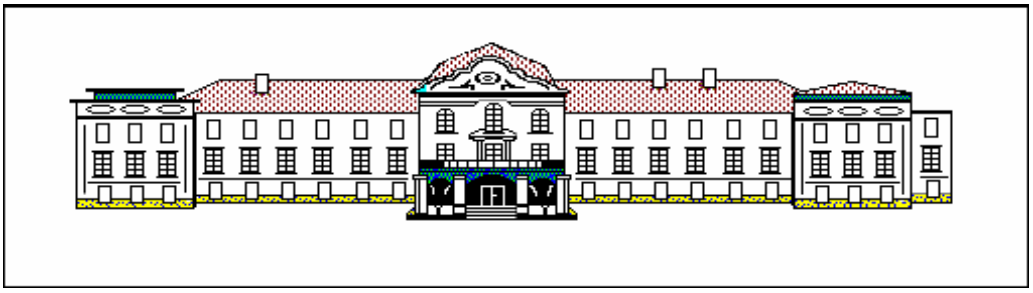


Szent István Egyetem
Gödöllő
Növénytudományi Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Dr. Heszky László

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Lisztharmat és peronoszpóra rezisztens szőlő genotípusok marker alapú szelekciója

Molnár Stella

Gödöllő
2011

Doktori iskola: Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Heszky László,
egyetemi tanár, akadémikus
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

Tudományág: növénytermesztés, kertészet, növénynemesítés, genetika,
növényvédelem és kórélettan

Doktori Program: Növénynemesítés genetikai és biotechnológiai módszerekkel

Vezetője: Dr. Heszky László,
egyetemi tanár, akadémikus
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

Témavezetők: Dr. Kiss Erzsébet,
egyetemi tanár, a mezőgazdasági tudomány kandidátusa
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

Dr. Kozma Pál,
tudományos főmunkatárs, a mezőgazdasági tudomány kandidátusa
Pécsi Tudomány Egyetem Szőlészeti és Borászati Intézet, Pécs

…… ……..
Dr. Kiss Erzsébet Dr. Kozma Pál
Témavezető Témavezető

……..
Dr. Heszky László
A Doktori Iskola vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS 7

1.1 A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE 7
1.2 CÉLKITŰZÉS 10

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS 11

2.1 A SZŐLŐ (VITIS VINIFERA L.) SZÁRMAZÁSA, TAXONÓMIÁJA ÉS ELTERJEDÉSE 11
2.2 A LISZTHARMAT (ERYSIPHE NECATOR SCHWEIN.) BIOLÓGIÁJA 14
2.3 A PERONOSZPÓRA (PLASMOPARA VITICOLA BERK. ET CURTIS EX DE BARY BERL. ET DE TONI) BIOLÓGIÁJA 16
2.4 AZ EUVITIS ÉS A MUSCADINIA NEMZETSÉG FAJAINAK ELLENÁLLÓKÉPESSÉGE LISZTHARMATTAL ÉS PERONOSZPÓRÁVAL SZEMBEN 18
2.4.1 Ellenálló fajták nemesítése 19
2.5 AZ IMMUNITÁS, ILLETVE A VÉDEKEZÉSI MECHANIZMUSOK AZ ÉLŐVILÁGBAN 24
2.6 A MARKEREK CSOPORTOSÍTÁSA 30
2.6.1 Izoenzim vizsgálatok szőlőben 32
2.6.2 DNS markerek alkalmazása a szőlőfajták jellemzésére 33
2.6.3 PCR alapú módszerek 34
2.7 MOLEKULÁRIS MARKEREK ALKALMAZÁSA REZISZTENCIA GÉNEK TÉRKÉPEZÉSÉBEN 42
2.7.1 *Run1* és *Rpv1* lókusz lokalizációjának vizsgálata és jellemzése 46

3 ANYAG ÉS MÓDSZER 52

3.1 NÖVÉNYANYAG 52
3.2 ALKALMAZOTT MÓDSZEREK 53
3.2.1 DNS-extrakció 53
3.2.2 Polimeráz láncreakció (PCR) 53
3.2.3 ALF – Automata Lézer Fluorométer 57

4 EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK 58

4.1 A RUN1 LISZTHARMAT REZISZTENCIA GÉNNEL KAPCSOLT MOLEKULÁRIS MARKEREK A BC_4 X CARDINAL HIBRIDCSALÁDBAN (02-02-ES CSALÁD) 58
4.2 A RUN1 ÉS AZ RPV1 PERONOSZPÓRA REZISZTENCIA GÉNEKKEL KAPCSOLT MOLEKULÁRIS MARKEREK A BC_4 X KISMIS MOLDAVSZKIJ HIBRIDCSALÁDBAN 64
4.3 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK 71

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 72

6 ÖSSZEFOGLALÁS 74

7 MELLÉKLET 79

7.1 DNEASY PLANT MINI KIT 79
7.2 ALF – AUTOMATIKUS LÉZER FLUOROMÉTER 80
7.3 A 02-2 HIBRIDCSALÁD ELŐÁLLÍTÁSÁBAN SZEREPLŐ SZŐLŐFAJTÁK JELLEMZÉSE 81
7.4 DNS MINŐSÉGÉNEK ÉS MENNYISÉGÉNEK ELLENŐRZÉSE NANODROP™ ND-100 KÉSZÜLÉKKEL 84

8 IRODALOMJEGYZÉK 86

9 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS 113

Rövidítések jegyzéke

ALF- **A**utomata **L**ézer **F**luorométer

AFLP- **A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism = amplifikált fragmentum-hossz polimorfizmus

APAF1- **A**poptotic **P**rotease **A**ctivating **F**actor **1** = apoptózist szabályozó faktor 1

AP-PCR- **A**rbitrarily **P**rimed – PCR = PCR tetszés szerinti primerrel

BAC- **B**acterial **A**rtificial **C**hromosome

BC- **B**ack-**c**ross

BCR- **B C**ell **R**eceptor

bp- bázispár

BSA - **B**ulked **S**egregant **A**nalysis = csoport szegregációs analízis

CAPS- **C**leaved **A**mplified **P**olymorphic **S**equences

CSIRO- **C**ommonwealth **Sci**entific and **R**esearch **O**rganization

DAF- **D**NA **A**mplification **F**ingerprint = DNS amplifikációs ujjlenyomat

DNS- **D**ezoxiribo**n**ukleins**a**v

cDNS- kópia-DNS

dNTP- **D**ezoxiribo**n**ukleotid **t**ri**f**oszfát

dsDNS- dupla szálú DNS

EDTA- Etiléndiamin-tetraecetsav

EST- **E**xpressed **S**equence **T**ags

ETI- **E**ffector **T**riggered **S**usceptibility

ETS- **E**ffector **T**riggered **I**mmunity

EU- **E**uropean **U**nion

FAO- **F**ood and **A**griculture **O**rganization

HR- **H**ypersensitivity **r**esponse = hiperszenzitivitási válasz

Ig- **I**mmuno**g**lobulin

INRA- L'**i**nstitute **N**ationale la **R**echerche **A**gronomique

IRAK- **I**nterleukin-1**R**eceptor **A**ssociated **K**inase

ISSR- **I**nter **S**imple **S**equence **R**epeats

LRR- **L**eucine **R**ich **R**epeat = leucinban gazdag ismétlődő szakaszok

MAPK– **m**itogén **a**ktivált **p**rotein **k**ináz

MAS- **M**arker **A**ssisted **S**election = markereken alapuló szelekció

NBS- **N**ucleotide **B**inding **S**ite = nukleotid kötő hely

NCBI- **N**ational **C**enter of **B**iotechnology **I**nformation

NF- **N**ukleáris **F**aktor

NOD- **N**ucleotide–binding **O**ligomerization **D**omain

O.I.V.- Office **I**nternational de la **V**igne et du Vin = Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Hivatal

PAGE- **P**oly**a**crylamid **G**el **E**lectrophoresis - poliakrilamid gélelektroforézis

PAMP- **P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns = patogénekhez kapcsolt molekuláris mintázat

PCR- **P**olymerase **C**hain **R**eaction = polimeráz láncreakció

PR- **P**athogenesis – **R**elatedproteins = védőfehérjék

PRR- **P**attern **R**ecognition **R**eceptors = mintázatfelismerő receptorok

PTI- **P**athogen **T**riggered **I**mmunity

QTL- **Q**uantitative **T**rait **L**oci = mennyiségi tulajdonságok lokusza

RAG- **R**ekombináz **A**ktiváló **G**én

RAPD- **R**andomly **A**mplified **P**olymorphic **D**NA = véletlen amplifikált polimorf DNS

rDNS- riboszómális - DNS

RFLP- **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism = restrikciós fragmentum-hossz polimorfizmus

RGA- **R**esistance **G**ene **A**nalogs = rezisztencia génanalógok

ROS- **R**eactive **O**xygen **S**pecies = reaktív oxigénfajták

RPV1- Resistant to *Plasmopara viticola* 1

RUN1- Resistant to *Uncinula necator* 1

SAR- **S**ystemic **A**cquired **R**esistance = szisztematikus szerzett rezisztencia

SCAR- **S**equence **C**haracterized **A**mplified **R**egions = ismert szekvenciáról amplifikált régió

SNP- **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism

SSLP- **S**imple **S**equence **L**ength **P**olymorphism

SSR- **S**imple **S**equence **R**epeat = egyszerű szekvenciaismétlődés

STR- **S**hort **T**andem **R**epeat = rövid tandem ismétlődés

Taq- *Thermus aquaticus*

TBE- puffer- **T**ris-**B**orat-**E**DTA-puffer

TCR- **T C**ell **R**eceptor

TIR- **T**oll **I**nterleukin 1 **R**eceptor

TLR- **T**oll-**l**ike **r**eceptors

Tm- melting temperature = olvadási hőmérséklet

UV- **U**ltra**v**iolet = ultraibolya fény

VMC- **V**itis **M**icrosatellite **C**onsortium

VNDR- **V**ariable **N**umber of **D**inucleotide **R**epeats = változó számú dinukleotid ismétlődések

VNTR- **V**ariable **N**umber **T**andem **R**epeat = változó számú tandem ismétlődések

1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az európai szőlőfajták nagy gazdasági károkat okozó gombabetegsége a lisztharmat (*Erysiphe necator* Schwein.) és a peronoszpóra (*Plasmopara viticola* Berk. et Curtis ex de Bary) Berl. et de Toni. Az ellenük való védekezés jelentős erőforrásokat igényel a szőlőtermesztésben, amely indokolja a rezisztencianemesítést megalapozó genetikai kutatásokat.

1.1 A téma aktualitása, jelentősége

A szőlőkultúra az emberi civilizáció igen jelentős eleme. A szőlő felhasználása sokrétű: bort vagy szőlőlevet állítunk elő belőle, csemegeszőlőként fogyasztjuk, magjából olajat nyerünk ki. A szőlőtermés körülbelül 71%-át borkészítésre használják, 21% friss gyümölcsként, 2% pedig mazsolaként kerül értékesítésre. A szőlő levét édesítőszerként is használják a cukormentes befőttekhez.

A világ legnagyobb szőlőtermelői országait, valamint a termelésre használt területek méretét az 1. táblázat foglalja össze (www.fao.org).

1. táblázat: A világ jelentősebb szőlőtermelő országai

Országok	Termelésre használt terület mérete
Spanyolország	11750 km²
Franciaország	8640 km²
Olaszország	8270 km²
Törökország	8120 km²
Amerikai Egyesült Államok	4150 km²
Irán	2860 km²
Románia	2480 km²
Portugália	2160 km²
Argentína	2080 km²
Ausztria	1642 km²
Magyarország*	710 km²

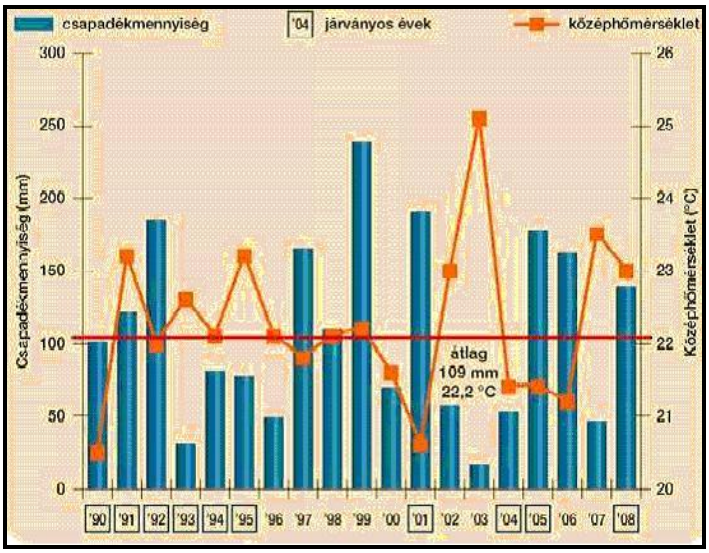
* FAO és az Agrárszektor (http://agrarszektor.hu) adatai alapján

A világ szőlőültetvényeit sokféle patogén és kártevő veszélyezteti. Európában a XIX. század közepén jelentek meg azok a gombafajok, amelyek ma a legnagyobb veszélyt jelentik az érzékeny *Vitis vinifera* eredetű fajtákra.

A szőlő gombás betegségei közül a peronoszpóra (*Plasmopara viticola* Berk. & M.A. Curtis Berl. & De Toni), a lisztharmat (*Erysiphe necator* Schwein.), a szürke rothadás (*Botrytis cinerea*), a szőlőorbánc (*Pseudopeziza tracheiphilla*) és a tőelhalást okozó betegségek a legjelentősebbek (Bényei *et al.* 1999).

Magyarországon a szőlőültetvényeket mind a lisztharmat, mind a peronoszpóra veszélyezteti Az időjárásban a változékonyság és a szélsőségek jellemzőek, melyek kedveznek a szőlőbetegségek kialakulásának.

A peronoszpóra terjedése és a megbetegítés aránya nem kizárólag a kórokozó dinamikájától, hanem a csapadékos, hűvös időjárástól is függ. A lisztharmat járványok kialakulásának a párás, de meleg időjárás kedvez. A lisztharmatjárványok dinamikája azonban döntően a kórokozón múlik (1. ábra).



1. ábra: A lisztharmatjárványok kitörését a bogyófertőzési időszak (a virágzás kezdete és a zöldborsónyi állapot között) időjárása nem befolyásolja. Szekszárdi borvidék, 1990-2008 (Füzi, 2009).

Az 1. ábrán megfigyelhető, hogy az 1999-2008 közötti években a tíz járványos évet szinte mindig más időjárás jellemezte (1990-1995, 2001, 2004, 2005 és 2008). A hűvös, csapadékostól a meleg, száraz viszonyokig minden előfordult, és ugyanilyen változatos volt az a kilenc esztendő is, amikor nem tört ki járvány. A lisztharmatjárványok erejének évenkénti változását ugyanis a bogyófertőzési időszak

meteorológiai viszonyai gyakorlatilag nem befolyásolják. A bogyófertőzéshez alapvetően kedvez hazánk időjárása (Füzi, 2009). Ez ad magyarázatot arra, hogy miért tartják a lisztharmatot a legkiszámíthatatlanabb szőlőbetegségnek.

Mindkét kórokozó (lisztharmat, peronoszpóra) önmagában is 100%-os termésveszteséget okozhat a fogékony fajták esetében, ha nem alkalmaznak növényvédőszereket. A gombás megbetegedések elleni védekezés a mai gazdag növényvédőszer kínálattal, valamint a fertőzés előrejelzésével hatékonnyá tehető.

A túlzott növényvédőszer-használat veszélyeztetheti az emberi egészséget, megváltoztatja a kórokozó biodiverzitást, és fungicid rezisztens patogén törzsek kialakulásának kedvez. A szőlőnemesítés fő célja, ezért a legfontosabb gombabetegségekkel szemben rezisztens, kiváló minőségű fajták előállítása.

A rezisztens fajták létrehozásához megfelelő génforrásokra van szükség, amelyekkel az értékes bor–és csemegeszőlőket keresztezve, kiváló minőségű ellenálló fajtákat lehet előállítani. A minőség megőrzése több nemzedéken keresztül végzett visszakeresztezéseket és gondos szelekciót igényel. A rezisztenciagén(eke)t hordozó utódok kiválogatását, az utódgeneráció méretének redukcióját teszi lehetővé a markerekre alapozott szelekció (MAS), amely a rezisztenciagén(ekk)el szorosan kapcsolt markerek közötti szekvenciakülönbségek detektálása alapján biztosítja az ellenálló és a fogékony genotípusok azonosítását.

A rezisztencianemesítés Európában a lisztharmat- és peronoszpórafertőzéssel szemben már a XIX. században elkezdődött, melyben a magyar szőlőnemesítők jelentős szerepet vállaltak. A jelenlegi fajtaválasztékot, olyan új fajtákkal bővítették és kívánják bővíteni, melyek nagyfokú ellenálló képességgel rendelkeznek a lisztharmat- és peronoszpórafertőzéssel szemben. Amerikai és ázsiai fajokat és fajtákat is felhasználtak a keresztezéseknél, melyből olyan hibiridcsaládokat állítottak elő, melyek utódai hordozzák a kórokozókkal szembeni rezisztenciagén(eke)t. Ezek a fajták csak minimális növényvédőszeres kezelést igényelnek a járványos időszakban.

1.2 Célkitűzés

1. Az észak-amerikai eredetű *M. rotundifolia*-ból származó lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia gént hordozó (*RUN1/RPV1*) genotípusok szelekciója a PTE Szőlészeti és Borászati Intézetben előállított két hibridcsalád – a BC_4 x Cardinal (02-02) és a BC_4 x Kismis moldavszkij (02-01) utódnemzedékekben, a rezisztenciagénekkel kapcsolt 3 mikroszatellit-, 2 BAC klón eredetű- és 1 rezisztencia génanalóg (RGA) markerrel.

2. A *RUN1* és az *RPV1* rezisztencia génekkel kapcsolt mikroszatellit marker allélek pontos méretének meghartározása.

3. A vizsgálatba bevont markerek koszegregációjának alapján annak megállapítása, hogy az adott markerek milyen fokú megbízhatósággal alkalmazhatóak a BC_4 x Cardinal (02-02) és a BC_4 x Kismis moldavszkij (02-01) hibridcsalád egyedein belül a rezisztens genotípusok kiválogatására.

4. Rutinvizsgálatra alkalmas gyors, egyszerű, agaróz gélelektroforézisen alapuló MAS módszer kifejlesztése a *RUN1/RPV1* pozitív genotípusok szelekciójára.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A szőlő (*Vitis vinifera* L.) származása, taxonómiája és elterjedése

A szőlőfélék legősibb képviselői a *Cissites* nemzetség fajai a földtörténeti krétakorában, mintegy 100 milló éve jelentek meg a Földön. A harmadidőszakban kipusztult *Cissites* nemzetségből származtatják a ma is meglévő: *Cissus, Ampelocissus, Clematocissus, Parthenocissus, Rhoicissus, Ampelopsis, Landukia, Tetrastigma, Pterishanthe* és a *Vitis* nemzetséget. Kialakulásuk a 70-90 millió évvel ezelőtti, alsó krétakorra tehető. A *Vitis* nemzetség legősibb fajai a *Vitis dacotana* és a *Vitis inaequilateralis* lehettek (Bényei *et al.* 1999)

A *Vitis* nemzetség fejlődéstörténete a Harmadidőszak elejétől, az Eocén kortól követhető egyértelműen nyomon. A Harmadidőszak éghajlata melegebb volt a mainál. Nagy számú fosszilis fajra bukkantak a kutatók ebből a korból. Alaszka, Grönland és Izland területén fedeztek fel szőlőmaradványokat, melyeket *Vitis alaskana, Vitis arctica* és *Vitis islandica*-nak neveztek (Bényei *et al.* 1999). Több mint 40 szőlőfajt sikerült azonosítani Észak-Amerika, Európa és Ázsia különböző területein talált leletekből.

A hazai és a nemzetközi szőlőtermesztésben meghatározó szerepet játszó *Vitis* nemzetség története 60 millió évre nyúlik vissza. A *Vitis* nemzetségnek két alnemzetsége a *Muscadinia* és az *Euvitis* alakult ki. Az *Euvitis* alnemzetségből a kontinensvándorlás, az éghajlati és egyéb adottságok változásának tekintetében alapvetően három földrajzilag jól elkülöníthető csoport jött létre: az észak-amerikai, a kelet-ázsiai és az eurázsiai fajok.

A Harmadidőszakot követő Negyedidőszakban az éghajlat jelentősen megváltozott, és a Pleisztocénban, mely kb 2 millió évig tartott, több eljegesedés követte egymást. Az eljegesedés mértéke azonban a három kontinensen nem volt egyforma mértékű. A szárazföldi jégtakaró legnagyobb kiterjedésekor az európai kontinenst az 50.-ik, míg az észak-amerikait csak a 38.-ik szélességi fokig borította. Ázsiában kisebb volt az eljegesedés, mint Európában. Az európai kontinensen élt szőlőfajok jelentős része elpusztult, míg Észak-Amerikában és Ázsiában a jégkorszakot lényegesen több faj vészelte át (Bényei *et al.* 1999.)

Az egyik nagy túlélő, a ligeti szőlő (*Vitis silvestris*), amelynek az őshazája valahol Közép-Ázsia és a Kaukázus között keresendő, de a legújabb kutatások szerint a

Balkánon és Észak-Afrikában is megmaradhatott. A Ligeti szőlő a jégkorszak után, 7-8 ezer évvel ezelőtt terjedt el, az ember hamar termesztésbe vonta, nemesíteni kezdte. Ennek eredményeképpen a leve egyre zamatosabb, édesebb lett, létrejött a kerti szőlő, a *Vitis vinifera*, amely lényegében a ma ismert borszőlők alapja (Hegedűs *et al.* 1966).
A *Muscadinia* alnemzetségbe három, Amerikában őshonos fajt sorolunk: *Muscadinia munsoniana*-t, a *Muscadinia popenoii*-t és a vizsgálataink során is fontos szerepet játszó *Muscadinia rotundifoliát.* Az *Euvitis* alnemzetségbe tartozó 70 faj a már említett három földrajzi fajtacsoport tagja (Németh, 1966).

A mai Magyarország területén a földtörténeti újkorból származnak az első szőlő növényre utaló maradványok, amelyet *Vitis tokayensis,* illetve *Vitis hungarica* néven ismerhetünk. Ezek az "ősszőlők" egyáltalán nem hasonlítottak a ma ismert lédús, zamatos, illatos borszőlőre. Valószínűleg kemény zöldbogyós, kesernyés, savanyú levű vad gyümölcsök lehettek (Zanathy, 2004).

Az észak-amerikai szőlőfajták, amelyek az eurázsiai és ázsiai társaikkal együtt az *Euvitis* alnemzetségből alakultak ki, a földrajzi elkülönülés miatt eltérő módon fejlődtek. A szőlőfajok mintegy ¼-ének van kisebb vagy nagyobb termesztési jelentősége. Kiemelkednek ezek közül:

- a *Vitis labrusca*, melyet Észak-Amerika keleti részén kiterjedten termesztenek. Ez a faj hasonlít a legjobban a *Vitis vinifera*ra, a legtöbb régi direkttermő fajta egyik szülőpartnere,
- a szintén észak–amerikai *Vitis riparia,* a *Vitis rupestris,* a *Vitis berlandieri*, jelentős szerepet játszottak a filxoérának ellenálló alanyok előállításában,
- a Eurázsiából származó *Vitis amurensis*, mely nagyfokú fagytűréssel rendelkezik,
- a *Vitis vinifera*, melynek ma közel 15000 fajtája ismert. A fontosabb *Vitis* fajok tulajdonságait a 2. táblázat foglalja össze.

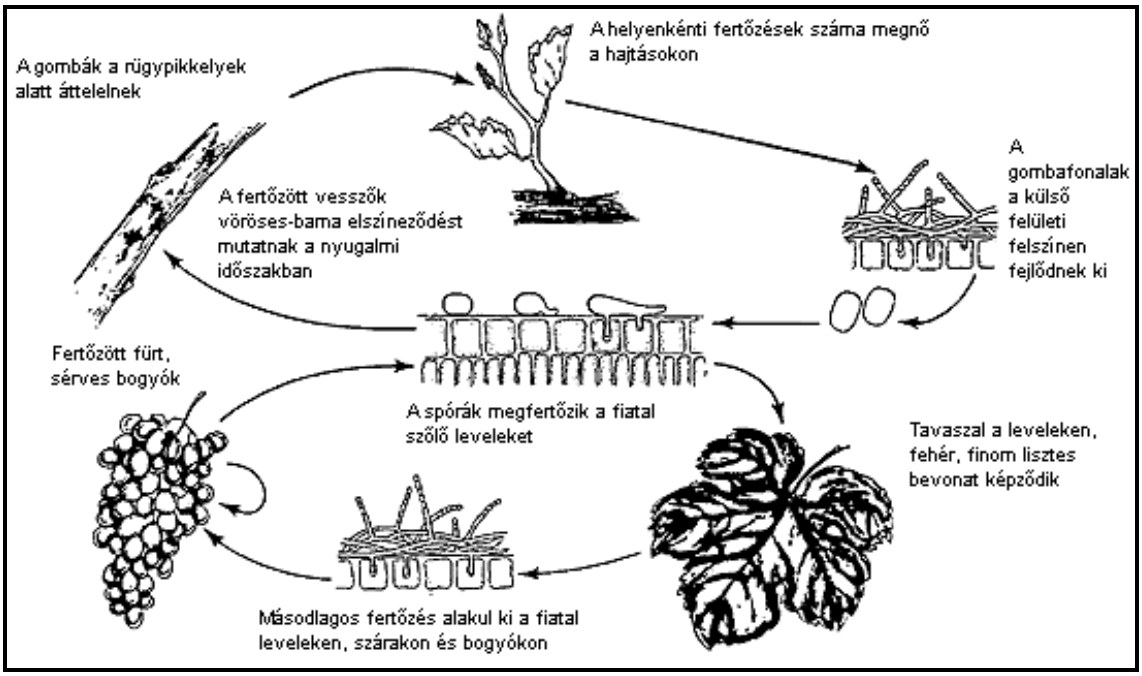
A filoxérával együtt támadó, szintén Amerikából „behurcolt” gombabetegségek, a peronoszpóra és lisztharmat elleni védekezés hívta életre a nemesítést, amely során a direkttermő és az európai *Vitis vinifera* fajták keresztezéséből hoztak létre új fajtákat. A cél a minőségi borszőlő előállítása volt, mindezt úgy, hogy a betegségekkel szembeni ellenálló képesség megmaradjon.

2. táblázat: A legfontosabb *Vitis* fajok tulajdonságai (Bényei *et al.* 1999).

Sor-szám	A szőlőfaj neve	Növeke-dési erély	Fürt-Nagyság	Bogyó			Ellenállóképesség			Gyökere-sedés	Termesztési jelentősége
				Nagysága	**Színe**	**Íze**	**Filoxéra**	**liszt-harmat**	**peronosz-póra**		
1.	*Muscadinia* nemzetség *Vitis rotundifolia*	Erős	Kicsi	Közepes vagy nagy	Bronzos vagy fekete	Kellemes pézsma-zamat	Teljes	Teljes	Teljes	Rossz	**Kb.30 fajtáját termesztik az USA délkeleti államaiban**
2.	*Euvitis* nemzetség *Vitis aestivalis*	Erős	Közepes	Közepes vagy nagy	Kék	Róka-zamat	Kicsi vagy közepes	Gyenge	Gyenge	Rossz	**Csak hibridjeit termesztik: pl. Norton, Herbemont, Jacquez, Delaware**
3.	*Vitis berlandieri*	Erős	Közepes/ nagy	Kicsi	Kék	Fanyar	Kiváló	Jó	Jó	Rossz	**A legelterjedtebb alanyfajták egyik szülője.**
4.	*Vitis candicans*	Nagyon erős	Kicsi	Nagy	Fekete	Róka-zamat	Közepes	Jó	Jó	Rossz	**Elsősorban alanyhibridek előállítására.**
5.	*Vitis cinerea*	Erős	Nagy	Kicsi	Fekete	Édes	Kiváló	Kiváló	Kiváló	Rossz	**Alany- és étkezési fajhibridek előállítására.**
6.	*Vitis cordifolia*	Erős	Közepes/ nagy	Kicsi	Fekete	Savas	Jó	Gyenge	Jó	Rossz	**Sok természetes fajhibridje van, és az alanyszőlő nemesítésben is felhasználják.**
7.	*Vitis labrusca*	Erős	Közepes	Közepes vagy nagy	Fehér és kék	Erős róka-zamat	Kicsi	Jó	Gyenge	Rossz	**Az USA-ban sok fajtáját termesztik: pl. Concord, Izabella, Canada, Early.**
8.	*Vitis riparia*	Erős	Kicsi	Kicsi	Fekete	-	Jó	Jó	Jó	Jó	**A legelterjetebb alanyfajták egyik szülője. Mintegy 60 fajtája ismert.**
9.	*Vitis rupestris*	Erős	Kicsi	Kicsi	Fekete	-	Közepes	Kiváló	Kiváló	Nagyon jó	**A *V. berlandieri* és a *V. riparia* mellett a harmadik észak-amerikai szőlőfaj, filoxéra megállításában kiemelkedő.**
10.	*Vitis amurensis* Kelet-ázsiai fajcsoport	Erős	Kicsi	Kicsi	Lilás kék	Savas	-	Jó	Jó	Jó	**Fagytűrése kiemelkedő**
11.	*Vitis silvestris* Eurázsiai fajcsoport	Erős	Kicsi	Kicsi	Kék/ fekete	Egyszerű	-	Közepes	Közepes	-	**Vadon nő Európa számos vidékén.**
12.	*Vitis vinifera*	Jó	Változatos	Változatos	Fehér, piros, kék	Aromás, édes	-	Gyenge	Gyenge	Jó	**Fajtáit 5 kontinensen termesztik (bor-, csemege-, és mazsolaszőlőként.**

2.2 A lisztharmat *(Erysiphe necator Schwein.)* biológiája

A betegséget először 1847-ben Angliában figyelték meg, majd hamarosan egész Európában elterjedt. A betegség tünetei a szőlő valamennyi zöld részén megfigyelhetőek. A gomba életciklusát a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A lisztharmat (*Erysiphe necator* Schwein.) életciklusa. Az ábrát R Sticht. készítette Pearson és Goheen munkája alapján (Compendium of Grape Diseases, 1988, American Phytopathological Society, St. Paul, MN. USA.).

A kórokozó ivaros alakja a kleisztotécium és ivartalan tenyészteste a hifaszövedékből álló micélium, életképesen átvészeli a leghidegebb telet is. A gomba bárhol be tud hatolni a zöld növényi részekbe, enzimjeivel feloldja a kutikulát és a belső szövetekben akadálytalanul növekszik. A fertőzés a rügypikkelyek alatt áttelelt gombafonalakból indul ki. Tavasszal a rügyekben áttelelő gomba fonál a hifa szinte együtt fejlődik a levéllel és a hajtással. A primer fertőződésű hajtások levelein felületi hifák hálóján nagy számban konídiumok képződnek és azok a szőlő valamennyi zöld növényi részét, így a virágot is fertőzhetik. A leveleken kezdetben kevésbé feltűnő sárgászöld foltok jelennek meg, majd a gomba fejlődésének előrehaladtával finom lisztes bevonat válik láthatóvá. Az enyhébb fertőzéskor a bogyók felülete hálózatosan parásodott rajzolatot mutat. Erős fertőzés esetén a levelek világoszöld színűvé válnak, majd megsárgulnak, végül elhalnak. A fertőzött virágok nem kötődnek, lehullanak, ezért ez a legnagyobb gazdasági kárt okozó tünet sok esetben rejtve marad.

Amennyiben a lisztharmatfertőzés nem pusztította el a virágokat, a kórokozó a fejlődő zöld bogyókat fertőzi. A gomba nem jut be a bogyó belsejébe csak a felületen telepszik meg, és tapadókorongok szívják ki a tápanyagot. A már kötődött bogyók fertőződésük esetén is tovább fejlődnek. A bogyón és a fürtkocsányon szürkésfehér, koszosnak, porosnak látszó, lisztharmatos bevonat, gombatelep van, a bőrszövet elparásodik, nem növekszik megfelelően, és a bogyó héja felreped, sérves lesz (Bauer, 1966). A sérves bogyón kilátszanak a magok, de a bogyó húsa nem barnul meg, zöld marad.

A levél színén jelennek meg az első tünetek, halvány sárgászöld elszíneződés formájában. Később finom, szürkésfehér bevonatot látunk, ez a gombafonalak, vagyis a hifák tömege a micélium, és azon fejlődő konídiumtartók, konídiumok (3. ábra). Később, nyár végén, a bevonaton apró pontok jelennek meg. A fertőzött levél asszimilációja csökken, megszárad, és korai levélhullás fokozza a kárt.

A 25-30 ^{0}C-os levegő hőmérséklet és az 50%-os relatív páratartalom az optimális a lisztharmat–gomba fejlődésének. A hosszantartó esők lemoshatják a levelek felületéről a gomba rárakódást. Az előző évi fertőzés tünete az egyéves vesszőn is jól felismerhető (Véghelyi**,** 2000). A gomba minden szőlőtermesztő körzetben megtalálható. A kártétel nagyságát elsősorban a fertőzés kezdetének időpontja, valamint az időjárási tényezők együttesen befolyásolják. Az egyik legbiztosabb védekezési mód a lisztharmat–toleráns fajták telepítése.

3. ábra: Lisztharmat fertőzési tünetek szőlőn A – B (Füzi, 2003) és C (Kozma Pál felvétele, 2005).

2.3 A peronoszpóra (*Plasmopara viticola* Berk. et Curtis ex de Bary Berl. et de Toni) biológiája

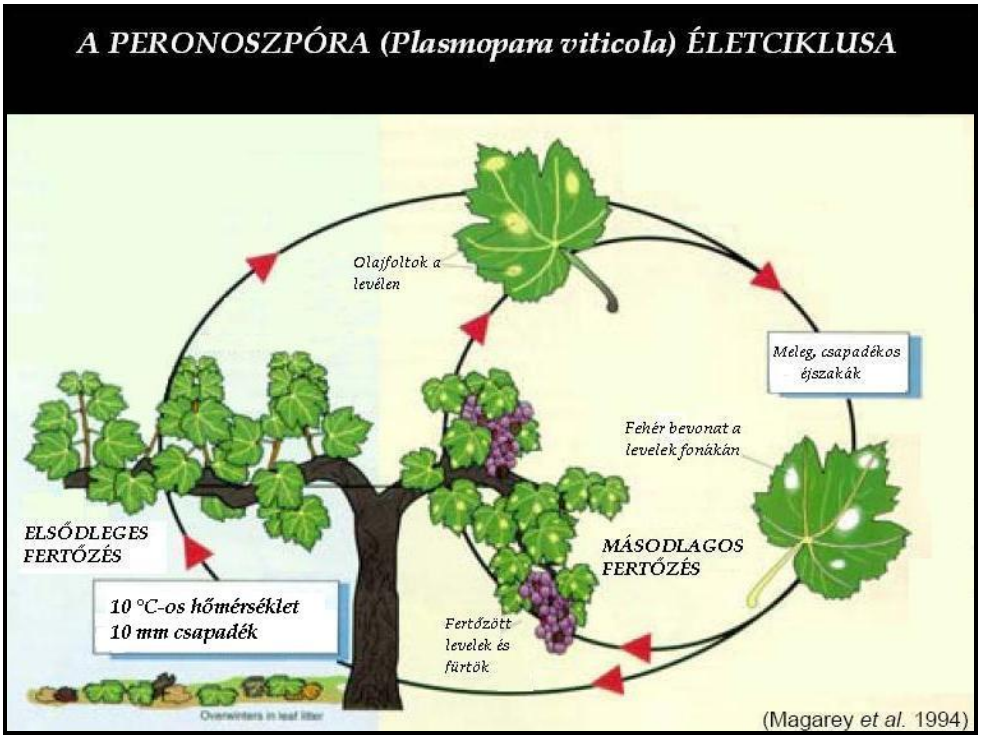
A peronoszpóra (*Plasmopara viticola* Berk. et Curtis ex de Bary Berl. et de Toni) az *Oomycetes* osztályába azon belül a *Peronosporales* rend *Peronosporaceae* családjába, a nem valódi gombákhoz tartozik. Egyike a legjelentősebb szőlőbetegséget okozó gombafajnak, mely az 1870-es években került be Észak-Amerikából Európába. Magyarországon 1880-ban kezdett elterjedni (Turcsányi, 1998). A peronoszpóra obligát parazita, mely táptalajon nem tenyészthető. A betegség önmagában véve akkora terméskiesést képes okozni, mint a többi kártevő együttesen. Az ellene való rendszeres védekezés nélkülözhetetlen, hiszen e nélkül nem biztonságos, gazdaságos a szőlőtermesztés. A kerti szőlő (*V. vinifera*) fogékony a peronoszpórára, az amerikai és ázsiai direkttermő fajok azonban kevésbé (2 táblázat).

Az elsődleges fertőzést az előző évről áttelelt spórák indítják el. A csírázáshoz állandó hőmérséklet (napi 12^0C feletti átlag) és csapadék (legalább 10 mm) szükséges. A másodlagos, vagyis a folyamatos fertőzéshez már 4 mm csapadék, sőt a bőséges harmatképződés is elegendő. A peronoszpóra tünetei közül a legszembetűnőbb az olajfolt megjelenése a levélen. Ennek továbbterjedése az időjárási viszonyoktól függ. A csírázás és az olajfolt megjelenése között azonban úgynevezett lappangási idő telik el. Ennek hossza szintén az időjárás függvénye. Ha az időjárási viszonyok nem kedveznek a peronoszpórának, akkor nem tud továbbfejlődni. Az olajfolt kiszárad és nem képes a következő fejlődési szakaszba lépni (Folk, 1993).

A kórokozó biotróf, tehát csak az élő szervezetből képes táplálkozni, csíratömlőt hajt, a növényeket a sztómákon át fertőzi meg, majd a sejtközötti járatokban terjed, a sejtekbe hausztóriumot bocsát. A hausztórium a gombák tápanyagfelvételre szakosodott, a gazdanövény sejtjébe benyúló szerve.

A lehullott leveleken oospórákkal telel át. Megfelelő hőmérséklet és csapadék esetén kicsírázik, makrosporangium képződik, amelyből kialakulnak a zoospórák, majd kirajzanak és a légzőnyílásokon keresztül fertőzik meg a leveleket, a virágokat, a fürtöt és a hajtásokat is megtámadja (Gobbin *et al*. 2005).

Az ivartalan szaporodási ciklus kedvező körülmények között nagyon gyors, akár 4 nap is lehet (Vercesi *et al*. 1999). A peronoszpóra képes ivaros úton is spórákat képezni (4. ábra).



4. ábra: A peronoszpóra életciklusa (Magarey *et al.* 1994).

5. ábra: Peronoszpórafertőzés szőlőlevélen (Kozma Pál felvétele, 2005).

2.4 Az *Euvitis* és a *Muscadinia* nemzetség fajainak ellenállóképessége lisztharmattal és peronoszpórával szemben

Az *Euvitis* nemzetségbe tartozó *V. vinifera* faj legtöbb fajtája fogékony a lisztharmattal és peronoszpórával szemben. Különbségek találhatók azonban a fogékonyság tekintetében.

Az észak-amerikai kontinens gazdag azokban a *Vitis* fajokban, melyek nagy ellenálló képeséggel rendelkeznek a lisztharmattal, peronoszópórával és a filoxérával (*Dactulospharia vitifoliae* Fitch.) szemben. Számos faj használható rezisztenciaforrásként, mivel alkalmazkodtak a szőlőt károsító kórokozókhoz és kártevőkhöz. A legfontosabb *Vitis* fajok listáját, illetve a termesztési jelentőségüket a 2. táblázat tartalmazza.

A *V. riparia,* a *V. rupestris, V. berlandieri* és a *V. cineres* nagyfokú ellenállóképességgel rendelkeznek a filoxéra-, a lisztharmat- és a peronoszpórafertőzéssel szemben.

A jelenleg ismert, megközelítőleg 80 *Vitis* faj fele származik az ázsiai kontinensről. A fajok közül némelyek ellenállóak a fertőző betegségekkel szemben. A *V. amurensis,* mely Kelet-Ázsiából, az Amur folyó völgyéből, Mandzsúriából származik, ellenáll a peronoszpóra és lisztharmat kórokozóknak (Korbuly, 2002).

A *Muscadinia* vagy *Vitis rotundifolia,* a *V. munsoniana* és a *V. popenoii* az Amerikai Egyesült Államok déli, szubtrópusi és trópusi tájain él, Delaware, Florida, Texas és Dél-Georgia területén (Small, 1913, Bouquet, 1980). Termesztési jelentősége kizárólag a *M. rotundifolia*nak van. Közel 200 éve (XVII. századtól) fogyasztják gyümölcsét és bort is készítenek belőle (Bényei *et al.* 1999). Az *M. rotundifolia* a filoxérával, lisztharmattal és peronoszpórával szemben is ellenállóképességgel rendelkezik, ez adja legnagyobb értékét (Olmo, 1986).

Az észak-amerikai kontinensről, valamint Ázsiából származó fajok alkalmazkodtak a változatos környezeti viszonyokhoz, és az adott területen őshonos, a szőlőt károsító kórokozókhoz. Így közülük számos faj felhasználható rezisztencia-forrásként (lisztharmat, peronoszpóra és filoxéra) a nemesítési programokban.

2.4.1 Ellenálló fajták nemesítése

A XIX. század második felében Európa szőlőültetvényein a filoxéra mellett megjelent a peronoszpóra és a lisztharmat, így szükségessé vált a rezisztens szőlőfajták keresése és telepítése. Azok a fajták kerültek veszélybe, melyek védtelenek voltak a kórokozókkal (*Erysiphe necator* Schwein. és *Plasmopara viticola* Berk. et Curtis) szemben. Gyakorlatilag ez az Európában termesztett összes szőlőfajtát jelentette.

A lisztharmat megbetegedés leírása 1845-1878 közé tehető, amely egybeesik az első tömeges megjelenéssel (Olmo, 1986; Alleweldt és Possingham, 1988).

A rezisztencianemesítés is ebben a században kezdődött. A nemesítők felfedezték mind az ázsiai, mind pedig az észak-amerikai kontinensen, azokat a *Vitis* fajokat, melyek nagyfokú ellenállóképességgel rendelkeztek. A nemesítési programba való bevonásuk törvényszerű volt.

A modern szőlőtermesztés még mindig nagymértékben támaszkodik a kémiai gombaölőszerekre a betegség folyamatos kontrollja miatt, azonban a védekezés e formája igen költséges és környezetkárosító. A vegetáció során többször alkalmazott permetezések miatt a kórokozók egyes törzsei ellenállóvá váltak a fungicidekre (Erickson és Wilcox, 1997). Ezek a problémák vezettek ahhoz, hogy olyan szőlőfajtákat nemesítsenek, melyek fokozottan ellenállnak a lisztharmat és – peronoszpóra fertőzésnek, valamint olyan kutatások alapjául szolgálnak, melyekben a rezisztencia gének a minőségi szőlőfajtákba beépíthetővé válnak.

A *Muscadinia* alnemzetségbe tartozó *M. rotundifolia* előnyös genetikai anyagának átvitele a *V. vinifera* fajba már a XIX. században megkezdődött, azonban a kezdeti próbálkozások nem vezettek sikerre az F_1 populáció sterilitása miatt (Wylie, 1871, Detjen, 1919). Az áttörés 1968-ban következett be, Olmo és Jelenkovic munkája eredményeképpen (Jelenkovic és Olmo, 1968). A nemesítési és a kutatómunkát Bouquet vitte tovább, akinek 1974-ben indított nemesítési programja több visszakeresztezett BC_4 és BC_5 nemzedéket eredményezett (Bouquet, 1980, Pauquet *et al.* 2001), köztük a VRH 3082-1-42-t, amely az ebben a dolgozatban elemzett két hibridcsalád rezisztens szülője is volt (9. ábra).

A *V. riparia*, a *V. rupestris* és a *V. berlandieri* a filoxéra fertőzés megállításában kiemelkedő szerepet játszott az európai kontinensen. A kiváló genetikai anyaguk felhasználásával filoxérának ellenálló alanyok előállítását tették lehetővé. A *V. cinerea* és a *V. monticola*-t is felhasználták az ellenálló alanyfajták kialakításában, azonban jelentőségük kisebb volt (Galet, 1988).

A lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia-nemesítésben a *V. riparia,* a *V. rupestris,* a *V. berlandieri, V. labrusca, V. cinerea, V. lincecumii, a V. aestivalis* fajokat keresztezték egymás között, valamint *V. vinifera* fajtákkal.

A *V. amurensis* is nagyon értékes rezisztenciagén-forrás. Nagyfokú fagyállósága miatt vonták be a nemesítésbe, hiszen bírja a –40°C-ot is. A nemesítési munkák során azonban kiderült, hogy fagyállósága mellett peronoszpóra és lisztharmat rezisztenciával is rendelkezik (Koleda, 1974; Korbuly, 1999).

Az 1960-as évekig nem azonosították a *V. vinifera* eredetű gombabetegségekkel fajtákat, így nemesítői törekvés volt, hogy fajok közötti, interspecifikus hibridekben egyesítsék a szőlőfajok kedvező tulajdonságait, vagyis a *V. vinifera* jó minőségét a vad *Vitis* fajok gombabetegségekkel szembeni rezisztenciájával.

Az első ilyen irányú keresztezések eredményei a direkttermő fajták. Ez az elnevezés arra utal, hogy az ilyen szőlőalany oltás nélkül, tehát közvetlenül telepíthető. A korabeli amerikai nemesítők a XIX. század elején amerikai szőlőfajokat használták fel. A Herbemont alapvetően a *V. aestivalis* termesztésbe vont fajtája. A Concord és az Izabella a *V. labrusca* fajhoz sorolható (Gadoury *et al.* 2001). A Jacquez a *V. aestivalis,* a *V. cinerea* és a *V. vinifera* keresztezéséből vezethető le. A Taylor a *V. riparia, V. labrusca* és *V. monticola* hibridje, a Noah szőlőfajta, pedig a Taylor magonca. A Clinton *V. riparia* és *V. labrusca* hibrid, az Othello pedig a Clinton és egy *V. vinifera*, a Trollingi keresztezéséből származik. A Piros Delaware a *V. labrusca,* a *V. aestivalis* és a *V. vinifera* természetes hibridje, a Fehér Delaware ennek magonca (Csepregi és Zilai, 1988). A direkttermők esetében az ellenállóképesség és a minőség negatív korrelációban áll egymással. Ennek ellenére a korabeli gyűjtők erős növekedésük és tetszetős lombozatuk miatt számos direkttermőt hoztak be Európába. E szállítmányokkal érkezhetett a lisztharmat, a filoxéra és a peronoszpóra a kontinensre.

A XIX. század utolsó harmadáig a magyar borvidékek túlnyomó részén kártevőknek a méheket és darazsakat, valamint a madarakat, elsősorban a seregélyeket tartották. A mindezek által okozott károk eltörpülnek azonban a XIX. század végén elterjedt két veszedelmes szőlőbetegség és a filoxéra hatásával szemben.

Leo Laliman francia szőlőbirtokos Touratte-ban, Bordeaux mellett olyan ültetvényt hozott létre, mely a nagy európai és amerikai szőlőfajtákat egyaránt tartalmazta. Az ő nevéhez fűződik a filoxera behurcolása az európai kontinensre.

Ezt követően ő volt az, aki először hívta fel a szőlőművelők figyelmét arra a körülményre, hogy a filoxéra az amerikai szőlőket nem képes úgy megtámadni, mint az európai fajtákat.

Megfigyelte, hogy amikor a filoxéra az európai szőlőket kipusztította, az amerikai fajták még életképesek voltak, és termést hoztak (Schaeffer, 1969).

1869-ban a francia mezőgazdák által Beaune-ban tartott értekezleten Laliman bejelentette ezt a felismerését, azonban mindezt nagy közöny fogadta. 1873-ban a Hérault Département gazdasági egyesülete a francia kormány támogatásával Jules-Emile Planchon tanárt Amerikába küldte, hogy tanulmányozza az amerikai szőlők ellenállóképességét. Laliman korábbi kijelentése igaznak bizonyult, melyet hazatérve Planchon is igazolt.
Planchon megfigyeléseit Charles Valentine Riley amerikai rovarszakértő is megerősítette (Smith, 2005). Ennek hatására a montpellieri gazdasági tanintézetben az amerikai szőlők szaporítására és tanulmányozására 4 hektár nagyságú telepet rendeztek be. Ez a telep volt a bázisa a francia szőlőtermelők filoxéra ellen folytatott küzdelmének.
Az Európában körülbelül 1500 fajtában, illetve változatban művelt szőlő mind egyetlen fajhoz a *V. vinifera*-hoz tartozik, addig Amerikában több, jellegzetes tiszta faj található (2. táblázat).

A filoxérát Magyarországon 1875-ben észlelték először Pancsován, majd körülbelül húsz év alatt végigpusztította az ország történelmi borvidékeit. Az összes kötött talajra telepített szőlő elpusztult (3850 km^2) (Anonymus, 2006). A peronoszpóra és a lisztharmat 1884-ben lépett fel először Magyarországon. 1891-ben olyan elemi erővel támadta meg a szőlőket, hogy az évi termésnek több mint a fele elpusztult. Az 1890-es évek vége felé szükségessé vált az évi kétszeri permetezés.

Az európai, főként francia szőlészek, Oberlin, Couderc, Castel, Seibel, Baco, Malegue és Kühlmann, igen nagy számban állították elő az amerikai és eurázsiai fajták komplex hibridjeit, melyek a nemesítő neve és kódszáma alapján váltak ismertté. A két világháború között a nemesítőmunka felgyorsult és további termőhibridek jöttek létre. A legnagyobb ismertséget a Seyve-Villard fajták, az 5276 (Seyval blanc) a 12286, a 12375 (Villard blanc) és a 18315 (Villard noir) érték el (Zanathy, 2004).

A behurcolt kártevőkkel szembeni küzdelemben a magyar tudósok is kivették a részüket. Teleki Zsigmond alanyfajtái ma is elterjedtek a világon. A peronoszpóra és a lisztharmat biológiájának világszerte elismert kutatója Istvánffy Gyula és Pálinkás Gyula (1880) (Istvánffi, 1908 és 1912).

Az ellenálló fajták közül több is ismertté vált Magyarországon, mint a Százszoros, a Baco, az Aurora, a Feri szőlő, a Pannonhalmi kék, de a legismertebb ellenálló fajta a Villard blanc (Seyve-Villard 12375) lett. Az interspecifikus fajták nemesítését Csizmadia, Bereznai és Kozma kezdték el a Seyve-Villard hibridek felhasználásával. Ezek a szőlőfajták a következők: a Bianca (Seyve-Villard 12375 x Bouvier), a Medina (Seyve-Villard 12286 x

Kékmedoc), a Zalagyöngye (Seyve-Villard 12375 x Csabagyöngye) és a Lakhegyi mézes (Seyve-Villard 12375 x Mézes fehér) (Zanathy, 2004).

Egerben nemesítették a Zalagyöngyét (államilag elismerés 1970-ben), Biancát (1982), Medinát (1984), Nero (1993), valamint további fajtákat, az Áront, a Suzyt, a Rität (Göcseji zamatos), a Lakhegyi mézest, a Vértes csillagát, a Viktort (EB 10) és az Alettát (ECS 18). Az egri nemesítés eredményeire támaszkodva Szegedi és munkatárasai további interspecifikus keresztezéseket végeztek Kecskemét, Katonatelepen. Kecskeméten (SZBKI) nemesített államilag elismert fajták a Pölöskei muskotály (1979) és a Teréz (1995). A Kertészeti Egyetemen előállított szőlőfajták a Viktória gyöngye (1995), a Duna gyöngye (1995), a Csillám (1997), a Palatina (1996) (Hajdu, 2003). Néhány termesztett szőlőfajta (*V. vinifera* és interspecifikus eredetű) lisztharmattal szembeni érzékenységét a 2. táblázat tartalmazza.

A fajok közötti keresztezésből származó hibridek elvileg egyenértékűek a *V. vinifera* fajtákkal, melyről az O.I.V. XVI. Kongresszusán, Stuttgartban született határozat. Azóta nevezzük általánosan a fajhibrideket rezisztens fajtáknak. Mindezek ellenére már az Európai Unió 2003 előtti borjoga is előírta, hogy minőségi bor készítéséhez csak *V. vinifera* fajhoz sorolható fajták használhatóak fel. Az EU új borpiaci rendtartásának kialakítása céljából független tanulmányt készítetett a fajhibridekről. A vizsgálat a Villard blanc, a Seyval blanc, a Bianca, a Zalagyöngye, a Medina, a Regent, a Villard noir és a Couderc noir fajtákra terjedt ki. Az Európai Bizottság e tanulmány eredményeire támaszkodva fenntartja a korábbi korlátozását, mely szerint a hibridek a *V. vinifera* fajtákénál rosszabb minőségű bort adnak (Szilágyi, 2008).

A **3. táblázat** tartalmazza a termesztett szőlőfajták besorolását a lisztharmattal szembeni fogékonyságuk szintjének megfelelően.

3. táblázat: A termesztett szőlőfajták besorolása a lisztharmattal szembeni fogékonyságuk szintjének megfelelően (www.agf.gov.bc.ca).

Fogékony	Közepesen érzékeny	Kevésbé érzékeny
Bacchus	Chelois	Auxerrois
Cabernet franc	Chenin blanc	Melon
Cabernet sauvignon	Concord	Villard blanc
Chancellor	Foch	Százszoros
Chardonnay	Pinot blanc	Bianca
Chasselas	Pinot gris	Zalagyöngye
Gamay	Malbec	Medina
Gewurztraminer	Merlot	Lakhegyi mézes
Grenache	Ortega	Pölöskei muskotály
Himrod	Pinot noir	Teréz
Madeleine angevine	Perlett	Viktória gyönyge
Madeleine Sylvaner	Sheridan	Duna gyöngye
Malbec	Vidal blanc	Csillám
Muller Thurgau	Weissburgunder	Palatina
Pearl of Csaba		Pannonhalmi kék
Petit Verdot		
Rkatzeteli		
Riesling		
Sauvignon blanc		
Schonburger		
Siegerebe		
Syrah		
Viognier		
Mézes fehér		
Csabagyöngye		
Kékmedoc		
Sárga muskotály		
Furmint		
Kövérszőlő		
Hárslevelű		

1960-as évek elején a francia szőlőültetvények több mint 30%-án használtak rezisztens fajtákat. Ezekben a fajtákban az észak-amerikai *Vitis* fajokat (2n=38) használták rezisztenciagén forrásként.

Az amerikaiakon kívül ázsiai fajokat is próbáltak a keresztezéseknél felhasználni. Ezek fagytűrő képességükkel emelkedtek ki, önmagukban azonban rossz minőségű bort adtak. Leghíresebb a *V. amurensis* volt, aminek a *V. vinifera*-val történő keresztezéséből jött létre többek között az ismert Kunleány és a Kunbarát fajta is.

A *M. rotundifolia* kiemelkedően fontos nemesítési alapanyag, mivel nemcsak a legfontosabb gombabetegségekkel, hanem egyes baktériumokkal, filoxérával és fonálférgekkel szemben is immunis, illetve nagyfokú rezisztenciával rendelkezik, melyek dominánsan, oligogénikusan (2-3 géntől függően) öröklődnek. Mind a lisztharmat (Bouquet 1986), mind pedig a peronoszpóra (Staudt és Kassemeyer, 1995) elleni nemesítési programokba bevonták (Kozma és Dula, 2003; Merdingolu *et al.* 2003).

Az PTE Szőlészeti és Borászati Intézete (Pécs) nemesítési programjába a különböző forrásokból származó gomba rezisztenciagének kombinálásában úttörő munkát végzett.

2.5 Az immunitás, illetve a védekezési mechanizmusok az élővilágban

A védekezési mechanizmusok vizsgálatakor fel kell tennünk azt a kérdést, mely hogy tulajdonképpen mi is az immunrendszer feladata. Erre a kérdésre a választ Frank MacFarlane Burnet és Peter Medawar fogalmazták meg, mely szerint az immunrendszer alapfunkciója a különbségtétel a saját és a nem saját között. Munkájukat 1960-ban Nobel-díjjal jutalmazták (Petrányi és Gyódi, 2005).

Minden élőlény különböző túlélési stratégiával rendelkezik, melynek segítségével védekezhet a különböző betegségekkel szemben. Ezekre a betegségekre csak akkor figyelünk fel, mikor azok már járványméretűvé duzzadnak.

A mikróbák és a kórokozók nagy többsége a növényi, az állati és az emberi szervezet számára teljesen ártalmatlan. Másik részük a különböző élőlényekre specializálódott kórokozó. Az élő szervezetek aktívan védekeznek velük szemben. A törzsfejlődés során először a védekezési mechanizmus egy természetes vagy más néven általános módja alakult ki, mellyel mind az alacsonyabb, mind pedig a magasabb rendű élőlények rendelkeznek. Mivel ennek kialakulása jóval korábbra tehető, ez lehet a védekezés ősi formája, mely jóval

korábban jelent meg az adaptív immunválasznál. Az adaptív válasz mintegy ráépül erre a védekezési formára, felhasználva annak elemeit.

A védekezés módja függ az adott élőlény fejlettségi szintjétől, valamint a kórokozó típusától is. A szaprofitonokkal szemben a természetes védekezés megfelelő védelmet nyújt, hiszen ebben az esetben a növényeknél nem tapasztalunk semmilyen tünetet, a fertőzést követően. A növényi szervezet leküzdi a kórokozót úgy, hogy gyakorlatilag nem kapunk információt magáról a fertőzésről. A patogénekkel szemben az általános rezisztencia már nem nyújt kellő védelmet. Itt már a védekezési rendszer egy fejlettebb formája alakult ki. A mikroorganizmusok ellen a magasabbrendű élőlények egy elsődleges védőpajzzsal, a bőrszövetükkel (növény–epidermisz; állat-hámszövet) védekeznek. A gombák okozta megbetegedésekkor már a hámszövet által biztosított védelem sem elegendő, hiszen még a viaszos növényi epidermiszt is képesek egyes gombafajok sikeresen áttörni (Szatmári és Klement, 2003).

A XX. század kezdetén az immunológusok egyértelműen azt a nézetet képviselték, hogy a növények nem rendelkeznek a gerincesekhez hasonló immunvédekező mechanizmusokkal. Ahhoz, hogy ezt igazolni vagy cáfolni tudjuk, számba kell vennünk a növényi és az állati védekezés különböző formáit és esetleges kapcsolatukat.

Mind a növényi mind pedig az állati védekezési rendszerre jellemző, hogy képes a sajátot az idegentől megkülönböztetni, majd ezt követően az adott kórokozót hatástalanítani. Ha a felismerés elmarad, vagy csak később következik be, a fertőzés kialakul. A növények, az állati immunrendszerhez hasonlóan kétféle védekezési rendszerrel rendelkeznek: (1) általános vagy nem–specifikus, valamint (2) a kórokozóra specifikus (hiperszenzitív) rezisztenciával (HR) (Klement *et al.* 2003). A növényi–és az állati nem–specifikus védekezés hasonlóságait és különbségeit a 6. ábra mutatja.

6. ábra: Az állati és növényi védekezés közös és eltérő tulajdonságai (Klement *et al.* 2003).

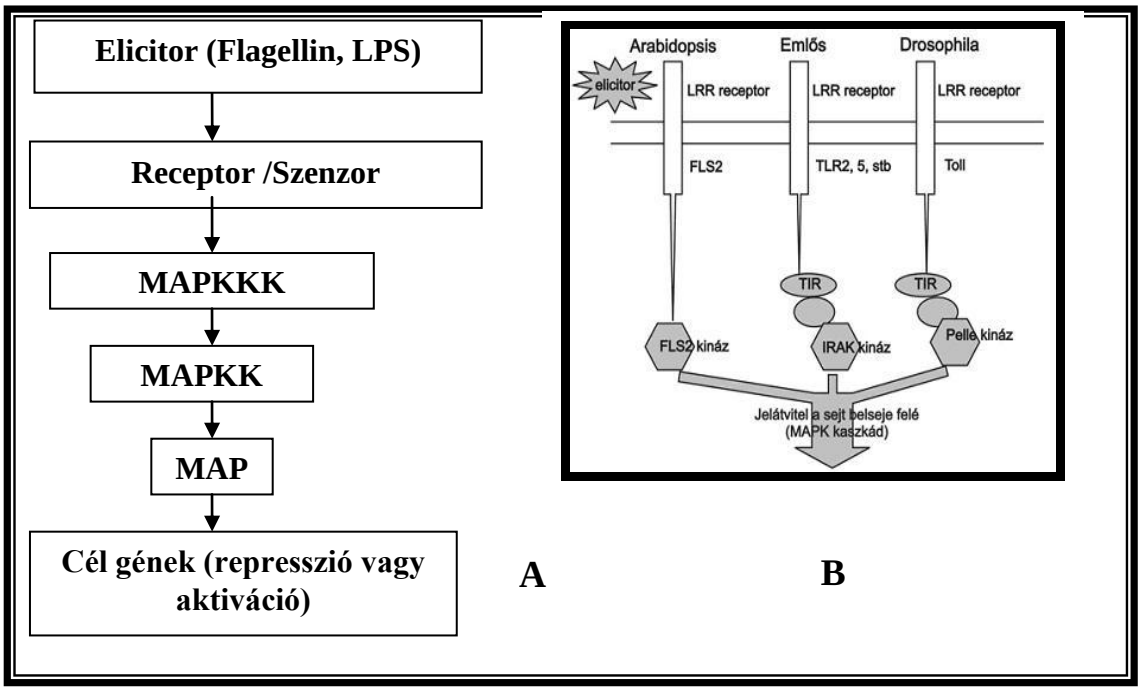
A növények nem rendelkeznek humorális immunitással, minden sejt lokálisan maga védekezik, legyen szó általános vagy specifikus védekezésről. Az állati szervezetben a védekezésre specializálódott sejtek (makrofágok, limfociták, granulociták és az ölősejtek) a különböző szervekben-szövetekben (csontvelő, csecsemőmirigy, és nyirokcsomó) alakulnak ki, majd a vér és a nyirokrendszer segítségével jutnak el a fertőzés helyére (Klement *et al.* 2003).

Az általános vagy természetes védekezés mind a növényi–mind az állati sejtekben szinte láthatatlanul zajlik le, azonban a védekezés menete sok hasonlóságot mutat. Ahhoz, hogy a fizikai–és kémiai védekező mechanizmus aktiválódjon, a támadó patogéneket a sejteknek fel kell ismerniük. A kórokozók felszínén úgynevezett nem specifikus felületi elemek találhatóak. Számos felületi molekulát írtak le, azonban az egyik legismertebb az LPS-fehérje komplex (lipopoliszacharid), mely a baktérium sejtfalat alkotja. A kutatások eredményei sokáig csak az LPS-re korlátozódtak, mint az egyetlen olyan elicitor molekulára, mely mind a három szervezetben (növény-*Arabidopsis,* rovar–*Drosophila* és emlős) megfelelő jelet szolgáltat az idegen szervezet felismerésére. A baktériumcsilló monomerje, a flagellin jelenlétét és homológiáját mind az emlős, mind a rovarkutatásban igazolták. A növénybiológusok érdeklődését azonban akkor keltette fel, amikor bebizonyosodott, hogy a flagellin, védekezésre utaló választ vált ki az *Arabidopsis*ban (Felix *et al.* 1999). A flagellin (FLS2) és az LPS ideális elicitornak bizonyultak, és képesek mindhárom szervezet védekezési mechanizmusának beindítására. A sejtek, mint idegen anyagot, a felszíni receptoraik

segítségével felismerik. A mikroorganizmusok felületén megtalálható elicitorok közös néven a PAMP-k (Pathogen Associated Molecular Patterns).

A kórokozók a rájuk jellemző molekuláris mintázattal rendelkeznek, melyeket a növényi–és az állati sejtek membránján megtalálható receptorok felismernek (PRR-Pattern Recognition Receptors). A kutatások kezdeti szakaszában a *Drosophila melanogaster* jelfelismerő rendszerét vizsgálták, mely során azonosították a receptort kódoló Toll–gént. A vizsgálatokat mindhárom szervezetre kiterjesztették, majd igazolták, hogy a TLR (Toll–like receptors) receptorok homológjai valamennyi soksejtű szervezetben megtalálhatóak (Aderem és Ultevitch, 2000). A TLR receptorok két alegységből tevődnek össze. Az LRR (Leucine Rich Repeat), a leucinban gazdag ismétlődések a sejtek felszínén találhatóak, míg az intracelluláris rész különböző kinázokból tevődik össze (Rehli, 2002; Jones *et al.* 2006; Bent és Mackey, 2007). A sejtek felszínén található receptorok az idegen mikroorganizmus jelenlétéről üzenetet küldenek a sejtmag felé. A sejten belüli jelátvitel a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) kaszkád rendszerén keresztül megy végbe. A kaszkád egymást foszforiláló kinázokból áll, melyek receptor jelzésre aktiválódnak (Chang *et al.* 2001). A folyamatot a 7/A. ábra szemlélteti.

Az MAPK kaszkádok, valamint az általuk szabályozott jelátviteli útvonalak evolúciósan konzerválódott modulok. Közvetlen kapcsolatot hoznak létre az elicitorok valamint a cél gének között. A növénybiológiai kutatások több növényfajra terjedtek ki, a *Nicotiana tabacum* valamint az *Arabidopsis thaliana* esetében sikerült a teljes MAPK kaszkád jelátviteli útjának a leírása. A teljes útvonal feltérképezése a rovarok közül a *Drosophila*ban történt meg (Asai, 2002). A 7/B. ábra szemlélteti a jelátviteli utak közötti hasonlóságot a három szervezet között (növény, rovar és emlős).



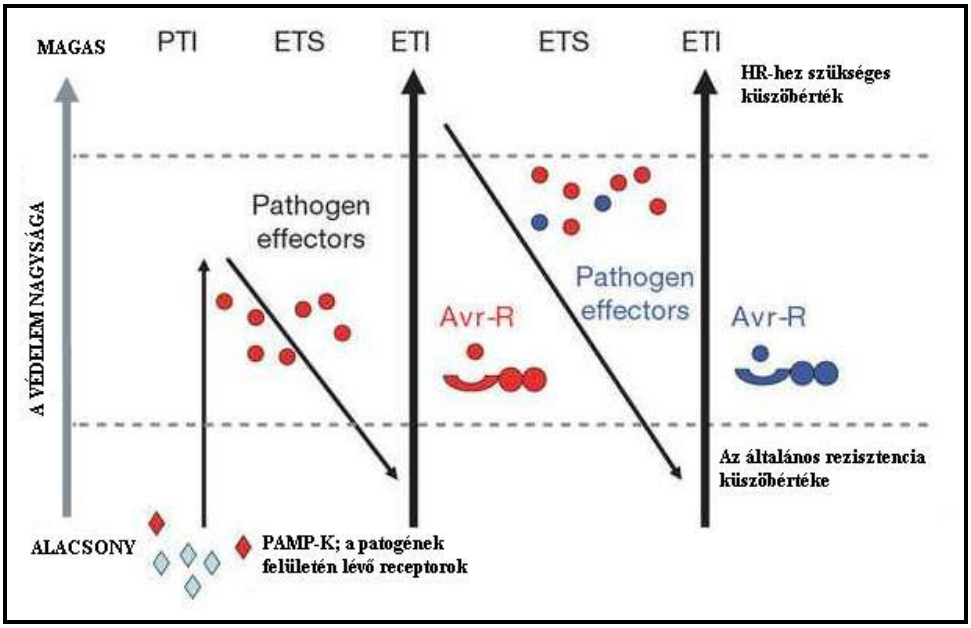
7/A. ábra: Az MAPK kaszkád jelátviteli diagramja (Tena *et al.* 2001)
7/B. ábra: Érzékelés és jelátvitel modellje *Arabidopsis*, emlős és *Drosophila* veleszületett immunrendszerében (Asai, 2002 nyomán)

Az általános vagy más néven nem-specifikus immunreakciók mellett létezik a specifikus, csak egyetlen vagy néhány patogéntörzzsel szemben ható ellenállóképesség és a szisztematikusan érvényesülő szerzett rezisztencia is (Király *et al.* 1997). A szervezetek között azonban több közös vonást fedezhetünk fel, de specifikus védekezési útvonalak már jelentősen eltérnek egymástól.

A növényi szervezetek specifikus védekezési mechanizmusa a hiperszenzitív rezisztencia (HR), míg a gerincesek adaptív immunválasszal védekeznek bizonyos kórokozókkal szemben.

A növények hiperszenzitív válaszát (HR) a fertőzés helyén bekövetkező gyors, lokalizált sejthalál jellemzi (nekrózis). Ezáltal a kórokozó szaporodása akadályozottá válik. A jelenséget a pázsitfüvek rozsdabetegségének tanulmányozása során először H.M. Ward írta le 1902-ben (Ward, 1902). A reakció sajátossága, hogy rasszspecifikus, tehát bizonyos fajták rezisztenciáját jelenti, bizonyos patogén rasszokkal szemben. A rezisztencia abban az esetben valósul meg, ha a fajta rendelkezik az adott rasszra specifikus R rezisztencia génnel, valamint az adott gén kapcsolatba kerül a kórokozó Avr (avirulencia) génjével. A folyamat során tehát a növény és a kórokozó géntermékei lépnek egymással kapcsolatba. A jelenséget 1971-ben Flor „gene for gene hypothesis”-ként jellemezte (Flor, 1971; Yu *et al.* 1998).

A 8. ábra foglalja össze a növényi immunrendszer védekező mechanizmusát, valamint a hiperszenzitív válasz és az általános rezisztencia küszöbértékéhez szükséges védelem nagyságát, a négy fázisból álló „cipzár modell” segítségével (Jones *et al.* 2006).



8. ábra: A növényi immunrendszer négy-fázisos „cipzár modellje”
(Jones *et al.* 2006)

Az első és a második fázisban a patogén vagy kórokozó felületén lévő PAMP / MAMP-k, valamint a növényi sejtek felületén lévő elicitorok kapcsolatba lépnek egymással. A minimális kolonizációt követően (ETS), a növény immunrendszere legyőzi a kórokozót. Ezt patogén által indukált immunitásnak (PTI) nevezzük.

A harmadik fázisban a gazdanövények specifikus rezisztenciagénjeinek (*R*-gének) termékei kapcsolatba lépnek a kórokozók specifikus avirulencia-génjeinek (*Avr*-gének) termékeivel. A növény rezisztenciagénjének terméke ismeri fel a patogén avirulencia génjének termékét. Ekkor vagy közvetlenül a fehérjetermékhez, vagy egy enzim által katalizált reakcióban létrejövő termékhez kapcsolódik. Amint a felismerés megtörténik, a védekezési folyamatok beindulnak. Ezt a legtöbb esetben a hiperszenzitív reakció (HR) jelzi. A folyamat eredményeképpen a fertőzés nem képes tovább terjedni (ETI). A hiperszenzitív reakció tehát a rezisztens növény–kórokozó kapcsolatot, azonban természetes körülmények között a folyamat szabad szemmel nem látható, mivel csak a betolakodóval közvetlenül érintkező sejtek válaszolnak HR-rel, és ezek száma igen kevés.

A negyedik fázisban olyan új patogén effektorok jelennek meg (kék színnel jelölve a 8. ábrán), melyekre a növény a harmadik fázisban említett módon, közvetlenül hiperszenzitív reakcióval válaszol.

A gerincesek esetében a specifikus immunválaszt az antigént felismerő T- és B–limfociták biztosítják. A limfociták génjei a védekező reakció során képesek szomatikus átrendeződésre, melynek segítségével végtelen számú kórokozó felismerése válik lehetővé az állati szervezet számára.

A növényi R-gének specifikussága a limfociták sokféleségére emlékeztet. A rezisztencia gének gyakran klaszterekben, egymáshoz közel helyezkednek el. Ezáltal lehetőség nyílik a hasonló gének közötti rekombinációra, új öröklődő variációk, új típusú rezisztencia létrejöttének kialakulására (Boller és Keen, 1999). A növények nem rendelkeznek memóriasejtekkel, azonban egy új kórokozó megjelenésekor válaszként új specifikus *R* gének jönnek létre, melyek nemzedékről nemzedékre öröklődnek.

A védekező rendszerek az evolúció során a patogének mutációjához olyan receptorok megőrzésével alkalmazkodtak, melyek a kórokozóknak a magasabb rendű eukariótákban nem található konzervatív motívumait ismerik fel, és olyan jelátvivő molekulák is konzerválódtak, amelyek kölcsönhatása az immunvédekezés aktiválódását eredményezi. Ez a magyarázata annak, hogy az élővilágban az evolúció során megőrzött, hasonló elemeket tartalmazó védekező rendszereket találhatunk.

2.6 A markerek csoportosítása

A növénynemesítésben a genetikai markerek alkalmazásának igénye és lehetősége már a XX. század elején felmerült. Sax 1923-ban a bab maghéj színének öröklődése alapján termésméretre szelektált, Chase (1952) spontán haploidok kiválogatására antocián marker gént használt (Kiss, 2005).

A genetikai marker a felismerhető fenotípust, vagy tulajdonságot meghatározó gén. A markerek közül a morfológiai és biokémiai markerek tartoznak ide. A molekuláris markereken ma DNS markereket, szekvencia-variációkat értünk, amelyeket a legtöbb esetben PCR-technikával mutatunk ki.

A növényi szervek, magok egyes morfológiai bélyegei közvetlenül alkalmazhatók genetikai markerként.

A morfológiai bélyegek szülők és az utódok megkülönböztetésére alkalmas fenotípusos különbségek, amelyek a kódoló szakaszokban létező allélvariáció, polimorfizmus eredményei. A biokémiai markerek szintén az eltérő allélok megnyilvánulásai, azonosításukhoz azonban analitikai módszerek szükségesek. Mind a morfológiai, mind a biokémiai markerekre érvényes, hogy a számuk korlátozott, a környezeti hatásokra érzékenyek és expressziójuk a fejlődési stádiumtól függ (Kiss, 2005).

Tanksley (1983) molekuláris markereknek nevezte el azokat a biokémiai markereket, amelyekkel fehérje vagy DNS-szinten lehet a polimorfizmust kimutatni. A DNS-szintű markerek alkalmazását a Southern blot technika (Southern, 1975), az ezen alapuló RFLP módszer, majd a polimeráz láncreakció felfedezése tette lehetővé (Mullis és Faloona, 1987).

Az ideális DNS-markerek jellemzői:

- nagyfokú polimorfizmus,
- kodomináns öröklődés,
- gyakori előfordulás a genomban, könnyű és gyors detektálhatóság,
- reprodukálhatóság,
- az adatok könnyű megosztása a laboratóriumok között.

A molekuláris markerek a genom meghatározott helyén, vagy helyein (lokusz) találhatók. A velük kapcsolt gén jelenlétének kimutatására, vagy adott tulajdonság öröklődésének nyomon követésére használhatók. Specifikus DNS szakaszok, melyek azonosíthatóak a genomban. A morfológiai és biokémiai markerekkel szemben előnyük, hogy függetlenek a környezeti hatásoktól, számuk elméletileg korlátlan, és mivel magára a DNS molekulára épülnek, a variabilitás objektív meghatározását teszik lehetővé (Kiss, 1999).

A szőlő genom biodiverzitásának feltérképezésére először biokémiai markereket alkalmaztak, amelyet az 1990-es években már DNS polimorfizmus detektálásán alapuló RFLP elemzések követtek. Jelentős előrelépést jelentett mind az izoenzim analízis (Weeden *et al.* 1989; Subden *et al.* 1987), mind az RFLP markerek felhasználása (Beckmann és Soller, 1986; Bowers *et al.* 1996). Az említett molekuláris markereknek számos hátrányos tulajdonsága volt. Az izoenzimek vizsgálata kizárólag az oldható fehérjékre korlátozódik, míg az RFLP meglehetősen munka- és időigényes (Roy *et al.* 1992). A PCR (Polymerase Chain Reaction) technika kifejlesztése (Mullis és Faloona, 1987; Saiki *et al.* 1988) a DNS szintű polimorfizmusok kimutatásában óriási előrelépést jelentett. A növényi genom különböző részeinek felszaporítását biztosító PCR primerek alkalmazásával RAPD (Welsh és

McClelland, 1990, Williams *et al.* 1990) és mikroszatellit (Weber és May, 1989; Condit és Hubell, 1991; Thomas és Scott, 1993) módszerekkel végeztek genotipizálást a növényvilágban fajtaazonosítás, eredet – származás és homogenitás vizsgálat céljából. Az alap PCR technikák mellett olyan továbbfejlesztett PCR alapú polimorfizmus vizsgálati technikákat (Nagy, 1999) is bevezettek a genomanalízisbe, mint az AFLP (Vos *et al.* 1995, Sensi *et al.* 1996), a CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), mellyel a monomorf mintázat polimorffá tehető (Konieczny *et al.* 1994), vagy mint a SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), amely segítségével kodomináns markereket lehet előállítani domináns RAPD markerekről (Paran és Michelmore, 1993).

2.6.1 Izoenzim vizsgálatok szőlőben

Mivel a morfológiai bélyegek nem bizonyultak elegendőnek a fajták biztos elkülönítésére, a kutatók az 1950-es évektől kezdődően a fehérjékre mint a struktúrgének elsődleges termékeire kezdtek fókuszálni. A biokémiai markerek lehetnek a különböző struktúrfehérjék, tartalékfehérjék vagy egyes enzimek változatai, az izoenzimek.

Az izoenzim elnevezést Markert és Moller fogalmazta meg az azonos szubsztrát–specifitású enzimek különböző molekulaformáira 1959-ben (Markert és Moller, 1959).
Az izoenzim (biokémiai) markerek mendeli, kodomináns öröklődésmenetet követnek. A módszer egyszerre nagy mennyiségű minta vizsgálatát teszi lehetővé. Az izoenzimek egészen fiatal növényi szövetekből izolálhatóak, ezáltal szelektálhatunk olyan tulajdonságokra, melyek morfológiailag csak később jelennek meg. Évelő növények esetében ez jelentős költségmegtakarítást jelenthet (Bretting és Widrechner, 1995).

Hátrányuk, hogy a DNS markerekkel szemben szövet, illetve fejlődési állapot-specifikusak. Poszt-transzkripcionális módosulásuk a felhasználhatóságukat gyakran korlátozza (Staub *et al.* 1996).

Az izoenzimek a szőlőfajták jellemzésére és vizsgálatára is lehetőséget adnak. 1996-ban Ros Barceló és munkatársai tanulmányozták peronoszpóra rezisztens (*V. vinifera* x *V. rupestris*) x *V. riparia* hibridben, és a fogékony *V. vinifera* szülőben. Munkájuk során bebizonyosodott, hogy a rezisztens hibridben, mind a levél–mind pedig a háncsszövetben expresszálódott a peroxidáz enzim, míg a fogékony szülőből ez teljesen hiányzott. A kísérletek alapján tehát a peroxidáz enzim izoenzimje a szőlő peronoszpóra rezisztencia markereként alkalmazható.

Izoenzim markereket a magyar kutatók is alkalmaztak szőlőfajták megkülönböztetésére a magyar kutatók. 2003-ban Hermán Rita és munkatársai izoenzimek segítségével vizsgálták a kárpát-medencei szőlőfajtákat (Hermán *et al.* 2003). 2008-ban Györffyné Jahnke Gizella és munkatársai olyan savas foszfatáz mintázatot azonosítottak, amely kizárólag a pontuszi fajtákra jellemző (Györffyné *et al.* 2008). Az elemzéseket kiterjesztették a Magyarországon köztermesztésben lévő fajták jellemzésére és egymástól való megkülönböztetésére is (Jahnke *et al.* 2009).

2.6.2 DNS markerek alkalmazása a szőlőfajták jellemzésére

2.6.2.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Az RFLP–t, a legelső DNS markert 1980-ban írták le (Botstein *et al.* 1980). A módszer a DNS molekula restrikciós endonukleázzal történő emésztésén és Southern–hibridizáción alapul.

A növényi genom mérete megközelítőleg 10^8 – 10^{11} bp közötti. A restrikciós enzimek, 4, 6 és 8 bp felismerő hellyel rendelkeznek. A restrikciós hasítási helyek eloszlásában a genomok közötti különbségeknek, valamint a mutációknak (inszerció, deléció, pontmutáció, báziscsere) a szerepe a meghatározó (Kiss, 2005). A Southern blot analízissel a genomi DNS restrikciós enzimmel darabolt fragmentumokat azonosítjuk és következtethetünk a mutációra.

Az RFLP előnye, hogy nem igényli a DNS templát szekvenciájának ismeretét. A heterozigóták megkülönböztetésére alkalmas kodomináns marker. Hátránya, hogy nagy mennyiségű DNS-t igényel, a jelölt próbát a Southern blot-hoz elő kell állítani, mindez hosszadalmas és költséges.

Bourquin és munkatársai 1993-ban 46 szőlőfajta vizsgálatát végezték el RFLP módszerrel. Munkájuk során 111 fragmantumot különítettek el egymástól. A kapott mintázatok összehasonlításával, valamint a ritkán előforduló fragmentumok lokalizációjával igazolták az ökológiai-földrajzi csoportok meglétét (Bourquin *et al.* 1993). Szintén RFLP technika alkalmazásával kilenc *V. berlandieri* x *V. riparia* alanyfajta összehasonlítását végezte el Guerra és Meredith 1995-ben. A vizsgált fajták között Teleki magoncaiból származó alanyfajták is szerepeltek (SO4, 5C, 5BB, 125AA, Cosmo2, Cosmo10). Hat DNS próbából 3 kombinációjával 7 fajtát tudtak elkülöníteni (Guerra és Meredith, 1995).

2.6.3 PCR alapú módszerek

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

A módszer lényege, hogy véletlenszerűen megválasztott szekvenciájú, 10-15 nukleotid hosszúságú, primerekkel indítunk polimeráz láncreakciót (Williams *et al*. 1990; Welsh és McClelland, 1990). Ha a primer kötődési helyei elég közel helyezkednek el egymáshoz viszonyítva a genomban, akkor különböző fragmentumok szintetizálódnak, amelyeket gélelektroforézissel el lehet egymástól választani. A képződő fragmentumok száma a primertől, a fajtól és a reakciófeltételektől függően 5-20 körül lehet. A detektálható polimorfizmusok forrása lehet a primer kötési helyeinek megléte vagy hiánya (szekvenciaváltozása), valamint egy adott lokuszon a primer kötési helyek eltérő távolsága (deléciós vagy inszerciós helyek) (Williams *et al*. 1990; Welsh és McClelland, 1990).

Polimorf mintázat esetén a különbséget jelentő fragmentumok az agaróz gélből kivághatóak és szekvenálhatóak. A már meghatározott szekvencia alapján a fragmentumra specifikus primerek tervezhetőek, melyeket **SCAR** markereknek nevezünk (Paran és Michelmore, 1993).

A módszer előnye, hogy a genom előzetes ismerete nélkül is alkalmazható, akár egy, a kutatásba bevont új fajon is. Viszonylag egyszerű módszer, hiszen egy polimeráz láncreakcióból és az azt követő gélelektroforézisből áll. A RAPD markerek domináns jellegűek, ritkán azonban kodominancia is előfordul. Mivel a vizsgálati lehetőségek szinte korlátlanok, a genotipizálás finomsága, a felbontása a megválasztott primerektől függ, és szinte egyedi azonosítás érhető el vele. A módszer alkalmas a fajták, és állományok azonosítására, megkülönböztetésére (Williams *et al.* 1990; Smith *et al.* 1996).

Morell és munkatársai (1995) hagyma-, repce-, brokkoli-, karfiol-, zeller-, zab-, és kakaófajták azonosítására használták a RAPD technikát, melynek segítségével közeli rokon fajtákat is meg tudtak különböztetni.

A módszert szőlőn elsőként Collins és Symons 1993-ban alkalmazta, akik egyetlen primer felhasználásával, illetve két primer keverékével számos fajta esetében jellemző RAPD-mintázatokat írtak le. Az eljárástól azt remélték, hogy általa egy olyan DNS-adatbank hozható létre, amely az egyes fajták megkülönböztetésében és a rokonsági kapcsolatok megállapításában jelentős segítséget nyújthat.

Büscher és munkatársai (1993) a szőlőfajták RAPD-markerekkel történő elkülönítésének hibalehetőségéről számoltak be. A primerkoncentráció változtatásával, az egyes Taq-polimerázok összehasonlításával, illetve különböző PCR-berendezések

alkalmazásával eltérő eredményekre jutottak. Ebből kiindulva Tessier és munkatársai (1999) a fajta-elkülönítéseik során használt primerek hatékonyságának jellemzésére egy paramétert (D) határoztak meg, mely annak a valószínűségét mutatja, hogy két véletlenszerűen kiválasztott egyed RAPD-mintázata eltérő.

Meglepő eredményre vezetett a RAPD-technika alkalmazása *V. vinifera* fajták és a vadon termő *V. vinifera ssp. silvestris* egyedek összehasonlításakor (Grando *et al.* 1995). Nem sikerült jelentős különbséget tenni a termesztett és a vadon élő szőlő között, ugyanakkor a *Convarietas occidentalis* fajtacsoportba tartozó fajták jól elkülöníthetőek voltak. Az első kapcsoltsági térképet Lodhi és munkatársai (1995) szerkesztették, mely részben RAPD markerek felhasználásával készült.

Wang és munkatársai (1999) 42 genotípust vizsgáltak. RAPD-mintázatuk alapján a *Muscadinia* alnemzetségbe tartozó *M. rotundifolia* az *Euvitis* alnemzetségbe tartozó fajok bármelyikétől megkülönböztethető volt. Arra a következtetésre jutottak, hogy az amerikai és ázsiai szőlők sokkal közelebbi rokonságban vannak a *Muscadinia* alnemzetséggel, mint a *V. vinifer*ával.

Vidal és munkatársai 2002-ben 34 szőlőfajta esetében nyolc RAPD-markerből fejlesztettek SCAR-markert, összesen 30 specifikus primert terveztek 64 szőlőfajta vizsgálatához.

Bisztray és munkatársai (2001) a RAPD módszert alkalmazták a szőlő fajok, valamint fajták jellemzésére. Az összesen 96 tesztelt RAPD markerből 40 bizonyult megfelelőnek. Sikerült azonosítani a vizsgált 6 *V. vinfera* fajtát és 9 interspecifikus hibridet. A vizsgált 7 Szürkebarát klónt szintén el lehetett különíteni 40 RAPD markerrel (Bisztray, 2001).

Kocsis és munkatársai 2005-ben 12 kárpát–medencei szőlőfajtát vizsgáltak RAPD markerekkel. Munkájuk elsősorban a vizsgált fajtakörben a genetikai diverzitás és rokonság felmérése volt. A vizsgálatokhoz 28 primert használtak, mely során 120 polimorf fragmentumot azonosítottak. A kapott eredményeket összhasonlították Németh (1967) taxonómiai besorolásával, illetve a fajták feltételezett földrajzi eredetével.

AFLP *(Amplified Fragment Length Polymorphism)*

Az AFLP-módszert, Zabeau és Vos (Key Gene, Hollandia) 1993-ban szabadalmaztatta és 1995-ben publikálta. A technika genomi DNS restrikciós emésztésén és a fragmentumok szelektív PCR amplifikációján alapul. Az amplifkáció előtt a genomi DNS-t két restrikciós endonukleázzal hasítjuk és a DNS-fragmentumok végeire helyspecifikus ds (double stranded

= kétszálas) adaptereket ligálunk. Így az adapterek szekvenciája és a csatlakozó hasított vég lesz a restrikciós fragmentumok primerkötő helye az amplifikáció alatt. A PCR-primerek 3' végeihez szelektív nukleotidokat adunk, amelyek a hasítási helyek csak egy csoportját tudják azonosítani. Így csak azok a restrikciós fragmentumok amplifikálódnak, amelyekben a hasítási helyhez kapcsolódó nukleotidok összeillenek a szelektív nukleotidokkal.

Véletlen primerek használatakor az egyedek vagy vonalak közötti polimorfizmust egyrészt a primer kötőhelyben levő DNS-szekvenciakülönbség, másrészt pedig az amplifikált régióban vagy a primer kapcsolódási helyén kialakuló deléció, inszerció vagy inverzió okozhatja (Vos *et al.* 1995).

A módszer nem igényel előzetes szekvenciaismeretet és ugyanazok a primerek széles körben használhatók több fajhoz is. További előnyei, mint PCR-en alapuló módszernek, hogy viszonylag egyszerű műszerezettséget igényel, gyors és sok markert eredményez. Nagyon kis mennyiségű templát-DNS (nanogramm-nyi mennyiség) szükséges a reakcióhoz, így akár egy levéldarab vagy beszárított növényi rész is használható kiindulásként (Sutka, 2004).

Az ismételhetőség miatt fontos a reakcióhoz szükséges alkotórészek koncentrációjának pontos beállítása. Domináns kiértékelésű módszer, ezért kevesebb információval rendelkező markerek a genetikai munkák során gondot okozhatnak, mivel a markerek nagy része intron vagy repetitív szekvenciákból amplifikálódik (ezek A+T gazdag szekvenciák), ezért az amplifikált fragmentumok hibridizációs próbaként való használata nem mindig sikeres (Kaló, 2000).

Az AFLP markerek alkalmazása jelentős szerepet tölt be a szőlő genetikai kutatásokban. 2001-ben Labra és munkatársai egy olasz szőlőfajta a „Trebbiano" és a morfológiailag hozzá hasonló fajták elkülönítésére használták az AFLP-t. Ugyanebben az évben Regner és munkatársai (2001) több mint 1200 szőlő genotipizálását végezte el AFLP, RAPD, SSR és ISSR markerek felhasználásával. AFLP és SSR markereket tartalmazott Doligez és munkatársai (2002) által készített térkép, melyen a magvatlanságot és a bogyótömeget meghatározó QTL–ek (Quanitative Trait Loci) helyét térképezték. 2003-ban 47, az olaszországi Olterpó Pavese regióból származó szőlőfajtát különítettek el egymástól Rossoni és munkatársai (2003). A kapott eredmények alapján dendrogamot készítettek, melyből kiderült, hogy a 47 fajta között nagy a genetikai távolság, a morfológiai hasonlóságuk ellenére.

A szőlő rezisztencia gének közül legrészletesebben a *M. rotundifolia*–ból származó *Run1* lokuszt térképezték. 2001-ben Pauquet 13 AFLP marker segítségével lokális térképet készített, majd 2005-ben Barker és munkatársai létrehoztak egy részletes genetikai, valamint

egy BAC könyvtárra alapuló fizikai térképet, mely alapján a *Run1* lokuszt a 12-es kapcsoltsági csoportban helyezték el. 2003-ban Merdinoglu és munkatársai megállapították, hogy a peronoszpóra ellenállóságért felelős lokusz az *Rpv1*, amelyről bebizonyították, hogy a *Run1* lókusszal kapcsolt (Schmidlin *et al.* 2006).

CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*)

A random amplifikáció során sok genotípus esetében gyakran monomorf mintázatot kapunk. Az amplifikációt követő szekvencia összehasonlítások alátámasztják, hogy a genotípusok egy részénél több helyen is található pontmutáció a primerek közötti szekvencia mentén. A szekvencia-különbségek eredményeképpen a restrikciós emésztést követően a fragmentum mintázat polimorffá alakítható (Nagy, 1999), azaz az ún. CAPS módszerrel (Konieczny és Ausubel, 1994) a szekvenciaspecifikus monomorf amplifikációs mintázat specifikussá tehető. A CAPS módszert más néven PCR-RFLP-nek is nevezik (Kiss, 2005).

Létezik egy másik megközelítési mód is a CAPS alkalmazására. Ekkor a templát DNS emésztése még az amplifikáció előtt megtörténik, és az ilyen módon felszaporított amplifikált fragmentum megléte vagy hiánya jelenthet allélikus különbséget (Nagy, 1999).

Bourquin és munkatársai 1995-ben CAPS vizsgálatot végeztek 17 *Vitis* 3 *Ampelopsis* és 2 *Partenocissus* faj jellemzésére. Négy, a Chardonnay fajtából származó primer segítségével 22 alanyt tudtak egymástól elkülöníteni, de a 3309 C alany 9 vizsgált klónja között nem tudtak különbséget tenni. Mindezek ellenére a módszert alkalmasnak tartják taxonómiai felhasználásra.

A CAPS markerek felhasználására a rezisztencianemesítésben több példa is rendelkezésre áll. A paradicsom (*Lycopersicon esculentum*) nematódafertőzés elleni védekezés egyik leghatékonyabb módja a rezisztencianemesítés. 1944-ben a nemesítés során ivaros keresztezéssel és embriótenyésztéssel vitték át a *L. peruvianum*-ból származó domináns *Mi* rezisztencia gént a fogékony *L. esculentum*-ba (Smith, 1944; Szőke *et al.* 2005). Mára a paradicsom *Mi* rezisztencia génje, az egyik legjobban jellemzett nematódarezisztencia–génné vált. Mesterséges fertőzéssel és a domináns *PM3* marker segítségével a homozigóta és heterozigóta genotípusok nem voltak elkülöníthetőek egymástól. Ezért az *Mi* gén allélösszetételének vizsgálatára a CAPS módszert használták (Williamson *et al.* 1994; Yaghoobi *et al.* 1995). A kodomináns REX CAPS markerrel az egyedek genotípusa már az egyedfejlődés kezdeti szakaszában meghatározható. Az ellenálló F_1 hibridek

előállítására csak olyan szülőpartnerek használhatóak, melyek közül legalább az egyik homozigóta az adott rezisztenciagénre. A marker-tulajdonság koszegregációjának vizsgálatára az F_2 hasadó nemzedék egyedeit használták fel. Az egyedeket domináns génspecifikus és kodomináns CAPS markerekkel vizsgálták, melynek segítségével sikerült a fogékony-, a heterozigóta-és a homozigóta rezisztens genotípusokat elkülöníteni egymástól (Szőke *et al.* 2005).

Donald és munkatársai 2002-ben olyan rezisztenciagén–analógokat publikáltak, melyek segítségével a liszthar mat rezisztenciagén detektálható (Donald *et al.* 2002). A *Run1* lókusszal kapcsolt CAPS vagy más néven PCR-RFLP markerrel sikerült szőlő hibridcsalád egyedei között az ellenálló és fogékony egyedeket elkülöníteni egymástól (Molnár *et al*. 2007).

Mikroszatellitek vagy SSR *(Simple Sequence Repeat)*

A mikroszatellitek abba a repetitív szekvencia családba tartoznak, amelyben igen egyszerű, di-, tri- tetra-, vagy pentanukleotidok egymást követve ismétlődnek egy szakaszon belül (Litt és Luty, 1989).

A mikroszatellitek szinonim megnevezései a következőek:

- **VNDR-Variable Number Tandem Repeat** (Nakamura *et al.* 1987)
- **STR-Short Tandem Repeat** (Edwards *et al.* 1991)
- **SSLP**–Simple Sequence Length Polymorphism (Rosenberg *et al.* 2002)
- **SSR - Simple Sequence Repeat** (Jacob *et al.* 1991).

A mikroszatelliteket az eddig vizsgált összes prokarióta és eukarióta genomból ki tudták mutatni (Zane *et al.* 2002). Kódoló és nem kódoló régiókban egyaránt megtalálhatók. Az eukarióta genomban mindenütt nagy mennyiségben jelen vannak, és nagy polimorfizmust mutatnak az ismétlődő egységek számát tekintve.

Az ismétlődő motívumsor alapján megkülönböztethetünk perfekt, imperfekt és összetett szekvenciákat. A perfekt mikroszatellitek szabályosan ismétlődő egységekből épülnek fel. Az imperfekt mikroszatellitek esetén egy vagy több nukleotid ékelődik a perfekt sorba. Az összetett szekvenciájú mikroszatelliteknél különböző típusú ismétlődő szekvenciákból épül fel a mikroszatellit régió (Weber és May, 1989).

Az SSR-k különböző típusainak gyakorisága növényfajonként eltérő. A növényi genom legelterjedtebb **dinukleotid** ismétlődése az AA/TT motívum. Ennél kevesebbszer fordulnak elő az AT/TA és a CT/GA motívumok. Ez a három dinukleotid SSR átlag 1–6-szor ismétlődik egymás után, és az összes növényi mikroszatellit 75%-át teszik ki (Lagercrantz *et al.* 1993). A **trinukleotidok** közül a $(GGC)_n$, $(TTG)_n$ és a $(TTC)_n$ ismétlődések a leggyakoribbak (Taramino és Tingey, 1996). A három és négy nukleotidból álló ismétlődések előnye a két nukleotidból állókkal szemben az, hogy a kis méretbeli különbséget mutató allélvariánsok vizsgálatát is lehetővé teszik.

Az ismétlődések határszekvenciái nagyfokú konzervatizmust mutatnak, a PCR primereket a tandem ismétlődő régiót határoló szekvenciák alapján tervezik. A mikroszatellit markerek ideálisak a genetikai rokonság feltérképezésére, mivel kodomináns mendeli öröklésmenetet követnek (Regner *et al.* 1996; Sefc *et al.* 1997; Sefc *et al.* 1999). Eloszlásuk a genomban egyenletesebb, mint a miniszatelliteké, ami kiváló segítséget nyújt a géntérképezéshez, a nagy marker variabilitást, pedig igen jól lehet hasznosítani egyedi illetve a fajtaazonosításban és a genetikai összehasonlításokban is (Peever *et al.* 2004).

A növényekben genotipizálásra Beyermann és munkatársai (1992) alkalmazták először az SSR módszert. Ezt követően számos kutató több növényfajban kezdte el vizsgálatait SSR-markerekkel: *Arabidopsis thaliana* (Bell és Ecker, 1994), *Glycine max* (Akkaya *et al.* 1995), *Zea mays* (Senior *et al.* 1996), *Triticum aestivum* (Devos *et al.* 1994), ***V. vinifera*** (Thomas és Scott, 1993), *Oryza sativa* (Wu és Tanksley, 1993; Zhao és Kochert, 1993), *Helinathus annus* (Brunel, 1994).

Az első szőlő mikroszatellit markereket szőlőben Thomas és Scott írta le (Thomas és Scott, 1993). A szőlő mikroszatellitek egyre növekvő száma (Bowers *et al.* 1996; Scott *et al.* 2000; Sefc *et al.* 1999; Arroyo-Garcia és Martinez-Zapater, 2004) az SSR markerek alkalmazási körének növekedését vonta maga után.

A leírt szőlő SSR markerek időrendben a következőek:

- VVS1, VVS2, VVS3, VVS4, VVS5 (Thomas és Scott, 1993)
- VVMD5, VVMD6, VVMD7, VVMD8 (Bowers *et al.* 1996)
- VVMD25, VVMD28, VVMD31, VVMD34, VVMD36 (összesen 22 VVMD primer azonosítása) (Bowers *et al.* 1999a)
- VrZAG 7, VrZAG 12, VrZAG 15, VrZAG 21, VrZAG 62, VrZAG 67, VrZAG 79 (Sefc *et al.* 1999)
- Vitis Microsatellite Consortium (megalakulása 1999-ben) 19 kutatócsoporttal további SSR primerek izolálása (Pellerone *et al.* 2001, Lefort et al. 2002, Decroocq *et al.*

2003, Arroyo-Garcia és Martinez-Zapater, 2004, Adam-Blondon *et al.* 2004, DiGaspero *et al*. 2005, Merdinoglu *et al.* 2005, Di Gaspero *et al.* 2007).

- Jelenleg az NCBI adatbázisban (National Center for Biotechnology Information) 620 *V. vinifera* és 19 *V. riparia* mikroszatellit szekvencia található, melynek száma napról napra növekszik (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

A „The European *Vitis* Database" fejlesztésével párhuzamosan This és munkatársai 2004-ben a mikroszatellit adatok értékelésének olyan módszerét dolgozták ki, melynek segítségével a különböző európai laboratóriumokban kapott eredmények összegezhetőek, és összehasonlíthatóak. Hat, a fajtaazonosításra hatékonyan használható SSR lokuszt (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZag62, VrZag79) választottak ki, és a kapott allélokat kódokkal látták el (This *et al.* 2004).

Halász és munkatársai 2005-ben a pécsi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet gyűjteményében fenntartott 115 szőlőfajta mikroszatellit ujjlenyomatát határozták meg (Halász *et al.* 2005 a,b). A vizsgálatokat Galbács és munkatársai tovább folytatták, melynek során elkészült a 115 szőlőfajta mikroszatellit ujjlenyomata 12 mikroszatellit lokuszban (Galbács *et al.* 2009). A 115 fajtát a 12 SSR primerpárral, összesen 2760 különböző allélmérettel jellemezték. Ebbe az adathalmazba a Halász és munkatársai által meghatározott adatok is beletartoznak. A 2760 SSR allélméret adat alapján dendogramot szerkesztetettek, valamint elkészítették a 115 szőlőfajta DNS „vonalkódját". A dendrogram az azonosságok azonnali megállapítására, míg a DNS „vonalkód" a fajták objektív azonosítására alkalmas. Az elemzések alapján, DNS szinten is igazolni tudták a Mátrai muskotály és az Irsai Olivér származását. A Mátrai muskotály az Ottonel muskotály x Izsáki (Hajdu, 2003), az Irsai Olivér pedig a Pozsonyi fehér x Csabagyöngye (Hajdu, 2003) keresztezéséből származik (Galbács *et al.* 2009).

A mikroszatellit markerek megbízható fajtaazonosítást, genotipizálást tesznek lehetővé (Cipriani *et al*. 1994; Lopes *et al.* 1999; Maletic *et al.* 1999; Sefc *et al.* 2000; Hvarleva *et al.* 2004; Halász *et al.* 2005 a,b; Galbács *et al.* 2009) és eredményesen alkalmazhatók a származás vizsgálatokban is (Bowers *et al.* 1996; Bowers *et al.* 1999; Dettweiler *et al.* 2000; Regner *et al.* 2000; Kozma *et al.* 2003). A mikroszatellitek nagyfokú polimorfizmusának köszönhetően már hat ilyen marker segítségével elkülöníthetővé válnak az egyes fajták, bár közeli rokonok esetében ennél többre is szükség lehet (Sánchez- Escribano *et al.* 1999; Crespan és Milani, 2000).

A mikroszatellit ujjlenyomatok nemcsak genotipizálásra alkalmasak, hanem a lehetséges szülők bevonásával segíthetnek a fajták földrajzi eredetének és pedigréjének megfejtésében, valamint lehetővé teszik homonímák és szinonímák azonosítását is. A már meghatározott allélméretek száma folyamatosan növekvő tendenciát mutat a különböző *Vitis* fajok (Lamboy és Alpha, 1998, Di Gaspero *et al.* 2000, Di Gaspero *et al.* 2007) és a világon termesztett fajok esetében is (Sefc *et al.* 2000). A szőlő mikroszatellit szekvenciák növekvő száma sokoldalú felhasználást tesz lehetővé (Cipriani *et al.* 1994, Lefort és Roubelkais-Angelakis *et al.* 2001).

A mikroszatellit szekvenciák alapján kapcsoltsági térképeket hoztak létre, melyek segítségével lehetővé vált olyan markerek kiválasztása, amelyek kapcsoltan öröklődnek fontos tulajdonságok génjeivel. A QTL analízissel számos jelleget, rezisztenciát meghatározó genetikai régiót lehet azonosítani.

SNP *(Single Nucleotide Polymorphism)*

Az SNP olyan DNS–polimorfizmus, mely akkor jön létre, ha egy nukleotid az adott lokuszban megváltozik. Az SNP analízis minden esetben szekvencia ismeretet igényel. A pontmutációkból eredő allélvariációkat szekvenálással, allél–specifikus amplifikációval, hibridizációval vagy tömegspektrometriával mutathatjuk ki (Orita *et al.* 1989).

Az SNP-k kimutatására az RFLP, más néven SNP-RFLP módszer is lehetőséget ad. Ha egy allél rendelkezik egy restrikciós enzim-hasítóhellyel, míg egy másik nem, akkor a két allél enzimatikus emésztése eltérő hosszúságú fragmentumokat eredményez. Abban az esetben, ha nincs ilyen hasítóhely-különbség, akkor a PCR módszer válik használhatóvá (Kiss, 2005). Nagyfelbontású poliakrilamid gélen az egymástól egyetlen nukleotidban eltérő fragmentumok is elkülöníthetővé válnak (Hayasahi, 1992; Sunncks *et al*. 2000).

2006-ban Amrani és Corio–Costet az *Erysiphe necator* L. β- tubulin génjében egy pontmutációt fedezett fel, melynek ismeretével sikerült az aszkospórás és a zászlós hajtás tüneteket okozó genotípusokat elkülöníteni (Amrani *et al.* 2006). 2007-ben Velasco és munkatársai publikálták a második szőlő szekvencia eredményeit (Velasco *et al.* 2007). Az első fizikai térképhez hasonlóan (Jaillon *et al*. 2007) ez is a Pinot noir fajtán készült, azonban nem a 93%-os homozigótaságig öntermékenyített genotípuson (PN40024), hanem egy heterozigóta klónon (ENTAV 115). 477,1 Mb hosszúságú szekvencia sorrendet kaptak 29585 feltételezett génnel, melyeknek 96,1%-át pozicionálni tudták a kromoszómákon. A gének 86,7%-ában egy vagy több SNP marker található.

2.7 Molekuláris markerek alkalmazása rezisztencia gének térképezésében

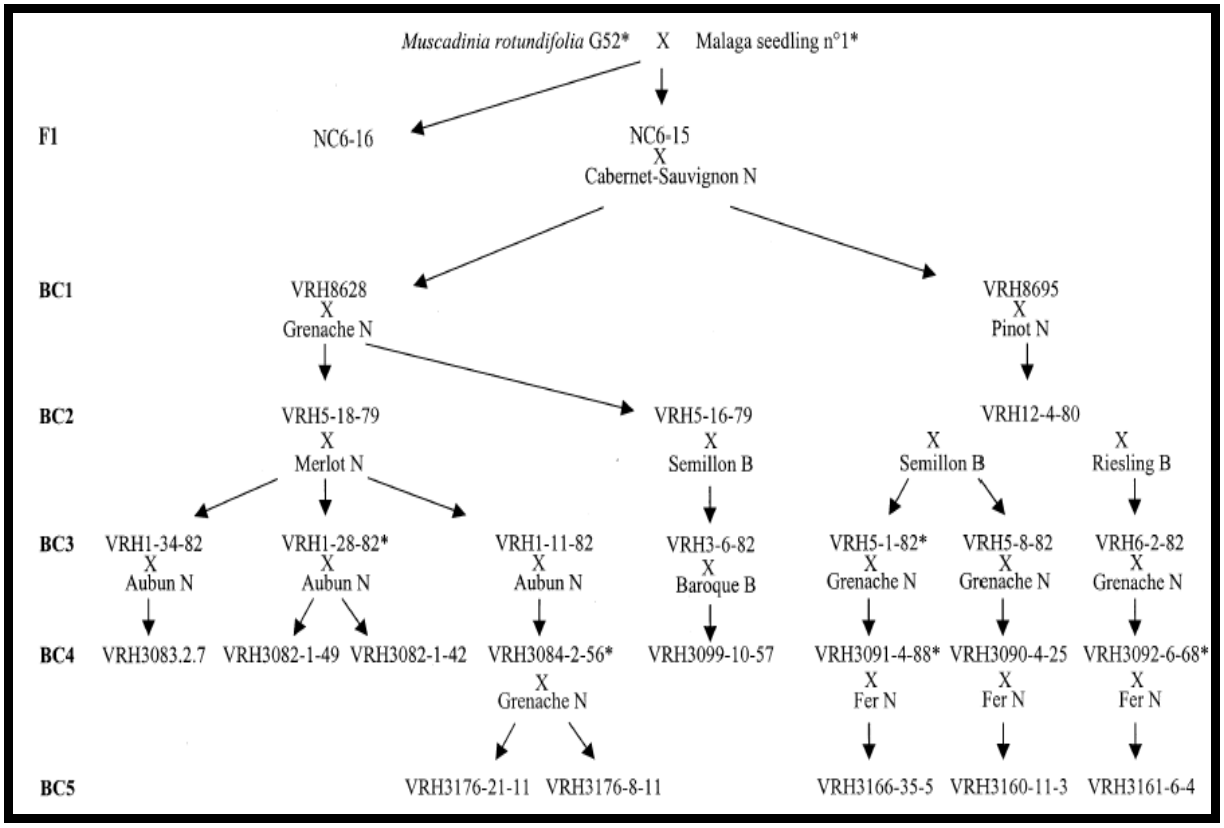
A lisztharmattal szemben kialakult genetikai ellenállóképességet már több növényfajban azonosították. Olyan rezisztencia meglétét sikerült igazolni, mely eltér a gazda- és nemgazda válaszrekaciók működésétől. Az *MLO* egy géncsalád tagja, egy transzmembrán fehérje, mely hét sejtmembránon átívelő szakaszból áll. Az *MLO* blokkolja az aktin–függő és az aktin-független védekezési utakat. Azonban a természetes populációkban előforduló mutáns allélje (*mlo*) egy hibás gén, amelynek géntermé egy defektes, nem funkcionális transzmembrán fehérje, éppen ezért széles spektrumú rezisztenciát biztosít az árpát fertőző *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* ellen (Büschges *et al.* 1997; Miklis *et al.* 2007).

2003-tól folynak kutatások *Arabidopsis*ban a lisztharmat rezisztencia gének azonosítására. A kutatások eredményeképpen sikerült azonosítani a PENETRATION 1 (*PEN1*) *PEN2* és *PEN3* kulcsgéneket, melyek a lisztharmatfertőzéssel szembeni alapvető védekezési válasz kialakításában játszanak szerepet (Collins *et al.* 2003; Lipka *et al.* 2005; Stein *et al.* 2006). A leírt gének közül a *PEN1*-nek van a legnagyobb hatása, ugyanis ez kódolja a szintaxin nevű fehérjét, mely a sejtek szerkezeti átrendeződését okozza fertőzéskor, ezáltal megakadályozza a hausztóriumok behatolását a növényi sejtekbe (Meyer *et al.* 2009).

A *M. rotundifolia* az Egyesült Államok a lisztharmat, a peronoszpóra, a filoxéra és a nematódák által okozott fertőzéseknek is ellenáll (2. táblázat), így kiemelkedő fontosságú forrássá vált a patogénekkel szembeni nemesítésben (Olmo, 1986). 1859-ben A. P. Wylie próbálta először keresztezni a *M. rotundifoliát* a *V. viniferával*, és kideríteni, hogy az utódok örökölni fogják e a vad szülő kedvező tulajdonságát. A keresztezésben a *V. vinifera,* a Muscat frontignan, vagy a Black Hamburg vett részt. A *V. vinifera* pollennel nem sikerült megtermékenyíteni a *Muscadiniát,* viszont reciprok keresztezéssel sikeres volt a termékenyítés. 1916-ban további hibrideket állítottak elő Észak Carolinában, Willardban (Mortensen, 1971). Ezt követően, 1942-ben megalakult a Davis program, melynek keretében további hibrideket állítottak elő a Carolina Egyetemen (Olmo, 1971). A klasszikus genetikai tanulmányok alapján kiderült, hogy a lisztharmat rezisztenciáért egy, a *M. rotundifolia*-ból származó domináns gén a felelős, melyet *RUN1*-nek (**R**esistance to ***U****ncinula* **n**ecator) neveztek el (Bouquet, 1986). A keresztezések eredményeképpen a lisztharmat rezisztenciáért felelős lokusz introgresszálódott a *V. viniferába* (Bouquet, 1986; Pauquet, 2001).

Bouquet 1986-ban több VRH nemzedéket (*vinifera x rotundifolia* hibrid) állított elő, mely alapjául a *V. vinifera* Malaga seedling és a *M. rotundifolia* G.52 genotípus

keresztezéséből származó NC 6-15 F_1 hibrid szolgált. Ezt követően a pseudo-backcross stratégiát alkalmazva különböző *V. vinifera* fajtákkal (Grenache, Merlot, Aubun, Pinot noir és a Semillon) keresztezték vissza a már korábban említett F_1 hibridet (9. ábra).



9. ábra: A *Muscadinia rotundifolia RUN1 / RPV1* génjét hordozó BC (n) családok előállítási sémája (Pauquet *et al.* 2001).

A BC_4 1996-ban magyar-francia fajtacsere keretében került Magyarországra. A Bouquet által előállított *V. vinifera* x *M. rotundifolia* BC_3 és BC_4 hibrideket használta nemesítési programjában ifj. Kozma Pál (Kozma jr., 2000; Kozma jr., 2002; Kozma és Dula, 2003) többféle kombinációban (14. ábra). A BC_4 x Cardinal és a BC_4 x Kismis moldavszkij keresztezésből származó utódnemzedék molekuláris szelekciója a témája ennek az értekezésnek.

1999-2002 között olyan hibridcsaládokat is előállítottak Pécsett a francia anyag felhasználásával, amelyekben nemcsak a *M. rotundifolia* x *V. vinifera* BC_4–et a franko-amerikai hibridekkel, hanem jó minőségű *V. vinifera* fajtákkal is kombinálták. A hibrid populációk egyedeinek leveleit mesterséges és természetes fertőzések alapján tesztelték és értékelték. A lisztharmat ellenállóságot 4 fokozatba sorolták (Kozma jr., 2002; Kozma és Dula, 2003). Ezeknek a keresztezéseknek nemcsak a rezisztens és kiváló minőségű fajták

előállításában van jelentőségük, hanem a genomikai kutatásokhoz is nélkülözhetetlenek, hiszen további térképezési populációk állíthatóak elő, melyek segítségével molekuláris marker térképek szerkeszthetőek és ismeretlen rezisztencia gén lokuszok azonosíthatóak.

A különböző növények, sokféle patogénnel szembeni rezisztencia génjei nagyfokú strukturális konzervativizmust mutatnak (10. ábra). Nukleotid kötőhelyet (NBS: Nucleotide Binding Site), leucin gazdag ismétlődést (LRR: Leucin Reach Repeat), leucin cipzár régiót (LZ: Leucin Zipper) és receptorszerű kinázt (RLK: Receptor Like Kinase) tartalmaznak. Meyers és munkatársai több ilyen NBS illetve LRR régiót publkáltak. A meghatározott szakaszok konzervatív szekvenciákat hordoznak (Meyers *et al.* 1999). Egy receptorban általában 2-3 domén található (DiGaspero és Cipriani, 2003; DiGaspero *et al.* 2003).

N-terminális	***Nukleotid kötő hely*** **NBS**	***Leucinben gazdag ismétlődő szakasz*** **LRR**

→ → ← ←

P- loop kinase2 GLPL MHD

10. ábra: A rezisztenciagén nukleotid-kötőhely-leucin gazdag ismétlődésének sematikus modellje. Az ábra magyarázatát a lent található szöveg tartalmazza.

Az NBS, valamint az LRR szekvenciákat alkotó konzervatív régiók lehetővé teszik a rezisztenciagén-analógok azonosítását (Yu *et al.* 1996; Kanazin *et al.* 1996). Az ilyen szekvenciákra tervezett primerek megfelelő markereknek bizonyultak más növényfajokban és a szőlő esetében is (Donald *et al.* 2002).

A 10. ábra szemlélteti a primerek relatív elhelyezkedését, amelyeket az NBS konzervatív doménekre terveztek. Ezeknek PCR termékeknek a jellemzése és klónozása felfedte, hogy nem egy, hanem több különböző RGA szekvenciát tartalmaznak. A csoportosítást a következőkben a 4 bázisos felismerőhellyel rendelkező enzimmel elvégzett emésztés alapján megfigyelt restrikciós mintázat alapján végezték.

A klónok amplifikálására MHD primereket használtak (MHD 30, MHD 59, MHD 98, MHD 106, MHD 145 és MHD 148), amely magába foglalja a GLPL és RNBS-D motívumokat.

A nested primereket az ismert rezisztencia fehérjék NBS szakaszaiban a 4 jelenlévő konzervatív aminosav motívumokra tervezték, GVGKTT (P-loop), L (I/V/L) VLDDV (kinase2); GLPL (az úgynevezett hidrofób domain) és MHD, amelyeket az RGA-ok amlifikálására használták BC_4 rezisztens egyedeiben. A genomi DNS PCR amplifikációját

követően, az előre várható, RGA szekvenciákat kapták, a PLoop /GLPL≈ 300 bp és a PLoop/MHD≈ 600-650 bp méretet adott.

Az *Arabidopsis*-ban 120 NBS-LRR gén van. Hasonló szekvenciák a szőlő genomban is megtalálhatóak. Az NBS régión belül elhelyeszkedő, 4 konzervatív régióra tervezett primerkombinációval sikerült azonosítani 28 egyedülálló szőlő RGA szekvenciát, amely nagyfokú homológiát mutatott a klónozott NBS-LRR rezisztencia gén szekvenciákkal (Collins *et al.* 1998).

Az NBS-LRR proteineknek két nagy alcsoportját sikerült azonosítani (Meyers *et al.* 1999). Az egyik egy Toll/interleukin-1 receptorhoz hasonló kódoló (TIR), a másik egy nem kódoló (non-TIR) régió (Pan *et al.* 2000). Az *Arabidopsis* genomban a non-TIR:TIR típusú NBS szekvenciák arányát először 1:2-nek (49:100) határozták meg (Aarts *et al.* 1998).

Az RGA-k azonosítása, az *Arabidopsis* genomon kívül több növényfajban is megtörtént: szójabab (Kanazin *et al.* 1996; Yu *et al.* 1996; Peñuela *et al.* 2002; He *et al.* 2003), kukorica (Collins *et al.* 1998), napraforgó (Gentzbittel *et al.* 1998), saláta (Shen *et al.* 1998), a *Brassica* (Joyeux *et al.* 1999), rizs (Mago *et al.* 1999), citrusfélék (Deng *et al.* 2000), kávé (Noir *et al.* 2001), csicseriborsó (Huettel *et al.* 2002), szőlő (Donald *et al.* 2002), alma (Lee *et al.* 2003), búza (Lacock *et al.* 2003), cikória (Plocik *et al.* 2004) és a cirok (Totad *et al.* 2005).

A szegregáciációs analízisekben a 3 szőlő BC_5 populációból izolált, a lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt RGA-ot sikerült azonosítani. A rezisztencia génanalóg próbák segítségével két RFLP markert írtak le: a GLP1-12-őt és az MHD145-öt, melyek koszegregálnak a rezisztens fenotípussal. A GLP1-12 aminosav szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutatott néhány korábban izolált rezisztencia génnel, illetve rezisztenciagén analóggal, mint az NL27 (*Solanum tuberosum*), az N (*Nicotiana tabacum*), az N-like (*Arabidopsis thaliana*) és az M (*Linum usitatissum*). Emellett, RNBS-A, Kináz-2 és RNBS-D szekvenciákat TIR-hez hasonló NBS-LRR génekben azonosították, ez a megállapítás alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint a GLP1-12 egy TIR-hez hasonló NBS-LRR gén (Donald *et al.* 2002).

A munka következő állomását a populáció „durva” genetikai térképezése jelentette a *Run1* lokusz körül (Pauquet *et al.* 2001). Meghatározták a *Run1* lokalizációját 11 AFLP és 2 RGA-ból származó marker segítségével a VRH3294 populáció 160 növényegyedén, amely egy rezisztens BC_4 szülő, a VRH3082-1-42 (**9. ábra**) és a fogékony *V. vinifera* cv. Cabernet sauvignon keresztezéséből származik (Pauquet *et al.* 2001; Donald *et al.* 2002).

2004-ben Riaz és munkatársai 140 SSR markerből álló térképét választotta az IGGP (International Grape Genom Program) referencia térképnek (Riaz *et al.* 2004). Adam-

Bolondon még ebben az évben egy 245 SSR markerből álló genetikai térképet publikált (Adam-Blondon *et al*. 2004).

Ezeknek a mikroszatellit térképeknek köszönhetően sikerült azonosítani olyan *RUN1*-hez kapcsolt SSR markereket, melyek a VRH3294 család ellenálló és fogékony egyedeinek megkülönböztetéseire alkalmasak. Barker és munkatársai 2005-ben 3 ilyen SSR markert írtak le, melyek a következőek: VMC1g3.2, VMC4f3.1 és a VMC8g9 (Barker *et al.* 2005).
A VRH3294 populáción végzett vizsgálatok igazolták, hogy mindhárom marker kapcsolt a *Run1* lokusszal. A VMC8g9 teljesen koszegregálódott a *Run1*-el a VRH3294 populációban, a VMC4f3.1 és VMC1g3.2 markereket, pedig 0.6 cM és 4.4 cM távolságra térképezték a rezisztenciáért felelős lokusztól (Barker *et al.* 2005).

A *RUN1* gén a VMC4f3. 1, VMC8g9 markerek által közrefogott régióban lokalizálható, és a *V. vinifera* konszenzusos térképen a 12-es kapcsoltsági csoporton található (Riaz *et al.* 2004).

2006-ban elkészült az egyik legteljesebb szőlő genetikai térkép, melyet Doligez és munkatársai öt munkacsoport bevonásával, és öt meglévő genetikai térkép egyesítésével készítettek el (Doligez *et al.* 2006). 439 primerpár segítségével 512 lokusz helyét határozták meg. A kapcsoltsági csoportok teljes hossza 1647 cM, és a markerek átlagos távolsága 3,3 cM. DiGaspero munkatársaival egy 420 mikroszatellit markerből és 82 RGA-ból álló térképet hozott létre 2007-ben (DiGaspero *et al.* 2007).

2.7.1 *Run1* és *Rpv1* lókusz lokalizációjának vizsgálata és jellemzése

A lisztharmat rezisztencia génhez szorosan kapcsolt markerek és a *Run1* lokusz azonosítása céljából BAC könyvtárat hoztak létre, az *Erysiphe necator*-ral szemben ellenálló BC_5 populációból (VRH3294) (Peterson *et al.* 2000).

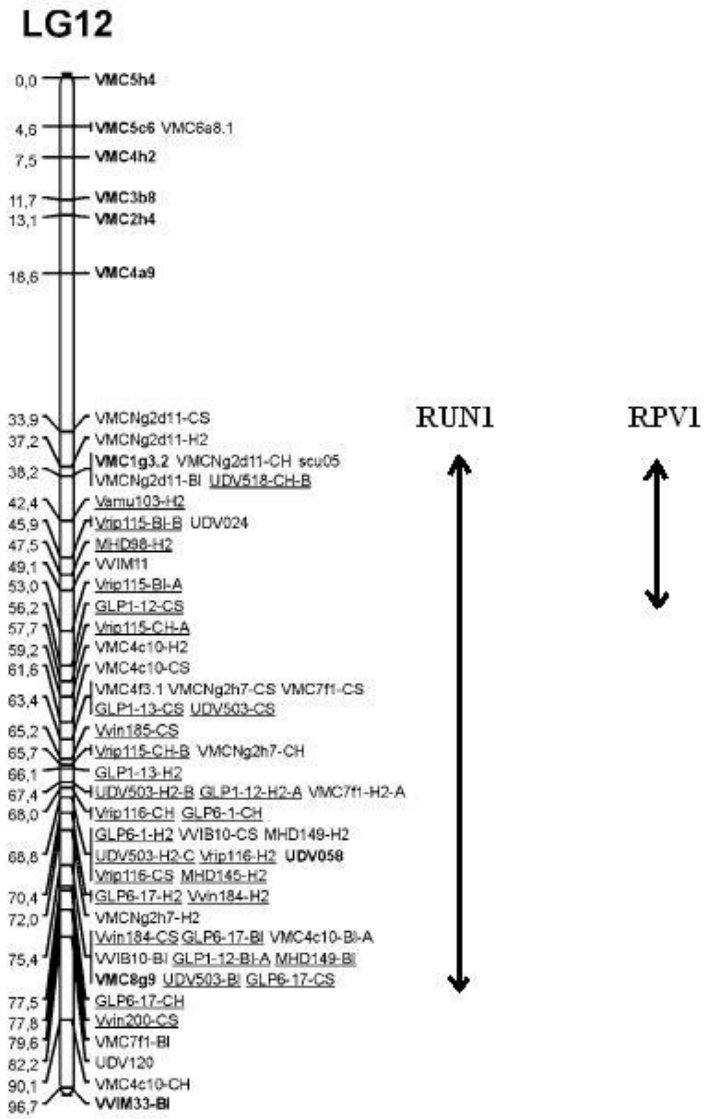
A BAC klónok határszekvenciáit Yang és Mirkov (2000) szub-klónozási módszerével és direkt szekvenálással is meghatározták.

2003-ban a VRH3294 (VRH3082-1-42 x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) populációból 161, a VRH3322 (VRH3176-21-11 x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) populációból 419 magoncot állítottak elő a rekombinánsok azonosítása céljából (Pauquet *et al.* 2001).

Egy másik *M. rotundifolia x V. vinifera* keresztezéséből származó populáció egyedein vizsgálták a genetikai markereket, mind lisztharmatra, mind pedig peronoszpórára Merdinoglu és munkatársai (Merdinoglu *et al.* 2003). Egyetlen olyan növényt sem sikerült

azonosítani, melyben el lehetett volna különíteni a lisztharmat rezisztenciáért felelős lokuszt a peronoszpóráért felelőstől, ami azt bizonyítja, hogy az *RPV1* gén a *RUN1*- el szoros kapcsoltságban van, tehát a *M. rotundifolia*-ból introgresszálódott régión belül helyezkedik el (Merdinoglu *et al.* 2003; Luo *et al.* 2001, Fisher *et al.* 2004, Schmidlin *et al.* 2006).

A *Run1* és az *Rpv1* lokuszok sematikus ábráját Merdinoglu, Barker és DiGaspero munkatársai által készített térkép alapján a 11. ábra szemlélteti (Merdinoglu *et al.* 2003; Barker *et al.* 2005. és DiGaspero *et al.* 2007).

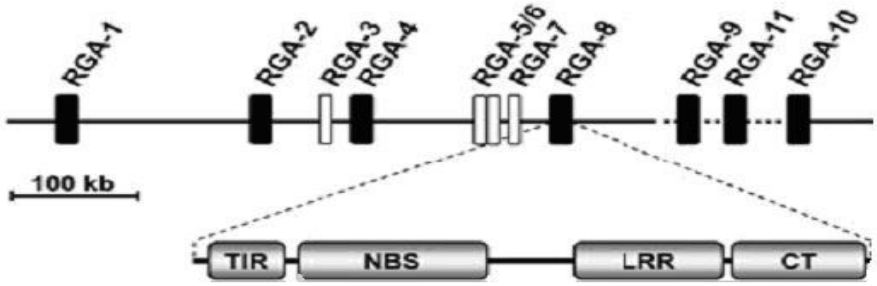


11. ábra. A *Run1* és *Rpv1* lokusz fizikai térképe (Merdinoglu *et al.* 2003; Barker *et al.* 2005; és DiGaspero *et al.* 2007 nyomán)

A *RUN1* és *RPV1* rezisztencia gének (RGA) TIR-NBS-LRR típusú fehérjéket kódolnak, melyek felépítése nagyon hasonló az árpából izolált *Mlo* fehérjéhez (Donald *et al.* 2002). Az *MLO* gént 1942 óta ismerik, de nemesítési értékét sokáig megkérdőjelezte, hogy

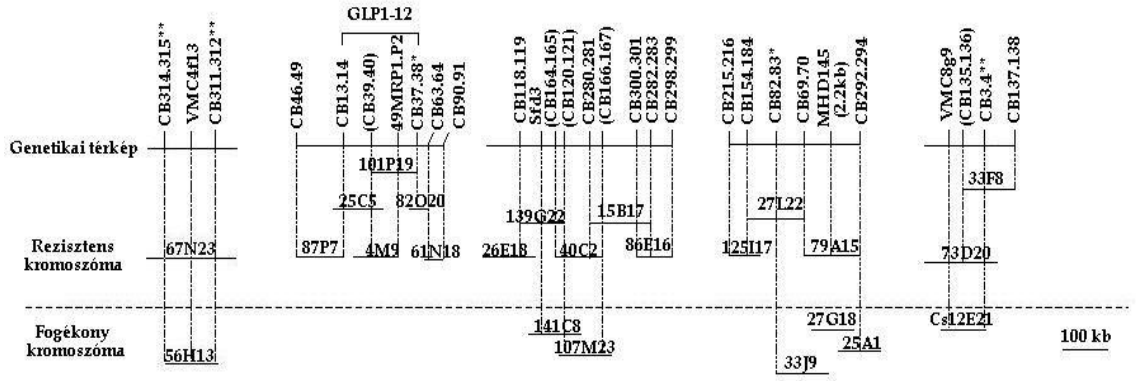
gyakran nekrotikus tünetekkel jelentkezett, ami a lisztharmat kártételénél is nagyobb termésveszteséget okozhatott. E hátrányát a nemesítés 1979-re küszöbölte ki. Az első Atem fajtát újabb és újabb fajták követték. Az eredmények annyira igéretesek voltak, hogy ma már a tavaszi árpa lisztharmattal szembeni rezisztencianemesítése túlnyomóan az *mlo*-rezisztenciára épül (Chelkowski *et al.* 2003). Az *mlo* alapú lisztharmat rezisztencia pontos folyamatai máig nem ismertek. Azonban 17 feltételezett *MLO* gént azonosítottak a megszekvenált *V. vinifera* genomban. A génexpressziós vizsgálatokat követően megállapították, hogy a *VvMlo* géncsalád tagjai eltérő módon reagálnak az abiotikus és biotikus környezeti hatásokra. A lisztharmat fertőzést követően a 14 *VvMlo* gén íródott át a szövetekben, ezek közül 2 transzkripciós aktivitása volt magasabb (Jaillon *et al.* 2007; Velasco *et al.* 2007; Feechan *et al.* 2009).

A további genetikai analízisek során megállapították, hogy a *Run1* / *Rpv1* lokusz hozzávetőleg 1 Mbp nagyságú szakaszon belül található. A régió szekvenálásával 11 RGA jelenlétét bizonyították. Az RGA szekvenciák közelebbi vizsgálata azt mutatja, hogy a rezisztencia génanalóg családok 6 teljes-hosszúságú gént (*RGA-1*; *RGA-2*; *RGA-4*; *RGA-8*; *RGA-9* és *RGA-11*), valamint 4 részleges hosszúságú vagy nem-funkcionális gént (*RGA-3*; *RGA-5*; *RGA-6* és *RGA-7*) tartalmaznak (Dry *et al.* 2009) (12. ábra).



12. ábra. A rezisztencia génanalógok (RGA) csoportjai a *Run1* lokuszon (Dry *et al.* 2009)
Jelölések: fekete téglalapok jelölik a teljes hosszúságú géneket; fehér téglalapok jelölik a nem teljes hosszúságú géneket; CT -C-terminális domén meghatározatlan funkcióval; szaggatott vonal jelzi a genomiális DNS átfedő régióit.

A *RUN1*-et tartalmazó, lisztharmat-fertőzésnek ellenálló szőlő egyedeken expressziós vizsgálatokat hajtottak végre, reverz transzkriptáz-PCR analízist. A vizsgálat teljes egészében igazolta, hogy az összes teljes-hosszúságú kódoló szekvencia, mint az *RGA-1*, *RGA-2*, *RGA-4* és *RGA-8* expresszálódott az ellenálló növényekben. A *Run1* lokusz fizikai térképét a 13. ábra szemlélteti.



13. ábra: A *Run1* lokusz fizikai térképe, melynek mérete közel 2Mb (Barker *et al.* 2005).

A VMC4f3.1 és a VMC8g9 markerek közötti fizikai távolságot határozták meg, mely nagyobbnak bizonyult, mint amit a genetikai térkép alapján vártak. A *Run1* / *Rpv1* lokuszt tartalmazó „szűk" genomi régióban további rekombinánsok azonosítása vált emiatt szükségessé (Barker *et al.* 2005; Dry *et al.* 2009).

2007-ben a Fischer és munkatársai által készített térkép (Fischer *et al.* 2004) SSR markerekkel kibővített változatán további lisztharmat–és peronoszpóra rezisztencia QTL-eket azonosított Welters és csoportja. Megállapították, hogy a peronoszpóra rezisztencia két, egy fő–és egy al QTL-ből tevődik össze, melyek a 18. és a 4. kapcsoltsági csoporton helyezkednek el. A lisztharmat ellenállóképességért felelős QTL-ek a 15. kapcsoltsági csoporton találhatóak (Welter *et al.* 2007).

A markerekre alapozott szelekció (MAS) nagymértékben gyorsíthatja a megfelelő rezisztencia-forrásokból származó rezisztencia gének introgresszióját az értékes, jó minőségű fajtákba. A rezisztencia génekkel koszegregáló kapcsolt markerek a vad fajokból származó rezisztencia gének nemes fajtákba történő bevitelének gyorsítása mellett, a *V. vinifera* fajtákban is elősegíti a kedvező allél-társulások, haplotípusok felfedezését.

Ezekre az eredményekre alapozva kezdtük meg a pécsi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben előállított (*M rotundifolia* x *V. vinifera*) BC_4 x *V. vinifera* cv. CardinaI BC_5 nemzedékének molekuláris vizsgálatát a *Run1* és *Rpv1* lokusszal kapcsolt DNS markerekkel (Donald *et al.* 2002) olyan növényegyedeken, amelyek egyrészt súlyos lisztharmat fertőzési tüneteket mutattak a leveleken, másrészt tünetmentesek voltak.

A rezisztenciagénekkel kapcsolt markerek azonosítása lehetővé teszi a minőségi tulajdonságokat determináló génekkel való kapcsoltság meghatározását is (Marino *et al.* 2003, Zyprian *et al.* 2005).

Kozma Pál és munkatársai további hibridcsaládokat állítottak elő, melyekbe már nemcsak az észak-amerikai *Vitis* fajokat, vagy a *M. rotundifolia* fajt vonták be, hanem olyan közép-ázsiai *V. vinifera* eredetű fajtákat is, amelyek ellenállóak lisztharmattal szemben. Az 1960-as években írták le, hogy léteznek olyan *V. vinifera* fajták, amelyek *E. necator* rezisztensek. Közéjük tartozik a *Dzsandzsal kara* (Korbuly, 1999) és a *Kismis vatkana* (Kozma *et al.* 2006). Ilyen hasadó hibridcsalád a 04-10/325 (*V. vinifera* cv *Kismis vatkana* x *V. vinifera* cv. *Nimrang*), melyben a lisztharmattal szemben ellenálló *Kismis vatkanát* keresztezték a fogékony *Nimranggal*. Az utódnemzedék 1:1 arányban hasadt rezisztens és szenzitív fenotípusokra, ami arra utalt, hogy a *Kismis vatkana* egy domináns rezisztencia gént hordoz (heterozigóta formában). Ezt a gént *REN1*-nek (Resistance to *Erysiphe necator*) nevezték el (Kozma *et al.* 2006). BSA analízissel meghatározták, hogy a rezisztenciáért felelős a *REN1* gén a 13-as kromoszómán helyezkedik el. Tehát a *K. vatkana* lisztharmat rezisztencia génje különbözik a *M. rotundifolia* faj rezisztencia génjétől (Hoffmann *et al.* 2008). Ezért több kutatócsoport is foglalkozik a távol-keleti *V. vinifera* fajok (*V. amurensis, V. romanetii*) rezisztenciájával. A távol-keleti *Vitis* fajok könnyen keresztezhetőek egymással, és nem jellemző rájuk a minőséget jelentősen rontó „poloska” íz (Riaz *et al.* 2011). A *RUN1*, az *RPV1* és a *REN1* gének azonosítását követően további lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciáért felelős lókuszok térképezése kezdődött meg a már korábban említett új génforrások felhasználásával. A *M. rotundifolia* 18-as kapcsoltsági csoportjára két rezisztencia lókuszt térképeztek: a *Run2*-őt (’Magnolia’- *Run2.1* és ’Trayshed’- *Run2.2*) (Riaz *et al.* 2011) és az *Rpv2*-őt (’Trayshed’) (Wiedermann-Merdinoglu 2006; Bellin *et al.* 2009). Ezen kívűl azonosították az *Rpv3*-at (18-as kapcsoltsági csoport) és az *Rpv4*-et (4-es kapcsoltsági csoport) (Welter *et al.* 2007; Bellin *et al.* 2009). A *V. amurensis* 14-es kapcsoltsági csoportjára egy peronoszpóra fő QTL-t, az *Rpv8*-at térképezték (Blasi *et al.* 2011). A térképezési vizsgálatokba az ázsiai eredetű *V. romanetii*-t is bevonták, amelynek a 18-as kapcsoltsági csoportjában, egy domináns lisztharmat rezisztencia lókuszt, a *Ren4*-et azonosították (Ramming *et al.* 2011; Riaz *et al.* 2011; Mahanil *et al.* 2010). Ez további kutatási lehetőséget ad, a különböző genetikai forrásokból származó rezisztencia gének vizsgálatára, illetve összehasonlítására. A szőlőben eddig térképezett lisztharmat és peronoszpóra géneket / QTL-eket az 4. táblázat foglalja össze (Katula-Debreceni, 2011).

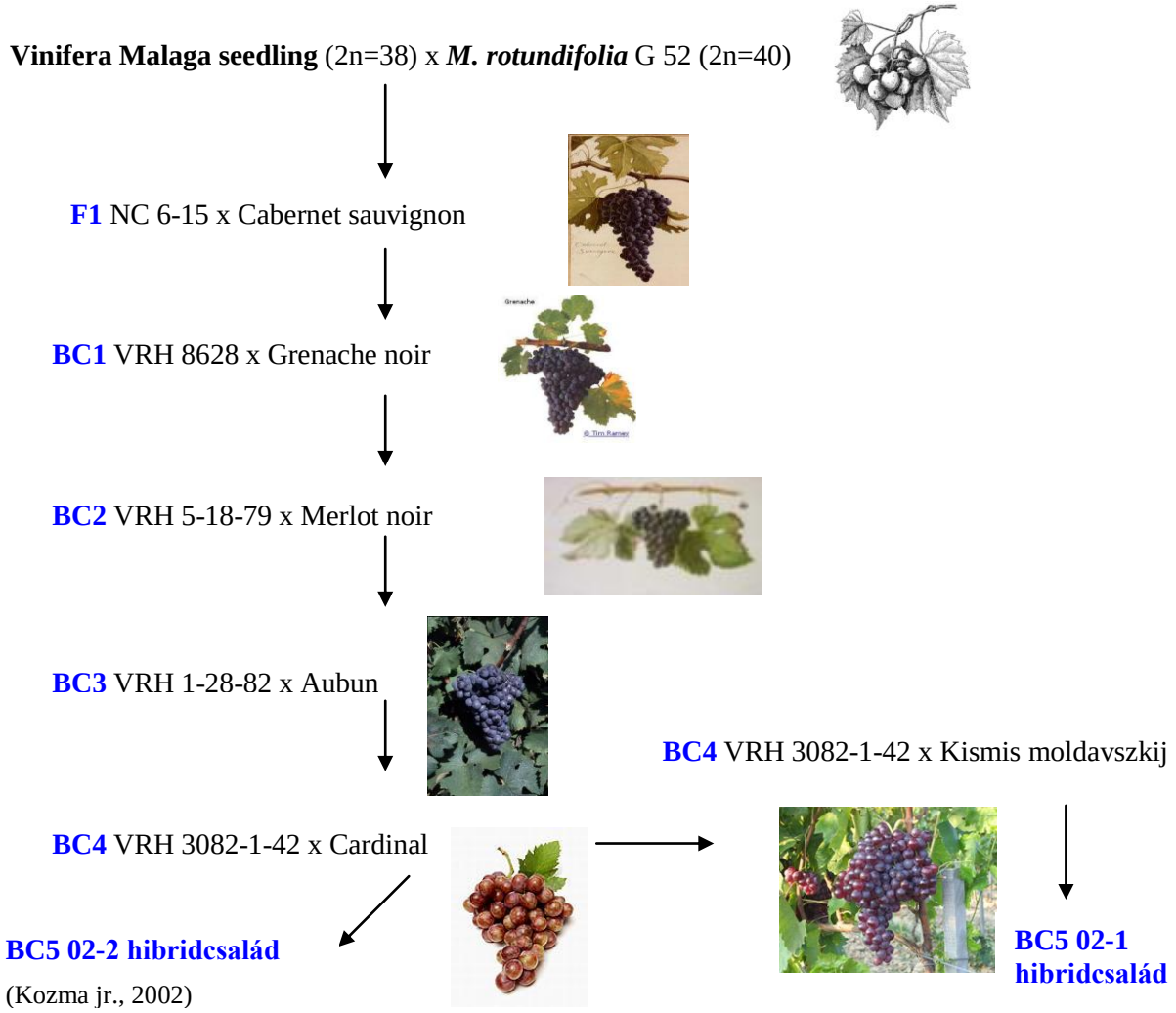
4. táblázat: A szőlőben azonosított lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia gének

Lokusz	LG	Forrás (fajta / törzs)	Rezisztencia	Hivatkozás
Run1	12	*M. rotundifolia* 'G-52'	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.* 2010
Rpv6	12	*V. riparia* 'Glorie de Montpellier'	QTL, kvantitatív / részleges	Marguerit *et al.* 2010
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

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Növényanyag

A vizsgálatok növényanyagát a pécsi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetében ifj. Kozma Pál és munkatársai állították elő. A Bouquet (1986) által létrehozott VRH 3082-1-42 jelű BC_4 lisztharmat és peronoszpóra rezisztens hibridet az érzékeny Cardinal (02-02 hibridcsalád) és Kismis moldavszkij (02-01 hibridcsalád) csemegeszőlő fajtákkal keresztezték (**14.** ábra). A 02-02 BC_5 hibrid nemzedék 150, a 02-01 család 54 magoncát vizsgáltuk a *RUN1* és *RPV1* lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia génekkel kapcsolt molekuláris markerekkel.



14. ábra: A Pseudo-Backcross módszerrel előállított 02-1 és 02-2 hibridcsalád (Kozma jr., 2002)

3.2 Alkalmazott módszerek

3.2.1 DNS-extrakció

Első lépésben, a lisztharmat-fertőzési tünetekben eltérő 20-20 növény vizsgálatát végeztük el a 02-02-es hibridcsaládban, ezután a hasadó BC_5 nemzedék 150 egyedét elemeztük a szülőkkel együtt (rezisztens szülő: [*M. rotundifolia* x *V. vinifera*] BC_4; fogékony szülő Cardinal fajta). Ezt követően vizsgáltuk a BC_4 x Kismis moldavszkij (02-01-es hibridcsalád) lisztharmat tünetek alapján nem szelektált 50 egyedét.

Mind a (*M. rotundifolia x V. vinifera*) BC_4 x *Cardinal* 02-02, mind pedig a (*M. rotudifolia x V. vinifera)* BC_4 x Kismis moldavszkij 02-01 hibridcsaládból származó BC_5 egyedek friss, fiatal hajtáscsúcsi leveleit válogattuk ki DNS izolálásra.

A genomi DNS-t a Qiagen cég DNeasy Plant Mini Kit DNS-izoláló rendszerrel vontuk ki (A részletes leírást a 7. 1. számú melléklet tartalmazza).

A sejtmagból izolált DNS minőségét és mennyiségét egyrészt agaróz gélen etidium–bromidos festést alkalmazva határoztuk meg, másrészt NanoDrop™ ND-1000 készülékkel ellenőriztük (A módszer részletes leírását a 7. 4. melléklet tartalmazza).
A készülék és a szoftver segítségével meghatároztuk a felhasználandó minta koncentrációját, az abszorpciós görbe lefutásából a DNS minta tisztaságára is következtethettünk.

3.2.2 Polimeráz láncreakció (PCR)
CAPS módszer; restrikciós emésztés és mikroszatellit elemzés

A molekuláris vizsgálatokat Halász *et al.* (2005 a. és 2005 b.) szerint hajtottuk végre. A PCR-RFLP reakciókhoz a GLP1-12P1 és a GLP1-12P3 primereket és *Eco*RI restrikciós enzimmel való emésztést alkalmaztunk (Donald *et al.* 2002), a mikroszatellit elemzésekhez a VMC4f3.1 (Di Gaspero *et al.* 2000), VMC8g9, VMC4f.3.1 (Barker *et al.* 2005) és VMC1g3.2 (Merdinoglu *et al.* 2003) SSR primereket használtuk, a BAC-klón-spcifikus szekvenciákat (CB69.70, CB137.138) Ian Dry (CSIRO, Ausztrália) bocsátotta rendelkezésünkre.

A polimeráz láncreakciók végtérfogata 25 µl volt, mely 25-50 ng genomi DNS-t és az 5. **táblázatban** feltüntetett komponenseket tartalmazza.

5. táblázat: A rezisztencia-analízis során alkalmazott reakcióelegy összetétele

Elemek	Alkalmazott mennyiség/minta	Koncentráció
PCR-puffer	2, 5 µl	**1x**
dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	0, 6 µl	**75 µM**
$MgCl_2$	1 µl	**3 mM**
Primer1	2, 5 µl	**1,2 µM**
Primer2	2, 5 µl	**1,2 µM**
Taq-polimeráz (Westeam)	1 µl	**1 Unit**
Ioncserélt víz	13 µl	**-**
DNS-minta	**5 µl**	**25-50 ng/µl**

A reakciót Bio-Rad iCycler készülékben végeztük, a következő program alapján: 2 perc 95 ˚C elődenaturáció, amit követett 35 cikluson keresztül 30 másodperc 95 ˚C denaturáció, 30 másodperc 57-58 ˚C primer kapcsolódás, 1 perc 30 másodperc 72˚C polimerizáció, az utolsó ciklus után 2 perc 72˚C utópolimerizáció. A PCR-ekben a RGA eredetű (CAPS/GLP1-12), BAC-klón eredetű (CB69; CB70, CB138, CB139) és mikroszatellit (VMC4f3.1, VMC8g9, VMC1g3.2) primereket alkalmaztunk.

A GLP1-12P1 és GLP1-12P3 (Donald *et al.* 2002.) primerekkel az PCR-RFLP, vagy más néven a CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) módszert alkalmaztuk (Konieczny és Ausubel, 1994.). Ehhez a PCR-t követően az amplifikátumok restrikciós emésztésére volt szükség. A PCR termék 10 µl-ét *EcoR*I restrikciós enzimmel hasítottuk, melyhez 0,5 µl *EcoR*I (10 u/µl; Fermentas) enzimet, 3 µl vizet és 1,5 µl puffert (Fermentas, Tango ^{TM}) adtunk, majd az elegyet 1,5 – 2 órán át 37 ^{o}C-on inkubáltuk.

A mikroszatellit elemzéshez a VMC4f3.1, VMC8g9 és VMC1g3.2 mikroszatellit forward primereit Cy-5 festékkel (fluoreszcens) jelöltettük meg, így az ALF Express II. (Amersham Biosciences, AP Hungary Kft. Budapest) készülék segítségével a pontos allélméretek meghatározhatók. A Barker és munkatársai által leírt CB primer szekvenciákat (Barker *et al.* 2005), amelyek BAC-klón eredetűek és *RUN1* specifikus domináns markerek, Ian Dry bocsátotta rendelkezésünkre. Lokalizációjuk a 13. ábrán látható.

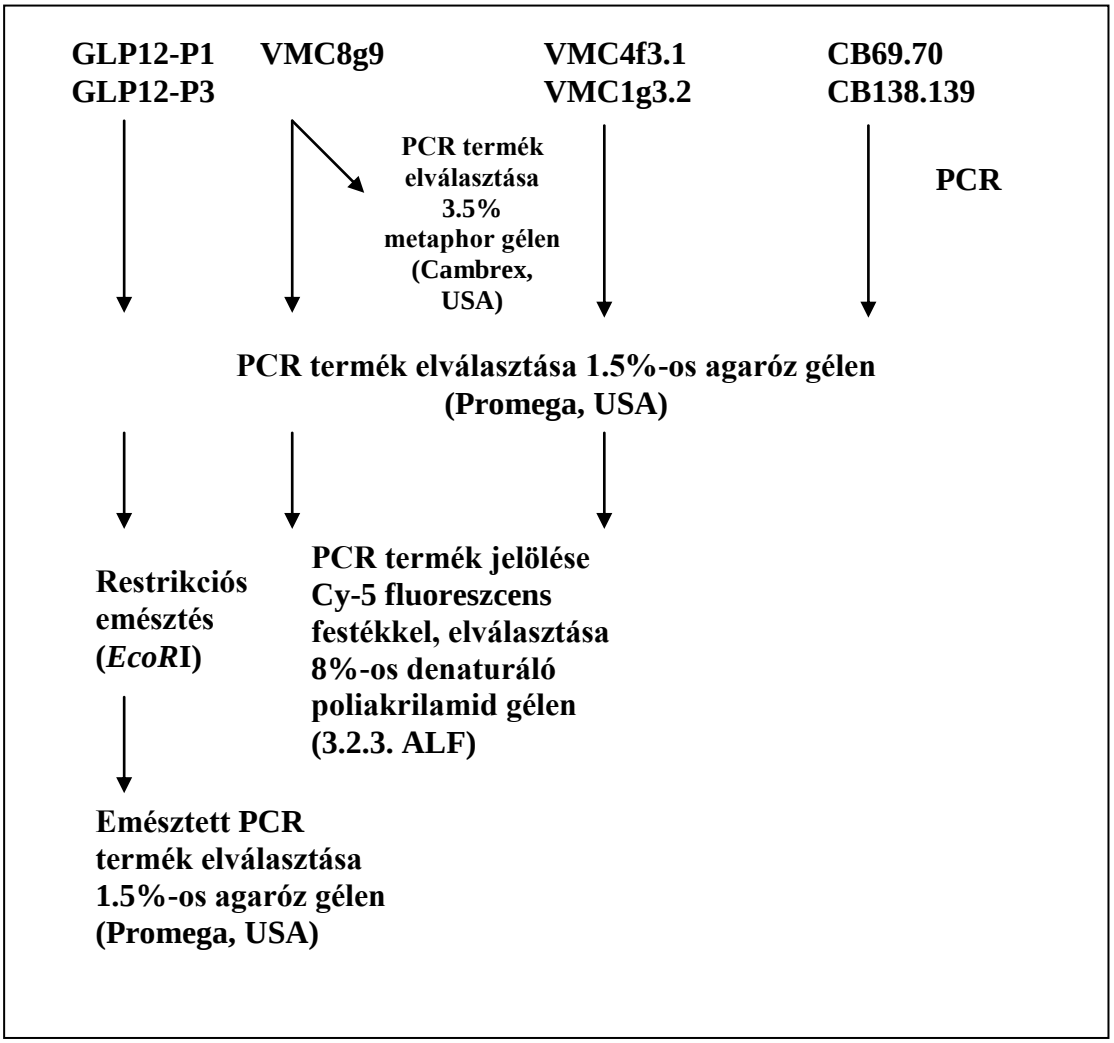
A VMC8g9 mikroszatellit primerrel kapott allélokat nemcsak poliakrilamid gélen, hanem metaphor agaróz gélen (Cambrex Bio Science, Rockland, ME, USA) 1xTBE puffer alkalmazásával is elválasztottuk.

Az alkalmazott primerek szekvenciáit a **6. táblázat** tartalmazza.

6. táblázat: Az alkalmazott primerek szekvenciái

Primer neve	Szekvencia (5'-3')	Kapcsolódási hőmérséklet	Hossz	Típus	Hivatkozás
GLP1-12P1	GGAATATTTACTTGGACATCG	57°C	21	RGA	Donald *et al.* 2002
GLP1-12P3	CATTTGAATTGGACGATACTC	57°C	21	RGA	
VMC8g9-F	AACATTATCAACAACATGGTTTTA	58°C	24	SSR	Barker *et al.* 2005
VMC8g9-R	ATATTCATCCTTCCCATCACTA	58°C	22	SSR	
VMC4f3. 1 F	AAAGCACTATGGTGGGTGTAAA	58°C	22	SSR	
VMC4f3. 1 R	TAACCAATACATGCATCAAGGA	58°C	22	SSR	
VMC1g3.2 F	GATAGTTACCATACTTAGTCGGA	58°C	23	SSR	
VMC1g3.2 R	ACTTAGCTTCAGAAGAAAATAGA	58°C	23	SSR	
CB69	GAAAGTAAGGAGACAAGGCG	57°C	20	BAC klón eredetű	Ian Dry személyes közlés
CB70	CACTTGCTTCTCCATTACCC	57°C	20	BAC klón eredetű	
CB137	GGATAGGACATGCTATCG	57°C	18	BAC klón eredetű	
CB138	CATCTTTTCAGGGATCGAG	57°C	19	BAC klón eredetű	

A PCR termékeket és az emésztett fragmentumokat is gélelektroforézissel választottuk el. A 15. ábra részletesen bemutatja az elválasztás menetét a GLP1-12P1 és GLP1-12P3 primerekkel és a restrikciós emésztést követően, valamint a VMC4f3.1, VMC8g9, VMC1g3.2, CB69.70 és a CB138.139 primerekkel végzett vizsgálatok során.



15. ábra: A fragmentumok elválasztásának és detektálásának folyamatábrája

A fragmentumok elválasztáshoz 1,5%-os agarózt (Promega, USA) vagy 3,5% metaphor agaróz gélt (Cambrex, USA), és 1x TBE puffert (89 mM Tris-Borát, 2 mM EDTA) használtunk. A gélt 1,5 mg/ml (1,5 µl / gél) etídium-bromid oldattal festettük. A minták felviteléhez 3 µl (mintánként) brómfenol-kék festéket használtunk. A fragmentumokat UV-lámpa segítségével tettük láthatóvá. A fragmentumok méretét 50 bp-os és 100 bp-os molekula tömegmarkerekhez (GeneRuler 100 bp vagy 50 bp Ladder Plus, Fermentas, Lithuania, BIOCENTER Kft, Szeged) viszonyítottuk.

3.2.3 ALF – Automata Lézer Fluorométer

A pontos allélméret meghatározást az ALF Express II. készülékben végeztük el (7.2. melléklet), mely során a VMC4f3.1, VMC8g9 és a VMC1g3.2 forward primereit Cy-5 fluoreszcens festékkel jelöltük meg (IDT Inc., BioSciences Kft. Budapest), mely vörös lézerfénnyel gerjeszthető. A jelölt nukleinsav mintákat 8%-os denaturáló poliakrilamid gélen (ReproGel - Amersham Biosciences, AP Hungary Kft. Budapest) választottuk el.

A denaturáló gélkazettát közvetlenül a vizsgálat előtt készítettük el. A kazetta egy termo–és egy fedőlemezből áll, mely közé, még a folyékony állapotban lévő 8 %-os poliakrilmaid gélt, egy speciális kiöntő tubus segítségével juttattuk be. Ezt követően az ún. „fesű" behelyezésével zsebeket alakítotunk ki a gél felső részén, amely megfelelő a 6-10 µl térfogatú minta befogadására. A fésű behelyezését követően a kazettában található gélt 10 percig UV fénnyel szilárdítottuk meg. A gél vastagsága a „spacerek" (a két üveglap közötti távolság beállítására szolgáló üveglemezek), valamint a „fésűk" függvényében 3 mm vagy 5 mm lehet. Vizsgálataink során az elválasztást 5 mm vastagságú gélen végeztük. A megszilárdult gélt 0,5 X TBE pufferbe helyeztük (pH = 8,13 – 8,23), a fluoeszcensen jelölt mintákhoz hozzáadtuk a molekulatömeg standardokat és a denaturálást végeztünk a Bio-Rad iCycler készülékben.

A vizsgálataink során kapott allélméretek a 100 – 190 bp mérettartományba estek, ezért a 95 bp, 275 bp vagy 300 bp közötti molekulatömeg standardot alkalmaztuk. Az elválasztáshoz és a detektáláshoz a **7. táblázatban** foglalt paramétereket használtuk.

7. táblázat: ALF Express II. készülék beállítási paraméterei

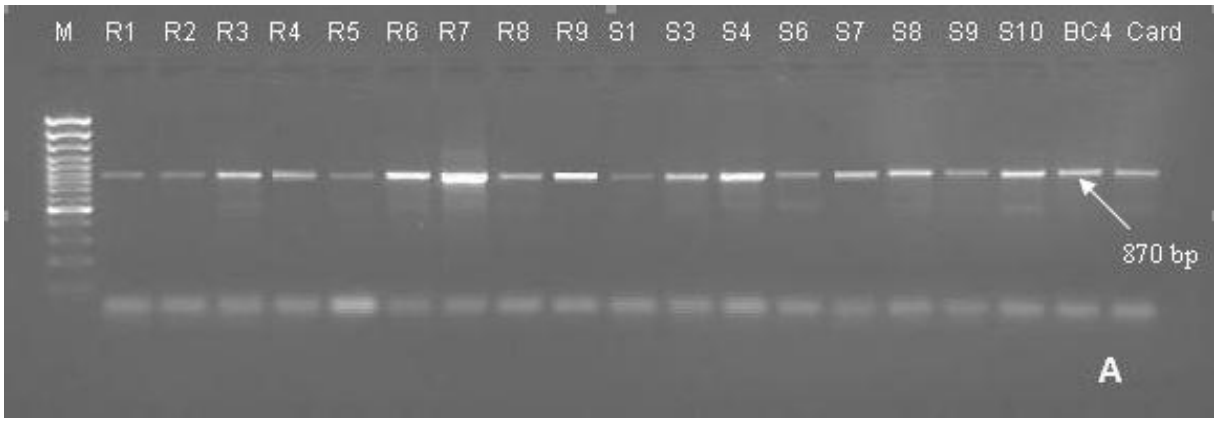
Hőmérséklet	55 ^{0}C
Feszültség	1000 Volt
Áramerősség	45 mA
Teljesítmény	30 Watt
Futtatási idő	2 óra

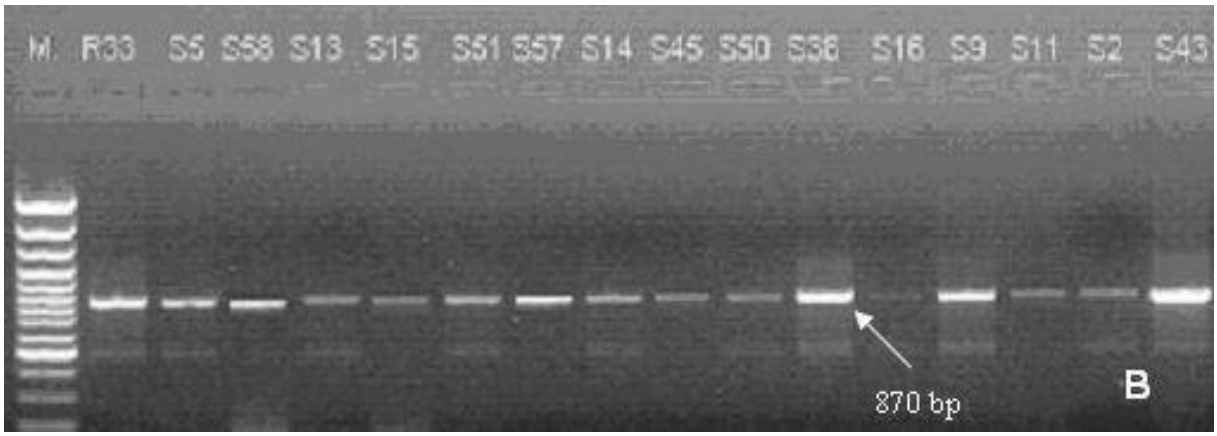
4 EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1 A *RUN1* lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt molekuláris markerek a BC_4 x Cardinal hibridcsaládban (02-02-es család)

A 02-02 hibridcsalád 20 tünetmentes és 20 fertőzött egyedét vizsgáltuk először a Donald és munkatársai által leírt GLP1-12P1 - GLP1-12P3 primerpárral (Donald *et al.* 2002).

A primerek alkalmazásakor mind a 40 egyed esetében felszaporodott a várt 870 bp méretű fragmentum, amely a GLP–primerpár eredményes működését igazolta (16/A és 16/B ábra), de az így kapott monomorf mintázat nem volt alkalmas a lisztharmatfertőzést mutató, valamint a tünetmentes egyedek elkülönítésére.

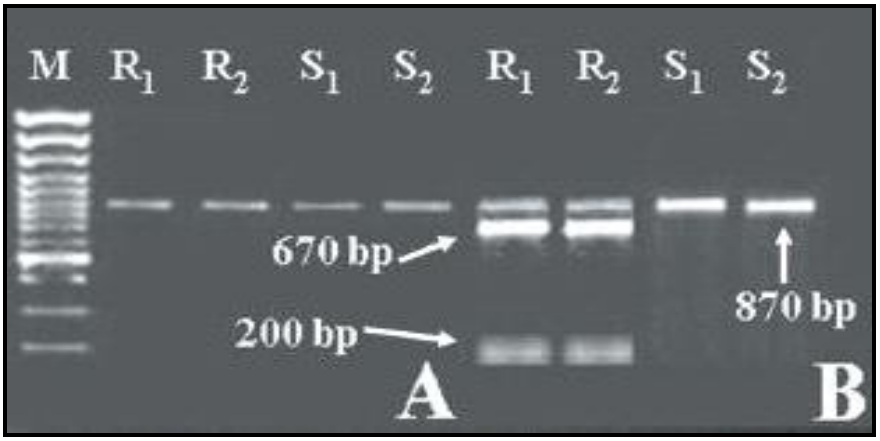




16/A és 16/B ábra: A BC_5 nemzedék különböző genotípusainak vizsgálata a GLP1-12P1 - GLP1-12P3 primerpárral. A 870 bp méretű fragmentum minden mintában felszaporodott, monomorf mintázatot eredményezve.

A PCR termék *Eco*RI enzimmel való emésztése után (PCR-RFLP) a genotípusok egyértelműen megkülönböztethetőek voltak egymástól: míg a fogékony növények DNS-éből származó fragmentum nem emésztődött, addig a tünetmentes növények esetében a 870 bp mellett egy 670 és 200 bp méretű szakasz jelent meg az agaróz gélen (17. ábra). Ezzel nemcsak a GLP1-12P1 - GLP1-12P3 primerpár *RUN1* markerként történő alkalmazhatóságát bizonyítottuk, hanem azt is, hogy a rezisztens egyedek heterozigóták a *Run1* lokuszra.

Ezt követően a (*M. rotundifolia x V. vinifera*) BC_4 x *Cardinal* 02-02 hibridcsalád többi egyedét, összesen 150 utódot is teszteltünk a GLP-primerpárral. Hatvanhat tünetmentes utód esetében kaptunk a 17. ábra R1; R2 genotípusával azonos mintázatot a 870 bp méretű PCR fragmentum *Eco*RI emésztése után, és 63 utód S1; S2 genotípusú. Ez – egy kivétellel – megegyezett a fenotipizálási eredményekkel.



M: Molekula tömeg marker (Fermentas 100 bp ladder plus)
R_1; R_2 (A): a lisztharmat tünetektől mentes
S_1; S_2 (A): a fertőzött vonalak PCR fragmentumai a GLP1-12P1P3 primer párral
R_1; R_2 (B): tünetmentes (rezisztens) egyedek a PCR termék restrikciós emésztése után (*Eco*RI)
S_1; S_2 (B): fertőzött (fogékony) egyedek mintázata a PCR termék restrikciós emésztése után (*Eco*RI)

17. ábra: A 02-02 hibridcsalád néhány egyedének vizsgálata GLP1-12P1; GLP1-12P3 primerpárral

A GLP1-12P1; GLP1-12P3 mellett két mikroszatellit primerpárt, VMC4f3.1-et és VMC8g9-et (Barker *et al.* 2005), is bevontuk a vizsgálatokba. Mind a VMC4f3.1 mind, pedig a VMC8g9 esetében meg kellett határoznunk a *RUN1* génnel kapcsolt markerallél méretét.

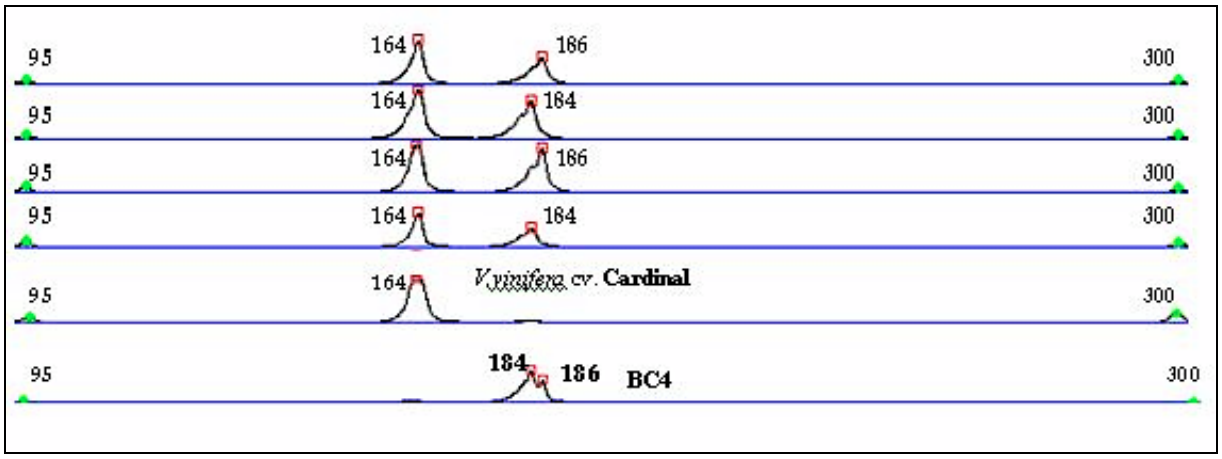
A VMC4f3.1 primerpárral kapott ALF-elemzés egy részletét mutatja be a 18. ábra. A rezisztens BC_4 genotípusa 184:186, a szenzitív Cardinal-é 164:164 bp. A szegregáló BC_5 nemzedékben az ellenálló egyedek genotípusa a VMC4f3.1 markerrel 164:186 bp, míg a

fogékonyaké 164:184 bp, tehát csak 2 bp különbség van a rezisztenciát vagy a fogékonyságot jelző markerallél között.

A rezisztens BC_4 genotípusa VMC8g9 primerrel 160:167 bp, a fogékony Cardinal-é 179:179 bp. A szegregáló BC_5 nemzedékben a rezisztens egyedek a VMC8g9 markerrel 160:179 bp, a fogékonyak 167:179 bp genotípusúak, azaz a 160 bp hosszúságú fragmentum kapcsolt a *RUN1* rezisztencia génnel. A VMC8g9 alkalmazásakor a kapott ALF eredményeket a 23. ábra mutatja be.

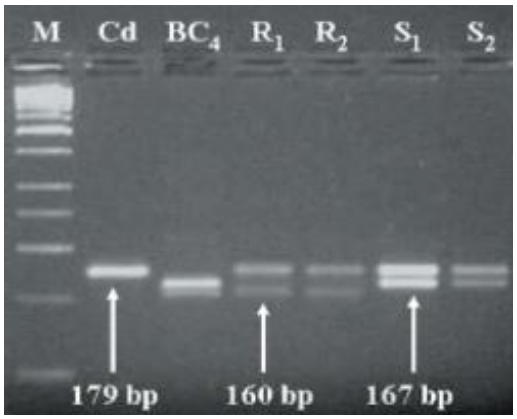
A GLP1-12P1 - GLP1-12P3 primerpár és a két mikroszatellit (VMC4f3.1 és a VMC8g9) marker alkalmas a MAS-ra, de a GLP1-12P1P3 alkalmazását nehézkessé teszi, hogy a PCR terméket restrikciós endonukleázzal meg kell emészteni. A SSR markerek esetében viszont a pontos allélméret meghatározásához fluoreszcens festékkel jelölt forward primereket és speciális berendezést kell alkalmazni.

A MAS rutinszerű gyakorlati alkalmazása, egyszerűen kivitelezhető módszereket igényel. A VMC4f3.1 esetében a 2 bp-os különbség kimutatására, még a jó minőségű, nagy felbontóképességű agaróz gélek sem használhatóak, ezért Automata Lézer Fluorométert (ALF) használtunk.



18. ábra: A VMC4f3.1 mikroszatellit primerekkel kapott néhány genotípus ALF Express II. készülékkel készített elektroforetogramja

A VMC8g9 esetében a 160-167 bp–os allélek elkülönítésére érdemesnek látszott az egyszerűbb, agaróz alapú elválasztási technika kidolgozása, ezért a VMC8g9 PCR termékeket nagy felbontó képességű 3,5% metaphor agaróz gélen is elválasztottuk. A 19. ábrán jól látható, hogy a rezisztens és a fogékony genotípusok jól elkülöníthetőek egymástól. Az ellenálló minták fragmentumai 160:179 bp, a fogékony egyedek allélméretei 167:179 bp méretűek.



Cd: Cardinal (szenzitív)
BC_4: az ellenálló (rezisztens) szülő (VRH 3082-1-42)

R_1; R_2 (C): rezisztens minták
S_1; S_2 (C): fogékony egyedek

19. ábra: A 02-02 hibricsalád egyedeinek vizsgálata VMC8g9 primerrel – a fragmentumok elválaszása metaphor gélen (3,5%)

A mikroszatellit analízis arra is lehetőséget ad az allélméretek alapján, hogy az idegen megporzásból származó egyedeket kizárjuk a nemesítési munkából. Az ilyen eltérő, a szülői kombinációknak nem megfelelő allélméretek, illetve bizonytalan fenotipizálás miatt 21 mintát kihagytunk az adatok értékeléséből. A 8. táblázatban foglaltuk össze a hasadó nemzedék 129 tagjára és a szülőkre vonatkozó adatokat.

8. táblázat: A lisztharmat-fertőzési tünetek és a markerekkel kapott eredmények összehasonlítása (az árnyékolt számok a rezisztenciát jelző allélméreteket jelölik)

Fajta	**Fenotípus**		**Molekuláris markerek**					
	Tünet-mentes	Fertőzött	**GLP1-12P1P3**		**VMC4f3.1** allélek (bp)		**VMC8g9** allélek (bp)	
	R	**S**	**R** (a PCR fragmentum *Eco*RI-el emésztődött)	**S** (a PCR fragmentum *Eco*RI-el nem emésztődött)	**R** 186	**S** 184	**R** 160	**S** 167
Cardinal	-	+	-	+		164: 164		179: 179
BC_4	+	-	+	-	184: 186		160: 167	
BC_5 növények	67	62	66	63	164: 186	164: 184	160: 179	167: 179
					61	68	66	63
χ^2	0,193		0,068		0,378		0,068	
χ^2 **Yates korrekcióval**	0,124		0,031		0,193		0,031	
χ^2 **érték (P=0,5%)**	3,84							
„Rekombináns" genotípusok aránya			1/129=0,007		13/129=0,100		5/129=0,038	

Az üvegházi fertőzést követően a tünetmentes és a fertőzött növények 67: 62-es aránya a mendeli 1: 1-es hasadási aránynak felel meg. A GLP1-12P1 – GLP1-12P3-as markerrel ugyanezekre a vonalakra 66: 63-as, a VMC4f3.1 markerrel 61:68, és a VMC 8g9 markerrel 66:63 hasadási arányt kaptunk. A hasadási arányokat χ^2 próbával értékelve a fenotípusos és a marker genotípusok 1:1 aránya staisztikailag is igazolható.

Mindhárom marker esetében találtunk olyan genotípusokat, amelyek rezisztens fenotípusnak bizonyultak, ugyanakkor nem a rezisztencia markerallélt hordozták:

- a GLP1-12P1 – GLP1-12P3 PCR fragmentum nem emésztődött *Eco*RI enzimmel,
- a VMC8g9 160 bp méretű fragmentuma helyett a 167-es volt megtalálható bennük,
- a VMC4f3.1 esetében pedig az ellenálló fenotípushoz nem tartozott a rezisztenciát jelző markerallél.

A feltételezett „rekombinánsok" megjelenése ellenére a GLP1-12P1 - GLP1-12P3, a VMC4f3.1 és a VMC8g9 markerek alkalmasak molekuláris szelekcióra (MAS), hiszen a marker-genotípus alapján 90-99%-ban olyan növényeket válogatunk ki, amelyek tartalmazzák a *RUN1* domináns lisztharmat rezisztenciagént. A VMC4f3.1 esetében egy 186 bp, a VMC8g9 alkalmazásakor, pedig egy 160 bp méretű allél bizonyult lisztharmat rezisztenciával kapcsolt markernek.

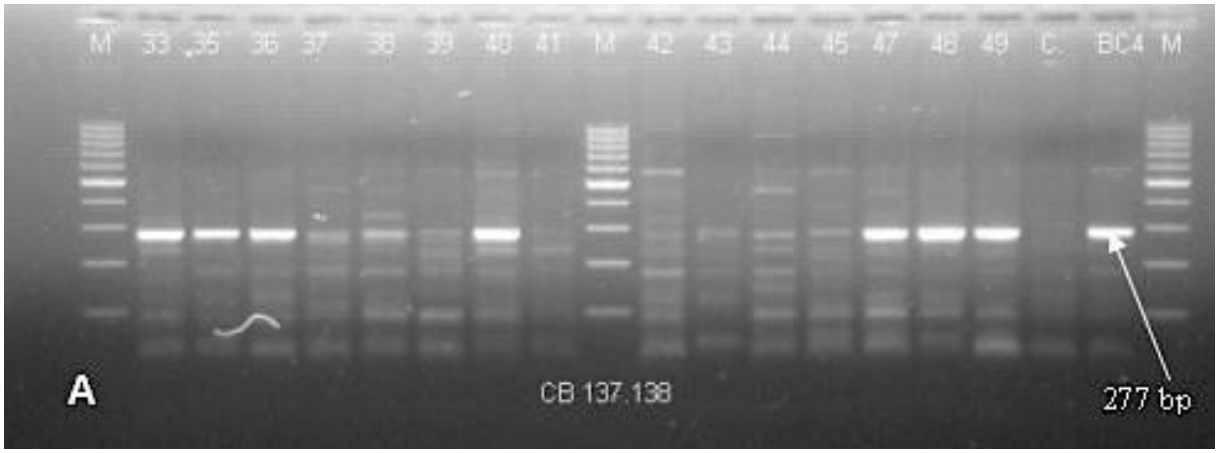
A „rekombinánsok" további elemzése a fenotipizálás és a molekuláris elemzések megismétlését, illetve bővítését igényelné, amellyel bizonyítható, hogy valódi rekombinánsokat találtunk-e vagy kísérleti hiba fordulhatott elő.

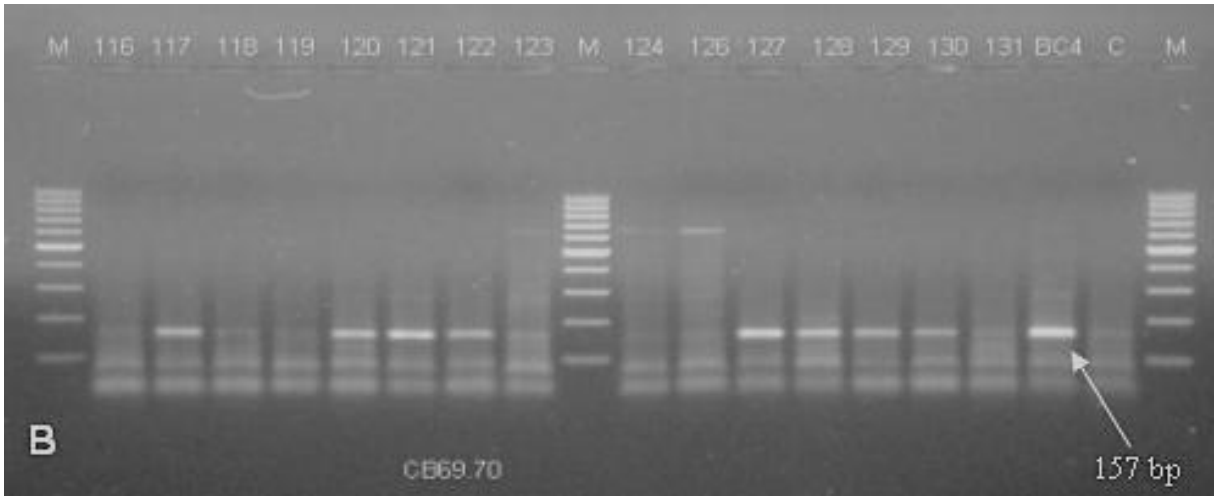
A VMC8g9 alkalmazása megbízható szűrést tesz lehetővé. A gyorsaság és hatékonyság szempontjából dolgoztuk ki azt a módszert, mely lehetővé teszi az egyszerű PCR-el kapott 160-167 bp méretű fragmentumok elkülönítését metaphor agaróz gélen (3,5%) is. A feltételezett rekombinánsok számát figyelembe véve is 96%-os megbízhatósággal szelektálhatóak a rezisztens genotípusok.

Az eddig ismertetett 3 marker mellett további két BAC klón eredetű domináns markert, a CB69.70-et és a CB137.138-at (Ian Dry személyes közlés) is bevontuk a 02-02 BC_5 hibridcsalád elemzésébe. A vizsgálat célja az volt, hogy igazoljuk a két BAC klón eredetű domináns marker működését a 02-02 BC_5 utódnemzedék egyedein, ami még egyszerűbb szűrést tesz lehetővé.

A PCR-t követő agaróz gélelektroforézis bizonyította, hogy az ellenálló és fogékony egyedek elkülöníthetőek egymástól a két domináns markerrel. A rezisztens egyedeket a

CB69.70 alkalmazásakor egy 157 bp méretű fragmentum felszaporodása jelezte, míg a szenzitív utódok esetében nem kaptunk PCR terméket. A CB137.138 markerrel végzett reakciót követően, a CB69.70-hez hasonlóan a DNS fragmentum megjelenése vagy hiánya volt tapasztalható: az ellenálló egyedeknél egy 277 bp méretű fragmentum szaporodott fel. A kapott eredményeket a 20/A és 20/B. ábra foglalja össze.





20/A és 20/B. ábra: A 02-02 hibricsalád egyedeinek vizsgálata CB137.138 és CB69.70 primerekkel

4.2 A *RUN1* és az *RPV1* peronoszpóra rezisztencia génekkel kapcsolt molekuláris markerek a BC_4 x Kismis moldavszkij hibridcsaládban

A BC_4 x Cardinal hibridcsalád eredményei alapján a vizsgálatainkat kiterjesztettük a *(M. rotudifolia x V. vinifera)* BC_4 x Kismis moldavszkij keresztezésből származó 02-01-es hibridcsalád 50 szelektálatlan, szabadföldbe kiültetett magoncára is.

Ahogy már említettük a VMC4f3.1 primer esetében a rezisztenciával, illetve az érzékenységgel kapcsolt markerallélek méretkülönbsége csak 2 bp (184-186 bp) – amely még az ALF Express II. készülékkel is többszöri ismételt elemzést igényel. Ezért ezt a markert a további elemzések (BC_4 x Kismis moldavszkij) során nem alkalmaztuk, a későbbi MAS-ból is kizártuk.

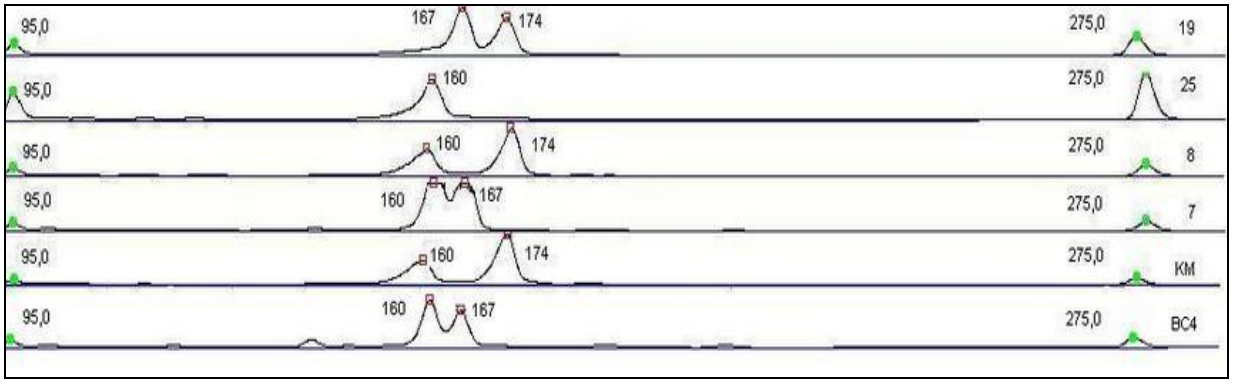
Erről a hibridcsaládról mesterséges fertőzési adatok nem álltak rendelkezésünkre, csak egyszeri szabadföldi természetes peronoszpóra fertőzöttségi tünet-felvételezés történt. A felvételezések alapján 20 egyed bizonyult fertőzöttnek és 30 tünetmentesnek. A szülőket és a hasadó nemzedéket a BC_4 x Cardinal család elemzése során bevált VMC8g9 mellett a VMC1g3.2 SSR markerrel, valamint a CB69.70 és CB137.138 BAC klón eredetű domináns markerekkel is megvizsgáltuk. A VMC1g3.2-t Merdinoglu *et al.* (2003) az *RPV1* markerezésére javasolta, Eibach *et al.* (2007) pedig a *RUN1* lisztharmat rezisztenciagén jelenlétének bizonyítására alkalmazta. A lokusz pozíciója a 11. ábrán látható. A CB69.70 és a CB137.138 markerek lokalizációját a 13. ábra mutatja.

A szülők és a 02-01 BC_5 nemzedékben az utódok lehetséges VMC8g9 és VMC1g3.2 genotípusait a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat: A szülők genotípusa a 02-01 BC_5 hibridcsaládban

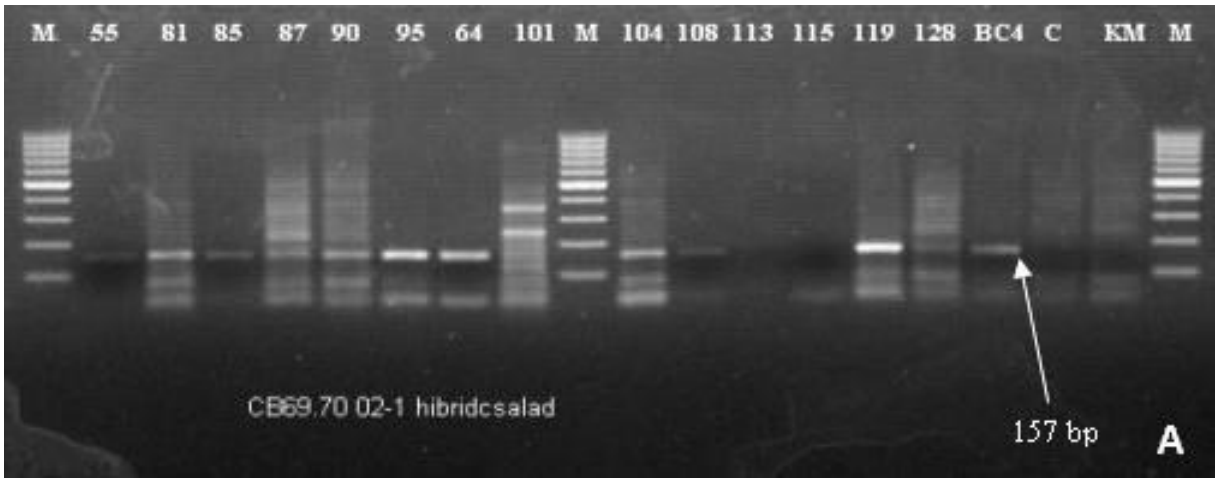
	VMC8g9	VMC1g3.2.
BC4	160:167	122:140
Kismis moldavszkij	160:174	128:142
RUN1+/RPV1+	160:160	122:128
Genotípusok	160:174	122:142
run1-/rpv1-	160:167	128:140
genotípusok	167:174	140:142

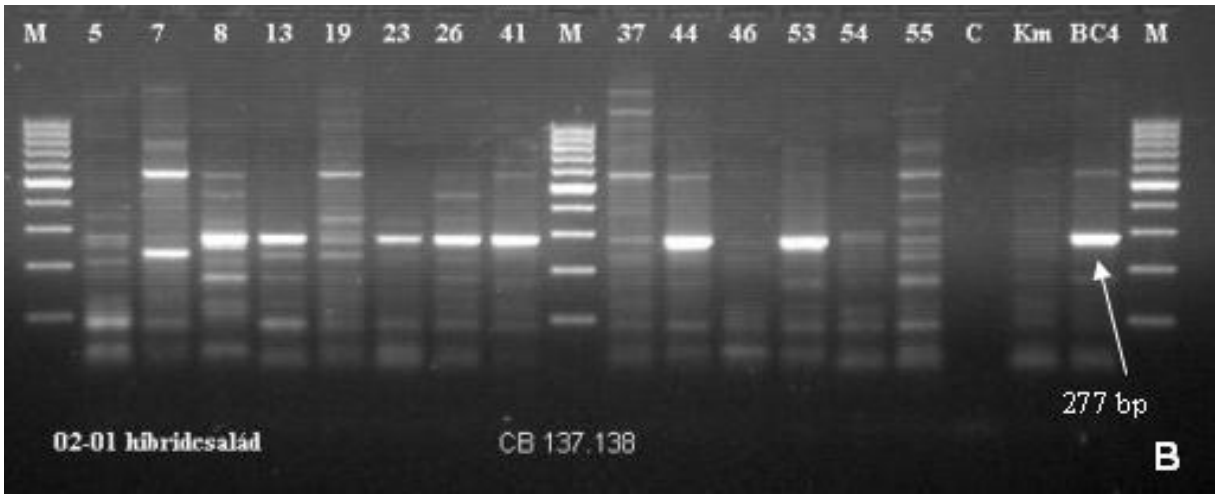
Mivel a fogékony Kismis moldavszkij szülő is tartalmaz a VMC8g9 lokuszban egy 160-as, a BC_4 x Cardinal családban a rezisztenciát jelző markerallélt, ezért az utódnemzedékben nem a 160 bp markerallél jelenléte, hanem a genotípus alapján lehet szelektálni. Tehát, *RUN1*-et hordozó (feltételezhetően rezisztens) egyedek 160:160 bp, illetve 160:174 bp allélösszetételűek (21. ábra). A VMC1g3.2 markernél a BC_4 122:140 bp, a Kismis moldavszkij 128:142 bp és az utódnemzedék peronoszpóra tünetmentes egyedei 122:128 bp vagy 122:142 bp genotípusúak. Ezért megállapítható, hogy a 122 bp allél egyértelműen jelzi a *Run1*/*Rpv1* lokuszok jelenlétét.



21. ábra: A VMC8g9 mikroszatellit primerekkel kapott néhány eredmény - az ALF Express II. készülékkel készített elektroforetogram

A CB69.70 és CB137.138 BAC klón eredetű domináns markerekkel végrehajtott PCR a CB69.70 primer esetében az ellenálló egyedeknél egy 157 bp méretű fragmentumot, míg a CB137.138 primer esetében egy 277 bp méretű fragmentumot eredményezett a BC_4xCardinal utódokban. A fogékony egyedek esetében a fragmentumok hiánya volt tapasztalható. A fragmentumok megléte, illetve hiánya igazolható a BC_4xKismis moldavszkij magoncok esetében is, mely a 22/A és 22/B. ábrán látható.





22/A és 22/B. ábra: A BC_4xKismis moldavszkij (02-01) hibricsalád egyedeinek vizsgálata CB69.70 és CB137.138 primerekkel

A 10. táblázat a szántóföldi fertőzöttség, valamint a CB69.70, CB137.138, VMC8g9 és a VMC1g3.2 marker genotípusokat foglalja össze az utódnemzedékben.

10. táblázat: A peronoszpóra-fertőzési tünetek és a markerekkel kapott eredmények összehasonlítása a 02-01 hibridcsaládban

Minta sorszám	A szabadföldi peronoszpóra fertőzéses tünetek eredménye	CB69.70	CB137.138	VMC8g9	VMC1g3.2
BC4	Ø	+	+	160:167	122:140
Kismis moldavszkij	+	Ø	Ø	160:174	128:142
Cardinal	+	Ø	Ø	179:179	136:140
„Rezisztens” genotípusok				160:174 160:160	122:128 122:142
Szenzitív genotípusok				160:167 167:174	128:140 140:142
5	+	Ø	Ø	167:174	140:142
7	+	Ø	Ø	160:167	128:140
8	Ø	+	+	160:174	122:142
9	Ø	**Ø**	+	160:174	122:142
10	+	Ø	Ø	160:167	128:140
12	+	Ø	Ø	160:167	128:140
13	Ø	+	+	160:174	122:142
16	Ø	+	+	160:174	122:142
17	+	Ø	Ø	160:167	128:140
19	+	Ø	Ø	167:174	140:142
23	Ø	+	+	160:160	122:128
25	+	Ø	Ø	**160:160**	128:140
26	Ø	+	+	160:160	**128:140**
30	+	Ø	Ø	160:167	128:140
32	Ø	Ø	Ø	160:174	122:128
37	+	Ø	Ø	167:174	140:142
41	Ø	+	Ø	160:160	122:128
44	Ø	+	+	160:160	122:128
46	+	Ø	Ø	160:167	**122:128**
49	+	Ø	Ø	167:174	140:142
53	Ø	+	+	160:160	122:128
54	Ø	+	+	160:174	122:142
55	Ø	**Ø**	**Ø**	160:160	122:128
64	Ø	+	+	160:160	122:128
68	Ø	+	+	160:160	122:128
69	Ø	+	+	160:174	122:128
70	Ø	+	+	160:160	122:128
73	+	Ø	Ø	160:167	128:140

Minta sorszám	A szabadföldi peronoszpóra fertőzéses tünetek eredménye	CB69.70	CB137.138	VMC8g9	VMC1g3.2
76	Ø	+	+	160:174	122:142
81	Ø	+	+	160:174	122:142
85	Ø	+	+	160:160	122:128
87	Ø	+	+	160:174	122:142
90	Ø	+	+	160:174	122:142
95	Ø	+	+	160:160	122:128
100	+	Ø	Ø	160:167	128:140
101	+	Ø	Ø	160:167	128:140
104	Ø	+	+	160:174	122:142
108	+	**Ø**	**Ø**	**160:160**	**122:142**
113	+	Ø	Ø	167:174	128:140
115	+	Ø	Ø	167:174	140:142
119	Ø	+	+	160:160	122:128
122	Ø	+	+	160:160	122:128
128	+	Ø	Ø	167:174	140:142
133	+	Ø	Ø	160:167	128:140
140	Ø	**Ø**	+	160:174	122:142
148	Ø	+	+	160:174	122:142
152	Ø	**Ø**	+	160:174	122:142
153	+	Ø	Ø	167:174	140:142
163	Ø	**Ø**	+	160:174	122:142
167	Ø	+	+	160:174	122:142

* Az eltérések kék színnel jelölve.

Ø-*jelölés*: A fenotípusos vizsgálat során fertőzési tüneteket nem mutató egyedek, valamint a CB69.70 és CB137.138 markerekkel végzett reakció során a rezisztenciát jelző fragmentumok hiányát jelöli.

+-*jelölés*: A fenotípusos vizsgálat során fertőzési tüneteket mutató egyedek, valamint a CB69.70 és CB137.138 markerekkel végzett reakció során a rezisztenciát jelző fragmentumok meglétét jelöli.

Ugyanerre a vonalra a CB69.70, CB137.138, VMC8g9 és VMC1g3.2 markerekkel kapott hasadási arányokat a 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat: A 10. táblázat adatainak összesítése: a peronoszpóra felvételezés, a markerekkel kapott genotípusok összehasonlítása a BC_4 x Kismis moldavszkij családban (az adatok darabszámként értendőek)

Fenotípus: peronoszpóra tünetmentes	**30**
Fenotípus: peronoszpóra fertőzött	20
VMC8g9 rezisztens genotípus: *RUN1+/RPV1+* genotípus	32
VMC8g9 szenzitív genotípus	18
VMC1g3.2 rezisztens genotípus: *RUN1+/RPV1+* genotípus	31
VMC1g3.2 szenzitív genotípus	19
CB69.70 pozitív genotípus: *RUN1+/RPV1+* genotípus	24
CB69.70 negatív genotípus	26
CB137.138 pozitív genotípus: *RUN1+/RPV1+* genotípus	27
CB137.138 negatív genotípus	23

A négy markerrel (CB69.70, CB137.138, VMC8g9 és VMC1g3.2) elvégzett kísérletek alapján 11 minta esetében tapasztaltunk diszkrepanciát, vagy a szabadföldi peronoszpórafertőzési tünetek, vagy pedig valamely marker által adott eredmény alapján. Az eltéréseket a 12. táblázatban foglaljuk össze.

12. táblázat: A peronoszpóra-fertőzési tünetek és a markerekkel kapott eltérő eredmények összehasonlítása és értékelése a 02-01 hibridcsaládban

Minta sorszám	A szabadföldi peronoszpóra fertőzéses tünetek eredménye	CB69.70	CB137.138	VMC8g9	VMC1g3.2
9	Ø	Ø	+	R	R
25	+	Ø	Ø	**R**	**S**
26	Ø	+	+	**R**	**S**
32	Ø	Ø	Ø	R	R
41	Ø	+	Ø	R	R
46	+	Ø	Ø	**S**	**R**
55	Ø	Ø	Ø	R	R
108	+	Ø	Ø	R	R
140	Ø	Ø	+	R	R
152	Ø	Ø	+	R	R
163	Ø	Ø	+	R	R

* Az eltérések kék színnel jelölve.

* A 108-as minta eredményei piros színnel jelölve.

***Ø**-jelölés*: A fenotípusos vizsgálat során fertőzési tüneteket nem mutató egyedek, valamint a CB69.70 és CB137.138 markerekkel végzett reakció során a rezisztenciát jelző fragmentumok hiányát jelöli.

+-jelölés: A fenotípusos vizsgálat során fertőzési tüneteket mutató egyedek, valamint a CB69.70 és CB137.138 markerekkel végzett reakció során a rezisztenciát jelző fragmentumok meglétét jelöli.

A vizsgálatok során az egyszeri fenotipizálás és a marker-genotípus között a legnagyobb eltérést a CB69.70 markerrel kaptuk. A *Run1* és *Rpv1* lokuszok sematikus és fizikai térképe alapján (14. és 16. ábra), a két lokuszhoz a legközelebb a VMC1g3.2, míg a legtávolabb a CB69.70 és a CB137.138 helyezkedik el. A nagyobb eltérésszám ezzel is indokolható, azonban a 02-01-es hibridcsaládról mesterséges fertőzési adatok nem álltak rendelkezésünkre, így a tünet-felvételezési adatok csak tájékoztató jellegűek. A 14. táblázatban a fertőzöttségi adatokat nem vettük figyelembe. A genotipizálás ereményeit tekintve a 108-as egyednél ellentmondás van a CB69.70 - CB137.138 markerekkel kapott eredmény és a VMC8g9 - VMC1g3.2 markerekkel meghatározott genotípusok között.

Figyelemre méltó, hogy a VMC8g9 és a VMC1g3.2 koszegregációja 3 eset (egyedek száma: 25, 26 és 46) kivételével teljes, ami újabb bizonyítéka a *RUN1*/*RPV1* szoros kapcsoltságának és e két marker szelekcióra, MAS-ra való alkalmasságának. A feltételezett „rekombinánsok” ellenére a VMC8g9 és VMC1g3.2 mellett a CB137.138, és CB69.70 markerek is alkalmazhatóak lehetnek gyors-szűrésre.

4.3 Új tudományos eredmények

1. Elsőként alkalmaztuk a lisztharmat / peronoszpóra rezisztencia génekel kapcsolt molekuláris markereket a BC_4 x Cardinal és a BC_4 x Kismis moldavszkij hibridcsaládok genotípus összetételének meghatározására.
2. Bizonyítottuk, hogy a CAPS-ben (PCR-RFLP) alkalmazott GLP1-12P1 - GLP1-12P3 primerek és a VMC4f3.1, VMC8g9 mikroszatellit használhatóságát szelekcióra a BC_4 x Cardinal hibridcsaládban.
3. Meghatároztuk a VMC4f3.1 és a VMC8g9 mikroszatellit lókuszban a rezisztencia génnel kapcsolt allél méretét.
4. Igazoltuk a BC_4 x Cardinal hibridcsaládban a CB69.70 és a CB137.138 alkalmazhatóságát.
5. A VMC8g9 esetében agaróz gélelektroforézisen alapuló egyszerűsített genotipizálási módszert dolgoztunk ki.
6. Bizonyítottuk, hogy a VMC8g9 a BC_4 x Kismis moldavszkij családban is alkalmas a MAS-ra, annak ellenére, hogy a szenzitív szülő közös allélt (160 bp) hordozza. A genotípus alapján azonban a szelekció megbízható.
7. Meghatároztuk a VMC1g3.2 mikroszatellit lókuszban a rezisztencia génnel kapcsolt allél méretét.
8. A VMC1g3.2 primer bevonásával megerősítettük a *RUN1*/*RPV1* szoros kapcsoltságát.
9. Igazoltuk a CB 69.70 és a CB137.138 domináns markerek használhatóságát a BC_4 x Kismis moldavszkij hibridcsaládban.

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Eredményeinkkel sikerült bizonyítanunk, hogy a hasadó BC_4 x Cardinal (02-02) és a BC_4 x Kismis moldavszkij (02-01) hibridcsaládok különböző fenotípusú egyedei, a liszttharmat és peronoszpóra rezisztencia génnekkel kapcsolt molekuláris markerekkel elkülöníthetőek egymástól a korai pár lombleveles fejlődési szakaszban. Olyan rutinszerű szelekciós módszert dolgoztunk ki, mellyel költséghatékonyan válogathatjuk ki a hasadó hibridpopulációkból az értékes utódokat. Ennek révén a fenntartási, a fernotipusos szelekciós és bonitálási költségek is jelentősen csökkenthetők.

A VRH3082-1-42 BC_4 x Cardinal hibridcsalád 150 magocának vizsgálata során bizonyítottuk, hogy a RGA eredetű GLP1-12P1 – GLP1-12P3 primerpár (Donald *et al*. 2002) kiválóan alkalmas a sikeres PCR, majd a termék *Eco*RI enzimmel való emésztése után a genotípusok egyértelmű elkülönítésére. Ezzel, nemcsak a GLP1-12P1 - GLP1-12P3 *RUN1* markerként történő alkalmazhatóságát bizonyítottuk, hanem azt is, hogy a rezisztens egyedek heterozigóták a *Run1* lókuszra. Az SSR analízisbe további két markert, a VMC8g9-et és a VMC4f3.1-et (Barker *et al*. 2005) vontuk be. Mind a két primer esetében meghatároztuk a *RUN1* génnel kapcsolt markerallél méretét. A legnagyobb rekombinációs százalékot a VMC4f.3.1 (10%), míg a legkisebbet a GLP1-12P1 – GLP1-12P3 adta (0,7%). A VMC8g9 esetében a feltételezhetően rekombináns egyedek aránya 3,8% volt. A pontos allélméret elemzéshez ALF Express II DNS fragmentum analizátor és a primerek fluoreszcens jelölése szükséges. Ezért a VMC8g9 esetében az ellenálló és fogékony egyedek elkülönítésére egyszerűbb módszert dolgoztunk ki, az egymástól 7 bp-ban különböző szenzitív és rezisztens allélek elektroforetikus elválasztásával agaróz gélen.

Domináns BAC klón eredetű markereket (CB69.70 és B137.138) is bevontuk a szelekciós vizsgálatokba, azért, hogy minél egyszerűbb és gyorsabb kiválogatási módszert találjunk. A CB69.70 és a CB137.138 markerek alakalmazhatóságát is bizonyítani tudtuk a 02-02 hibridcsalád egyedein.

A 02-02 hibridcsaláddal kapott eredmények alapján vizsgáltuk a VRH3082-1-42 BC_4 x Kismis moldvszkij (02-01) család 50 szelektálatlan magoncát. Mivel a *RUN1/RPV1* szoros kapcsoltságát több szerző is leírta és megerősítette a VMC8g9, CB69.70 és CB137.138 markerek mellett, a VMC1g3.2 SSR lókuszt is bevontuk a vizsgálatokba, mivel néhány kutató ezt az *RPV1+* genotípusok szelekciójára alkalmazta. Mind a négy marker segítségével

elkülöníthetőek a lisztharmat és a peronoszpóra rezisztenciagéneket hordozó (*RUN1+/RPV1+*) és a nem hordozó (*run1-/rpv1-*) egyedek egymástól.

Eredményeink alapján javasoljuk a munkánk során felhasznált markerek (GLP1-12P1 – GLP1-12P3, VMC8g9, VMC4f.3.1, VMC1g3.2, CB69.70 és CB137.138) további szelekciós vizsgálatokba történő bevonását. Olyan hibridcsaládok vizsgálatára lehetnek alkalmasak, melyek egyik keresztezési partnere (rezisztens szülő) a VRH2082-1-42 BC_4, vagy bármely olyan visszakeresztezett nemzedékből származó ellenálló szülő (például: VRH3082-1-49, VRH3084-2-56, VRH3099-10-57), amelyben a peronoszpóra/lisztharmat rezisztencia forrása a *Muscadinia rotundifolia*. Olyan megbízható marker alapú rendszert dolgoztunk ki, amellyel a PCR-t és a poliakrilamid vagy agaróz gélelektrofotézist követően a *RUN1/RPV1* genotípusú egyedek kiválogathatóak. A VMC8g9, a VMC1g3.2, a CB69.70 és CB137.138 markerek alkalmasságát más, halmozott rezisztenciagéneket tartalmazó hibridcsaládokban (Kozma *et al.* 2006) is eredményesen alkalmazták (Katula-Debreceni *et al.* 2010), ami megerősíti a disszertáció eredményeit.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A Pécsi Tudomány Egyetem Szőlészeti és Borászati Intézetben létrehozott és fenntartott 02-02 BC_5 (*M. rotudifolia x V. vinifera*) BC_4 x *Cardinal* hibrid nemzedék 150 és a 02-01 *(M. rotudifolia x V. vinifera)* BC_4 x Kismis moldavszkij nemzedék 50 szelektálatlan magoncát vizsgáltuk a *RUN1* és *RPV1* lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia génekkel kapcsolt molekuláris markerekkel.

1 /a. A *RUN1* lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt molekuláris marker vizsgálatainkat a 02-02 hibrid nemzedék üvegházban előszelektált 20 tünetmentes és 20 fertőzött egyedén kezdtük meg a GLP1-12P1 - GLP1-12P3 primerpárral. Ezzel a primerpárral genotípustól függetlenül egységesen minden növényben egy 870 bp méretű PCR terméket kaptunk. A lisztharmattal fertőzött és egészséges növények azonban a kapott PCR termék *Eco*RI enzimmel való emésztése után (PCR-RFLP) egyértelműen elkülöníthetővé váltak egymástól. A 20 tünetmentes utódban a restrikciós hasítás után 3 DNS fragmentumot kaptunk, az eredeti 870 bp, egy 670 és egy 200 bp méretű szakasz, jelezve, hogy a tünetmentes utódok heterozigóták a GLP1 lokuszban. A 20 fertőzött növény PCR terméke nem emésztődött. A 40 egyeden igazoltuk a GLP1 marker, és a rezisztens fenotípus azaz a rezisztenciagén koszegregációját.

1/b. A vizsgálatokat kiterjesztettük a 02-02 hibridcsalád további 110 magoncára, valamint bevontunk a vizsgálatba a *RUN1* lokusszal kapcsolt két mikroszatellit primerpárt is, a VMC4f3.1-et és a VMC8g9-et. A mikroszatellit elemzés során az allélméretek alapján kizártuk az idegen megporzásból származó egyedeket, amelyek nem felelnek meg a szülői kombinációknak. Mindhárom molekuláris marker esetében közel 1:1 hasadást kaptunk. A legnagyobb rekombinációs százalékot a VMC4f3.1 (10%), míg a legkisebbet a GLP1-12P1 – GLP1-12P3 adta (0,7%). A VMC8g9 esetében a feltételezhetően rekombináns egyedek aránya 3,8% volt.

A pontos allélméret meghatározáshoz ALF Express II. DNS fragmentum analizátor és a primerek fluoreszcens jelölése szükséges, ezért a VMC8g9

esetében 160-167 bp méretű fragmentumok elkülönítésére agaróz elektroforetikus módszert dolgoztunk ki. A PCR termékeket Metaphor agaróz gélen is sikerült elválasztanunk, tehát ebben az esetben a genotipizálás az olcsóbb agaróz elektroforézissel is megvalósítható.

Munkánk következő lépésében a CB69.70 és CB137.138 BAC klón eredetű domináns markerek genotipizálásra való alkalmazhatóságát vizsgáltuk. A gélelektroforézist követően – CB 69.70 primer - az ellenálló egyedeknél egy 157 bp méretű, míg a CB137-138 primer esetében egy 277 bp méretű fragmentumot kaptunk, ami hiányzott a fogékony genotípusokban.

2/a. A BC_4xCardinal családdal kapott eredmények alapján megvizsgáltuk 02-01 hibrid család 50 szelektálatlan magoncát. A BC_5 (BC_4xKismis moldavszkij) utódok esetében a lisztharmat fertőzöttségről egyáltalán nem volt információnk, egyszeri szabadföldi peronoszpóra tünetfelvételezési adatokat kaptunk Dr. Hoffmann Saroltától. Mivel a *RUN1/RPV1* szoros kapcsoltságát több szerző is leírta és megerősítette a VMC8g9, VMC1g3.2, CB69.70 és CB137.138 markerek mellett, a VMC1g3.2 SSR lokuszt is bevontuk a vizsgálatokba, mivel néhány kutató ezt az *RPV1* + genotípusok szelekciójára alkalmazta.

2/b. A VMC8g9 marker esetében a *RUN1+/RPV1+* genotípusok 160:160 bp és 160:174 bp, míg a *run1-/rpv1-* genotípusok 160:167 bp és 167:174 bp allélméretekkel jellemezhetők A VMC1g3.2 marker vizsgálata során kapott *RUN1+/RPV1+* genotípusok 122:128 bp és 122:142 bp, míg a *run1-/rpv1-* genotípusok 128:140 bp és 140:142 bp allélmintázatot adtak. A VMC8g9 és a VMC1g3.2 primerek segítségével elkülöníthetőek a lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciagéneket hordozó egyedek egymástól. A BC_4xCardinal családhoz hasonlóan a CB 69.70 primer egy 157 bp méretű, míg a CB137-138 primer egy 277 bp méretű fragmentumot eredményezett a feltehetően *RUN1+/RPV1+* genotípusoknál. A valószínűleg *run1-/rpv1-* utódokban a fragmentumok hiánya volt tapasztalható.

A 02-01-es hibridcsalád mesterséges lisztharmat / peronoszpóra fertőzési adatai a kiültetett állományban a genotipizálás „visszaellenőrzésére”, a marker-genotípusok és a lisztharmat vagy peronoszpóra rezisztens fenotípusok egybeesésének megerősítésére adnak lehetőséget a tünetek többszöri felvételezése esetén

SUMMARY

150 individuals of a BC_5 hybrid family (named 02-02) deriving from a (*M. rotundifolia x V. vinifera*) BC4 x Cardinal cross and 50 unselected seedlings of the BC_5 hybrid family (named 02-01) deriving from a (*M. rotudifolia x V. vinifera*) BC_4 x Kismis moldavszkij were tested with molecular markers, closely linked to *RUN1* (Powdery mildew) and *RPV1* (Downy mildew) resistance genes. Pál Kozma in PTE Research Institute of Viticulture and Enology constructed the hybrid families.

1 /a. As a first step phenotypically preselected 20 resistant and 20 susceptible BC_5 plants of the 02-02 hybrid family were tested with RFLP-PCR markers (GLP1-12P1 and GLP1-12P3) to check the expected cosegregation of the marker with the phenotype. One 870 bp DNA fragment was amplified both in healthy and sensitive plants. Symptomless and susceptible individuals could only be separated by restriction analysis of the PCR product. The *Eco*RI cleaved the DNA amplicon of the resistant leaves into two pieces (670 and 200 bp), while it did not split the PCR product of the susceptible samples, so the resistant and the sensitive samples were clearly distinguished. The co-segregation of marker genotype-phenotype in the 40 seedlings from the 02-02 hybrid family was reliably verified.

1 /b. According to the results of the 40 samples, altogether 110 individuals from the BC_5 hybrid family were screened with the RFLP-PCR markers and additionally two SSR markers closely linked to the *RUN1* locus, VMC4f3.1 and VMC8g9 SSR were involved in the research. SSR primers provided also a way to monitor outcrosses. In the case of VMC4f3.1 a 186 bp, while in the case of VMC8g9 a 160 bp allele proved to be a powdery mildew resistance linked marker. All the three markers proved to be applicable for genotyping PM susceptiple and symptomless plants. However in the case of all three markers recombinants were obtained: powdery mildew resistant individuals, whose GLP1-12P1 – GLP1-12P3 PCR amplicons remained uncut after *Eco*RI cleavage or the SSR alleles coupled with the resistance were missing from them. The highest recombination percentage (10%) was obtained with the VMC4f3.1 SSR marker, while the smallest (0.7%) with the GLP1-12P1 – GLP1-12P3 RFLP-PCR marker. The ratio of putative recombinants with VMC8g9 marker was 3.8%.

However the linkage of the applied markers proved to be lower than 100%, they could be successfully applied in MAS, since 90-99% of the plants selected in this way will carry the *RUN1 Uncinula necator* resistance gene.

Economically the VMC8g9 is the most favourable of the three markers, because after determination of the accurate allele sizes with fluorescent labeling of the SSR markers using ALF Express II. DNA fragment analyzer the discriminative 160:167 bp fragments can be separated on Metaphor agarose gel (3.5%) following a simple PCR allowing the routine analyses of many samples at the same time.

The 02-02 BC_5 hybrid family was screened with two additional BAC clone origin dominant marker - CB69.70 and CB137.138 - besides the previously used 3 primers.

The aim of the study was to confirm the applicability of the two BAC clone origin dominant marker on the progeny individuals of the 02-02 BC_5 hybrid family. The PCR reaction followed by agarose gel electrophoresis was demonstrated; the two dominant markers could separate the symptomless and susceptible individuals. In the case of the CB 69.70 primer amplified a 157 bp allele, which is a specific indicator of the resistant individuals, while the sensitive seedlings do not appear this fragment. In the case of the CB 137.138 primer was seen the same case as in the case of CB69.70 marker after the PCR reaction. The susceptible and the resistant progeny could be separated from each other, because in the case of CB137.138 primer amplified a 277 bp allele in symptomless individuals only.

2 /a. The *RPV1* gene is responsible for the downy mildew resistance in *M. rotundifolia.* Since linkage of *RUN1* and *RPV1* were reported and confirmed by several authors 50 unselected seedlings of the 02-01 hybrid family [(*M. rotundifolia x V. vinifera*) BC4 x Kismis moldavszkij] were screened one the one hand with the same markers as the BC_4xCardinal progeny (VMC8g9, CB69.70 and CB137.138), on the other hand VMC1g3.2 primers applied by researchers as *RPV1*-specific marker was also involved into the analyses. In the [(*M. rotundifolia x V. vinifera*) BC4 x Kismis moldavszkij] family only a single field observation of downy mildew symptoms happened showing 30 symptomless and 20 symptom-carrying plants. Powdery mildew phenotyping data were not available at all, therefore we only genotyped the individuals with

the above mentioned markers. In the case of the CB 69.70 primer amplified a 157 bp, while CB137-138 primer gave a 277 bp allele in 24 and 27 plants, respectively. In 26 (CB 69.70) and 23 (CB 137.138) plants the fragments were undetectable.

2 /b. *RUN1+/RPV1+* genotypes are the following in the case of VMC8g9 marker: 160:160 bp and 160:174 bp, while *run1-/rpv1-* genotypes are: 160:167 bp and 167:174 bp. The *RUN1+/RPV1+* genotypes of the VMC1g3.2 marker analysis are as the follows: 122:128 bp and 122:142 bp, while the run1-/rpv1- genotypes are: 128:140 bp and 140:142 bp. With VMC8g9 32 *RUN1+/RPV1+* while with VMC1g3.2 31, proving that all the chosen primers discriminated the genotypes repeated phenotyping would be indispensable to confirm the coincidence of *RUN1+/RPV1+* genotype and PM or DM resistance.

7 MELLÉKLET

7.1 DNeasy Plant Mini Kit

1. A sejtek feltárása: 0, 1 gramm friss levélszövetet elporítunk folyékony nitrogénben.

2. A mintákat Eppendorf-csövekbe helyezzük, hozzáadunk 400 µl AP1 puffert és 4 µl RN-áz (RNS-t emésztő) puffert. A puffer a fehérjéket és a poliszacharidokat kicsapja.

3. Az oldatokat vortexelés után 10 percre 65 ^{0}C-ra helyezzük, inkubáljuk. Inkubálás közben a mintákat 2-3-szor megforgatjuk.

4. Ezután hozzámérünk a mintákhoz 150 µl AP2 puffert, majd 5 percre jégre helyezzük őket. Ezalatt az enzim a minta RNS-ét emészti.

5. A lizátumot a kithez tartozó QIAshredder szűrőre töltjük, majd 12000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, így az oldatot megtisztítjuk a sejttörmelékektől, a szűrőn átjutó rész, pedig tovább homogenizálódik.

6. Az üledék nélküli szűrlet újabb Eppendorf-csövekbe kerül. Ezután a mintákhoz másfél térfogatnyi (kb. 680 µl) AP3/E oldatot adunk, amely AP3 oldat koncentrátuma 95%-os etanollal hígítva 1:2 arányban. Az elegyet pipettával elkeverjük.

7. Ebből 650 µl-t DNeasy szűrőre pipettázunk, majd 8000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk. A maradék lizátummal a lépést megismételjük. A szűrés során a szilíciumgélek adszorbeálják a DNS molekulákat, így azok a szűrő membránján megtapadnak, a lizátum kicsapott fehérjéi és poliszacharidjai pedig átjutnak.

8. A DNS-t tartalmazó szűrőt új Eppendorf-csőbe helyezzük és 500 µl AW puffert mérünk hozzá, majd egy percig 12000 fordulat/perc-en centrifugáljuk. A szűrlet eltávolítása után a lépést megismételjük, de most 2 percig centrifugáljuk a mintákat, így a szűrő kiszárad.

9. A DNS-szűrőt új Eppendorf-csőbe helyezzük, 100 µl 65^{0}C-os AE pufferrel a membránt átmossuk, 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 1 percig 8000 fordulat/perc-en centrifugáljuk. A mosást még egyszer megismételjük. A puffer hatására megváltozott közegben a DNS molekulák leválnak a szűrő szilíciumgéljéről és átjutnak az Eppendorf csőbe.

Az így nyert szűrlet megfelelő tisztaságban tartalmazza a DNS-t, az oldat mennyisége körülbelül 200 µl (Qiagen, 2004).

7.2 ALF – Automatikus Lézer Fluorométer

1. Az első lépésben megtisztítjuk a gélkazetta alkotókat, az üveglemezt, a thermolemezt, az üveg spacer-eket és a fésűt. A tisztításhoz langyos (30 ^{0}C) vizet, puha nylon kefét és nem fluoreszkáló detergenst (5%-os *Decon 90*) használunk. A mosás után alaposan leöblítjük az összes komponenst *MilliQ* vízzel, és megszárítjuk.

2. A vízzel való tisztítás után etanollal mossuk, majd szárítjuk a lemezt. Ezután Bind-Silane oldatot készítünk: 1ml abszolút etanol, 3 µl Bind-Silane, 250 µl 10%-os ecetsav; és az eleggyel áttöröljük a thermolemez felső 1/3-át. Szárazra töröljük.

3. A gélkazetta összeállítása: Két üveg spacer-t helyezünk a thermolemez szegélyéhez. Az üveglemezt ráhelyezzük a thermolemezre, csipesszel rögzítjük, és behelyezzük a kazettákat a ReproSet-be.

4. A gélt a kazetta alapi részére öntjük. A kapilláris erő hatására a gél egyenletesen eloszlik. Ha keletkeznek buborékok, azokat el kell távolítani, mielőtt a fésűt beletesszük.

5. A gélt UV-sugárzásnak kell kitenni, melynek hatására az megszilárdul. Ennek érdekében a gélt 10 percre ReproSet készülékbe helyezzük.

6. A gélkazetta elhelyezése a készülékben. Először is meg kell bizonyosodnunk róla, hogy az üveglemez tiszta, és a detektorok a területen belül arányosan helyezkednek el. A megfelelő futtató pufferrel feltöltjük a készülék tárolóedényét, majd a gélkazettát a gép szemközti falára akasztva rögzítjük, és belehelyezzük a pufferbe. Ezután ellenőrizzük a futtató elegyek szintjét, beállítjuk a lézert és a kazettát elektromosan is csatlakoztatjuk a készülékhez.

7. A minták betöltése és a futtatás indítása: Mivel a készülék egyszálas DNS-sel dolgozik, a mintákat denaturálnunk kell. Mikor a készülék a megfelelő hőmérsékletet elérte, a fésűt óvatosan eltávolítjuk, majd az analizálandó mintákat a zsebekbe töltjük úgy, hogy az 1. a 20. és a 40. zsebbe külső standard kerül. Újra megbizonyosodunk a lézer pontos beállításáról, és elindítjuk a futtatást.

7.3 A 02-2 hibridcsalád előállításában szereplő szőlőfajták jellemzése

Cardinal

Ampelográfiai leírások szerint ezt a vörös csemege szőlőfajtát a Flame Tokay (Ahmer Bou'Amer) Ribier (Alphonse-Lavallée) keresztezésével állította elő Snyder és Harmon 1939-ben Fresnoban, Kaliforniában (Németh, 1975). A Flame Tokay-t mint szülőt azonban mikroszatellit elemzésekkel 2007-ben kizárták (Akkak *et al*. 2007).

Előállítását követően Spanyolországban közel 5800 ha-on, Olaszországban (3800 ha), Romániában (3800 ha) és Bulgáriában (2000 ha), hogy csak a fontosabbakat említsük. Mindemellett ismertté vált Kaliforniában, Mexikóban, Chilében, Argentínában és dél-Franciaországban is népszerű fajtává vált. A Cardinal szőlőt keresztezési partnerként olyan új fajták előállításához használták fel, mint a Blanc Du Bois, Carina , Diana , Flame Seedless és Zagore. Olaszországban egy igen korán érő mutánsa, a **Cardinal Early** is létrejött.

Morfológiai bélyegei a C*onvarietas orientalis* (Németh, 1975) fajtacsoportba sorolják. Magyarországra 1963-ban került, és 1970-ben állami elismerést kapott.

23. ábra: Cardinal (www.cdbank.co.il és www.mahagrapes.com)

Nagy bíborszínű bogyókkal rendelkezik, héja vastag, olvadó, melyekben apró magvak találhatók, korai érésű, erős növekedésű, bőtermő szőlő, melynek termésátlaga közel 10-15 t/ha.

Levele szabálytalan alakú, nagy, ötkaréjú, levélnyele vöröseszöld, csupasz, a fürt nagy, átlagtömege 300 g, a bogyók gömbölyűek (Tóth és Pernesz, 2001). Fagyérzékeny, rothadásra hajlamos. A gombás megbetegedések közül peronoszpórára mérsékelten, lisztharmatra érzékeny (Németh, 1975).

Szinonimái: Apostoliatiko, Karaburnu Rannii, Kardinal, Rannii Carabournu.

Muscadinia rotundifolia

A *Muscadinia* alnemzetség fajai, így a *M. rotundifolia* is az Egyesült Államok déli, melegebb részein (pl. Dél-Floridában), és a szubtrópusi és trópusi tájain (pl. Mexikó egyes tájain) vadon élnek.

Az *Euvitistől* mind megjelenésüket, mind termesztési értéküket tekintve jelentősen különböznek. Virágzatuk aránylag kevés, 3-30 virágból áll, a virágok funkcionálisan hím- vagy nővirágúak, kétlakikak. Bogyóik középnagyok vagy nagyok, vastag héjúak, hamvasság nélküliek, húsuk kemény, édes, sajátságos pézsma, vagy poloska ízű. A bogyók különböző időben érnek, beérve lehullanak.

A filoxérával és a *V. vinifera*-t veszélyeztető más gombás betegségekkel szemben természetes ellenálló képességgel rendelkeznek. Kromoszómaszámuk (2n=40) az *Euvitis* alnemzetségbe tartozó fajoktól (2*n=38)* eltérő (Branas, 1932). *Az Euvitisekkel* csak akkor keresztezhetők, ha a *Muscadinia* az apa, az *Euvitis* pedig az anya. Ebben az esetben keresztezésből származó egyedek életképesek.

24. ábra: *Muscadinia rotundifolia* (www.wikipedia.org)

A BC_4 VRH 3082-1-42, a *Vitis vinifera* Malaga seedling és a *M. rotundifolia* G52 keresztezésébel előállított F1 nemzedékből úgynevezett pszeudo-backcross módszerrel, nemzedékenként változó, minőségi fajtákkal (Cabernet sauvignon, Grenache noir, Merlot noir, Aubun) végezve a keresztezést, állította elő Alain Bouquet.

Kismis moldavszkij

Moldáviában állítottak elő a Pobeda és a Kismis rozovüj keresztezésével. A fajta a convarietas orientalis (keleti) fajtacsoportba tartozik (Tóth és Pernesz, 2001). Moldávia középső és déli szőlőtermesztő tájain, a Krím félszigeten és Dagesztán környékén termesztik. Moldáviában, Ukrajnában és Romániában igen elterjedt, Magyarországra a fajtát ifj. Kozma Pál hozta be, majd az FVM SZBKI jelentette be állami elismerésre.

Tőkéje erős növekedésű, vesszői közép- vastagok, vagy vastagok, színük sárgás barna. A fajta igen nagy szív alakú, három karéjú, erősen szeldelt levelekkel rendelkezik. Bogyói nagyok, szélesedő tojás alakúak, azonban keresztmetszetük nem kerek. Színük lilás sötétpiros, gyengén hamvas. A héja közepesen vastag, olvadó, bogyóján a bibepont alig látható, húsa színtelen, konzisztenciája kemény, ropogós, csökevényes magvú (magvatlan).

A Kismis moldavszkij (25**.** ábra) késői érésű, erős növekedésű, bőtermő, magvatlan csemegeszőlő fajta. Kifejezetten védett, meleg fekvést igényel, talaj iránt nem igényes, fagyérzékeny, rothadásra kevésbé hajlamos, szárazságtűrő, jól szállítható.
Hasonnévvel nem rendelkezik, morfológiai szempontból hozzá hasonló fajta nem ismert (Tóth és Pernesz, 2001).

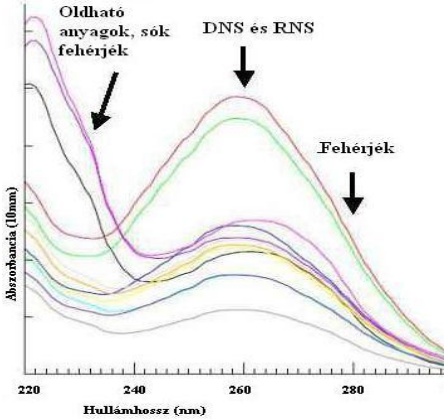
25. ábra: Kismis moldavszkij (www.csemegeszolo.hu)

A magoncok fenotipizálását, a lisztharmat és peronoszpóra levéltünetek felvételezését, a molekuláris elemzéseket a {(*M. rotundifolia* x *V. vinifera*) BC_4} x Cardinal (*V. vinifera*) BC_5 nemzedék lisztharmattal fertőzött és tünetmentes egyedein alkalmaztuk. A lisztharmat levélfertőzési tüneteket ifj. Kozma Pál és munkatársai határozták meg.

7.4 DNS minőségének és mennyiségének ellenőrzése NanoDrop™ ND-100 készülékkel

A DNS minta a mérés folyamán nem kvarcküvettában helyezkedik el, hanem két optikai szál között, folyadékoszlopként feszül ki. A vizsgálandó mintát az alsó optikai szál felszínére kell cseppenteni, majd a felső szálat rá kell zárni az 1-2 µl térfogatú cseppre. A felületi feszültséget kihasználva, 1mm magas folyadékoszlop alakul ki, mely megegyezik a fényút hosszával. A fényforrás egy Xenon Flash lámpa, mely egy 2048 elemből álló lineáris szilikon CCD array detektor. A NanoDrop fotométerek hullámhosszkalibrációja a xenon fényforrás ismert csúcsai alapján automatikusan történik minden egyes alkalommal, mikor a szoftvert elindítjuk (www.nanodrop.com). A mérést a 220-280 nm hullámhosz-tartományban végezztük.

A készülék vezérlése és a mérési adatok begyűjtése a mellékelt számítógépes szoftverrel történik. A munka hatékonyabbá tételét szolgálják az egyes előprogramozott mérési modulok a különböző minőségű, mérendő anyagoknak megfelelően: DNS, RNS, tiszta fehérje oldat, fehérje mérés BCA - Bradford - Lowry módszerrel, jelölt oligó, jelölt fehérjék.



26. ábra: DNS abszorpciós görbe

A készülék és a szoftver segítségével meghatározhatjuk a felhasználandó minta koncentrációját, valamint a görbe lefutásából következtethetünk a tisztaságára.

A sikeres PCR reakció alapfeltétele, hogy megfelelő minőségű és mennyiségű DNS-sel dolgozzunk. A peptid kötése, a nukleinsavak és az aromás aminosavak abszorpciós maximuma eltér egymástól:

- A_{230} nm: peptid kötések abszorpciós maximuma (fehérje)
- A_{260} nm: nukleinsavak abszorpciós maximuma (DNS-RNS)

- A_{280} nm: aromás aminosavak abszorpciós maximuma (fehérje)

A készülékkel történő mérés során ezek az értékek összeadódnak. Azonban abban az esetben beszélhetünk megfelelő minőségű DNS-ről, ha az (*OD*) optikai denzitás értékek a következő hányadossal rendelkeznek:

- OD260/ OD280= OD DNS, RNS / OD fehérje= 1,8 - 2,0
- OD260/ OD230= OD DNS, RNS / OD fehérje = 1,5

8 IRODALOMJEGYZÉK

1. **AARTS M.G.M., HEKKERT B.T.L., HOLUB E.B; BEYNON J.L., STIEKEMA W.J. AND PEREIRA A.** (1998): Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant- Microbe Interaction 11: 251-258.

2. **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. 5: 1017-27.

3. **ADEREM A., AND ULTEVITCH J.** (2000): Toll – Like Receptor in the Induction of the Innate Immune Response. Nature. 406: 782-787.

4. **AKKAYA M.S., BHAGWAT A.A. AND CREGAN P.B.** (1995): Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. Genetics 132: 1131-1139.

5. **ALLEWELDT, G., POSSINGHAM, J. V.,** (1988): Progress in grapevine breeding. Theor. Appl. Genet. 75: 669-673.

6. **AMRANI, L. AND CORIO-COSTET, M.-F.** (2006): A single nucleotide polymorphism in the β-tubulin gene distinguishing two genotypes of *Erysiphe necator* expressing different symptoms on grapevine. Plant Pathol. 55: 505-512.

7. **ANONYMUS** (2006): A hazai szőlő – és borkultúra kialakulása, és fejlődésének fő szakaszai. Digitális tananyag, (2006. október 14).

8. **ARROYO-GARCIA R., MARTINEZ-ZAPATER J.M.** (2004): Development and characterization of new microsatellite markers for grape. Vitis 43: 175-178.

9. **ASAI T., TENA G., PLOTNIKOVA JOULIA, WILLMANN M.R., CHIU W-L., GOMEZ-GOMEZ L., BOLLER T., AUSUBAL F.M., SHEEN J**. (2002). Map Kinase Signalling Cascade In Arabidopsis Innate Immunity. Nature 415: 977-983.

10. **BARKER C.L., DONALD T., PAUQUET J., RATNAPARKHE M.B., BOUQUET A., ADAM-BLONDON A.-F., THOMAS M.R., 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.

11. **BECKMANN J.S., SOLLER M.** (1986): Toward an unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. Bio/Technology 8: 930-932.

12. **BELL C.J. AND ECKER J.R.** (1994): Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. Genomics 19: 137-144.

13. **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 major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. Theor. Appl. Genet. 120: 163-176.

14. **BEYERMANN B., NÜRNBERG P., WEIHE A., MEIXNER M., EPPLEN J.T., BÖRNER T.** (1992): Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. Theor. Appl. Genet. 83: 691-694.

15. **BENT, R.A. AND MACKEY, D.** (2007): Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. Annual Review of Phytopathology. 45: 399-436.

16. **BÉNYEI F., LŐRINCZ A., SZ. NAGY L.** (1999): Szőlőtermesztés. Mezőgazda Kiadó. Budapest.

17. **BISZTRAY GY.** (2001): Molekuláis genetikai markerek. In: Növénygenetika, szerk. Velich I. Mezőgazda Kiadó. Budapest.

18. **BLASI P., BLANC S., WIEDEMANN-MERDINOGLU S., PRADO E., RÜHL E.H., MESTRE P., MERDINOGLU D. (**2011): Construction of a reference linkage ma pof *vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring to grapevine downy mildew. Theor. Appl. Genet. 123:43-53.

19. **BOLLER T., KEEN N. T.** (1999): Resistance Genes and the Perception and Transduction of Elicitor Signals in Host-Pathogen Interactions. In: Slusarenko, A., Fraser, R. S. S., Van Loon, L. C. (Eds) Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. 189-229. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.

20. **BOTSTEIN D.**, **WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W.** (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphisms. Am.J.Hum.Genet. 32: 314-331.

21. **BOUQUET A.** (1980): *Vitis* x *Muscadinia* hybridisation: a new way in grape breeding for disease resistance in France. Proc. 3th Int. Symp. Grape Genet. Breed., (Davis), 42-61 p.

22. **BOUQUET A.** (1986): Introduction dans l'espéce *V. vinifera* L. d'un caractére de résistance á l'oidium (*Uncinula necator* Schw. Burr.) issu de l'espéce *M. rotundifolia* (Michx.) Small. Vignevini 12: 141-146.

23. **BOURQUIN J.C., SONKO A., OTTEN L., WALTER B.** (1993): Restricion fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet. 87: 431-438.

24. **BOURQUIN J.C., OTTEN L., WALTER B.** (1995): PCR-RFLP analysis of *Vitis*, *Ampelopsis* and *Pathenocissus* and its application to the identification of rootstocks. Vitis. 34: 103-108.

25. **BOWERS J.E., DANGL G.S., VIGNANI R., MEREDITH C.P.** (1996): Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*V. vinifera* L.). Genome 39: 628-633.

26. **BOWERS J.E., DANGL G.S., MEREDITH C.P.** (1999a): Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. Am. J. Enol. Vitic. 50: 243-246.

27. **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.

28. **BRANAS M.M.** (1932): Sur la caryologie des Ampélidées, C R Acad. Sci. Paris 194: 121-123.

29. **BRETTING P.K., WIDRECHNER M.P.** (1995): Genetic Markers and Horticultural Germaplasm Management. HortScience 30 (7): 1349–1356.

30. **BRUNEL D.** (1994): A microsatellite marker in *Helianthus annus* L. Plant. Mol. Biol. 24: 397-400. Theor. Appl. Genet. 91: 195-199.

31. **BÜSCHER N., ZYPRIAN E., BLAICH R.** (1993): Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10-mer primers. Vitis 32: 187-188.

32. **BÜSCHGES R., HOLLRICHER K., PANSTRUGA R., SIMONS G., WOLTER M., FRIJTERS A., VANDAELEN R., VANDERLEE T., DIERGAARDE P., GROENENDIJK J., TÖPSCH S., VOS P., SALAMINI F., SCHULZE-LEFERT P.** (1997): The barley mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance.Cell 88: 695-705.

33. **CHANG L.**, **KARIN M.** (2001): Mammalian Map kinase signalling cascades. Nature. 410: 37-40.

34. **CHELKOWSKI J., TYRKA M., SOBKIEWICZ A.** (2003): Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular markers. J. Appl. Genet. 44: 291-309.

35. **CIPRIANI G., FRAZZA G., PETERLUNGER E., TESTOLIN R.** (1994): Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. Vitis 33: 211-215.

36. **COLLINS N.C., WEBB C.A., SEAH S., ELLIS J.G., HULBERT,S.H., PRYOR A.** (1998) The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. Molecular Plant-Microbe Interaction 11: 968-978.

37. **COLLINS G.G., SYMONS R.H.** (1993): Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. Plant ol. Biol. Peptr. 11: 105-112.

38. **COLLINS N.C., THORDAL-CHRISTENSEN H., LIPKA V., BAU S., KOMBRINK E., QIU J.L., HÜCKELHOVEN R., STEIN M., FREIALDENHOVEN A., SOMERVILLE S.C., SCHULZE-LEFERT P.** (2003): SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. Nature 425: 973-977.

39. **CONDIT R.**, **HUBELL S.P.** (1991): Abundance and DNA sequence of two-based repeat regions in tropical tree genomes. Genome 34: 66-71.

40. **CRESPAN M., MILANI M.** (2000): Application of various molecular methodologies to the characterization of rootstocks and table grapevines. Acta horticulturae 528: 97-104.

41. **CSEPREGI P. ÉS ZILAI J.** (1988): Szőlő fajtaismeret és -használat. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

42. **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.

43. **DECROOCQ V., FAVÉ M.G., HAGEN L., BORDENAVE L., DECROOCQ S.** (2003): Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. Theor. Appl. Genet. 106: 912–922.

44. **DENG Z., HUANG S., LING P., CHEN C., YU C., WEBER C.A., MOORE G.A., GMITER J.R.** (2000): Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. Theor. Appl. Genet. 101: 814-822.

45. **DETJEN L.R.** (1919): The limits of hybridization of *Vitis rotundifolia* with related species and genera. Technical bulletin, No. 17.

46. **DETTWEILER E., JUNG A., ZYPRIAN E., TÖPFER R**. (2000): Grapevine cultivar Müller-Thurgau and its true to type descent. Vitis 39: 63-65.

47. **DEVOS K.M. AND GALE M.D.** (1994): The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor. Appl. Genet. 84: 567-572.

48. **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.

49. **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. Breed. 15: 11-20.

50. **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-gene candidates. Theor. Appl. Genet. 114: 1249-1263.

51. **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.

52. **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.

53. **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.

54. **DRY, I.B., FEECHAN, A., ANDERSON, C., JERMAKOW, A.M., BOUQUET, A., ADAM-BLONDON, A.F. AND THOMAS, M.R.** (2009): Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. Australian Journal of Grape and Wine Research.

55. **EDWARDS A., CIVITELLO A., HAMMOND H.A., CASKEY C.T.** (1991): DNA typing and genetic mapping with trinetric and tetrametric tandem repeats. Am. J. Hum. Genet. 49: 746-756.

56. **ERICKSON E.O. AND WILCOX W.F.** (1997): Distribution of sensitivities to three sterol demethylation inhibitor fungicides among populations of Uncinula necator sensitive and resistant to triadimefon. Phytopathology 87: 784-791.

57. **FEECHAN A., JERMAKOV A.M, DRY I.B** (2009): Grapevine *MLO* candidates required for powdery mildew pathogenicity? Plant Signaling & Behavior 4: 522-523.

58. **FELIX G.**, **DURAN J.D., VALKO S., BOLLER T.** (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant J. 18: 265-276.

59. **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.

60. **FLOR H. H.** (1971): Current status of the gene - for – gene concept. Annual Review of Phytopathology. 9: 275-296.

61. **FOLK GY.** (1993): A szőlő betegségei. IN: Folk, Gy., Glits, M.: Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó.

62. **FÜZI I.** (2003): Környezeti tényezők szerepe az *Uncinula necator* (Schw) Burr. járvámydinamikájában. Doktori értekezés. Veszprémi Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi kar. Keszthely.

63. **FÜZI I.** (2009): Járványos szőlőbetegségek kialakulásának föltételei. Szakcikk. www. szoloszem.basf.hu

64. **GADOURY D.M., SEEM R.C., PEARSON R.C., AND WILCOX W.F**. (2001): Effects of Powdery Mildew on Vine Growth, Yield, and Quality of Concord Grapes. Plant disease 85: 137-140.

65. **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.

66. **GALET P.** (1988): Cépages et vignobles de France. Tome 1., Les vignes américaines. Imprimerie Charles Dehan, Parc Euromedicine, Montpellier, France.

67. **GENTZBITTEL L., MOUZEYA S., BADAOUI S., MESTRIES E., VEAR F., DE LABROUHE D.T., NICOLAS P.** (1998): Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. Theor. Appl. Genet. 96: 519–525.

68. **GOBBIN D., JERMINI M., LOSKILL B., PERTOT I., RAYNAL M., GESSLER C**. (2005): Plant Pathology 54**:** 522-534.

69. **GRANDO M.S., DE MICHELI L., BIASETTO L., SCIENZA A.** (1995): RAPD markers in wild and cultivated Vitis vinifera L. Vitis 34: 37-39.

70. **GYŐRFFYNÉ JAHNKE G. , DEÁK E., GYŐRFFYNÉ MOLNÁR J., KOCSIS L. , LAKATOS A., MÁJER J., STEFANOVITSNÉ BÁNYAI ÉVA, VARGA ZS.** (2008): A Vitis vinifera L. pontuszi fajtákra jellemző új savas foszfatáz izoenzim vizsgálat. Vitis vinifera L. pontuszi fajtákra jellemző új savas foszfatáz izoenzim vizsgálat. XIII. Fiatal Műszakiak Tudományos Ülésszaka. 2008. Kolozsvár.

71. **GUERRA B., MEREDITH C. P.** (1995): Comparison of *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* rootstock cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis. Vitis 34: 109-112.

72. **HAJDU E.** (2003): Magyar szőlőfajták-Varieties of Hungarian Grapes. Budapest, Mezőgazda Kiadó.

73. **HALÁSZ G., KOZMA P., MOLNÁR S., VERES A., HOFFMANN S., GALBÁCS ZS., KISS E., HESZKY L.** (2005a): Szőlőhibridek elemzése rezisztenciagénekhez kapcsolt markerekkel. A fajtaválaszték fejlesztése a kertészetben (Szerk. G. Tóth M.). Kertgazdaság, különkiadás, 127-132.

74. **HALÁSZ G., VERES A., KOZMA P., KISS E., BALOGH A., GALLI ZS., SZŐKE A., HOFFMANN S., HESZKY L.** (2005b): Microsatellite fingerprinting of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties of the Carpathian Basin. Vitis 44: 173-180.

75. **HAYASHI K.** (1992): PCR-SSCP: a method for detection of mutations. Genetic Analysis: Techniques and Applications, 9: 73-79.

76. **HE C.Y., TIAN A.G., ZHANG J.S., ZHANG Z.Y., GAI J.Y., CHEN S.Y.** (2003): Isolation and characterization of a full-length resistance gene homolog from soybean. Theor. Appl. Genet. 106: 786–793.

77. **HEGEDŰS Á., KOZMA P., NÉMETH M.** (1966): A szőlő. Akadémiai kiadó, Budapest.

78. **HERMÁN R., DR. STEFANOVITSNÉ BÁNYAI É., GYÖRFFYNÉ JAHNKE G., DR. KORBULY J.** (2003): A Kárpát – medencei szőlőfajták megkülönböztetése izoenzimek vizsgálatával. Lippay János - Ormos Imre - Vas Károly Tudományos Ülésszak. 2003. november 6-7., Budapest.

79. **HOFFMANN, S., DIGASPERO, G., KOVÁCS, L., HOWARD, S., KISS, E., GALBÁCS, Z., 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.

80. **HUETTEL B., SANTRA D., MUEHLBAUER F., KAHL G.** (2002): Resistance gene analogues of chickpea (*Cicer arietinum* L.): isolation, genetic mapping and association with a *Fusarium* resistance gene cluster. Theor. Appl. Genet. 105: 479-490.

81. **HVARLEVA T., RUSANOV K., LEFORT F., TSVETKOV I., ATANASSOV A., ATANASSOV I.** (2004): Genotyping of Bulgarian *V. vinifera* L. cultivars by microsatellite analysis. Vitis 43: 27-34.

82. **JACOB H.J., LINDPAINTNER K., LINCOLN S.E., KUSUMI K., BUNKER R.K., MAO YI-PEI, GANTEN D. DZAU V. J., LANDER E.S.** (1991). Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. Cell 67: 213-224.

83. **JAHNKE G., MÁJER J., LAKATOS A., GYŐRFFYNÉ MOLNÁR J., DEÁK EDIT, STEFANOVITSNÉ BÁNYAI ÉVA, VARGA P.** (2009): Isoenzyme and microsatellite analysis of Vitis vinifera L. varieties from the Hungarian grape germplasm. Scientia Horticulturae. 213-221.

84. **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.

85. 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.

86. JOYEUX A., FORTIN M.G., MAYERHOFER R., GOOD A.G. (1999): Genetic mapping of plant disease resistance gene homologues using a minimal *Brassica napus* L. population. Genome: 735-743.

87. JONES J.D.G., DANGL J.L. (2006): The plant immune system. Nature. 444: 323-329.

88. ISTVÁNFFI GY. (1908): A szőlőlisztharmat telelő gyümölcseinek felfedezéséről hazánakaban, tekintettel a védekezés gyakorlatára. Magyar Királyi Központi Szőlészeti Kísérleti Állomás és Ampelológiai Intézet Évkönyve 3: 61-77.

89. ISTVÁNFFI GY. (1912): A peronospora biológiájáról s a védekezésről. Budapest.

90. KALÓ P., ENDRE G., ZIMÁNYI L., CSANÁDI G., KISS, G.B. (2000): Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Theor. Appl. Genet. 100: 641–657.

91. **KANAZIN V., FREDERICK MAREK L., RANDY C. SHOEMAKER** (1996): Resistance gene analogs are conserved and clustered is soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 11746-11750. (October 1996 Genetics).

92. **KARL BAUER** (1966): Szőlősgazdák könyve. Integrált szőlőtermesztés. Mezőgazda Kiadó. A mű eredeti címe: Weinbau. Lehr- und Fachbuch für den „Integrierten Weinbau”6. überarbeite Auflage. Österreichisher Agrarverlag, Klosterneuburg, 1966.

93. **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 hybrid grape family. Sci. Hortcult. 126: 448-453.

94. **KATULA-DEBRECENI D.** (2011): Gombarezisztens szőlő genotípusok molekuláris azonosítása. Doktori értekezés. Szent István Egyetem. Növénytudományi Doktori Iskola, Gödöllő.

95. **KIRÁLY Z., EL-ZAHABY H.M., KLEMENT Z.** (1997): Role of Extracellular Polysaccharide (EPS) slime on plant pathogenetic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. Journal of Phytopathology. 145: 59-68.

96. **KISS E.** (1999): Növényi molekuláris genetika I. Egyetemi jegyzet, Gödöllő

97. **KISS E.** (2005): Molekuláris növénynemesítés. In: Mezőgazdasági Biotechnológia. 194-210. Szerk. Heszky L., Fésűs L., Hornok L. Agroinform Kiadó, Budapest.

98. **KLEMENT Z., BOZSÓ Z., KECSKÉS M.L., BESENYEI E., CZELLENG A., OTT P.G.** (2003). Local Early Induced Resistance of Plants as the First Line of Defence Against Bacteria. Pest Management Science. 59: 465-474.

99. **KOCSIS M., JÁROMI L., PUTNOKY P., KOZMA P., BORHIDI A.** (2005): Genetic diversity among twelve grape cultivars indigenous to the Carpathian Basin revealed by RAPD markers. *Vitis* 44: 87-91.

100. **KOLEDA I.** (1974): Ergebnisse von Kreuzungen zwischen *V. amurensis* und *V. vinifera* in der Züchtung frostwinderstandtfahiger Reben. Vitis. 14: 1-5.

101. **KONIECZNY A., AUSUBEL F.M.** (1994): A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotypespecific PCR-based markers. Plant J. 4: 403-410.

102. **KORBULY J.** (1999): Evaluation of different sources of resistance for breeding powdery mildew resistant grapevine varieties. Horticult. Sci. 5: 35-40.

103. **KORBULY J.** (2002): A *Vitis amurensis* (Rupr.) értékei a szőlőrezisztencia nemesítés számára. Int. J. Horticult. Sci. 8: 53-58.

104. **KOZMA P. JR.** (2000): Winegrape breeding for fungus disease resistance. Acta Horticult. 528: 505-510.

105. **KOZMA P. JR.** (2002): A szılırezisztencia-nemesítés szempontjai és módszerei Magyarországon. Int. J. Horticult. Sci. 8: 43-48.

106. **KOZMA P.JR., DULA T.** (2003): Inheritance of resistance to downy mildew and powdery mildew of hybrid family *Muscadinia* x *V. vinifera* x *V. amurensis* x Franco-American hybrid. Proc. 8th Int. Conf. Grapre Genet. and Breed. Acta Horticult. 603: 457-463.

107. **KOZMA P., KISS E., HOFFMANN S., GALBÁCS ZS., DULA T.,** (2006): Using the powdery mildew resistant *Muscadinia rotundifolia* and *Vitis vinifera* cv. Kismish vatkana for breeding new cultivars. 9th International Grape Conference on Grape Genetics and Breeding. Udine, Italy. Book of Abstracts, p. 7. 170.

108. **LABRA M., WINFIELD M., GHIANI A., GRASSI F., SALA F., SCIENZA A., FAILLA O.** (2001): Genetic studies on Trebbiano and morphologically related varieties by SSR and AFLP markers. *Vitis* 40. : 187-190.

109. **LACOCK L., VAN NIEKERK C., LOOTS S., DU PREEZ F., BOTHA A.M.** (2003): Functional and comparative analysis of expressed sequences from *Diuraphis*

noxia infested wheat obtained utilizing the conserved Nucleotide Binding Site. African Journal of Biotechnology. 2: 75-81.

110. **LAGERCRANTZ U., ELLEGREN H., ANDERSSON L.** (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. Nucleic Acids Research. 21 (5): 1111-1115.

111. **LAMBOY W.F., ALPHA C.G.** (1998): Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis vinifera* L.) species. J. Am. Soc. Hort. Sci. 123: 182-188.

112. **LEE S.Y., SEO J.S., RODRIGUEZ-LANETTY M., LEE D.H.** (2003): Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. Molecular Genetics and Genomics. 269: 101-108.

113. **LEFORT F., KYVELOS C.J., POISSE E., EDWARDS K.J., ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.A.** (2001): New microsatellite markers for *Vitis vinifera* L. and their conservation in *Vitis* spp. and hybrids. The Greek Vitis Database.

114. **LEFORT F., KYVELOS C., ZERVOU M., EDWARDS K., ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.** (2002): Characterization of new microsatellite loci from Vitis vinifera L. and their conservation in some Vitis species and hybrids. Mol. Ecol. Notes 2: 20-21.

115. **LIPKA V., DITTGEN J., BEDNAREK P., BHAT R., WIERMER M., STEIN M., LANDTAG J., BRANDT W., ROSAHL S., SCHEEL D., LIORENTE F., MOLINA A., PARKER J., SOMERVILLE S., SCHULZE-LEFERT P.** (2005): Pre- and postinvation defences both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. Science 310: 1180-1183.

116. **LITT M., LUTY J.A.** (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44: 397-401.

117. **LODHI M., ADALY M.J., YE G.N., WEEDEN N.F., REISCH B.I.** (1995): A molecular marker based linkage map of *Vitis*. Genome 38: 786-794.

118. **LOPES M., SEFC K., EIRAS-DIAS J., STEINKELLNER H., DA CÂMARA MACHADO M., DA CÂMARA MACHADO A.** (1999): The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. Theor. Appl. Genet. 99: 733-739.

119. **LUO S.L., HE P.C., ZHOU P., ZHENG X.Q.** (2001): Identification of molecular genetic markers tightly linked to downy mildew resistant genes in garpe. Acta Genet. Sinica China: 28. 76-82.

120. **MAGAREY P.A., WACHTEL M.F., EMMETT R.W.** (1994): Downy mildew. In: Grape Production Series Number 1: Diseases and Pests.

121. **MAGO R., NAIR S., MOHAN M.** (1999): Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. Theor. Appl. Genet. 99: 50-57.

122. **MAHANIL S., GARRIS A., OWENS C., RAMMING D., CADLE DAVIDSON L.** (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. Proceeddings p. 29.

123. **MALETIC E., SEFC K. M., STEINKELLNER H., KONTIC J. K., PEJIC I.** (1999): Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and detection of synonymous cultivars in neighbouring regions. Vitis 38: 79-83.

124. **MARGUERIT E., BOURY C., MANICKI A., DONNART M., BUTTERLIN G., NÉMORIN A., WIEDEMANN-MERDINOGLU S., MERDINOGLU D., OLLAT N., DECROOCQ S.** (2010): Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. Theor. Appl. Genet. 118: 1261-1278.

125. **MARINO R., SEVINI F., MADINI A., VECCHIONE A., PERTOT I., SERRA A.D., VERSINI G., VELASCO R., GRANDO M.S.** (2003) QTL mapping for disease resistance and fruit quality in grape. In: Proceedings of the VIIIth International Conference on Grape Genetics and Breeding. Acta Hortic. 603: 527–533.

126. **MARKERT C., MOLLER L. F.** (1959): Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 45: 753-763.

127. **MERDINOGLU D., WIEDEMANN-MERDINOGLU S., COSTE P., DUMAS V., HAETTY S., BUTTERLIN G., GREIF C.** (2003): Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia.* Proc. 8th. Int. Conf. Grape. Acta Horticult. 603: 451-456.

128. **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. Breed. 15: 349-366.

129. **MEYERS B.C., DICKERMAN A.W., MICHELMORE R.W., SIVARAMAKRISHNAN S., SOBRAL B.W., YOUNG, N.D.** (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant J. 20: 317–332.

130. **MEYER D., PAJONK S., MICALI C., O'CONELL R., SCHULZE-LEFERT P.** (2009): Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments.The Plant Journal, 57: 986-999.

131. **MIKLIS M., CONSONNI C., BHAT R.A., LIPKA V., SCHULZE-LEFERT P., PANSTRUGA R.** (2007): Barley Mlo modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defence pathways at the cell periphery. Plant Physiol. 144: 1132-1143.

132. **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 (4): 212-213.

133. **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.

134. **MORELL M.K., PEAKALL R., APPELS R., PRESTON L.R., H. LLOYD L.** (1995): DNA profiling techniques for plant variety identification. Australian Journal of Experimental Agriculture **35:** 807-819.

135. **MORTENSEN J.A.** (1971): Breeding grapes for central Florida. HortScience 6: 149-153.

136. **MULLIS K.B., FALOONA F.A.** (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-350.

137. **NAGY ISTVÁN** (1999): Továbbfejlesztett PCR-alapú polimorfizmus vizsgálati technikák. Szemle. Növénytermelés, Tom. 48. No. 4.

138. **NAKAMURA Y., LEPPERT M., O'CONELL P., WOLFF R., HOLM T., CULVER M., MARTIN C.** (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science 235: 1616-1622.

139. **NÉMETH M.** (1966): Borszőlőfajták határozókulcsa. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

140. **NÉMETH M.** (1967): Ampelográfiai album I. (Termesztett borszőlőfajták 1.) Budapest: Mezőgazdasági Kiadó 234. p.

141. **NÉMETH M.** (1975): Ampelográfiai album III. (Alany-, direkt termő és csemegeszőlőfajták) Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

142. **NOIR S., COMBES M.C., ANTHONY F., LASHERMES P.** (2001): Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). Mol. Gen. Genom. 265: 654-662.

143. **OLMO H.P**. (1971): *Vinifera* x *rotundifolia* hybrids as wine grapes. Am. J. Enol. Vitic. 22: 87-91.

144. **OLMO H.P.** (1986): The potential role of (*Vinifera* x r*otundifolia*) hybrids in grape variety improvement. Experientia 42, Birkhauser Verlag.

145. **ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K.** (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. Genomics. 5: 874-879.

146. **PAN Q., WENDEL J., FLUHR R**. (2000): Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. Journal of Molecular Evolution. 50: 203-213.

147. **PARAN I., MICHELMORE I.W.** (1993): Development of reliable markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85: 985-993.

148. **PAUQUET J., BOUQUET A., THIS P., ADAM-BLONDON A.-F.** (2001): Estabilishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene RUN1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. Theor. Appl. Genet. 103: 1201-1210.

149. **PEEVER T.L., SALIMATH S.S., SU G., KAISER W.J., MUEHLBAUER F.J.** (2004): Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. Mol. Ecol. 13: 291–309.

150. **PELLERONE F.I., EDWARDS K.J., THOMAS M.R.** (2001): Grapevine microsatellite repeats: isolation, characterisation and use for genotyping of grape germplasm from Southern Italy. Vitis 40: 179–186.

151. **PEÑUELA S., DANESH D., YOUNG N.D.** (2002): Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of non-TIR NBS-LRR genes in soybean. Theor. Appl. Genet. 104: 261-272.

152. **PETERSON D., TOMKINS J., FRISCH D., WING R., PATERSON A.** (2000): Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: An illustrated guide, J. Agric. Genomics. Vol. 5. http://www.ncgr.org

153. **PETRÁNYI GY., GYÓDI É.** (2005): A fő hisztokompabilitási rendszer (MHC) molekuláris genetikai szerepe a „saját és idegen" felismerésben és jelentősége a fajfejlődésben. Immungenomika: a genomalapú immunológia. Magyar Tudomány, 2005/6: 659.o.

154. **PLINIUS SECUNDUS CAIUS** (1987): A természet históriája. A növényekről. Részletek a XII-XXI. Könyvekből. Natura. Veszprém. (Fordította: Tóth S.).

155. **PLOCIK A., LAYDEN J., KESSELI R.** (2004): Comparative analysis of NBS domain sequences of NBS-LRR disease resistance genes from sunflower, lettuce and chicory. Molecular Phylogenetics and Evolution. 31: 153-163.

156. **QIAGEN G.** (2000): DNeasy Plant Maxi Kit Handbook. 15-17. p.

157. **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.

158. **REGNER F., STEINKELLNER H., TURETSCHEK E., STADLHUBER A., GLÖSSL J.** (1996): Genetische Characterisierung von Rebensorten (*Viltis vinifera* L.) durch Mikrosatelliten – Analyse. Mitteilungen Klosterneuburg. 46: 52-62.

159. **REGNER F., WIEDECK E., STADLBAUER A**. (2000): Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. Vitis 39: 103-107.

160. **REGNER F., STADLBAUER A., EISENHELD C.** (2001): Molecular markers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties. *Acta Horticulturae* 546: 331-341.

161. **REHLI M.** (2002): Of Mice and Men: Species Variations of Toll-like Receptor Expression. Trends in Immunology. 23: 375-378.

162. **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.

163. **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.

164. **ROS BARCELÓ A., ZAPATA J. M., CALDERÓN A. A.** (1996): A Basic Peroxidase Isoenzyme, Marker of Resistance Against Plasmopara viticola in Grapevines, is Induced by an Elicitor from Trichoderma viride in Susceptible Grapevines. Journal of Phytopathology. 144: 309-313.

165. **ROSENBERG N.A., PRITCHARD J.K., WEBER J.L., CANN H.M., KIDD K.K., ZHIVOTOVSKY L.A., FELDMAN M.W.** (2002): Genetic structure of human populations. Science. 298: 2381-2385.

166. **ROSSONI M., LABRA M., IMAZIO S., GRASSI F., SCIENZA A., SALA F.** (2003): Genetic relationship among grapevine cultivars grown in Oltrepó Pavese (Italy). *Vitis* 42 (1): 31-34.

167. **ROY A., FRASCARIA N., MAC KAY J., BOUSQUET J.** (1992): Segregrating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Theor. Appl. Genet. 85: 173-180.

168. **SAIKI R., GELFAND D., STOFFEL S., SCHARF S., HIGUCHI R., HORN G., MULLIS K., ERLICH H.** (1988): Primer – directed enzymatic amplification of DNA within a thermostable DNA polymerase. Science. 239: 487-491.

169. **SÁNCHEZ-ESCRIBANO E.M., MARTÍN J.R., CARRÉNO J., CENIS J.L.** (1999): Use sequencetagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. Genome 42: 87-93.

170. **SCOTT K.D., EGGLER P., SEATON G., ROSETTO M., ABLETT E.M., LEE L.S., HENRY R.J.** (2000): Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor. Appl. Genet. 100: 723-726.

171. **SCHMIDLIN L., PRADO E., COSTE P., WIEDEMANN-MERDINOGLU S., MESTRE P., MERDINOGLU D.** (2006): Analysis of cellular and molecular basis of downy mildew resistance in *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera* hybrids. 9th Int. Conf. Grape Genet. Breed. Udine 2006 July 2-6.

172. **SEFC K.M., STEINKELLNER H., WAGNER H.W., GÖSSL J., REGNER F.** (1997): Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. Vitis. 36: 179-183.

173. **SEFC K.M., REGNER F., TURETSCHEK E., GLÖSSL J., STEINKELLNER H.** (1999): Identification of microsatellite sequences in Vitis riparia and their applicability for genotyping of different Vitis species. Genome 42: 367-373.

174. **SEFC K.M., LOPES, M.S., LEFORT F., BOTTA R., ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.A., IBANEZ J., PEJIC I., WAGNER H.W., GLÖSSL J., STEINKELLNER H.** (2000): Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. Theor. Appl. Genet. 100: 498-505.

175. **SENIOR M.L., CHIN E.C.L., LEE M.C., SMITH J.S., STUBER C.W.** (1996): Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GENBANK database: map construction. Crop Sci. 36**:** 1676–1683.

176. **SENSI E., VIGNANI R., ROHDE W., BIRICOLTI S.** (1996): Characterization of genetic biodiversity within *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR-DNA marker technology. Vitis 35: 183-188.

177. **SCHAEFFER M**. (1969): La crise du phylloxera. Economie méridionale. 67: 3-23.

178. **SHEN K.A., MEYERS B.C., ISLAM-FARIDI M.N., CHIN D., STELLY D.M., MICHELMORE R.W.** (1998): Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. Molecular Plant-Microbe Interaction. 11: 815-823.

179. **SMALL J.K.** (1913): Flora of the Southeastern United States. 2nd edition. 1394 p. New York.

180. **SMITH P.G.** (1944): Embryo culture of a tomato species hybrid. Proc. Am. Sci. 44: 413-416.

181. **SMITH J.F., BURKE C.C., WAGNER W.L.** (1996): Interspecific hybridization in natural populations of Cyrtandra (*Gesneriaceae*) on the Hawaiian islands: evidence from RAPD markers. Pl. Systematics and Evolution. 200: 61-77.

182. **SMITH C.M.** (2005): Plant Resistance to Arthropods: molecular and Conventional Approaches. Springer.

183. **SOUTHERN E.** (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology. 98: 503-517.

184. **STAUB J. E., SERQUEN F. C., GUPTA M.** (1996): Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeeding. HortScience 31: 729-740.

185. **STAUDT G., KASSEMEYER H.H.** (1995): Evaluation of downy mildew resistance in various genotypes of wild *Vitis* species. Vitis. 34: 225-228.

186. **STEIN M., DITTGEN J., SÁNCHEZ-RODRIQUEZ C., HOU B-H., MOLINA A., SCHULZE-LEFERT P., LIPKA V., SOMERVILLE S.** (2006): Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. The Plant Cell, 18: 731-746.

187. **SUBDEN R.E., KRIZUS A., LOUGHEED S.C., CAREY K.** (1987): Isozyme Characterisation of Vitis Species and Some Cultivars. American Journal of Enology and Viticulture. 38: 176-181.

188. **SUNNUCKS P., WILSON A.C.C., BEHEREGARAY L.B., ZENGER K., FRENCH J., TAYLOR A. C.** (2000): SSCP is not so difficult: the application and utility of singlestanded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Molecular Ecology. 9: 1699-1710.

189. **SUTKA J.** (2004): Növényi citogenetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

190. **SZATMÁRI, Á., KLEMENT, Z.** (2003). Hasonlóságok és különbözőségek a növény- és állatvilág immun-mechanizmusában. Növénytermelés. 52. 6. 703-712.

191. **SZILÁGYI J.E.** (2008): Borjog, különös tekintettel az eredetvédelem kérdéseire. PhD értekezés. Deák Ferenc Állam- és Jogtudomány Doktori Iskola. Miskolc.

192. **SZŐKE A.**, **KISS E., MILOTAY P., SZABÓ-HEVÉR Á., HESZKY L.** (2005): Molekuláris markerek alkalmazása a paradicsom fonálféreg–rezisztencianemesítésben. Kertgazdaság, 37. (3).

193. **TARAMINO G., TINGEY S.** (1996): Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. Genome. 39: 277-287.

194. **TENA G.**, **ASAI T., CHIU W-L., SCHEEN J.** (2001): Plant Mitogen – Activated Protein Kinase Signaling Cascades. Current Opinion in Plant Biology. 4: 392-400.

195. **TESSIER C., DAVID J., THIS P., BOURSIQUOT J.M., CHARRIER A.** (1999): Optimization ofthe choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera L*. Theor. Appl. Genet, 98: 171-177.

196. **THIS P., JUNG A., BOCCACCI P., BORREGO J., BOTTA R., COSTANTINI L., CRESPAN M., DANGL G. S., EISENHELD C., FERREIRA-MONTEIRO F., GRANDO S., IBAŇEZ J., LACOMBE T., LAUCOU V., MAGALHÃES R., MEREDITH C. P., MILANI N., PETERLUNGER E., REGNER F., ZULINI L., MAUL E.** (2004): Development of a standard set of microsatellite reference allels for identification of grape cultivars. Theor Appl Genet 109. (7): 1448-1458.

197. **THOMAS M.R., SCOTT N.S.** (1993): Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence–tagged sites. Theor. Appl. Genet. 86: 985-999.

198. **TOTAD A.S., FAKRUDIN B., KURUVINASHETTI M.S.** (2005): Isolation and characterization of resistance gene analogs (RGAs) from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Euphytica. 143: 179-188.

199. **TÓTH IMRE ÉS PERNESZ GYÖRGY** (2001): Szőlőfajták. Második kiadás. Mezőgazda Kiadó.

200. **TURCSÁNYI G.** (1998): Mezőgazdasági növénytan. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.

201. **VELASCO R., ZHARKIKH A., TROGGIO M., CARTWRIGHT D.A., CESTARO A**. (2007): A high quaility draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS ONE 2 (12):e1326. doi:10.1371/journal.pone.0001326.

202. **VERCESI A., TORNAGHI R., BURRUANO S., FAORO F**. (1999): A cytological and ultrastructural study on the maturation and germination of oospores of *Plasmopara viticola* from overwintering vine leaves. Mycol. Res. 103: 193-202.

203. VÉGHELYI K. (2000): htttp://www.agronaplo.hu. Országos mezőgazdasági folyóirat VII. évfolyam 2003/6.

204. VIDAL J.R., MORENO S., MASA A., ORTIZ J.M. (2002): Study of the genetic homogeneity of Albariño (*Vitis vinifera* L.) growing in Galicia (Spain) using isozyme and RAPD markers. Vitis. 37: 145-146.

205. VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. (1995): AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.

206. WALTERS T.W., POSLUSZNY U., KEVAN P.G. (1989): Isozyme analysis of the grape (Vitis). I. A practical solution. Canadian Journal of Botany 67: 2894-2899.

207. WANG Y., CHEN J., LU J., LAMIKANRA O. (1999): Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and florida bunch grapes. Sci. Hortic. 82: 85-94.

208. WARD H.M. (1902): On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss.). Annals of Botany. 16: 233-315.

209. WEBER J.L., MAY P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Human Genet. 44: 388-396.

210. WEEDEN N.F., REISCH B.I., MARTENS M.H.E. (1989): Genetic analysis of isoenzyme polymorphism in grape. J. Am. Soc. Hort. Sci. 113: 765-769.

211. WELSH J., MCCLELLAND M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Research. 18: 7213-7218.

212. WELTER L.J., GÖKTÜRK-BAYDAR N., AKKURT M., MAUL E., EIBACH R., TÖPFER R., ZYPRIAN E.M. (2007): Genetic mapping and localisation of

quantitative trait lociaffecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*V. vinifera* L.). Mol. Breed. 20: 359-374.

213. **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

214. **WILLIAMS J.G.K., LIVAK A.R., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V.** (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers use useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531-6535.

215. **WILLIAMSON V.M., HO J.Y., WU F.F., MILLER N., KALOSHIAN I.** (1994): A PCR – based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi* in tomato. Theor. Appl. Genet. 93: 894-901.

216. **WU T., TANKSLEY S.D.** (1993): A novel repetitive DNA sequence in the genus *Oryza*. Theor. Appl. Genet. 84: 136-144.

217. **WYLIE A.P.** (1871): Hybridization of rotundifolia grapes. American Pomological Society Proceedings 13: 113-116.

218. **YANG Z.-N., MIRKOV T.E.** (2000): Isolation of large terminal sequences of BAC inserts based on double- restriction – enzyme digestion followed by anchored PCR. Genome. 43: 412-415.

219. **YAGHOOBI J., KALOSHIAN I., WEN Y., WILLIAMSON V.M.** (1995): Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. Theor. Appl. Genet. 91: 457-464.

220. **YU I.C., PARKER J.B., ANDREW F.** (1998): Gene – for – Gene resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* Dndl mutant. Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA. 95: 7819- 7824.

221. **YU Y.G., BUSS G.R., SAGHAI MAROOF M.A.** (1996): Isolation of a super family of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93: 11751-11756.

222. **ZANATHY G.** (2004): Agro napló, Országos mezőgazdasági szakfolyóirat - VIII. évfolyam - 2004/12.

223. **ZANE L., BARGELLONI L., PATARNELLO T.** (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology. 11: 1-16.

224. **ZHAO X., KOCHERT G.** (1993): Phylogenetic distribution and genetic mapping of a $(GGC)_n$ microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). Plant Molecular Biology. 21: 607-614.

225. **ZYPRIAN E., AKKURT M., FISCHER B., SALAKHUTDINOV I., WELTER L., KORTEKAMP A., EIBACH R., TÖPFER R.** (2005): Fundamental research meets pratical breeding: genetics of disease resistance in grapevine. In: Proceedings of International Grape Genomics Symposium, St. Louis, USA, 12–14 July 2005.

9 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kiss Erzsébetnek a szakmai és a gyakorlati tanácsaiért, valamint a folyamatos támogatásáért. Külön köszönettel tartozom a publikációim és a dolgozatom elkészítésében nyújtott nélkülözhetetlen és önzetlen segítségéért.

Köszönöm Dr. Kozma Pálnak a PTE Szőlészeti és Borászati Intézet (Pécs) igazgatójának a segítségét, valamint hogy a vizsgálataimhoz szükséges növényanyagot a rendelkezésemre bocsátotta.

Szeretném megköszönni Dr. Heszky Lászlónak, az intézet korábbi vezetőjének is, hogy a SZIE Genetika és Biotechnológia Intézetében megismerkedhettem a molekuláris genetika elméleti és gyakorlati alapjaival, valamint hogy lehetővé tette számomra a kísérleteim elvégzését és az Intézetben végzett munkámat folyamatosan figyelemmel kísérte.

Köszönöm Dr. Halász Gábornak és Dr. Veres Anikónak a vizsgálatok és a laboratóriumi munka során nyújtott segítőkészségét, szakmai tanácsait. Köszönöm a tanszék posztdoktorainak és doktoranduszainak - Dr. Galbács Zsuzsanna, Dr. Szőke Antal, Dr. Szabó Zoltán, Lágler Richárd, Koncz Tímea- segítségét.

Köszönöm Dr. Hoffmann Sarolta segítőkészségét a PTE Szőlészeti és Borászati Intézet és a SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet közötti együttműködés során.

Köszönöm az intézet összes dolgozójának kedvességét, barátságos és segítőkész hozzáállását munkámhoz és tanulmányaimhoz.

Köszönettel tartozom Családomnak kitartásukért és a támogatásukért.