *Vitis vinifera* L. genom szekvenálása hozzájárulhat a gazdaságilag fontos gének, pl. rezisztencia gének fizikai térképezéséhez.

A szőlő két legfontosabb gombabetegségével (*Erysiphe necator* Schwein. Burr, *Plasmopara viticola* Berk. et Curtis) szembeni tartós rezisztencia kialakításának egyik módszere a rezisztencia gének halmozása (piramidálása) a legértékesebb genotípusokba, ami megbízható molekuláris markerek nélkül csak több évig tartó utódvizsgálattal valósítható meg.

A PTE Szőlészeti és Borászati Intézetében Kozma Pál és munkatársai a rezisztencia gének kombinálására különböző hibridpopulációkat állítottak elő.

A hibridcsaládok közül a következőket vizsgáltuk: BC_4 (VRH 3082-1-42) x *Vitis vinifera* 'Kismis vatkana', BC_4 x *Vitis vinifera* 'Kismis moldavszkij', *Vitis vinifera* 'Génuai zamatos' x *Vitis vinifera* 'Kismis vatkana', (*Vitis vinifera* 'Dzsandzsal kara' x 'Laszta') x (*Vitis vinifera* 'Katta kurgán' x *Vitis vinifera* 'Perlette').

A hagyományos európai *V. vinifera* fajták nem rezisztensek a lisztharmat és a peronoszpóra ellen, azonban a fajták fogékonysága között eltérések vannak. Az 1960-as évek közepéig nem azonosítottak ellenálló *V. vinifera* fajtákat, ezért vad *Vitis* fajokat alkalmaztak rezisztenciagén forrásként. Az egyik ilyen vad faj a *Muscadinia rotundifolia* Michx. Small, amely domináns lisztharmat (*Run1*) és peronoszpóra (*Rpv1*) rezisztencia génekkel rendelkezik. A Bouquet (1986) által előállított *M. rotundifolia* x *V. vinifera* BC_4 hibridet Kozma és munkatársai *V. vinifera* fajtákkal keresztezték rezisztens fajták előállítására.

A 'Dzsandzsal kara'-t írták le először lisztharmat ellenálló fajtaként, később azonban többet is azonosítottak, köztük a 'Kismis vatkana'-t, amelyben a domináns *Ren1* gén felelős a rezisztenciáért. A tartós rezisztencia elérése céljából kombinálták a rezisztencia géneket: a *M. rotundifolia* x *V. vinifera* BC_4 hibridcsaládot (*Run1 és Rpv1* gén) keresztezték a 'Kismis vatkana'-val (*Ren1*), melynek eredményeképpen az utódnemzedékben olyan egyedeket szelektálhatunk, amelyek mindhárom gént hordozzák (*Run1/Rpv1/Ren1* genotípusok).

Munkánk során különböző eredetű (*Muscadinia rotundifolia-Run1, Rpv1, V. vinifera-Ren1,* és 'Seyve-Villard' PM QTL-ek) lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia géneket tartalmazó egyedeket szelektáltunk a hasadó hibridpopulációkban SSR, CB (BAC könyvtár alapján tervezett) és SCAR (RAPD marker alapú) markerekkel, illetve vad *Vitis* fajokat és fajtákat jellemeztünk a markerek alapján.

Célkitűzések:

1. BC_4 x ‘Kismis vatkana’ hibridpopuláció (BC_5) halmozott rezisztenciagéneket hordozó genotípusok szelekciójára alkalmas módszer kidolgozása; multiplex PCR alkalmazásával *Run1/Rpv1/Ren1* genotípusok szelekciója egy lépésben, majd az ellenálló és fogékony egyedek agaróz gélen történő rutinszerű elkülönítése;
2. Olyan marker alapú szelekciós módszer kidolgozása, amelyek más populációkban is alkalmazhatóak;
3. (*Vitis vinifera* ‘Dzsandzsal kara’ x *Vitis* hibrid ‘Laszta’) x (*Vitis vinifera* ‘Katta kurgán’ x *Vitis vinifera* ‘Perlette’) hibridpopuláció rezisztencia génjeinek követése molekuláris markerekkel; a lisztharmat rezisztens ‘Kismis vatkana’ és ‘Dzsandzsal kara’ rezisztencia génjeinek összehasonlítása;
4. Magyar nemesítésű rezisztens fajták jellemzése lisztharmat QTL-lel kapcsolt markerekkel;
5. A lisztharmat rezisztens fajták (‘Dzsandzsal kara’, ‘Kismis vatkana’) tiszta *V. vinifera* eredetének bizonyítására *V. vinifera* specifikus markerrendszer kidolgozása.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A szőlő eredete, származása (*Vitis vinifera* L.)

A szőlő termesztésbe vonására 6-8000 évvel ezelőtt kerülhetett sor.

A fosszilis maradványok szerint a ma termesztett szőlőfajok ősei, a *Cissites*ek feltehetően a felső krétakorban, 100 millió évvel ezelőtt jelentek meg. Ebből a nemzetségből származtatják a mai is élő tíz szőlőnemzetséget, a *Cissus,* az *Ampelocissus,* a *Clematocissus,* a *Parthenocissus,* a *Rhoicissus,* az *Ampelopsis,* a *Landukia,* a *Tetrastigma,* a *Pterisanthes,* és a *Vitis* nemzetségeket. Ezeknek a nemzetségeknek a kialakulása szintén a felső krétakorra tehető. Harmadkori (kb. 30 millió éves) szőlőmaradványokat Magyarországon is találtak: *Vitis hungarica* (Eger mellett), *Vitis tokaiensis* (Erdőbénye), a *Vitis aestivalis* Michx. (Mikófalva, Sály), *Vitis teutonica* A. Braun (Mád, Tállya). Az utóbbiak a ma élő észak-amerikai fajokkal mutatnak rokonságot a morfológia bélyegek (pl. levélalak) alapján. Ezek az "ősszőlők" egyáltalán nem hasonlítottak a ma ismert lédús, zamatos, illatos borszőlőre. Valószínűleg kemény zöldbogyós, kesernyés, savanyú levű vad gyümölcsök lehettek (Csepregi és Zilai 1988).

A földrészek vándorlása, és önálló kontinensekké alakulása következtében a szőlőfélék jól elkülöníthető földrajzi csoportokká fejlődtek. A két kontinens fajainak (amerikai és eurázsiai) fejődésére nagy hatással voltak a környezeti feltételek, mind az éghajlati tényezők, mind a biológiai környezet. Ennek hatására jellegzetes morfológiai bélyegek és fenológiai sajátosságok alakultak ki. Az amerikai kontinensen csak azok a fajok maradtak meg, amelyek az ott elterjedt kártevőknek és betegségeknek ellenálltak. A szőlőnek jelenleg három nagy földrajzi csoportját különböztetjük meg (Bényei és Lőrincz 2005). Az észak-amerikai fajok, mintegy 30, a kelet-ázsiai fajok (40) és végül az eurázsiai fajok, amelyek ugyan csak 2 fajjal képviseltetik magukat, mégis a világ borászatának alapjául szolgáltak.

A harmadidőszak elején alakult ki a *Vitis* nemzetség két alnemzetsége, a *Muscadinia* és az *Euvitis*. A két alnemzetség tulajdonságaiban jól elkülönül egymástól, ami arra enged következtetni, hogy őseik régen, az eocén időszakban (kb. 30-50 millió évvel ezelőtt) elváltak a fejlődés folyamán. Míg az *Euvitis* alnemzetség fajait főleg az északi-féltekén, a mérsékelt éghajlatú területeken, Európában, Ázsiában és Észak-Amerikában találjuk meg, addig a *Muscadinia* három faját Észak-Amerika déli, meleg éghajlatú tájain (Florida, Mexikó).

Az utolsó nagy jégkorszak nagy pusztítást vitt véghez az eurázsiai virágos növények között. Az egyik nagy túlélő, a ligeti szőlő (*Vitis silvestris* Gmel.) volt, amelynek az őshazája valahol Közép-Ázsia és a Kaukázus közt kereshető, de találtak lelőhelyeket a Balkánon és Észak-Afrikában is (Csepregi és Zilai, 1988). A Kaukázus fekete-tengeri partvidéke különösen gazdag *V. silvestris*-ben. A ligeti szőlő a jégkorszak után, 7-8 ezer évvel ezelőtt terjedt el, és az ember hamar gyűjtögetni, majd termeszteni, nemesíteni kezdte. Ennek eredményeképpen fürtjei, bogyói nagyobbak lettek, a leve zamatosabb, édesebb lett, és létrejött a kerti szőlő, *V. vinifera*, amely lényegében a ma ismert borszőlők alapja. A *V. vinifera* morfológiai és biológiai jegyeiben annyira eltér a kiindulási őstől, a *V. silvestris*-től, hogy a növényrendszertanban önálló fajként szerepel. Arra nézve, hogy a termesztésbe vont *V. silvestris* faj hogyan alakulhatott át kerti szőlővé (*V. vinifera*), valószínűsítik, hogy a váltivarú *V. silvestris* a belterjes művelés, metszés, öntözés és a szelekciós nyomás hatására változatokban gazdagodott. A változás során nagy jelentőségű volt a hímnős virágú típusok megjelenése, ami a termesztés hatására rügymutációval és kereszteződéssel jöhetett létre, mint az a nemrég (80-150 éve) termesztésbe vont *V. amurensis* Rupr. és *M. rotundifolia* fajoknál is megfigyelhető.

A *V. vinifera* fajták nagy földrajzi kiterjedése és az egyes fajták eltérő morfológiai és biológiai jellemzői szükségessé tették a fajon belüli rendszerezést. Németh Márton (1967) származás szerinti fajtarendszerében felhasználta Andrasovszky (1926), Marton (1944), Negrul (1946) és Levadoux (1956) eredményeit, azokat bővítette, továbbfejlesztette:

1. Convarietas pontica (pontuszi, Fekete-tenger melléki változatcsoport), amelyhez sok hungarikum fajtánk tartozik, pl.: a ‘Furmint’, ‘Hárslevelű’, ‘Ezerjó’, ‘Kéknyelű’, de ilyen a ‘Kadarka’, a ‘Kövidinka’, az ‘Izsáki sárfehér’ is. Jellemzői: a levél fonáka és a vitorlalevél erősen gyapjas, a mag kicsi vagy középnagy, és a fajták általában fagyérzékenyek. A legkorábban ez a fajtacsoport alakult ki Nyugat- és Kelet-Grúziában, valamint Kis-Ázsiában. Kiindulási formája a helyi ligeti szőlő a *V. silvestris* var. *typica* var. *balcanica.* A fajtacsoport jelenlegi elterjedési területe nem túl nagy, Magyarországon ennek fajtái (pl. ‘Furmint’, ‘Kadarka’, ‘Hárslevelű’) a legelterjedtebbek bőtermőségük, gyors növekedésük, igen jó regenerálódó képességük miatt.

2. Convarietas orientalis (keleti változatcsoport), melyek között több ismert magyarországi fajtánk is szerepel (‘Juhfark’, ‘Leányka’, ‘Kékfrankos’). Jellemzői: a levél fonáka csupasz,

legfeljebb az erek serteszőrösek, a vitorlalevél csupasz és fényes, a mag középnagy vagy nagy, csőre hosszú és a nagybogyójú fajták fagyérzékenyek, a többi közepesen tűri a fagyot. A *V. vinifera* termesztési területének határán jöttek létre az ókori elő-ázsiai szőlőtermesztő államokban, a Kaszpi-tengerrel határos területek ligeti szőlőjéből (*V. silvestris* Gmel. var. *abberans*). A keleti fajtacsoportot a recesszív tulajdonságok jellemzik, convar. *orientalis* subconvar. *caspica* például az 'Oportó', 'Leányka' és a Chasselas-félék. A convar. *orientalis* subconvar. *antasiatica* későbbi eredetű, ezek nagy fürtű, nagy, húsos bogyójú csemegeszőlőfajták, pl. 'Nimrang', 'Icskimar', 'Afuz Ali', 'Katta kurgan', továbbá a provar. *apirinea* magvatlan fajták, pl. 'Szultanina', 'Kismis vatkana'.

3. Convarietas occidentalis (nyugati változatcsoport), ide tartozik a 'Pinot', 'Chardonnay', 'Olaszrizling', 'Rajnai rizling', 'Merlot', 'Sauvignon blanc', a 'Semillon', a 'Veltelini' és a 'Cabernet'. Jellemzői: a levél fonáka és a vitorlalevél pókhálós vagy gyapjas, a mag kicsi és a csőre rövid, a fajták fagytűrése viszonylag jó (Csepregi és Zilai 1988). A nyugati fajták kiindulási formái a helyi ligeti szőlők (*V. silvestris*) és az azokkal természetes hibrideket képező pontuszi fajták lehettek. Ez a legfiatalabb fajtacsoport (Kozma 2002).

2.2. A *Muscadinia* Planch. alnemzetség: *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small

A *Vitis* L. nemzetség képviselői az északi féltekén élnek. A nemzetséghez tartozó fajokat egyrészt a *Muscadinia* Planch., másrészt az *Euvitis* Planch. alnemzetségbe soroljuk. A *Muscadinia* fajok megjelenésüket és termesztési értéküket tekintve jelentősen különböznek az *Euvitisektől*.

A *Muscadinia* alnemzetség három faja, a *M. rotundifolia*, a *M. munsoniana*, és a *M. popenoii* az Amerikai Egyesült Államok déli, szubtrópusi és trópusi vidékein élnek (Florida, Texas, Dél-Georgia), de megtalálhatók Mexikó egyes tájain is.

Termesztési jelentősége egyedül a *M. rotundifolia*-nak van. Hermafrodita virágú mutánsok felfedezése után (Dearing 1917) elkezdődött a faj nemesítése. Nagyszámú, szelekcióval és az alnemzetségen belüli hibridizációval előállított fajtája terjedt el a termesztésben (pl. 'Eden', 'James', 'Thomas'). Termése friss fogyasztásra alkalmas, a bogyók édesek, sajátságos ízűek, bor, dzsem, és szörp is készíthető belőle. Ma már több mint 30 fajtája ismert (Bényei és Lőrincz 2005). Melegigényes, a tőkéi erős növekedésűek. Vesszőjében nincs ízválasztó (diafragma), bélrésze vékony. Levele kicsi, szív alakú vagy

kerekded, alig tagolt. A kacsok egyszerűek, nem ágaznak el. Virágzata aránylag kevés, 3-30 virágból áll, a virágok funkcionálisan hím- vagy nővirágúak, kétlakiak. Termésfürtjeik kicsik, bogyóik középnagyok, vagy nagyok, vastag héjúak, kemény húsúak, különböző időben érnek, beérve folyamatosan lehullanak a fürtről (Csepregi és Zilai 1988).

A *Muscadinia* világszerte értékes alapanyagul szolgál a szőlőnemesítés számára, hiszen a legtöbb szőlőt károsító kórokozóval (peronoszpóra, liszttharmat) és kártevővel (filoxéra) szemben immunitás értékű rezisztenciával rendelkezik (Olmo 1986). Alkalmazzák mind alanyként, mind a keresztezéses nemesítésben. *Euvitis*ekkel való hibridizációja nehézkes, nem találkozunk természetes hibridjükkel, és mesterségesen is nehéz előállítani a keresztezést. A genetikai akadályt a két nemzetség közötti eltérő kromoszómaszám, és a homológ kromoszómák hiánya jelentik. Kromoszómaszámuk (2n=40) az *Euvitis* alnemzetségbe tartozó fajoktól (2n=38) eltérő. Az *Euvitis*ekkel csak akkor keresztezhetők, ha a *Muscadinia* az apa, az *Euvitis* az anya, de a siker a genotípustól, a *V. vinifera* fajtától is függ. Részben fertilis utódokat kapott Jelenkovic és Olmo (1968), és sikeresen visszakeresztezték *V. vinifera*-val, így lehetővé vált a *Muscadinia* genetikai bázisának kiaknázása a szőlő rezisztencianemesítésben (Olmo 1971).

2.3. Molekuláris filogenetikai vizsgálatok

A virágos növények filogenetikai kapcsolatainak feltárásával több kutatócsoport is foglalkozott (Chase et al. 1993, Soltis és Soltis 1997, Savolainen et al. 2000).

A legtöbb molekuláris filogenetikai vizsgálat kloroplasztisz (*rbcL* - Chase et al. 1993) mitokondrium (18S rDNS - Soltis és Soltis 1997) és/vagy nukleáris genom szekvenciák és más nem DNS karakterek jellemzésén, összehasonlításán, illetve ezek kombinációján, például morfológiai, biokémiai markerek (Nandi et al. 1998) és kloroplasztisz *atpB* és *rbcL* gének kombinációján (Savolainen et al. 2000) alapulnak. Több száz növényfaj majd 1000 jellemzőjét vizsgálták, ezzel az egyik legnagyobb filogenetikai analízist végezték el. A kapott eredményeket Soltis et al. (1997) foglalták össze. A főbb származási ágakat, elágazásokat (nodes) sikerült megrajzolni, de még mindig maradtak kérdőjelek. A teljes kloroplasztisz genom szekvencia (Goremkyn et al. 2003, 2004, 2005) gazdag tárházát nyújtja a zárvatermők családfájának pontos és alapos megszerkesztéséhez.

A Rosids a zárvatermők egyik legnagyobb növényrendszertani csoportja, a virágos növények mintegy harmadát teszi ki. Egy illetve több génen alapuló molekuláris filogenetikai

vizsgálatok 7 fő kládot azonosítottak a Rosids-on belül, bár az egyes csoportok között a rokonsági viszonyok még tisztázatlanok maradtak (Savolainen et al. 2000, Soltis et al. 2000, 2003). Az egyes taxonok akkor alkothatnak egy kládot, ha azok monofiletikus eredetűek. A Rosids név a „Rosidae" rendszertani néven alapul, amit általában alosztálynak tekintenek. A *Vitaceae* család rokonsági viszonyai még nem tisztázottak, úgy tűnik, nincs egészen közeli rokona. Az 'Angiosperm Phylogeny Group' (2009) a családot a Rosids kládba helyezte, azon belül a saját rendjébe, a *Vitales*-be. Jansen et al. (2006) szekvenálták a *V. vinifera* teljes kloroplasztisz genomját. A kapott adatokkal megállapították 27 zárvatermő faj rokonsági viszonyát, valamint azt, hogy a *Vitis* kloroplasztisz genom mind méretében, mind felépítésében (gének sorrendje) nagy hasonlóságot mutat más, már korábban szekvenált zárvatermő kloroplasztisz genomokkal. Eredményeikkel megerősítették a *Vitaceae* család helyét a Rosids kládon belül, és azt, hogy legkorábban vált szét a többi taxontól.

Wen et al. (2007) sejtmagi *GAI1* (Gibberellic Acid Insensitive) gén szekvenciák alapján tervezett primerek segítségével szerkesztettek *Vitaceae* törzsfát. Eredményeiket összehasonlították a korábban, kloroplasztisz markerekkel kapott filogenetikai fákkal (Soejima és Wen 2006), és azokkal egybehangzóak voltak. A *Vitaceae* családon belül három fő klád különült el. Az első nagy csoport tagjai: *Ampelopsis, Rhoicissus, Cissus striata* komplex (dél-amerikai fajok), *Parthenocissus, Yua, Vitis, Ampelocissus* és *Pterisanthes*. Ez a klád körülbelül 240 fajt foglal magába, főként az északi féltekéről. A második klád tagjai a *Cissus*-ok, körülbelül 350 fajjal, a trópusokról (Ázsia, Afrika, Ausztrália, Csendes-óceáni térség). A harmadik kládhoz tartoznak a *Cayratia, Tetrastigma, Cyphostemma,* körülbelül 350 fajjal.

Verriés et al. (2000) szőlő alkohol-dehidrogenáz (*Adh*) génbe ékelődött LTR (long terminal repeat)-retrotranszpozont azonosítottak, amit *Vine-1*-nek neveztek el. Céljuk a *Vine-1* retrotranszpozon és az *Adh* gazdagén jellemzése volt a *V. vinifera* 'Danuta' fajtában. Különböző *V. vinifera* fajtákat, illetve *Vitis* fajokat vizsgáltak, hogy megtalálható-e a *Vine-1* inszerció a genomjukban. Szekvencia-analízissel megállapították, hogy az általuk azonosított *Adh*r gén egyik tagja az *Adh* multigén családnak, de nem egyezik meg a szőlőben eddig leírt *Adh* génekkel. A *Vine-1*, bár hiányos, mégis a legteljesebb LTR- típusú retrotranszpozon elem, amit *V. vinifera*-ban találtak. 2392 bp hosszú, két majdnem azonos LTR-rel (287 bp) a végeken, direkt ismétlődő 5 bp-nyi 'gazda' DNS határolja. A *Vine-1* elem azonosan helyezkedett el az *Adh*r génben a különböző *V. vinifera* fajtákban, míg a vad *Vitis* fajokban nem. Ez az adat arra enged következtetni, hogy a *Vine-1* inszerció *V. vinifera* specifikus, tehát az *Adh* izogének szétválása után, de még a fajták fejlődése előtt ment végbe.

2.4. A lisztharmat és a peronoszpóra kártétele és biológiája

2.4.1. Lisztharmat [*Erysiphe* (syn. *Uncinula*) *necator* (Schwein.) Burrill]

Európában, 1847-ben Angliában figyelték meg először a betegséget. A kórokozót fertőzött szaporítóanyaggal hurcolták be Észak-Amerikából, hamarosan egész Európában elterjedt. Magyarországon csak a múlt századforduló vége felé jegyeztek fel jelentősebb károkat. Az utóbbi időben a szárazabb évjáratokban súlyos kártételek alakultak ki. Tartósan meleg, párás időben 80-100%-os fürtkár is keletkezhet.

A lisztharmat az *Ascomycota* törzs, *Ascomycetes* osztály, *Erysiphales* rend, *Erysiphaceae* családba tartozik. A betegség a *Cissus, Parthenocissus* és a *Vitis* fajokon fordul elő. Az amerikai fajok kevésbé fogékonyak, ezeken csak ősszel tapasztalható erősebb fertőzés (Glits és Folk 1993).

A kórokozó morfológiája és biológiája: a gomba biotróf, külső élősködő. Ivartalanul láncokban fejlődő konídiumokkal szaporodik. Ivaros spórája kleisztotéciumban fejlődő aszkospóra. A kleisztotéciumban több aszkusz található, a függelékek pásztorbotszerű kampóban végződnek. A kórokozó a fertőzött rügyekben micélium alakban telel át. Aszkospórás fertőzés is előfordulhat de ez utóbbi jelentéktelen. Rügyfakadás után azonnal várható a károsítás, a tünetek azonban csak a virágzás után válnak feltűnővé.

A betegség lefolyása, tünetei: a betegség tüneteit a szőlő valamennyi zöld részén megfigyelhetjük. A levél színén kezdetben alig észrevehető sárgászöld elszíneződésű foltok jelennek meg, felületükön finom bevonat látható. Néhány fajtánál a kezdeti folt nekrotizálódik. Később a levél felületén már erőteljesebb szürkésfehér micélium bevonat fejlődik, amely fokozatosan a levél fonákára is ránő, és a levélen fekete kleisztotéciumok is képződnek. A levéllemez meggörbül, a levél elszárad majd, lehullik. A fertőzött virágok nem kötődnek, lehullanak, így a tünet rejtve marad. Amennyiben a lisztharmat nem pusztította el a virágokat, a kórokozó a fejlődő zöld bogyókat fertőzi.

A fürtön a leggyakoribb a betegség, amelynek tünete a bogyókon a virágzástól egészen a szüretig megjelenhet. A zöld bogyókon lisztes micélium bevonat képződik, és a zöld bogyók felületén barna színű parásodás indul meg (**1. ábra**). A megkeményedő bogyóhéjat a növekedő bogyó felszakítja, a bogyó felreped, a magok kilátszanak, ún. sérves bogyó keletkezik. A gomba nem jut be a bogyó belsejébe csak a felületen telepszik meg, és tapadókorongok szívják ki a tápanyagot. A fürtkár járványos években akár 100% is lehet. Az előző évi fertőzés tünete az egyéves vesszőn is jól felismerhető, barnásvörös, összefüggő vagy hálózatos elszíneződések formájában. Ez azért fontos, mert a vesszők téli bonitálása alapján a

betegség előző évi elterjedtségére, és a következő évben várható mértékére is következtethetünk.

A beteg rügy jelentős fertőzési forrás, amelyben a gomba micéliuma áttelel. A fertőzött rügyekből a hajtások felületére nő a gomba. Ezeket a hajtásokat primer, vagy elsődlegesen fertőzött hajtásoknak nevezzük. Felületükön láncokban konídiumok fejlődnek. Ezekkel jut át a gomba az egészséges hajtásokra, melyeket szekunder vagy másodlagosan fertőzött hajtásoknak hívunk. A gomba szétterjedését az egész vegetációban a légáramlás segítségével elrepülő konídiumok végzik. A konídiumok csírázása 15-27°C hőmérséklet és 96% relatív páratartalom esetén optimális. A konídiumok ekkor néhány óra alatt csíráznak, és 5-6 nap múlva már újabb konídiumláncok fejlődhetnek.

Járványok keletkezéséhez a párás és meleg időjárás a kedvező, esős, csapadékos időjárás a betegség számára kedvezőtlen. Ezzel magyarázható, hogy a lisztharmat okozta járvány idején a peronoszpóra, peronoszpórás években pedig a lisztharmat kártétele a kevésbé jelentős.

1. ábra: Lisztharmat súlyos kártétele fogékony *V. vinifera* szőlőfajta fürtjén, üvegházi felvétel (a felvételt Dr. Hoffmann Sarolta készítette).

2.4.2. Peronoszpóra [*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni]

A betegséget Észak-Amerikában 1837-ben írták le először. Innen szőlővesszők közé került levelekkel hurcolták be Európába, először Franciaországban észlelték 1878-ban. A szőlő egyik leggyakoribb és legveszélyesebb betegsége. A szőlő valamennyi föld feletti részén, ahol működőképes sztóma van (levél, fürt, a fürt különböző részei, kacs) megtalálható a betegség tünete.

A peronoszpóra az *Oomycetes* osztály, *Peronosporales* rend, *Peronosporaceae* családjába tartozik. Nem a valódi gombákhoz tartozik (rajzóspórái kétostorosak; a valódi gombák - *Eumycota* - törzsébe tartozó gombáknak nincs ostoros fejlődési alakjuk), obligát parazita, táptalajon nem tenyészthető. A szőlőperonoszpóra a *Vitaceae* család fajain fordul elő. A *Cissus, Parthenocissus* fajok csaknem teljesen ellenállóak. A *Vitis* fajok közül az amerikai és az ázsiai fajok rezisztenciája nagyfokú.

A kórokozó morfológiája és biológiája: az elsődleges fertőzési források az áttelelt levelekben képződő oospórák. A téli csapadék hatására az oospórák szabaddá válnak a mozaikos levelekből, érés után kicsíráznak, ún. makrokonídiumot fejlesztenek, amelyekből 35-40 haploid, két csillangós rajzóspóra szabadul ki. Esőcseppekkel verődnek fel a fiatal hajtásokra, levelekre. A sztómákon keresztül a sejtközötti járatokban szétterjed a gomba egysejtű hifája, hausztóriumokat fejleszt és ezek segítségével elvonja a gazdanövény sejtjéből a tápanyagokat. Ennek szemmel látható jele az olajfoltok megjelenése. A lappangási idő végére az olajfoltoknak megfelelően a levél fonákán kifejlődik a zoosporangiumtartó gyep. A zoosporangiumtartókon képződnek a tojásdad alakú zoosprangiumok, melyek megérve leválnak a tartóról, felnyílnak, és belőlük 4-6 két csillangós rajzóspóra szabadul ki. Vízben élénk mozgással eljutnak a sztómákhoz, letelepedve csíratömlőt fejlesztenek és a sztómán keresztül behatolnak a sejt közötti járatokba, és ezzel újabb ivartalan ciklus kezdődik. A fertőzés folyamatos az egész vegetációs periódusban. Augusztustól a mozaikos levelekben oospóra képződés figyelhető meg. Az ivaros úton keletkező oospóra áttelel a lehullott levelekben és tavasszal megindítja a fertőzést.

A betegség lefolyása, tünetei (**2. ábra**): a fiatal levél színén tavasszal kör alakú sárgászöld olajfoltok jelennek meg. A levél fonákán az olajfoltoknak megfelelően fehér színű penészgyep (zoosporangiumtartó) látható. A foltokban a levélszövet megbarnul és elszárad. A vegetáció második felében az idősebb leveleken a sárgászöld olajfoltok lényegesen kisebbek, erek által határoltak, szögletesek, a fonákon gyéren fejlődik zoosporangiumtartó gyep. A

foltok elhalása után a levél jellegzetesen mozaikos kinézetű. A mozaikos szövetekben képződnek az oospórák.

A fürt a fürtvirágzat megjelenésétől kezdve egészen a borsómag nagyságú bogyók kifejlődéséig hasonló tünetekkel betegszik meg. A fürtkocsány, a fiatal bogyók sárgászöld színűvé válnak, és felületükön dús fehér sporangiumtartó-gyep képződik. A fürtkocsány és a bogyók elszáradnak. A bogyó a kocsány felől fertőződik meg, szürke, majd barna, lilásbarna színűekké válnak, összetöppednek és megszáradnak. A töppedő bogyók belső szövetei már a betegség első szakaszában megbarnulnak.

A legjelentősebb fertőzési forrást a szőlő talajon fekvő áttelelt beteg levélmaradványai jelentik. Ezekben a gomba oospórái telelnek át. Jelentős fertőzési forrás még a júniusi monszun esőkkel, délről elsodródó sporangiumok tömege is. Az oospórák tavasszal akkor indulnak fertőzésnek, ha a napi középhőmérséklet eléri a 10-13°C-ot, és az éjszakai hőmérséklet sem csökken 10-11°C alá, továbbá egy vagy két napon belül legalább 10 mm csapadék hullik (Glits és Folk 1993). A szőlőperonoszpóra lappangási ideje, azaz az oospórával történő fertőzéstől az olajfoltok megjelenéséig eltelő időszak, elsősorban a levegő hőmérsékletének függvénye.

2. ábra: 06-1 (*M. rotundifolia* x *V. vinifera*) BC_4 x 'Kismis vatkana' keresztezéséből származó hibridcsalád peronoszpórafertőzésre igen fogékony magonca (OIV kód 452: 1 fokozat) (a felvételt Dr. Hoffmann Sarolta készítette).

2.5. A kórokozókkal szembeni rezisztencia típusai

A rezisztencia nemesítés fő törekvése a betegségekkel szemben tartós rezisztenciát hordozó fajták előállítása. A rezisztenciát akkor nevezhetjük tartósnak, ha a fajta ellenálló-képessége akkor is megmarad, ha a betegség terjedésének tartósan kedvező környezeti feltételei vannak. A tartós rezisztenciát kontrollálhatja egy vagy több gén (McDonald és Linde 2002).

A tartós rezisztencia kialakításának több útja lehetséges, amely függ a gazdanövény és a patogén kölcsönhatásától. A növényben meglévő természetes ellenálló-képesség, a rezisztencia formáit osztályozhatjuk aszerint, hogy a rezisztencia a kórokozó megtelepedése vagy a betegség kialakulása ellen hat. A rezisztencia lehet nem specifikus, azaz horizontális, ilyenkor a kórokozó valamennyi törzse ellen védettséget ad, és lehet specifikus, azaz vertikális, amikor csak egy bizonyos patogén törzs ellen hat (Gáborjányi és Király 2007).

A specifikus vagy más néven kvalitatív ellenálló-képesség, ami hiperszenzitív reakcióban (HR) nyilvánul meg, genetikailag meghatározott kórokozó-növény kapcsolatokban működik. A „gén-génnel szembeni rezisztencia” elméletet Flor (1971) definiálta len-rozsda interakció tanulmányozásával. Mind a fajtarezisztenciát, mind a kórokozótípus változását gének határozzák meg. Ez az alapja a „gén a génnel szembeni rezisztencia” elméletnek, ami azt jelenti, hogy csak az a kórokozó képes fertőzni az adott növényfajtát, amelynek a kórokozó-képességért felelős géntermékeit (elicitorok) a növény specifikus receptorai képesek felismerni. Ha a növényi receptor felismeri az elicitorokat, beindítja a növény védelmi mechanizmusát és a sejt azonnali halálát okozza, ezáltal lokalizálja a kórokozót. Mivel mind a patogenitást (kórokozó-képességet), mind a betegségrezisztenciát több gén is szabályozhatja, a növények ellenálló-képessége változatos képet mutat.

A gén-génnel szembeni rezisztenciát más néven major-gene-resistance-nek (MGR) is nevezik, miután a hatása nagyfokú és hatékony, és csak az ellen a patogén populáció ellen hat, amelyik az elicitort termeli. Ennek a mechanizmusnak hátránya, hogy gyakran előfordul az, hogy a korábban rezisztens fajta fogékonnyá válik, mert új kórokozó típusok vagy rasszok jelennek meg.

Egy másik genetikailag szabályozott rezisztencia típus, amikor a növények különböző vegyületeket termelnek, mint pl a fitoalexinek, PR (’pathogenesis related’) fehérjék, kitinázok. Ezt a válaszreakciót nevezik kvantitatív rezisztenciának (QR) vagy minor gene rezisztenciának.

A MGR esetében a tartós rezisztencia kialakításának útja, hogy megpróbálnak minél több major rezisztencia gént egy egyedben halmozni, remélve, hogy a patogénben nem következik be mutáció minden egyes rezisztencia gén ellen. Ezzel a módszerrel sikeres eredményeket értek el árpa esetében, amelynél a *Rhynchosporium secalis* gomba ellen 3 gént egyesítettek egy fajtában (Raman et al. 2001).

A QR egyik hátránya, hogy a rendszer nagyon érzékeny a környezeti feltételekre. Bár itt a patogénben bekövetkező mutáció nem okoz rezisztencia csökkenést, mégis megfigyelték, hogy a rezisztencia tartóssága csökken. A tartós rezisztencia kialakítását a QR és MGR gének egy egyedben történő akkumulációjával, halmozásával érhetjük el (McDonald és Linde 2002). Szőlőben Eibach et al. (2007) alkalmazott sikeresen marker alapú szelekcióval (MAS) génhalmozást. A VHR3082-1-42 hibrid ((*M. rotundifolia x V. vinifera*) BC_4) és a 'Regent' német fajta keresztezésével hoztak létre olyan utódpopulációt, amely tartalmazta a *M. rotundifolia* eredetű *Run1* (Resistance to *Uncinula necator*) és *Rpv1* (Resistance to *Plasmopara viticola*) géneket és a 'Regent' fajtából származó kvantitatív lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia géneket (QTL-eket). Az utódok vizsgálatánál magasabb fokú rezisztenciát állapítottak meg.

Tartós rezisztencia létrehozása, a rezisztencia gének halmozása, az MGR és QR gének kombinálásával egy genotípusba, megbízható molekuláris markerek nélkül nem valósítható meg. A követni kívánt tulajdonsággal szorosan kapcsolt markerekkel lehetővé válik a korai szelekció. A marker alapú szelekció nélkülözhetetlen, hogy elkerüljük a hatalmas hasadó populációk fenntartását, és az egyedek ismételt fenotipizálását.

2.5.1. Az *mlo* rezisztencia

Gabonafélék esetében gyakran fordul elő a gombák elleni rezisztencia megnyilvánulásaként papilla képződés. A *de novo* szintetizálódott fizikai akadályok, gátak mint pl. a sejtfal helyi megvastagodása, a papillaképződés, ami a sejtfalnak azon a részén fordul elő, ahol a patogén érintkezik a gazda sejttel, hozzájárulnak a rezisztenciához. A papilla főként kallózt és lignint tartalmaz, de fehérjék, szuberin és szilícium-oxidokok is rakódnak bele. Szőlő esetében a kallóz lerakódás körülbelül 5 nappal a mesterséges fertőzést követően jelenik meg, és mind a toleráns, mind a szenzitív genotípusokban megtalálható (Kortekamp et al. 1997). Az árpában azonosított *mlo* gén (Jørgensen 1992) által meghatározott lisztharmat rezisztencia is papillaképződéssel jár. A papilla akkor hatékony a

védekezés során, ha antimikrobiális hatású fenolok és hidrogén-peroxid is felhalmozódik benne, ami kompatibilis esetben nem fordul elő (Hückelhoven et al. 1999). Lisztharmat-fogékony árpában egy kalciumkötő fehérje, a kalmodulin kapcsolódik az *Mlo* gén által kódolt fehérjéhez. Ennek hatásásra kalcium áramlik a sejtbe, és ezzel megakadályozza a védelmi mechanizmusok beindulását, a rezisztencia kialakulását. A lisztharmat rezisztencia az *Mlo* fehérje hiányában lép fel, ami egy pontmutáció (*mlo*) következménye. Ebben az esetben a fogékonyság nem passzív, hanem indukált, aktív jelenség. Piffanelli et al. (2004) izolálta az *mlo-11* allélt. A tavaszi árpa *mlo* rezisztenciája egyike a természetben előforduló, vad típusú *Mlo* gén „természetes" géncsendesítési jelenségének. Az árpa lisztharmat rezisztenciájának genetikai vizsgálata azt mutatja, hogy a mutáns *mlo* allél széles spektrumú, tartós rezisztenciát biztosít a kórokozó ellen (Freialdenhoven et al. 1996). Ezt később Arabidopsisban (*Arabidopsis thaliana*) (Consonni et al. 2006) és paradicsomban (*Solanum lycopersicum*)(Bai et al. 2008) is igazolták.

Az *Mlo* alapú rezisztencia pontos mechanizmusa még nem tisztázott. Szőlő esetében Winterhagen et al. (2008) és Feechan et al. (2009) 17 feltételezett *Mlo* gént azonosítottak a megszekvenált *V. vinifera* (Jaillon et al. 2007, Velasco et al. 2007) genom felhasználásával. Génexpressziós vizsgálatokkal igazolták, hogy a *VvMlo* család tagjai különbözőképpen válaszolnak a biotikus és az abiotikus stimulusokra. *E. necator* fertőzést követően 14 *VvMlo* gén íródott át különböző szövetekben (hajtáscsúcs, bimbó, virág és levél) és 2 mutatott magasabb transzkripciós aktivitást. Filogenetikai vizsgálatok azt mutatják, hogy ez a két PM fertőzésre indukálódó *VvMlo* gén a paradicsomban (*SlMlo1*) és az Arabidopsisban (*AtMlo2, AtMlo6, AtMlo12*) már korábban azonosított *Mlo* génekkel mutat rokonságot.

2.6. A szőlő hagyományos rezisztencianemesítése

Magyarországon a szőlő rezisztencianemesítése 1949-ben kezdődött a Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetben, amelynek peronoszpórával, lisztharmattal és szürke rothadással szemben rezisztens fajták előállítása volt a célja, illetve, hogy leváltsák a gyenge minőségű direkttermő szőlőfajtákat. A programot Kosinsky Viktor, majd Csizmazia D. József vezette (Hajdu 2003). Rezisztenciagén-forrásként a franko-amerikai hibridek szolgáltak, amelyek előállításához észak-amerikai vad szőlőfajokat használtak fel (Kozma jr. 1999). Az észak-amerikai *Vitis* fajok peronoszpóra és lisztharmat rezisztenciája poligénikusan öröklődik.

Rezisztens szőlőfajták előállítására különféle keresztezési partnereket használtak fel a korabeli nemesítők. Ilyen megközelítés pl. a direkttermő fajták (amerikai x amerikai), a rezisztens alanyfajták (amerikai x amerikai) használata, majd a rezisztens interspecifikus (amerikai x európai) hibridek előállítása. A direkttermő elnevezés azt jelenti, hogy ezeket a fajtákat oltás nélkül is lehet termeszteni, gyökerük ellenáll a filoxérának. Az amerikai nemesítők vad *Vitis* fajokat használtak fel a különböző keresztezésekhez: pl. *V. aestivalis*-t a 'Herbemont' fajtához, *V. labrusca*-t a 'Concord' és az 'Izabella'-hoz, a 'Taylor' a *V. riparia, V. labrusca* és a *V. monticola* hibridje, a 'Noah' a 'Taylor' magonca. Feltehetően a direkttermők felelősek a lisztharmat, a peronoszpóra és a filoxéra behurcolásáért Európába. A direkttermők hátránya, hogy az ellenállóság és a minőség negatív korrelációban állnak egymással. Az EU-ban nem lehet a direkttermőkből bort készíteni (pl. 'Noah', 'Izabella', 'Othello', 'Clinton', 'Herbemont'), sem bor előállítás céljából új szőlőt telepíteni. Ennek oka a bor gyenge minősége, a jellegzetes ún. poloskaíze, és a borban lévő nagyobb pektintartalom, ami az erjedés során metil-alkohollá alakul át.

Az alany-előállítás terén a francia, és a magyar nemesítők értek el nagy sikereket. Ahhoz, hogy kötött talajon szőlőt lehessen termeszteni, elkerülhetetlen az alanyhasználat. Francia nemesítési alapanyagból kiindulva Magyarországon a XX. század elején, Villányban Teleki Zsigmond, majd később fia, Teleki Sándor állított elő értékes alanyfajtákat. A legfontosabbak a *V. berlandieri* Planch. és a *V. riparia* Michx. keresztezéséből származnak. A világon ma is legelterjedtebb magyar alanyfajta a 'Berl. x Rip. T. 5C'. Keszthelyen a 70-es években Bakonyi Károly és munkatársai állították elő a 'Georgikon 28' alanyfajtát, 'Berl. x Rip. T. K. 5BB' alanyfajtákat *V. vinifera*-kal keresztezve. A fajta mésztűrése és filoxérával szembeni ellenállósága kiváló, államilag még nem elismert, törzskönyvezése az EU-ban folyamatban van. Európában még Németországban (Fuhr, C. Börner nemesítők), Ausztriában (F. Kober) és Franciaországban, Bordeaux-ban (R. Pouget) foglalkoztak alany-előállítással (Hajdu 2003).

Az interspecifikus hibridek nemesítése Franciaországban indult el az XX. század első felében, amerikai fajok és eurázsiai fajták keresztezésével. Ezek a termőhibridek jobb minőségűek, mint a direkttermők, illetve a gombás betegségekkel szemben (peronoszpóra, lisztharmat) ellenállóak voltak. A hibridek a nemesítők neve és különböző kódszámok alapján terjedtek el pl. Couderc nemesítő keresztezései a 'Couderc 503' (Százszoros) és 'Couderc 7120', Baco fajtái a 'Baco 1' és 'Baco 22'. A legszélesebb körben elterjedt interspecifikus fajták a 'Seibel', 'Seyve Villard'-ok. Ezeket a hibrideket később Magyarországon is felhasználták Egerben, Kecskeméten rezisztens fajták előállítására. Seibel francia nemesítő

hibridjei pl. ‘S 4643’ (‘Roi des noirs’, ‘Pannonhalmi kék’), ‘S 4986’ (‘Rayon d’Or’ vagy ‘Roi des blanc’), ‘S 5279’ (‘Aurora’ vagy ‘Feri szőlő’ – Magyarországon Orosz Ferenc termesztő terjesztette, innen kapta nevét), ‘S 7053’ (Bényei és Lőrincz 2005). Ez utóbbi fajtát több nemesítő is felhasználta szülőpartnerként rezisztens fajták létrahozására, pl. ‘Seyve Villard’ fajták (Franciaország), ‘Regent’ (Pedigréje: ‘Diana’ x ‘Chambourcin’ (‘Seyve Villard 12417’ x ‘Chancellor’=‘Seibel 7053’; Németország). A ‘Seyve Villard’ fajták közül az ‘SV 12375’-öt (fehér bort adó), az ‘SV 18315’-öt, és az ‘SV 12286’-ot (vörös bort adó) kell kiemelni. Az ‘SV 12375’ fajtát ‘Villard blanc’ néven termesztették Franciaországban, mindhárom gombabetegséggel (peronoszpóra, lisztharmat, szürkepenész) szemben ellenálló, származása: 56% *V. vinifera*, 3% *V. labrusca*, 30% *V. rupestris*, 6% *V. berlandieri*, 5% *V. lincecumii* (Striem 2000). A ‘Villard blanc’ és a ‘Villard noir’ (‘SV 18315’) voltak a legelterjedtebb ‘Seyve Villard’ fajták Franciaországban az 50-es években (Csepregi és Zilai 1988).

Magyarországon Egerben Csizmazia D. József és Bereznai László állított elő először rezisztens hibridfajtákat a ‘Seyve Villard 12286’ és a ‘Seyve Villard 12375’ felhasználásával. Kiváló minőségű *V. vinifera* fajtákkal (pl. ‘Csabagyöngye’, ‘Gárdonyi Géza’, ‘Medoc noir’, ‘Bouvier’) keresztezve hozták létre a ‘Nero’, ‘Zala gyöngye’, ‘Bianca’, ‘Göcseji zamatos’ (‘Rita’), ‘Medina’, ‘Suzy’, ‘Lakhegyi mézes’ fajtákat. Kecskeméten Szegedi és munkatársai által előállított interspecifikus hibridek a ‘Pölöskei muskotály’, ‘Teréz’, ‘Sarolta’ (KM. 309), ‘Eszter’ (R. 65), ‘Lidi’ (R.66), ‘Lilla’ (R.68). Kozma Pál és munkatársai nevéhez fűződnek a ‘Duna gyöngye’, ‘Viktória gyöngye’, ‘Csillám’, ‘Palatina’ fajták.

Koleda István és Tamássy István az ázsiai eredetű *V. amurensis* és *V. vinifera* keresztezéséből nemesítette a fagytűrő és peronoszpórával szemben ellenálló ‘Kunleány’ és ‘Kunbarát’ fajtákat (utóbbi nincs szaporításban) (Koleda 1968, Korbuly 1998). A *V. amurensis* származékairól később kiderült, hogy oligogénikus peronoszpóra rezisztenciával rendelkeznek.

A franko-amerikai hibridek és származékaik felhasználásával igen nehéz keresztezéses nemesítéssel egy genotípusban kombinálni a különböző rezisztenciáért és a jó minőségért felelős géneket, mivel a minőségi tulajdonságok is poligénikusan öröklődnek. Emiatt a nemesítők az elmúlt száz év során nem alkalmazhatták a visszakeresztezési módszert, hanem a legjobb rezisztens hibrideket és fajtákat egymás között keresztezték. Így lassú volt a minőséget illetően a genetikai haladás.

A XX. században a szőlőrezisztencia nemesítésben a legjelentősebb sikereket a francia nemesítők érték el. Az 1960-as évek elején szőlőterületük több mint 30%-án termesztettek

rezisztens fajtákat. Ezekben a fajtákban az észak-amerikai *Vitis* fajokat (2n=38) használták rezisztenciagén forrásként.

A *M. rotundifolia* (2n=40), amely szubtrópusi vidékről származik (Florida, Mexikói öböl), kiemelkedően fontos ebben a vonatkozásban, mivel nemcsak a legfontosabb gombabetegségekkel, hanem egyes baktériumokkal, filoxérával és fonálférgekkel szemben is immunis, illetve nagyfokú rezisztenciával rendelkezik. Mind a lisztharmat (Bouquet 1986), mind pedig a peronoszpóra (Staudt és Kassemeyer 1995) elleni nemesítési programokba bevonták (Kozma és Dula 2003, Merdinoglu et al. 2003).

A PTE Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet (Pécs) a nemesítési programjába 1999-ben vonta be a *M. rotundifolia* hibrideket, amelyeket Franciaországból hoztak be.

A *M. rotundifolia* egy nagyhatású domináns lisztharmat rezisztenciagént/QTL-t tartalmaz (*Run1*) (Pauquet et al. 2001), amely *V. vinifera*-val történő visszakeresztezések során a minőségi fajtákban is nagyfokú rezisztenciát biztosít. 1999-2002 között hibridcsaládokat állítottak elő Pécsett a francia anyag felhasználásával, amelyben kombinálták a *M. rotundifolia* x *V. vinifera* BC_4-et, a franko-amerikai hibrideket és a *V. amurensis x V. vinifera* eredetű fajtákat. A *M. rotundifolia* domináns lisztharmat rezisztenciájának és a kelet-ázsiai *V. amurensis* oligogénikusan öröklődő peronoszpóra rezisztenciájának kombinálása a rezisztencia-nemesítési programban jelentősen megnövelte a szőlő keresztezéses nemesítésének hatékonyságát.

Ezeknek a keresztezéseknek nemcsak a sikeres (rezisztens és kiváló minőségű) fajták előállításában van jelentőségük, hanem a genomikai kutatásokhoz nélkülözhetetlen térképezési populációk szerepét is betöltik, molekuláris marker térképek szerkesztését és ismeretlen rezisztenciagén lókuszok azonosítását is lehetővé teszik.

Az utóbbi időben a rezisztencia-nemesítők távol-keleti, főként kínai vad *Vitis* fajokra figyeltek fel, melyek lisztharmatra vagy peronoszpórára rezisztensek pl. *V. amurensis, V. romanetii, V. piazezkii, V. davidii, V. liubanensis* (Wan et al. 2007). A rezisztencia típusa még nem ismert ezeknél a fajoknál, ezeken a területeken a lisztharmat és peronoszpóra gomba nem őshonos, tehát nem lehet szó gazda rezisztenciáról. Nagymértékű variabilitás található a rezisztencia és a fogékonyság mértékében az egyes genotípusok, fajok között, a rezisztencia mechanizmusának megismerése még további kutatásokat igényel. A *V. vinifera* más *Vitis* fajokkal keresztezhető. A Mediterránum és a Közel-Keleti *V. vinifera* fajták általában fogékonyak az Amerikában őshonos patogénekre, de a földrajzi elszigetelődés következtében kialakulhatott specifikus, nem-gazda rezisztencia az egyes helyi fajtákban.

2.7. Molekuláris rezisztencianemesítés szőlőben

A markerekre alapozott szelekció (MAS) nagymértékben gyorsíthatja a megfelelő rezisztencia-forrásokból származó rezisztenciagének beépítését (introgresszióját) az értékes, jó minőségű fajtákba. A rezisztenciagénekkel együtt hasadó (koszegregáló) kapcsolt markerek a vad fajokból származó rezisztenciagének nemes fajtákba történő bevitelének gyorsítása mellett, a *V. vinifera* fajtákban is elősegíti kedvező allél-társulások, haplotípusok felfedezését. A markerekre alapozott szelekció nemcsak gyorsítja a megfelelő forrásokból származó rezisztenciagének beépítését az értékes, jó minőségű fajtákba, hanem egyszerűen nélkülözhetetlen azokban az esetekben, amelyekben azonos fenotípusos hatású, de különböző rezisztencia gének kombinálása a cél.

A molekuláris markereket sikerrel alkalmazzák a szőlőfajták azonosításában, származási vizsgálatokban, kapcsoltsági térképek szerkesztésében.

Napjainkban a mikroszatellit (SSR – Simple Sequence Repeat) markerek felhasználása a legelterjedtebb. A mikroszatellitek 1-6 nukleotidból álló tandem ismétlődések, jellemzőjük a nagyfokú szekvencia polimorfizmus, a genomban nagy számban fordulnak elő, kodominánsak, mendeli módon öröklődnek. Az első szőlő mikroszatellit markereket Thomas és Scott írták le (VVS marker készlet) (Thomas és Scott 1993). A szőlő mikroszatellitek egyre növekvő száma (Bowers et al. 1996, Arroyo-Garcia és Martinez-Zapater 2004, Adam-Blondon et al. 2004) az SSR markerek alkalmazási körének bővülését is maga után vonta. A mikroszatellit markerek megbízható fajtaazonosítást, genotipizálást tesznek lehetővé (Cipriani et al. 1994, Kiss et al. 2003, Bisztray et al. 2005, Halász et al. 2005), származás vizsgálatokban is eredményesen alkalmazhatóak (Bowers et al. 1999, Regner et al. 2000, Kozma et al. 2003).

Az első szőlő térképezési munkát Lodhi et al (1995) készítették el, amerikai genotípusok felhasználásával, mint például a ‘Cayuga white’ és ‘Aurora’. A térkép RAPD markereken alapult. Dalbó és munkatársai (Dalbó et al. 2000) a RAPD markerek mellett mikroszatellit és AFLP markerekkel is térképezett. A kezdeti térképezési munkákban a modell keresztezési populációk még nem voltak túl nagyok, mintegy 50-80 egyedből álltak (Lodhi et al. 1995, Dalbó et al. 2000, Grando et al. 2003). Fischer et al. (2004) szerint QTL-ek térképezéséhez lehetőleg nagyszámú egyedből álló keresztezési populációt kell használni, bár a szőlő esetében, mint a többi fásszárú növénynél is, ennek vannak gyakorlati akadályai.

Az első genetikai térképeket főként domináns markerek (RAPD, AFLP) segítségével szerkesztették (Dalbó et al. 2000, Doligez et al. 2002, Grando et al. 2003, Fischer et al. 2004,

Doucleff et al. 2004). Ezek a markerek bár gyors térképezést tesznek lehetővé, nem vihetők át más genotípusokra, illetve a különböző térképek nehezen összehasonlíthatóak (Adam-Blondon et al. 2004). Azzal a céllal, hogy a szőlő genetikai kutatásokban felhasználható kodomináns markereket fejlesszenek, 21 kutatócsoportból álló nemzetközi konzorciumot hoztak létre. Feladatuk szőlő mikroszatellit alapú markerek azonosítása volt (VMC, Vitis Mikrosatellite Consortium, AGROGENE, Moissy Cremayel, France). Munkájuk során több mint 350 VMC markert fejlesztettek és ezekkel az új SSR markerekkel létrehozták a 'Rizling' x 'Cabernet Sauvignon' keresztezésen alapuló nemzetközi referencia kapcsoltsági térképet (Riaz et al. 2004). Két további mikroszatellit alapú marker készletet fejlesztettek Olaszországban (UDV, Di Gaspero et al. 2005) és Franciaországban (VVI, Merdinoglu et al. 2005). Adam-Blondon et al. (2004) egy második, részletesebb kapcsoltsági térképet hoztak létre, a VMC és a VVI markerek együttes felhasználásával.

A mikroszatellit markerek nagyfokú polimorfizmusa lehetővé teszi, hogy már néhány SSR marker segítségével elkülöníthetőek az egyes fajták, bár közeli rokonok esetében ennél többre is szükség lehet. További elemzésekkel, meghatározott kapcsoltsági térképek segítségével, olyan markerek kiválasztása is lehetővé vált, amelyek kapcsoltan öröklődnek fontos tulajdonságok génjeivel. A QTL (Quantitative Trait Locus) analízis segítségével fajok és fajták közötti keresztezésekben számos jelleget, rezisztenciát meghatározó genetikai régiót lehet azonosítani. Amennyiben a térképezett marker és lókusz elég közel vannak egymáshoz, tehát a marker kapcsoltan öröklődik a tulajdonságot meghatározó lókusszal, a DNS marker felhasználható a jelleg (pl. rezisztencia) meglétének bizonyítására már a fiatal növények korai fejlődési stádiumában. Ilyen eredményeket értek el nematóda rezisztencia (Walker és Jin 2000), liszttharmat (Pauquet et al. 2001, Donald et al. 2002) és peronoszpóra (Luo et al. 2001, Zyprian 2003) esetében is. Számos amerikai szőlő faj (*V. labrusca, V. rupestris, V. riparia*) részben vagy teljesen rezisztens a liszttharmattal és a peronoszpórával szemben, míg a *V. vinifera* fogékony. A Bouquet által 1986-ban előállított *M. rotundifolia* x *V. vinifera* hibridcsaládokat vizsgálva, rezisztencia génnel kapcsolt AFLP markereket határoztak meg Pauquet és munkatársai (Pauquet et al. 2001). Az elsőként tanulmányozott rezisztencia lókusz, a *Muscadinia* nemzetségbe tartozó *M. rotundifolia Run1* génje volt (Pauquet et al. 2001, Donald et al. 2002), a *Run1* lókuszt a 12-es kapcsoltsági csoportba térképezték (Barker et al. 2005). Paquet et al. (2001) szerint a lókuszban található gének felelősek a penetráció helyén lévő epidermisz sejtek gyors elhalásáért.

Donald et al. (2002) 28 rezisztencia gén analógot (RGA) azonosítottak, melyek közül hármat találtak a *Run1* lókusszal szorosan kapcsoltnak. Ezek a markerek, amelyek a *Run1*-

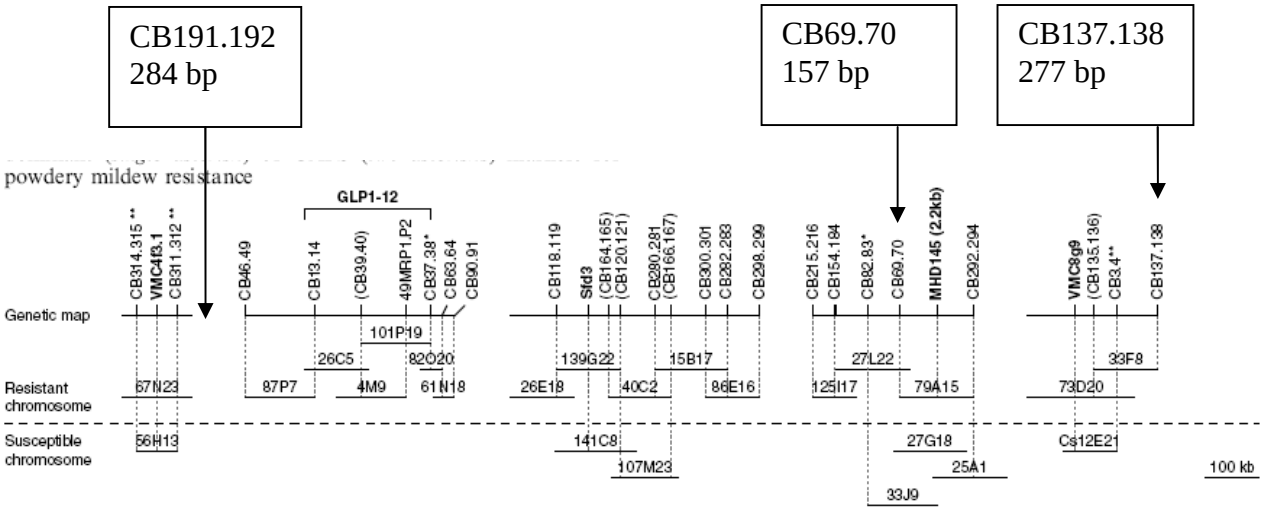
gyel együtt hasadnak, homológiát mutatnak más növények rezisztencia génjeivel: NBS (Nucleotide-Binding Site = nukleotid kötő hely) és LRR (Leucine-Rich Repeat = leucin gazdag ismétlődések) konzervatív régiók (Meyers et al. 1999). A GLP1-12 domináns RFLP marker, ami egy 1,6 kb méretű *Eco*RI fragmentummal hibridizált, amelyet csak a rezisztens genotípusokban találtak. Az MHD145 marker egy 2,2 kb méretű fragmentummal hibridizált, a fogékony egyedekből ez a fragmentum hiányzott. Az MHD98 egy 5 kb és egy 3,5 kb méretű *Eco*RI fragmentummal hibridizált a rezisztens genotípusoknál, míg a szenzitív egyedeknél csak a 3,5 kb méretű fragmentum volt megtalálható. Az MHD98 markert 2,4 cM távolságra térképezték a *Run1* lókusztól.

Az elmúlt években Donald et al. (2002) mellett Di Gaspero és Cipriani (2002, 2003) is izoláltak NBS-LRR géneket. A növényi rezisztencia gének többsége az NBS-LRR gének családjába tartozik. Minimum három strukturális doménjük van: C-terminális leucinban gazdag ismétlődő régió (LRR), központi nukleotidkötő hely (NBS), N-terminális *Toll*-interleukin1 receptor (TIR) domén vagy coiled-coil (CC) motívum. Ez utóbbi domén felelős azért, hogy a kódolt fehérje antitestként viselkedjen a patogéntől származó effektorokkal szemben, ami aktivizálja a növényben a védelmi mechanizmusokat. CC-NBS LRR gének találhatók az összes zárvatermő növényben, míg a TIR-NBS-LRR gének csak a kétszikű fajokban (Bai et al. 2002). A szőlőben mindkét típus megtalálható (Di Gaspero és Cipriani 2003). Ennek a nagy géncsaládnak több száz tagja van, amelyek felelősek a növényi válasz beindításáért, kaszkádrendszereken keresztül, a patogén észlelésétől a hiperszenzitív reakció következtében bekövetkező sejthalálig (Monosi et al. 2004). A géncsalád tagjai általában klaszterekbe tömörülnek, a kromoszómán elfoglalt helyük konzerválódott a különböző taxonokban (Di Gaspero et al. 2007).

A rezisztencia génekkel kapcsolt markerek azonosítását nemcsak molekuláris marker térképek segítik, hanem az a kiemelkedő jelentőségű eredmény is, hogy 2007-ben publikálták a szőlő teljes genom szekvenciáját (Jaillon et al. 2007, Valesco et al. 2007). A rezisztencia génekkel kapcsolt markerek azonosítása alapvető jelentőségű, ugyanakkor lehetővé teszi minőségi tulajdonságokat determináló génekkel való kapcsoltság meghatározását is.

Barker et al. (2005) a lisztharmat rezisztenciáért felelős *Run1* rezisztenciagént térképezték. Munkájuk során három populációt alkalmaztak: Mtp 3294 (VRH3082-1-42 x *V. vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’) 161 egyedét, Mtp3322 (VRH3176-21-11 x *V. vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’) 419 egyedét és a Mtp3328 (*V. vinifera* ‘Marselan’ x VRH3082-1-49) 416 egyedét vizsgálták. A VRH hibridpopulációk mind rezisztensek a lisztharmatra, és hordozzák a *Run1* rezisztencia gént. BAC (bakteriális mesterséges kromoszóma) könyvtárat

hoztak létre úgy, hogy genomi DNS-t izoláltak rezisztens *V. vinifera* növényekből, melyek hordozták az introgresszálódott *Run1* gént. Ezzel a munkával húsz új genetikai markert azonosítottak, amelyek szorosan kapcsoltak a *Run1* génhez. Lokalizációját finomították: a VMC4f3.1 SSR marker és a CB292.294 primerek (BAC könyvtár alapján tervezett) közé térképezték (**3. ábra**). Ezt a régiót két rezisztencia gén analóg (RGA) család –a GLP RGA család és az MHD RGA család- határolja. Az MHD és GLP gén családok NBS (nukleotid kötő helyek)- LRR (leucinban gazdag régió) fehérjéket kódolnak.



3. ábra: A *Run1* gén fizikai térképe (Barker et al. 2005).

A genetikai és fizikai térképezés adatait összehasonlítva azt találták, hogy a *Run1* közelében a rekombináció igen csekély, valószínűleg az *M. rotundifoliából* származó, introgresszálódott kromoszóma rész miatt.

Csökkent rekombinációs gyakoriságot figyeltek meg búzában, árpában és nyárfánál a rezisztencia lókusz körül, ha az introgresszióval jutott be a genomba egy rokon fajból (Wei et al. 1999, Stirling et al. 2001, Neu et al. 2002). Barker et al. (2005) szerint az Mtp 3294 populációban a VMC1g3.2, a VMC4f3.1 és a VMC8g9 markerek kapcsoltan öröklődnek a *Run1* rezisztencia génnel. A VMC8g9 teljesen koszegregál a *Run1*-gyel, míg a VMC4f3.1 0,6 cM, a VMC1g3.2 4,4 cM távolságra találhatóak.

Merdinoglu et al. (2003) BC_2 hibridpopulációt vizsgáltak (*M. rotundifolia x V. vinifera),* peronoszpóra rezisztencia QTL-t térképeztek a 12-es kapcsoltsági csoportra, melyet *Rpv1*-nek (Resistance to *Plasmopara viticola*) neveztek el. Mivel a *M. rotundifolia* nemcsak a peronoszpórára rezisztens, hanem a lisztharmatra is (Bouqet 1986), célul tűzték ki a két

rezisztencia gén közötti, feltételezett kapcsoltság bebizonyítását. Ugyanazt a BC_2 hibridcsaládot mindkét betegség kórokozójával fertőzték (*Erysiphe necator, Plasmopara viticola*), az eredményeket értékelték. Pozitív korrelációt találtak a két rezisztencia öröklődésében, a kapcsoltsági analízis alátámasztotta, hogy az *Rpv1* peronoszpóra rezisztenciagén szorosan kapcsoltan öröklődik a *Run1* lisztharmat rezisztencia génnel (Merdinoglu et al. 2003). Dry et al. (2010) több, mint 5000 BC (back cross) utód vizsgálatával sem talált egyetlenegy rekombinánst sem, így feltételezhető hogy vagy egyetlen gén felelős a rezisztenciáért, vagy a két gén ugyanabban a gén klaszterben (csoportban) található.

Eibach et al. (2007) a VRH 3082-1-42 x 'Regent' hibridpopulációt vizsgálták molekuláris markerekkel. A VRH 3082-1-42 hibrid tartalmazza a lisztharmat rezisztenciáért felelős *Run1* gént, és a peronoszpóra rezisztenciával kapcsolt *Rpv1* gént. Mindkét rezisztencia gén a *M. rotundifolia*-ból származik (Bouquet et al. 2000). A 'Regent' egy új fajta, ami kvantitatív rezisztenciát hordoz mind a lisztharmat, mind a peronoszpórával szemben (Eibach és Töpfer 2003), Németországban kereskedelmi forgalomban van. Az F_1 populáció 119 egyedét vizsgálták *Run1, Rpv1*, lisztharmat QTL és peronoszpóra QTL kapcsolt molekuláris markerekkel. A fenotipizálási adatok alapján (levélkorong mesterséges fertőzése peronoszpóra, és üvegházi természetes fertőzés lisztharmat esetén) 20 genotípus nem mutatott fertőzési tüneteket. A marker alapú szelekciónak köszönhetően ki tudták válogatni azt a négy genotípust, amelyek mindkét szülőtől származó lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia géneket (*Run1, Rpv1),* illetve QTL-eket tartalmazza. A molekuláris markerek tehát kiemelkedő fontosságúak a poligénikusan öröklődő tulajdonságok vonatkozásában is, mint például a rezisztencia. A növénynemesítés szemszögéből kiemelkedő jelentőségű a különböző eredetű rezisztencia gének kombinálása egy új fajtába, ezzel biztosítva a tartós rezisztenciát.

2.7.1. Amerikai *Vitis* fajok alkalmazása a rezisztencia nemesítés során

A gombabetegségeknek ellenálló rezisztenciaforrások általában azokban földrajzi régiókban találhatók, ahol a patogén populációk és a gazdanövény evolúciója közösen ment végbe. A szőlőnemesítők lisztharmat rezisztencia forrásként az Észak-Amerikában őshonos szőlő genetikai bázist tanulmányozták, majd később alkalmazták a rezisztencia nemesítés során.

A nemesítéssel párhuzamosan, a PM rezisztencia genetikai alapját is vizsgálták ezekben a *Vitis* fajokban, beleértve a *V. cinerea*-t és a *V. rupestris*-t (Dalbó et al. 2001), valamint a komplex hibrideket, amelyeket a *V. aestivalis, V. berlandieri, V. cinerea, V. labrusca, V. lincecumii, V. riparia* és a *V. rupestris* felhasználásával állítottak elő (Fischer et al 2004).

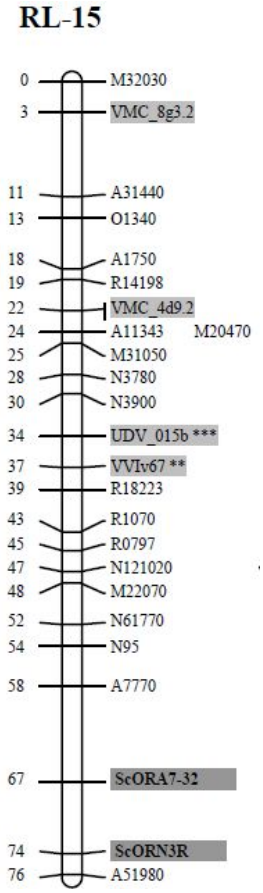
Dalbó et al. (2001) a marker alapú szelekció hatékonyságát vizsgálták, PM fő QTL-lel kapcsolt molekuláris markerek alkalmazásával. Első lépésben genetikai térképet hoztak létre a 'Horizon' x 'Illinois 547-1' hasadó populáció felhasználásával, ahol az utóbbi szülői partner egy fajhibrid, a *V. rupestris* Scheele x *V. cinerea* Engelm. keresztezéséből származik. A rezisztens szülőpartnerben, az 'Illinois 547-1'-ben a fő QTL 41%-ban felelős a rezisztenciáért. Hasadó populáció szegregációs analízisével (BSA) egy RAPD és egy AFLP marker mutatott szoros kapcsoltságot a lisztharmat rezisztenciával. Ebből a két markerből CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) markereket fejlesztettek, ami kodomináns marker, tehát követni tudják a PM QTL szegregációját a hasadó populációban. Több keresztezésen tesztelték a markert, mely hibridpopulációkban mindig szerepelt szülői vagy nagyszülői szinten a 'Illinois 547-1' rezisztens fajta. Eredményeik azt mutatták, hogy a markerek szorosan kapcsoltak a rezisztenciával, tehát alkalmazhatóak marker alapú szelekcióra.

Fischer et al. (2004) 'Regent' x 'Lemberger' keresztezés alapján szerkesztettek genetikai térképet, amelyen 429 molekuláris markert helyeztek el. A 'Regent' fajta többszörös gomba rezisztenciát tartalmaz, mely poligénikusan öröklődik, míg a 'Lemberger' hagyományos érzékeny fajta. Összesen 185 AFLP, 137 RAPD, 85 SSR és 22 SCAR marker felhasználásával készítették el a kapcsoltsági térképet. Lisztharmat fő QTL-t térképeztek a 16-os kapcsoltsági csoportra, és peronoszpóra fő QTL-t a 9-es és minor QTL-t a 10-es kapcsoltsági csoportra. A fertőzési tüneteket több mint három éven keresztül felvételezték, leveleken és bogyókon. A fenotipizálást többféle módszerrel végezték: számolták a gomba által okozott nekrózisok számát, megadták a károsodott levélfelület százalékát, illetve az OIV (Office International de la Vigne et du Vin, Paris, France; Anonymous 1983) skála szerinti pontozást is alkalmazták. A gomba rezisztenciával kapcsolt QTL-eken felül azonosítottak még bogyóéréssel, bogyóméretttel és a vitorla növekedésével kapcsolatos QTL-eket.

Akkurt et al. (2007) 6, lisztharmat (major) QTL-hez kapcsolt RAPD marker (Fischer et al. 2004) alapján SCAR markereket fejlesztettek. Az általuk használt tesztpopuláció szintén a 'Regent' (rezisztens) x 'Lemberger' (szenzitív) keresztezés utódnemzedéke volt. A RAPD során nyert fragmentumokat klónozták, majd szekvenálták. Azokat a SCAR markereket, amelyek specifikus sávokat szaporítottak fel a várt mérettartományban (az eredeti RAPD markerek alapján), mind a 'Regent' x 'Lemberger' F_1 utódpopuláció egyedein, mind további

más szenzitív illetve rezisztens genotípusokon, keresztezések utódnemzedékein is továbbtesztelték. Két olyan SCAR markert találtak, a ScORA7-760-at és a ScORN3-R-t, amelyek túlnyomórészt (LOD≥6.0) a rezisztens egyedekben szaporított fel specifikus fragmentumot, tehát korrelációt mutatott a lisztharmat rezisztenciával. A ScORA7-760 markert ajánlják marker alapú szelekcióra. A marker lehetővé teszi a génhalmozást, különböző genetikai forrásokból származó lisztharmat rezisztencia gének követését.

Akkurt et al. (2007) az általuk fejlesztett ScORA7-760-at és ScORN3-R-t visszatérképezték az eredeti kapcsoltsági csoportra, ami a fő (major) lisztharmat QTL-t nagy statisztikai pontossággal (LOD≥6.0) tartalmazza. Az IGGP (International Grape Genome Program) (www.vitaceae.org) által kiadott nemzetközi nomenklatúra szabályaival egyetértésben ezt a kapcsoltsági csoportot 15-ös kapcsoltsági csoportnak jelölték meg (**4. ábra**). A ScORA markerek helyzeti elcsúszását az eredeti RAPD markerekhez viszonyítva a SCAR markerek nagyobb fokú specifikussága, megbízhatósága okozhatja.



4. ábra: A SCAR markerek elhelyezkedése a 15-ös kapcsoltsági csoporton (korábban 16-os, Fischer et al. 2004 alapján) (Akkurt et al. 2007).

Welter et al. (2007) Fischer et al. (2004) kapcsoltsági térképét felhasználva integrált térképet hoztak létre, 14 lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciával kapcsolt RGA-val, három SCAR (Akkurt el al. 2007) és 122 mikroszatellit markerrel kiegészítve. Lisztharmat és peronoszpóra QTL-eken kívül levél morfológiai tulajdonságok QTL-jeit is vizsgálták. Megerősítették Akkurt et al. (2007) eredményeit, miszerint a fő lisztharmat QTL (*Ren3*) a 15-ös kapcsoltsági csoporton található. Fő peronoszpóra QTL-t azonosítottak a 18-as kapcsoltsági csoporton (*Rpv*3), és egy minor QTL-t (*Rpv4*) a 4-esre (**1. táblázat**).

Az észak-amerikai szőlő fajok gazda ('host') rezisztenciát hordoznak a *P. viticola*-val (DM) szemben is. Ez a rezisztencia-mechanizmus akkor lép működésbe, amikor a hausztórium kapcsolatot létesít a mezofillum sejtek membránjával (Díez-Navajas et al. 2008, Jürges et al. 2009). Az észak-amerikai fajok rezisztens genotípusain a *P. viticola* teljes életciklusa végbemegy, de a sporangiumtartók alacsonyabb arányban nyílnak fel, azaz a sporuláció kisebb mértékű, mint a szenzitív egyedeknél. A védekezés beindulásának ideje és intenzitása azonban erősen genotípusfüggő.

Bellin et al. (2009) a 'Bianca' fajta 'Villard blanc'-tól örökölt peronoszpóra rezisztenciájának fenotípusos és genetikai elemzését végezték a 'Chadonnay' x 'Bianca' keresztezés utódpopulációjának felhasználásával: QTL analízissel, valamint kvantitatív és kvalitatív komponensek térképezésével (növényi reakció, patogén fejlődése). A peronoszpóra rezisztencia fenotípusos hasadásának vizsgálata a 'Bianca' fajtában, egy domináns allél azonosítását eredményezte az *Rpv3* lókuszban. A 'Bianca' fajta, és az utódok 59%-a heterozigóta a domináns allélre, ami felelős a fertőzést követően 2 napon belül kialakuló hiperszenzitív reakcióért. Az *Rpv3* lókuszt korábban a rokon 'Regent' fajtában már azonosították (Fischer et al. 2004). A 'Regent' és a 'Bianca' pedigréjében egyaránt megtalálhatóak 'Seyve Villard' és 'Seibel' fajták, amelyek vad *Vitis* fajokra vezethetők vissza (*V. labrusca, V. rupestris, V. riparia, V. aestivalis var. lincecumii, V. cinerea és V. berlandieri*). A 4 éven át megfigyelt és felvételezett adatok alapján a QTL-t nem tudták stabil pozícióba térképezni, illetve a megbízhatósági intervallum igen széles volta miatt a szerzők feltételezték, hogy az *Rpv3* lókuszban több funkcionális gén is található (Welter et al. 2007). Ugyanez az allél, vagy egy másik funkcionális rezisztencia gén/allél lehet a 'Villard blanc' *Rpv3* lókuszában (Zyprian et al. 2005). A 'Regent' és a 'Villard blanc' genetikai térképei alapján nem volt egyértelmű, hogy vajon az *Rpv3* QTL egy, a *M. rotundifolia* eredetű *Rpv2* géntől (Wiedemann-Merdinoglu et al. 2006) különböző rezisztencia gén, vagy a QTL egyik allélja, vagy kis fizikai távolságon belül található kapcsolt génekről van szó, amelyek mind a *M. rotundifolia*-ban, mind a *Vitis*-ben működőképesek.

Bellin et al. (2009) genetikai térképezéssel el tudták különíteni a HR kvalitatív jellegen alapuló *Rpv3* lókuszt a *M. rotundifolia*-ban térképezett *Rpv2*-től. Blast elemzéssel a PN40024 szekvencián (Jaillon et al. 2007) két egymástól elkülönülő régiót azonosítottak, megközelítőleg 1,5 Mbp-nyira a 18-as LG-n.

Kisebb hatású QTL-eket is azonosítottak, ami arra utal, hogy a rezisztencia mechanizmusa kialakulásának különböző lépéseit számos genetikai faktor befolyásolja. Olyan QTL-eket is azonosítottak, amelyek a szignifikancia küszöbérték alatt, illetve felett ingadoztak a 7-es kapcsoltsági csoportra *V. riparia*-ban (Marguerit et al. 2009), és 'Villard blanc'-ban (Zyprian et al. 2005). Minor QTL-eket térképeztek a 9-es kapcsoltsági csoportra *V. riparia*-ban (Marguerit et al. 2009) és a 'Regent' fajtában a 4-es és 5-ös kapcsoltsági csoportra (Welter et al. 2007) (**1. táblázat**).

Bellin et al. (2009) pszeudo back-cross stratégiát alkalmazva térképezték a HR lókuszt, a 'Bianca' szülő esetében 312, a 'Chardonnay' esetében 289 SSR marker segítségével. A hiperszenzitív rezisztenciáért felelős lókuszt a 18-as kapcsoltsági csoport disztális részére térképezték, az UDV305 és a VMC7F2 SSR markerek közé. Ez a távolság 2,9 cM-t fed át.

Az *Rpv3* allél további fenotípusos hatása a gazda ('host') rezisztencia eredményeképpen megjelenő nekrózisok mellett, hogy a patogén „teljesítményét", terjedését csökkenti. Bellin et al. (2009) megfigyelték, hogy az *Rpv3* rezisztens allélja a patogén későbbi fejlődését is hátrányosan befolyásolta. Hasonló típusú gazda reakció volt megfigyelhető a 'Solaris' fajtában (Gindro et al. 2003). A 'Bianca' 7-es kromoszómján található minor QTL a felelős a patogén növekedésének és sporulációjának mértékéért, ami megmagyarázza a fenotípusos variancia fennmaradó részét. A genetikai kontroll ilyen jellegű felépítése egybeesik a szőlő peronoszpóra rezisztenciája kutatásainak korai feltételezéseivel, miszerint az észak-amerikai szőlő fajok hiperszenzitív reakciójáért magasszintű monofaktoriális komponens a felelős, és további kvantitatív komponensek befolyásolják a patogén fejlődését a későbbi fázisokban (Boubals 1959).

A 18-as kapcsoltsági csoport disztális része, ahová az *Rpv3* lókuszt is térképezték TIR-NBS-LRR génekben gazdag (Di Gaspero et al. 2007). A HR lókusszal szomszédos UDV305 SSR marker egy olyan fizikai 'contig'-on található, ami NBS-LRR géneket tartalmaz (Moroldo et al. 2008). Az a tény, hogy a rezisztencia HR-en alapul, és az *Rpv3* lókusz NBS-LRR génklaszterben található, felveti a lehetőségét, hogy a 'Bianca' peronoszpóra rezisztenciája rassz-specifikus. A 'gén-a-génnel' szembeni gazda rezisztencia áttörhető, egy virulens törzs kikerülheti a gazdanövény felismerő mechanizmusát, ahogy az a 'Regent' fajta (Kast et al. 2001), majd később a 'Bianca' esetében is előfordult (Peresotti et al. 2010). Cadle-

Davidson et al. (2008) különböző *Vitis* fajokat (*V. acerifolia, V. aestivalis, V. amurensis, V. cinerea, V. labrusca, V. palmata, V. riparia, V. romanetii, V. rupestris, V. vulpina,* stb.) és interspecifikus hibrideket vizsgáltak, mind természetes, mind mesterséges (levélkorong fertőzés) peronoszpórafertőzést követően. Eredményeik azt mutatják, hogy több faj genotípusai rezisztensek egyetlen izolátumra, de már nem mutatnak ellenállóságot egy második izolátummal szemben. Az észak-amerikai fajok peronoszpóra rezisztenciája tehát rassz-specifikus.

Peressotti et al. (2010) Csehországban, Ledniceben azonosítottak olyan *P. viticola* izolátumot, ami áttörte a 'Bianca' peronoszpóra rezisztenciáját. Ez volt az első alkalom, hogy olyan *P. viticola* izolátumot találtak, amely áttörte a monogénes rezisztenciát, bizonyítva, hogy egy új rasszal szemben a rezisztens fajta védtelenné válhat. Peresotti et al. (2010) eredményei felhívják a figyelmet a különböző rezisztencia gének kombinálásának fontosságára, mellyel tartós rezisztencia érhető el. Tartós rezisztencia elérése különösen fontos az évelő növényfajok esetén, mint amilyen a szőlő is, hiszen legalább 30 évig termesztésben marad szabadföldön. A nemesítési programoknak nemcsak arra kell törekedniük, hogy a rezisztencia hatékony legyen, hanem arra is, hogy állandó és tartós maradjon, annak ellenére, hogy a patogének folyamatos evolúción mennek keresztül.

A nagyfokú heterozigozitást mutató növényeknél, mint a szőlőnél is, az ún. 'double pseudo-testcross' stratégiát alkalmazzák genetikai térképek létrehozására (Grattapaglia és Sederhoff 1994). A módszer lényege, hogy mindkét szülő genetikai térképét elkészítik, külön-külön. A kodomináns markerek, mint amilyenek a mikroszatellit markerek lehetővé teszik, hogy egyetlen integrált térképet állítsanak elő a két szülői térképből. Továbbá lehetőség nyílik arra, hogy konszenzus térképet szerkesszenek több különböző térképezési populáció adatainak integrálásával. Napjainkig a legrészletesebb integrált szőlő genetikai térképet Doligez et al. (2006) szerkesztette meg. A konszenzus térképet öt hasadó populáció genetikai térképe alapján állították össze, 439 primer pár alkalmazásával, melyből 426 SSR, és 13 más típusú PCR marker. Vezulli et al. (2008) is integrált térképet állított elő 5 elit fajta ('Syrah', 'Pinot noir', 'Grenache', 'Cabernet Sauvignon' és 'Riesling') 3 hasadó populációjának felhasználásával. A 283 SSR marker mellett 501 SNP ('single-nucleotide polymorphism') alapú markert helyeztek el a térképen, az egyes lókuszok közötti átlagos távolság 1,27 cM.

Di Gaspero et al. (2007) kapcsoltsági térképet szerkesztett, melyre 420 mikroszatellit markert és 82 rezisztencia gén analógot (RGA) helyeztek el. A térképezési populáció két pszeudo-tesztkeresztezés volt: 'Chadonnay' x 'Bianca' és 'Cabernet Sauvignon' x '20/3', ahol a *V. vinifera* volt az anya, és a *Vitis* hibrid a pollenadó apa. Az apaként használt fajták

interspecifikus hibridek, a ‘Bianca’ a komplex hibrid ‘Villard blanc’ és a *V. vinifera* ‘Bouvier’ keresztezéséből származik (Csizmazia és Bereznai, 1968), míg a ‘20/3’ a ‘Bianca’ és ‘SK77-4/5’ keresztezésből (Kozma 2000). Az ‘SK77-4/5’ a *V. amurensis* eredetű ‘Kunbarát’ (Koleda 1975) és a *V. vinifera* ‘Tramini’ keresztezése (Cindric et al. 2000). A térképezéshez használt populációk az interspecifikus hibrideknek köszönhetően lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciát hordoznak. A két tesztpopuláció szimultán térképezése, és az hogy a rezisztens szülői partnerek távoli rokonok, lehetővé tette, hogy a tesztelt markerek 91%-át térképezni tudták. Az integrált térkép 19 kapcsoltsági csoportból áll, ami megfelel a szőlő haploid kromoszómaszámának. A teljes hossza 1676 cM és a szomszédos lókuszok közötti átlagos távolság 3,6 cM. Az SSR markerek véletlenszerűen oszlottak el a térképen, míg az RGA markerek többsége (83%-a) klaszterekbe rendeződve hét kapcsoltsági csoporton helyezkedtek el: a 3-as, 7-es, 9-es, 12-es, 13-as, 18-as és 19-es LG-n. Több RGA klasztert is azokhoz a kromoszóma régiókhoz térképeztek, ahol már korábban különböző hasadó populációkat vizsgálva találtak fenotípusosan is megjelenő rezisztenciákat: gomba (peronoszpóra, lisztharmat), baktérium (Pierce-betegség), és kártevő (filoxéra). Az az eredmény, hogy nagyszámú RGA-t integráltak az új térképre, a jövőben elő fogja segíteni a különböző kórokozókkal és kártevőkkel szembeni rezisztenciákkal kapcsolt markerek kiválasztását.

2.7.2. Ázsiai *Vitis* fajok és *V. vinifera* fajták alkalmazása a rezisztencia nemesítés során

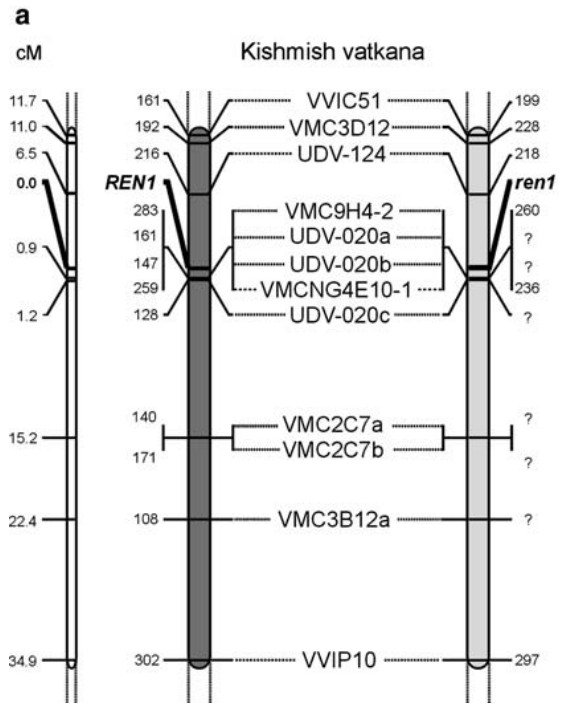
Az európai szőlőfajták érzékenyek a peronoszpóra (DM) és a lisztharmat (PM) fertőzésére, de egyes közép-ázsiai csemegeszőlőfajták a lisztharmattal szemben jól ellenállnak. A közép-ázsiai származású ‘Dzsandzsal kara’-t írták le először lisztharmat rezisztens fajtaként (Filippenko és Stin 1977), majd bevonták nemesítési programjaikba. Később kilenc újabb rezisztens fajtát is azonosítottak: ‘Kahét’ (örmény), ‘Gordin’ (moldáv), ‘Sampancsik’ (orosz), ‘Tsitska saheris’, ‘Alexandruli’, ‘Dzveli szamahre’, ‘Dzvelsavi saheris’ (grúz), ‘Tagobi’ és ‘Kismis vatkana’ (üzbég) (Vojtovic 1987). Ezek a fajták értékes genetikai forrásként szolgálnak a szőlő rezisztencianemesítés számára szemben a többi *Vitis* fajjal, hiszen nem befolyásolják kedvezőtlenül a minőséget.

A ‘Dzsandzsal kara’ mellett, melynek rezisztenciáját Magyarországon is felhasználták (Korbuly 1999), a ‘Kismis vatkana’ a másik lisztharmat rezisztens fajta. A *V. vinifera* ‘Kismis vatkana’ fajta előzetes vizsgálatok szerint ellenállóbb, mint a ‘Dzsandzsal kara’ (Kozma

szóbeli közlés). Mind szántóföldi, mind üvegházi körülmények között ellenállónak találták. A tenyészidő során sem a leveleken, sem a bogyókon nem jelentkeztek fertőzési tünetek, a későbbiekben is csak a szeneszcens leveleken lehetett korlátozott számban lisztharmat kolóniákat találni.

A ‘Kismis vatkana’ ampelográfiai bélyegek alapján a convarietas *orientalis* subconvarietas *antasiatica* csoportba tartozik. Fürtjei nagyok, lazák, a bogyók antociánosan pigmentáltak, a magok abortálnak (sztenospermokarpia), így magvatlan csemegeszőlőként termesztik Kelet-Üzbegisztánban.

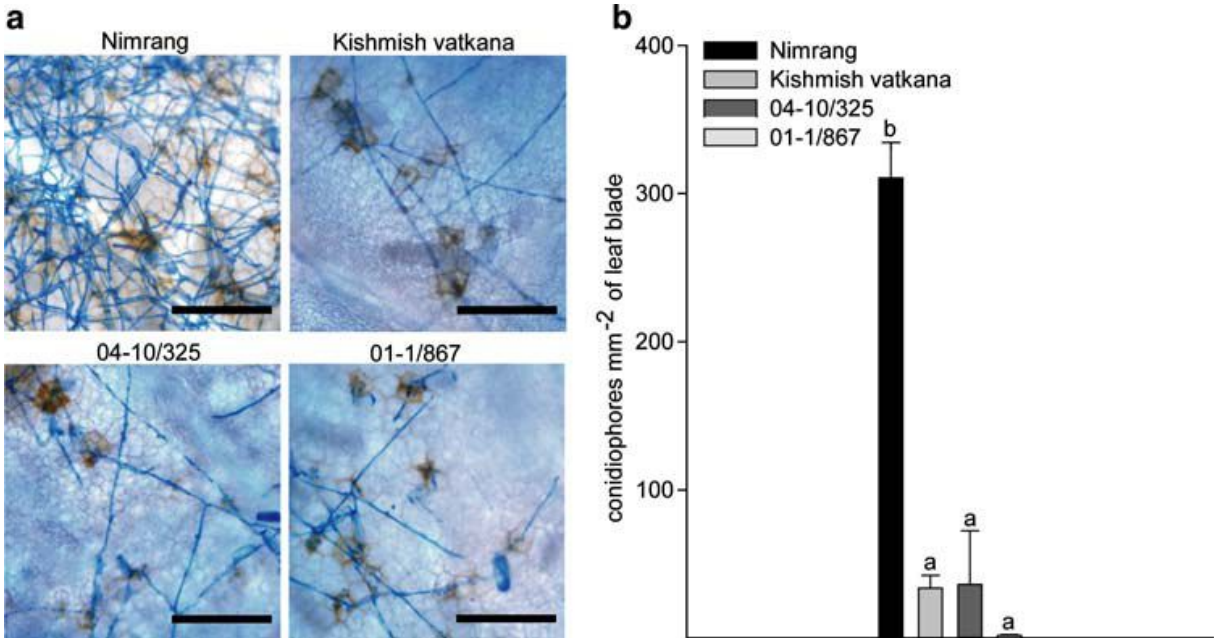
Hoffmann et al. (2008) a ‘Kismis vatkana’ x ‘Nimrang’ keresztezés 310 egyedét vizsgálták. A fenotípusos hasadás alapján (szenzitív: rezisztens=1:1) a ‘Kismis vatkana’ heterozigóta a domináns lisztharmat-rezisztencia génre, amelyet *Ren1*-nek neveztek el (Resistance to *Erysiphe necator*) (Kozma et al. 2006). A ‘Kismis vatkana’ x ‘Nimrang’ utódok molekuláris markerekkel történő elemzése azt bizonyította, hogy a ‘Kismis vatkana’ lisztharmat-rezisztenciagénje nem azonos a *Run1*-gyel. A *Ren1*-et a *M. rotundifolia Run1* génjétől eltérően nem a 12-es, hanem a 13-as kapcsoltsági csoportba térképezték, ahol korábban még nem azonosítottak rezisztencia lókuszt. Hoffmann et al. (2008) BSA-t (bulk segregant analysis) alkalmaztak 195 mikroszatellit marker felhasználásával, amelyek egységesen lefedték a genomot. A *Ren1* génhez legközelebbi markerek a VMC9h4.2, UDV20 és az VMCNG4E10.1 SSR markerek, amelyeket a rezisztencia géntől 0,9 cM távolságra határoztak meg (**5. ábra**). Di Gaspero et al. (2007) NBS-LRR géneket térképeztek a *Ren1*-gyel kapcsolt markerek köré 10 cM távolságban.



5. ábra: A *Ren1* gén fizikai térképe (Hoffmann et al. 2008).

A rezisztens ‘Kismis vatkana’ gazda-patogén (*E. necator*) kölcsönhatás hisztológiai vizsgálatát Kovács László és munkatársai végezték a Missouri Egyetemen (USA). A gomba kolóniái szabad szemmel nem láthatóak a leveleken. Mikroszkópos megfigyeléssel megállapították, hogy bár a gomba képes behatolni a növényi sejtbe (penetráció), de a hifa fonalak szaporodása már szignifikánsan kisebb, mint a kontroll szenzitív ‘Nimrang’ fajtában. Míg a ‘Nimrang’-on dús micélium fejlődött, addig a ‘Kismis vatkana’-n gyér micélium fejlődést tapasztaltak (a hifa elágazódás nem gátlódik, de a hifa növekedés igen). A mesterséges fertőzést követően 120 óra múlva meghatározták a konidíumtartók számát mm^2-ként a levélfelszínen, amiből a gomba fertőzés (invázió) sikerességére lehet következtetni. A konídiumtartók számában szignifikáns eltérést tapasztaltak a rezisztens genotípusok és a szenzitív ‘Nimrang’ fajta (310,5 ± 24,0 konídiumtartó/mm^2) között. Bár a legkisebb abszolút értéket a *M. rotundifolia* utódnál kaptak (1,7 ± 0,6 konídiumtartó/mm^2), a rezisztens ‘Kismis vatkana’ genotípushoz képest (33,6 ± 8,7 konídiumtartó/mm^2) nem mutatott szignifikáns eltérést (**6. ábra**). Azok az epidermisz sejtek, amelyek az appresszóriumokkal (a gomba táplálkozását szolgáló módosult hifa) érintkeztek, különböző mértékben megbarnultak. A megtámadt sejtek sejtfalai mentén bekövetkező barnulás a ‘Kismis vatkana’ és a ‘Nimrang’ fajták esetében nem különbözött egymástól, de lényegesen hamarabb és nagyobb mértékben következett be a rezisztens *M. rotundifolia* utódnál (01-1/867). Feltételezik, hogy a ‘Kismis

vatkana' rezisztencia mechanizmusa a gomba behatolását követően ('post-invasion') lép működésbe.



6. ábra: *E. necator* hifa növekedése (a) és konídium tartóinak sűrűsége levéllemez mm^2-ként (b) 120 órával a mesterséges fertőzést követően. Vizsgált genotípusok: 'Nimrang' (szenzitív fajta), 'Kismis vatkana', 04-10/325: 'Kismis vatkana' x 'Nimrang' keresztezés utódja, 01-1/867: (*M. rotundifolia* x *V. vinifera)* x 'Petra' keresztezésből származó egyed. A mérési egység hossza 100 µm (Hoffmann et al. 2008).

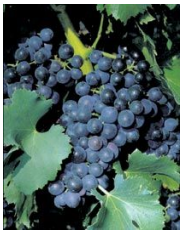
Kozma és munkatársai rezisztencia gének halmozása céljából keresztezték a *M. rotundifolia* x *V. vinifera* BC_4 hibridcsaládot (*Run1 és Rpv1*) a 'Kismis vatkana'-val (*Ren1*) (**7. ábra**). Disszertációmban ezt a hibridcsaládot (06-1 populáció) vizsgáltuk molekuláris markerek alkalmazásával.

V. vinifera ‘Malaga seedling No. 1’ (2n=38) x *M. rotundifolia* ‘G-52’ (2n=40)

↓

‘Cabernet Sauvignon’ x F1 NC 6-15

↓



BC_1 VRH 8628 x ‘Grenache noir’

↓

‘Merlot noir’ x BC_2 VRH 5-18-79

↓

BC_3 VRH 1-28-82 x ‘Aubun’

↓

BC_4 VRH 3082-1-42 x **‘Kismis vatkana’**
(Bouquet, 1986) ‘Kismis moldavszkij’
‘Cabernet Sauvignon’
‘Petra’
‘Superior seedless’

↓

BC_5 hibrid család
(Kozma et al. 2006)

7. ábra: A BC_5 hibridcsaládok előállítási sémája.

Munkánk megkezdésekor még nem azonosították a ‘Dzandzsal kara’-ban a PM rezisztencia gént, így kezdtük el vizsgálni a 06-1-es populáció (BC_4 x ‘Kismis vatkana’) során kapott eredményeink alapján a 07-12-es populációt (*V. vinifera* ‘Dzsandzsal kara’ x *Vitis* hibrid ‘Laszta’) x (*V. vinifera* ‘Katta kurgán’ x *V. vinifera* ‘Perlette’**)**. Célunk az volt, hogy összehasonlítsuk az azonos származású és lisztharmat rezisztens fajta, a ‘Kismis vatkana’ és a ‘Dzsandzsal kara’, valamint az utódpopulációk rezisztens egyedeinek rezisztencia génjét molekuláris markerekkel. Munkánkkal egy időben egy másik kutatócsoport is dolgozott ezzel az anyaggal, eredményeiket publikálták (Coleman et al. 2009).

Egyes feltételezések szerint (Wan et al. 2007, Coleman et al. 2009) a *Ren1* rezisztencia gén interspecifikus hibridizációval kerülhetett a ‘Dzsandzsal kara’ és a ‘Kismis vatkana’ fajtákba, Amerikából származó alanyfajtákból vagy kelet-ázsiai vad szőlőfajból, amit még az ősi kereskedelmi útvonalakon (Selyem út) hozhattak a közép-ázsiai oázisokba. Coleman et al. (2009) rokonsági vizsgálatokkal (SSR markerek alapján) megállapították, hogy a ‘Kismis vatkana’ és a ‘Dzsandzsal kara’ másodfokú rokonsági viszonyban vannak egymással (féltestvérek, vagy nagyszülő-unoka, vagy avuncular=”nagybácsi”), valamint a ‘Kismis vatkana’ ugyancsak rokonsági kapcsolatban van a magvatlan, mazsolaszőlő ‘Szultanina’ fajtával (szülő-utód). A ‘Dzsandzsal kara’-nak hímnős virágai vannak, látható embriók fejlődnek, a bogyókban található mag. Szemben a ‘Kismis vatkana’-val, amelyet sztenoszpermokarp fajtaként tartanak nyilván. A magház degenerálódik rögtön a megtermékenyülés után, az embriógenezis kezdeti stádiumában. A *V. vinifera*-n belül egyedülálló, hogy a ‘Kismis vatkana’ és a ‘Dzandzsal kara’ a lisztharmat fertőzésnek ellenállnak természetes körülmények között. Ha a fertőzés erős mértékű, előfordulhat, hogy a gomba kikerüli a növény védelmi mechanizmusát, ekkor mikrokolóniák, illetve korlátozott mértékben konídiumok jelennek meg. A lisztharmat rezisztencián kívül mindkét fajta tipikus tagja a helyben domesztikált fajtáknak, mint például a ‘Nimrang’ vagy a ‘Katta kurgán’, melyek ugyanarról a helyről származnak (Üzbegisztán). Ezeknek a fajtáknak a tiszta *V. vinifera* eredete sosem kérdőjeleződött meg, ehelyett külön csoportot alkotnak jellegzetes morfológiai tulajdonságaik miatt: *V. vinifera* subs. *sativa orientalis antasiatica* (Troshin et al. 1990).

Ha a *Ren1* gén mégsem „kívülről”, vad *Vitis* fajból került a *V. vinifera* genomjába, felmerül a kérdés, hogy ez a gén milyen funkcionális csoporthoz tartozik, és hogyan fejlődött ki a funkciója. A legtöbb növényi lisztharmat rezisztencia gén NBS-LRR típusú, amelyekre a ’post penetration’ rezisztencia jellemző (Halterman et al. 2001). Ilyen rezisztencia gén a *Muscadinia* eredetű *Run1* is (Barker et al. 2005). Az NBS-LRR gének ismétlődő tandem

duplikációkban vannak jelen a genomban, génklaszterekbe tömörülve, véletlenszerűen váltakozva a DNS szegmensekkel. Ebbe az osztályba tartozó gének gyorsan változnak, csoportokba, klaszterekbe való szerveződésük lehetővé teszi, hogy néhány mutálódott gén olyan új receptorokat „fejlesszen”, alakítson ki, ami képes felismerni a virulens patogén effektorait. A vegetatívan szaporított növényeknél többnyire a vad típusokban, populációkban alakulnak ki a rezisztencia gének, hiszen itt a növények ivaros úton szaporodnak, ami kedvez az új genetikai variációk kialakulásának, ami versenyelőnyt biztosít a genotípusnak.

A *Ren1* gén egy NBS-LRR génklaszterben található, két oldalán SSR markerekkel határolva. A *Ren1* közelében található NBS gének a szójában (*Rps1*-k) és a burgonyában (*R3a*) azonosított CC-NBS-LRR rezisztenciagénekkel mutatták a legnagyobb hasonlóságot. Ez a DNS blokk olyan szerkezeti átrendeződéseket tartalmaz, ami az árpában azonosított lisztharmat rezisztencia lókuszhoz, az *Mla*-val (Wei et al. 2002) mutat hasonlóságot.

A szőlő lisztharmat (*E. necator*) és peronoszpóra (*P. viticola*) gombák Amerikából származnak, mégis több ázsiai *Vitis* faj rezisztens mindkét kórokozóra (Wan et al. 2007). Ez a tény további kérdéseket, illetve vizsgálatok szükségességét veti fel, hiszen ebben az esetben nem beszélhetünk gazda-patogén koevolúcióról. Két másik peronoszpóra faj azonban megtalálható Kínában (*P. cissii és P. amurensis*), így valószínűleg a kínai *Vitis* fajok ezekkel a kórokozókkal együtt fejlődtek. A rezisztencia mechanizmusa még ismeretlen, de ellenállóságot biztosíthat mind a *P. viticola*, mind az *E. necator* ellen is (Riaz et al. 2011). Új rezisztencia források kutatása és nemesítési programokba való bevonása mára a távol-keleti fajok felé fordította a figyelmet (*V. amurensis, V. romanetii, V. piasezkii, V. davidii és V. liubanensis*). A legtöbb kínai *Vitis* faj nagy előnye az észak-amerikai fajokkal szemben, hogy a bogyók íze sokkal természetesebb (neutrális, pl. „rókaíz” mentes, ld. *V. labrusca*), illetve a *V. vinifera*-val könnyen keresztezhetőek. Blasi et al. (2011) peronoszpóra fő QTL-t (*Rpv8*) térképezett a *V. amurensis* 14-es kapcsoltsági csoportjára. Riaz et al. (2011) ún. „korlátozott genetikai térképezési stratégiát” alkalmazva öt hasadó populáció alapján lisztharmat rezisztencia géneket térképeztek azzal a céllal, hogy különböző eredetű rezisztencia forrásokat azonosítsanak későbbi génhalmozási nemesítési programokba. Ez a módszer azt jelenti, hogy csak azokon a kromoszómákon található markereket alkalmaznak a térképezés során, amelyekre korábban rezisztencia géneket, illetve RGA-kat azonosítottak. Az *M. rotundifolia* 18-as kapcsoltsági csoportjára térképezték a *Run2* rezisztencia lókuszt (‘Magnolia’- *Run2.1* és ‘Trayshed’- *Run2.2*), és az ázsiai származású *V. romanetii* 18-as kapcsoltsági csoportjára egy domináns lisztharmat rezisztencia lókuszt, amelyet *Ren4*-nek neveztek el. Eredményeik azt mutatják, hogy ezek a rezisztenciáért felelős régiók átfedésben vannak egymással, ami

lehetőséget teremt a különböző genetikai forrásból származó gének összehasonlító analízisére, a különböző rezisztencia mechanizmusok evolúciójának, illetve a gazda-patogén kapcsolatának vizsgálatára. A 18-as kapcsoltsági csoporton a lisztharmat rezisztencia lókuszon kívül peronoszpóra rezisztencia lókusz is található: a *M. rotundifolia* 'Trayshed' eredetű *Rpv2* és a két különböző észak-amerikai eredetű hibridből származó ('Regent', 'Bianca') *Rpv3* (Merdinoglu et al. 2003, Fischer et al. 2004, Welter et al. 2007, Wiedemann-Merdinoglu 2006, Bellin et al. 2009). További kutatások szükségesek annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a *V. romanetii*-ben azonosított *Ren4* hasonló-e a *M. rotundifolia* rezisztencia génjével, illetve, hogy lehetséges-e hogy a *V. romanetii* is hordoz peronoszpóra rezisztencia géneket ugyanabban a régióban, ahová a lisztharmat rezisztencia lókuszt térképezték. Míg a legtöbb lisztharmat rezisztencia gén a hausztóriumok kifejlődése és az effektor fehérjék megjelenése után hat ('post infection'), addig a *Ren4* megakadályozza a penetrációt, a hausztórium fejlődést és a hifanövekedést ('pre infection'). Nagy jelentőségű, hogy extrém rezisztenciát biztosít, domináns, monogénes úton öröklődik, nem rassz specifikus és szövet típustól (levél, hajtás, bogyó) független (Ramming et al. 2011). A *V. romanetii* rezisztencia lókuszának introgressziója *V. vinifera* fajtákba nagy előrelépést jelent a szőlő rezisztencianemesítésben.

Napjainkig a szőlőben térképezett lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia géneket/QTL-eket az **1. táblázatban** foglaljuk össze.

1. táblázat: A szőlőben azonosított lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciát meghatározó gének *Muscadinia* és *Vitis* fajokban

Lókusz	LG	Forrás (fajta/törzs)	Rezisztencia	Hivatkozás
Run1	12	*M. rotundifolia* 'G-52'[1]	domináns, HR, kvantitatív/részleges	Barker et al. 2005
Run2 *Run2.1* *Run2.2*	18	*M. rotundifolia* 'Magnolia', 'Trayshed'	QTL, kvantitatív/részleges	Riaz et al. 2011
Rpv1	12	*M. rotundifolia* 'Dearing'	QTL, kvantitatív/részleges	Merdinoglu et al. 2003
Rpv2	18	*M. rotundifolia*' Trayshed'	posztinf., kvalitatív	Wiedemann-Merdinoglu 2006, Bellin et al. 2009
Rpv3	18	*Vitis* hibrid 'Regent' *Vitis* hibrid 'Bianca'	QTL, kvantitatív/részleges QTL, domináns, HR, kvalitatív	Welter et al. 2007 Bellin et al. 2009
Rpv4	4	*Vitis* hibrid 'Regent'	QTL, kvantitatív/részleges	Welter et al. 2007
Rpv5	9	*V. riparia* 'Glorie de Montpellier'	QTL, kvantitatív/részleges	Marguerit et al. 2009
Rpv6	12	*V. riparia* 'Glorie de Montpellier'	QTL, kvantitatív/részleges	Marguerit et al. 2009
Rpv7	7	*Vitis* hibrid 'Bianca'	QTL, kvantitatív/részleges	Bellin et al. 2009
Rpv8	14	*V. amurensis* 'Ruprecht'	QTL, kvantitatív/részleges	Blasi et al. 2011
Rpv9	7	*V. riparia* 'Wr63'	QTL, kvantitatív/részleges	Moreira et al. 2011
Rpv10		*V. amurensis*		Schwander et al., in prep.
Rpv11	5	*Vitis* hibrid 'Regent'	QTL, kvantitatív/részleges	Fischer et al. 2004
Rpv12		*V. amurensis*		Di Gaspero et al., in prep.
Rpv13	12	*V. riparia* 'Wr63'	QTL, kvantitatív/részleges	Moreira et al. 2011
Ren1	13	*V. vinifera* 'Kismis vatkana'	domináns, posztinf., kvalitatív	Hoffmann et al. 2008
Ren2	14	*Vitis* hibrid 'Illinois 547-1'	QTL, kvantitatív/részleges	Dalbó et al. 2001
Ren3	15	*Vitis* hibrid 'Regent'	QTL, kvantitatív/részleges	Fischer et al. 2004
Ren4	18	*V. romanetii* 'C166-026' 'C166-043' 'C87-41'	domináns, preinf., nem rassz-specifikus	Ramming et al. 2011 Riaz et al. 2011 Mahanil et al. 2010

(International Conference on Grapevine Breeding and Genetics at Geneva August 1-5, 2010, http://www.vivc.de alapján)

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

A PTE Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetében Kozma és munkatársai különböző hibridpopulációkat állítottak elő abból a célból, hogy a lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia géneket kombinálják.
A hibridcsaládok a következők: BC_4 (VRH 3082-1-42) x *Vitis vinifera* 'Kismis vatkana', (BC_4 x *Vitis vinifera* 'Kismis moldavszkij'), *V. vinifera* 'Génuai zamatos' x *V. vinifera* 'Kismis vatkana', (*V. vinifera* 'Dzsandzsal kara' x *Vitis* hibrid 'Laszta') x *(V. vinifera* 'Katta kurgán' x *V. vinifera* 'Perlette') (**2. táblázat**).

Vizsgálatainkban szereplő hibridpopulációk, fajok, fajták:

06-1 populáció: BC_4 (VRH 3082-1-42) x *V. vinifera* 'Kismis vatkana'

A rezisztencia gének halmozásának céljából Kozma és munkatársai keresztezték a *M. rotundifolia x V. vinifera* BC_4 hibridet (*Run1 és Rpv1*) a 'Kismis vatkana'-val (*Ren1*), ahol az előbbi az anya, az utóbbi a pollenadó apa (Kozma et al. 2006). A VRH 3082-1-42 hibridet Bouquet, francia nemesítő állította elő 1986-ban, pszeudo-back cross stratégiát alkalmazva (Bouquet 1986). A hibrid előállítási sémája a **7. ábrán** látható. Így a BC_4 (VRH 3082-1-42) x 'Kismis vatkana' keresztezés egy BC_5 *M. rotundifolia - V. vinifera* keresztezésnek tekinthető. Pécsett a Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetben Kozma Pál és Hoffmann Sarolta végezte el a BC_5 populáció lisztharmat fertőzöttségének felvételezését. A magokat, amelyeket a keresztezés során nyertek, Jiffy tápkockába ültették, majd a magoncokat egyleveles stádiumban nagyobb tenyészedényekbe ültették át. A magoncokat üvegházban, már fertőzött *V. vinifera* egyedekkel együtt nevelték, majd a tenyészidő végén, fenotípusosan értékelték a növényeket. A bonitálási értékek alapján két csoportra osztották az utódpopulációt, melyekből 30 tüneteket hordozó, szenzitív és 899 tünetmentes egyedet kaptunk meg molekuláris elemzésre. Az utódnemzedék egyedeinek jelölése a következő volt: Pécs-06-1/1-899, ahol a Pécs-06-1 a hibridcsaládot, a számok 1-899-ig pedig a hasadó populáció egyes egyedeit jelentik.

06-3-as populáció: *V. vinifera* ‘Génuai zamatos’ x *V. vinifera* ‘Kismis vatkana’

A domináns, monogénes lisztharmat rezisztencia (*Ren1) V. vinifera*-n belüli (intraspecifikus) alkalmazása céljából, Kozma és munkatársai a ‘Kismis vatkana’-t, a ‘Génuai zamatos’ csemegeszőlő fajtával keresztezték. A ‘Génuai zamatos’ származási helye Törökország, szinonim nevei ‘Chaouch blanc’, ‘Génuai szagos’. Morfológiai jellemzői alapján a convar. *pontica*-ba sorolják. Két fajtája ismert, a kék bogyójú ‘Kék génuai’ és a fehér bogyójú ‘Fehér génuai’. Magyarországon nem jelentős a termesztése, csak házikertekben fordul elő. Nővirágú fajta, bogyói nagyok, megnyúlt gömbölydedek, vékony héjúak, húsosak, lédúsak. Fürtjei szépek, mutatósak, szeptember első felében érnek (Csepregi és Zilai 1988).

07-12-es populáció: (*V. vinifera* ‘Dzsandzsal kara’ x *Vitis* hibrid ‘Laszta’) x (*V. vinifera* ‘Katta kurgán’ x *V. vinifera* ‘Perlette’)

A hibridcsalád előállításának az volt a célja, hogy a lisztharmattal szemben rezisztens ‘Dzsandzsal kara’ és a ‘Seyve-Villard’ eredetű ‘Laszta’ rezisztencia génjeit kombinálják. Az azonos földrajzi származású ‘Kismis vatkana’ és ‘Dzsandzsal kara’ rezisztencia génjeinek összehasonlítsára alkalmas térképezési populáció biztosítását is jelentette ez a keresztezés.

A ‘Dzsandzsal kara’ csemegeszőlő fajta a ‘Kismis vatkana’-hoz hasonlóan Üzbegisztánból származik. Megfigyelések szerint a lisztharmatnak ellenáll, a növényvédelem nélkül hagyott tőkéken csak a szeneszcens leveleken figyeltek meg fertőzési tüneteket (Kozma szóbeli közlés). Virága hímnős, bogyója kék színű, hosszúkás, középnagy-nagy, vékony héjú. Szeptember közepén érik, közepesen erős növekedésű, talaj és fekvés iránt nem igényes, nem fagyérzékeny.

A ‘Laszta’ interspecfikus hibrid, Petar Cindric nemesítő állította elő Jugoszláviában. A pedigréjében megtalálható ‘Seyve Villard’ (SV) fajtáknak köszönhetően lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciát hordoz.

Pedigréje: ‘Muscat de St. Vallier’ (SV 20365) x ‘Lyana’ (Moldova)

↙ ↘

‘SV 12129’ x ‘Panse’ ‘Chaouch blanc’ (‘Génuai zamatos’) x ‘Pierrelle’

↙ ↘

‘S 6468’ x ‘S 5408’ ‘Panse’ x ‘Villard blanc’ (‘SV 12375’)

A ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’ keresztezést ugyancsak Jugoszláviában állították elő, a bogyó színe kék, nemesítésben használt kódszáma: ‘SK 914-27 YUGO’.

‘Katta kurgan’ x ‘Perlette’:

A ‘Perlette’ fajtát az Amerikai Egyesült Államokban, Kaliforniában állította elő Harold Olmo szőlőnemesítő 1936-ban, a mazsolaszőlő ‘Szultanina’ fajta és a ‘Szőlőskertek királynője muskotály’ keresztezésével. A ‘Szultanina’ származási helye Üzbegisztán, a fajta a convar. *orientalis* subconvar. *antasiatica*-ba sorolható. Bogyója magvatlan, közepes, kisméretű, lédús, vékony héjú. Fehér színű fajtáját termesztik. Korán érő, tetszetős fürtű, kellemes ízű csemegeszőlőfajta. Magyarországon Szűcs József szőlőnemesítő ‘Szentendrei magvatlan’ néven terjesztette. Érdekessége a ‘Perlette’ fajtának, hogy a keresztezésben szereplő egyik szülő a magyar nemesítésű ‘Szőlőskertek királynője muskotály’, amelyet Mathiász János állított elő 1916-ban, az ‘Erzsébet királyné emléke’ x ‘Csaba gyöngye’ keresztezésével.

A ‘Katta kurgán’ szintén Üzbegisztánból származik, nővirágú, kék bogyójú fajta. Származási helye megegyezik a ‘Kismis vatkana’, ‘Dzandzsal kara’, ‘Szultanina’, ‘Nimrang’ fajtákkal. Helyi fajta, termesztési értéke nem jelentős, borkészítésre és friss fogyasztásra egyaránt használják. Primér neve: ‘Parkent’, szinonimája ‘Alicon’.

Az **2. táblázatban** összegyűjtöttük a vizsgálatainkban szereplő hibridcsaládokat, a vizsgált mintaszámmal, illetve a szülő szőlőfajtákat, és jelöltük, hogy mely fajták, hibridcsaládok rezisztensek a lisztharmat gombabetegségre.

2. táblázat: A vizsgált hibridcsaládok és a családokat létrehozó szülő szőlőfajták

Fajta	Az egyes populációkban vizsgált mintaszám	
	PM tünetmentes	PM érzékeny
BC_4 (VRH 3082-1-42)	igen	nem
‘Kismis vatkana’	igen	nem
‘Kismis moldavszkij’	nem	igen
‘Génuai zamatos’	nem	igen
‘Dzsandzsal kara’	igen	nem
‘Laszta’	igen	nem
‘Regent’	igen	nem
‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’	igen	nem
‘Katta kurgán’ x ‘Perlette’	nem	igen
BC_4 x ‘Kismis vatkana’	410	30
BC_4 x ‘Kismis moldavszkij’	30	20
‘Génuai zamatos’ x ‘Kismis vatkana’	78	68
(‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’) x (‘Katta kurgán’ x ‘Perlette’)	96	30

PM QTL analízis:

Lisztharmat QTL-lel kapcsolt markerekkel az alábbi fajtákat vizsgáltuk:

‘Regent’: új nemesítésű, komplex lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciájú interspecifikus hibrid (Eibach és Töpfer 2003). PM QTL található a 15-ös kapcsoltsági csoporton és fő DM QTL a 18-as kapcsoltsági csoporton (Fischer et al. 2004, Akkurt et al. 2007). Bogyója kék színű, borszőlőfajta. 1967-ben állította elő Gerhardt Alleweldt professzor, nemesítő a Geilweilerhof Intézetben, Németországban.

Pedigréje: ‘Diana’ x ‘Chambourcin’ (‘Seyve Villard 12417’ x ‘Chancellor’=‘Seibel 7053’). A ‘Diana’ *V. vinifera* eredetű ‘Szilváni’ x ‘Müller-Thurgau’ keresztezésből származó fajta, míg a ‘Chambourcin’ interspecifikus fajta felelős a széleskörű gomba rezisztenciáért. 1996-ban kapott állami elismerést Németországban, azóta a legfontosabb rezisztens, borszőlő fajták egyikeként tartják számon világszerte.

Nemesítésben használt kódszámai: ‘Geilweilerhof 67-198-3’ és ‘Gf. 67-198-3’.

‘Laszta’:
Pedigréje:’Muscat de St. Vallier’ (‘SV 20365’) x ‘Lyana’

Magyar nemesítésű interspecifikus, rezisztens szőlőfajták (zárójelben feltüntettük a pedigéjüket):
‘Duna gyöngye’ (‘Seibel 4986’ x ‘Csaba gyöngye’)
‘Viktória gyöngye’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Csaba gyöngye’)
‘Csillám’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Csaba gyöngye’)
‘Nero’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Gárdonyi Géza’)
‘Zala gyöngye’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Csaba gyöngye’)
‘Palatina’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Szőlőskertek királynője muskotály’)
‘Bianca’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Bouvier’)
‘Göcseji zamatos’ (‘Eger 1’ (SV 12286) x ‘Medoc noir’)
‘Medina’ (‘Eger 1’ (SV 12286) x ‘Medoc noir’)

A ‘Seibel’, ‘Seyve Villard’ eredetű fajták pedigréjében szereplő vizsgált fajták, vad *Vitis* fajok:
‘S 4986’, ‘S 7053’, ‘SV 12286’, ‘SV 20365’, ‘Villard blanc’ (‘SV 12375’),
V. labrusca, V. rupestris, V. berlandieri, V. lincecumii.
‘Villard blanc’ pedigréje: 56% *vinifera*, 3% *V. labrusca*, 30% *V. rupestris*, 6% *V. berlandieri*, 5% *V. lincecumii* (Striem 2000).

Rezisztencia génekkel kapcsolt markerekkel vizsgált ázsiai eredetű *V. vinifera* fajták, származási helyük szerint csoportosítva:
Üzbegisztán: ‘Kismis vatkana’, ‘Dzsandzsal kara’, ‘Tagobi’, ‘Iszpiszár’, ‘Icskimár’
Törökország: ‘Kabarcik’
Grúzia: ‘Alexandrouli’, ‘Tsitska’, ‘Bazaletouri tsolikouri’

Ismeretlen származású: ‘Rezisztens magvatlan’
Moldávia: ‘Gordin’

Rezisztencia génekkel kapcsolt markerekkel vizsgált szenzitív *V. vinifera* fajták:
‘Cardinal’, ‘Csaba gyöngye’, ‘Irsai Olivér’, ‘Madeleine angevine’, ‘Muscat Fleur d’Oranger’, ‘Kadarka’, ‘Pozsonyi’, ‘Kossuth szőlő’, ‘Duchess of Buccleugh’, ‘Izsáki’, ‘Kövérszőlő’, ‘Leányka’, ‘Királyleányka’

Az ázsiai származású fajták genetikai távolságának meghatározásához szerkesztett dendrogram készítéséhez alkalmazott fajták, alany fajták, vad fajok:

Referencia *V vinifera* fajták:
‘Chardonnay’, ‘Pinot noir’
Lisztharmat ellenálló fajták:
‘Kismis vatkana’, ‘Dzsandzsal kara’, ‘Tagobi’, ‘Gordin’, ‘Alexandrouli’, ‘Tsitska’, ‘Bazaletouri tsolikouri’, ‘Kabarcik’, ‘Rezisztens magvatlan’
Ázsiai fajták (nincs adatunk arról, hogy lisztharmat ellenállóak-e):
‘Icskimár’, ‘Iszpiszár’
Szenzitív fajták:
ázsiai: ‘Nimrang’, ‘Szultanina’, ‘Katta kurgán’
moldáviai: ‘Kismis moldavszkij’
Lisztharmat rezisztens interspecifikus hibrid:
‘Laszta’, ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’
Ázsiai vad fajok:
V. romanetii, V. coignetiae, V. amurensis, V. silvestris, V. yeshanensis
Alanyfajták:
Riparia portalis, Rupestris metalica, Riparia sauvage, Rupestris du Lot

‘Kadarka’ (a többi fajtától eltérően a *V. vinifera* convar. *pontica* változatcsoportba tartozik)

A *V. vinifera* specifikus markerrendszer kidolgozásához a következő fajtákat, illetve fajokat alkalmaztuk:

Referencia, *V. vinifera* fajták:
‘Barbera’, ‘Chardonnay’, ‘Pinot noir’

Lisztharmat ellenálló fajták:

‘Kismis vatkana’, ‘Tagobi’, ‘Gordin’, ‘Alexandrouli’, ‘Tsitska’, ‘Bazaletouri tsolikouri’, ‘Dzandzsal kara’, ‘Kabarcik’

Vad fajok:

V. romanetii, V. coignetiae, V. pagnucci, V. amurensis, V. silvestris, V. aestivalis, V. candicans, V. cinerea, V. monticola, V. cordifolia, V. titanica, V. arizonica, V. labrusca, V. lincecumi, V. yeshanensis, V. solonis, V. vulpina, V. longii puncee, V. riparia, V. slarini, V. dalniana, Muscadinia rotundifolia, Parthenocissus quinquefolia

Alanyfajták:

Riparia portalis, Riparia sauvage, Rupestris metalica

A levélmintákat Pécsett, a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben gyűjtöttük, vagy vesszőket kaptunk, amelyeket kihajtattunk, így jutva fiatal, friss levelekhez. A vad *Vitis* fajok egy részét az INRA Domaine de Vassal (Route de Sete 34340 Marseillan Plage) küldte meg számunkra. A különböző közép-ázsiai *V. vinifera* fajtákat, helyi génbankokból (Grúzia, Telavi Collection, Törökország: Ormanagzi falu, Olur, Erzurum városa) és az INRA-tól kértük és kaptuk meg.

A levélmintákat a DNS-izolálásig –70°C-on tároltuk.

3.2. DNS izolálás

A DNS izolálásához mintánként 100 mg fiatal levelet használtunk fel. A leveleket dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel elporítottuk, majd DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) alkalmazásával a DNS-t kivontuk és tisztítottuk a gyártó leírása szerint. A DNS koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel mértük, majd a törzsoldatokból 10 ng/µl koncentrációjú hígításokat készítettünk, amelyeket templátként használtunk fel a PCR reakciók során.

3.3. PCR körülmények és a vizsgálatokban szereplő markerek

A polimeráz láncreakciókat iCycler készülékben (Bio-Rad) végeztük, 10 µl végtérfogatban.

A reakcióelegy összetevői: 20 ng templát DNS, 0,6 egység WTB-*Taq* polimeráz (West Team Biotech, Pécs), 0,1 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,75 µM forward, ill. reverse primer, 1,25 mM $MgCl_2$, 1X PCR puffer.

A reakció-elegyet jégen mértük össze.

SSR analízis és CB markerek alkalmazása (3. táblázat):

Run1/Rpv1 rezisztencia génekkel kapcsolt markerek:

VMC8g9 és VMC4f3.1 markereket alkalmaztunk a *Run1* gén öröklődésének követésére, Barker et al. szerint (2005) és VMC1g3.2 markert az *Rpv1* gén követésére Wiedemann-Merdinoglu et al. szerint (2006). Az *Rpv1* gén követésére teszteltük a VMC1g3.2 közvetlen közelében található VVim11 és VVib32 markereket (Doligez et al. 2006). A CB markereket, CB69.70, CB137.138, CB191.192, Barker et al. (2005) fejlesztették ki BAC könyvtár alapján (Dry személyes közlés). Az Mtp3294 hibridpopuláció (VRH3082-1-42 x *V. vinifera* 'Cabernet Sauvignon') egyik lisztharmat rezisztens egyedét (3294-R23) használták fel a BAC könyvtár létrehozására (Barker et al. 2005).

Ren1 rezisztencia génnel kapcsolt markerek:

A VMC9h4.2, UDV20a és VMCNg4e10.1 SSR markereket használtuk, melyeket Hoffmann et al. (2008) térképeztek a *Ren1* lisztharmat rezisztencia gén közvetlen közelébe (0,9 cM). Ezeket az SSR markereket mi használtuk először marker alapú szelekcióra (Katula-Debreceni et al. 2010).

Lisztharmat QTL-lel kapcsolt markerek:

Három SSR markert, a VMC4d9.2, UDV15b és a VViV67 markereket használtuk Eibach et al. (2007) szerint, és a ScORA7-760 SCAR markert Akkurt et al. (2007) szerint.

Dendrogram szerkesztéséhez alkalmazott SSR markerek (4. táblázat):

A GrapeGen06 (http://www.montpellier.inra.fr/grapegen06) programban javasolt 9 SSR marker, melyek alapján az egyes fajták mikroszatellit ujjlenyomatát elkészítettük:
VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VVS2, ssrVrZag62, ssrVrZag79.

Fajspecifikus markerrendszer kidolgozásához alkalmazott markerek (5. táblázat):

A *V. vinifera* specifikus markerek azonosításához a következő markereket alkalmaztuk: kloroplasztiszban kódolt *rbcL* génekre (Soltis et al. 2000), sejtmagban kódolt gibberellinsav gén szekvenciákra (*GAI1*) (Wen et al. 2007) és *Vine-1* retrotranszpozonra tervezett primerek (Verriés et al. 2000), az antocián bioszintézisben szerepet játszó *Vvmyb* génnel kapcsolt marker: 20D18CB9 (Walker et al. 2006). A 20D18CB9 markert BAC könyvtár alapján tervezték (‘Cabernet Sauvignon’ Barker et al. 2005).

3. táblázat: Rezisztencia génekkel kapcsolt markerek

	Primer neve:	Forward primer szekvencia (5'–3')	Reverse primer szekvencia (5'–3')	Referencia
Run1/ Rpv1	VMC8g9	AAC ATT ATC AAC AAC ATG GTT TTA	ATA TTC ATC CTT CCC ATC ACT A	Barker at al. 2005
	VMC4f3.1	AAA GCA CTA TGG TGG GTG TAA A	TAA CCA ATA CAT GCA TCA AGG A	Barker at al. 2005
	VMC1g3.2	GAT AGT TAC CAT ACT TAG TCG GA	GAT AGT TAC CAT ACT TAG TCG GA	Merdinoglu et al. 2003
	VVIm11	AAA AGC CCA TTA AGT GCC AAT G	CCT ATG AAC TTA TTG GGC TCT T	Doligez et al. 2006
	VVIb32	GTA ACC ATC TCT AAC CAT TTC A	TGA GAA CAC TTC ACA GAG ATT T	Doligez et al. 2006
Run1	CB69.70	GAA AGT AAG GAG ACA AGG CG	CAC TTG CTT CTC CAT TAC CC	Barker at al. 2005.
	CB137.138	GGA TAG GAC ATG CTA TCG	CAT CTTTTC AGG GAT CGA G	Barker at al. 2005.
	CB191.192	GTC AAC GGT TTG TTT GAC C	CTG CAG AGT TAG GTT ACC	Barker at al. 2005.
Ren1	VMC9h4.2	GCA GTT GAT GCA AAA CAA CAG T	CAC ATC ATT CAT TGA TGA GGC T	DiGaspero et al. 2007, Hoffmann et al. 2008
	UDV020a	TGT TGG TGT GTG TTT GTA CGT G	TGT TGG CCT GAT GTT GAG AG	DiGaspero et al. 2007, Hoffmann et al. 2008
	VMCNg4e10.1	AAT GCA GCA GCG CCA GAT G	GCA GGC TGC TGC TGT TTT G	DiGaspero et al. 2007, Hoffmann et al. 2008
PM QTL	ScORA7-760	GAA ACG GGT GTG AGG CAA AGG TGG	GGC CAT TAG GAA ATC AAC ATT AC	Akkurt et al. 2007
	VMC4d9.2	CTC AAT GCC AATGGC TTT	GTTBCAA ATG TCA TGG CCC GTA G	Eibach et al. 2007
	UDV15b	TGC ACA TTT CCC TCC TTA G	CGG GTT ACT GGG AAG GGT AT	Eibach et al. 2007
	VViV67	TAT AACTTCTCATAGGGTTTC	TTG GAG TCC ATC AAA TTC ATC T	Eibach et al. 2007

4. táblázat: Az ázsiai fajták mikroszatellit ujjlenyomatához alkalmazott markerek

Primer neve:	Forward primer szekvencia (5'–3')	Reverse primer szekvencia (5'–3')	Referencia
VVS2	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	Thomas és Scott 1993
VVMD5	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	Bowers et al. 1996
VVMD7	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	CGAACCTTCACACGCTTGAT	Bowers et al. 1996
VVMD25	TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAAGG	TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG	Bowers et al. 1999
VVMD27	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	Bowers et al. 1999
VVMD28	AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGAGA	TCATCAATTTCGTATCTCTATTTGCTG	Bowers et al. 1999
VVMD32	TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG	GGAAAGATGGGATGACTCGC	Bowers et al. 1999
ssrVrZag62	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	Sefc et al. 1999
ssrVrZag79	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	TGCCCCCATTTTCAAACTCCCTTCC	Sefc et al. 1999

5. táblázat: Faj specifikus markerrendszer kidolgozásához alkalmazott markerek

Primer neve:	Forward primer szekvencia (5'–3')	Reverse primer szekvencia (5'–3')	Referencia
rbcL	ATG TCA CCA CAA ACA AGA AAC	TCC TTT TAG TAA AAG ATT GGG CCG AG	Soltis et al. 2000
GAI1	ATG GAT GAG CTT CTC GCT GT	TAG AAG TGC ATC TGT AGA AT	Wen et al. 2007
Vine-1 (G5D-E4R)	CCA TGT TTT GGG ACA GAA GG	ATC CTG AGG AGG TCA CAC A	Verriés et al. 2000
20D18CB9	GAT GAC CAA ACT GCC ACT GA	ATC ACC TTG TCC CAC CAA	Walker et al. 2006

A különböző SSR és CB markerek eltérő primer kapcsolódási (‘annealing’) hőmérsékletet igényelnek.

A CB primerpárok felszaporításához a reakció körülmények a következők:
2 perces 94°C-os előciklus (’hot start’); 40 cikluson keresztül: denaturálás 94°C-on 10 mp-ig, primerkapcsolódás 57°C-on 30 mp-ig, DNS-szintézis 72°C-on 1 percig; majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizáció.

Az SSR primerpárok felszaporításához ‘touch down’ PCR-t használtunk, melynek lépései a következők:

1. 2 perces 94 °C-os előciklus (‘hot start’),
2. 10 cikluson keresztül: 94°C-on 30 mp-ig - denaturálás
   65°C-on 30 mp-ig - primerkapcsolódás
   72°C-on 1 percig - DNS-szintézis.

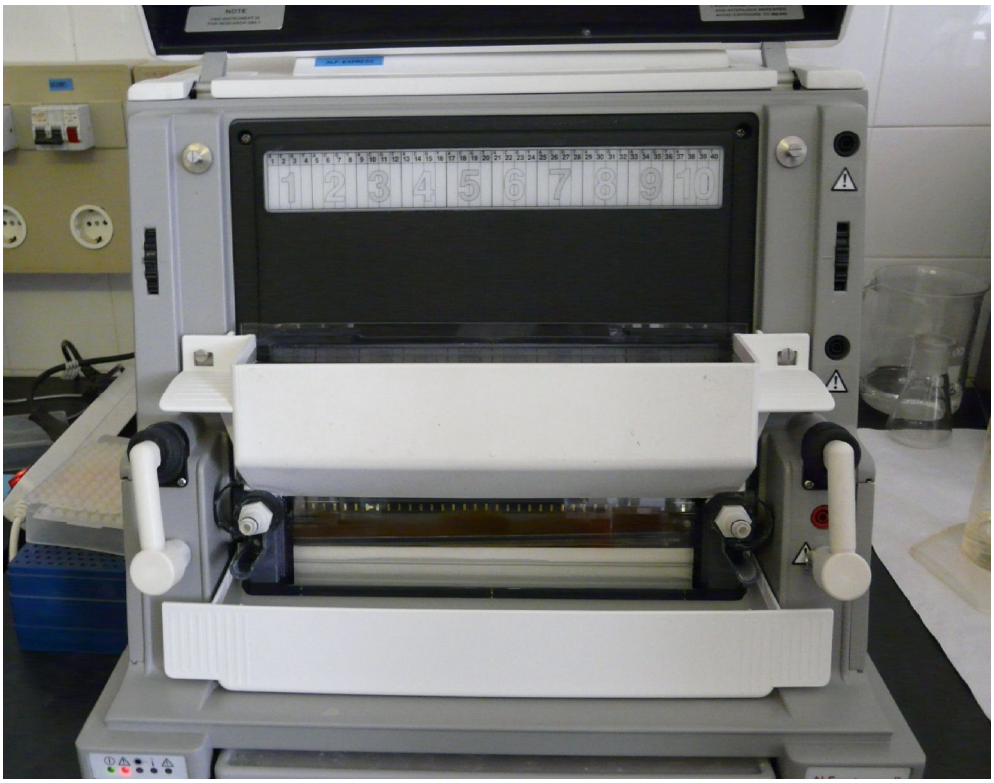
   A kapcsolódási hőmérséklet ciklusonként 1°C-kal csökken.
3. 24 cikluson keresztül: 94°C-on 30 mp-ig
   56°C-on 30 mp-ig
   72°C-on 1 percig;
   majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizáció.

A PCR reakciókat, és a PCR termékek futtatását agaróz gélen minden primerpár esetében minimum háromszor végeztük el. A futtatások többszöri ismétlése abban az esetben is indokolt, amikor túl erős fragmentumokat kapunk, és a termékeket különböző mértékben hígítani kell, hogy az allélokat az SSR analízis során el tudjuk egymástól különíteni.

3.4. Az ALF-Express II. készülék

Az ALF-Express II készülék (**8. ábra**) automatikusan detektálja a fluoreszcensen jelölt DNS fragmentumokat poliakrilamid gélelektroforézis közben. A gélelektroforézis vertikális, a fluoreszcensen jelölt fragmentumok negatív töltésük miatt lefelé, a katód felé vándorolnak. A gél hőmérsékletét (55°C) a thermoplate-en keresztül áramoltatott víz biztosítja. A gél vastagságát (0,3 mm vagy 0,5 mm) a kazettát alkotó két üveglap közötti üveglapocska (spacer) vastagsága határozza meg. A poliakrilamid gél denaturáló gél, a DNS mintákat felvitel előtt 95°C-on denaturálni kell, majd a mintákat jégre helyezni. A minták a gél tetején

kialakított 40 zsebbe vihetők fel. Futás közben a lézersugár áthalad az üveg spacereken és gerjeszti a fluoreszcensen jelölt DNS fragmentumokat. A kibocsátott fényt 40 fotodetektor detektálja, melyek az egyes sávok mögött találhatók. (Minden egyes sávnak külön fénydetektora van.) A detektorok jeleit a készülék összegyűjti és a számítógépnek továbbítja feldolgozás céljából. A jelek csúcsok formájában folyamatosan követhetők a futás során. Az ALFwin Fragment Analyser 1.00 szoftver segítségével az eredmények kiértékelhetők, az egyes fragmentumok méretei számszerűsíthetőek.



8. ábra: Az ALF-Express II. készülék (GE Healthcare BioSciences).

3.5. A mikroszatellit allélméretek meghatározása

A mintákat 1,2%-os, etídium-bromiddal festett agaróz gélen futtattuk meg 10 V/cm feszültséggel, majd a mintázatokat 313 nm-es UV fényben digitális kamerával fényképeztük és detektáltuk. Azokat a reakciótermékeket, amelyekben a mikroszatellit régiókat sikeresen felszaporítottuk, ALF-Express II. (ld. 3.4.) készülékben 8%-os poliakrilamid gélen (ReproGel^{TM} High Resolution, GE Healthcare BioSciences) futtattuk a pontos allélösszetételük és méretük meghatározása céljából. Ehhez a forward primereket Cy-5 fluoreszcens festékkel jelöltük. A futások során saját készítésű belső, illetve külső standardeket használtunk, melyek ismert hosszúságúak (a pBI426 plazmidban megtalálható

nptII (neomicin-foszfotranszferáz) gén szekvenciájáról szaporítottuk fel, Dr. Galli Zsolt ötlete alapján), és ugyancsak fluoreszcens festékkel jelöltük. A belső standerdek az SSR analízisben 95 bp, 275 bp és/vagy 300 bp méretűek voltak. Az alkalmazott standard méreteket úgy választottuk ki, hogy a PCR során felszaporodott fragmentumokat a belső standerdek közrefogják. A külső standardek: 95 bp, 275 bp, 300 bp és 500 bp méretűek voltak.

A *Vvmyb* génnel kapcsolt marker (20D18CB9) esetén, mivel annak mérettartománya jóval nagyobb, mint a mikroszatellitek esetében, 582 bp és 700 bp méretű standardeket készítettünk. Ebben az esetben a belső standard méretek: 95 bp, 275 bp, 300 bp és 700 bp. A külső standardek: 95 bp, 275 bp, 300 bp, 582 bp, 700 bp. A belső standard kiválasztásánál ügyelni kell arra, hogy a standard és a PCR során felszaporodott fragmentum mérete ne fedjék egymást, mert az az eredmény torzításához vezethet.

A PCR reakciókat követően a poliakrilamid gélre való felvitel előtt, a mintákból 1-4 µl-t (attól függően, hogy az agaróz gélen milyen erős fragmentumot kaptunk), a belső standardből 3 µl-t összekevertünk 3 µl bideszt. vízzel, majd a külső standardekkel együtt 95°C-on 5 percig denaturáltuk. A denaturálást követően a mintákat rögtön jégre helyeztük. A gél első, huszadik és negyvenedik zsebébe 4-4 µl külső standardet vittünk fel, majd a minták és a belső standardek keverékéből 8-8 µl-t tettünk a 2-19 és a 21-39 zsebekbe.

A futás paramétereit a következőképpen állítottuk be:

- áramerősség: 45 mA
- feszültség: 850 V
- teljesítmény: 30 Watt
- hőmérséklet: 55°C
- futási idő: 80 perc.

Minden futás alkalmával referencia mintákat, és az utódpopuláció szülőit is alkalmaztuk, a kapott allélméretek pontos meghatározása céljából. Az egyes futások közötti egyenetlenségek így kiküszöbölhetőek.

Az eredmény kiértékelését és dokumentálását a Fragment Analyser 1.0 számítógépes szoftver (GE Healthcare BioSciences) segítségével végeztük. Az ismert nukleotidhosszúságú külső és belső standardek segítségével, majd a számítógépes programmal meghatároztuk az egyes allélok pontos bázisméretét.

A CB markerekkel felszaporított termékeket 1,2%-os, etídium-bromiddal festett agaróz gélen értékeltük ki.

A multiplex PCR során kapott termékeket mind ALF-Express II. készülékkel, mind 4%-os Metaphor® (Cambrex Bioproducts, Biocenter Kft, Szeged) agaróz gélen is elválasztottuk.

3.6. Mikroszatellit allélméretek statisztikai értékelése és dendrogram szerkesztése

Az analízishez az UPGMA ('Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean') módszert alkalmaztuk, mely a hierarchikus klaszterezési eljárások közé tartozik. Hasonlósági koefficiensek segítségével összeállított mátrix alapján csoportosítja az objektumokat, és kapcsolatukat dendrogram formájában ábrázolja. Ezzel szemléletesen bemutatható az objektumok közötti hasonlóság vagy távolság (Hajósné Novák 1999).

A mikroszatellitekkel kapott allélméreteket binárisan kódoltuk, az adott méretű fragmentum meglétét 1-gyel, míg hiányát 0-val jelöltük. Az adatokat bevittük az SPSS 11.0 (IBM) statisztikai programba, ahol Jaccard index (1908) alapján klaszter analízist készítettünk. A klaszter analízis sok változó alapján csoportokat alakít ki, ami alapján összehasonlíthatjuk a fajtákat. Az eredmények szemléltetésére dendrogramot szerkesztettünk, melyet a program hasonlósági mátrix alapján készít el.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. Marker alapú szelekció alkalmazása különböző hibridpopulációkban

4.1.1. 06-1-es populáció: VRH 3082-1-42 BC_4 x 'Kismis vatkana'

A VRH 3082-1-42 BC_4 hibridet (Bouquet, 1986) Kozma és munkatársai keresztezték a 'Kismis vatkana'-val abból a célból, hogy a *Run1*/*Rpv1* és a *Ren1* gének kombinálásával multi-rezisztens szőlő genotípusokat nyerjenek.

A VRH 3082-1-42 BC_4 x 'Kismis vatkana' keresztezés összesen 1185 utódot eredményezett (06-1-es populáció). Üvegházi fertőzést követően, Pécsett a Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetben Kozma Pál és Hoffmann Sarolta bonitálták a növényeket, és aszerint, hogy hordoztak-e lisztharmat (PM) tüneteket vagy nem, két csoportra osztották az utódpopulációt: 286 PM szenzitív és 899 PM rezisztens egyedet határoztak meg (**9. ábra**). A tünetmentes: érzékeny egyedek hasadási aránya a hibridpopulációban 3:1. A fertőzési tünetek fenotípusos értékelése hosszadalmas és nehézkes folyamat, és ezzel a hagyományos módszerrel a különböző eredetű PM rezisztencia géneket hordozó, de azonos fenotípust mutató egyedeket nem lehet egymástól elkülöníteni.

9. ábra: (a) 06-1 (*M. rotundifolia* x *V. vinifera*) BC_4 x 'Kismis vatkana' hibridcsalád tesztelése üvegházban lisztharmat fogékonyságra: tünetmentes rezisztencia (OIV kód 455: 9 fokozat); (b) Üvegházi tesztelés során lisztharmat és peronoszpóra fogékonyságot mutató magonc a 06-1 hibridcsaládból (a felvételeket Dr. Hoffmann Sarolta készítette).

Az azonos fenotípust mutató, tünetmentes *Run1+*, *Ren1+* vagy *Run1+/Ren1+* genotípusokat molekuláris markerek segítségével azonosítottuk. A marker alapú szelekcióhoz (MAS) véletlenszerűen kiválasztottunk 410 PM rezisztens egyedet a 899-ből, és 30-at a 286 fogékonyból. Ezeken a növényeken teszteltük, hogy a *Run1* és/vagy *Ren1* specifikus markerek együtt hasadnak-e a PM rezisztenciával. A mintákon három *Ren1*-gyel, kettő *Run1*-gyel kapcsolt SSR markerrel, továbbá BAC szekvencia alapján tervezett további három markerrel, és egy *Rpv1* génhez kapcsolt SSR markerrel követtük a fenti rezisztencia gének (*Run1*/*Rpv1* és *Ren1*) öröklődését.

Olyan, az irodalomban korábban leírt markereket kerestünk, amelyek *Ren1*-gyel (Hoffmann et al. 2008), illetve *Run1*-gyel (Barker et al. 2005) kapcsoltak, és rutinszerűen alkalmazhatók a MAS-ra. Az irodalomban korábban nem írták le a *Run1*/*Rpv1* rezisztencia gének SSR markereinek pontos allélméreteit (a *Ren1*-gyel kapcsolt markerekét sem teljes egészében), sem pedig azt, hogy mely allélok kapcsoltak a PM rezisztenciával. Így első lépésben a szülők (BC_4 és ‘Kismis vatkana’) és az utódpopuláció 30 PM-tüneteket mutató, illetve 30 tünetmentes egyedének genotípusát határoztuk meg a kiválasztott markerekkel (**6. táblázat**). Mivel a populáció két, egymástól függetlenül öröklődő domináns PM rezisztenciagént tartalmaz, nem kereshettünk egy olyan allélméretet, ami minden rezisztens egyedben megtalálható, de egyik szenzitívben sem. A rezisztensnek vélt, tünetmentes egyedeknél úgy tudtuk meghatározni a rezisztenciával kapcsolt allélméreteket, hogy az egyes markereknél olyan allélméreteket kerestünk, amik a szenzitív egyedekben egyáltalán nem jelentek meg, a rezisztenseknek pedig mintegy a felében (**6. táblázat)**.

6. táblázat: A rezisztencia génekhez kapcsolt, a vizsgálataink során alkalmazott SSR markerekkel felszaporított pontos allélméretek

	Ren1			*Run1*		*Rpv1*
	VMC 9h4.2	UDV20a	VMC Ng4e10.1	VMC 8g9	VMC 4f3.1	VMC 1g3.2
‘Kismis vatkana’	262:**286**	138:**164**	240:**260**	167:174	160:186	122:140
BC_4	282:298	148:148	260:260	**160**:167	184:**186**	**122**:140
‘Cardinal’	289:307	140:160	265:286	179:179	162:162	135:140
BC_4 x ‘Kismis vatkana’						
Rezisztens genotípusok	282:**286** **286**:298	148:**164**	260:**260**	**160**:167 **160**:174	160:**186** 186:**186**	**122**:140 **122**:122
Szenzitív genotípusok	262:282 262:298	138:148	240:260	167:167 167:174	160:184 184:186	122:140 140:140

A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

4.1.1.1. A *Ren1* génnel kapcsolt markerek

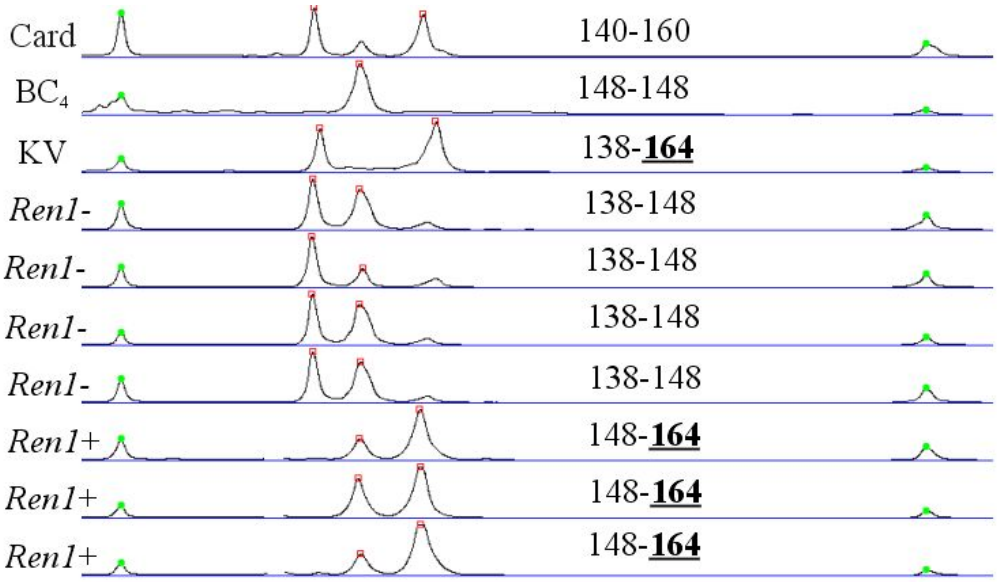
Ren1-gyel kapcsolt markerként a VMC9h4.2, UDV20a, és a VMCNg4e10.1 markereket használtunk, amelyeket Hoffmann et al. (2008) 0,9 cM távolságra térképeztek a *Ren1* lókusztól (**5. ábra**).

A VMC9h4.2 marker esetében azok az utódok, amelyek örökölték a 'Kismis vatkana' rezisztenciával kapcsolt 286 bp méretű alléját, *Ren1*+ genotípusok. A recesszív allél ennél a markernél a mi vizsgálataink szerint 262 bp. Hoffmann et al. (2008) szerint a 'Kismis vatkana' genotípusa 260:283, ahol az utóbbi kapcsolt a *Ren1* génnel. A néhány bázispáros allélméretbeli különbség a nemzetközi irodalomban is megtalálható ugyanazon fajta abszolút allélméreteiben, aminek oka legtöbbször az eltérő vizsgálati módszerekben keresendő (Crespan és Milani 2001). Az ilyen eltérések kiküszöbölésére vezették be This et al. (2004) az N kódolást, ami lehetővé teszi az egyes laboratóriumok közötti adatcserét (*Vitis* Mikroszatellit Konzorcium, VMC). A módszer lényege, hogy referencia fajtákat határoznak meg, melyeknek megállapítják a pontos allélméreteit az egyes lókuszokban. Az adott lókuszban megfigyelt legkisebb allélméretet tekintik N-nek, és az ettől való eltéréseket kódolva N+ értéknek. Így ha az abszolút allélméretekben van is eltérés az egyes laboratóriumok között, az N+ értékek minden esetben megegyeznek.

Az UDV020a marker a 'Kismis vatkana'-ban egy 138 és egy 164 bp méretű allélt szaporított fel. Azok az utódok, amelyek örökölték a rezisztenciáért felelős 164 bp méretű allélt, *Ren1*+, rezisztens genotípusok (**10. ábra**). Hoffmann et al. (2008) a rezisztenciával kapcsolt allélméretet 161-nek határozták meg, míg a recesszív allélt nem határozták meg, kérdőjellel jelölték a 13-as kapcsoltsági csoport fizikai térképén.

A VMCNg4e10.1 markerrel azok az utódok amelyek 260:260 homozigóták *Ren1*+, rezisztens genotípusok. Adatainkat Hoffmann et al. (2008) eredményeivel összevetve, pár bázispáros eltérést itt is tapasztaltunk: a 'Kismis vatkana' genotípusa 236:259, mi pedig 240:260 allélméreteket kaptunk. A nagyobb allélméret kapcsolt a *Ren1* génnel. A VMC9h4.2 és VMCNg4e10.1 primerek alkalmasak multiplex PCR-re, melynek eredményeit az **4.1.1.4.** Multiplex PCR és agaróz alapú gélelektroforézis című fejezetben részletezzük.

Mindhárom marker egyértelmű diagnosztikus értékű eredményeket adott (**7. és 9. táblázat**). A három *Ren1*-gyel kapcsolt marker allél minden esetben együtt öröklődött, megerősítve a szoros kapcsoltságot (Hoffmann et al. 2008). Az összes növény, amely hordozza a *Ren1* génnel kapcsolt markert, PM rezisztens, és a 30 szenzitív minta egyike sem tartalmazza ezt az allélt.



10. ábra: *Ren1* génnel kapcsolt marker (UDV20a) elemzése a 06-1-es populációban. Card: 'Cardinal', fogékony referencia fajta, Szülők: BC_4: 148-148 *(Ren1-)*, KV: 'Kismis vatkana': 138-**164** *(Ren1+)*, Utódpopuláció egyedei: 138-148 genotípusú: *Ren1-*, 148-**164** genotípusú: *Ren1+*. A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

4.1.1.2. A *Run1* génnel kapcsolt markerek

Run1 génnel kapcsolt markerként a VMC8g9 és a VMC4f3.1 primereket használtuk Barker et al. (2005) szerint, akik a VRH3082-1-42 BC_4 x *V. vinifera* 'Cabernet Sauvignon' hibridcsaládot vizsgálva megállapították, hogy a VMC8g9 minden esetben együtt hasadt a PM-rezisztens fenotípussal, míg a VMC4f3.1 SSR lókuszt 0,6 cM és a VMC1g3.2 lókuszt 4,4 cM távolságra térképezték a *Run1* géntől.

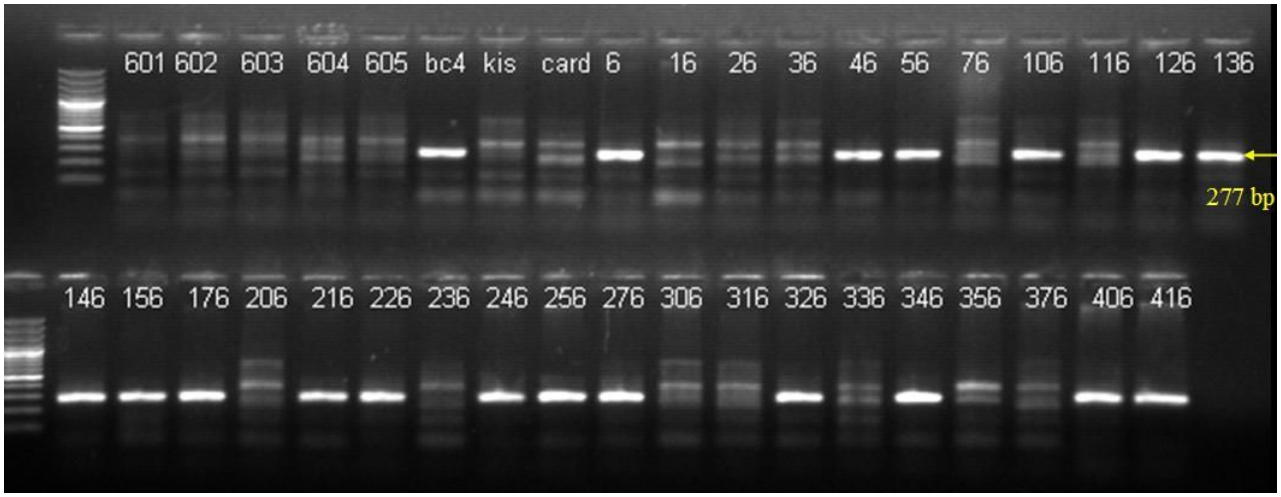
A VMC8g9-cel kapott allélméretek (**6. táblázat**) 160, 167 és 174 bp, ahol a 160 bp méretű allél kapcsolt a *Run1* génnel. Az egyes allélok egymástól jól és egyértelműen elkülöníthetőek voltak. A VMC8g9 alkalmas a *Run1* rezisztencia gént hordozó egyedek szelektálására.

A VMC4f3.1 markerrel a BC_4 hibridcsaládnál egy 184 és egy 186 (*Run1* kapcsolt) bázispár méretű allél szaporodott fel, míg a 'Kismis vatkana'-nál 160 és 186 bp (**6. táblázat**). A 2 bp méretkülönbség olyan csekély, hogy az utódpopuláció 160:184 és 160:186 genotípusainál nem lehetett minden esetben egyértelműen kijelenteni, mely egyedek tartalmazzák a rezisztenciával kapcsolt 186 bp méretű allélt, ezért ezt a markert kizártuk a későbbi vizsgálatokból. A BC_4 és a 'Kismis vatkana' szülők mellett, a PM-érzékeny 'Cardinal' fajta referenciaként szerepel a táblázatban.

Mivel csak egy informatív *Run1* kapcsolt marker állt a rendelkezésünkre, úgy gondoltuk, fontos, hogy olyan markert keressünk, ami a VMC8g9-cel kapott eredményeket

egy attól független módszerrel megerősíti. Ezért teszteltük a domináns CB191.192, CB69.70, és CB137.138 markereket, hogy együtt hasadnak-e az SSR markerrel. A CB primereket Barker et al. (2005) tervezte BAC szekvencia alapján.

A CB domináns markerekre végzett PCR a BC_4 és az utódpopuláció rezisztens egyedeiben a várt méretű fragmentum felszaporodásával: CB191.192 primerpár esetén 284 bp, CB69.70 primerpár esetén 157 bp és CB137.138 primerpár esetén 277 bp (**11. ábra**) jelezte a *Run1* gén jelenlétét.



11. ábra: A 06-1-es populáció elemzése a *Run1*-kapcsolt CB137.138 markerre nézve.
Az 1. zsebben molekulatömeg marker található (GeneRuler 100 bp Ladder Plus), a 06-1/601-605. számú minták szenzitívek (*Run1*-), BC_4: *Run1*+, 'Kismis vatkana': *Run1*-,'Cardinal' szenzitív genotípus (*Run1*-), 06-1/6-416 számú minták tünetmentes egyedek. A nyilak a rezisztenciát jelző 277 bp méretű fragmentumokra mutatnak.

Az összes egyed, ami tartalmazta a VMC8g9-cel a *Run1* rezisztencia génnel kapcsolt allélt, pozitív lett a CB markerekkel is, tehát a kapott eredmények megerősítették egymást. A CB69.70 marker esetében azonban négy tünetmentes mintánál (76, 116, 236, 636) felszaporodott a várt 157 bp méretű fragmentum, de csak nagyon kis mennyiségben a biztosan pozitív minták nagyon erős jeléhez képest.

A *Ren1* rezisztencia génnel kapcsolt mindhárom marker (VMC9h4.2, UDV020a, VMCNg4e10.1) eredménye egybeesik (**7. táblázat**), így a *Ren1*+ genotípusok könnyen szelektálhatóak. A *Run1* rezisztencia génnel kapcsolt markerek eredményei alapján, a VMC8g9, a CB191.192 és a CB137.138 primerek adatait tekintettük megbízhatónak, mivel azok eredményei minden esetben megegyeztek.

Az **7. táblázatban** szereplő adatok bizonyítják a VMC8g9 és a CB markerek szoros kapcsoltságát ugyanazoknál a növény egyedeknél, melyek CB eredményei a **11. ábrán** láthatóak. Azok a növények, amelyek nem tartalmazzák a *Run1* gént (pl. 16, 26, 36, 76, stb.)

és mégis tünetmentesek a lisztharmatfertőzésre, a ‘Kismis vatkana’-tól örökölték az ugyancsak PM rezisztenciáért felelős *Ren1* gént. Azok az egyedek, amelyek mindkét rezisztencia gént tartalmazzák (46, 106, 136, 146, 156, 216, 226, 406 és 416) értékes alapanyagul szolgálnak a növénynemesítés számára, mivel két, különböző genetikai forrásból származó, és különböző kromoszómán lévő domináns PM rezisztencia gént hordoznak.

Az összes növény, ami tartalmazza a *Run1*-gyel kapcsolt markereket, PM-tünetmentes fenotípust mutatott, és a 30 fogékony egyed egyike sem tartalmazta a rezisztenciával kapcsolt allélokat egyik markerrel sem.

7. táblázat: Harminc véletlenszerűen kiválasztott, tünetmentes egyed (06-1 populáció) tesztje hat *Ren1* és *Run1* specifikus markerrel

Lisztharmat tüneteket nem mutató	*Ren1*			*Run1*		
06-1/	VMC 9h4.2	UDV 020a	VMC Ng4e10.1	VMC 8g9	CB 191.192	CB 137.138
6	-	-	-	+	+	+
16	+	+	+	-	-	-
26	+	+	+	-	-	-
36	+	+	+	-	-	-
46	+	+	+	+	+	+
56	-	-	-	+	+	+
76	+	+	+	-	-	-
106	+	+	+	+	+	+
116	+	+	+	-	-	-
126	-	-	-	+	+	+
136	+	+	+	+	+	+
146	+	+	+	+	+	+
156	+	+	+	+	+	+
176	-	-	-	+	+	+
206	+	+	+	-	-	-
216	+	+	+	+	+	+
226	+	+	+	+	+	+
236	+	+	+	-	-	-
246	-	-	-	+	+	+
256	-	-	-	+	+	+
276	-	-	-	+	+	+
306	+	+	+	-	-	-
316	+	+	+	-	-	-
326	-	-	-	+	+	+
336	+	+	+	-	-	-
346	-	-	-	+	+	+
356	+	+	+	-	-	-
376	+	+	+	-	-	-
406	+	+	+	+	+	+
416	+	+	+	+	+	+

A *Ren1*+/*Run1*+ genotípusokat szürke színezéssel jelöltük.

4.1.1.3. Az *Rpv1* génnel kapcsolt markerek

Merdinoglu et al. (2003) a VMC1g3.2 SSR markert a peronoszpóra rezisztenciával kapcsoltan öröklődőnek találták, így annak követésére alkalmas marker.

Az *Rpv1* gén jelenlétének kimutatására alkalmazott VMC1g3.2 marker a BC_4 és a 'Kismis vatkana' szülőkben azonos méretű allélokat eredményezett (122:140 bp), ezért *Rpv1+* genotípusként csak azokat a növényeket azonosíthattuk, amelyek homozigóták a 122 bp méretű allélre. A heterozigóták elemzése újabb marker bevonását igényli. A VMC1g3.2 marker lókusz közvetlen közelében található két újabb markerrel (VVIm11 és VVIb32) kezdtük el a vizsgálatokat (Doligez et al. 2006). Azok az egyedek, amelyek homozigóták a 122-es allélre, tehát *Rpv1+*-ak, egyben mind *Run1+*-ak is (**9. táblázat**). Megerősítettük a Merdinoglu et al. (2003) által más anyagon megfigyelt jelenséget, miszerint a *Run1* és *Rpv1* gének szorosan kapcsoltan öröklődnek.

A Genetika és Biotechnológiai Intézetben korábban vizsgált BC_5 (BC_4 x 'Kismis moldavszkij') hibridcsaládot használtuk az új markerek tesztelésére, mert ennél a populációnál rendelkezésünkre álltak szabadföldi peronoszpóra felvételezési adatok (Kozma Pál, személyes közlés). A populációból kiválasztottunk hét szenzitív és hét rezisztens egyedet, majd mind a korábban alkalmazott markerekkel (VMC8g9, VMC1g3.2), mind a két új markerrel (VVIm11 és VVIb32) elvégeztük az elemzést (**8. táblázat**). A *Run1* génnel kapcsolt VMC8g9 markerrel és az *Rpv1*-gyel kapcsolt VMC1g3.2 markerrel kapott eredmények megegyeztek a fenotipizálási adatokkal. A VVIb32 markerrel kapott genotípus adatok szórnak a szenzitív és a rezisztens fenotípusú egyedek között, tehát ez a marker nem alkalmas az *Rpv1* rezisztencia gén követésére. A VVIm11 markerrel kapott eredmények viszont megegyeznek a VMC8g9 és a VMC1g3.2 eredményeivel, így feltételezhetjük, hogy ez a marker együtt hasad az *Rpv1* génnel is. A markerek tesztelése után elvégeztük a PCR-t a VVIm11-gyel a 06-1-es populáció egyedein, hogy megnézzük, alkalmazható-e a marker ennél a populációnál is. Kiválasztottunk véletlenszerűen 109 egyedet (minden ötödiket) és a szülőket. A szülők és az utódpopuláció néhány egyedének allélméreteit a **9. táblázatban** mutatjuk be.

8. táblázat: A 02-1-es (BC_4 x ‘Kismis moldavszkij’) populáció allélösszetétele

		VMC8g9 lisztharmat		VMC1g3.2 peronoszpóra		VVIm11
BC_4		**160**:167		**122**:140		270:**295**
‘Kismis moldavszkij’		160:174		128:142		295:295
Rezisztens genotípusok		**160**:174 **160**:160		**122**:128 **122**:142		**295**:295
Szenzitív genotípus		160:167 167:174		128:140 140:142		270:295
Peronoszpóra fenotipizálási adatok	Minta szám	Genotípusok				
Szenzitív	5	167:174	SZ	140:142	SZ	270:295
Szenzitív	7	160:167	SZ	128:140	SZ	270:295
Szenzitív	10	160:167	SZ	128:140	SZ	270:295
Szenzitív	12	160:167	SZ	128:140	SZ	270:295
Szenzitív	17	160:167	SZ	128:140	SZ	270:295
Szenzitív	19	167:174	SZ	140:142	SZ	270:295
Szenzitív	30	160:167	SZ	128:140	SZ	270:295
Rezisztens	**8**	**160**:174	R	**122**:142	R	**295**:295
Rezisztens	**9**	**160**:174	R	**122**:142	R	**295**:295
Rezisztens	**13**	**160**:174	R	**122**:142	R	**295**:295
Rezisztens	**16**	**160**:174	R	**122**:142	R	**295**:295
Rezisztens	**23**	**160**:160	R	**122**:142	R	**295**:295
Rezisztens	**32**	**160**:174	R	**122**:142	R	**295**:295

A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

A VVIm11 marker az *Rpv1* gént tartalmazó, peronoszpórára rezisztens szülőnél, a BC_4-nél felszaporított egy 270 és egy 295 bp méretű allélt, a peronoszpóra érzékeny ‘Kismis moldavszkij’ pedig 295 homozigóta. Mivel a peronoszpóra rezisztens egyedek mind homozigóták a 295 bp méretű allélre, feltételeztük, hogy a rezisztenciával kapcsolt allél 295 bp méretű. Nem jelent problémát, hogy a szenzitív és a rezisztens egyedek allélméretei (295 bp) megegyeznek, mert ilyen esetben nemcsak az allélméreteket, hanem a genotípust kell nézni. Az utódpopuláció rezisztens egyedeinek genotípusa 295:295, a szenzitív egyedek genotípusa pedig 270:295.

A 06-1-es populáción tesztelve a markert azt az eredményt kaptuk, hogy a ‘Kismis vatkana’ esetében egy 260 és egy 285 bp méretű fragmentum szaporodott fel. Ez azt jelenti, hogy ennél a populációnál nincs allélegyezőség, tehát még egyértelműbben szét lehet válogatni a szenzitív egyedeket a rezisztensektől. A feltételezésünk szerint peronoszpóra rezisztenciával kapcsolt 295-ös allél a BC_4 x ‘Kismis vatkana’ populáció szenzitív egyedeinél nem szaporodott fel. A VMC1g3.2-vel kapott 122 bp méretű allélre homozigóta egyedeknél a

295 bp méretű allél minden esetben felszaporodott, míg a 122-es allélt nem tartalmazó egyedeknél (140:140 homozigóta szenzitív) nem, így a marker alkalmazható az *Rpv1* gén követésére. Megállapíthatjuk, hogy a biztosan *Rpv1* gént hordozó egyedek VVIm11-gyel tartalmazzák az adott méretű, 295 bp méretű allélt. A marker nagy előnye, hogy így a heterozigóta (122:140) egyedeket is szét tudjuk válogatni, tehát el tudjuk különíteni a peronoszpórára szenzitív és rezisztens genotípusokat. Ahhoz, hogy eredményeinket alá tudjuk támasztani, szükség lesz a populáció mesterséges peronoszpóra fertőzésére és a bonitálási adatokra. A VVIm11-et korábban még nem használták MAS-ra, mi alkalmaztuk először a szenzitív és rezisztens genotípusok elkülönítésére.

9. táblázat: A 06-1-es (BC_4 x 'Kismis vatkana') populáció 50 véletlenszerűen kiválasztott egyedének allélösszetétele

	Ren1		*Run1*			*Rpv1*	
	VMC 9h4.2	UDV 20a	VMC 8g9	CB191 .192	CB137 .138	VMC 1g3.2	VVim 11
BC_4	282:298	148:148	**160**:167	+	+	**122**:140	270:**295**
KV	262:**286**	138:**164**	167:174	-	-	122:140	260:285
Rezisztens genotípus	282:**286** **286**:298	148:**164**	**160**:167 **160**:174	+	+	**122**:140	260:**295**
Szenzitív genotípus	262:282 262:298	138:148	167:167 167:174	-	-	122:140	260:270
5	286:298	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
10	282:286	148:164	167:174	-	-	122:140	260:270
15	286:298	148:164	167:174	-	-	122:140	260:270
20	262:282	148:164	167:167	-	-	140:140	270:285
25	282:286	148:164	167:167	-	-	140:140	270:285
30	262:298	138:148	160:174	+	+	122:140	260:270
35	262:282	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
40	286:298	148:164	160:174	+	+	122:140	260:270
45	262:298	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
50	282:286	148:164	167:167	-	-	140:140	270:285
55	286:298	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
60	282:286	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
65	262:282	138:148	160:167	+	+	122:122	260:295
70	262:282	138:148	167:174	-	-	122:140	260:270
75	262:282	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
80	262:282	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
85	262:282	138:148	167:174	-	-	122:140	260:270
90	282:286	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
95	286:298	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
100	282:286	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
105	286:298	148:164	167:167	-	-	140:140	270:285
110	262:282	138:148	160:174	+	+	122:122	260:295
115	262:298	138:148	160:167	+	+	122:122	260:295

120	262:298	138:148	160:174	+	+	122:122	260:295
125	282:286	148:164	167:174	-	-	122:140	260:270
130	262:298	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
135	286:298	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
140	286:298	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
145	286:298	148:164	167:174	-	-	122:140	260:270
150	262:298	138:148	160:174	+	+	122:122	260:295
155	286:298	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
160	282:286	148:164	167:174	-	-	122:140	260:270
165	262:282	138:148	160:174	+	+	122:140	285:295
170	286:298	148:164	167:167	-	-	122:140	260:270
175	282:286	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
180	286:298	148:164	167:167	-	-	140:140	270:285
185	286:298	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
190	286:298	148:164	160:174	+	+	122:140	260:295
195	286:298	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
200	282:286	148:164	160:174	+	+	122:140	260:295
205	286:298	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
210	282:286	148:164	167:174	-	-	122:140	260:270
215	282:286	148:164	167:167	-	-	140:140	270:285
220	262:298	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
225	286:298	148:164	167:167	-	-	122:140	260:270
230	262:298	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
235	286:298	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
240	286:298	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
245	262:298	138:148	160:174	+	+	122:122	260:295
250	262:282	138:148	160:174	+	+	122:122	260:295

A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

Az ALF futások eredményeinek kiértékelése után az adatokat táblázatba foglaltuk, +, illetve – jellel jelölve, hogy az utódpopuláció mely egyedei tartalmazzák az adott markerrel kapcsolt rezisztencia gént. A vizsgálatainkban szereplő összes minta eredménye az **1-es számú melléklet 17. táblázatában** található.

A 06-1 populáció 440 egyedét vizsgálva, a szenzitív fenotípust mutató növények egyike sem tartalmazza egyik rezisztencia gén egyik kapcsolt markerét sem. A PM tünetmentes 410 növény közül – a markerelemzés szerint – 36% tartalmazza mind a *Run1*, mind a *Ren1* rezisztencia géneket, míg 28% *Run1* pozitív és 36% *Ren1* pozitív. A *Ren1*+ genotípusok javára való eltolódást okozhatja az, hogy míg a *Run1* egy főhatású (major) QTL, amely a *M. rotundifolia*-ból introgresszálódott a visszakeresztezések során a BC_4 hibridbe, addig a *Ren1* PM rezisztencia gén egy domináns, monogénes rendszer, amit a 'Kismis vatkana' x 'Nimrang' keresztezés 1:1-es hasadási viszonyai is alátámasztanak (Kozma et al, 2006).

4.1.1.4. Multiplex PCR és agaróz gélelektroforézis

A szelekciós folyamat továbbfejlesztésének céljából, multiplex PCR-en és agaróz alapú gélelektroforézisen alapuló módszert dolgoztunk ki. Bár az alapvető célunk a két különböző PM rezisztencia gént hordozó genotípusok kiválogatása, illetve az egyes rezisztencia gének jelenlétének bizonyítása volt, az *Rpv1* génnel kapcsolt VMC1g3.2 markert is alkalmaztuk a peronoszpóra rezisztencia követésére. Az eredményeink alátámasztották, hogy a *Run1* és *Rpv1* kapcsolt markerek koszegregálnak. Az adataink bizonyítják, hogy a marker alapú szelekció gyors és pontos módszert kínál a nemesítési célkitűzésnek megfelelő, halmozott rezisztenciagéneket hordozó genotípusok szelekciójára.

Célkitűzéseink között szerepelt a halmozott rezisztencia géneket hordozó genotípusok szelekciója egy lépésben, multiplex PCR reakcióban. Ehhez úgy kellett kiválogatni az egyes primerpárokat, hogy az amplifikálódott allélméretek ne fedjék egymást, és a primerek kapcsolódási hőmérséklete a PCR reakció során megegyezzen. Ennek alapján a következő primerpárok alkalmasak multiplex PCR-re:

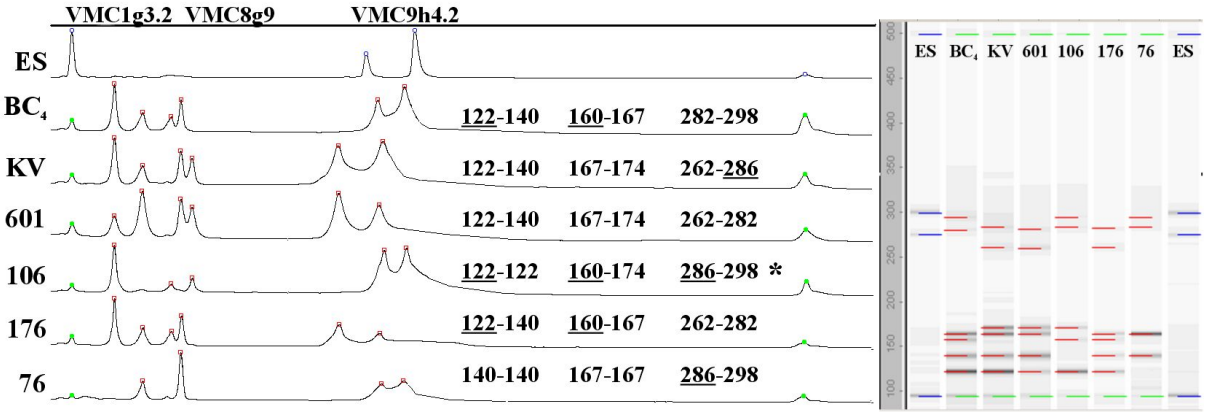
VMC9h4.2 (*Ren1*)/VMC8g9 (*Run1*),

VMCNg4e10.1 (*Ren1*)/VMC8g9 (*Run1),*

VMC1g3.2 (*Rpv1*)/VMC9h4.2 (*Ren1*),

VMC1g3.2 (*Rpv1*)/VMCNg4e10.1 (*Ren1*)

és VMC1g3.2 (*Rpv1*)/VMC8g9 (*Run1*)/VMC9h4.2 (*Ren1*) (**12. ábra**).



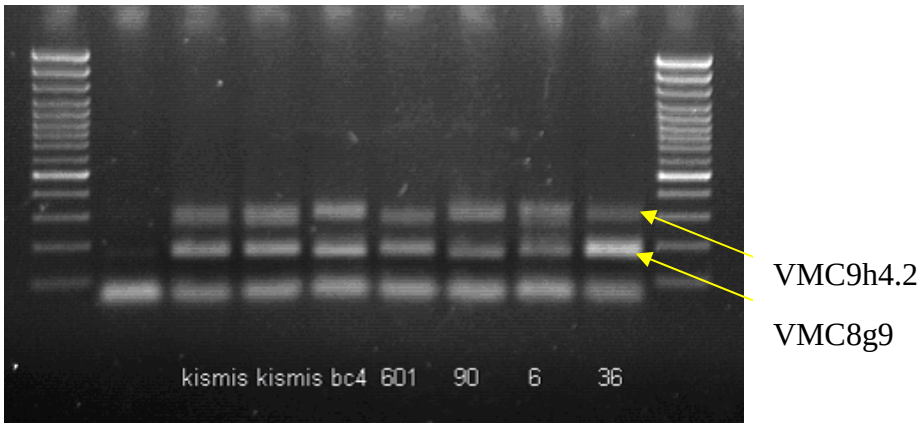
12. ábra: VMC1g3.2, VMC8g9 és VMC9h4.2 markerekkel végzett triplex PCR ALF elektroforetogramja.

(a) ES: külső standard (95, 275, 300, 500 bp), BC_4 (*Run1*+/*Ren1*−), KV: 'Kismis vatkana' (Run1−/*Ren1*+), BC_5 utódpopuláció: 601: *Run1*−/*Ren1*−, 106: *Run1*+/*Ren1*+, 176: *Run1*+/*Ren1*−, 76: *Run1*−/*Ren1*+. A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással jelöltük. A *Run1*+/*Ren1*+ genotípust csillaggal jelöltük.
(b) A multiplex PCR virtuális gél fotója.

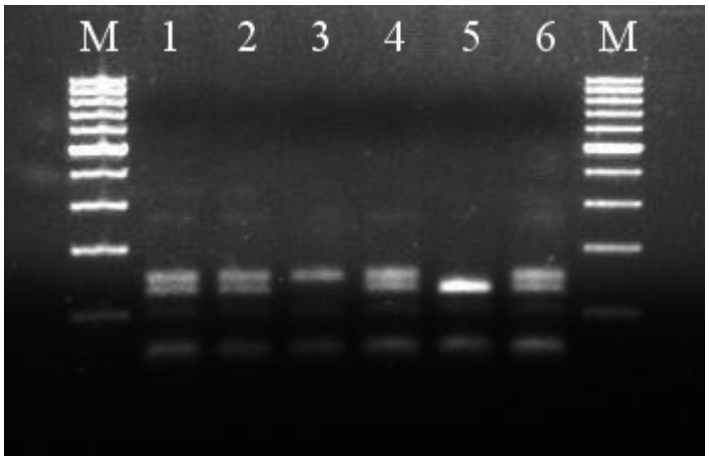
Ennek a módszernek nagy előnye, hogy egy lépésben, időt, pénzt, energiát megtakarítva szelektálhatjuk ki az értékes genotípusokat. Gyorsan és hatékonyan tudjuk a rezisztencia gének jelenlétére tesztelni a VRH 3082-1-42 BC_4 x 'Kismis vatkana' BC_5 utódnemzedék mind a 899 tünetmentes egyedét, ill. ez a módszer más olyan hibridcsaládok tesztelésére is kiválóan alkalmas, amelyek ugyanezeket a szülői partnereket tartalmazzák. Lehetőség nyílik a halmozott rezisztenciagéneket hordozó genotípusok szelekciójára, rutinszerűen vizsgálhatjuk az utódpopulációt multiplex PCR reakcióban a *Run1* és *Ren1* gén együttes jelenlétére.

Molnár et al. (2007) korábban már leírták, hogy a (VRH 3082-1-42 BC_4 x *V. vinifera* 'Cardinal') BC_5 utódnemzedékben a VMC8g9 markerrel felszaporított allélok nagy felbontóképességű 4%-os Metaphor gélen is elválaszthatóak. Ennek a módszernek az az előnye, hogy nem igényli a költséges és körülményes poliakrilamid gélelektroforézist, ALF Express II. készüléket, és a primerek fluoreszcens jelölését.

A BC_4 x 'Kismis vatkana' hibridcsalád tesztelése során duplex PCR reakciót alkalmaztunk, VMC8g9 markert a *Run1*+ genotípusok, és VMC9h4.2 markert a *Ren1*+ genotípusok kiválogatására. A PCR reakció során kapott termékeket mind 1,2%-os agarózon, mind 4%-os Metaphor agarózon elválasztottuk (**13. és 14. ábra**).



13. ábra: Duplex PCR (VMC9h4.2, VMC8g9) 1,2%-os agarózon elválasztva.
Az 1. zsebben molekulatömeg marker található (GeneRuler 100 bp Ladder Plus) (magyarázat a szövegben) Kismis: 'Kismis vatkana', bc4: BC_4 szülők, utódpopuláció egyedei: 06-1/601 (szenzitív genotípus), 06-1/90, 06-1/6, 06-1/36 (rezisztens genotípusok)



14. ábra: VMC1g3.2 markerrel végzett PCR 1,2%-os agarózon elválasztva.
M: molekulatömeg marker (GeneRuler 100 bp Ladder), 1. BC_4 (122:140), 2. 'Kismis vatkana' (122:140), 3. 06-1/604 szenzitív minta (140:140), 4. 06-1/90 PM tünetmentes minta (122:140), 5. 06-1/6 PM tünetmentes minta (122:122), 6. 06-1/36 PM tünetmentes minta (122:140). Zárójelben a VMC1g3.2 markerrel kapott allélméreteket tüntettük fel.

A **13. ábrán** látható, hogy a duplex PCR során mindkét primerpárral felszaporodtak a DNS fragmentumok. Az 1,2%-os agaróz nem alkalmas azonban arra, hogy a rezisztens genotípusokat a szenzitívektől el tudjuk különíteni, ezért a nagyobb felbontóképességű Metaphor agarózon is elválasztottuk a PCR termékeket.

Az 1,2%-os agaróz csak a VMC1g3.2 marker esetében alkalmas a DM rezisztens, 122:122 genotípusú és a szenzitív 140:140 genotípusok elkülönítésére (**14. ábra**).

Az allélméreteket pontosan ismertük, azokat korábban az ALF készülékkel meghatároztuk.

A két szülő, a ‘Kismis vatkana’ és a BC_4 genotípusa:

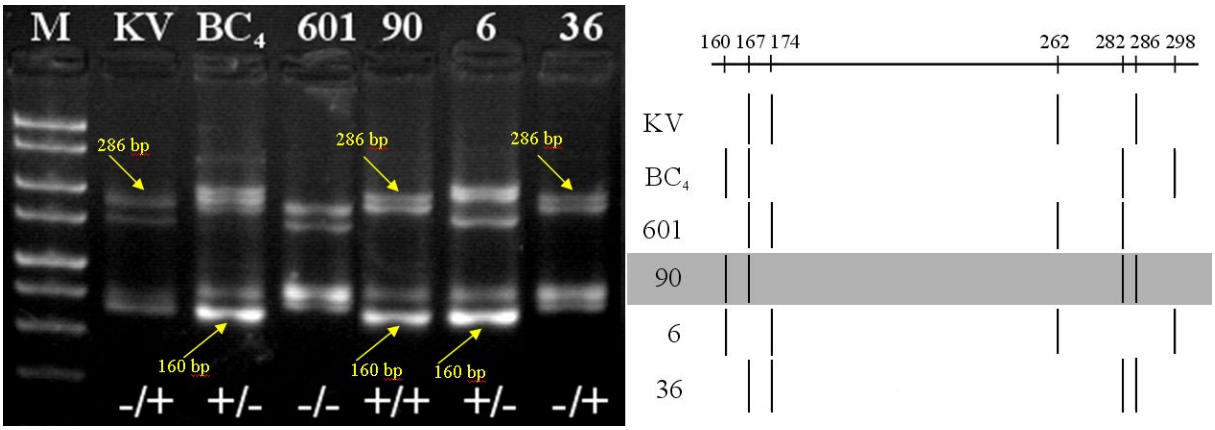
	VMC8g9:	VMC9h4.2:	*Run1/Ren1*
‘Kismis vatkana’:	167:174	262:**286**	*Run1-/Ren1+*
BC_4:	**160**:167	282:298	*Run1+/Ren1-*

A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

Az utódpopuláció egyedei közül kiválasztottunk négyet (06-1/601, 06-1/90, 06-1/6, 06-1/36), amelyek a négy különböző genotípust reprezentálják (*Run1-/Ren1-; Run1+/Ren1+; Run1+/Ren1-; Run1-/Ren1+).*

Ezek genotípusa a következő:

	VMC8g9	VMC9h4.2	*Run1/Ren1*
06-1/601:	167:174	262:282	*Run1-/Ren1-*
06-1/90:	**160**:167	282:**286**	*Run1+/Ren1+*
06-1/6:	**160**:174	262:298	*Run1+/Ren1-*
06-1/36:	167:174	282:**286**	*Run1-/Ren1+*



15. ábra: a) VMC8g9 és VMC9h4.2 markerekkel végzett duplex PCR 4%-os Metaphor agarózon elválasztva.

M: molekulatömeg marker (BioLine HyperLadder V., Izinta Kft, Budapest, Hungary), 2. ‘Kismis vatkana’: *Run1-/Ren1+* 3. BC_4: *Run+/Ren1-*, 4-7. utódpopuláció egyedei 06-1/601: *Run1-/Ren1-*, 06-1/90: *Run1+/Ren1+*, 06-1/6: *Run1+/Ren1-*, 06-1/36: *Run1-/Ren1+*. A rezisztencia génnel kapcsolt allélokat nyíllal jelöltük.

b) A duplex PCR vonalkódja.

Szürke színezéssel jelöltük az értékes, mindkét lisztharmat-rezisztencia gént tartalmazó genotípust.

A **15. ábrán** jól látható, hogy az az egyed, amelyik örökölte a BC_4 szülő 160 bp méretű *Run1* lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt allélját, az *Run1+* genotípusú, amelyik utód a 'Kismis vatkana' 286 bp méretű *Ren1* lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt allélját örökölte, az *Ren1+* genotípusú, ill. amelyik mindkettőt tartalmazza, *Run1+/Ren1+* genotípus. Ezzel a módszerrel egyszerű agaróz alapú elektroforézissel is elkülöníthetők a rezisztens egyedek. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a **15b ábrán** a multiplex PCR eredményét vonalkóddal is ábrázoltuk.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy azok az SSR markerek, amelyeket a *Run1* és *Ren1* lisztharmat rezisztencia gének térképezésére fejlesztettek, alkalmasak marker alapú szelekcióra. Ezekkel a markerekkel bizonyítani tudtuk a halmozott rezisztencia gének jelenlétét a BC_5 hibridpopulációban. Az azonos fenotípust meghatározó halmozott rezisztenciagéneket (*Run1, Ren1*) tartalmazó növények azonosítása csak DNS-szintű elemzéssel lehetséges. Bizonyítottuk, hogy a *Ren1* génnel kapcsolt SSR markerek rutinszerűen használhatók MAS-ra.

4.1.2. 06-3-as populáció: *Vitis vinifera* 'Génuai zamatos' x *Vitis vinifera* 'Kismis vatkana'

A *V. vinifera* 'Génuai zamatos' x *V. vinifera* 'Kismis vatkana' keresztezés célja az volt, hogy a kitűnő csemegeszőlő 'Génuai zamatos' fajtába bevigyék a *V. vinifera* eredetű lisztharmat rezisztencia gént (*Ren1)* a 'Kismis vatkana'-ból. Mivel a szőlő rezisztencianemesítés során alkalmazott vad fajokból számos poligénikusan öröklődő kedvezőtlen tulajdonságot is átvisznek az interspecifikus hibridekbe, fontos előrelépést jelent *V. vinifera* eredetű rezisztencia gének alkalmazása.

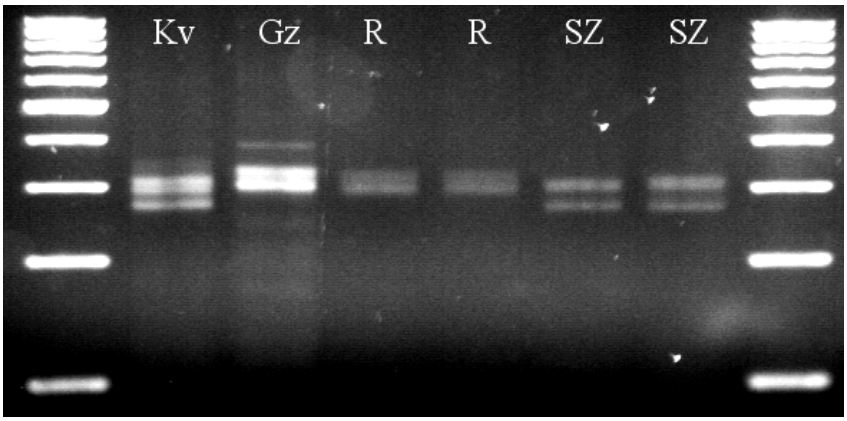
A keresztezés analízise, 78 tünetmentes és 68 fertőzési tüneteket hordozó mintán a *Ren1*-gyel kapcsolt VMC9h4.2 SSR markerrel történt. A szülők és az utódok allélméreteit a **10. táblázat** tartalmazza. A 06-1 populációnál kapott eredményeket használtuk fel a keresztezés vizsgálatánál. Azok az utódok, amelyek örökölték a 'Kismis vatkana' 286 bp méretű allélját, lisztharmat rezisztensek. Azért a VMC9h4.2 markert alkalmaztuk ennél a keresztezésnél, mert a kapott allélméretek lehetővé teszik a rutin agarózon való detektálást is (**16. ábra**). Így korán, már pár lombleves állapotú utódpopulációnál lehetővé válik a szelekció, nem szükséges a hosszadalmas és költséges mesterséges fertőzést, majd bonitálást elvégezni, illetve a nagyméretű hasadó populációt fenntartani. Gyorsan, hatékonyan és az

agaróz alapú gélelektroforézisnek köszönhetően költségtakarékosan szelektálhatók a rezisztens egyedek. A vizsgálatainkban szereplő minták eredményei az **1-es számú melléklet 18. táblázatában** találhatóak.

10. táblázat: ‘Génuai zamatos’ x ‘Kismis vatkana’ populáció allélméretei a *Ren1*-gyel kapcsolt markerekkel

	Ren1		
	VMC9h4.2	UDV20a	VMCNg4e10.1
‘Génuai zamatos’	290:294	138:148	268:270
‘Kismis vatkana’	262:**286**	138:**164**	240:**260**
Rezisztens genotípus	**286**:290 **286**:294	138:**164** 148:**164**	**260**:268 **260**:270
Szenzitív genotípus	262:290 262:294	138:138 138:148	240:268 240:270

A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.



16. ábra: *Ren1* génnel kapcsolt marker (VMC9h4.2) elemzése a 06-3-as populációban. M: molekulatömeg marker (GeneRuler 100 bp Ladder), Kv: ‘Kismis vatkana’. Gz: ‘Génuai zamatos’, R: rezisztens genotípus, *Ren1*+, SZ: szenzitív genotípus, *Ren1*-.

4.1.3. 07-12-es populáció: (*Vitis vinifera* ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’) x (*Vitis vinifera* ‘Katta kurgán’ x *Vitis vinifera* ‘Perlette’)

A hibridpopuláció vizsgálatával az volt a célunk, hogy rezisztenciával kapcsolt markerekkel kiválogassuk a halmozott rezisztenciagéneket hordozó genotípusokat (PM rezisztenciagén a ‘Dzsandzsal kara’-ból, QTL-ek a ‘Laszta’-ból), illetve az egyes rezisztencia géneket kövessük az utódpopulációban, tehát szét tudjuk válogatni a rezisztens és szenzitív egyedeket. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a *Run1/Rpv1*-gyel, illetve a *Ren1*-gyel kapcsolt markerek alkalmazhatóak-e ennél a populációnál. Mivel a ‘Laszta’ rezisztens fajta

‘Seyve Villard’ eredetű, pedigréjében megtalálható mind a ‘SV 20365’, mind a ‘SV 12375’ (‘Villard blanc’), PM kapcsolt QTL markereket is teszteltünk.

Összesen 126 egyedet vizsgáltunk, ebből fertőzési tüneteket mutatott 30, és tünetmentes volt 96. A **11. táblázatban** mutatjuk be *Run1/Rpv1*-gyel kapcsolt VMC8g9 és VMC1g3.2 markerek, illetve a *Ren1*-gyel kapcsolt VMC9h4.2, UDV20a és VMCNg4e10.1 markerek eredményeit, a hibridpopuláció szüleinek, a rezisztens szülőt létrehozó rezisztens fajtáknak, a ‘Dzsandzsal kara’-nak és a ‘Laszta’-nak és az utódpopuláció szenzitív, illetve rezisztens egyedeinek allélméreteit.

A szenzitív és a rezisztens fenotípusú egyedek nem válogathatóak szét a *Run1/Rpv1* kapcsolt markerekkel, ez arra utal, hogy a hibridpopuláció nem tartalmazza ezeket a géneket.

Mind a ‘Kismis vatkana’, mind pedig a ‘Dzsandzsal kara’ *Ren1*-gyel kapcsolt alléljei pontosan megegyeznek, és mind a hibridpopulációt létrehozó rezisztens szülő (‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’), mind pedig a hasadó utódpopuláció lisztharmat rezisztens egyedeinek *Ren1*-gyel kapcsolt allélméretei is.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy csak a *Ren1*-gyel kapcsolt allélméretek hasadnak együtt a lisztharmat rezisztens fenotípussal, ami arra enged következtetni, hogy a ‘Dzsandzsal kara’ domináns lisztharmat rezisztencia génje megegyezik a ‘Kismis vatkana’ *Ren1* génjével.

11. táblázat: A (‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’) x (‘Katta kurgán’ x ‘Perlette’) hibridpopuláció allélméretei a *Ren1*-gyel és a *Run1/Rpv1*-gyel kapcsolt SSR markerekkel

	Ren1			*Run1/Rpv1*	
	VMC9h4.2	UDV20a	VMCNg4e10.1	VMC8g9	VMC1g3.2
‘Kismis vatkana’	262:**286**	138:**164**	240:**260**	167:174	122:142
‘Dzsandzsal kara’	280:**286**	150:**164**	255:**260**	167:174	124:128
‘Laszta’	252:290	150:150	230:268	162:178	128:134
‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’	**286:**290	150:**164**	**260:**268	162:174	124:128
‘Katta kurgán’ x ‘Perlette’	262:286	138:150	238:260	178:178	122:128
Szenzitív egyedek	262:290 286:290	138:150 150:150	238:268 260:268	162:178 174:178	124:128 122:128 122:124 128:128
Rezisztens egyedek	262:**286** 286:**286**	138:**164** 150:**164**	238:**260** 260:**260**	162:178 174.178	124:128 122:128 122:124 128:128

A 07-12 populáció tünetmentes egyedeinél 108-205-ig tart a minták számozása. A feltételezett rekombinánsok: lisztharmat rezisztens fenotípust mutatnak, de a *Ren1* kapcsolt markerrel *Ren1-* genotípust mutató egyedek: 139, 204. PM tüneteket mutató, szenzitív genotípust mutató egyedek közül a I/7/1 és a IV/3/3 *Ren1+* genotípust mutatnak.

Coleman et al. (2009) az alábbi egyedeket találták rekombinánsnak: 82, 139. A 82-es mintát mi nem kaptuk meg, a 139-es nálunk is egyezik. Ők 151 utódot vizsgáltak, így valószínűleg a 204-es mintát nem. A rekombinánsok azonosításához ismételt fenotipizálásra van szükség.

A vizsgálatainkban szereplő minták eredményei az **1-es számú melléklet 19. táblázatában** találhatóak.

A 07-12-es hibridpopulációt lisztharmat QTL-lel kapcsolt SSR és SCAR markerekkel is vizsgáltuk. Ennek eredményeit a **4.2. PM QTL analízis** című fejezetben mutatjuk be.

4.2. PM QTL analízis

4.2.1. Lisztharmat QTL-lel kapcsolt SSR markerek alkalmazása

Eibach et al. (2007) molekuláris markerek segítségével vizsgálták a génhalmozás gyakorlati alkalmazhatóságát a VHR 3082-1-42 BC_4 x 'Regent' keresztezésből származó F1 utódpopuláción. A *Muscadinia rotundifolia* eredetű lisztharmat rezisztenciáért felelős *Run1* gén követésére a GLP1-12 CAPS markert (Donald et al. 2002), a peronoszpóra rezisztenciáért felelős *Rpv1* gén követésére Wiedemann-Merdinoglu et al. (2006) szerint VMC8g9 és VMC1g3.2 SSR markereket alkalmaztak. A 'Regent' fajta lisztharmat, illetve peronoszpóra QTL-jeit három-három SSR markerrel követték (Fischer et al. 2004), továbbá kiegészítették a vizsgálatokat a ScORA7-760-as SCAR markerrel (Akkurt et al. 2007).

A 'Laszta' lisztharmat és peronoszpóra rezisztens fajta, a pedigréjében megtalálható 'Seyve Villard' szülőktől örökölte a lisztharmat, és peronoszpóra QTL-eket. Eibach et al. (2007) szerint alkalmaztuk a VMC4d9.2, UDV15b és a VViV67 SSR markereket a 15-ös kapcsoltsági csoporton lévő lisztharmat QTL követésére a 07-12-es populációban.

Az UDV15b marker, amit Di Gaspero et al. (2005) fejlesztettek ki, multilókuszos marker, ezért előfordul, hogy egyes genotípusoknál több allélt kapunk. A hibridpopuláció vizsgálatakor mind a rezisztens szülőnél, mind az utódpopuláció egyedeinél három-öt-hét csúcsot detektáltunk, ami nehézkessé teszi az eredmények kiértékelését, nehezen követhetőek

az allélok, így ezt a markert kizártuk a későbbi vizsgálatokból. A másik két markerrel (VMC4d9.2 és VViV67) kapott allélméretek szórtak a rezisztens és a szenzitív fenotípusú utódok között, illetve a rezisztens szülő, a ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’ mindkét markerre nézve homozigóta (**12. táblázat)**. MAS-ra olyan markerek alkalmazhatóak, amelyek a követni kívánt tulajdonságot hordozó szülőnél heterozigóta formában vannak jelen, ezért ezek az SSR markerek ebben az utódpopulációban nem alkalmazhatóak a PM QTL követésésre. A ‘Regent’,’Seibel’,’Seyve Villard’ fajtákkal és a *Vitis* fajokkal kapott adatok valószínűsítik, hogy a lisztharmat QTL-lel kapcsolt allél a VViV67 marker esetén a 352 bp méretű allél. A VMC4d9.2 marker esetén nem tudtuk meghatározni, hogy melyik allélméret kapcsolt a rezisztenciával, mivel mind a 235, mind a 240 bp méretű allél megtalálható a rezisztens fajtákban. Az irodalomban nem találtunk arra nézve adatot, hogy a ‘Laszta’ fajtával, illetve hibridpopulációjával alkalmaztak volna marker alapú szelekciót.

Az irodalomban leírt PM QTL-lel kapcsolt markerek (VMC4d9.2, UDV15b és a VViV67 SSR markerek és a ScORA7-760-as SCAR marker) nem alkalmasak a ‘Laszta’ és a vele létrehozott hibridpopuláció lisztharmat QTL-jének követésére. Olyan új térképezési populációt volna célszerű létrehozni (‘Laszta’-t egy szenzitív fajtával keresztezve), ami alapja lehet annak, hogy a ‘Laszta’ PM QTL-jeivel kapcsolt markereket azonosítsunk.

12. táblázat: A 15-ös kapcsoltsági csoporton lévő PM QTL-lel kapcsolt SSR markerekkel kapott allélméretek

	VMC4D9.2	VViV67
‘Regent’	235:240	334:352:364
‘S 7053’	230:235	334:352
‘Laszta’	235:240	352:364
‘SV 20365’	235:240	334:352:364
‘SV 12375’	230:235	334:352:364
BC_4	244:244	352:364
V. labrusca	230:240	344:352:358
V. rupestris	235:240	358:358
V. berlandieri	235:235	330:352
V. lincecumii	235:235	330:338:352
Rezisztens szülő: ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’	240:240	352:352
Szenzitív szülő: ‘Katta kurgán’ x ‘Perlette’	226:240	352:364
A hasadó utódpopuláció PM tünetmentes egyedei:		
108	240:240	352:352
109	240:240	352:352
110	240:240	352:352
111	240:240	352:352
112	240:240	352:352
113	226:240	352:364
114	226:240	352:364
115	226:240	352:352
116	226:240	352:364
117	240:240	352:364
A hasadó utódpopuláció PM fertőzési tünetet hordozó egyedei		
I/2/1	240:240	352:352
I/2/2	226:240	352:352
I/2/3	226:240	352:352
I/3/1	226:240	352:352
I/3/2	226:240	352:352
IV/1/1	240:240	352:364
IV/1/2	226:240	352:352
IV/1/3	226:240	352:364
IV/2/1	226:240	352:364
IV/2/2	240:240	352:364

4.2.2. Lisztharmat QTL-lel kapcsolt SCAR marker alkalmazása

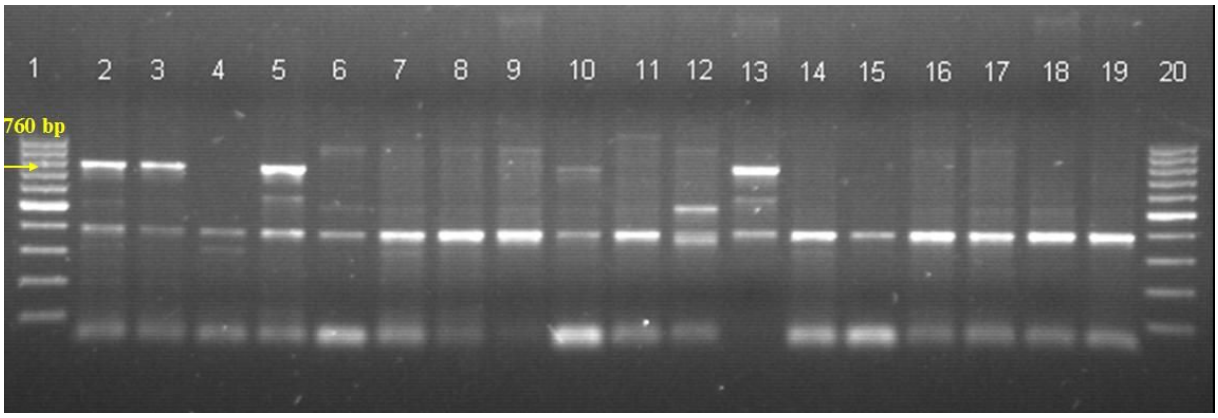
Akkurt et al. (2007) RAPD markereket (Fischer et al. 2004) alakítottak át SCAR markerekké. Céljuk az volt, hogy olyan molekuláris markereket fejlesszenek, amelyek marker alapú szelekcióra és a növénynemesítés számára hasznos genetikai források jellemzésére alkalmasak. A ScORA7-760 markert ajánlják marker alapú szelekcióra, mert nagymértékben (LOD 8,1-10,2) korrelációt mutatott a leveleken felvételezett lisztharmat rezisztenciával.

Az előbbiek alapján alkalmaztuk a ScORA7-760 markert, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mely fajtákban, fajokban követhető a 15-ös kapcsoltsági csoporton lévő lisztharmat QTL, amit a PCR során felszaporodó 760 bp méretű fragmentum jelez.

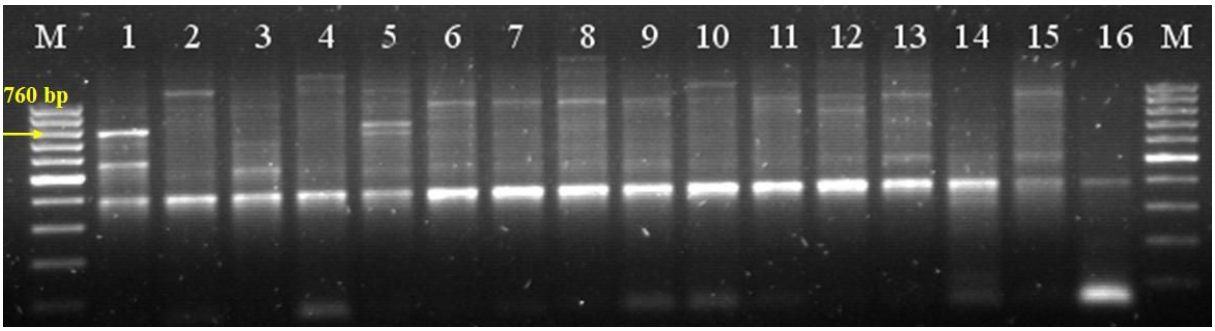
A 'Regent', ill a pedigréjében szereplő 'S 7053' (='Chancellor'; nagyszülő) esetén felszaporodott a várt 760 bp méretű fragmentum, ami megegyezik Akkurt et al. (2007) eredményeivel (**17. ábra**). A 'Laszta' pedigréjében szereplő 'SV 20365' és az 'SV 12375' ('Villard blanc') esetén felszaporodott a várt fragmentum, de a 'Laszta'-ban nem. Akkurt et al. (2007) tesztelték a markert különböző genetikai hátterű, de eredetüket nézve rokonságban lévő genotípusokon: 'Regent' és pedigréjében szereplő genotípusok ('Chambourcin', 'Diana', 'Chancellor', 'Seibel 880', 'Seibel 5163', 'Seibel 6468', 'Subberux'), Gf. GA-47-42 rezisztens nemesítési vonal ('Bacchus', 'Seyval', 'Seibel 5656', 'Seibel 4199', 'Seibel405', 'Rayon d'Or', 'Aramon du Gard'), 'Villard blanc' pedigréjében: 'Seibel 6468', 'Bayard', 'Afuz Ali', 'Seibel 4614', 'Seibel 2003' x *V. berlandieri*, 'Seibel 405', 'Subereux', 'Seibel 85'). Ezek a szülői vonalak különböző mértékben kapcsolódnak egymáshoz, ill. a 'Regent' fajtához, ami az irodalomban is megjelent pedigréjükből egyértelmű. Leírták, hogy a ScORA7-760 megközelítőleg 90%-ban korrelál a lisztharmat rezisztenciával a különböző genetikai hátterű keresztezésekben. Ennek ellenére azt találták, hogy nem mindegyik 'Seibel' ill. 'Seyve Villard' eredetű fajtában szaporodik fel a rezisztenciát jelző fragmentum. Akkurt et al. (2007) nem vizsgálták a 'Villard blanc'-t, de a két szülőt a 'Seibel 6468'-at és a 'Subereux'-t igen. Az utóbbi két fajtában felszaporodott a 760 bp méretű fragmentum. Vizsgálataink során a 'Villard blanc'-ban ('SV 12375') is felszaporodott a várt méretű fragmentum.

A 'Laszta' 'Seyve Villard' eredetű szülője, a 'SV 20365', ami az analízis során mutatta a PM rezisztenciát jelző fragmentumot. Sajnos sem a 'Laszta'-ban, sem az általunk vizsgálni kívánt hibridpopuláció rezisztens szülő partnerében ('Dzsandzsal kara' x 'Laszta') nem szaporodott fel a fragmentum, tehát a 07-12 populációt lisztharmat QTL-re ezzel a markerrel nem lehet vizsgálni. A 'Villard blanc' pedigréjében szereplő *V. labrusca, V. rupestris, V.*

berlandieri, *V. lincecumii* fajokat is vizsgáltuk (**18. ábra**), azonban csak a *V. lincecumii* esetén szaporodott fel a várt fragmentum, tehát a 'Villard blanc' ezt a fragmentumot a *V. lincecumii*-tól örökölte. Más lisztharmat rezisztens vad fajokat vizsgálva: *V. yeshanensis* és *V. amurensis* esetén sem szaporodott fel, ami azzal magyarázható, hogy ez a két faj Kelet-Ázsiából, Kínából és Mandzsúriából származik és nem Amerikából. Ahogy vártuk, a *V. vinifera* eredetű, de lisztharmat rezisztens fajták, 'Kismis vatkana', 'Dzsandzsal kara', 'Kabarcik', 'Rezisztens magvatlan', 'Tagobi', 'Gordin', 'Alexandrouli', 'Tsitska', 'Bazaletouri tsolikouri' nem tartalmaznak QTL-t, ezért nem szaporodott fel a lisztharmat QTL-t jelző fragmentum. Mivel a két közép-ázsiai származású fajtáról, az 'Iszpiszár'-ról és az 'Icskimár'-ról nincs adatunk, hogy lisztharmat ellenállóak-e vagy nem, ezeket is bevontuk a vizsgálatokba. Ahogy a többi ázsiai származású fajtánál sem, úgy ezeknél sem szaporodott fel a 760 bp méretű fragmentum. Sem a *M. rotundifolia*, sem a *M. rotundifolia* eredetű lisztharmat rezisztens BC_4 (VRH3082-1-42) esetén nem kaptuk meg a specifikus fragmentumot, hiszen a *M. rotundifolia*-ban és a BC_4-ben megtalálható *Run1/Rpv1* nagyhatású QTL a 13-as kapcsoltsági csoporton, míg a 'Regent' fajta lisztharmat QTL-je a 15-ös kapcsoltsági csoporton található.



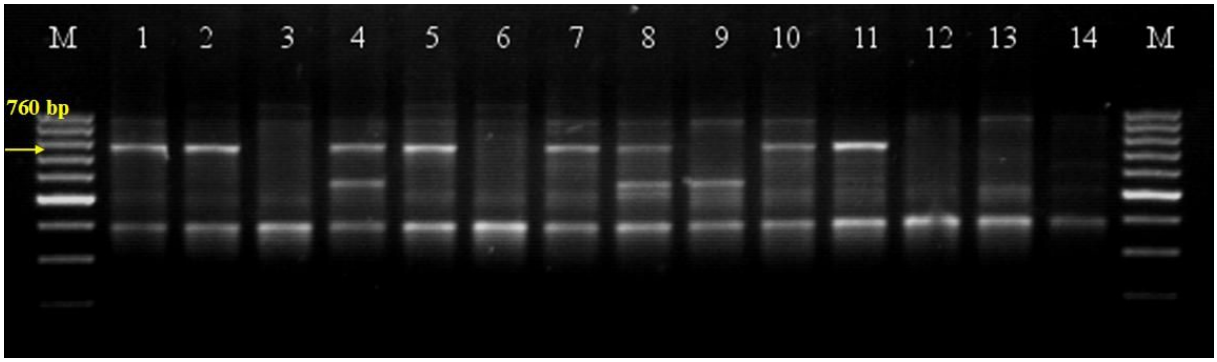
17. ábra: Interspecifikus hihridek ('Regent', 'Laszta'), a pedigréjükben szereplő fajok, fajták és a 07-12-es populáció elemzése a ScORA7-760 markerrel.
1. Marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 2. 'Regent' 3. 'S 7053' 4. 'Laszta' 5. 'SV 20365' 6. 'Dzsandzsal kara' 7. 'Kismis vatkana' 8. BC_4 9. *V. yeshanensis* 10. *V. lincecumii* 11. *V. labrusca* 12. *V. amurensis* 13. 'Villard blanc' 14. 07-12 hibridpopuláció szenzitív szülő ('Katta kurgán' x 'Perlette') 15. 07-12 hibridpopuláció rezisztens szülő ('Dzsandzsal kara' x 'Laszta') 16-17. 07-12 hibridpopuláció rezisztens utódai 18-19. 07-12 hibridpopuláció szenzitív utódai 20. Marker (GeneRuler 100 bp Ladder).



18. ábra: ‘Villard blanc’, a pedigréjében szereplő *Vitis* fajok és PM rezisztens ázsiai fajták elemzése a ScORA7-760 markerrel.
Marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 1. ‘Villard blanc’ (‘SV 12375’) 2. *V. labrusca* 3. *V. rupestris* 4. *V. berlandieri* 5. *V. lincecumii* 6. *M. rotundifolia* 7. ‘Kabarcik’ 8. ‘Iszpiszár’ 9. ‘Icskimár’ 10. ‘Rezisztens magvatlan’ 11. ‘Tagobi’ 12. ‘Gordin’ 13. ‘Alexandroulii’ 14. ‘Tsitska’ 15. ‘Bazaletouri tsolikouri’ 16. ‘Csaba gyöngye’ (szenzitív kontroll).

4.2.2.1. Magyar nemesítésű rezisztens fajták jellemzése a ScORA7-760 markerrel

Hazánkban az interspecifikus fajták nemesítését Csizmazia és Bereznai kezdték el a SV hibridek felhasználásával. Egerben nemesített fajhibridek: ‘Zala gyöngye’ (államilag elismerés: 1970), ‘Bianca’ (1982), ‘Medina’ (1984), ‘Nero’ (1993), ‘Rita’ (‘Göcseji zamatos’). A Kertészeti Egyetemen (illetve jogutódain) előállított szőlőfajták: ‘Viktória gyöngye’ (1995), ‘Duna gyöngye’ (1995), ‘Csillám’ (1997), ‘Palatina’ (1996).



19. ábra: Magyar nemesítésű rezisztens fajták elemzése a ScORA7-760 markerrel.
Marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 1. ‘Regent’ (rezisztens kontroll) 2. ‘S 4986’ 3. ‘Duna gyöngye’ 4. ‘Villard blanc’ (‘SV 12375’) 5. ‘Viktória gyöngye’ 6. ‘Csillám’ 7. ‘Nero’ 8. ‘Zala gyöngye’ 9. ‘Palatina’ 10. ‘Bianca’ 11. ‘SV 12286’ 12. ‘Göcseji zamatos’ 13. ‘Medina’ 14. ‘Csaba gyöngye’ (szenzitív kontroll).

A ‘Regent’ fajtát használtuk pozitív kontrollként, Akkurt et al. (2007) szerint (**19. ábra**). A rezisztens magyar fajták mellett azokat a ‘Seibel’, ‘Seyve Villard’ fajtákat is vizsgáltuk a SCAR markerrel, amelyeket a fajták előállítása során használtak, úgymint: ‘Seibel 4986’, ‘SV

12375', 'SV 12286'. Úgy vittük fel a gélre a mintákat, hogy az egyes 'Seibel', 'Seyve Villard' fajták után azok a fajták következnek, amelyeknek a pedigréjükben szerepelnek.

A 'Duna gyöngye' pedigréjében szereplő 'S 4986' tartalmazza a 760 bp méretű, lisztharmat QTL-t jelző fragmentumot, de a 'Duna gyöngyében' nem szaporodott fel. A 'Villard blanc' utódai közül a 'Viktória gyöngye', a 'Nero', a 'Zala gyöngye' és a 'Bianca' örökölte a specifikus fragmentumot, míg a 'Csillám' és a 'Palatina' nem. A pedigréjükben 'SV 12286'-ot tartalmazó, és lisztharmat rezisztens fajták, a 'Göcseji zamatos' és a 'Medina' esetében nem szaporodott fel a lisztharmat QTL-t jelző fragmentum, míg a szülőben, az 'SV 12286'-ban igen. Akkurt et al. (2007) eredményei is alátámasztják a mi eredményeinket, miszerint nem mindegyik 'Seibel' és 'Seyve Villard' fajtában, illetve ezek rezisztens utódaiban található meg a ScORA7-760 markerrel amplifikálható lisztharmat rezisztenciát jelző fragmentum.

Eredményeink alapján azokat a rezisztens fajtákat javasoljuk további nemesítési programokban felhasználni, illetve rezisztencia gének halmozásának céljából keresztezési partnerként alkalmazni, amelyekben a lisztharmat QTL követhető a ScORA7-760 markerrel, így esetükben alkalmazható a MAS. A 'Viktória gyöngye', a 'Nero' és a 'Zala gyöngye' nemcsak rezisztens fajták, hanem kiváló tulajdonságokkal rendelkező csemegeszőlő fajtáink, érésüket tekintve koraiak, amit a méltán világhírű 'Csaba gyöngyétől' örököltek. Ezeket a fajtákat keresztezve a 'Dzsandzsal kara'-val, vagy a 'Kismis vatkana'-val, génhalmozással tartós rezisztenciát érhetünk el. Marker alapú szelekcióval ki tudjuk válogatni a keresztezést követően azokat az egyedeket, amelyek tartalmazzák mind a domináns lisztharmat rezisztencia gént (*Ren1*), mind a 'Seibel'/'Seyve Villard' eredetű PM QTL-t. Továbbá a 06-1-es populáció azon egyedeit, amelyek mind a *Run1*, mind a *Ren1* géneket tartalmazzák, tehát *Run1*+/*Ren1*+ genotípusúak, keresztezve a PM QTL-t tartalmazó, és a rezisztenciát markerekkel követhető fajtákkal, olyan új, rezisztens fajták állíthatók elő, melyeknek rezisztenciája szinte áttörhetetlen.

Összefoglalásul, a 07-12 populáció vizsgálatával összehasonlítottuk a BC_4 x 'Kismis vatkana' és a ('Dzsandzsal kara' x 'Laszta') x ('Katta kurgán' x 'Perlette') utódnemzedékek tünetmentes egyedeit rezisztencia génnel kapcsolt markerek alapján. Eredményeink azt mutatják, hogy a 13-as kapcsoltsági csoportban a *Ren1* lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt SSR markerek (VMC9h4.2, UDV20a és VMCNg4e10.1) rezisztenciát jelző alléljai megegyeztek a két család tünetmentes egyedeiben, ez alapján megállapíthatjuk, hogy a két közép-ázsiai fajta, a 'Kismis vatkana' és a 'Dzsandzsal kara' azonos lisztharmat rezisztencia

gént, allélt hordoz, amit most már irodalmi adatok is alátámasztanak (Coleman et al. 2009). Munkánk megkezdésekor még nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok, Coleman et al. (2009) velünk párhuzamosan végezték ugyanazon a 07-12-es populáción vizsgálataikat.

A ‘Laszta’ pedigréjében szereplő ‘Seyve Villard’ eredetű szülők miatt lisztharmat QTL-lel kapcsolt SSR (VMC4d9.2, UDV15b és a VViV67) és SCAR (ScORA7-760) markereket is teszteltünk. Az adott populáció (07-12) vizsgálatakor a QTL-ekkel kapcsolt markerek nem adtak a MAS szempontjából informatív eredményeket, vagyis nem tudtuk a QTL-ekkel kapcsolt markerekkel kiválogatni a lisztharmat QTL-t hordozó, ill. nem hordozó egyedeket. Ez azzal magyarázható, hogy a ‘Dzsandzsal kara’ domináns lisztharmat rezisztencia génje (*Ren1*), ami Coleman et al. (2009) szerint is, és a mi vizsgálataink szerint is megegyezik az ugyancsak közép-ázsiai származású ‘Kismis vatkana’ lisztharmat rezisztencia génjével, elnyomja a több, kisebb hatású lisztharmat QTL-t. A másik ok az lehet, hogy nem elegendő egyszeri fenotipizálási adat a QTL-ek követésére. A rezisztencia fenotipizálását QTL-ek esetében legalább három-négy tenyészidőszakon keresztül felvételezni kell, ahogy azt Fischer et al. (2004) is megállapították. A QTL-ek erősen függnek a környezeti tényezőktől, az évjárathatástól, illetve a különböző fenofázisoktól. Ahhoz, hogy a QTL-eket megfelelően tudjuk markerekkel követni, több éves fenotipizálási adatokra van szükségünk azoknál az egyedeknél, melyek nem tartalmazzák a *Ren1* gént.

Lisztharmat QTL-lel kapcsolt SCAR marker (ScORA7-760) tesztelésével jellemeztünk különböző ‘Seibel’, ‘Seyve Villard’ fajtákat, illetve ‘Seibel’/’Seyve Villard’ eredetű, magyar nemesítésű rezisztens fajtákat: ‘Duna gyöngye’, ‘Villard blanc’, ‘Viktória gyöngye’, ‘Csillám’, ‘Nero’, ‘Zala gyöngye’, ‘Palatina’, ‘Bianca’, ‘Göcseji zamatos’ és ‘Medina’. Eredményeinkkel ajánlást tudunk tenni arra nézve, hogy mely fajták lisztharmat QTL-je követhető az adott markerrel, tehát egy komplex rezisztencia-nemesítési programban mely fajták javasolhatók szülői partnerként, ha marker alapú szelekciót szeretnénk alkalmazni. Ez különösen fontos és nélkülözhetetlen, ha génhalmozással, azaz egy genotípusba több rezisztenciagén bevitelével hozunk létre tartós rezisztenciával rendelkező új genotípusokat, fajtákat.

4.3. Különböző fajták jellemzése rezisztencia génekkel kapcsolt markerekkel

Különböző szőlő fajtákat jellemeztünk a *Run1/Rpv1* és *Ren1* rezisztencia génekkel kapcsolt SSR markerekkel. A célunk az volt, hogy ellenőrizzük, hogy a szenzitív fajták allélméretei megegyeznek-e a rezisztenciát jelző allélokkal (BC_4, 'Kismis vatkana'), illetve hogy a különböző eredetű rezisztens fajták rezisztencia génjeit összehasonlítsuk a már ismert (*Run1/Rpv1, Ren1*) rezisztencia génekkel (**13. és 14. táblázat)**. Önellenőrzésképpen az ismert keresztezés 'Pozsonyi' x 'Csaba gyöngye' = 'Irsai Olivér' fajtákat is bevontuk az elemzésbe, amelynek a szülő-utód kapcsolatát SSR elemzéssel egyértelműen bizonyítani lehetett (Galbács et al. 2005). A négy rezisztenciagénnel kapcsolt markerekkel kapott allélméretek is alátámasztották a rokonsági kapcsolatot.

13. táblázat: Szenzitív szőlő fajták SSR profilja rezisztenciával kapcsolt markerekkel

	Ren1		*Run1/Rpv1*	
Fajta neve	VMC9h4.2	UDV20a	VMC8g9	VMC1g3.2
BC_4	282:298	148:148	**160**:167	**122**:140
'Kismis vatkana'	262:**286**	138:**164**	167:174	122:140
'Cardinal'	289:307	138:148:152:158	179:179	135:140
'Csaba gyöngye'	264:289	138:152:162	179:179	118:135
'Irsai Olivér'	289:312	138:152	179:202	118:140
'Madeleine angevine'	289:289	138:152	176.179	118:128
'Muscat Fleur d'Oranger'	264:312	138:162	179:205	128:135
'Kadarka'	289:307	135:148:158	179:179	140:140
'Pozsonyi'	282:312	138:148:162	167:202	128:140
'Kossuth szőlő'	289:289	138:152	176:179	118:128
'Duchess of Buccleugh'	264:282	138:148:162	164:205	128:128
'Izsáki'	262:262	128:152:162	167:174	118:128
'Kövérszőlő'	276:276	138:160	174:179	128:135
'Leányka'	282:282	128:138:152	167:172	128:128
'Királyleányka'	289:289	128:135:152:158	172:176	128:128

Referencia fajtaként a BC_4-et és a 'Kismis vatkana'-t alkalmaztuk.
A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

14. táblázat: Ázsiai származású szőlő fajták és két interspecifikus rezisztens hibrid (‘Laszta’ és ‘Regent’) SSR profilja rezisztenciával kapcsolt markerekkel

	Ren1		*Run1/Rpv1*	
Fajta neve	VMC9h4.2	UDV20a	VMC8g9	VMC1g3.2
BC_4	282:298	148:148	**160**:167	**122**:140
‘Kismis vatkana’	262:**286**	138:**164**	167:174	122:140
‘Kabarcik’	262:276	138:148	167:176	135:140
‘Dzsandzsal kara’	280:**286**	148:**164**	167:174	124-128
‘Laszta’	252:290	148:148	162:178	128-135
‘Regent’	262:282	142:148	174:174	128:140
‘Tagobi’	266:298	148:162	176:176	124:128
‘Gordin’	282:308	148:158	167:176	118:128
‘Alexandrouli’	282:290	138:148:166	167:167	128:135
‘Tsitska’	298:302	148:148	176:176	118:118
‘Bazaletouri tsolikouri’	282:298	138:148	167:176	118:135
‘Rezisztens magvatlan’	254:**286**	148:**164**	172:174	124:124
‘Iszpiszár’	276:276	138:156:166	174:174	124:144
‘Icskimár’	262:276	138:148:166	167:174	128:144

Referencia fajtaként a BC_4-et és a ‘Kismis vatkana’-t alkalmaztuk.
A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

A szenzitív szőlő fajták egyike sem hordozta a rezisztenciával kapcsolt allélokat, 160, 122 bp a VMC8g9 és VMC1g3.2 esetén, és 286, 164 bp a VMC9h4.2 és az UDV20a esetén (**13. táblázat**). Ugyanakkor a *M. rotundifoliából* a BC_4 hibridbe introgresszálódott *Run1/Rpv1* gént egyik rezisztens *V. vinifera* fajta sem tartalmazza, illetve a ‘Seibel’, ‘Seyve Villard’ eredetű fajták (‘Regent’, ‘Laszta’) sem. Az azonos helyről származó ‘Kismis vatkana’ és ‘Dzsandzsal kara’ rezisztenciával kapcsolt alléljaik viszont megegyeznek, tehát ez az eredmény alátámasztja azt a feltételezést, hogy a ‘Dzsandzsal kara’ is a *Ren1* lisztharmat rezisztencia gént tartalmazza (**14. táblázat**). Ezt a megállapítást megerősítik Colemann et al. (2009) is. A ‘Rezisztens magvatlan’ *Ren1*-gyel kapcsolt allélméretei szintén megegyeznek a ‘Kismis vatkana’-éval. A ‘Rezisztens magvatlan’ eredetére nézve nincs adatunk, de eredményeink alapján Közép-Ázsiából származhat, mint az ugyancsak magvatlan és lisztharmat rezisztens ‘Kismis vatkana’. A többi ázsiai eredetű *V. vinifera* lisztharmat rezisztens fajta nem tartalmazza a már ismert rezisztencia géneket (*Run1/Rpv1, Ren1*), tehát új rezisztencia-forrásnak tekinthetők a nemesítés szempontjából. Jövőbeli terveink között szerepel a ‘Kabarcik’ fajta rezisztencia génjének vizsgálata, illetve egy szenzitív fajtával keresztezve a rezisztenciára nézve hasadó populáció létrehozásával a rezisztencia gének térképezhetők.

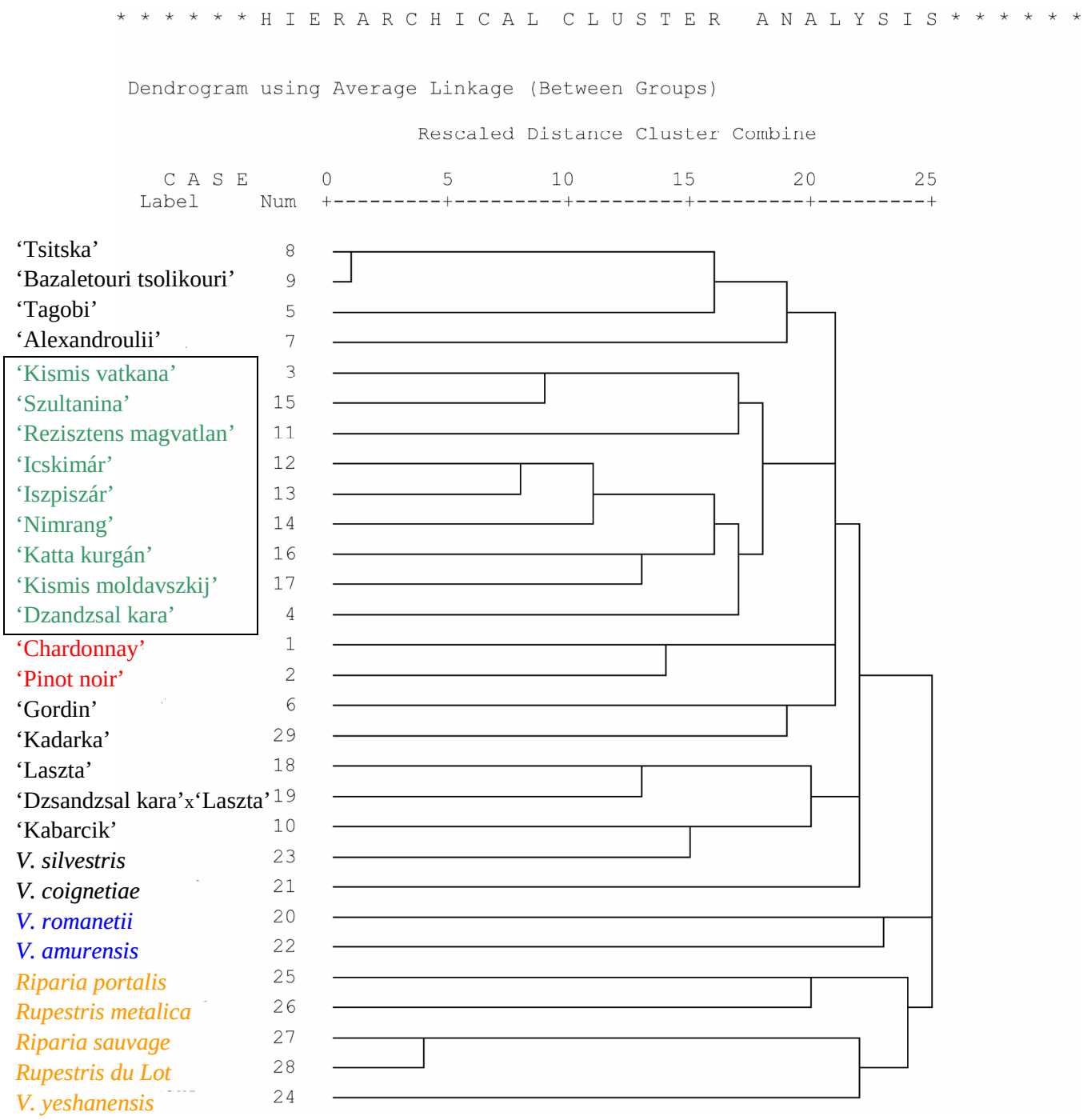
4.4. Ázsiai származású fajták mikroszatellit analízise

A GENRES 081, Európai Uniós kutatási projekt keretében a kutatásban résztvevő partnerek célja a különböző szőlőfajták rendszerezése, standardizálása, és az információk kicserélhetősége volt az egyes laboratóriumok között (Dettweiler és This 2000). A morfológiai tulajdonságok, a főbb ampelográfiai bélyegek (http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/393.pdf) jellemzése mellett molekuláris, DNS szintű jellemzést, ún. ’DNS fingerprinting’ (DNS ujjlenyomat) készítését is célul tűzték ki (This és Dettweiler 2003). 6 széleskörűen alkalmazott, informatív mikroszatellit markert (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62, VrZAG79) határoztak meg a szőlőfajták jellemzésére, majd a program folytatását jelentő GrapeGene06 projektben még további három markert vontak be a vizsgálatokba (VVMD25, VVMD28, VVMD32) (http://www.montpellier.inra.fr/grapegen06). A GrapeGene06 programban a PTE Szőlészeti és Borászati Intézete és a Szent István Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézete is részt vesz a Kárpát-medencei őshonos fajták jellemzésével (Halász et al. 2005, Galbács et al. 2009). A kapott mikroszatellit adatok alapján készítették el Kiss et al. (2007) a Magyar Vitis Mikroszatellit Adatbázist (http://www.mkk.szie.hu/dep/gent).

A közép-ázsiai fajták közötti genetikai távolság szemléltetésére a GrapeGene06 programban javasolt 9 markerrel (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VVS2, VrZAG62, VrZAG79) végeztük el a mikroszatellit analízist (**15. táblázat**). A kapott eredményekből Jaccard index alapján készült hasonlósági mátrixból dendrogramot (**20. ábra**) szerkesztettünk. A páronkénti összehasonlítással kapott egyezési koefficiensek félmátrix táblázata a **2. számú mellékletben** található. Referencia fajtaként a ‘Chardonnay’ és a ‘Pinot noir’ fajtákat alkalmaztuk.

15. táblázat: Az ázsiai fajták genetikai távolságának vizsgálatához alkalmazott fajták, fajok, alanyfajták 9 SSR markerrel kapott allélméretei

	VVMD5	VVMD7	VVMD25	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VVS2	Vrzag62	Vrzag79
‘Chardonnay’	236:240	243:247	242:258	182:190	220:230	241:273	138:144	192:200	246:248
‘Pinot noir’	230:240	243:247	242:252	186:190	220:238	241:273	138:152	192:198	242:248
‘Kismis vatkana’	236:242	243:253	242:242	180:196	220:236	251:273	138:146	192:206	250:262
‘Dzandzsal kara’	236:242	247:253	244:248	180:196	236:260	251:273	126:156	192:200	250:250
‘Tagobi’	230:236	249:257	244:258	180:186	246:246	259:259	126:144	192:200	250:254
‘Gordin’	228:248	243:243	242:258	180:180	230:238	265:273	134:134	192:200	240:262
‘Alexandroulii’	238:242	251:251	242:258	180:186	236:246	263:263	144:154	194:208	240:254
‘Tsitska’	228:236	243:257	242:258	186:186	238:260	263:273	144:144	200:200	254:254
‘Bazaletouri tsolikouri’	228:236	253:257	242:258	180:186	238:260	251:263	144:144	200:200	242:254
‘Kabarcik’	238:242	251:251	242:252	186:186	238:250	251:273	138:138	192:192	254:260
‘Rezisztens magvatlan’	236:240	239:257	252:252	186:196	220:228	251:251	126:152	192:206	254:270
‘Icskimár’	236:242	247:257	252:260	186:196	236:246	251:257	142:152	192:200	252:260
‘Iszpiszár’	226:242	247:257	250:260	186:196	246:246	251:257	142:156	192:192	254:260
‘Nimrang’	230:236	247:251	252:260	186:196	238:246	251:273	144:152	192:200	254:260
‘Szultanina’	236:236	243:257	242:252	182:196	220:246	251:251	146:152	192:192	250:262
‘Katta kurgán’	236:242	251:257	242:250	182:196	236:246	257:273	134:156	192:192	250:260
‘Kismis moldavszkij’	236:242	251:257	242:250	186:193	238:246	251:273	136:152	192:192	244:250
‘Laszta’	240:240	253:255	242:252	180:190	238:238	257:257	134:150	190:198	258:264
‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’	240:242	247:255	250:252	180:190	238:260	251:257	150:156	192:198	250:264
V. romanetii	248:248	247:249	254:258	186:186	222:240	249:249	130:130	220:220	250:250
V. coignetiae	236:242	243:255	243:246	184:188	236:236	239:239	134:140	192:198	242:242
V. amurensis	236:236	245:245	250:264	192:212	230:246	249:249	130:142	192:204	260:260
V. silvestris	238:238	243:251	242:252	184:190	238:242	251:273	134:134	194:198	254:254
V. yeshanensis	238:240	235:251	244:258	180:198	238:238	231:273	136:144	196:196	258:258
Riparia portalis	268:268	255:269	240:240	200:212	218:246	237:237	142:146	196:204	258:262
Rupestris metalica	254:254	255:265	240:246	186:206	218:248	241:241	142:142	202:208	262:264
Riparia sauvage	228:232	235:251	244:254	196:208	218:250	241:259	132:146	178:208	252:258
Rupestris du Lot	228:262	235:251	244:254	186:196:208	218:250	241:259	136:146	178:194:208	240:258
‘Kadarka’	228:228	251:259	242:258	186:196	230:262	273:273	136:136	192:208	252:252



20. ábra: 9 SSR lókusz klaszteranalízisével összeállított dendrogram.
A fonosabb blokkokat színessel jelöltük.

A legkisebb genetikai távolság a 'Tsitska' és a 'Bazaletouri tsolikouri' grúz fajták között található. Érdekes, hogy az üzbég 'Tagobi' fajta is ebben a klaszterben található.

A második nagyobb csoportba (a 20**. ábrán** zöld színnel, bekeretezve jelöltük) tömörülnek az üzbég fajták: 'Kismis vatkana', 'Szultanina', 'Icskimár', 'Iszpiszár', 'Nimrang', 'Katta kurgán' és 'Dzsandzsal kara'. Ezen belül is közel található egymáshoz a 'Szultanina' és 'Kismis vatkana' fajták, amelyek Coleman et al. (2009) vizsgálatai szerint

szülő-utód rokonságban állnak egymással. Ezt a mi eredményeink is megerősítik, a 9 vizsgált mikroszatellit lókuszban minimum egy közös alléljuk volt. A ‘Rezisztens magvatlan’ fajta eredetéről nem volt adatunk, de eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy közeli rokonságban áll a ‘Kismis vatkana’-val, tehát valószínűleg Üzbegisztánból származik. Coleman et al. (2009) szerint a ‘Kismis vatkana’ és ‘Dzsandzsal kara’ másodfokú rokonságban állnak egymással. Ezt a mi eredményeink sem zárják ki. Az ‘Iszpiszár’, ‘Icskimár’ fajtáknak is minden vizsgált lókuszban legalább egy közös alléljuk volt, tehát közeli (pl. szülő-utód) rokonsági kapcsolatban állnak egymással. Ezek a fajták a convarietas *orientalis* (keleti változatcsoport) tipikus tagjai. A ‘Kismis moldavszkij’ is ebbe a csoportba került. A ‘Kismis moldavszkij’-t Moldáviában állították elő, a ‘Pobeda’ és a ‘Kismis rozovüj’ fajták keresztezésével. A nemzetközi fajta katalógusban talált adatok alapján (*Vitis* International Variety Catalogue, http://www.vivc.de/index.php) a ‘Pobeda’ üzbegisztáni fajta, míg a ‘Kismis rozovüj’ örmény.

Az első főcsoportban találhatók az üzbég fajtáktól elkülönülve a referencia fajtaként alkalmazott ‘Chardonnay’ és ‘Pinot noir’ (piros színnel jelölve). Ez a két fajta a nyugati változatcsoport tagjai, *V. vinifera* convarietas *occidentalis***.**

A moldáviai ‘Gordin’ és a ‘Kadarka’ fajták egy csoportba kerültek. A ‘Kadarka’ a convarietas *pontica*–ba tartozik, szépen elkülönül a convarietas *occidentalis* és convarietas *orientalis* változatcsoportok fajtáitól.

Külön alcsoportot alkotnak az interspecifikus ‘Laszta’, és a ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’ hibridek. A *V. silvestris*-hez genetikailag a legközelebb a Törökországból származó ‘Kabarcik’ áll. Elképzelhető, hogy a fajta kialakulásában résztvehetett. A *V. coignetiae*, amelynek természetes areája Japán, Korea, Mandzsúria, teljesen elkülönül a *V. vinifera* fajtáktól, de mégis ehhez a főcsoporthoz tartozik.

A második főcsoportot (kék színnel jelölve) a *V. romanetii* és a *V. amurensis* alkotják. Ezek a fajok Kelet-Ázsiából, Mandzsúriából, Kínából és Kelet-Mongóliából származnak.

A harmadik főcsoportban (narancssárgával jelölve) találhatók az amerikai alanyfajták és a *V. yeshanensis*, ami Japánból származik.

Eredményeink nem támasztják alá azt a feltételezést (Wan et al. 2007, Coleman et al. 2009), miszerint a ‘Kismis vatkana’ és ‘Dzsandzsal kara’ *Ren1* rezisztencia génje egy véletlenszerű interspecifikus hibridizáció útján került a fajtákba amerikai alanyfajtákból vagy vad *Vitis* fajokból. Eredményeink megerősítik Coleman et al. (2009) megállapításait. A dendrogram jól szemlélteti, hogy az üzbég fajták (*V. vinifera* convar. *orientalis*) és a többi *V.*

vinifera fajta (*V. vinifera* convar. *occidentalis* és convar. *pontica*) között kisebb a genetikai távolság, mint akármelyik vad *Vitis* fajhoz, illetve az amerikai alanyfajtákhoz képest.

4.5. *V. vinifera* specifikus markerrendszer kidolgozása

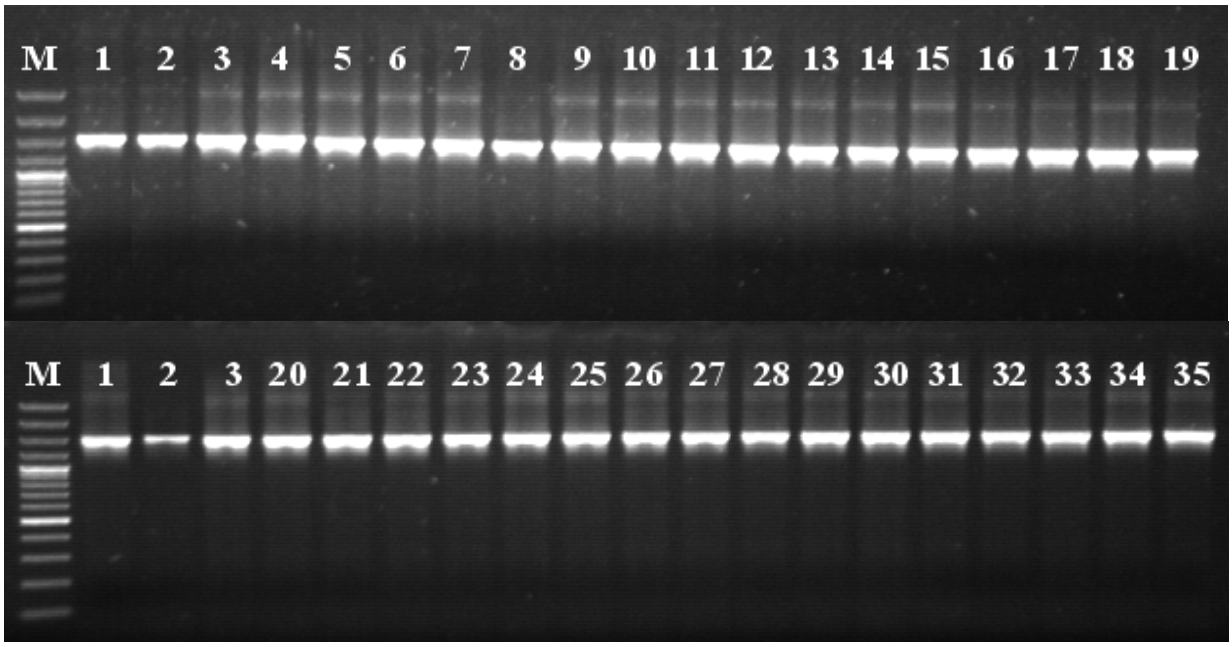
A *V. vinifera* szőlőfajták eredetileg fogékonyak a lisztharmat és a peronoszpóra-fertőzésekre. A rezisztencianemesítési munkákban különböző vad *Vitis* fajokat használnak fel, amelyek hátránya, hogy más agronómiailag kedvezőtlen tulajdonságot is átviszünk a hibridekbe. A múlt század közepén Közép-Ázsiában olyan csemegeszőlő fajtákat találtak, amelyek ellenállóak a lisztharmatra. Ezekről a fajtákról DNS szinten még nem bizonyították, hogy *V. vinifera* vagy más vad *Vitis* faj termesztett fajtáik-e. Célunk egy olyan PCR alapú markerrendszer kifejlesztése, illetve adaptálása volt, mely ampelográfiai ismeretek és szekvenálás nélkül is rutinszerűen alkalmazható a bortermő szőlőfajták vad *Vitis* fajoktól történő elkülönítésére.

A *Vitis* fajok filogenetikai kapcsolatait leggyakrabban a kloroplasztisz-genom kódoló és nem kódoló szakaszainak szekvenciaszintű összehasonlításával végezték el (Soltis et al. 2000). Ezekben azonban a szekvenciakülönbségek kicsik és nehezen detektálhatóak.

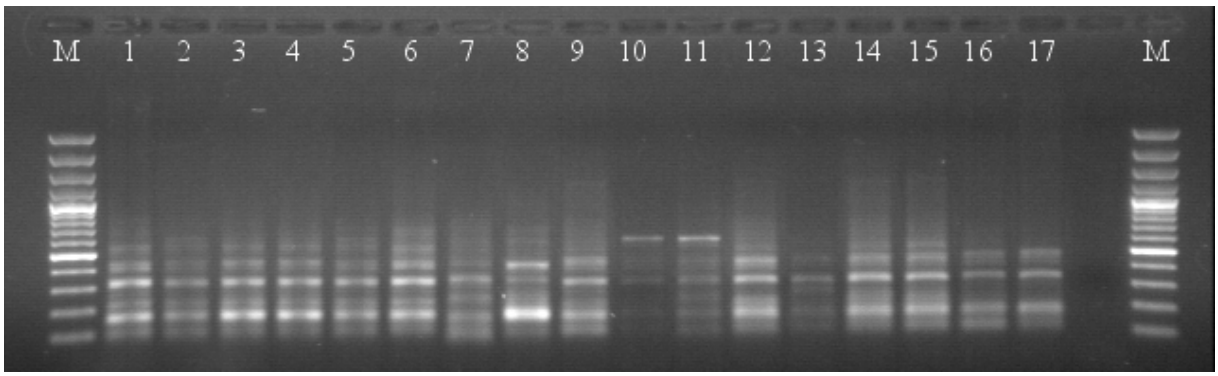
A vizsgálatokba három referencia fajtát, 6 lisztharmat ellenálló Közép-Ázsiai fajtát, 21 vad *Vitis* fajt, a *M. rotundifolia*, a *Parthenocissus quinquefolia* fajokat és 3 alanyfajtát vontunk be.

A kloroplasztisz génekre (*rbcL, atpB*)(Soltis et al. 2000), illetve a sejtmagi gibberellinsav gén szekvenciákra (*GAI1*) (Wen et al. 2007) tervezett PCR primerek agaróz gélelektroforetikus mintázata teljesen azonosnak bizonyult, nem tették lehetővé a fajok megkülönböztetését (**21. ábra**). Az esetleges különbségek csak szekvencia szinten detektálhatóak.

Annak ellenére, hogy Verriés et al. (2000) szerint a *Vine-1* retrotranszpozon inszerciója az *Adh* génbe *V. vinifera* specifikus, a mi eredményeink ezt nem támasztották alá (**22. ábra**). Verriés et al. (2000) eredményei szerint a *V. vinifera* fajtákban (8 fajtát vizsgáltak, köztük a ‘Chardonnay’-t, a ‘Pinot noir’-t, a ‘Cabernet sauvignon’-t) a *Vine-1* retrotranszpozon specifikus primerekkel egy 800 bp méretű fragmentum szaporodott fel, míg a vad *Vitis* fajokban nem. A ‘Chardonnay’ referencia fajta megegyezett a kísérletünkben, de nekünk sem ebben a fajtában, sem a többi vizsgált *V. vinifera* fajtában nem szaporodott fel a 800 bp méretű fragmentum. Verriés et al. (2000) szerint is még több vizsgálat szükséges ahhoz, hogy bebizonyítsák, a *Vine-1* inszerciója valóban *V. vinifera* specifikus.

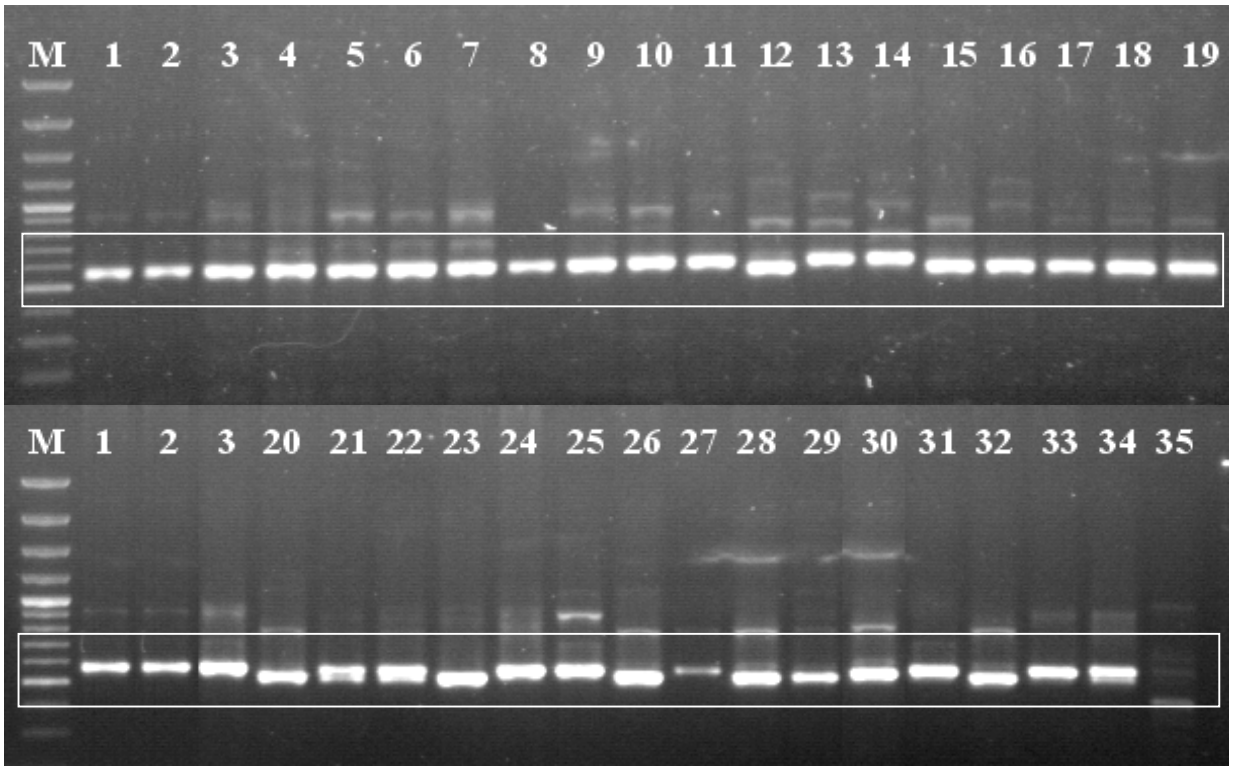


21. ábra: Az *rbcL* génekre tervezett markerrel végzett PCR elemzés.
M: Molekulatömeg marker (GeneRuler 100 bp Ladder Plus) 1: 'Barbera', 2. 'Chardonnay', 3.'Pinot noir', 4. 'Kismis vatkana', 5. 'Tagobi', 6. 'Gordin', 7. 'Alexandroulii', 8. 'Tsitska', 9. 'Bazaletouri tsolikouri', 10. *V. romanetii,* 11. *V. coignetiae,* 12. *V. pagnucci,* 13. *V. amurensis,* 14. *V. silvestris,*15. *V. aestivalis,* 16. *V. candicans,* 17. *V. cinerea,* 18. *V. monticola,* 19. *V. cordifolia,* 20. *V. titanica,* 21. *V. arizonica,* 22. *V. labrusca,* 23. *V. lincecumi,* 24. *V. yeshanensis,* 25. *V. solonis,* 26. *V. vulpina,* 27. *V. longii puncee,* 28. *V. riparia,* 29. *V. slarini,* 30. *V. dalniana,* 31. *M. rotundifolia,* 32. *Riparia portalis,* 33. *Rupestris metalica,* 34. *Riparia sauvage,* 35. *Parthenocissus quinquefolia*.



22. ábra: Az *Vine-1* retrotranszpozonra tervezett markerrel végzett PCR elemzés.
M: Molekulatömeg marker (GeneRuler 100 bp Ladder Plus), 1. *V. cordifolia,* 2. *V. pagnucci, 3. V. coignetiae,* 4. *V. romanetii,* 5. *V. aestivalis,* 6. *Riparia portalis,* 7. *Parthenocissus quinquefolia,* 8. *Cissus trifoliata,* 9. 'Kismis vatkana', 10. 'Chardonnay', 11. 'Merlot', 12. 'Csaba gyöngye', 13. 'Bronnerstraube', 14. 'Afúz Ali', 15. 'Nimrang', 16. 'Szultanina', 17. 'Alexandriai muskotály'.

Sikerült azonban találnunk egy olyan BAC (bakteriális mesterséges kromoszóma) könyvtárból származó, a bogyó antocián bioszintézisben szerepet játszó *Vvmyb* génnel kapcsolt markert (20D18CB9) (Walker et al. 2006), amely kismértékű hossz polimorfizmust mutatott a *V. vinifera* és vad *Vitis* fajok között (**23. ábra**).



23. ábra: A BAC könyvtárból származó 20D18CB9 markerrel kapott PCR elemzés.
M: Molekulatömeg marker (GeneRuler 100 bp Ladder Plus) 1: 'Barbera', 2.'Chardonnay', 3.'Pinot noir', 4. 'Kismis vatkana', 5. 'Tagobi', 6. 'Gordin', 7. 'Alexandroulii', 8. 'Tsitska', 9. 'Bazaletouri tsolikouri', 10. *V. romanetii,* 11. *V. coignetiae,* 12. *V. pagnucci,* 13. *V. amurensis,* 14. *V. silvestris,*15. *V. aestivalis,* 16. *V. candicans,* 17. *V. cinerea,* 18. *V. monticola,* 19. *V. cordifolia,* 20. *V. titanica,* 21. *V. arizonica,* 22. *V. labrusca,* 23. *V. lincecumi,* 24. *V. yeshanensis,* 25. *V. solonis,* 26. *V. vulpina,* 27. *V. longii puncee,* 28. *V. riparia,* 29. *V. slarini,* 30. *V. dalniana,* 31. *M. rotundifolia,* 32. *Riparia portalis,* 33. *Rupestris metalica,* 34. *Riparia sauvage,* 35. *Parthenocissus quinquefolia*.
A polimorf fragmentumokat fehér keretezéssel emeltük ki.

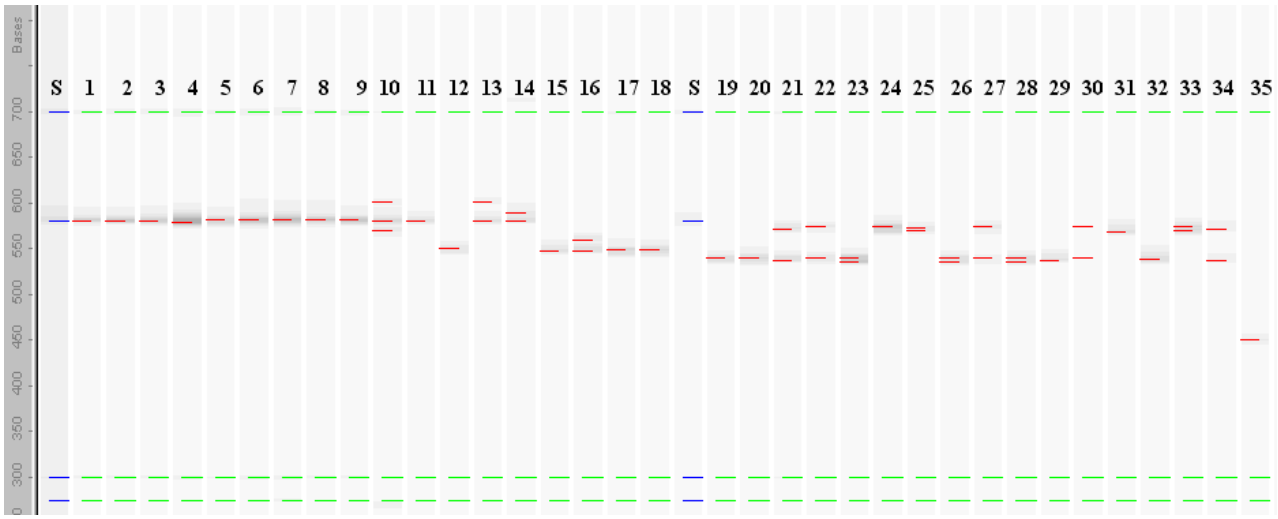
A PCR termékek pontos méretének meghatározását az agaróz gélelektroforézis nem tette lehetővé, ezért azokat az SSR analízisekben alkalmazott automata lézer fluorométerrel (ALFexpress II. készülék) végeztük el, nagyobb méretű belső és külső standardeket készítve és alkalmazva, mint a mikroszatellit elemzéseknél szoktunk (**16. táblázat**).

16. táblázat: Különböző *V. vinifera* fajták, vad fajok és alanyfajták allélméretei a 20D18CB9 markerrel

Fajta/Faj	DNS fragmentum méret (bp)	Faj	DNS fragmentum méret (bp)
'Barbera'	582	*Vitis cordifolia*	540
'Chardonnay'	582	*Vitis titanica*	540
'Pinot noir'	582	*Vitis arizonica*	540:575
'Kismis vatkana'	582	*Vitis labrusca*	540:575
'Tagobi'	582	*Vitis lincecumii*	535:540
'Gordin'	582	*Vitis yeshanensis*	575
'Alexandrouli'	582	*Vitis solonis (syn. V. acerifolia)*	575
'Tsitska'	582	*Vitis vulpina*	535:540
'Bazaletouri tsolikouri'	582	*Vitis longii puncee*	540:575
'Dzsandzsal kara'	582	*Vitis pagnucci*	550
'Kabarcik'	582	*Vitis riparia*	535:540
Vitis romanetii	571:582	*Vitis slarini*	538
Vitis coignetiae	582	*Vitis dalniana*	540:575
Vitis amurensis	582:602	*Muscadinia rotundifolia*	570:575
Vitis silvestris	582:590	*Riparia portalis*	540
Vitis aestivalis	550	*Rupestris metallica*	570:575
Vitis candicans	550:560	*Riparia sauvage*	540:575
Vitis cinerea	550	*Parthenocissus quinquefolia*	440
Vitis monticola	550		

Kék színnel jelöltük az *ázsiai Vitis* fajokat, lila színnel az *észak-amerikai Vitis* fajokat, zölddel a *Muscadinia* nemzetség tagját és a *Parthenocissust,* feketével a *V. vinifera* fajtákat, ill. a *V. silvestrist*, narancssárgával az *alany fajtákat*.

A referencia *V. vinifera* fajtákban (1-3 minták) a 20D18CB9 markerek egy 582 bázispár hosszúságú DNS szakaszt amplifikáltak, ugyanúgy, mint a lisztharmat ellenálló közép-ázsiai fajtákban (4-9 minták). A vizsgált vad fajok közül csak a *V. coignetiae* fajban kaptuk ugyanezt a fragmentum méretet. A többi vad fajban eltérő méretű és/vagy számú PCR terméket kaptunk. Az eltérő méreteket a készülék által előállított virtuális gélfotó is jól szemlélteti (**24. ábra**). Az összes ázsiai eredetű vad *Vitis* fajban (*V. romanetii, V. coignetiae, V. amurensis*) felszaporodott az 582 bp méretű fragmentum, míg az amerikai vad *Vitis* fajokban nem kaptunk ilyen méretű fragmentumot. A *V. silvestris* őshazája Közép-Ázsia és a Kaukázus környékén található, illetve a lisztharmat rezisztens *V. vinifera* fajták szintén ázsiai eredetűek (Üzbegisztán, Grúzia).



24. ábra: BAC könyvtárból származó 20D18CB9 markerrel kapott PCR elemzése (23. ábra) ALF készülékkel.

S: külső standard (275, 300, 582 és 700 bp), 1-35: ld. 23. ábra

A BAC könyvtárból származó 20D18CB9 marker tehát alkalmas volt a *V. vinifera* fajták vad szőlőfajoktól való elkülönítésére a mikroszatellit analízishez használt ALF Express II. készülékkel, nagyobb méretű standardek készítésével és alkalmazásával szekvenálás nélkül. Bizonyítottuk, hogy a Közép-Ázsiából származó, lisztharmat ellenálló fajták a *V. vinifera* fajhoz tartoznak.

4.5. Új tudományos eredmények

1. A BC_4 x ‘Kismis vatkana’ 06-1 hibridpopuláció halmozott rezisztencia géneket (*Run1, Rpv1, Ren1*) hordozó genotípusainak kiválogatására alkalmas módszert dolgoztunk ki.
2. Elsőként bizonyítottuk, hogy a *Ren1* lisztharmat rezisztencia gén térképezéséhez használt SSR markerek alkalmasak marker alapú szelekcióra.
3. Olyan multiplex PCR módszert dolgoztunk ki, mely alkalmas a *Run1/Rpv1/Ren1* genotípusok elkülönítésére egy lépésben, továbbá agaróz alapú, rutinszerűen kivitelezhető szelekciós eljárást dolgoztunk ki az egyes rezisztencia géneket együttesen vagy külön-külön hordozó egyedek kiválogatására.
4. Bizonyítottuk, hogy a VVim11 SSR marker alkalmas a peronoszpóra rezisztencia gén (*Rpv1*) követésére (02-1 populáció alapján).
5. Igazoltuk, hogy a rezisztencia génekkel kapcsolt SSR markerek a rezisztencia donort szülői partnerként tartalmazó, más hibridpopulációkba is átvihetőek.
6. A 07-12 hibridpopuláció vizsgálatával megerősítettük, hogy a lisztharmat rezisztens ‘Kismis vatkana’ és ‘Dzsandzsal kara’ fajták ugyanazt a rezisztencia gént (*Ren1*) hordozzák.
7. Igazoltuk, hogy a 07-12 hibridpopuláció vizsgálatára az irodalomban (‘Regent’) leírt lisztharmat QTL-ekkel kapcsolt markerek MAS-ra nem alkalmazhatóak. Javasoljuk a ‘Laszta’ interspecifikus hibrid rezisztencia QTL-jeinek térképezését.
8. Elsőként igazoltuk, hogy a magyar nemesítésű ‘Viktória gyöngye’, a ‘Nero’, a ‘Zala gyöngye’ és a ‘Bianca’ fajták 15-ös kapcsoltsági csoportban található lisztharmat QTL-je molekuláris markerekkel követhető, így MAS-sal, rezisztencia génhalmozási programokban használhatóak keresztezési partnerként.
9. A GrapeGen06 program által javasolt mikroszatellit markerekkel végzett analízis alapján igazoltuk, hogy a lisztharmat rezisztens közép-ázsiai fajták genetikailag közelebb állnak a *V. vinifera* fajtákhoz, mint a vad *Vitis* fajokhoz vagy az amerikai alanyfajtákhoz.
10. *V. vinifera* specifikus markerrendszert dolgoztunk ki, amellyel bizonyítottuk, hogy a lisztharmat rezisztens ázsiai származású fajták a *V. vinifera*-hoz tartoznak.

5. Következtetések, javaslatok

Eredményeinkkel bizonyítottuk, hogy az azonos fenotípusú, de különböző lisztharmat rezisztencia géneket hordozó egyedek a rezisztencia génekkel szorosan kapcsolt markerekkel szétválogathatóak. Módszerünkkel rutinszerűn, költségtakarékosan szelektálhatjuk ki a hasadó hibridpopulációkból az értékes egyedeket, már pár lombleveles állapotban. Ezzel elkerülhető a hatalmas utódpopuláció fenntartása, folyamatos bonitálása, ismételt szelekciója. Az egyedekről DNS izolálást és egy PCR-t követően biztonsággal meg tudjuk állapítani, hogy hordoznak-e PM rezisztencia gént, és ha igen melyiket. Bár a 06-1 populáció létrehozásánál és molekuláris vizsgálatánál a lisztharmat rezisztencia gének halmozása egy genotípusba volt a cél, javasoljuk a populáció peronoszpóra ellenállóságának felvételezését is, hogy a VVim11 SSR marker alkalmazhatóságát ezen a populáción is bizonyítani tudjuk.

A ‘Génuai zamatos’ x ‘Kismis vatkana’ keresztezés létrehozásával és a populáció *Ren1* génnel kapcsolt markerekkel történő vizsgálatával sikerült megvalósítani a kitűzött célt, a lisztharmat ellenállóság és a kiváló minőség kombinálását intraspecifikus keresztezéssel, majd a rezisztenciagén követését MAS-sal.

A 07-12-es hibridpopuláció molekuláris vizsgálata igazolta, hogy az azonos származású, PM rezisztens fajták, a ‘Kismis vatkana’ és a ‘Dzsandzsal kara’ azonos lisztharmat rezisztencia gént hordoznak. A populáció másik, rezisztenciát hordozó szülőpartnere, a ‘Laszta’ QTL-jei az irodalomban ‘Regent’ fajtára leírt PM QTL-lel kapcsolt SSR és SCAR markerekkel nem követhetőek. A ‘Laszta’ interspecifikus hibrid QTL-jeit még nem térképezték, ezért javasoljuk egy olyan térképezési populáció létrehozását, amellyel a fajta rezisztencia QTL-jeivel kapcsolt markerek azonosíthatóak.

Eredményeink alapján javasoljuk a magyar nemesítésű, rezisztens ‘Seibel’ és ‘Seyve Villard’ eredetű fajtákban, amelyek PM QTL-jei a ScORA7-760 markerrel nem követhetők (‘Duna gyöngye’, ‘Csillám’, ‘Palatina’, ‘Göcseji zamatos’, ‘Medina’), további markerek azonosítását.

SSR analízis (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VVS2, VrZAG62, VrZAG79) alapján szerkesztett dendrogramon mutattuk be a vizsgált ázsiai származású, *V. vinifera* convar. *orientalis* változatcsoportba tartozó fajták genetikai közelségét, illetve távolságát a többi *V. vinifera* (convar. *occidentalis* és *pontica*) fajtákhoz, vad *Vitis* fajokhoz és amerikai alanyfajtákhoz. Eredményeink megbízhatóságát referencia fajták bevonásával igazoltuk. Bizonyítottuk, hogy a többi *V. vinifera* fajtától morfológiailag

eltérő és lisztharmat rezisztens ‘Kismis vatkana’ és ‘Dzsandzsal kara’ a *V. vinifera*-hoz tartozik. Olyan marker alapú rendszert dolgoztunk ki, amellyel szekvenálás nélkül, PCR-t és poliakrilamid gélelektroforézist követően a *V. vinifera* fajták a vad *Vitis* fajoktól elkülöníthetőek.

Az ismert rezisztencia génekkel kapcsolt markerekkel különböző, ázsiai eredetű, lisztharmat ellenálló fajtákat jellemeztünk. Vizsgálataink alapján a ‘Rezisztens magvatlan’ fajta ugyanazt a lisztharmat rezisztencia gént hordozza, mint a ‘Kismis vatkana’, és megállapítható a közeli rokonság is. A többi fajta esetében nem találtunk allél-egyezőséget, így megállapíthatjuk, hogy ezek a fajták eddig még nem azonosított rezisztencia géneket hordoznak. Szenzitív fajtákkal keresztezve, térképezési populáció létrehozásával a rezisztencia gének térképezhetők, ezzel lehetőség nyílik a jövőben új rezisztencia források azonosítására és bevonására a rezisztencianemesítésbe. A törökországi ‘Kabarcik’ fajta ígéretes lehet ebben a tekintetben.

Eredményeink alapján olyan MAS alapú rezisztencia génhalmozási nemesítési programot állíthatunk össze, melyben a *Ren1, Run1, Rpv1,* PM QTL-ek megbízhatóan követhetőek molekuláris markerekkel. Példaként említhetjük: a 06-1 populáció mindkét lisztharmat rezisztencia gént (*Ren1+/Run1+* genotípusok) hordozó egyedeit keresztezve például a ‘Bianca’ fajtával, melynek mind a PM QTL-je (jelen disszertáció), mind a DM QTL-jei (*Rpv3* és *Rpv7*, Bellin et al. 2009) molekuláris markerekkel követhető, az utódpopulációból olyan egyedeket szelektálhatunk, amelyek *Ren1+/Run1+/Ren3+/Rpv1+/Rpv3+/Rpv7+* genotípusúak.

6. Összefoglalás

Célul tűztük ki egy olyan módszer kidolgozását, amely a BC_4 x 'Kismis vatkana' hibridpopuláció (BC_5) halmozott rezisztenciagéneket hordozó genotípusainak szelekciójára alkalmas. A hasadó populáció 440 egyedén a *Ren1* gént 3 SSR markerrel (VMC9h4.2, UDV20a, VMCNg4e10.1), a *Run1* gént 2 SSR markerrel (VMC8g9, VMC4f3.1) és 3 BAC könyvtár alapján tervezett primerrel (CB191.192, CB69.70, CB137.138), míg az *Rpv1* gént 1 SSR markerrel (VMC1g3.2) teszteltük. A VMC4f3.1 markert detektálási nehézségek miatt kizártuk a vizsgálatokból. A kiválasztott primerek alkalmasak multiplex PCR reakcióban a *Run1* és *Ren1* gén együttes vizsgálatára. Az eredményeket mind 8%-os poliakrilamid gélen, mind pedig 4%-os Metaphor gélen értékeltük, így lehetővé vált a lisztharmat ellenálló és fogékony egyedek agaróz gélen történő rutinszerű elkülönítése. A BAC könyvtár alapján tervezett primerek az 1,2%-os agaróz gélen történő elválasztást és értékelést is lehetővé teszik. A *Run1/ Rpv1* géneket hordozó genotípusok elkülönítésére újabb primereket vontunk be a vizsgálatokba. A VVim11 SSR marker alkalmasnak bizonyult az *Rpv1* peronoszpóra rezisztencia gén követésére.

A lisztharmat fertőzés bonitálási eredményei alapján fogékony egyedekben a molekuláris vizsgálatok a vizsgált rezisztencia gének hiányát bizonyították. A tünetmentes egyedek 36%-ában mindkét lisztharmat rezisztencia gén, 28%-ában csak a *Run1*, 36%-ában pedig csak a *Ren1* rezisztencia gén jelenléte volt kimutatható. Eredményeink alapján a kidolgozott módszer alkalmas mind a génhalmozott (*Run1* és *Ren1* gén), mind pedig az egyes rezisztencia géneket külön hordozó egyedek elkülönítésére. A multiplex PCR alkalmazásával gyorsan és költségtakarékosan szelektálhatjuk ki a mindkét lisztharmat rezisztencia gént hordozó értékes egyedeket, amelyek a molekuláris vizsgálatok nélkül, hagyományos módszerekkel nem azonosíthatóak.

Az egyes rezisztencia gének térképezéséhez használt SSR markerek jól és megbízhatóan alkalmazhatóak marker alapú szelekcióra. A *Ren1* génnel szorosan kapcsolt markerek más, a 'Kismis vatkana'-t szülői partnerként tartalmazó hibridpopulációk szelekciójára is alkalmasak. A 'Génuai zamatos' x 'Kismis vatkana' keresztezés 146 egyedét vizsgáltuk, a tünetmentes egyedekben megtalálható volt a rezisztenciával kapcsolt allél.

A (*Vitis vinifera* 'Dzsandzsal kara' x 'Laszta') x (*Vitis vinifera* 'Katta kurgán' x *Vitis vinifera* 'Perlette') hibridpopuláció 126 egyedét (ebből tünetmentes volt 96 és 30 fertőzési tüneteket mutatott) ismert rezisztencia génekkel (*Ren1, Run1, Rpv1)* és PM QTL-ekkel

kapcsolt markerekkel (3 SSR-VMC4d9.2, UDV15b, VViV67 és 1 SCAR-ScORA760) teszteltük. A populáció alkalmas volt arra is, hogy összehasonlítsuk a két közép-ázsiai csemegeszőlő fajta, a 'Kismis vatkana' és a 'Dzsandzsal kara' rezisztencia génjeit molekuláris markerek alapján. Eredményeink azt mutatták, hogy a 13-as kapcsoltsági csoportban a *Ren1* lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt SSR markerek rezisztenciát jelző alléljei megegyeztek, így a két rezisztencia gén azonos. Eredményeinket irodalmi adatok is alátámasztják. Az irodalomban leírt PM QTL-lel kapcsolt markerek nem alkalmasak a populáció vizsgálatára, mert a rezisztens szülő ('Dzsandzsal kara' x 'Laszta') az SSR analízis alapján homozigóta a lisztharmat QTL-ekkel kapcsolt mikroszatellit markerekkel kapott allélokra.

A PM QTL-lel kapcsolt ScORA760 SCAR markerrel jellemeztünk vad *Vitis* fajokat, lisztharmat rezisztens ázsiai fajtákat, interspecifikus hibrideket, magyar nemesítésű rezisztens fajtákat. A következő fajtákban nyomon követhető a lisztharmat rezisztencia a SCAR markerrel: 'Regent', 'Seibel 7053', 'SV 20365', 'Villard blanc', 'Seibel 4986', 'Viktória gyöngye', 'Nero', 'Zala gyöngye', 'Bianca', 'SV 12286'. Eredményeik segítséget nyújthatnak a fajtaválasztáshoz egy rezisztencia nemesítési programban, ahol a különböző rezisztencia gének kombinálása, halmozása a cél marker alapú szelekció felhasználásával.

A *V. vinifera* var. *orientalis* convar. *antasiatica* változatcsoportba tartozó szőlő fajták (pl. 'Nimrang', 'Icskimar', 'Iszpiszár', 'Katta kurgan', 'Szultanina', 'Kismis vatkana', 'Dzsandzsal kara') morfológiailag jelentősen eltérnek a többi *V. vinifera* fajtától. Feltételezések merültek fel, hogy valóban *V. vinifera* fajtákról van-e szó, nem történt-e spontán kereszteződés akár vad *Vitis* fajok vagy a régi kereskedelmi útvonalakon Közép-Ázsiába szállított alanyfajták és a helyben termesztett fajták között? A lisztharmat rezisztens fajták ('Dzsandzsal kara' és 'Kismis vatkana') tiszta *V. vinifera* eredetének bizonyítására *V. vinifera* specifikus markerrendszert dolgoztunk ki. Sikerült olyan markert találnunk, amellyel szekvenálás nélkül, egy PCR-t, és poliakrilamid gélelektroforézist követően el tudtuk különíteni a *V. vinifera* fajtákat a vad fajoktól.

A GrapeGene06 Európai Uniós program által javasolt 9 mikroszatellit markerrel (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VVS2, ssrVrZag62, ssrVrZag79) SSR analízist végeztünk az ázsiai fajtákkal, 2 referencia fajtával, vad *Vitis* fajokkal és amerikai alanyfajtákkal. Célunk az volt, hogy a kapott allélméretek alapján dendrogramon szemléltessük a referencia fajták ('Chardonnay', 'Pinot noir'), a különböző ázsiai lisztharmat rezisztens és fogékony fajták, a vad *Vitis* fajok és az amerikai alanyfajták genetikai távolságát. Eredményeink alapján az üzbég fajták külön (köztük a lisztharmat

rezisztens fajták is) alcsoportba tömörültek, az összes ázsiai fajta, és a *V. vinifera* referencia fajták egy főcsoportba tartoztak. Külön főcsoportokat alkottak a vad *Vitis* fajok és az amerikai alanyfajták. Ez az eredmény is alátámasztja, hogy a közép-ázsiai származású lisztharmat rezisztens fajták, a 'Dzsandzsal kara' és a 'Kismis vatkana' a *V. vinifera*-k közé tartoznak, és nem állnak genetikailag közel sem a vad *Vitis* fajokhoz sem az alanyfajtákhoz.

A *Ren1* lisztharmat rezisztencia gént tartalmazó 'Kismis vatkana' és 'Dzsandzsal kara' fajták különösen értékesek a szőlő rezisztencia nemesítés számára, hiszen a *V. vinifera*-n belül nyújtanak lehetőséget a rezisztencia és a kiváló minőség kombinálására.

SUMMARY

MOLECULAR IDENTIFICATION OF FUNGI RESISTANT GRAPE GENOTYPES

The purpose of our study was to select the genotypes carrying pyramided resistance genes and to follow the single resistance genes in the BC_4 (VRH 3082-1-42) x *V. vinifera* 'Kishmish vatkana' progenies with linked markers. 441 individuals of the BC_5 progeny were screened with 3 SSR markers linked to *Ren1* (VMC9h4.2, UDV20a, VMCNg4e10.1), 2 SSR markers (VMC8g9, VMC4f3.1) and 3 BAC (bacterial artificial chromosome)-clone derived primers (CB191.192, CB69.70, CB137.138) linked to *Run1* and finally 1 SSR marker linked to *Rpv1* (VMC1g3.2). VMC4f3.1 marker was excluded because of detection difficulties. To further streamline the selection process, we developed a multiplex PCR-method combined with agarose gel electrophoresis of the resulting amplicons. Multiplex PCR products were separated both on 8% polyacrylamide (ALF Express II.) and 4% Metaphor gel. In this way this method was suitable for separating the PM (powdery mildew) resistant and sensitive individuals through agarose-based electrophoresis. PCR products of CB primers – they have been developed on the basis of BAC-clones - could be separated and evaluated on 1.2% agarose gel. For separating genotypes carrying *Run1/Rpv1* genes new primers have been used. VVim11 marker seemed to be appropriate to follow the DM (downy mildew) resistance gene, *Rpv1*.

According to powdery mildew symptoms on leaves sensitive genotypes contain no resistance genes. Among the 411 plants that were resistant to PM 35% contained both the *Run1* and *Ren1* resistance genes, while 28% were *Run1* positive and 37% *Ren1* positive.

Based on our results the method have been developed is suitable to separate genotypes carrying both individual and pyramided resistance genes (*Run1* and *Ren1*). Using multiplex PCR enables us to select the valuable genotypes in a single step, saving time, effort and sources. Marker-assisted selection is indispensable for selecting *Run1*+/*Ren1*+ genotypes due to the same phenotypic effect of both resistance genes.

Our results demonstrate that SSR markers developed for the mapping of the disease resistance loci can be applied for MAS (marker assisted selection). Markers tightly linked to *Ren1* are appropriate to select another hybrid population, where one of the parents is 'Kishmish vatkana'. The cross 'Génuai zamatos' x 'Kishmish vatkana' was screened with these markers and the resistance allele could be detectable in the symptomless individuals.

We tested the (*V. vinifera* 'Dzhandzhal kara' x 'Laszta') x (*V. vinifera* 'Katta kurgán' x *V. vinifera* 'Perlette') hyibrid population (126 offspring) with markers linked to known resistance genes (*Ren1, Run1, Rpv1)* and PM QTLs (3 SSRs-VMC4d9.2, UDV15b, VViV67 and 1 SCAR-ScORA760) because of the 'Seyve Villard' origin of 'Laszta'. The population enabled us to compare the resistance genes of the two Central-Asian table grape cultivars, 'Kishmish vatkana' and 'Dzhandzhal kara'. The data showed that SSR profiles in *Ren1* linked loci on LG 12 that 'Kishmish vatkana' and 'Dzhandzhal kara' possess the same *Ren1* PM resistance gene, confirmed by the literature. PM QTLs described in 'Regent' cultivar were not appropriate to analyze this population, because the resistant parent ('Dzhandzhal kara' x 'Laszta') is homozygous for the alleles of the linked SSR markers.

We characterized wild *Vitis* species, PM resistant cultivars from Central-Asia, interspecific cultivars and Hungarian bred resistant cultivars with ScORA760 SCAR marker linked to PM QTL. Powdery mildew resistance can be followed by the SCAR marker in these varieties: 'Regent', 'Seibel 7053', 'SV 20365', 'Villard blanc', 'Seibel 4986', 'Viktória gyöngye', 'Nero', 'Zala gyöngye', 'Bianca', 'SV 12286'. Our data can be useful for a resistance breeding program, where the aim is disease resistance gene pyramiding with MAS.

Grape varieties belonging to *V. vinifera* var. *orientalis* convar. *antasiatica* (i.e. 'Nimrang', 'Icskimar', 'Iszpiszár', 'Katta kurgan', 'Sultanina', 'Kishmish vatkana', 'Dzhandzhal kara') have different morphological features than other *V. vinifera* varieties. One might assume that these varieties are not pure *V. vinifera*, perhaps recent interspecific hybridisation might have occurred with wild *Vitis* species or American rootstocks. We have processed a *V. vinifera* specific marker system to prove the pure *V. vinifera* origin of these PM resistant cultivars ('Dzhandzhal kara' and 'Kismis vatkana'). We have identified a molecular marker which makes it possible to distinguish *V. vinifera* varieties from the wild

ones after a Polymerase Chain Reaction (PCR) and polyacrilamid gel electrophoresis without sequencing.

We have determined the SSR profile of the Asian cultivars (PM resistant and sensitive varieties), 2 reference cultivars (‘Chardonnay’ and ‘Pinot noir’), wild *Vitis* species and American rootstocks in 9 microsatellit locus (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VVS2, ssrVrZag62, ssrVrZag79), recommended by GrapeGen06 project. Our aim was to create a dendrogram based on cluster analysis in order to show the genetic distance among these cultivars and species. All of the Central-Asian and reference *V. vinifera* varieties are included in Cluster 1, and varieties from Uzbekistan grouped together in a smaller group including the PM resistant ‘Dzhandzhal kara’ and ‘Kishmish vatkana’ as well. Wild *Vitis* species and American rootstocks are included different clusters (Cluster 2 and 3). The results confirm that ‘Dzhandzhal kara’ and ‘Kishmish vatkana’ derived from Central Asia belong to *V. vinifera*, and are not related to either wild *Vitis* species nor American rootstocks.

The powdery mildew resistant ‘Kishmish vatkana’ and ‘Dzhandzhal kara’ varieties are valuable for grape breeders, because they open up the possibility of combining the resistance gene (*Ren1*) with high quality in *V. vinifera.*

MELLÉKLETEK

1. Melléklet:

17. táblázat: 06-1 populáció: A vizsgált 440 minta eredményei

Tünetmentes egyedek (410 minta):
Run1+ genotípusok (115)
6, 56, 126, 176, 246, 256, 276, 326, 346, 446, 476, 526, 646, 686, 846, 30, 35, 50, 65, 75, 80, 110, 115, 120, 130, 150, 165, 220, 230, 245, 250, 290, 310, 325, 370, 375, 380, 395, 400, 420, 430, 435, 440, 455, 490, 495, 510, 515, 540, 555, 565, 575, 590, 595, 640, 655, 660, 670, 685, 735, 755, 795, 810, 845, 860, 880, 885, 895, 905, 910, 14, 54, 64, 138, 174, 188, 198, 204, 208, 238, 258, 274, 304, 308, 328, 354, 364, 368, 394, 414, 434, 528, 534, 594, 598, 638, 648, 678, 684, 764, 768, 778, 788, 828, 844, 868, 888, 904, 2, 11, 12, 42, 51, 61, 82
Ren1+ genotípusok (149)
16, 26, 36, 76, 116, 206, 236, 306, 316, 336, 356, 376, 456, 636, 666, 676, 696, 756, 816, 826, 916, 926, 10, 15, 25, 45, 105, 125, 145, 160, 170, 180, 210, 215, 225, 255, 275, 285, 300, 315, 330, 335, 340, 350, 360, 365, 410, 460, 465, 480, 500, 520, 560, 570, 585, 690, 700, 705, 715, 740, 745, 760, 785, 800, 815, 825, 830, 840, 865, 875, 890, 900, 920, 18, 24, 38, 74, 78, 84, 88, 118, 128, 134, 158, 164, 168, 178, 214, 218, 228, 248, 264, 268, 278, 284, 288, 298, 318, 324, 334, 338, 344, 348, 358, 384, 398, 404, 408, 454, 458, 464, 468, 484, 498, 504, 508, 514, 518, 524, 538, 544, 564, 574, 634, 644, 658, 688, 694, 708, 714, 718, 798, 848, 854, 864, 878, 894, 898, 908, 918, 928, 1, 32, 52, 62, 71, 81, 92, 111
Run1+/Ren1+ genotípusok (146)
46, 106, 136, 146, 156, 216, 226, 406, 416, 426, 436, 506, 536, 576, 706, 726, 736, 746, 776, 806, 836, 856, 876, 886, 906, 5, 40, 55, 60, 90, 95, 100, 135, 140, 155, 175, 185, 190, 195, 200, 205, 235, 240, 265, 270, 280, 295, 345, 355, 385, 390, 405, 415, 425, 445, 450, 470, 475, 485, 505, 525, 530, 535, 545, 550, 580, 600, 635, 650, 665, 695, 710, 725, 730, 765, 770, 775, 790, 805, 820, 850, 915, 4, 8, 28, 34, 44, 58, 68, 94, 98, 114, 124, 144, 148, 154, 184, 224, 234, 244, 354, 314, 374, 378, 388, 418, 424, 428, 438, 444, 448, 474, 478, 485, 494, 554, 568, 578, 584, 588, 654, 668, 698, 724, 728, 734, 738, 744, 758, 784, 794, 818, 824, 834, 838, 858, 874, 884, 914, 21, 22, 31, 72, 91, 102, 112
PM szenzitív egyedek: *Run1-/Ren1-* genotípusok (30)
601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630

18. táblázat: 06-3 populáció: A vizsgált 146 minta eredménye

Tünetmentes egyedek:
PM tünetmentes, *Ren1+* genotípusú egyedek:
1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76
PM tünetmentes, de *Ren1-* genotípusú egyedek:
7, 25, 36
PM tüneteket mutató egyedek:
PM tüneteket hordozó, *Ren1-* genotípusú egyedek:
77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118,

119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142
PM tüneteket hordozó, de *Ren1+* genotípusú egyedek:
130
Nem fenotipizált egyedek: 143: Ren1- 144: Ren1+ 145: Ren1- 146: Ren1+

19. táblázat: 07-12 populáció: A vizsgált 126 minta eredménye

Tünetmentes egyedek (96 minta):
PM tünetmentes, *Ren1+* genotípusú egyedek:
108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 2055
PM tünetmentes, de *Ren1-* genotípusú egyedek:
139, 204
PM tüneteket mutató egyedek (30 minta):
PM tüneteket hordozó, *Ren1-* genotípusú egyedek:
I/1/1, I/1/2, I/1/3, I/2/1, I/2/2, I/2/3, I/3/1, I/3/2, I/3/3, I/4/1, I/4/2, I/4/3, I/5/1, I/5/2, I/5/3, I/6/1, I/6/2, IV/1/1, IV/1/2, IV/1/3, IV/2/1, IV/2/2, IV/2/3, IV/3/1, IV/3/2, IV/4/1, IV/4/2, IV/4/3
PM tüneteket hordozó, de *Ren1+* genotípusú egyedek:
I/7/1, IV/3/3

2. Melléklet: Dendrogram szerkesztéséhez használt hasonlósági mátrix

20. táblázat: A vizsgált szőlőfajták hasonlósági együtthatói (Jaccard index), 9 mikroszatellit lókusz alapján.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
CHARD	1,000	,500	,320	,198	,256	,348	,143	,348	,256	,154	,190	,230	,138	,296	,320	,190	,138	,148	,184	,160	,198	,148	,148	,154	,000	,044	,040	,038	,213
PINOT	,500	1,000	,308	,138	,138	,205	,089	,205	,138	,333	,359	,276	,184	,410	,373	,133	,238	,256	,286	,154	,247	,044	,256	,095	,000	,089	,081	,118	,205
KISMISV	,320	,308	1,000	,485	,148	,290	,148	,160	,205	,290	,320	,296	,198	,190	,667	,389	,320	,099	,190	,107	,333	,099	,154	,000	,095	,046	,086	,081	,160
DZSANDZS	,198	,138	,485	1,000	,333	,160	,095	,160	,267	,160	,256	,427	,389	,308	,267	,464	,320	,048	,444	,107	,205	,099	,048	,049	,000	,000	,086	,081	,103
TAGOBI	,256	,138	,148	,333	1,000	,160	,267	,444	,406	,160	,320	,359	,320	,522	,267	,256	,320	,000	,089	,232	,095	,154	,048	,160	,046	,046	,086	,125	,160
GORDIN	,348	,205	,290	,160	,160	1,000	,222	,400	,290	,242	,048	,198	,154	,205	,222	,213	,213	,167	,148	,056	,290	,107	,232	,111	,049	,049	,044	,086	,317
ALEX	,143	,089	,148	,095	,267	,222	1,000	,364	,333	,364	,092	,238	,256	,308	,095	,256	,256	,048	,043	,107	,148	,048	,278	,222	,046	,095	,086	,222	,290
TSITSKA	,348	,205	,160	,160	,444	,400	,364	1,000	1,000	,242	,213	,256	,213	,406	,222	,154	,278	,107	,095	,116	,160	,051	,232	,174	,000	,049	,044	,086	,242
BAZALET	,256	,138	,205	,267	,406	,290	,333	1,000	1,000	,290	,256	,296	,256	,444	,205	,143	,389	,154	,138	,107	,095	,048	,213	,160	,000	,046	,042	,081	,222
KABARCIK	,154	,333	,290	,160	,160	,242	,364	,242	,290	1,000	,278	,320	,348	,485	,222	,278	,424	,167	,267	,056	,160	,107	,467	,174	,000	,049	,092	,133	,242
REZMAGV	,190	,359	,320	,256	,320	,048	,092	,213	,256	,278	1,000	,410	,308	,427	,464	,190	,308	,095	,184	,103	,092	,095	,148	,048	,000	,044	,040	,078	,154
ICSKI	,230	,276	,296	,427	,359	,198	,238	,256	,296	,320	,410	1,000	,727	,696	,427	,480	,410	,089	,276	,148	,184	,247	,089	,044	,086	,086	,078	,074	,256
ISZPISZ	,138	,184	,198	,389	,320	,154	,256	,213	,256	,348	,308	,727	1,000	,500	,256	,522	,373	,046	,359	,160	,092	,205	,095	,048	,092	,092	,040	,078	,213
NIMRANG	,296	,410	,190	,308	,522	,205	,308	,406	,444	,485	,427	,696	,500	1,000	,373	,296	,427	,092	,230	,154	,089	,198	,256	,205	,043	,043	,081	,118	,267
SZULTAN	,320	,373	,667	,267	,267	,222	,095	,222	,205	,222	,464	,427	,256	,373	1,000	,464	,464	,099	,190	,107	,205	,154	,213	,000	,148	,046	,086	,081	,160
KATTA	,190	,133	,389	,464	,256	,213	,256	,154	,143	,278	,190	,480	,522	,296	,464	1,000	,522	,148	,296	,049	,320	,205	,148	,048	,044	,000	,083	,078	,213
KISMISM	,138	,238	,320	,320	,320	,213	,256	,278	,389	,424	,308	,410	,373	,427	,464	,522	1,000	,095	,296	,103	,198	,205	,205	,154	,044	,044	,040	,121	,278
LASZTA	,148	,256	,099	,048	,000	,167	,048	,107	,154	,167	,095	,089	,046	,092	,099	,148	,095	1,000	,545	,000	,213	,000	,364	,167	,099	,099	,043	,040	,051
DZSANXLA	,184	,286	,190	,444	,089	,148	,043	,095	,138	,267	,184	,276	,359	,230	,190	,296	,296	,545	1,000	,099	,190	,044	,256	,095	,043	,089	,000	,000	,046
ROMANETI	,160	,154	,107	,107	,232	,056	,107	,116	,107	,056	,103	,148	,160	,154	,107	,049	,103	,000	,099	1,000	,000	,174	,000	,056	,000	,051	,000	,043	,116
COIGN	,198	,247	,333	,205	,095	,290	,148	,160	,095	,160	,092	,184	,092	,089	,205	,320	,198	,213	,190	,000	1,000	,099	,278	,000	,046	,095	,000	,000	,103
AMUREN	,148	,044	,099	,099	,154	,107	,048	,051	,048	,107	,095	,247	,205	,198	,154	,205	,205	,000	,044	,174	,099	1,000	,000	,000	,213	,048	,000	,000	,107
SILVESTI	,148	,256	,154	,048	,048	,232	,278	,232	,213	,467	,148	,089	,095	,256	,213	,148	,205	,364	,256	,000	,278	,000	1,000	,167	,000	,000	,043	,083	,107
YESHAN	,154	,095	,000	,049	,160	,111	,222	,174	,160	,174	,048	,044	,048	,205	,000	,048	,154	,167	,095	,056	,000	,000	,167	1,000	,103	,000	,198	,238	,174
RIPPORT	,000	,000	,095	,000	,046	,049	,046	,000	,000	,000	,000	,086	,092	,043	,148	,044	,044	,099	,043	,000	,046	,213	,000	,103	1,000	,267	,133	,125	,000
RUPMETAL	,044	,089	,046	,000	,046	,049	,095	,049	,046	,049	,044	,086	,092	,043	,046	,000	,044	,099	,089	,051	,095	,048	,000	,000	,267	1,000	,133	,172	,103
RIPSAUV	,040	,081	,086	,086	,086	,044	,086	,044	,042	,092	,040	,078	,040	,081	,086	,083	,040	,043	,000	,000	,000	,000	,043	,198	,133	,133	1,000	,870	,256
RUPDULOT	,038	,118	,081	,081	,125	,086	,222	,086	,081	,133	,078	,074	,078	,118	,081	,078	,121	,040	,000	,043	,000	,000	,083	,238	,125	,172	,870	1,000	,296
KADARKA	,213	,205	,160	,103	,160	,317	,290	,242	,222	,242	,154	,256	,213	,267	,160	,213	,278	,051	,046	,116	,103	,107	,107	,174	,000	,103	,256	,296	1,000

1. ‘Chardonnay’, 2. ‘Pinot noir’, 3. ‘Kismis vatkana’, 4. ‘Dzandzsal kara’, 5. ‘Tagobi’, 6. ‘Gordin’, 7. ‘Alexandroulii’, 8. ‘Tsitska’, 9. ‘Bazaletouri tsolikouri’, 10. ‘Kabarcik’, 11. ‘Rezisztens magvatlan’, 12. ‘Icskimár’, 13. ‘Iszpiszár’, 14. ‘Nimrang’, 15. ‘Szultanina’, 16. ‘Katta kurgán’, 17. ‘Kismis moldavszkij’, 18. ‘Laszta’, 19. ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’, 20. *V. romanetii*, 21. *V. coignetiae*, 22. *V. amurensis*, 23. *V. silvestris*, 24. *V. yeshanensis*, 25. *Riparia portalis*, 26. *Rupestris metalica*, 27. *Riparia sauvage*, 28. *Rupestris du Lot*, 29. ‘Kadarka’

Irodalomjegyzék

1. Adam-Blondon, A.F., Roux, C., Claux, D., Butterlin, G., Merdinoglu, D., This, P. 2004. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. Theor. Appl. Genet. 109: 1017-1027.

2. Akkurt, M., Welter, L., Maul, E., Töpfer, R., Zyprian, E. 2007. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). Mol. Breeding 19: 103-111.

3. Andrasovszky, J. 1926. Ampelográfiai tanulmányok. Magyar Királyi Szőlő és Borgazdaság Központi Kísérleti Állomás Évkönyve, 7.

4. Angiosperm Phylogeny Group 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161: 105–121. DOI:10.1111/j.1095-8339.2009.00996

5. Anonymous 1983. Descriptor list for grapevine varieties and *Vitis* species. Office International de la Vigne et du Vin (OIV), Paris

6. Arroyo-Garcia, R., Martinez-Zapater, J.M. 2004. Development and characterization of new microsatellite markers for grape. Vitis 43: 175-178.

7. Bai, J., Pennill, L.A., Ning, J., Lee, S.W., Ramalingam, J., Webb, C.A., Zhao, B., Sun, Q., Nelson, J.C., Leach, J.E., Hulbert, S.H. 2002. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. Genome Res. 12: 1871-1884.

8. Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N.F., Reinstadler, A., Lotti, C., DeGiovanni, C., Ricciardi, L., Lindhout, P., Visser, R., Theres, K., Panstruga, R. 2008. Naturally occurring broadspectrum powdery mildew resistance in a central American tomato accession is caused by loss of *mlo* function. Mol. Plant-Microbe Interact. 21: 30-39.

9. Barker, C.L., Donald, T., Adam-Blondon, A.F., Pauquet, J., Ratnaparkhe, M.B., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.-F., Thomas, M., Dry, I. 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. Theor. Appl. Genet. 111: 370-377.

10. Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R., Di Gaspero, G. 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. Theor. Appl. Genet. 120: 163–176. DOI 10.1007/s00122-011-1565-0

11. Bényei, F., Lőrincz, A. 2005. Borszőlőfajták, csemegeszőlő-fajták és alanyok. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

12. Bisztray, Gy.D., Deák, T., Eisenheld, C., Pedryc, A., Balogh, I., Regner, F. 2005. Microsatellite based identification of grapevine cultivars traditional in Hungary and in the Carpathian Basin. *International Journal of Horticultural Science*, 11: 71-73.

13. Blasi, P., Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Prado, E., Rühl, E.H., Mestre, P., Merdinoglu, D. 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. Theor. Appl. Genet. 123: 43–53. DOI 10.1007/s00122-011-1565-0

14. Boubals, D. 1959. Amélioration de la résistance de la vigne au mildiou (*Plasmopara viticola* (Berk et Curt.) Berlese et de Toni). Recherche de géniteurs de résistance. Annales de l'Amélioration des Plantes 6: 481-525.

15. Bouquet, A. 1986. Introduction dans l'espèce *Vitis vinifera* L. d'un caractère de resistance a l'oïdium (*Uncinula necator* Schw. Burr) issu l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. Vignevini 12 (suppl): 141-146.

16. Bouquet, A. Pauquet, J., Adam-Blondon, A.F., Torregrosa, L., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S. 2000. Vers l'obtention de variétés de vigne résistantes á l'oïdium et au mildiou par les méthodes conventionnelles et biotechnologiques. Prog. Agric. Vitis 117: 383-389.

17. Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R., Meredith, C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape. Genome 39: 628-633.

18. Bowers, J.E., Boursiquot, J.M., This, P., Chu, K., Johanssen, H., Meredith, C. 1999. Historical genetics: The parentage of Chardonnay, Gamay and other wine grapes of Northeastern France. Science 285: 1562-1565.

19. Cadle-Davidson, L. 2008. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. Plant Dis. 92: 1577-1584.

20. Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G., Morgan, D., Les, D.H., Mishler, B.D., Duvall, M.R., Price, R.A., Hills, H.G., Qiu, Y.L., Kron, K.A., Rettig, J.H., Conti, E., Palmer, J.D., Manhart, J.R., Sytsma, K.J., Michael, H.J., Kress, W.J., Karol, K.G., Clark, W.D., Hedrén, M., Gaut, B.S., Jansen, R.K., Kim, K.J., Wimpee, C.F., Smith, J.F., Furnier, G.R., Strauss, S.H., Xiang, Q.Y., Plunkett, G.M., Soltis, P.S., Swensen, S.M., Williams, S.E., Gadek, P.A., Quinn, C.J., Eguiarte, L.E., Golenberg, E., Learn Jr., G.H., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Dayanandan, S., Albert, V.A. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. Annals of the Missouri Botanical Garden 80: 528–580.

21. Cindric, P., Korac, N., Kovac, V. 2000. Grape breeding in the Vojvodina province. Acta Horticult. 528: 499-504.

22. Cipriani, G., Frazza, G., Peterlunger, E., Testolin, R. 1994. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. Vitis 33: 211-215.

23. Coleman, C., Copetti, D., Cipriani, G., Hoffmann, S., Kozma, P., Kovács, L., Morgante, M., Testolin, R., Di Gaspero, G. 2009. The powdery mildew resistance

gene *REN1* co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. BMC Genetics 10: 89. doi:10.1186/1471-2156-10-89

24. Consonni, C., Humphry, M.E., Hartman, H.A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L.,Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Somerville, S.C., Panstruga, R., Jone, A.M. 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. Nat. Genet. 38: 716-720.

25. Crespan, M., Milani, N. 2001. The Muscats: a molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars. Vitis 40: 23-30.

26. Csepregi, P., Zilai, J. 1988. Szőlőfajta-ismeret és használat. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

27. Csizmazia, J., Bereznai, L. 1968. A szőlő *P. viticola* és a *Viteus vitifolii* elleni rezisztencianemesítés eredményei. Orsz. Szőlő. Bor. Kut. Int. Évk., Budapest, p. 191-200.

28. Dalbó, M.A., Ye, G-N., Weeden, N.F., Steinkellner, H., Sefc, K.M., Reisch, B.I. 2000. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. Genome 43: 333-340.

29. Dalbó, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Wilcox, W.F., Reisch, B.I. 2001. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 126: 83-89.

30. Dearing 1917. In: Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E. (1998): Biology of Grapevine. Cambridge University Press.

31. Dettweiler, E., This, P. 2000. The European Network for Grapevine Genetic Resources, Conservation and Characterization, 11-17. Int. Conf. Prosp. Vitic. Enol., Zagreb.

32. Díez –Navajas, A.M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Greif, C., Merdinoglu, D. 2008. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. Phytopathology 98: 776-780.

33. Di Gaspero, G., Cipriani, G. 2002. Resistance gene analogs are candidate markers for disease resistance genes in grape (*Vitis* ssp.). Theor. Appl. Genet. 106: 163-172.

34. Di Gaspero, G., Cipriani, G. 2003. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like kinases related to disease resistance in grapevine. Mol. Gen. Genom. 269: 612-623.

35. Di Gaspero, G., Cipriani, G., Marazzo, M.T., Andreetta, D., Prado Castro, M.J., Peterlunger, E., Testolin, R. 2005. Isolation of (AC)n-microsatellites in *V. vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. Mol. Breeding 15: 11-20.

36. Di Gaspero, G., Cipriani, G., Adam-Blondon, A.F., Testolin, R. 2007. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-genes candidates. Theor. Appl. Genet 114: 1249-1263.

37. Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, C.P., Edwards, K.J., This, P. 2002. Genetic mapping of grapevine (*V. vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. Theor. Appl. Genet. 105: 780-795.

38. Doligez, A., Adam-Blondon, A.F., Cipriani, G., Di Gaspero, G., Laucou, V., Merdinoglu, D., Meredith, C.P., Riaz, S., Roux, C., This, P. 2006. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. Theor. Appl. Genet 113: 369-382.

39. Donald, T.M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A.F., Bouquet, A., Thomas, M.R., Dry, I.B. 2002. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. Theor. Appl. Genet. 104: 610-618.

40. Doucleff, M., Jin, Y., Gao, F., Riaz, S., Krivanek, A.F., Walker, M.A. 2004. A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. Theor. Appl. Genet. 109: 1178-1187.

41. Dry, I.B., Feechan, A., Anderson, C., Jermakow, A.M., Bouyuet, A., Adam-Blondon, A.-F., Thomas, M.R. 2010 Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. Australian Journal of Grape and Wine Research 16: 94–105.

42. Eibach, R., Töpfer, R. 2003. Success in resistance breeding: „Regent" and its steps into the market. Acta Horticult. 603: 687-691.

43. Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L., Töpfer, R. 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance gene in grapevine breeding. Vitis 46: 120-124.

44. Feechan, A., Jermakow, A.M., Dry, I.B. 2009. Grapevine *MLO* candidates required for powdery mildew pathogenicity? Plant Signaling & Behavior 4: 522-523.

45. Filippenko, I.M., Stin, L.T. 1977. In: Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Zs., Testolin, R., Kozma P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. Theor. Appl. Genet. 116: 427-438.

46. Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K.J., Töpfer, R., Zyprian, E.M. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. Theor. Appl. Genet. 108: 501-515.

47. Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9: 275-296.

48. Freialdenhoven, A, Peterhänsel, C, Kurth, J, Kreuzaler, F, Schulze-Lefert, P. 1996. Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley. Plant Cell 8: 5-14.

49. Gáborjányi R, Király Z. 2007. Molekuláris növénykórtan. Támadás és védekezés. Agroinform Kiadó, Budapest.

50. Galbács, Zs., Molnár, S., Halász, G., Kozma, P., Hoffmann, S., Kovács, L., Veres, A., Galli, Zs., Szőke, A., Heszky, L., Kiss, E. 2009. Identification of grapevine cultivars using microsatellite-based DNA barcodes. Vitis 48: 17-24.

51. Gindro, K., Pezet, R., Viret, O. 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. Plant Physiol. Biochem. 41: 846-853.

52. Glits, M., Folk, Gy. 1993. Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó, Bp.

53. Goremykin, V.V., Hirsch-Ernst, K.I., Wolfl, S., Hellwig, F.H. 2003. Analysis of the *Amborella trichopoda* chloroplast genome sequence suggests that *Amborella* is not a basal angiosperm. Mol. Biol. Evol. 20: 1499-1505.

54. Goremykin, V.V., Hirsch-Ernst, K.I., Wolfl, S., Hellwig, F.H. 2004. The chloroplast genome of *Nymphaea alba*: whole-genome analyses and the problem of identifying the most basal angiosperm. Mol. Biol. Evol. 21: 1445-1454.

55. Goremykin, V.V., Holland, B., Hirsch-Ernst, K.I., Hellwig, F.H. 2005. Analysis of *Acorus calamus* chloroplast genome and its phylogenetic implications. Mol. Biol. Evol. 22: 1813-1822.

56. Grando, M.S., Bellin, D., Edwards, K.J., Pozzi, C., Stefanini, M., Velasco, R. 2003. Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Michx. Theor. Appl. Genet. 106: 1213-1224.

57. Grattapaglia, D., Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. Genetics 137: 1121-1137.

58. Hajdu, E. 2003. Magyar szőlőfajták. Mezőgazda Kiadó, Budapest

59. Hajósné Novák, M. 1999. Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

60. Halász, G., Veres, A., Kozma, P., Kiss, E., Balogh, A., Galli, Zs., Szőke, A., Hoffmann, S., Heszky, L. 2005. Microsatellite fingerprinting of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties of the Carpathian Basin. Vitis 44: 173-180.

61. Halterman, D., Zhou, F., Wei, F., Wise, R.P., Schulze-Lefert, P. 2001. The *MLA6* coiled-coil, NBS-LRR protein confers *AvrMla6*-dependent resistance specificity to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in barley and wheat. Plant J. 25: 335-348.

62. Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Zs., Testolin, R., Kozma P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. Theor. Appl. Genet. 116: 427-438.

63. Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., and Kogel, K.H. 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. Plant Physiol. 119: 1251-1260.

64. Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223-270.

65. Jaillon, O., Aury, J-M., Noel, B., Policrit, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, P., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyere, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pé, E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.F., Weissenbach, J., Quétier, F., Wincker, P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiposperm phyla. Nature 449: 463-468.

66. Jansen, R.K., Kaittanis, C., Saski, C., Lee, S-B., Tomkins, J., Alverson, A.J., Daniell, H. 2006. Phylogenetic analyses of *Vitis* (*Vitaceae*) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. BMC Evolutionary Biology 6: 32. doi:10.1186/1471-2148-6-32

67. Jelenkovic, G., Olmo, H.P. 1968. Cytogenetics of *Vitis*. III. Partially fertile F1 diploid hybrids between *V. vinifera* L. and *V. rotundifolia* Michx. Vitis 7: 8-18.

68. Jørgensen, J.H. 1992. Discovery, characterisation and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. Euphytica 63: 141-152.

69. Jürges, G., Kassemeyer, H.-H., Dürrenberger, M., Düggelin, M., Nick P. 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. Plant Biol. 11: 886-898. doi:10.1111/j.1438-8677.2008.00182.x

70. Kast, W.K., Stark-Urnau, M., Seidel, M., Gemmrich, A.R. 2001. Interisolate variation of virulence of *Plasmopara viticola* on resistant vine varieties. Bull OILB/SROP 24: 45-49.

71. Katula-Debreceni, D., Lencsés, A.K., Szőke, A., Veres, A., Hoffmann, S., Kozma, P., Kovács, L.G., Heszky, L. Kiss E. 2010. Marker-assisted selection for two dominant powdery mildew resistance genes introgressed into a hybrid grape family. Sci. Horticult. 126: 448-453.

72. Kiss, E., Balogh, A., Kozma, P., Koncz, T, Galli, Zs., Heszky, L. 2003. Molecular analysis of grapevine cultivars indigenous in the Carpathian Basin. Acta Horticult. 603: 95-102.

73. Kiss, E., Kozma, P., Halász, G. 2007. Magyar szőlő mikroszatellit adatbázis. XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest MTA 2007. március 12. Összefoglalók, p. 45. http://www.oiv2007.hu/documents/viticulture/324_kiss_et_al_1__oiv_2007_hungarian_vitis_microsatellite_database.pdf

74. Koleda, I. 1968. Eredmények a szőlő fagy- és peronoszpóra rezisztencia nemesítésében kelet-ázsiai *Vitis* fajok felhasználásával. MTA Agrártudományi Közlemények, Budapest, 27: 559-567.

75. Koleda, I. 1975. Ergebnise von Kreuzungen zwischen *Vitis amurensis* und *Vitis vinifera* in der Zuechtung frostwiederstandfaechiger Reben. Vitis 14: 1-5.

76. Korbuly, J. 1998. Results of breeding for resistance to different pathogens and winter frost using *Vitis amurensis*. Acta Horticult. 528: 551-557.

77. Korbuly, J. 1999. Evaluation of different sources for breeding powdery mildew resistant grapevine varieties. Horticult. Sci. 5: 35-40.

78. Kortekamp, A., Wind, R., Zyprian, E. 1997. The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two susceptible *Vitis* cultivars. Vitis 36: 103–104.

79. Kozma, P. 2002. A szőlő és termesztése I. A szőlőtermesztés történeti, biológiai és ökológiai alapjai. Akadémiai Kiadó.

80. Kozma P. jr. 1999. Breeding of grape varieties resistant to fungus diseases in Hungary. Hung. Agricult. Res. 8: 10-13.

81. Kozma, P. jr. 2000. Winegrape breeding for fungus disease resistance. Acta Horticult. 528: 505-510.

82. Kozma, P. jr., Dula, T. 2003. Inheritance of resistance to downy mildew and powdery mildew of hybrid family *Muscadinia rotundifolia* x *V. vinifera* x *V. amurensis* x Franco-American hybrid.Acta Horticult. 603: 457-463.

83. Kozma, P., Balogh, A., Kiss, E., Galli, Zs., Koncz, T., Heszky, L. 2003. Study of origin of cultivar „Csaba gyöngye”. Acta Horticult. 603: 585-591.

84. Kozma, P., Kiss, E., Hoffmann, S., Galbács, Zs., Dula, T. 2006. Using the powdery mildew resistant *Muscadinia rotundifolia* and *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana for breeding new cultivars. 9th Internatinal Conference on Grape Genetics and Breeding. Udine, Italy Book of abstracts, p. 170.

85. Levadoux 1956. In: Csepregi, P., Zilai, J. 1988. Szőlőfajta-ismeret és használat. Mezőgazda Kiadó, Bp.

86. Lodhi, M.A., Daly, M.J., Ye, G-N., Weeden, N.F., Reisch, B.I. 1995. A molecular marker based linkage map of *Vitis*. Genome 38: 786-794.

87. Luo, S. L., He, P.C., Zhom, P., Zheng, X.Q. 2001. Identification of molecular genetic markers tightly linked to downy mildew resistance genes in grape. Acta Genet. Sin. 28: 76-82.

88. McDonald, B.A., Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 349-379.

89. Mahanil, S., A. Garris, C. Owens, D. Ramming, L. Cadle-Davidson. 2010. Development of molecular markers for powdery mildew resistance in grapevines. X. International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Geneva, NY August 2-5, 2010. Proceedings p. 29.

90. Marguerit, E., Boury, C., Manicki, A., Donnart, M., Butterlin, G., Némorin, A., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Ollat, N., Decroocq, S., 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. Theor. Appl. Genet. 118: 1261–1278. DOI 10.1007/s00122-009-0979-4

91. Marton, D. 1944. A magyar borvidékek es szőlőfajtáink. Borászati Zsebkönyv. Budapest

92. Merdinoglu, D., Wiedeman-Merdinoglu, S., Coste, P., Dumas, V., Haetty, S., Butterlin, G., Greif, C., Adam-Blondon, A.F., Bouquet, A., Pauquet, J. 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. Acta Horticult. 603: 451-456.

93. Merdinoglu, D. Butterlin, G., Bevilacqua, L., Chiquet, V., Adam-Blondon, A.F., Decroocq, S. 2005. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. Mol. Breeding 15: 349-366.

94. Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Subramoniam, S., Sobral, B.W., Young, N.D., Sivaramakrishnan, S. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant J. 20: 317-332.

95. Molnár, S., Galbács, Zs., Halász, G., Hoffmann, S., Kiss, E., Kozma, P., Veres, A., Galli, Zs., Szőke, A., Heszky, L. 2007. Marker assisted selection (MAS) for powdery mildew resistance in a grapevine hybrid family. Vitis 46: 212-213.

96. Monosi, B., Wisser, R.J., Pennill, L., Hulbert, S.H. 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. Theor. Appl. Genet. 109: 1434-1447.

97. Moreira, F.M., Madini, A., Marino, R., Zulini, L., Stefanini, M., Velasco, R., Kozma, P., Grando, M.S. 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. Tree Genetics & Genomes 7:153–167. DOI 10.1007/s11295-010-0322-x

98. Moroldo, M., Paillard, S., Marconi, R., Fabrice, L., Canaguier, A., Cruaud, C., De Berardinis, V., Guichard, C., Brunaud, V., Le Clainche, I., Scalabrin, S., Testolin, R., Di Gaspero, G., Morgante, M., Adam-Blondon A.-F. 2008. A physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. BMC Plant Biol 8: 66.

99. Nandi, O.I., Chase, M.W., Endress, P.K. 1998. A combined cladistic analysis of angiosperms using *rbcL* and non-molecular data sets. Ann. Miss. Bot. Gard. 85: 137-212.

100. Negrul, A.M. 1946. Proiszhozsdenie kul'turnogo vinogrado i ego klasszifikacija. Ampelografija SZSZSZR I. Moscow.

101. Németh, M. 1967. Ampelográfiai Album. I. Termesztett borszőlőfajtáink. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

102. Neu, C., Stein, N., Keller, B. 2002. Genetic mapping of the *Lr20-Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat. Genome 45: 737-744.

103. Olmo, H.P. 1971. *Vinifera x rotundifolia* hybrids as wine grapes. Am. J. Enol. Vitic. 22: 87-91.

104. Olmo, H.P. 1986. The potential role of (*Vinifera x Rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. Experientia 42: 921-926.

105. Pauquet, J., Bouquet, A., This, P., Adam-Blondon, A.F. 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powderly mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assement of their usefulness for marker assisted selection. Theor. Appl. Genet. 103: 1201-1210.

106. Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D., Mestre, P. 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. BMC Plant Biol. 10: 147. DOI: 10.1186/1471-2229-10-147.

107. Piffanelli, P., Ramsay, L., Waugh, R., Benabdelmouna, A., D'Hont, A., Hollricher, K., Jorgensen, J.H., Schulze-Lefert, P., Panstruga R. 2004. A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. Nature 430: 887-891.

108. Raman, H., Read, B.J., Brown, A.H.D., Abbott, D.C. 2001. Molecular markers and pyramiding of multiple genes for resistance to scald in barley. Australian barley

technical symposium Canberra, ACT, Australia. 16-20 September 2001 ISBN 1 920842 13 6.

109. Ramming, D.W., Gabler, F., Smilanick, J.L., Cadle Davidson, M., Barba, P., Consolie, N.H., Mahanil, S., Cadle Davidson, L.E. 2011. A single dominant locus *Ren4* confers non-race-specific penetration resistance to grapevine powdery mildew. Phytopathology. 101(4): 502-508. doi: 10.1094/PHYTO-09-10-0237

110. Regner, F., Stadlbauer, A., Eisenheld, C., Kaserer, H. 2000. Genetic relationship among Pinots and related cultivars. Amer. J. Enol. Vitic. 51: 7-14.

111. Riaz, S., Dangl, S.G., Edwards, K.J., Meredith, C.P. 2004. A microsatellite based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet. 108: 864-872.

112. Riaz, S., Tenscher, A.C., Ramming, D.W., Walker, M.A. 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. Theor. Appl. Genet. 122:1059–1073. DOI 10.1007/s00122-010-1511-6

113. Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

114. Savolainen, V., Chase, M.W., Hoot, S.B., Morton, C.M., Soltis, D.E., Bayer, C., Fay, M.F., de Bruijn, A.Y., Sullivan, S., Qiu, Y-L. 2000. Phylogenetics of flowering plants based upon a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. System. Biol. 49: 306-362.

115. Sefc, K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glossl, J., Steinkellner, H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. Genome 42: 367-373.

116. Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1997. Phylogenetic relationships in *Saxifragaceae* s.l.: a comparison of topologies based on 18S rDNA and *rbcL* sequences. Amer. J. Bot. 84: 504-522.

117. Soltis, D.E., Hibsch-Jetter, C., Soltis, P.S., Chase, M.W., Farris, J.S. 1997. Molecular phylogenetic relationships among angiosperms: an overview based on *rbcL* and 18S rDNA sequences. In: Iwatsuki K, Raven PH, eds. Evolution and diversification of land plants. Tokyo: Springer, 157-178.

118. Soltis, D.E., Soltis, P.S., Chase, M.W., Mort, M.E., Albach, D.C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W.H., Hoot, S.B., Fay, M.F., Axtell, M., Swensen, S.M., Prince, L.M., Kress, W.J., Nixon, K.C., Farris, J.S. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. Bot. J. Linn. Soc. 133: 381-461. doi:10.1006/bojl.2000.0380.

119. Soltis, D.E., Senters, A.E., Zanis, M.J., Kim, S., Thompson, J.D., Soltis, P.S., Ronse De Craene, L.P., Endress, P.K., Farris, J.S. 2003. Gunnerales are sister to other core eudicots: implications for the evolution of pentamery. Amer. J. Bot. 90: 461-470.

120. Soejima, A., Wen, J. 2006. Phylogenetic analysis of the grape family (*Vitaceae*) based on three chloroplast markers. Amer. J. Bot. 93: 278-287.

121. Staudt, G., Kassemeyer, H.H. 1995. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. Vitis 34: 225-228.

122. Striem, M.J. 2000. Grape hybrid varieties and accessions' parentage and their genetic percent of *Vitis* species.

123. Stirling, B., Newcombe, G., Vrebalov, J., Bosdet, I., Bradshaw, H.D. 2001. Suppressed recombination around the MXC3 locus, a major gene for resistance to poplar leaf rust. Theor. Appl. Genet 103: 1129-1137.

124. This, P., Dettweiler, E. 2003. EU-project GENRES CT96 No81: European *Vitis* database and results regarding the use of a common set of microsatellite markers. Acta Horticult. 603: 59-66.

125. This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G.S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibañez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith, C.P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., Maul, E. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. Theor. Appl. Genet. 109: 1448-1458.

126. Thomas, M.R., Scott, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theor. Appl. Genet. 86: 985-990.

127. Troshin, L., Nedov, P., Litvak, A., Guzun, N. 1990. Improvement of *Vitis vinifera sativa* DC. taxonomy. Vitis (special issue) 37-43.

.

128. Verriès, C., Bès, C., This, P., C. Tesnière, C. 2000. Cloning and characterization of *Vine-1*, a LTRretrotransposon-like element in *Vitis vinifera* L., and other *Vitis* species. Genome 43: 366-376.

129. Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T.M., Facci, M., Mitchell, J.T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Demattè, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B, Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J.A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, M.S., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S.K., Fontana, P., Gutin, A., Peer, Y. Van de, Salamini, F., Viola, R. 2007. High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS ONE 2: e1326. doi:10.1371/journal.pone.0001326

130. Vezzulli, S., Troggio, M., Coppola, G., Jermakow, A., Cartwright, D., Zharkikh, A., Stefanini, M., Grando, M.S., Viola, R., Adam-Blondon, A.F., Thomas, M., This, P., Velasco, R. 2008. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. Theor. Appl. Genet. 117: 499-511. doi 10.1007/s00122-008-0794-3

131. Vojtovic, K.A. 1987. Vospriimchivost sortov vinograda k oidiumu (Powdery mildew susceptibility of grapevine cultivars). In: Novüje kompleksno - ustojchevüje stolovüje sorta vinograda i metodü ih polichenija. (New complex resistant table grape cultivars and methods for breeding) Kishinev: Kisinev Kartja Moldovenjaske; 1987: 42-46.

132. Walker, A.R., Lee, E., Robinson, S.P. 2006. Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry color locus. Plant Mol. Biol. 62: 623-635.

133. Walker, M.A., Jin, Y. 2000. Breeding *Vitis rupestris* x *Muscadinia rotundifolia* rootstocks to control *Xiphinema index* and fanleaf degeneration. Acta Horticult. 528: 511-515.

134. Wan, Y., Schwaniniger, H., He, P., Wang, Y. 2007. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. Vitis 46: 132-136.

135. Wei, F., Gobel-Werner, K., Morroll, S.M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R.A., Leister, D., Schulze-Lefert, P., Wise, R.P. 1999. The *Mlo* (powdery mildew) resistance cluster is assiciated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. Genetics 153: 1929-1948.

136. Wei, F., Wing, R.A., Wise, R.P. 2002. Genome dynamics and evolution of the *Mla* (powdery mildew) resistance locus in barley. Plant Cell 14: 1903-1917.

137. Welter, L.J., Gokturk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R. Töpfer, R. Zyprian, E.M. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). Mol. Breeding 20: 359-374.

138. Wen, J., Nie, Z-L., Soejima, A., Meng, Y. 2007. Phylogeny of *Vitaceae* based on the nuclear *GAI1* gene sequences. Can. J. Bot. 85: 731-745. doi:10.1139/B07-071

139. Wiedemann-Merdinoglu, S., Prado, E., Coste,P., Dumas, V., Buttarelin, G., Bouquet, A., Merdinoglu, D. 2006. Genetic analysis of resistance to downy mildew from *Muscadinia rotundifolia*. 9th Int. Conf. Grape Genet. Breed., Udine, Italy.

140. Winterhagen, P., Howard, S.F., Qui, W., Kovács, L. 2008. Transcriptional up-regulation of grapevine *MLO* genes in response to powdery mildew infection. Am. J. Enol. Vitic. 59: 159-168.

141. Zyprian, E., Eibach, R., Töpfer, R. 2003. Comparative molecular mapping in segregating populations of grapevine. Acta Horticult. 603: 73-77.

142. Zyprian, E., Akkur, M., Fischer, B., Salakhutdinov, I., Welter L., Kortekamp, A., Eibach, R., Töpfer, R. 2005. Fundamental research meets practical breeding: genetics of disease resistance in grapevine. In: W. Qiu and L.G. Kovács (eds) Proceedings of the International Grape Genomics Symposium, July 12-14, 2005. St. Louis, Missouri, pp 163-168.

Internet elérhetőségek:

http://www.montpellier.inra.fr/grapegen06
www.vitaceae.org
http://www.mkk.szie.hu/dep/gent
Vitis International Variety Catalogue. http://www.vivc.de

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőm, Dr. Kiss Erzsébet egyetemi tanár munkámhoz nyújtott áldozatos segítségét és magas szintű szakmai irányítását. Külön köszönöm szakmai és erkölcsi támogatását a hosszú évek során, belém vetett bizalmát, és hogy lehetőséget adott disszertációm elkészítéséhez több éves távollét után is. Köszönöm, hogy bevezetett a tudomány világába, és általa megismerhettem és megszerettem a molekuláris genetika világát. Köszönöm továbbá mind a kísérleteim tervezésekor, mind a kiértékelésükben, mind a publikációk elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Heszky László akadémikus úrnak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a Genetika és Biotechnológiai Intézetben végezhessem kísérleteimet, és itt készítsem el diplomamunkámat, később szakdolgozatomat, majd pedig disszertációmat. Köszönöm, hogy tanácsaival segítette munkámat.

Köszönet illeti Dr. Kozma Pált, a Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Intézet tudományos főmunkatársát, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a szőlő genetikai alapanyagot, a különböző hibridcsaládokat és a vizsgálatainkhoz szükséges szőlő fajtákat, fajokat, és szakmai tanácsaival segítette munkánkat.

Köszönöm Dr. Galli Zsolt szakmai és baráti tanácsait, diplomás és doktorandusz éveim alatt sok mindent tanultam tőle, és most is bármikor bizalommal fordulhatok hozzá.

Külön köszönöm Dr. Szőke Antal és Dr. Veres Anikó szakmai segítségét, tanácsait.

Továbbá köszönöm az Intézet összes kutatójának, dolgozójának és doktoranduszainak tanácsait és önzetlen segítségét: Ádám Zoltánné, Stefi néninek, Mázikné Dr. Tőkei Katalinnak, Hajósné Dr. Novák Mártának, Dr. Gyulai Gábornak, Pilinszky Katalinnak, Kovács Lászlónak, Lencsés Andrea Kittinek, Katona Melindának, Dr. Bellusné Daniek Ágnesnek, Ócsai Sándorné, Évának, Bakos Györgyné, Marikának.

És nem utolsósorban köszönöm családomnak, férjemnek és gyermekeimnek, hogy türelmükkel és szeretetükkel támogattak mindvégig.