



**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**SZŐLŐ FAJTÁK SZÍNVÁLTOZATAINAK ELKÜLÖNÍTÉSE ÉS *VITIS* FAJOK  
MOLEKULÁRIS EVOLÚCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA**

Doktori (PhD) értekezés

**Kerekes Adrienn**

**Gödöllő**

**2019**

## **A Doktori Iskola**

**Megnevezés:** **Növénytudományi Doktori Iskola**

**Tudományága:** **Növénytermesztési és kertészeti tudományok**

**Vezetője:** **Dr. Helyes Lajos**

Egyetemi tanár, az MTA doktora

SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Kertészeti Technológiai Intézet

**Témavezetők:** **Dr. Kiss Erzsébet**

Egyetemi tanár, a mezőgazdasági tudományok kandidátusa

SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet

**Dr. Szőke Antal**

Egyetemi docens

SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet

.....  
Dr. Kiss Erzsébet

Témavezető

.....  
Dr. Szőke Antal

Témavezető

.....  
Dr. Helyes Lajos

A Doktori Iskola vezetője

## TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK .....	3
JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	5
1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS .....	6
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	8
2.1 A flavonoidok szerepe és jellemzése .....	8
2.2 Az antociánok fizikai-kémiai jellemzői .....	9
2.3 Az antociánok bioszintézise .....	11
2.4 Az antocián bioszintézis szabályozása .....	12
2.5 Az antociánok bioszintézise szőlőben .....	15
2.5.1 A <i>VvMyb</i> transzkripció faktor géncsalád szőlőben .....	18
2.5.1.1 A <i>VvMybA1</i> transzkripció faktor polimorfizmusa, mint a bogyószín variáció kulcsa .....	19
2.5.1.2 A <i>VvMybA2</i> transzkripció faktor polimorfizmusa .....	23
2.6 <i>VvMybA</i> haplotípusok szőlőben .....	24
2.7 A <i>VvMybA</i> markerek felhasználása a növénynevelésben és a génmegőrzésben ..	25
2.8 A <i>Vitaceae</i> család evolúciós története .....	29
2.9 A <i>Vitis</i> nemzetség evolúciója .....	30
2.10 A <i>Vitis</i> nemzetség rendszertani kapcsolatrendszere .....	32
2.11 A DNS nem kódoló régióinak jelentősége filogenetikai vizsgálatokban .....	35
2.12 A bogyószín mint lehetséges domesztikációs és filogenetikai marker .....	37
3 ANYAG ÉS MÓDSZER .....	40
3.1 A <i>VvMybA1</i> allél polimorfizmus meghatározása kárpát-medencei fajtákban .....	40
3.1.1 Vizsgált növényanyag .....	40
3.1.2 DNS kivonás .....	41
3.1.3 A vizsgálatokban felhasznált markerek .....	41
3.1.4 PCR körülmények és agaróz gélelektroforézis .....	42
3.2 SNP polimorfizmus meghatározása kárpát-medencei és más európai fajtákban .....	43
3.2.1 Növényanyag .....	43
3.2.2 Felhasznált primerek .....	43
3.2.3 <i>VvMybA2</i> gén SNP vizsgálata SNaPshot™ módszerrel .....	44
3.3 <i>Vitis</i> fajok vizsgálata .....	46
3.3.1 Növényanyag .....	46

3.3.2	Felhasznált primer és PCR körülmények .....	46
3.3.3	Ligálás, transzformáció és szekvenálás .....	47
4	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK .....	48
4.1	Kárpát-medencei fajták <i>VvMybA1</i> allél polimorfizmusának meghatározása .....	48
4.2	Szőlő rügymutánsok elkülönítése SNP polimorfizmus alapján .....	56
4.3	<i>Vitis</i> fajok filogenetikai vizsgálata .....	65
4.4	Új tudományos eredmények .....	77
5	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....	78
6	ÖSSZEFOGLALÁS .....	84
7	SUMMARY .....	86
8	IRODALOMJEGYZÉK .....	88
9	MELLÉKLETEK .....	107
10	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	109

## JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA: abscisic acid = abszcizinsav  
ABRE: ABA- responsive elements = abszcizinsavra reagáló elem  
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism = amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus  
ANS: anthocyanidin synthase = antocianidin-szintáz  
B: blanc = fehér  
bHLH: Basic helix-loop-helix  
CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences = felszaporított szekvencia hasítási polimorfizmusa  
CHI: chalcone isomerase = kalkonizomeráz  
CHS: chalcone synthase = kalkon-szintáz  
CoA: malonil-koenzim A  
cpDNA: Chloroplast DNA = kloroplasztisz DNS  
cpSSR: Chloroplast Simple Sequence Repeat = kloroplasztisz mikroszatellit ismétlődés  
C4H: cinnamate 4-hydroxylase = cinnamát 4-hidroxiláz  
DFR: dihydroflavonol reductase = dihidroflavon-reduktáz  
DNS: Deoxiribonukleinsav  
ETS: External Transcribed Spacer = Külső átíródo elválasztó szekvencia  
F3H: flavanone 3-hydroxylase = flavon-3-hidroxiláz  
F3'H: flavanone 3'-hydroxylase = flavon 3'-hidroxiláz  
F3'5'H: flavanone 3'5'-hydroxylase = flavon 3'5'-hidroxiláz  
G: gris = szürke  
*Gret-1*: Grapevine retrotransposon 1 = Szőlő retrotranszpozon 1  
ITS: Internal Transcribed Spacer = Belső átíródo elválasztó szekvencia  
LDOX: leucoanthocyanidin dioxygenase = leukoantocianidin-dioxigenáz  
LTR: Long Terminal Repeat = hosszú terminális ismétlődés  
N: noir = fekete  
PA: Proanthocyanidins = proantocianidin  
PAL: phenylalanine ammonia lyase = fenilalanin-ammónia-liáz  
PCR: Polymerase Chain Reaction = polimeráz lánreakció  
RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA = véletlen amplifikált polimorf DNS  
Rg: rouge = piros  
Rs: rose = rózsaszín  
SNP: Single Nucleotide Polymorphism = Egy nukleotidos polimorfizmus  
SRAP: Sequence-Related Amplified Polymorphism = Szekvencia specifikus amplifikált polimorfizmus  
SSR: Simple Sequence Repeat = Egyszerű szekvencia ismétlődés  
TE: Transposable Element = Transzpozon (áthelyeződő elem)  
TF: Transcription Factor = Transzkripció faktor  
UGFT: UDP-flavonoid glucosyl transferase = UDP-glükóz: flavonoid 3-O-glükoziltransferáz  
WDR: WD-repeat domain protein = Triptofán (W)-Aszparaginsav (D) ismétlődő fehérje  
4CL: 4-coumarate-CoA ligase = 4-kumarát-CoA ligáz

# 1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A termesztett szőlő (*Vitis vinifera* L. *subsp. vinifera*) az egyik legrégebbi és legfontosabb kultúrnövényünk. A szőlő egyik meghatározó minőségi tulajdonsága a bogyók színe. Ez sok esetben meghatározhatja egy-egy fajta felhasználási típusát is: bor, csemege, szőlőlé. Az évezredek során a mutációk, a természetes hibridizáció, majd a 19. századtól kezdve a tudatos nemesítési és szelekciós munka eredményeként számtalan színváltozat alakult ki: fekete, kék, piros, rózsaszín, szürke és fehér/zöld. A bogyók színét a héjban felhalmozódó antociánok mennyisége és minősége határozza meg. Az ezt meghatározó genetikai faktorok tágabb értelemben tehát fontos domesztikációs géneknek is tekinthetők a feltételezett ős, a fekete bogyójú *Vitis sylvestris* GMEL.-ből történő házasítás során.

A szőlőfajok többségére és a *Vitis vinifera* L. fajták ősére jellemző fekete színből ezek a különböző színváltozatok az antocián bioszintézisben résztvevő gének és a működésüket szabályozó transzkripciós faktorok mutációi miatt alakultak ki. A fehér szín az UDP-glükóz: flavonoid 3-O-glükoziltranszferáz (UFGT) enzim génjének működését szabályozó két Myb transzkripciós faktor (*VvMybA1*, *VvMybA2*) funkcióvesztéses mutációjának eredményeképpen alakult ki, míg a színes változatok a *VvMybA1* gén kódoló régiójában történő inszerciókra/deléciónokra (INDEL), pontmutációkra, illetve kimérizmusra és az ebből adódó génexpressziós különbségekre vezethetők vissza.

A GrapeGen06 EU projekt egyik fontos célkitűzése volt az európai őshonos fajták morfológiai és mikroszatellit markerekkel történő leírása, jellemzése, a szinonimák és homonimák kiszűrése. A SZIE Genetika és Biotechnológia Intézete ebben a projektben összesen 259 Magyarországon termesztett és nemesített fajta, s klón, köztük 97 kárpát-medencei fajta 9-12 mikroszatellit lókuszbán történő jellemzését végezte el. A fajták között több olyan csoport (színvariáns) is van, melyek SSR allélmintázata megegyezik, így nem lehet egyedi mikroszatellit ujjlenyomattal jellemezni. Mivel ezek a fajták, az ún. rügymutánsok (*conculata*) a bogyószínükben különböznek, így a köztük lévő genetikai különbségek az antocián-bioszintézisben résztvevő génekben és szabályozó régiókban keresendők. Ezek az ún. rügymutánsok mind a mai napig viszonylag gyakran kialakulhatnak mind a világ, mind a helyi fajták esetében. Ezekből a spontán mutánsokból új fajtákat lehet előállítani. Ennek egyik talán legismertebb képviselője a 'Pinot' fajtakör (noir, gris, rouge, blanc).

Az egyedi különbségeket adó mutációkat nemcsak a *conculta* tagok elkülönítésére lehet felhasználni, hanem a keresztezési partnerek *MybA1* és *MybA2* allélösszetételének meghatározásával előre jelezhető, vagy már csíranövény korban utólag is meghatározható az utódokban a bogyók színe. Így ezek az eredmények a gyakorlati nemesítési munkában is felhasználhatóak, mivel a bogyók színe fenotípusosan a keresztezést követően csak 4-5 év múlva értékelhető. Az adott tulajdonsággal kapcsolt genetikai markerek felhasználásával azonban ez az idő jelentősen lecsökkenthető, emellett a nemkívánatos genotípusok negatív szelekciójával jelentősen lecsökkenti a költségeket is.

Az utóbbi évtizedekben az új fajták nemesítése során egyre nagyobb figyelmet fordítanak az Észak-Amerikában és Ázsiában őshonos szőlő fajokra, amelyek értékes rezisztencia-források lehetnek a különböző biotikus és abiotikus stresszekkel szemben. Növekvő gazdasági jelentőségük ellenére a *Vitis* fajok evolúciója még nincsen teljesen tisztázva. A nemzetség filogenetikai, biogeográfiai és taxonómiai kutatásainak eredményei sokszor ellentmondásosak és a belőlük levont következtetések megkérdőjelezhetőek.

Annak ellenére, hogy a szőlőfajok bogyószínében lényegesen kisebb variációk figyelhetők meg, mint a *Vitis vinifera* fajtáknál, az antocián bioszintézist szabályozó transzkripciós faktorok kódoló régiójában már több mutációt is azonosítottak. Feltételezésünk szerint a *VvMybA* transzkripciós faktorokat kódoló régiókkal szorosan kapcsolt nem kódoló DNS szakaszok „semleges mutációi” is alkalmasak lehetnek a *Vitis* fajok evolúciójának vizsgálatára.

#### CÉLKITŰZÉSEK:

- Régi kárpát-medencei fajták *VvMybA1* transzkripciós faktor gén allélösszetételének meghatározása és a felhasznált markerek alkalmazhatóságának bizonyítása.
- Különböző származású színvariánsok egyedi elkülönítése *VvMybA1* és *VvMybA2* allélösszetételük meghatározásával.
- A különböző földrajzi eredetű szőlőfajok *MybA1* és *MybA2* génjeivel szorosan kapcsolt nem kódoló régióinak szekvencia-szintű összehasonlításával egy új filogenetikai kapcsolatrendszer felállítása a *Vitis* nemzetségen belül. A kapott eredményekből elkészített dendrogram szerkesztése és összehasonlítása a korábban publikált adatokkal.

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A flavonoidok szerepe és jellemzése

A flavonoidok élővilágban betöltött szerepe rendkívül összetett és szerteágazó. A természetben megjelenő színek, biológiai jelzőrendszerek, amelyek meghatározó szerepet töltenek be a rovarok, madarak és növényevő állatok életében. Emellett segítik a növény reprodukcióját a beporzással, a magok és termések terjesztésével (ANTUS és MÁTYUS 2014).

A virágok, gyümölcsök, magvak és a levelek színének kialakításán kívül a flavonoidok kulcsfontosságú szerepet töltenek be a megporzást segítő rovarok csalogatásában, védekezési mechanizmusokban, az UV-védelemben, valamint a fitopatogének elleni védelemben (MOL et al. 1998, WINKEL-SHIRLEY 2002, BRADSHAW és SCHEMSKE 2003). Számos képviselőjüknek van antifungális, antibakteriális, antioxidáns, valamint gyulladásgátló hatása (ANTUS és MÁTYUS 2014).

A flavonoidok szerepének - főként a növényekben található piros, kék és lila színyanyagokként megjelenő másodlagos anyagcsere termékeknek - nagy figyelmet szenteltek, és szentelnek napjainkban is (WINKEL-SHIRLEY 2001).

A flavonoidok változatos aromás vegyületeket alkotó családokat képeznek, amelyek fenilalaninból és malonil-koenzim A-ból (CoA- zsírsav bioszintézisen keresztül) származnak. Ezek a vegyületek hat fontosabb alcsaládra oszthatóak, melyek a legtöbb növényben megtalálhatóak: chalkon, flavon, flavonol, flavonoid, antocián és a tanninok. Egy hetedik csoportot is elkülöníthetünk, ezek az auronok, melyek ugyan sok növényben jelen vannak (sárga szín), de nem olyan széleskörűen elterjedtek, mint a másik hat csoportba tartozó vegyülettípusok (WINKEL-SHIRLEY 2001, 2006).

A flavonolokat tartják a stresszválaszokban résztvevő legfontosabb flavonoidoknak; ez a csoport a legősibb és a legszélesebb körben elterjedt flavonoid, amely rendkívül fontos élettani tevékenységet tölt be a növény életében (STAFFORD 1991, POLLASTRI és TATTINI 2011).

Az egészségügyi előnyök miatt szintén nagy az érdeklődés a flavonoidok iránt, különösen olyan vegyületek esetében, mint az izoflavonoidok, amelyek rákellenes hatásúak vagy a vörösborból levő sztilbén, amelyekről úgy gondolják, hogy hozzájárulnak a szívbetegségek kialakulásának csökkentéséhez (STAFFORD 1991).



Több mint 6000 különböző flavonoidot azonosítottak eddig, és nem kizárt, hogy ez a csoport további vegyületekkel bővíthet (FERRER et al. 2008). Ez a hihetetlenül nagy szám a flavonoidok származékaiban keresendőek. Ez a rengeteg hasonló, vagy rokon molekula csupán a heterociklusos gyűrű oxidációs fokában, a fenolos hidroxilcsoportok számában és helyzetében különbözhet egymástól, valamint abban, hogy a hidroxilcsoportok helyébe milyen csoportok (pl. metoxi-, metiléndioxi-, preniloxi-, izopreniloxi- stb.) épülhetnek be (ANTUS és MÁTYUS 2014).

A hüvelyesek és néhány nem hüvelyes növény szintetizálnak speciális flavonoidokat is, ezek az izoflavonoidok (YU és MCGONIGLE 2005, MIADOKOVÁ 2009, DU et al. 2010, WANG 2011). A szőlő és a földimogyoró, sztilbéneket tartalmaznak, amelyek a chalkonokhoz szorosan kapcsolódó vegyületek (CHONG et al. 2009, SHEN et al. 2009). A kondenzált tanninok, vagy proantocianidinek (PA) néven ismert polifenol vegyületek olyan növényi másodlagos anyagcseretermékek, melyek szintén a flavonoid bioszintézis útján szintetizálódnak. A növényekben széles körben előfordulnak, és fontos szerepet játszanak a növényevő rovarok elleni védekezésben (HARBORNE és GRAYER 1993, PETERS és CONSTABEL 2002).

A proantocianidinek antioxidáns hatása miatt, az emberi egészségre is kedvező hatással vannak, beleértve a szabadgyökök általi negatív hatások semlegesítését, és a szív- és érrendszeri betegségek elleni védelmet (BAGCHI et al. 2000, LIN et al. 2002, COS et al. 2004). A PA-k ezen kívül hozzájárulnak számos gyümölcs és más növényi termék, mint például gyümölcslevek és a tea (*Camellia sinensis*) kissé fanyar ízének kialakításához. Emellett fontos szerepük van a vörösbor minőségének és színének megtartásában (GLORIES 1988).

A növényekben a flavonoidok bioszintézise több ágon is történhet, amelyek különböző flavonoid vegyület-alsztályokat eredményeznek, ezek mindegyike különböző funkciókat lát el a növény fejlődésében, reprodukciójában és az abiotikus stresszekkel szembeni védelemben (MARTIN és GERATS 1993).

## **2.2 Az antociánok fizikai-kémiai jellemzői**

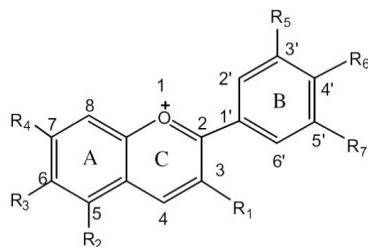
Az antociánok a flavonoid család egyik fő csoportját alkotják, amelyek a vakuólumban tárolt kis vízoldható molekulákból állnak. A magasabb rendű növények legfontosabb pigmentjei. Ezek a pigmentek felelősek a virágok és gyümölcsök narancssárga, rózsaszín,

vörös, lila és kék színének kialakításáért (HARBORNE és WILLIAMS 2000). Görög eredetű nevüket is innen kapták ('anthos' = virág és 'kianos' = kék szavakból).

Az antociánok fontos szerepet játszanak a megporzást végző rovarok csalogatásában és a fotooxidatív stressz elleni védelemben (WINKEL-SHIRLEY 2004). A növények termésénél, a dísznövényeknél és a gyümölcsöknél a termék esztétikai minőségének egyik fő meghatározói. Szőlőben kölcsönhatásba léphetnek más fenolos vegyületekkel, fehérjékkel és poliszacharidokkal, így kulcsfontosságú szerepet játszanak a bor színének és a legfontosabb érzékszervi tulajdonságok kialakításában (VIDAL et al. 2004).

Az antociánok egyik alapvető tulajdonsága az antioxidáns aktivitás, amely fontos szerepet játszik az ideg- és kardiovaszkuláris betegségek, a rák és a cukorbetegség megelőzésében (KONCZAK és ZHANG 2004). Számos kutatás foglalkozott már az antociánok rákkezelésben kifejtett hatásával (LULE és XIA 2005, NICHENAMETLA et al. 2006), a humán táplálkozásban betöltött szerepével (STINTZING és CARLE 2004) és biológiai aktivitásával (KONG et al. 2003).

Az antociánok (vagy aglikonok, amelyek az antocianinok alapszerkezetét jelentik) egy aromás gyűrűből [A] állnak, amely oxigént tartalmazó heterociklusos gyűrűhöz [C] kötődik, ehhez egy harmadik aromás gyűrű kapcsolódik [B], amelyet a két szén atom közötti kötés kapcsol össze (KONCZAK és ZHANG, 2004). Az antocianidinek glikozidos formái (cukorcsoportokhoz kötve) az antocianinok (1. ábra).



1. ábra: Az antocianinok általános szerkezete (CASTAÑEDA-OVANDO et al. 2009)

A természetben elterjedt antocianinok szerkezetileg igen sokfélék. A legfontosabb különbségek közöttük a hidroxil csoportok száma, a hozzájuk kapcsolódó cukormolekulák típusa és száma, valamint az alifás vagy aromás karboxil csoportok kötődése a molekula cukor komponenséhez, illetve e kötések helyzete (KONG et al. 2003).

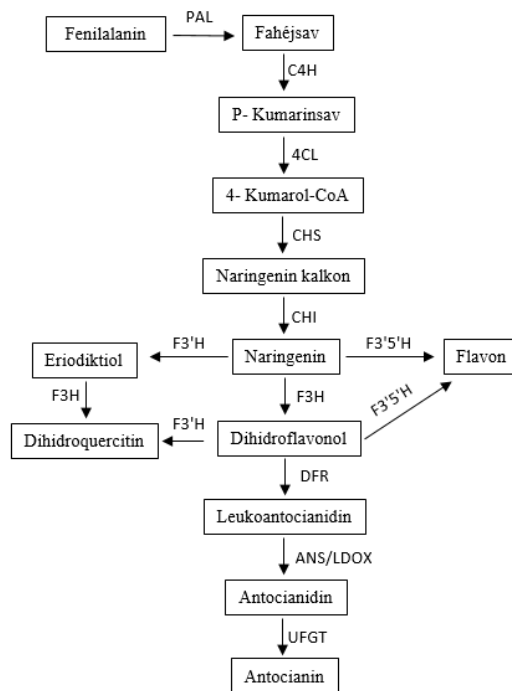
A növények, virágok és gyümölcsök színéért elsősorban az antocianinok és glikozidjaik a felelősek. Az alpmolekulához kapcsolódó szubsztituensek mellett a növényvilágban megtalálható számtalan színváltozat kialakulását az antocianidinek pH-függő reverzibilis szerkezetváltozása is fokozza (ANTUS és MÁTYUS 2014).

A szőlő bogyóban a felhalmozódó főbb flavonoidok a proantocianidinek (PA) és az antociánok. A PA elsősorban a bogyófejlődés kezdetén, vagyis zöld állapotban (KENNEDY et al. 2001, VERRIES et al. 2008), míg az antociánok érett állapotban alakulnak ki a bogyóban (BOSS et al. 1996a).

### 2.3 Az antociánok bioszintézise

A növényekben az antociánok bioszintézise az egyik legjobban jellemzett bioszintetikus útvonal. Az antocián bioszintézisben résztvevő géneket két csoportra oszthatjuk. A struktúrgének olyan enzimeket kódolnak, amelyek közvetlenül részt vesznek az antocianinok és más flavonoidok szintézisében és tárolásában. A másik csoport tagjai szabályozzák a strukturális gének expresszióját, és vezérlik a különböző színanyagok térbeli és időbeli felhalmozódását (QUATTROCCHIO et al. 1993, HOLTON és CORNISH 1995, WINKEL-SHIRLEY 2001).

Az antocián bioszintézis fontos mechanizmus a növényekben, ennek alapján már számos növényben tanulmányozták útvonalát (pl. burgonya, lúdfű, szőlő, kukorica stb.). Modell növényfajként mégis az *Arabidopsis thaliana* és *Vitis vinifera* L. terjedt el, melyeket széles körben alkalmaztak az antocián bioszintézis útvonalának megismerésében és a struktúrgének leírásában. A legfontosabbak közülük: a fenilalanin-ammónia-liáz (*PAL*), a cinnamát 4-hidroxiláz (*C4H*), a 4-kumarát-CoA ligáz (*4CL*), a chalkon-szintáz (*CHS*), a chalkonizomeráz (*CHI*), a flavon-3-hidroxiláz (*F3H*), flavon-3'-hidroxiláz (*F3'H*), flavon-3'5'-hidroxiláz (*F3'5'H*), dihidroflavon-reduktáz (*DFR*), antocianidin-szintáz/leukoantocianidin-dioxigenáz (*ANS/LDOX*) és UDP-flavonoid-3-O-glükoziltranszferáz (*UFGT*) (KAYESH et al. 2013) (2. ábra).



2. ábra: Az antocián bioszintézis egyszerűsített útvonala (WINKEL-SHIRLEY 2001, KAYESH et al. 2013 alapján saját szerkesztés).

Az antocián bioszintézis egyik kulcsenzime a dihidroflavonol-reduktáz (DFR) szintetizálja a dihidroflavonolokat, a leukoantocianidinek szintézisének keresztül (DOONER et al. 1991, SPARVOLI et al. 1994, HOLTON és CORNISH 1995). A DFR enzim segítségével a leukoantocianidinek a bioszintézis következő lépésében (BOSS et al. 1996a, 1996c) alakulnak ki a proantocianidinekből. Mivel a DFR kulcsfontosságú enzim a szőlő antocián bioszintézis útvonalának e részén, expressziójának szabályozási folyamata igen érdekes, és megvizsgálva kimutatták, hogy a gén expresszálódik a szőlő minden szervében: levélben, kacsban, zöld vesszőben, gyökérben, magban, virágban, a bogyó héjában és húsában. Ezek alapján elmondható, hogy a *DFR*, az antocián bioszintézisben résztvevő egyik legerőteljesebben expresszálódó gén, amely a szőlő összes szövetében megjelenik (BOSS et al. 1996c), főként a szőlő bogyóban (BOSS et al. 1996b).

## 2.4 Az antocián bioszintézis szabályozása

Az antocián bioszintézissel vagy az antociánok élettani hatásaival foglalkozó legtöbb tanulmány főként azokra a növényekre összpontosít, amelyeket elsősorban színük miatt fogyasztási szempontból értékesek pl. szőlő, alma, édesburgonya, paradicsom, bogyós

gyümölcsök. Különösen a gyümölcshús vörös színe fontos tényező a fogyasztói társadalom és a piacképesség szempontjából, és vitathatatlanul rendkívül fontos, a fehér és a vörös színű szőlő fajták közötti különbségekben.

A flavonoid bioszintézis fenilalaninból indul, melynek végtermékei az antocianinok, flavonok/izoflavonok és kondenzált tanninok (más néven proantocianidinek, PA-k) (HICHRI et al. 2011). A bioszintézisben részt vesznek olyan gének, amelyek az enzimeket kódolják, és olyanok is, amelyek a szintézisben résztvevő gének expresszióját szabályozzák (BARTON és METH-COHN 1999). Szőlőben ennek a transzkripciós komplexnek a legtöbb komponensét azonosították már (SPARVOLI et al. 1994, BOSS et al. 1996a, 1996b). A magasabbrendű növényfajokban mind a struktúrgének, mind a szabályozó TF-ok erősen konzerváltak (HOLTON és CORNISH 1995, RAMSAY és GLOVER 2005).

Különböző növényfajok esetében kimutatták, hogy a flavonoid bioszintézisben részt vevő bioszintetikus gének szövetspecifikus, térbeli és időbeli expresszióját közvetlenül a *MYB* TF-ok szabályozzák (ZIMMERMANN et al. 2004, MATUS et al. 2010, FELLER et al. 2011, HICHRI et al. 2011).

A *MYB* domént tartalmazó első fehérjét kódoló gént (*v-myb*) a madár influenza vírus (avian **myeloblastosis** virus- AMV) genomjában határozták meg, innen a '*MYB*' elnevezés (FELLER et al. 2011). A növényi *MYB* fehérjék három fő csoportba sorolhatók: az *R2R3-MYB*, az *R1R2R3-MYB* és egy heterogén csoport, melyben a *MYB*-hez hasonló fehérjék tartoznak (STRACKE et al. 2001, YANHUI et al. 2006). A *MYB* transzkripciós faktorok közül a legnagyobb csoportot az *R2R3-MYB*-ek alkotják, amelyek a szárazföldi növények több száz tagjában megtalálhatóak. Szőlőben az *R2R3 MYB* géncsalád 108, *Arabidopsis*-ban 133 tagját írták le (STRACKLE et al. 2001, MATUS et al. 2008). Különböző élettani és biokémiai folyamatokban vesznek részt, beleértve különböző másodlagos anyagcsere- és jelátviteli folyamatokat, a sejtek morfogenezisének szabályozását, a virág- és magfejlődést, a betegségek elleni rezisztencia kialakítását, a hideg és szárazságtűrést, valamint a sejtciklus ellenőrzését (JIN és MARTIN 1999, DU et al. 2009).

A növényekben a *MYB* domének körülbelül 50-53 aminosavból állnak és erősen konzerváltak (FELLER et al. 2011). Az első növényi *MYB*-gént 1987-ben kukoricából (*Zea mays*) izolálták, amely egy *c-myb*-szerű transzkripciós faktort kódol az antocián bioszintézisben (PAZ-ARES et al. 1987).

Szamócában, paradicsomban és almában a *MYB* transzkripciós faktorok funkcionális jellemzése bizonyította, hogy a növényvilágban a flavonoid bioszintézis útvonalának

szabályozása erősen konzervált mechanizmus (AHARONI et al. 2001, MATHEWS et al. 2003, TAKOS et al. 2006, BAN et al. 2007, ESPLEY et al. 2007).

A MYB TF-ok az általuk szabályozott élettani és biokémiai folyamatokat- beleértve a flavonoidok bioszintézisét - a legtöbb esetben nem önállóan, hanem más TF-kal szorosan együttműködve végzik (MOL et al. 1998, WINKEL-SHIRLEY 2001, GROTEWOLD 2005, PETRONI és TONELLI 2011). Ezek közül a leggyakoribbak a bHLH (basic helix-loop-helix) és a WD-repeat (WDR) fehérjék (JONES 2004, DU et al. 2010). Az első bHLH motívumokat - melyeket E12 és E47 néven írtak le - MURRE és munkatársai (1989) fedezték fel rágcsálókban, amelyek növényi megfelelőjét *Arabidopsis*-ban azonosították. A bHLH domének szintén nagymértékben konzerváltak, és körülbelül 60 aminosavat tartalmaznak (FELLER et al. 2011). A WD-repeat egy strukturális motívum, amely körülbelül 44-60 aminosavat tartalmaz, és általában a triptofán (W) aszparaginsav (D) aminosavszekvenciával végződik, innen ered a WD elnevezés (VAN NOCKER és LUDWIG 2003, DU et al. 2009).

A MYB és a bHLH fehérjék közötti együttműködést az antocián bioszintézis szabályozásán keresztül főleg petúniában (*Petunia hybrida*), oroszlánszájban (*Antirrhinum majus*) és kukoricában (*Zea mays*) tanulmányozták (VOM ENDT et al. 2002). A két TF szoros együttműködése azonban nemcsak az antocián bioszintézis szabályozásában nyilvánul meg, hanem többek között befolyásolják a hajszálgökök képződését (PESCH és HÜLSKAMP 2004), a vakuólum savasításának aktiválását (QUATTROCCHIO et al. 2006), a fitokróm 'A' jelátvitel szabályozását (JANG et al. 2007), a glükozinát bioszintézist (SCHWEIZER et al. 2013), és az ABA (abszizinsav) szabályozott gén expressziót (ABE et al. 1997).

A WDR fehérjével kölcsönhatásban résztvesznek a kromatin szerkezet átalakításán keresztül a hiszton fehérje módosításában is és ezáltal befolyásolják a transzkripció folyamatokat (SOMPORNPAILIN et al. 2002, SUGANUMA és WORKMAN 2010). A legtöbb növényfajban a MYB, a bHLH és a WDR fehérjék a MYB-bHLH-WDR (MBW) komplexen keresztül vagy aktiválják és/vagy elnyomják a célgének expresszióját, így szabályozva a flavonoid bioszintézis útvonalát (HICHRI et al. 2011, FALCONE FERREYRA et al. 2012).

A különböző növényfajokban megtalálható MYB, bHLH és WDR fehérjék elnevezését az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: Az antocián bioszintézisben részvevő MYB, bHLH és WDR fehérjék elnevezése egyes növényfajokban

	Növény faj	MYB fehérje	bHLH fehérje	WDR fehérje	Referencia
1.	<i>A. thaliana</i>	PAP1/2, MYB 113/114	GL3/EGL3/TT8	TTG1	BOREVITZ et al. 2000
2.	<i>A. thaliana</i>	MYBL2	TT8/GL3/EGL3 /MYC1	TTG1	DUBOS et al. 2008
3.	<i>Antirrhinum majus</i>	rosea1, rosea2, venosa	Delila/mutabilis	-	FELLER et al. 2011
4.	<i>Brassica oleracea</i>	Purple	bHLH1	WD40	YUAN et al. 2009
5.	<i>Gentiana triflora</i>	MYB3	bHLH1	-	NAKATSUKA et al. 2008
6.	<i>Gerbera hybrida</i>	MYB10	MYC1	-	ELOMAA et al. 2003
7.	<i>Petunia hybrida</i>	AN2/4	AN1	AN11	GERATS and STROMMER 2009
8.	<i>Ipomoea purpurea</i>	MYB1	bHLH2	WDR1	MORI et al. 2006; PARK et al. 2007
9.	<i>Malus domestica</i>	MYB1/10	bHLH3/33	-	ESPLEY et al. 2007
10.	<i>Nicotiana tabacum</i>	AN2	AN1	-	BAI et al. 2011; PATTANAIK et al. 2010
11.	<i>Vitis vinifera</i>	MYBA1/2	MYC1, MYCA1	WDR1/2	MATUS et al. 2010; HICHRI et al. 2010
12.	<i>Zea mays</i>	C1/PL	R/B	PAC1	GROTEWOLD et al. 2000

A szín kialakításában szerepet játszó *MYB* és *bHLH* transzkripciós faktorok közötti funkcionális kapcsolatra példaként hozható a kukorica *ZmC1 MYB* és *ZmB bHLH*, a petúnia *AN2 MYB* és *AN1* és *JAF13 bHLH*, valamint az *Antirrhinum Ros1, Ros2, Ve MYB*, és a *Mut* és *Del bHLH* faktorok közötti kölcsönhatások (GOFF et al. 1992, GOODRICH et al. 1992, MOL et al. 1998, SCHWINN et al. 2006).

## 2.5 Az antociánok bioszintézise szőlőben

Az antociánok felhalmozódása a szőlő bogyóhéjában a színes fajtákérésének egyik fő jellemzője, és ezért alapvető fontosságú a szőlő és a borok jellemzésére. Az antocián bioszintézis során keletkező vegyületek száma és típusa a szüretkor fontos paraméterek a termésminőség szempontjából.

A bogyóhéj színét az antociánok mennyisége és összetétele határozza meg. Ismert, hogy a színes bogyójú fajták antociánokat halmoznak fel a héjukban, míg a fehér fajták nem szintetizálják azokat, ennek köszönhetően a bogyók fehérek lesznek (BOSS et al. 1996a, 1996b). A szőlőfajtákban található antocianin-összetételt több kutató csoport is tanulmányozta (MAZZA és MINIATI 1993, SHIRAISHI és WATANABE 1994, BOSS et al. 1996b). SHIRAISHI és WATANABE (1994) meghatározták 59 piros és fekete szőlőfajta

bogyójának antocianin összetételét. A legtöbb piros fajta főleg antocianidin és/vagy peonidin származékokat, míg a fekete fajták elsősorban delfinidint, petunidint és/vagy malvidin származékokat tartalmaznak.

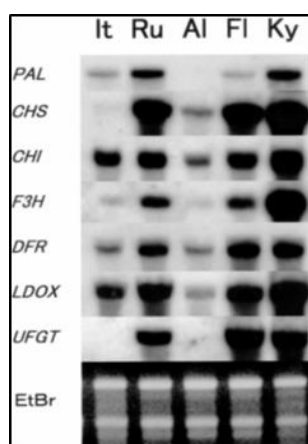
BOSS és munkatársai (1996a, 1996b) bizonyították, hogy az *UFGT* gén expressziója nélkülözhetetlen a szőlő bogyók antocián bioszintézisében. A fekete színű 'Shiraz' fajta bogyójának különböző szövetében az antocián bioszintézisben résztvevő hét gén expresszióját vizsgálva megállapították, hogy az *UFGT* kivételével az összes gén a legtöbb szövetben expresszálódik. Az *UFGT* gén expresszióját azonban csak a bogyó héjában mutatták ki, ahol antocianinok voltak jelen (BOSS et al. 1996a). A fehér és színes fajták héjának vizsgálatakor azt is megállapították, hogy az *UFGT* gént minden színes fajtában és egyetlen fehérben sem fejeződik ki (BOSS et al. 1996a).

A fekete bogyóhéjú fajtákból kialakult fehér vagy bronzszínű, illetve a fehér bogyószerű fajtákból származó színes héjú rügymutánsok vizsgálatánál kimutatták, hogy az *UFGT* gén csak a színes bogyóhéjú fajtákban expresszálódik (BOSS et al. 1996b). Eredményeik alapján az *UFGT*-t a szőlő antocián bioszintézisének legfontosabb enzimének tartják. Annak vizsgálatára, hogy az *UFGT* enzimet kódoló gén megtalálható-e a fehér fajtákban, BOSS és munkatársai (1996b) Southern-blot analízist végeztek. A teljes hosszúságú *UFGT* cDNS-klónt próbaként használva hibridizáló sávokat kaptak a fehér fajták mindegyikében (BOSS et al. 1996b). Ez arra utalt, hogy a fehér fajták legalább az *UFGT* gén egy részét tartalmazzák a genomjukban. Az *UFGT* gén szekvenciaszintű összehasonlítását fehér fajták és színes bogyójú rügymutánsaikon KOBAYASHI és munkatársai (2001) végezték el.

A fekete bogyójú 'Kyoho' fajtában az antocián bioszintézisben résztvevő összes enzim génje expresszált (3. ábra). A fehér bogyójú fajtákban ('Italia' és 'Muscat of Alexandria') a vizsgált gének aktivitása jóval alacsonyabb volt, mint a 'Kyoho' fajtában. Az expressziós mintázat némileg különbözött az 'Italia' és a 'Alexandriai muskotály' fehér fajták között is. A CHS (chalkon-szintáz) kifejeződése nem volt kimutatható az 'Italia', fajtában, míg a PAL-t (fenilalanin-ammónia-liáz) nem detektálták a 'Alexandriai muskotály'-ban. Az *UFGT* gén expresszióját egyik fajtában sem lehetett kimutatni. Ezeket a különbségeket Boss és munkatársai (1996a) is megfigyelték a struktúrgének expressziós mintázatai között a vizsgált öt fehér fajtán belül.

Hasonlóan KOBAYASHI és munkatársai (2001) eredményeihez a 'Muscat Gordo' fajtában (a 'Muscat of Alexandria' szinonímája) a PAL (fenilalanin-ammónia-liáz), az *F3H* (flavon-3-hidroxiáz) és az *UFGT* expresszióját nem tudták kimutatni a bogyóhéjban.





3. ábra: KOBAYASHI és munkatársai (2001) által végzett northern blot analízis. A vizsgálat során különböző szőlő fajták érett bogyójából izolált RNS-t, az antocián bioszintézisben résztvevő enzimek génjével hibridizáltatták (*PAL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *LDOX* és *UFGT*). A vizsgálat során felhasznált fajták: It- ‘Italia’ (fehér), Ru- ‘Ruby Okuyama’ (színes), Al- ‘Muscat of Alexandria’ (fehér), Fl- ‘Flame Muscat’ (színes), Ky- ‘Kyoho’ (színes) (KOBAYASHI et al. 2001).

Arra is rámutattak továbbá, hogy a vizsgált fehér fajták nem tartalmaztak mérhető mennyiségű antocianint a héjukban, de ezzel ellentétben tartalmaztak proantocianidint (BOSS et al. 1996a). Mivel a proantocianidinek szintézise leukoantocianidinből indul, melynek szintéziséhez szükség van a dihidroflavon-reduktáz enzim kifejeződéséhez, úgy vélték, hogy a DFR jelen van a fehér színű szőlőbogyó héjában (BOSS et al. 1996a).

A szőlő bogyó érése során az *UFGT* gén expresszióját csak az érési szakasz kezdete után lehetett kimutatni. Ezzel ellentétben a többi struktúrgén az érés korai stádiumában is expresszál, majd ez a szint csökkent vagy eltűnik a zsendülés szakaszban (a zsendülés időszakában a bogyó színének változása figyelhető meg, és a puhulás is elkezdődik), majd ismét nő a gének expressziója, amikor a bogyók színeződése elindult (BOSS et al. 1996c, KOBAYASHI et al. 2001).

KOBAYASHI és munkatársai (2001) kezdeti feltételezéseik szerint két oka lehet a rügymutánsok eltérő bogyó színeződésére. Az egyik lehetőség, hogy az *UFGT* promoterében vagy kódoló régiójában mutáció alakult ki. A másik, hogy a mutáció olyan szabályozó elem génjében fordulhat elő, amely szabályozza az antocián bioszintézisben résztvevő gének kifejeződését.

Az *UFGT* gének szekvenenciaanalízise (a promóterrégió bevonásával) nem mutatott különbséget a fehér- és színes bogyójú fajták szekvenciái között (KOBAYASHI et al. 2001).

Ezekből az eredményekből arra következtettek, hogy az *UFGT* gén működését szabályozó valamely transzkripció faktor mutációja okozza az antocián bioszintézis blokkolását az *UFGT* gén gátlásán keresztül. Ezeket a transzkripció faktorokat, a *VvMyb* (*Vitis vinifera* **Myb**) -géneket elsőként KOBAYASHI és munkatársai (2004) izolálták és bizonyították szerepüket az *UFGT* gén működésének szabályozásában.

### 2.5.1 A *VvMyb* transzkripció faktor géncsalád szőlőben

A szőlő fajták közötti egyik legfontosabb megkülönböztető morfológiai bélyeg a bogyóhéj színe, amit az antociánok akkumulációjának eltérő mértéke, minősége vagy hiánya határoz meg. Láthattuk, hogy a színes bogyójú fajták antociánokat halmoznak fel a héjukban, míg a fehér színű fajtákban a bioszintézis blokkolt (BOSS et al. 1996a).

A bogyóhéj színe olyan fontos tulajdonság, amelyet a csemege- és borszőlő nemesítési programokban való kiválasztás alapjaként használnak. Napjainkban a szőlő bogyóhéj színe rendkívül változatosá vált az évezredek alatt végbemenő mutációk és természetes hibridizáció, majd később a tudatos emberi beavatkozás miatt (THIS et al. 2007). Ennek köszönhetően a feketétől a kéken át egészen a fehérig (sárga-zöld) sok változat (piros, rózsaszín, szürke) alakult ki. Korábbi genetikai vizsgálatokból ismert, hogy a mai szőlőfajták őse a fekete bogyójú *V. sylvestris* GMEL. volt, amelyből sorozatos mutációk eredményeként alakultak ki a ma ismert színváltozatok (SLINKARD és SINGLETON 1984, CARRASCO et al. 2015). A vad fajból történő domesztikációs események során a bogyószín tekintetében azonban nem diverzitás csökkenés, hanem éppen ellenkezőleg jelentős variabilitás alakult ki a termesztett fajtákban (FOURNIER-LEVEL et al. 2009b).

A nagyfokú variabilitásért a 2. kromoszómán elhelyezkedő egyetlen géncsoport a felelős (DOLIGEZ et al. 2002). A végső szín a *VvMybA* gén alléljainak kombinált additív hatásának eredményeként alakul ki (FOURNIER-LEVEL et al. 2009b). Ez a lokusz három *Myb*-típusú transzkripció faktor gén klaszteréből áll, amelyek közül a *VvMybA1* és a *VvMybA2* funkcionálisan részt vesznek a bogyó pigmentációban (KOBAYASHI et al. 2002, 2004, WALKER et al. 2007, AZUMA et al. 2008). A harmadik gén, a *VvMybA3* mint pszeudogén közvetlenül nem vesz részt a szín kialakításában (FOURNIER-LEVEL et al. 2009b), de a *VvMybA1*-el történő homológ rekombinációja új allélváltozatokat és így új színű és antocián összetételű szomatikus mutánsok kialakulását eredményezheti (AZUMA et

al. 2009). A fehér bogyó az első két transzkripció faktor egyidejű funkcióvesztésének mutációja miatt alakult ki (KOBAYASHI et al. 2005, WALKER et al. 2007). A *VvMybA1* inaktivációja a promoterébe inszertálódott *Gret-1* (Grapevine retrotransposon 1) retrotranszpozonra vezethető vissza (KOBAYASHI et al. 2004, LIJAVETZKY et al. 2006, THIS et al. 2007). A *Gret-1* egy 10422 bázispár (bp) hosszúságú retrotranszpozon, amely egy 824 bp 5' LTR, 8774 bp belső régió és 824 bp 3' LTR szekvenciából áll (KOBAYASHI et al. 2004). A két LTR szekvencia csak négy nukleotidban különbözik, ami egy viszonylag új beépülési eseményre utal. Belső régiója hasonlóságot mutat a Ty3-gypsy retrotranszpozonok RetroSor1 (AF098806), RIRE2 (AB030283) és Cinfu1-1 (AF049110) gag-pol régiójával. A génekben vagy azok közelében lévő retrotranszpozon-inszerciók által okozott mutációk megváltoztathatják a gén expresszióját vagy a kódolt fehérjék szerkezetét (KUMAR és BENNETZEN 1999). A fehér bogyójú fajták többsége homozigóta a *Gret-1*-re (KOBAYASHI et al. 2004, 2005), azonban néhány fajtában nem a *Gret-1* inszerciója, hanem a *VvMybA1* különböző méretű deléciója és pontmutációja okozza a pigmentképződés gátlását (LIJAVETZKY et al. 2006, WALKER et al. 2006, YAKUSHIJI et al. 2006).

A *VvMybA2* esetében a kódoló szekvenciában két olyan pontmutációt azonosítottak, amely megváltoztatta a transzlálódó fehérje térszerkezetét, így az nem képes az *UFGT* gén promóteréhez kapcsolódni (WALKER et al. 2007, CARRASCO et al. 2015). Ha a három mutáció homozigóta formába kerül, a transzkripció faktorok nem tudják aktiválni az antocián bioszintézis kulcsenzimét, a bogyók fehérek lesznek.

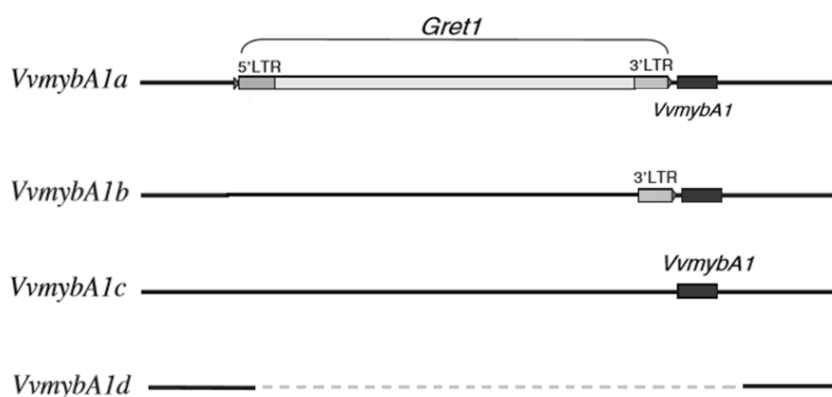
### **2.5.1.1 A *VvMybA1* transzkripció faktor polimorfizmusa, mint a bogyószín variáció kulcsa**

A szőlőfajták színében megfigyelhető jelentős eltérések legmeghatározóbb faktora a *VvMybA1* polimorfizmusa. Ezek az allélváltozatok különböző mutációs események eredményeképpen alakultak ki (KOBAYASHI et al. 2004, YAKUSHIJI et al. 2006, AZUMA et al. 2009). A *Gret-1*-et hordozó allél a *VvMybA1a*, amelyet a fehér bogyójú fajták többsége homozigóta formában tartalmaz (KOBAYASHI et al. 2004, 2005). A színes bogyójú fajták legalább egy funkcionális *VvMybA1* allélt tartalmaznak, általában a *VvMybA1b* vagy *VvMybA1c* allélt (KOBAYASHI et al. 2004, THIS et al. 2007, AZUMA et al. 2009).

A *VvMybA1b* esetében egy olyan allél változatról van szó, amelyből a *Gret-1* retrotranszpozon a 3' LTR régióját visszahagyva kivágódott, helyreállítva ezzel a gén működését (4. ábra). A *VvMybA1b* domináns a fehér funkcióképtelen alléllal (*VvMybA1a*)

szemben, így heterozigóta formában is történik transzkripció a *VvMybA1* génről, melynek következtében színes bogyó jelenik meg (KOBAYASHI et al. 2004).

YAKUSHIJI és munkatársai (2006) a ‘Pinot noir’ és ‘Pinot blanc’ fajtákat, míg WALKER és munkatársai (2006) a ‘Cabernet saugvignon’ színes bogyójú fajtát és annak fehér színváltozatát vizsgálva olyan allélt azonosítottak, mely nem tartalmazza sem a *Gret-1* inszerciót, sem a 3’ LTR szekvenciát. Ez az allél a *VvMybA1c*, amely az eredeti, *Gret-1* inszerciót nem hordozó vad típusú allél (4. ábra). A ‘Pinot blanc’ fajtában a *VvMybA1a* allél mellett a funkcióképes *VvMybA1c* allél teljes delécióját is megfigyelték, amelyet *VvMybA1d* allélnak (null allél) neveztek el (YAKUSHIJI et al. 2006).



4. ábra: A *VvMybA1* gén polimorfizmusa (KOBAYASHI et al. 2004, YAKUSHIJI et al. 2006).

Néhány fehér bogyójú fajtában a *VvMybA1* szekvencia analízise kimutatta, hogy az antociánok bioszintézisének gátlása nemcsak a *Gret-1* retrotranszpozon inszerciójának következtében alakulhat ki. A ‘Roditis’ fajtában egy 135 bp hosszúságú deléciót mutattak ki a kódoló régió végéről, így az arról átíródó csonka fehérje funkcióképtelenné vált és nem tudta aktiválni az *UFGT* átírását. Ezt az allélt *VvMybA1<sup>ROD</sup>*-nak nevezték el (LIJAVETZKY et al. 2006). Ugyanebben a tanulmányban a ‘Sultanina blanc’ fajtában 3 inszerciót találtak, a *Myb* promoterében 111 és 44 bp, a második intronban pedig 33 bp nagyságút (*VvMybA1<sup>SUB</sup>* allél), amelyek szintén funkcióvesztést okoztak.

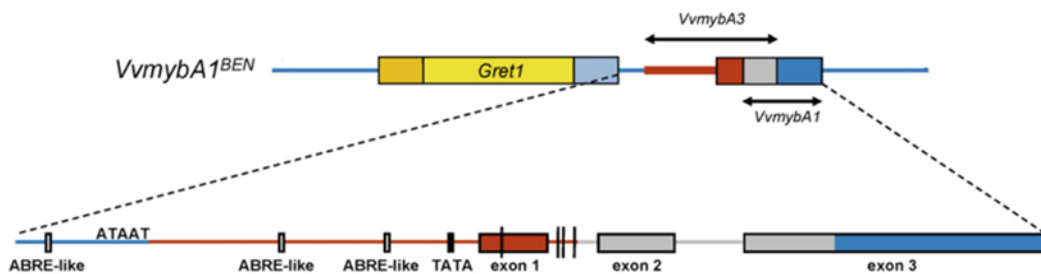
A funkcióképes *VvMybA1* gének szekvenciaszintű összehasonlításával további polimorfizmusokat mutattak ki a színes bogyójú fajták között (LIJAVETZKY et al. 2006, THIS et al. 2007, AZUMA et al. 2008, SHIMAZAKI et al. 2011, CARRASCO et al. 2015).

A ‘Sugraone’ (B) fajta és két szomatikus mutánsának vizsgálatával igazolták, hogy önmagában nemcsak a 3’LTR szekvencia teszi újra funkcióképpé a gént a *Gret-1* kivágódását követően, hanem a retrotranszpozon 5’ és 3’ LTR szekvenciái közötti

homológ rekombináció is. A spontán mutációval kialakult ‘Ralli Seedless’ (Rs) és a ‘Super Red’ (Rg) LTR szekvenciáit megvizsgálva megállapították, hogy mindkét fajta solo-LTR szekvenciája a ‘Sugraone’ 5’ és 3’ LTR szekvencia darabjait tartalmazza, helyreállítva ezzel a gén funkcióját a két szomatikus mutánsban (LIJAVETZKY et al. 2006).

Különböző színes bogyójú genotípusok összehasonlításával THIS és munkatársai (2007) több olyan polimorf helyet azonosítottak, amelyek felelősek a fekete/szürke és a piros/rózsaszín bogyójú fajták eltérő pigmentáltságáért. A *VvMybA1* promóter régiójában egy 829, egy 44, egy 1 bp méretű indel és egy SNP, a gén első exonjában két SNP, harmadik exonjában egy SNP felelős az eltérő színeződésért.

AZUMA és munkatársai (2009) funkcióképes *VvMybA1* allél polimorfizmusról számoltak be. Vizsgálatukban az ‘Italia’ két eltérő színeződésű és antocián összetételű rügymutánsát vizsgálták. Az ‘Italia’ fehér bogyójú fajta, amely homozigóta formában hordozza a *VvMybA1a* allélt, vagyis a *Gret-1* inszerciót. Két rügymutánsa közül a ‘Ruby Okuyama’ (Rg) a *VvMybA1a* és *VvMybA1b* (3’LTR) allélokot, míg a ‘Benitaka’ a *VvMybA1a* allélt hordozza, de emellett kimutattak egy extra fragmentumot is, amely különbözik a *VvMybA1a* és a *VvMybA1b* alléltól. Ezt az új allélt *VvMybA1<sup>BEN</sup>* allélnak nevezték el (5. ábra).



5. ábra: *VvMybA1<sup>BEN</sup>* allél, valamint a promóter régiójában megtalálható cisz szabályzó elemek elhelyezkedése (AZUMA et al. 2009).

A ‘Benitaka’ genom könyvtárából a *VvMybA3* gént tartalmazó klónokat is izolálták. Nagyon érdekes, hogy a *VvMybA3* promóter régiójának egy része azonos a *VvMybA1* kódoló régiójával a *VvMybA1<sup>BEN</sup>* allélban. Ezekből az eredményekből arra következtettek, hogy a *VvMybA1<sup>BEN</sup>* allél a *VvMybA1a* és a *VvMybA3* homológ rekombinációjának eredményeként alakult ki. RT-PCR-rel megerősítették, hogy a *VvMybA1<sup>BEN</sup>* allél visszaállította a *VvMybA1* transzkripcióját, tehát ez az allél felelős a ‘Benitaka’ színes bogyójának kialakulásáért.

A *VvMybAI<sup>BEN</sup>* allél promóter régiójában 3 ABRE (abscisic acid responsive elements) szekvencia van jelen, amelyek közül egy a *VvMybA1a* allélból, míg a másik kettő a *VvMybA3* génből származik (AZUMA et al. 2009).

Kutatások bizonyították, hogy az ABRE-szerű szekvenciák jelenléte a promóter régiókban szükséges a génexpresszió aktiválásához az ABA indukálta génekben (BUSK és PAGES 1988, FUJITA et al. 2005). AZUMA és munkatársai (2009) a funkcionális *VvMybA1c* allél promóter régiójában két ABRE-szerű szekvenciát találtak. A *VvMybA1a* allél vizsgálata során azonban kimutatták, hogy a *Gret-1* két ABRE motívum közé ékelődött be, alátámasztva UNO és munkatársai (2000) megállapítását, miszerint legalább két ABRE motívum szükséges a génexpresszió aktiválásához.

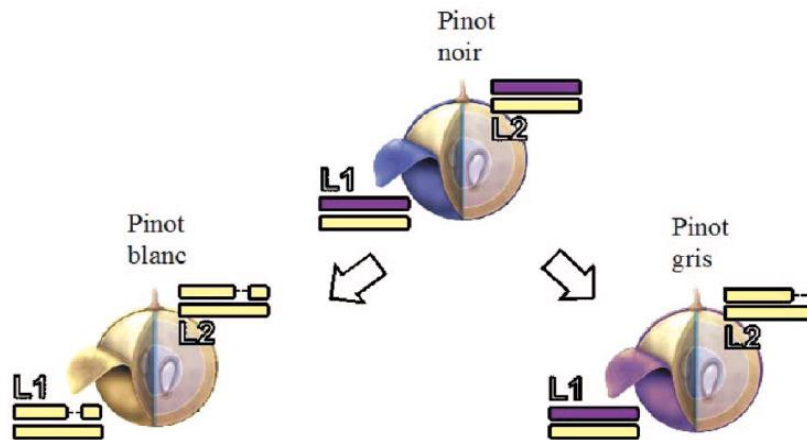
Az így létrejött ‘Benitaka’ szomatikus mutánsból a promóter régió egyetlen báziscseréjének eredményeként alakult ki a fekete bogyószerű ‘Brazil’ fajta (XU et al. 2017).

A rózsaszín bogyójú *V. vinifera* L. convar. *orientalis* csoportba tartozó kínai és japán fajtákban a *MybAI* promóter régiójában egy 44 és egy 111 bp, a második intronban pedig egy 33 bp hosszúságú inszerciót mutattak ki. Ez utóbbi befolyásolja a gén transzkripció aktivitását, mivel az inszerció miatt a splicing során a második intron nem tud kivágnodni, amely csökkenti az antocián felhalmozódásának mértékét (SHIMAZAKI et al. 2011).

Ibériai és kaukázusi *V. sylvestris* GMEL. populációkban CARRASCO és munkatársai (2015) a *VvMybAI* hosszpolimorfizmusát vizsgálva további két allélt azonosított. A *VvMybA1e* allél promóter régiójában egy 111 bp hosszúságú, a második intronban pedig tovább 33 bp méretű inszerciót azonosított. A *VvMybA1f* allél 55 bp nagyságú deléció tartalmazott a promóter régióban.

A szürke és bronz színű fajtákról már SSR markerekkel is kimutatták, hogy ún. periklinális kimérák, azaz a bogyó héjuk genetikailag eltérő sejtrétegekből áll (HOCQUIGNY et al. 2004). A szürke szín kialakulásának molekuláris magyarázatát a „Pinot-modell” alapján adták meg (WALKER et al. 2006, VEZZULLI et al. 2012). A ‘Pinot’ fajtacsoportba tartozó ‘Pinot noir’-, ‘Pinot blanc’- és ‘Pinot gris’ fajták bogyóhéjának kétféle sejttípusát (L1, L2) vizsgálva megállapították, hogy a két sejtrétegben eltérő *VvMybAI* allélok alakítják ki a szürke bogyószínt (6. ábra). A ‘Pinot noir’ esetében mindkét réteg tartalmaz egy működőképes allélt, míg szomatikus változatai közül a ‘Pinot blanc’ egyik rétegében sem mutattak ki működőképes allélt, szemben a ‘Pinot gris’ fajta, melynek L1 rétegében egy funkcióképes, L2 rétegében egy funkcióképtelen allél jelenlétét mutatták ki (VEZZULLI et al. 2012).

A genetikai modellnek megfelelően az L1 rétegben van antocián felhalmozódás, míg az L2 rétegben nincs, amely így együttesen alakítja ki a jellegzetes szürke/bronz színt (6. ábra) (WALKER et al. 2006).



6. ábra: A „Pinot modell”: a ‘Pinot noir’-, ‘Pinot blanc’- és ‘Pinot gris’ fajták L1 és L2 szöveteinek mintázata. Lila sáv: működőképes *VvMybA* allél. Sárga sáv: funkcióképtelen *VvMybA* allél (VEZZULLI et al. 2012).

### 2.5.1.2 A *VvMybA2* transzkripciós faktor polimorfizmusa

A *VvMybA2* transzkripciós faktor génjének kódoló szekvenciában történt mutációs események vezettek - a *VvMybA1* génhez hasonlóan - a szőlőbogyó fehér/zöld színének kialakulásához. Ebben az esetben azonban a nukleotid polimorfizmus (SNP) eredményeként a képződő fehérje  $\alpha$ -helix szerkezetében jelenik meg olyan változás, amely így szintén a gén funkcióvesztését okozza (WALKER et al. 2007).

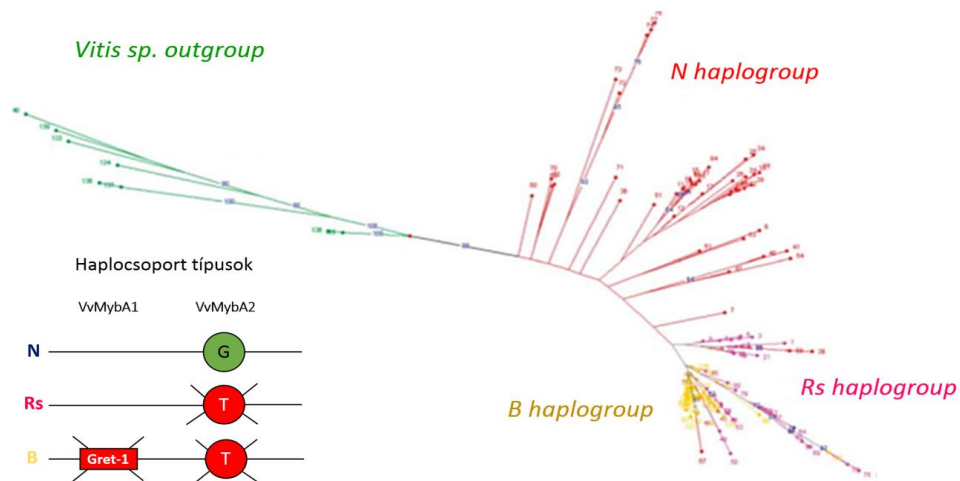
A különböző forrásból származó *VvMybA2* gén szekvenciáit összehasonlítva WALKER és munkatársai (2007) szignifikáns különbséget találtak a fehér és piros bogyóból származó *VvMybA2* transzkripciós faktor génjei között. Nagyon fontos különbség egy nem konzervatív aminosavváltozás megjelenése, ahol is a fehér bogyójú genotípusból származó gén aminosavsorrendjének 44. pozíciójában arginin helyett leucin jelenik meg ( $R^{44}L$ ). Az adott pozícióban az arginin aminosav jelenléte funkcionálisan fontos a DNS vagy más fehérjék kötésében, illetve a másodlagos szerkezet fenntartásában (STRACKE et al. 2001).

CARRASCO és munkatársai (2015) a *VvMybA2* transzkripciós faktor génjében bekövetkezett két pontmutációt vizsgálták szőlőfajok SNP polimorfizmusának jellemzéséhez. Az egyik a *VvMybA2R44* vagy K980, amelyet WALKER és munkatársai (2007) írtak le, a másik egy új SNP, amelyet 10 alacsony antocián tartalommal rendelkező szőlőfajta szekvenálásával határoztak meg *VvMybA2C22* néven. A *VvMybA2C22* az aminosav-szekvenciában okoz egy nem konzervatív változást a 22-es pozícióban, ahol cisztein- glicin aminosav csere figyelhető meg a pontmutáció következtében. A képződő fehérje  $\alpha$ -helix fehérje-kódoló régiójában okoz változást. FELLER és munkatársai (2011) szerint a cisztein aminosav az  $\alpha$ -helix szerkezetben fontos szerepet tölt be a DNS-hez való kötődésben vagy más fehérjékkel való összekapcsolódásban.

## 2.6 *VvMybA* haplotípusok szőlőben

A bogyószínt meghatározó két *MybA* gén fizikai közelsége miatt együtt öröklődik, így egy haplotípusként kezelhetők, de egymástól függetlenül, külön-külön is befolyásolhatják a bogyószínt kialakító faktorokat (KOBAYASHI et al. 2005, WALKER et al. 2007). FOURNIER-LEVEL és munkatársai (2009a) a *VvMybA1* gén polimorfizmusa (*Gret-1* jelenléte/hiánya) -, illetve a *VvMybA2* gén (K980 pozíció) kódoló régiójában a vad G (guanin) vagy mutáns T (timin) nukleotid jelenléte alapján 4 haplocsoportba rendezték a szőlőfajtaikat. A HapN feltételezhetően az ősi haplotípus, amely funkcióképes *VvmybA1c* és *VvMybA2r* vad típusú allélokot hordoz, vagyis színes (fekete/kék) fenotípus kialakítását teszi lehetővé. A HapRs haplotípus egy funkcióképes *VvMybA1c* és egy funkcióképtelen *VvMybA2w* allélt (T) hordoz, vagyis színes bogyók kialakulását eredményezi, azonban ez az első haplocsoporttól eltérően nem sötét, hanem rózsaszín fenotípust eredményez. A harmadik haplocsoport, a HapB homozigóta formában tartalmazza a funkcióképtelen *VvMybA1a* és *VvMybA2* allélokot, vagyis az antocián bioszintézis teljes hiánya következtében fehér bogyók alakulnak ki (FOURNIER-LEVEL et al. 2009a) (7. ábra).





7. ábra: A haplocsoportok lehetséges megjelenése a *VvMybA1* és *VvMybA2* polimorfizmus alapján. N- noir, vagyis fekete/kék szín; Rs- rose, átmeneti/rózsaszín; B-blanc, fehér bogyószín jelenléte figyelhető meg (FOURNIER-LEVEL et al. (2009a) alapján szerkesztve).

A leggyakrabban előforduló három haplotípus mellett (N, Rs, B) a később felfedezett új *VvMybA1* és *VvMybA2* allélváltozatok eredményeként 6 további haplotípust különítettek el: HapF (SHIMAZAKI et al. 2011), HapC, D, G, H, E (CARRASCO et al. 2015). A fajták haplotípusa befolyásolja az antocián tartalmat és összetételét (AZUMA et al. 2015, FANG et al. 2018). A két funkcionális haplotípus nagyobb antocián akkumulációt eredményez a fajtákban, mint egy funkcionális haplotípus (AZUMA et al. 2011, BAN et al. 2014, SONG et al. 2014).

## 2.7 A *VvMybA* markerek felhasználása a növénynemesítésben és a génmegőrzésben

A több ezer éves kultúrába vétele óta a szőlő (*V. vinifera* L.) az egyik legfontosabb kertészeti növényünké vált (EMANUELLI et al. 2013a). A 19. századtól elindult tudatos keresztezések és klónszelekciós munkák eredményeként rendkívüli fajtagazdagság jött létre, és mára az egyik genetikailag legjobban jellemzett növényé vált (ARADHYA et al. 2003).

A szőlőnemesítési programok a biotikus és abiotikus stresszrezisztencia növelés mellett egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a minőségi tulajdonságok javítására és kombinálására is (REISCH et al. 2012). A bogyó minőségét meghatározó tulajdonságok (érés idő, bogyó méret, szín és íz) a keresztezést követően 4-5 év múlva értékelhetőek.

Az adott tulajdonsággal kapcsolt genetikai markerek felhasználásával ezek a vizsgálatok már egyéves korban is elvégezhetőek, ami a nemkívánatos genotípusok negatív szelekciójával lehetővé teszi a fenntartott utópopuláció méretének csökkentését, jelentősen mérsékelve a költségeket.

Szőlőben jelenleg a rezisztencia gének mellett olyan komplex tulajdonságokra is rendelkezésre állnak kapcsolt markerek, mint a bogyó mérete, színe, muskotályos íze, magvatlansága (KARAAGAC et al. 2012, EMANUELLI et al. 2013b).

A szőlő intenzív domesztikációjának következtében a bogyószín evolúciója az utóbbi évezredekben igen intenzívvé vált és napjainkban is folytatódik. Szinte minden régi és jelenleg is termesztett fajtának voltak/vannak különböző színváltozatai, azonban ezek közül nem mindegyiknek van gazdasági jelentősége, megőrzésük viszont rendkívül fontos egyrészt a biodiverzitás, másrészt a nemesítés szempontjából. Ezek a színvariánsok morfológiailag azonosak, elsősorban a héj színében azonban különbözhetnek. Génforrásként való megőrzésükhöz olyan genetikai markerekre van szükség, amely fenofázistól függetlenül lehetővé teszi egyedi azonosításukat, a genotípusok pontos jellezését, a homonímák és szinonímák kiszűrését.. Gyakran előfordult, hogy egy fajta új területen történő meghonosítása során új nevet kapott (szinonímák), vagy más fajtát ugyanolyan névvel kezdtek termesztetni (homonímák). A termesztett fajtákban találhatunk olyan morfológiailag hasonló, a bogyó színében eltérő fajtákat, amelyeknek hasonló az elnevezésük. Németh Márton ezeket a fajtákat fajtacsoportokba, ún. *conculták*ba sorolta. Egy fajtacsoporton belül kék, szürke, fekete, piros, rózsaszín és fehér bogyójú fajták találhatóak, amelyek rügymutációval alakultak ki.

A GrapeGen06 EU projekt keretein belül HALÁSZ és munkatársai (2005) 97 kárpát-medencei fajta 6 mikroszatellit lókuszban történő jellemzését végezték el. A fajták között több olyan csoportot (színvariánsok) is találtak, melyek SSR ujjlenyomata megegyezett: 'Bakator' (piros, tündőszínű), 'Lisztes' (piros, fehér), 'Gohér' (piros, fehér, változó). GALBÁCS és munkatársai (2009) 88 kárpát-medencei fajta további 6, vagyis összesen 12 SSR lókuszban vizsgálatát végezték el kiegészítve a 'Muskotály' (piros, sárga) fajtákkal, amelyek mikroszatellit mintázata ugyancsak megegyezik. Ezeknek a rügymutánsoknak a bogyószíne különbözik így a köztük lévő genetikai különbségek az antocián bioszintézisben résztvevő génekben és szabályozó régiókban keresendő.

Gyakori jelenség, hogy a spontán mutációval a *Gret-1* retrotranszpozon kivágódásával a fehér bogyójú fajtákból színes bogyóval rendelkező rügymutánsok alakulnak ki. Ilyen például a 'Chardonnay' és a 'Szultana' rügymutánsai, vagyis a 'Piros Chardonnay' ('Red

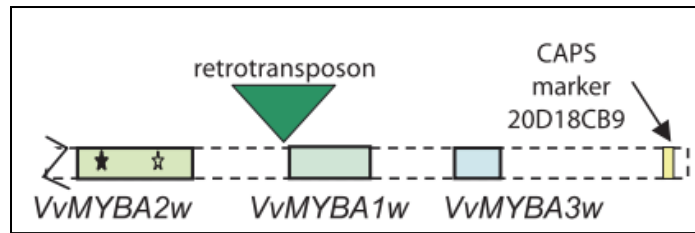
Chardonnay’) és a ‘Rózsaszín Szultana’ (‘Pink Sultana’) (BOSS et al. 1996b). Kiváló magyar borszőlőfajtánk, a ‘Kéknyelű’ esetében is megfigyeltek rügymutációt, melynek eredményeként a fehér bogyójú tőkén kék színű fürtöt jelentek meg (JAHNKE GIZELLA szóbeli közlése alapján) (8. ábra). A rügymutációval létrejött ‘Piros kéknyelű’ és az eredeti ‘Kéknyelű’ fajták genetikai vizsgálata is kimutatta a *VvMybA1* génben történt változásokat.



8. ábra: ‘Kéknyelű’ és rügymutánsa a ‘Kéknyelű piros’ (Fotó: JAHNKE GIZELLA, Badacsony).

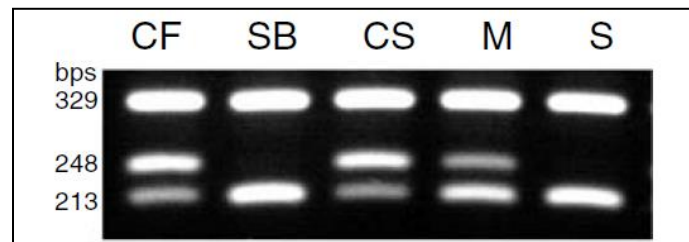
BODOR & SZŐKE és munkatársaik (2014) 27 szőlőfajtát (*Vitis vinifera* L.) 12 feltételezett *conculta* csoportba sorolt tagjait genotipizáltak 14 polimorf mikroszatellit (SSR) - és *VvMybA1* alapú markerekkel. Az SSR eredmények azt bizonyították, hogy a 12 feltételezett fajtacsoport közül ténylegesen csak 9 alkot *conculta*t, a másik három feltételezett bogyó színváltozat csoport homonima. A ‘Sárfehér’-‘Sárpiros’, ‘Delaware piros’-‘Delaware fehér’ és ‘Járdovány fekete’-‘Járdovány fehér’ esetében igazolták, hogy nem rügymutációról van szó, hanem különböző szőlőfajtákról, vagyis az említett fajták homonímák. Néhány *conculta* tagot (‘Chasselas’, ‘Furmint’ és ‘Lisztes’) a *Gret-1* retrotranszpozon jelenléte vagy hiánya alapján sikerült megkülönböztetniük, míg a ‘Bajor’, ‘Bakator’, ‘Gohér’ és a ‘Traminer’ *conculta* tagjait nem sikerült elkülöníteni sem SSR, sem a *VvMybA1* alapú markerekkel (BODOR & SZŐKE et al. 2014).

A szőlőfajták színének molekuláris jellemzésére WALKER és munkatársai (2006) BAC könyvtár alapján a *VvMybA* génekkel kapcsolt 20D18CB9 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) markert terveztek ‘Cabernet Sauvignon’ fajtán (9. ábra).



9. ábra: A 20D18CB9 BAC 140 kb méretű inszertjének részlete (WALKER et al. 2007).

A ‘Cabernet franc’, ‘Sauvignon blanc’, ‘Cabernet sauvignon’, ‘Malian’, és ‘Shalistin’ fajtákon alkalmazott 20D18CB9 CAPS marker lehetőséget adott a fajták szín alapján történő elkülönítésére, vagyis hosszpolimorfizmus detektálására. A színes fajtákban (‘Cabernet franc’, ‘Cabernet sauvignon’ és ‘Malian’) a PCR termék *DdeI* restrikciós emésztését követően egy 329, 248 és egy 213 bp méretű fragmentumot kaptak. A fehér fajták (‘Sauvignon blanc’, ‘Shalistin’) esetében a 329- és a 213 bp méretű fragmentum a színes fajtáékhoz hasonlóan megjelenik, míg a 248 bp hosszúságú fragmentum hiányzik, vagyis csak 2 fragmentum detektálható agaróz gélen (WALKER et al. 2006) (10. ábra).



10. ábra: A *VvMybA* génnel kapcsolt 20D18CB9 marker használata különböző színű szőlőfajták elkülönítésére. CF- ‘Cabernet franc’, SB- ‘Sauvignon blanc’, CS- ‘Cabernet sauvignon’, M- ‘Malian’, S- ‘Shalistin’ (WALKER et al. 2006).

A CAPS markert további fajtákon alkalmazva nemcsak a színes és fehér fajták genotipizálására volt alkalmas, hanem lehetővé tette a homo- és heterozigóta színes fajták elkülönítését (WALKER et al. 2007), illetve a revertánsok (fehérből kialakult színes fajták) megkülönböztetését is (BODOR & SZŐKE et al. 2014).

Ezt a markerrendszert felhasználva a ‘Nektár’ x ‘Jacquet’ magoncpopuláció tagjain még termőre fordulásuk előtt lehetővé vált az egyedek bogyószínének előrejelzése (TÓTH-LENCSES et al. 2015).

A különböző szőlőfajokban ez a marker polimorfizmust mutatott (SZŐKE ANTAL szóbeli közlése alapján), így ennek szekvenciaszintű összehasonlításával végeztük el filogenetikai vizsgálatainkat is.

## 2.8 A *Vitaceae* család evolúciós története

A szőlőfélék őse, a *Cissites* nemzetség fajai 100 millió évvel ezelőtt voltak jelen a Földön, amely a földtörténeti felső-krétakorra tehető. Ebből a nemzetségből származtatják a ma is élő szőlőnemzetségeket, többek között a *Cissus*, *Ampelocissus*, *Ampelopsis*, *Clametocissus*, *Rhoicissus*, *Tetrastigma*, *Landukia*, *Parthenocissus*, *Pterisanthes* és a *Vitis* nemzetségeket. A családba tartozó nemzetségek pontos száma sem egyértelmű, BÉNYEI és LŐRINCZ (2005) 10, SOEJIMA és WEN (2006) 14, míg BESSIS (2007) 17 nemzetséget sorolnak ide. Ezen nemzetségek közül azonban a *Vitis*-nek van a legnagyobb gazdasági jelentősége.

A *Vitaceae* családba tartozó szőlőfélék többnyire fás szárú kúszónövények, amelyekre jellemző az egyedi hajtás, levél és virágzat (GERRATH et al. 1998). A változatos morfológiai bélyegek segítségével a különböző nemzetségekben mintegy 1400 fajt írtak le. Ezek a fajok egyaránt előfordulnak a Föld mérsékelt és trópusi égövén is (SOEJIMA és WEN 2006, WEN et al. 2007). A fő elterjedési területek Kelet-Ázsia (Kína, Japán és Jáva) 25-30, és Észak-Amerika régióira tehető körülbelül 30-40 taxonnal (MOORE 1991, CHEN et al. 2007). Európában az egyetlen faj, amely a mediterrán vidékeken elterjedt *Vitis vinifera* L. (*V. vinifera* L. subs. *sylvestris*, *V. vinifera* L. subsp. *vinifera*) (ZOHARY és SPIEGEL-ROY 1975).

A *Vitaceae* családba tartozó nemzetségek közötti kapcsolatok tisztázásával több kutatás is foglalkozott (GERRATH et al. 1998, INGROUILLE et al. 2002, ROSSETTO et al. 2002, SOEJIMA és WEN 2006, TRÖNDLE et al. 2010).

INGROUILLE és munkatársai (2002) az *rbcL* gén szekvenálásáról számoltak be, és vizsgálták 20 *Vitaceae* családba tartozó fajban, beleértve *Leeaceae* családot is. ROSSETTO és munkatársai (2002) az Ausztráliából származó *Vitaceae* (*Ampelocissus*, *Cayratia*, *Cissus*, *Clematicissus* és *Tetrastigma*) közötti kapcsolatokat vizsgálták, kloroplaszt *trnL* intron (UAA) és riboszómális RNS ITS1 gének szekvenciái alapján.

SOEJIMA és WEN (2006) a *Vitaceae* családon belül három fő csoportot különítettek el *trnL-F* spacer, *atpB-rbcL* spacer és *rps16* intron szekvenciák alapján (1. *Ampelopsis-*

*Rhoicissus-Parthenocissus-Vitis-Nothocissus-Pterisanthes-Ampelocissus*, 2. *Cissus*, és a 3. csoport a *Cayratia-Tetrastigma-Cyphostemma* klád).

WEN és munkatársai (2007) genomi *GAI1* szekvenciákkal filogenetikai elemzést végeztek el a *Vitaceae* családon belül. A gibberellinek (GAs) olyan növényi hormonok, amelyek a növények számos fejlődési folyamatában nélkülözhetetlenek, mint például a mag csírázása, a szár megnyúlása vagy a levél növekedése (PENG et al. 1997, SILVERSTONE et al. 1998). Az *Ampelopsis* MICHX. alcsoportot képez, míg az összes ázsiai, afrikai, valamint Közép- és Dél-Amerikából (a *Cissus striata* kivételével) származó *Cissus* L. faj monofiletikus csoportot alkot. *Pterisanthes* BLUME (Délkelet-Ázsia) egy klánt alkot az ázsiai *Ampelocissus* PLANCH.-kal. A *Vitis* L. monofiletikus és egy nagyobb csoportot képez az *Ampelocissus* PLANCH. és a *Pterisanthes* BLUME fajokkal. A BOSS és THOMAS (2002) kutatásaikban *GAI*-szerű génszekvenciákat (*GAI1*) azonosítottak - hasonlóan a *GAI*-hoz - szőlő törpe mutánsokban, amely a 'Pinot Meunier' L1 sejtrétegében volt kimutatható.

## 2.9 A *Vitis* nemzetség evolúciója

A *Vitis* fajok földrajzi eredete a mai napig vitatott. Kloroplasztisz polimorfizmusuk és sejtmagi mikroszatellit elemzések az ázsiai eredetet támasztják alá (PÉROS et al. 2011), míg a sejtmagi genom SNP-k észak-amerikai származást valószínűsítene (WAN et al. 2013).

A harmadidőszakban sok szőlőfaj volt jelen a Földön, amelyek közül néhányat régészeti kutatásokon sikerült feltárni (pl. *V. minuta* REID, *V. teutonica* A. BRAUN., *V. ludwigi* A. BRAUN.). Az azonosított maradványok mindegyike az északi félteke különböző területeiről származtak. A *Vitis* nemzetségbe tartozó csoportok kialakulásában igen fontos szerepet játszott a kontinensvándorlás, amely a karbon kortól a pleisztocén korig tartott.



11. ábra: Vitaceae család földrajzi elterjedése (WAN et al. 2013).

Ez alatt a több százmillió év alatt jöttek létre a *Vitis* nemzetségben belül kialakult földrajzi fajcsoportok (észak-amerikai, európai/eurázsiai, kelet-ázsiai) (BÉNYEI és LŐRINCZ 2005), amelyek 11. ábrán jól láthatóak. A szőlőfajok őse Euráziában kb. 65 millió éve jelenhetett meg (THIS et al. 2006). A jégkorszakig a Kárpát-medence területén is jelen voltak különböző szőlőfajok (*V. hungarica* ANDR., *V. tokajensis* STUR.), amelyek a ma is élő észak-amerikai fajokkal mutattak morfológiai hasonlóságot. Régészeti kutatások bizonyították továbbá azt is, hogy több észak-amerikai faj őse szintén egyes európai fajokhoz hasonló morfológiai jellemzővel rendelkezik, mint például a *V. teutonica* A. BRAUN a *V. cordifolia* MICHX.-al, és a *V. sequanensis* SAP. a *V. rotundifolia* MICHX.-al (BÉNYEI és LŐRINCZ 2005).

A szőlő (*Vitis vinifera* L. subsp. *sativa*) az egyik első házasított évelő növényünk közé tartozik. Genomszekvenálási adatok szerint a termesztett szőlő őse kb. 22000 éve válhatott szét a többi szőlőfajtól (ZHOU et al. 2017). Domesztikációja kb. 6000-10000 évvel ezelőtt kezdődött a Kaszpi- és a Fekete-tenger vidékén (ZOHARY és HOPF 2000, MYLES et al. 2011). Jelenleg mintegy 309 olyan gént ismerünk, amelyeknek szerepe lehetett a domesztikációs folyamatokban (ZHOU et al. 2017). Ezek közül a legfontosabbak a nagyobb bogyó és fűrt méret, a cukortartalom növekedése, mag morfológiai változások, hermafrodita virágok kialakulása (THIS et al. 2007).

Domesztikációja során kismértékű genetikai diverzitás csökkenés figyelhető meg, klonális szaporítása pedig kedvezett a recesszív mutációk felszaporodásának, amelyek különböző mértékű beltenyésztéses leromláshoz vezettek (MYLES et al. 2011, ZHOU et al. 2017). Könnyű vegetatív szaporításának köszönhetően a szőlőültetvények évezredek óta széles körben elterjedtek a Földközi-tenger medencéjében (UNWIN 1991). A borkészítéshez (nyugaton), és a csemegeaszőlőnek (keleten) használt szőlőfajták eltérő felhasználása erős szelekcióhoz vezetett, vagyis kialakultak a kisebb és lédús bogyójú nyugati fajták, valamint nagyobb és húsos, fűszeres keleti fajták. A Kaukázusban fellelhető szőlőfajták elterjedése természetesen az emberi migrációt követve keletről nyugati irányba tartó telepítési mintázatot eredményezett (MC GOVERN et al. 2003). Ezen kívül a dugványok szaporítása, a termelés átfedése és az esetleges másodlagos domesztikációs események, valamint a vad rokonokkal való hibridizáció (LEVADOUX 1956) is elősegítette a rendkívül változatos fajtacsoportok kialakulását (ARADHYA et al. 2003, ARROYO-GARCIA et al. 2006).

A szőlőt (*Vitis vinifera* L.) évezredek óta természetették friss fogyasztásra, aszalt gyümölcsök és bortermelés céljából, bár a fehér bogyójú fajták eredete sokáig nem volt ismert. A ma termesztett szőlőfajták ősei vörös vagy vöröses fekete bogyósínűek voltak (SLINKARD és SINGLETON 1984), míg más fajok (például más *Vitis* és *Muscadinia* fajok) sötétszürke gyümölcssel rendelkeznek. Az egyiptomi királyi birodalomból (Tutanhamon Kr. E. 1332-1322) származó régi amforákban talált bormaradványok közelmúltbeli elemzése azt tárta fel, hogy az egyiptomiak mind vörös-, mind fehérborokat is készítettek, és mindkettőt fontosnak tartották a túlvilági élethez. Ezekből a régi időkben azonban nem találtak olyan feljegyzéseket, amelyek a fehér szőlőbogyókról vagy fehérborokról szóltak volna (GUASCH-JANE et al. 2006).

## **2.10 A *Vitis* nemzetség rendszertani kapcsolatrendszere**

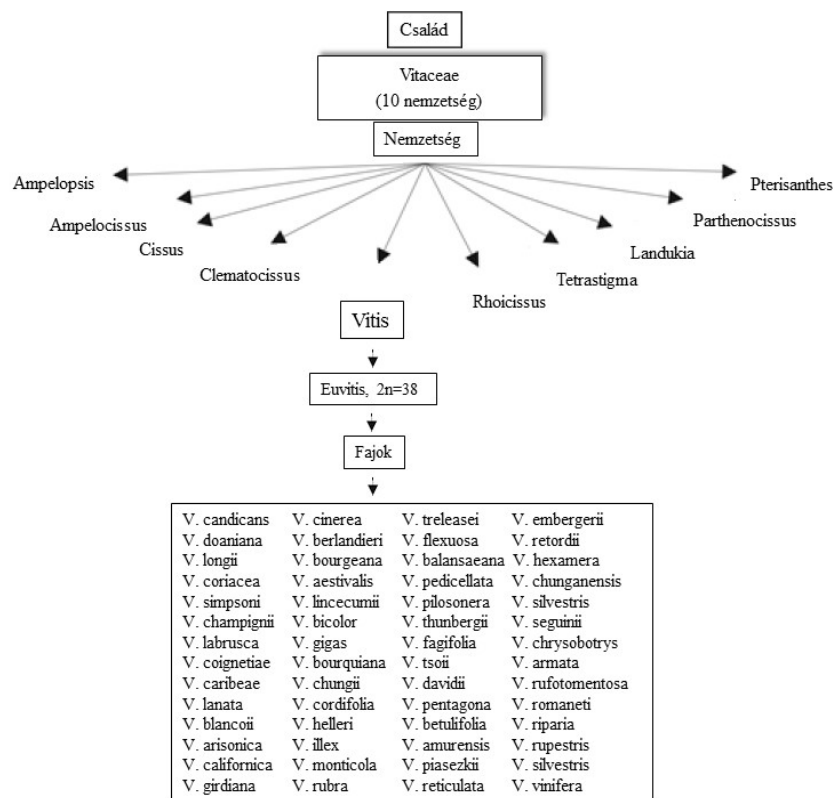
A *Vitis* nemzetség két alnemzetségre különül el (GALET 2000, GOLDY és ONOKPISE 2001). A Bailey-féle besorolás (BAILEY 1934), a 38 kromoszómával rendelkező *Vitis*-t az *Euvtis* alnemzetségbe helyezte, és a 40 kromoszómát tartalmazó fajokat a *Muscadinia* alcsoportba (WEN et al. 2007). Az *Euvtis* alnemzetség körülbelül 40-60 ázsiai, 25 észak-amerikai és az egyetlen európai fajból, a *Vitis vinifera* L.-ből áll. A *Muscadinia* alnemzetségbe négy faj tartozik (*V. rotundifolia* MICHX., *V. popenoi* FEN., *V. rotundifolia* MICHX. var. *munsoniana*, *V. rotundifolia* MICHX. var. *pygmaea*) (GALET 2000).



Ez a két alnemzetség nemcsak a kromoszómák számában különbözik egymástól, hanem számos morfológiai, anatómiai tulajdonságban és klimatikus igényük alapján is (MULLINS et al. 1992). A *Muscadinia* alnemzetség a trópusi klímához alkalmazkodott, míg a *Vitis* alnemzetség fajai elsődlegesen a mérsékelt égövben terjedtek el. A *Muscadinia* nemzetséget átmenetnek tekintik a *Vitis* és az *Ampelocissus* nemzetségek között (BOUQUET 2011). A későbbiekben a *V. vinifera* L.-n belül további két alfajt különítettek el, a *V. vinifera* L. ssp. *sativa*-t (bortermő szőlő) és a *V. vinifera* L. ssp. *sylvestris*-t (ligeti szőlő) (12. ábra).

A *Vitis* fajok evolúciója és elterjedésének mikéntje még sok kérdést vet fel. A nemzetség filogenetikai, biogeográfiai és taxonómiai kutatásainak eredményei sokszor ellentmondásosak és megkérdőjelezhetőek a belőlük levont következtetések, mivel a *Vitis* hagyományos besorolási rendszere (PLANCHON 1887, MUNSON 1909) és a molekuláris marker alapú vizsgálatok eredményei nem mindig egyeznek meg egymással (ARADHAYA 2008).

A fajok pontos száma sem ismert jelenleg, mert sok faj képes a spontán kereszteződésre és a különböző hibrid formák egyértelmű meghatározásához nem állnak rendelkezésre megfelelő morfológiai és molekuláris markerek (THIS et al. 2006).



12. ábra: A szőlő rendszertana (BÉNYEI et al. 1999 alapján saját szerkesztés).

A növények evolúciós történetének leírásához kiváló lehetőséget kínál a kloroplasztisz genom tanulmányozása. JANSEN és munkatársai (2006) közzölték először a szőlő teljes kloroplasztisz genomszekvenciáját, melynek eredményeit felhasználva PÉROS és munkatársai (2011) 9 új kloroplasztisz mikroszatellit (cpSSR) markert azonosítottak különböző szőlőfajtákban és fajokban. A plasztisz genom erősen konzervált szerkezete és mutációk kialakulására való igen alacsony hajlama miatt lehetőséget adhat leszármazási kapcsolatok feltárására (CLEGG 1993). Ennek köszönhetően a növényekben a plasztisz genom felhasználása a molekuláris markerezésben, filogenetikai vizsgálatokban rendkívül gyakori és elterjedt (CHASE et al. 1993).

A kloroplasztisz markerek mellett a sejtmagi kódoló és nem kódoló régiókat is felhasználták a *Vitis* nemzetség evolúciójának vizsgálatához (THIS et al. 2006).

A *Vitaceae* család filogenetikai kutatásaiban több markerrendszert alkalmaztak sikeresen: RAPD (GRANDO et al. 1996, WANG et al. 1999), SSR, AFLP (DI GASPERO et al. 2000, ARADHYA et al. 2008, 2013), retrotranszpozon alapú technikák (PELSY 2007) és SRAP módszert is (GUO et al. 2012).

TRÖNDLE és munkatársai (2010) három *Vitis* faj és néhány *V. vinifera* L. kloroplasztisz DNS (cpDNA) nem kódoló spacer szekvenciája alapján (2 intron és 1 IGS) a *Vitis*-en belül három csoportot különböztettek meg: az 1. kládba az európai-, a 2. csoportba az ázsiai-, míg a 3. kládba az észak-amerikai haplotípusok kerültek. A molekuláris adatok alapján kapott rendszerezés azonban nem egyértelmű, mivel egyes fajok nem abba a kládba kerültek, amelybe földrajzi eredetük alapján várható lett volna. Ezt az Észak-Amerika és Ázsia közti intenzív génáramlásként értelmezték, amelynek a hibridizáció révén nagy jelentőséget tulajdonítottak a *Vitis* fajok evolúciójában (TRÖNDLE et al. 2010).

PÉROS és munkatársai (2011) 30 *Vitis* fajt és hibrideket vizsgáltak kloroplasztisz DNS (*trnL*, *trnH-psbA-trnK*) és 15 mikroszatellit lókuszt polimorfizmusa alapján. Megállapították, hogy a *Vitis* fajok ázsiai eredetűek, és innen terjedtek el a kontinenseken a Pleisztocén időszak elején. Az észak-amerikai fajok között nagyobb genetikai variációt mutattak ki. A kloroplasztisz haplotípusokat értékelve meghatározták, hogy a termesztett szőlő (*V. vinifera* L.) két leszármazási ágra vezethető vissza.

ZECCA és munkatársai (2012) négy kloroplasztisz spacer (*trnH-psbA*, *trnK-rps16*, *trnF-nahJ*, *rpl32-trnL*) és sejtmagi *RPB2-1* gén vizsgálatával kimutatta, hogy a szőlő fajok evolúciója a földtörténeti Harmad, illetve Negyed időszak óta egyenletes és komplex folyamat, amelyre geográfiai és a klimatikus viszonyok egyaránt hatással vannak.

Fontos eltéréseket kaptak az ázsiai és amerikai fajok között, több új kloroplasztisz haplotípust meghatározva. Feltételezésük szerint a jelenleg egyetlen őshonos európai faj a *Vitis sylvestris* 4-5 millió évvel ezelőtt válhatott ki az ázsiai fajok közül (ZECCA et al. 2012).

## 2.11 A DNS nem kódoló régióinak jelentősége filogenetikai vizsgálatokban

Sokáig nem volt pontosan ismert, hogy milyen kapcsolat van a nem kódoló DNS szekvenciák és ezek biológiai funkciói között. Egyre világosabbá vált, hogy a génexpresszió változásai - elsősorban a nem kódoló DNS szekvenciák által közvetítve - óriási hatással vannak a szervezet fenotípusára (CASTILLO-DAVIS 2005). A génexpresszió szabályozása eukariótákban összetett és szigorúan szabályozott folyamat, amely különböző szabályozási szinteket foglal magába (BARRETT et al. 2012).

A nem kódoló régiók funkcionális elemei (promóter, enhanszer, inzulátor és silencerek) mindegyike más szerepet tölt be a génexpresszió szabályozásában. Transzlokációk, duplikációk, deléciók, inszerciók és pontmutációk zavarhatják ezeknek a szabályozó elemeknek a működését, és olyan DNS változásokat okozhatnak, amelyek valamilyen betegséghez kapcsolhatók (SCACHERI és SCACHERI 2015).

A növények evolúciós vizsgálatában is egyre jobban előtérbe kerül a DNS nem kódoló szakaszainak az elemzése (BORSCH et al. 2009). Ennek oka, hogy a nem kódoló régiók a legmagasabb mutációs gyakoriságot mutatják (PALMER et al. 1988, CLEGG et al. 1991). A növényi genomot nagyrészt nem kódoló szekvenciák alkotják. A sejtmag nem kódoló régiók közé tartoznak az intronok, spacer szekvenciák és a szatellit régiók is (BORSCH et al. 2009).

A növényi organellum genom nem kódoló régióinak vizsgálatánál nagy előnyt jelent, hogy ezek a régiók bőséges mennyiségű polimorf helyet tartalmaznak (BOSCH és QUANDT 2008, REIN et al. 2008, SCHMICKL et al. 2009). Ezért a populáció biológiában jelenleg használt az organellum genomban található nem kódoló régiók többségét viszonylag konzervált DNS-régiók (főleg gének) határolják, lehetővé téve univerzális PCR-primerek tervezését is (WHITE et al. 1990, TABERLET et al. 1991, DEMESURE et al. 1995, BLATTNER 1999, WEISING és GARDNER 1999).

A növények filogenetikai és evolúciós vizsgálataiban a két legszélesebb körben alkalmazott nem kódoló DNS marker a sejtmagi ITS (Internal Transcribed Spacer of nuclear encoded RNA) és a kloroplasztisz *trnL*-F régiója (*trnL* intron, *trnLF* intergénikus

spacer), amelyek értékes forrásokat szolgáltatnak a fajok közötti kapcsolatrendszerek feltárására és tanulmányozására (CALONJE et al. 2008).

TABERLET és munkatársai (1991) a kloroplasztisz DNS három nem kódoló régiójára (*trnT*, *trnF*, *trnL*) hat primert terveztek, annak érdekében, hogy kiderítsék, hogy ezek a primerek univerzálisak-e, így azokat különböző növényfajokból származó DNS amplifikálására használták. A primerek a legtöbb vizsgált fajnál működtek, beleértve az algákat, a harasztokat, a nyitva- és a zárva-termőket. Az a tény, hogy a kloroplasztisz genom nem kódoló régióinak bizonyos szakaszait széles taxonómiai tartományban amplifikálják, azt jelenti, hogy ezek a primerek felhasználhatóak a növények evolúciós változásainak tanulmányozására (TABERLET et al. 1991).

CALONJE és munkatársai (2008) összegző tanulmányában hat nukleáris markerrendszert is összefoglalt, amelyek az evolúciókutatás és filogenetikai rendszerek kutatásában rendkívül fontos szerepet játszanak: ITS (Internal Transcribed Spacer), ETS (External Transcribed Spacer), SSR (Simple Sequence Repeat), TE (Transposable Elements), intron és promóter régiók.

Az eukarióta promóter a DNS olyan szabályozó régiója, amely a II D transzkripció faktorhoz (TFIID) kötődik, a gén kódoló szakaszától upstream helyezkedik el, és lehetővé teszi a transzkripció iniciációs komplex komponenseinek ezt követő kialakulását, az RNS polimeráz II kapcsolódását és a transzkripció megindítását (SMALE és KADONAGA 2003, JUVEN-GERSHON et al. 2008). Ezeknek az alapján nyilvánvaló, hogy a promóter régió mutációja drámai hatást gyakorolhat bármely szervezet számára, így egyértelmű, hogy a promóter szekvenciák változásainak nyomon követése sokkal fontosabb az evolúció szempontjából, mint a kódoló régiókat ért esetleges változások (CALONJE et al. 2008).

A DNS nem kódoló információtartalmát főként filogenetikai kapcsolatrendszerek felállításában használták és használják fajok vagy nemzetségek között, valamint a populációsintű vizsgálatokban, hiszen néhány nem kódoló régió is elegendő variabilitást mutat az interspecifikus vizsgálatokhoz, azaz alfajok, fajták, nemesített formák filogenetikai kapcsolatainak elemzéséhez (PLEINES et al. 2009).

## 2.12 A bogyószín mint lehetséges domesztikációs és filogenetikai marker

A szőlő elsődleges tulajdonságai, melyeket a domesztikáció során figyelembe vettek a bogyók és a fürtök nagysága voltak (LEVADOUX 1956). A bogyók színét nem tekintették elsődleges célnak a szelekció során, amely egyébként nem is függött össze az adott földrajzi eredettel (SEFC et al. 2000, LIJAVETZKY et al. 2006).

A szőlő bogyószíne egyetlen pigmentcsalád, az antociánok jelenlétének köszönhető, amelyek nagymértékű változatosságot mutatnak a szőlőfajták között (MAZZA 1995). Az ősi vadszőlő-populációban nem volt megfigyelhető színváltozás, sem interspecifikus- (CADLE-DAVIDSON és OWENS 2008), sem intraspecifikus szinten (OLMO 1976). A szőlő színéért felelős lókus diverzifikációja fehér genotípusok kialakulásához vezetett, amelyek az ősi szőlőfajtákból alakultak ki (ZOHARY és HOPF 2000). E két csoport között folyamatosan halvány színű genotípusokat figyeltek meg, rózsaszíntől egészen a pirosig. Így az elsődleges házasítási tulajdonságokkal ellentétben az egyes szőlőtermesztési régiókon belül a termelők különböző színváltozatokat is kiválogattak, ami nagy színvariáció kialakulásához vezetett (FOURNIER-LEVEL et al. 2009a).

A *Gret-1* retrotranszpozont eredetileg kizárólag *V. vinifera* L. fajtákban mutatták ki, úgy vélték, a többi szőlőfajból hiányzik (CADLE-DAVIDSON és OWEN 2008). Ennek alapján azt feltételezték, hogy a *Gret-1* *VvMybA1* promoterébe történő inszerciója a *V. sylvestris* GMEL. vagy annak ősébe az észak-amerikai és ázsiai fajoktól történő elválása után következett be (MITANI et al. 2009, CARRASCO et al. 2015). Ezt később NIU és munkatársai (2017) megcáfolták, mivel a Kínában őshonos *V. davidii* FOEX. fehér bogyójú változataiban is megtalálták a *Gret-1*-et, ami a *V. vinifera* L.-val való szoros evolúciós kapcsolatra utalhat. Más vélemények szerint a *V. davidii* FOEX. színtelen bogyójú változatai a *V. vinifera* L. fajtákkal történő kereszteződések eredményeképpen alakultak ki (JIAO et al. 2014). A többi *Vitis* faj (*V. aestivalis* MICHX., *V. riparia* MICHX.) fehér bogyójú változataiban nem tudták kimutatni a retrotranszpozon jelenlétét, így ezek más, eddig még nem azonosított mutációkra vezethetők vissza a *VvMybA1* kódoló régiójában vagy más az antocián bioszintézisében résztvevő génben (CADLE-DAVIDSON és OWEN 2008).

A *Gret-1* inszerciója mint jelentős evolúciós esemény kb. 200 ezer évvel ezelőtt történhetett (MITANI et al. 2009). A *VvMybA2* mutációjának idejét jelenleg nem ismerjük, vad fajokban még nem vizsgálták, de megelőzte a *VvMybA1*-ét (FOURNIER-LEVEL et al. 2009b).

A domesztikáció során a *V. vinifera* L. eredetű fajtákban a *Myb* gének mutációjának következtében a sötét szín fokozatos világosodása figyelhető meg egészen a fehér szín megjelenéséig. A legősibb, sötét bogyójú haplotípus a nyugati régióra, míg az újabb haplotípusok a keleti régió csemege fajtáira jellemzőek, ahonnan továbbterjedtek (FOURNIER-LEVEL et al. 2009b).

Különböző földrajzi eredetű *V. sylvestris* GMEL. populációk *VvMybA1* és *VvMybA2* allélpolimorfizmusának meghatározásával is bizonyították, hogy a bortermő szőlőt két eltérő helyen domesztikálták, a Kaukázusban és a Földközi-tenger medencéjében. A nyugat-európai és a kaukázusi populációkban olyan különböző *VvMybA1* alléleket, illetve haplotípusokat azonosítottak, amelyek leggyakrabban a *convarietas occidentalis*, illetve *orientalis* ökotípusba tartozó fajtákban figyelhetők meg (CARRASCO et al. 2015). A nyugat-európai *V. sylvestris* GMEL. populációkban és a *convarietas occidentalis* csoportba tartozó *V. vinifera* L. fajtákban hiányoznak azok az allélok, amelyek promotere 44 és 111 bp illetve második intronja 33 bp nagyságú inszerciókat tartalmaznak. Ezek csak az ázsiai *V. sylvestris* GMEL. populációkra, illetve a *convarietas orientalis* csoportba tartozó *V. vinifera* L. fajtákra jellemzőek. Annak ellenére, hogy a legtöbb szőlőfaj fekete bogyóhéjszínnel rendelkezik, néhány ázsiai és észak-amerikai faj *MybA1* gén analízise polimorfizmust mutatott (SHIMAZAKI et al. 2011, PÉROS et al. 2015).

A *V. vinifera* L. *orientalis* csoportba tartozó fajtákban a rózsaszín bogyóhéjt okozó 44, 111 és 33 bp inszerciókat több ázsiai szőlőfajban is kimutatták (SHIMAZAKI et al. 2011). Ezek a mutációk azonban a vad fajokban nem befolyásolják az antociánok termelődését, a bogyók színe minden esetben fekete, amely az eltérő biokémiai szabályozásra utal.

A rózsaszín bogyójú *V. vinifera* L. *convarietas orientalis* csoportba tartozó kínai és japán fajtákban a *MybA1* promoter régiójában egy 44 és egy 111 bp, a második intronban pedig egy 33 bp hosszúságú inszerciót mutattak ki.

Különböző földrajzi eredetű szőlőfajok *MybA1* szekvenciaszintű összehasonlításával több SNP is azonosítottak az intron és a kódoló régiókban (PÉROS et al. 2015). Az exon régióban történő pontmutációk sok esetben aminosav-cseréket eredményeznek, amelyek hatással vannak az átíródó fehérje aktivitására is. A fajok közötti polimorfizmust filogenetikai analízisre felhasználva több rokonsági kapcsolatot is megvilágítottak. Olyan új mutációt is azonosítottak, amelyik hiányzik a *V. vinifera* L. fajtákból. Bizonyos indel-ek csak az észak-amerikai, mások csak az ázsiai fajokra voltak jellemzőek. A szekvencia adatok alapján szerkesztett dendrogram azonban nem minden esetben tükrözte a fajok földrajzi eredetét.

Érdekes morfológiai különbség az eltérő földrajzi eredetű fajtáknál, hogy a fekete bogyójú *V. vinifera* L. fajták és az ázsiai fajok őszi lombszínéződése piros, az amerikai fajoké – a *V. californica* kivételével – sárga (BRANAS 1974). Ez szintén az antocián bioszintézis különbségeire hívja fel a figyelmet.

### 3 ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1 A *VvMybAI* allél polimorfizmus meghatározása kárpát-medencei fajtákban

##### 3.1.1 Vizsgált növényanyag

A vizsgálatunkban felhasznált kárpát-medencei fajtákat a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet génbankjából kaptuk. Összesen 118 régi kárpát-medencei fajta *VvMybAI* allélösszetételét határoztuk meg, amelyeket a 2. táblázat tartalmaz.

2. táblázat: A vizsgálatban felhasznált 118 kárpát-medencei fajta

Fajták neve				
Ágasfark	Alanttermő	Aprófehér	Bajor feketefájú	Bajor kék
Bajor szürke	Bakarka	Bakator kék	Bakator piros	Bakator tüdőszínű
Bakszem	Balafánt	Balafánt fekete	Bálint	Bánáti rizling
Barátcsuha kék	Barátcsuha szürke	Beregi	Betyárszőlő	Bihari
Bogdányi dinka	Bőségszaru	Budai	Cudarszőlő	Cukorszőlő
Czeiger	Csókaszőlő	Csomorika	Demjén	Detki
Dinka pécsi	Dinka rakszemű	Dinka ürömi	Dinka vörös	Dinka zöld
Erdei	Ezerjő	Fodroslevelű	Furmint	Furmint piros
Furmint változó	Füger	Fügeszőlő	Fürjmoly	Gergely
Gohér fehér	Gohér piros	Gohér változó	Gorombaszőlő	Halápi
Hamuszőlő	Hárslevelű	Hosszúnyelű	Izsáki	Járdovány fehér
Járdovány fekete	Juhfark	Kadarka kék	Kéklő piros	Kéknyelű
Kéknyelű piros	Királyleányka	Királyszőlő	Kolontár	Kovácsi
Kovácskréger	Kozma	Ködös	Kőporos	Kövérszőlő
Kövidinka	Kövidinka fehér	Kübeli	Lágylevelű	Lányszőlő
Leányka	Leányka fekete	Leányka rózsás	Lisztés fehér	Lisztés piros
Magyarka	Mézes fehér	Mézes fekete	Muskotály csíkos	Muskotály fekete
Muskotály piros	Muskotály sárga	Mustos	Papsapka	Pécsi szagos
Pettyesszőlő	Pintes	Piros gránát	Piros szlanka	Piros tökök
Polyhos	Pozsonyi	Purcsin	Rakszőlő	Rohadó
Rókafarkú	Rózsaszőlő	Sárfehér	Sárpáros	Somszőlő
Szagos bajnár	Szekszárdi	Szeredi	Szerémi	Szőkeszőlő
Tihanyi	Tihanyi kék	Tótika	Tökszőlő	Tulipiros
Tükörszőlő	Tüskéspupú	Vékonyhájú		



### 3.1.2 DNS kivonás

A DNS kivonáshoz fiatal leveleket használtunk fel, amelyeket a DNS kivonás előtt és után  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk. DNS kivonására Qiagen DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit-et alkalmaztunk, a gyártó leírása alapján (M.1.2. számú melléklet). A kinyert DNS mennyiségét és minőségét Nanodrop spektrofotométerrel határoztuk meg, majd az adatok ismeretében  $10\text{ ng}/\mu\text{l}$  koncentrációjú hígításokat készítettünk, melyeket templátként használtunk fel a PCR során.

### 3.1.3 A vizsgálatokban felhasznált markerek

A kárpát-medencei fajták *VvMybA1* alléllösszetételének meghatározásához KOBAYASHI és munkatársai (2004) által leírt primereket alkalmaztuk (3. táblázat). A *VvMybA1a* primerrel végzett PCR egy  $1560\text{ bp}$  hosszúságú fragmentum felszaporítását teszi lehetővé, amely a 'fehér' allél jelenlétére utal, vagyis a *Gret-1* inszerció meglétét mutatja. A *VvMybA1b* és a *VvMybA1c* allélra specifikus primerpárok használata lehetővé teszi a funkcióképes allélok kimutatását. A  $851\text{ bp}$  hosszúságú DNS fragmentum a vad típusú *VvMybA1c* allél (nincs *Gret-1*), míg az  $1675\text{ bp}$  nagyságú PCR termék a *VvMybA1b* allél (3' LTR) meglétére utal. Azokban az esetekben amikor a *VvMybA1* allélspecifikus primerekkel nem tudtunk a fenotípusnak megfelelő várt genotípust meghatározni, a 20D18CB9 markerrel vizsgáltuk a fajtákat, amelyet WALKER és munkatársai (2006) írtak le. A 20D18CB9 marker a *VvMybA* génekkel való kapcsoltsága miatt alkalmas arra, hogy segítségével a fajták bogyószínét meghatározhassuk. A markerre tervezett primerekkel egy  $577\text{ bp}$  hosszúságú fragmentum szaporítható fel, amelyet a *DdeI* restrikciós enzimmel emésztve a különböző színű szőlőfajták eltérő mintázatokat adnak. A  $329$  és  $213\text{ bp}$ -os fragmentumok a *Gret-1* jelenlétét mutatják homozigóta formában (*VvMybA1a/VvMybA1a*). A  $329$ ,  $248$  és a  $213\text{ bp}$ -os fragmentumok *VvMybA1a/VvMybA1c* allélkombinációt mutatják, vagyis a funkcióképes allél miatt kialakuló színes bogyószínű fajták kimutatását teszi lehetővé. A  $329$  és  $248\text{ bp}$ -os fragmentumok a vad típusú allélok (*VvMybA1c/VvMybA1c*) meglétére utalnak.

3. táblázat: A felhasznált *VvMybA1* allélspecifikus és kapcsolt markerek szekvenciái

Primer	Forward primer szekvencia (5'-3')	Reverz primer szekvencia (5'-3')	Referencia
<i>20D18CB9</i> (577 bp)	GATGACCAAACCTGCCACTGA	ATCACCTTGTCCCACCAA	WALKER et al. (2006)
<i>VvMybA1a</i> (1560 bp)	AAAAAGGGGGGCAATGTAG GGACCC	GAACCTCCTTTTTGAAGTGG TGACT	KOBAYASHI et al. (2004)
<i>VvMybA1b</i> (1675 bp)	GGACGTTAAAAAATGGTTGC ACGTG	GAACCTCCTTTTTGAAGTGG TGACT	
<i>VvMybA1c</i> (851 bp)	GGACGTTAAAAAATGGTTGC ACGTG	GAACCTCCTTTTTGAAGTGG TGACT	

### 3.1.4 PCR körülmények és agaróz gélelektroforézis

A polimeráz láncreakciókat Bio-Rad iCycler készülékben (Bio-Rad) végeztük el. A reakcióelegy összetevői a következők voltak: 20 ng templát DNS, 0,6 egység WTB-*Taq* polimeráz (West Team Biotech, Pécs), 0,1 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,75-0,75  $\mu$ M forward, illetve reverz primer, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x PCR puffer. Az amplifikációra touchdown PCR-t használtunk a következők szerint: (1.) 2 perces 94°C-os előciklus, (2.) 10 cikluson keresztül: 94°C-on 30 mp-ig – denaturálás, 62°C-on 30 mp-ig – primerkapcsolódás, 72°C-on 1 percig - DNS-szintézis. A kapcsolódási hőmérséklet ciklusonként 1°C-kal csökkent. (3.) 24 cikluson keresztül: 94°C-on 30 mp-ig, 56°C-on 30 mp-ig, 72°C-on 1 percig; majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizáció.

A mintákat 1%-os agaróz gélen választottuk szét és 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l etídium-bromiddal festettük. A futtatás 80 V- on 30 percig történt 1X-es TAE vagy 0,5X-es TBE pufferben. Markernek a GeneRuler™ (Fermentas) 100 bp Plus DNA Ladder molekulatömeg markert használtuk, ami a következő DNS fragmenteket tartalmazza (bp): 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 és 100. A gélt UV fényel világítottuk meg és Alpha Innotech Multimage™ Light Cabinet géldokumentációs készülékkel fényképeztük le.

## 3.2 SNP polimorfizmus meghatározása kárpát-medencei és más európai fajtákban

### 3.2.1 Növényanyag

A kárpát-medencei fajtákat a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet génbankjából kaptuk. A vizsgálatunkban szereplő európai fajták mintáit szintén a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetből, valamint a Szent István Egyetem soroksári fajtagyűjteményéből kaptuk (4. táblázat).

4. táblázat: Az SNP vizsgálatban felhasznált 43 fajta

Fajták neve				
Barbera	Chardonnay	Pinot noir	Bajor szürke	Bajor kék
Bajor feketefajú	Bakator tündőszínű	Bakator piros	Bakator kék	Barátesuha szürke
Barátesuha kék	Csiljaki belűj	Csiljaki krasznűj	Furmint fehér	Furmint piros
Furmint változó	Gohér fehér	Gohér piros	Gohér változó	Huszajne belűj
Huszajne krasznűj	Kéknyelű	Kéknyelű piros	Korinthusi fekete	Korinthusi piros
Leányka	Leányka fekete	Leányka rózsás	Lisztos fehér	Lisztos piros
Muskotály csíkos	Muskotály fekete	Muskotály piros	Muskotály sárga	Oportó kék
Oportó szürke	Piquepoul gris	Piquepoul noir	Szilváni piros	Szilván zöld
Szeredi	Szultán fehér	Szultán fekete		

### 3.2.2 Felhasznált primerek

A felhasznált SNP primereket az 5. táblázat mutatja be. A *VvMybA2* kódoló régiójára alkalmazott primerek segítségével felszaporított 1250 bp hosszúságú szakaszt, és az SNP primerek kapcsolódását az M.1.1-es számú melléklet (24. ábra) tartalmazza.

5. táblázat: *VvMybA2* gén SNP vizsgálata során alkalmazott primerek

<i>VvMybA2</i> kódoló régióra alkalmazott primer		
<i>VvMybA2</i> (1250 bp)	F: 5'-GTGAGGAGAGTACATTGTAGG-3' R: 5'-GAACCTTCTTTTCAGGTGG-3'	WALKER et al. (2007)
SNP primerek		
<i>VvMybA2R44</i> (K980)	5'-GCAGGGTTGAATAGATGCC-3'	WALKER et al. (2007)
<i>VvMybA2C22</i> (C22)	5'-AGGATGTTCTCCTGAGGAA-3'	CARRASCO et al. (2015)

### 3.2.3 *VvMybA2* gén SNP vizsgálata SNaPshot™ módszerrel

A SNaPshot™ (Applied Biosystems) elterjedt módszer az SNP-k azonosításában, mivel számos polimorfizmus gyors detektálását teszi lehetővé egyetlen vizsgálatban. Ráadásul, más nagy teljesítményű genotípus-meghatározási módszerekkel összehasonlítva (pl. Affymetrix, SNP-Plex, Illumina rendszerek), a SNaPshot™ reakciók sokkal kevesebb DNS-t igényelnek (PANETO et al. 2011). A SNaPshot™ módszer miniszekvenálás reakción alapul, amelyet az elektroforézis és a fluoreszcencia detektálása követ. A jelöletlen primer az SNP elé van tervezve, vagyis a 3' végénél közvetlenül az SNP helyétől upstream helyezkedik el, a következő nukleotid a keresett SNP. Minden ddNTP-hez egy fluoreszcens festék van hozzárendelve (SOBRINO et al. 2005).

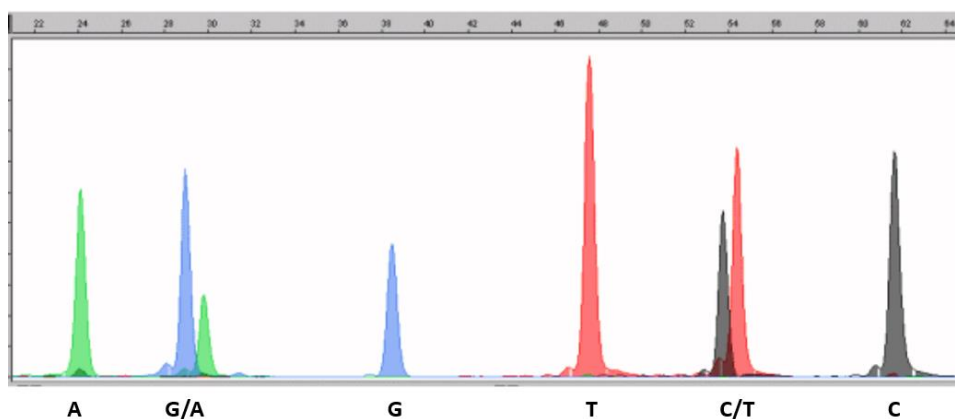
A *VvMybA2* génben található *VvMybA2R44/K980* (WALKER et al. 2007) és a *VvMybA2C22* (CARRASCO et al. 2015) SNP polimorfizmust vizsgáltuk. A *VvMybA2* gén, kódoló szekvenciáját a 5. táblázatban megtalálható *VvMybA2* szekvenciájára tervezett primerrel, PCR-rel amplifikáltuk WALKER és munkatársai (2007) által leírt körülmények alkalmazásával. A PCR termékeket 0,8 %-os agaróz (TBE) gélen választottuk el, majd QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk ki a gyártó leírása alapján. A keresett SNP-eket SNaPshot™ módszerrel detektáltuk a gyártó leírása alapján az ABI PRISM SNaPshot™ Multiplex kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California) segítségével. A SNaPshot™ reakciót végig jégen tartva, a mix hozzávalóival mérjük össze 10 µl végtérfogatra:

- 5 µl/minta SNaPshot™ Multiplex Ready Reaction Mix (amely tartalmazza az AmpliTaq® DNS polimerázt, a fluoreszcensen jelölt ddNTP-et és a reakcióhoz szükséges puffert)
- 1-1 µl/minta az általunk alkalmazott két SNP primer (5. táblázat)
- 1 µl/minta víz
- 3 µl/minta az előzetesen kitisztított PCR termék

Ezt követően PCR amplifikációt indítottunk a következő kondíciókkal: 96°C-on 10 mp-ig – denaturálás, 50°C-on 5 mp-ig – primerkapcsolódás, 60°C-on 30 mp – DNS-szintézis.

Ezt követően a 10 µl SNaPshot™ PCR termékeket enzimatikusan kezeltük 1 U alkalikus foszfatázzal 0,05 µl/minta koncentrációban (CIP, Invitrogen) a felesleges PCR primerek és dNTP-k eltávolításának érdekében. A reakcióelegyet alaposan összekevertük, és 37°C-on 1 órán át inkubáltuk, majd 15 percig 65°C-on inaktiváltuk az enzimet.

Az inkubációt követően 20 µl/minta Hi-Di formamide, és 0,5 µl/minta GeneScan™ - 120 LIZ™ size standard-ból mixet készítettünk, majd ebből 20 µl mennyiséget adtunk 1 µl SNaPshot™ PCR termékhez. A SNaPshot™ PCR termékeket kapilláris elektroforézis készülékben (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) detektáltuk. Az SNP szekvenálás eredményeit GeneMapper 4.0 szoftver segítségével értékeltük ki. A reakcióban felhasznált fluoreszcens festékeket alapján, a ddNTP-khez az alábbiak szerint rendelhetjük a kromatogramot: A (adenin)- zöld, G (guanin)- kék, T/U (timin/uracil)- piros, C (citozin)- fekete. Homozigóta eredmény esetén az adott nukleotidnak megfelelő színű csúcsot láthatunk, míg heterozigóta eredmény esetén két csúcsot láthatunk a megfelelő színnel párosulva (13. ábra).



13. ábra: A detektálható SNP-k (nukleotidok) szín szerinti megjelenése kromatogram formájában a SNaPshot™ reakcióban (Forrás: ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit Protokoll).

### 3.3 Vitis fajok vizsgálata

#### 3.3.1 Növényanyag

A vizsgált szőlőfajok a Pécsi Tudomány Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet génbankjából, a Szent István Egyetem soroksári, a németországi geiweilerhofi és az INRA franciaországi montpellier gyűjteményből származott. A rendelkezésünkre álló fajokat a 6. táblázat tartalmazza. Több faj esetében több helyről is rendelkezésünkre állt növény minta, amelyet az Eredmények 4.3. fejezetében megtalálható 7. táblázatban tüntettem fel.

1. táblázat: A vizsgálatban felhasznált 34 *Vitis* faj neve

<i>Vitis</i> fajok neve			
<i>V. vinifera</i> 'Barbera'	<i>V. sylvestris</i>	<i>V. amurensis</i>	<i>V. armata</i>
<i>V. pentagona</i>	<i>V. coignatiae</i>	<i>V. davidii</i>	<i>V. piasezkii</i>
<i>V. flexuosa</i>	<i>V. romaneti</i>	<i>V. rupestris</i>	<i>V. arizonica</i>
<i>V. tiliacea</i>	<i>V. girdiana</i>	<i>V. solonis</i>	<i>V. longii</i>
<i>V. doaniana</i>	<i>V. californica</i>	<i>V. labrusca</i>	<i>V. aestivalis</i>
<i>V. lincecumii</i>	<i>V. pagnucci</i>	<i>V. candicans</i>	<i>V. vulpina</i>
<i>V. cordifolia</i>	<i>V. simpsoni</i>	<i>V. berlandieri</i>	<i>V. cinerea</i>
<i>V. slavinii</i>	<i>V. titanica</i>	<i>V. monticola</i>	<i>V. andersonii</i>
<i>V. champinii</i>	<i>M. rotundifolia</i>		

#### 3.3.2 Felhasznált primer és PCR körülmények

A *Vitis* fajok esetében a polimeráz láncreakciót az antocián bioszintézist szabályozó *VvMybA1* transzkripció faktor génjével kapcsolt BAC könyvtár alapján tervezett 20D18CB9 marker szekvenciaszintű elemzését végtük el WALKER és munkatársai (2007) által tervezett primerpárral. A primerpár szekvenciáját a 3. táblázat tartalmazza.

A polimeráz láncreakciókat Bio-Rad iCycler készülékben (Bio-Rad) végeztük el. A 10 µl végtérfogatú reakcióelegy összetevői a következők voltak: 2 µl templát DNS, 0,25 µl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, 1µl dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,6-0,6 µl forward, illetve reverz primer, 1µl Phusion HF puffer. Az amplifikációra a gyártó leírása alapján meghatározott, de általunk módosított programot alkalmaztuk: (1.) 30 mp 98°C-os előciklus, (2.) 98°C-on 10 mp-ig – denaturálás, 55°C-on 20 mp-ig –

primerkapcsolódás, 72°C-on 15 mp – DNS-szintézis, majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizáció.

A mintákat 1%-os agaróz gélen választottuk szét és 0,5 µg/µl etídium-bromiddal festettük. A futtatás 80 V-on 30 percig történt 1 x-es TAE vagy 0,5 x-es TBE pufferben. Markernek a GeneRuler™ (Fermentas) 100 bp Plus DNA Ladder molekulatömeg markert használtuk, ami a következő DNS fragmentumokat tartalmazza (bp): 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 és 100. A gélt UV fényel világítottuk meg és Alpha Innotech Multimage™ Light Cabinet géldokumentációs készülékkel fényképeztük le.

### 3.3.3 Ligálás, transzformáció és szekvenálás

A tisztított PCR termékeket pGEM-T Easy (Promega) vagy CloneJET1.2 (Thermo Scientific) klónozó vektorba ligáltuk. A ligálási termékkel Library Efficiency Inva kompetens *Escherichia coli* (Invitrogen) sejteket transzformáltunk. A kiszélesztett sejteket 100 mg/l ampicillin tartalmú táptalajon szelektáltuk. A kinőtt telepeket kolónia PCR-rel ellenőriztük. A pozitív telepekből folyékony tenyészetet indítottunk, majd a PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) segítségével plazmidot izoláltunk.

A minták szekvenálását ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) készülékben végeztük el M13 univerzális vagy pJET1.2 primerekkel.

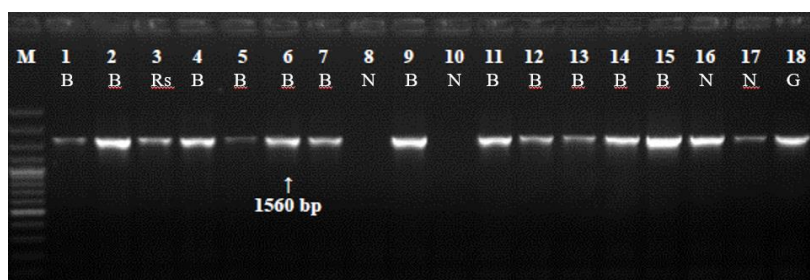
A szekvenciák illesztéséhez a MEGA6 programot, míg az illesztések grafikai bemutatásához a BioEdit 7.2.5. programot használtuk. A filogenetikai fa elkészítéséhez Megalign (Lasergene) programot használtunk Clustal W algoritmus alapján, 1000-es bootstrap érték megadásával.

## 4 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 4.1 Kárpát-medencei fajták *VvMybA1* allél polimorfizmusának meghatározása

A 118 régi kárpát-medencei fajta *VvMybA1* allélösszetételének meghatározásához elsődlegesen a KOBAYASHI és munkatársai (2004) által meghatározott *VvMybA1* allélspecifikus primereket használtuk (3. táblázat). Azokban az esetekben, amelyekben az előbb említett primerpárok használatával nem tudtuk a fenotípusnak megfelelő várt genetikai hátteret kimutatni, a 20D18CB9 markerre tervezett primerpárral határoztuk meg a bogyószín-genotípust. A géleképeken használt jelölések a bogyószínre vonatkoznak: N (noir)- fekete, B (blanc)- fehér, Rs (rose)- rózsaszín, Rg (rouge)- piros, G (gris)- szürke.

A *VvMybA1a* primerrel végzett PCR eredményeként (14. ábra, 16. ábra) sikerült meghatározni egy 1560 bp méretű szakaszt, amely a ‘fehér’ allél jelenlétére utal. A 14. ábrán látható, hogy a 12 fehér és 6 színes bogyóval rendelkező vizsgált fajta közül csak két esetben nem kaptunk fragmentumot, vagyis a fekete bogyójú ‘Tótika’ (8) és ‘Ködös’ (10) nem tartalmazza a *Gret-1* inszerciót. A szintén színes bogyójú ‘Rózsaszőlő’ (3), ‘Bakator kék’ (16), ‘Bajor kék’ (17) és ‘Bajor szürke’ (18) az előbb említett két fajttal ellentétben viszont hordozzák a *Gret-1* inszerciót, vagyis heterozigóták, amit a 15. ábrán látható gélekép is megerősít.



14. ábra: *VvMybA1a* primerrel végzett PCR eredménye kárpát-medencei fajtákon.

M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus)

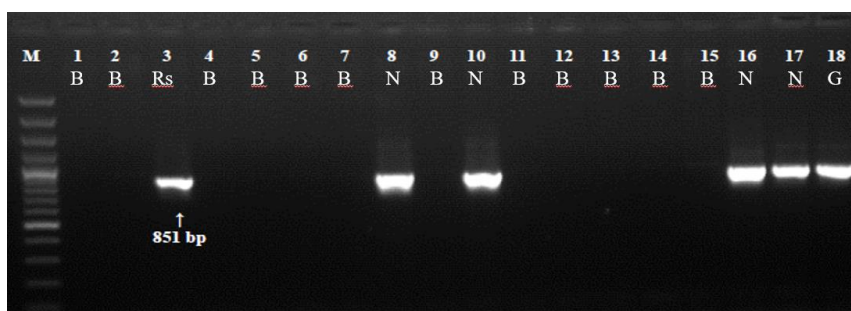
1. ‘Bihari’ (B), 2. ‘Kozma’ (B), 3. ‘Rózsaszőlő’ (Rs), 4. ‘Rakszőlő’ (B), 5. ‘Szókeszőlő’ (B), 6. ‘Szagos bajnár’ (B), 7. ‘Tükör szőlő’ (B), 8. ‘Tótika’ (N), 9. ‘Királyszőlő’ (B), 10. ‘Ködös’ (N), 11. ‘Kovácskréger’ (B), 12. ‘Kübeli’ (B), 13. ‘Lágylevelű’ (B), 14. ‘Mustos’ (B), 15. ‘Papsapka’ (B), 16. ‘Bakator kék’ (N), 17. ‘Bajor kék’ (N), 18. ‘Bajor szürke’ (G)

A *VvMybA1b* és *VvMybA1c* allélra specifikus primerpárok használata lehetővé tette a funkcióképes allélok kimutatását. A 851 bp hosszúságú DNS fragmentum a vad típusú



*VvMybA1c* allél (nincs *Gret-1*), míg az 1675 bp nagyságú PCR termék a *VvMybA1b* allél (*Gret-1* kivágódás, 3’LTR szekvencia megmaradása) meglétére utal. Ugyanazon a fajtákon a *VvMybA1b* allélra tervezett primerrel elvégzett PCR során (15. ábra) egy 851 bp méretű (*VvMybA1c* allél) DNS fragmentumot sikerült felszaporítani. A ‘Rózsaszőlő’ (3) a ‘Bakator kék’ (16) a ‘Bajor kék’ (17) és a ‘Bajor szürke’ (18) egyik allélje tartalmazza a *Gret-1* inszerciót (14. ábra), a másik alléljuk viszont a funkcióképes ‘c’ allél (15. ábra), vagyis heterozigóta genotípussal rendelkeznek (*VvMybA1a/c*). A funkcióképes *VvMybA1c* allél domináns a funkcióképtelen *VvMybA1a* alléllal szemben, így heterozigóta formában is zajlik transzkripció, amely színes bogyót eredményez.

A ‘Tótika’ és a ‘Ködös’ nem hordozzák a funkcióképtelen *VvMybA1a* allélt (14. ábra), így ezek homozigóták a *VvMybA1c* allélra, tehát nem tartalmazzák a *Gret-1* retrotranszpozon inszerciót a transzkripció faktor gén promoterében. Ez az eredmény a fajták ősi jellegére utalhat, hiszen a *Gret-1* inszerciójának evolúciós eseménye később történt a *V. vinifera* L. fajtáiban a többi fajtól való elválás után.

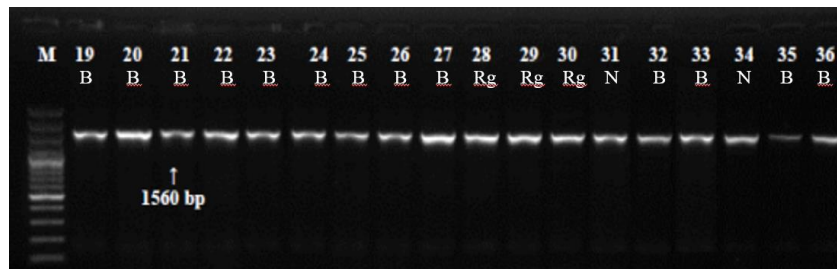


15. ábra: *VvMybA1b/c* allélre végzett PCR eredménye kárpát-medencei fajtákon.

M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus)

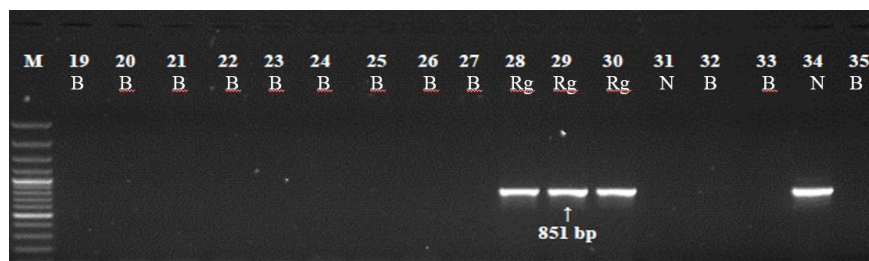
1. ‘Bihari’ (B), 2. ‘Kozma’ (B), 3. ‘Rózsaszőlő’ (Rs), 4. ‘Rakszőlő’ (B), 5. ‘Szőkeszőlő’ (B), 6. ‘Szagos bajnár’ (B), 7. ‘Tükör szőlő’ (B), 8. ‘Tótika’ (N), 9. ‘Királyszőlő’ (B), 10. ‘Ködös’ (N), 11. ‘Kovácskréger’ (B), 12. ‘Kübeli’ (B), 13. ‘Lágylevelű’ (B), 14. ‘Mustos’ (B), 15. ‘Papsapka’ (B), 16. ‘Bakator kék’ (N), 17. ‘Bajor kék’ (N), 18. ‘Bajor szürke’ (G)

További fajták vizsgálata során szintén a *VvMybA1a* és *VvMybA1c* allél jelenlétét sikerült kimutatni színes és fehér bogyójú fajtáiban (16. ábra, 17. ábra). A fehér bogyójú fajták mindegyike hordozza a *Gret-1* inszerciót (16. ábra) homozigóta formában, tehát funkcióképes alléllal nem rendelkeznek. A színes bogyójú fajták közül a ‘Beregi’ (28) a ‘Raksemű dinka’ (29) a ‘Vörös dinka’ (30) és a ‘Fekete balafánt’ (34) tartalmazzák mind a két allélt, vagyis heterozigóták (*VvMybA1a/c*), ami lehetővé teszi a színes bogyó kialakulását.



16. ábra: *VvMybA1a* allélspecifikus primerrel végzett PCR eredménye kárpát-medencei fajtákon. M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus). 19. 'Demjén' (B), 20. 'Fügér' (B), 21. 'Fügeszőlő' (B), 22. 'Erdei' (B), 23. 'Aprófehér' (B), 24. 'Bánáti rizling' (B), 25. 'Bőségszaru' (B), 26. 'Alanttermő' (B), 27. 'Fürjmoly' (B), 28. 'Beregi' (Rg), 29. 'Rakszemű dinka' (Rg), 30. 'Vörös dinka' (Rg), 31. 'Ágasfark' (N), 32. 'Bakarka' (B), 33. 'Balafánt' (B), 34. 'Fekete balafánt' (N), 35. 'Betyárszőlő' (B), 36. 'Csomorika' (B)

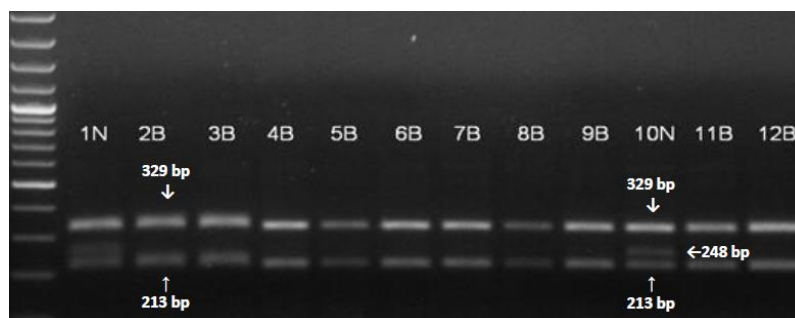
A sötét bogyójú 'Ágasfark'-ban (31) kimutattuk a *VvMybA1a* funkcióképtelen allél jelenlétét, amely önmagában nem is lenne baj, hiszen heterozigóta formában is zajlik transzkripció, viszont színes allél jelenlétét ezzel a markerrel nem sikerült bizonyítani (17. ábra), vagyis a fenotípusnak megfelelő várt genotípust a *VvMybA1* allélspecifikus primerrel nem lehetett meghatározni.



17. ábra: *VvMybA1b/c* allélre végzett PCR eredménye kárpát-medencei fajtákon. M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus) 19. 'Demjén' (B), 20. 'Fügér' (B), 21. 'Fügeszőlő' (B), 22. 'Erdei' (B), 23. 'Aprófehér' (B), 24. 'Bánáti rizling' (B), 25. 'Bőségszaru' (B), 26. 'Alanttermő' (B), 27. 'Fürjmoly' (B), 28. 'Beregi' (Rg), 29. 'Rakszemű dinka' (Rg), 30. 'Vörös dinka' (Rg), 31. 'Ágasfark' (N), 32. 'Bakarka' (B), 33. 'Balafánt' (B), 34. 'Fekete balafánt' (N), 35. 'Betyárszőlő' (B)

Azoknál a genotípusoknál, amelyeknél a *VvMybA1* specifikus primerekkel nem sikerült megállapítani a fajták allélösszetételét, ott a 20D18CB9 CAPS markerrel amplifikált és *DdeI* restrikciós enzimmel emésztett PCR termékek vizsgálatát végeztük el.

A PCR termék emésztésével, és az emésztett termék agaróz gélen való futtatásával könnyedén el tudjuk különíteni a színes és fehér bogyójú fajtákat. Ebben az esetben a fehér bogyójú fajták a PCR termék emésztését követően agaróz gélen detektálható 329 bp és 213 bp méretű fragmentumot eredményeznek. Így a 18. ábrán és a 19. ábrán látható gélképen a vizsgált összes fehér bogyósínű fajta esetében látható a fehér allél jelenléte, vagyis a 329 és 213 bp méretű fragmentumok. A 18. ábra és a 19. ábrán használt jelölések a bogyósínre vonatkoznak: N (noir)- fekete, B (blanc)- fehér, Rs (rose)- rózsaszín, Rg (rouge)- piros, G (gris)- szürke.

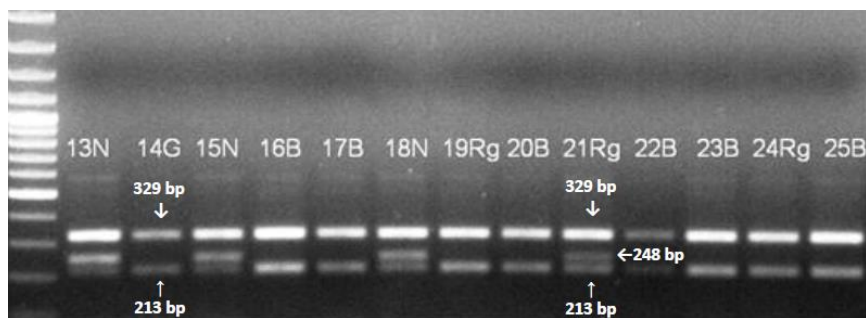


18. ábra: 20D18CB9 markerrel végzett PCR termék *DdeI* emésztése.

M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus)

1N. 'Ágasfark', 2B. 'Aprófehér', 3B. 'Balafánt', 4B. 'Bánáti rizling', 5B. 'Budai', 6B. 'Cudar szőlő', 7B. 'Cukorszőlő', 8B. 'Demjén', 9B. 'Detki', 10N. 'Pécsi dinka', 11B. 'Ürömi dinka', 12B. 'Ezerjő'

Az 'Ágasfark' (1N), a 'Pécsi dinka' (10N), a 'Gorombaszőlő' (13N), 'Kéklő piros' (15N) a 'Fekete leányka' (18N) és a 'Piros gránát' (21Rg) esetében a PCR termék emésztése 329, 248 és 213 bp méretű fragmentumokat eredményezett, ami jelezte, hogy heterozigóta formában hordozzák a *Gret-1* retrotranszpozont tartalmazó *VvMybA1a* allélt. A 'Hamuszőlő' (14G) és a 'Szeredi' (24Rg) esetében a fehér bogyójú fajtákra jellemző 329 és 213 bp hosszúságú DNS szakaszokat kaptunk, azaz nem rendelkeznek funkcióképes *VvMybA1c* alléllal.



19. ábra: 20D18CB9 markerrel végzett PCR termék *DdeI* emésztése.

M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus)

13N. ‘Gorombaszőlő’, 14G. ‘Hamuszőlő’, 15N. ‘Kéklő piros’, 16B. ‘Kőporos’, 17B. ‘Lányszőlő’, 18N. ‘Fekete leányka’, 19Rg. ‘Rózsás leányka’, 20B. ‘Mátrai muskotály’, 21Rg. ‘Piros gránát’, 22B. ‘Polyhos’, 23B. ‘Somszőlő’, 24Rg. ‘Szeredi’, 25B. ‘Tökszőlő’

A 118 kárpát-medencei fajta vizsgálati eredményeit tartalmazó összes gélfotó bemutatásától eltekintek, de az 7. táblázat összefoglalva tartalmazza a fajták *VvMybA1* génre vonatkozó allél polimorfizmusát. A 118 kárpát-medencei fajtából 78 *VvMybA1a/a* genotípusú, tehát mindkét allélján kimutatható a *Gret-1* inszerció, amely végül is a fehér fenotípus kialakulását eredményezi. Ez a 78 fajta tartalmazza azt a 4 fajtát is (‘Gohér piros’, ‘Rózsás leányka’, ‘Szeredi’, ‘Hamuszőlő’), amelyek színes bogyóval rendelkeznek ugyan, de ezt egyik általunk használt *VvMybA1* marker rendszerrel nem sikerült kimutatni.

A fajták közül 33 *VvMybA1a/c* allél kombinációt sikerült meghatározni, tehát egyik allélja funkcióképtelen a *Gret-1* inszerció miatt, míg másik allélja a vad típusú funkcióképes allélt hordozza. 3 fajta (‘Ködös’, ‘Kék tihanyi’, ‘Tótika’) esetében a *VvMybA1c* *Gret-1* inszerció nélküli vad típusú allélt sikerült kimutatni homozigóta formában. Végül 4 fajta esetében (‘Furmint piros’, ‘Kéknyelű piros’, ‘Lisztes piros’, ‘Muskotály piros’) a *VvMybA1a/b* genotípust különítettünk el, vagyis az egyik allélja hordozza a *Gret-1* retrotranszpozont, a másik allélja viszont a *Gret-1* kivágódását követően visszamaradt 3’LTR szekvenciájára utaló ‘b’ allélt sikerült kimutatni, amely a ‘c’ allélhoz hasonlóan szintén egy funkcióképes színes fenotípust eredményező allél.

A fajták jelentős része a bogyószínének megfelelő *VvMybA1* allél összetételt tartalmazza, de a ‘Gohér piros’ (Rg), a ‘Hamuszőlő’ (G), a ‘Rózsás leányka’ (Rg) és a ‘Szeredi’ (Rg) esetében nem sikerült piros allélra specifikus fragmentumot kimutatni (7. táblázat). Ez az eredmény arra utalhat, hogy a *VvMybA* transzkripciós faktor egy másik génje, vagy egy másik funkcióképes allélja alakítja ki a bogyószínt a fentebb említett 4 fajtában.

7. táblázat: A kárpát-medencei fajták *VvMybA1* allélösszetételének meghatározása.

Bogyószínűk rövidítései: N (noir)- fekete, B (blanc)- fehér, Rs (rose)- rózsaszín, Rg (rouge)- piros, G (gris)- szürke

	Fajták neve	Bogyószínű	<i>VvMybA1a</i>	<i>VvMybA1b</i>	<i>VvMybA1c</i>
1.	Ágasfark	N	x		x
2.	Alanttermő	B	x		
3.	Aprófehér	B	x		
4.	Bajor feketefájú	N	x		x
5.	Bajor kék	N	x		x
6.	Bajor szürke	G	x		x
7.	Bakarka	B	x		
8.	Bakator kék	N	x		x
9.	Bakator piros	Rg	x		x
10.	Bakator tündőszínű	Rs	x		x
11.	Bakszem	N	x		x
12.	Balafánt	B	x		
13.	Balafánt fekete	N	x		x
14.	Bálint	B	x		
15.	Bánáti rizling	B	x		
16.	Barátcsuha kék	N	x		x
17.	Barátcsuha szürke	G	x		x
18.	Beregi	Rg	x		x
19.	Betyárszőlő	B	x		
20.	Bihari	B	x		
21.	Bogdányi dinka	Rg	x		x
22.	Bőségszaru	B	x		
23.	Budai	B	x		
24.	Cudarszőlő	B	x		
25.	Cukorszőlő	B	x		
26.	Czeiger	B	x		
27.	Csókaszőlő	N	x		x
28.	Csomorika	B	x		
29.	Demjén	B	x		
30.	Detki	B	x		
31.	Dinka pécsi	N	x		
32.	Dinka rakszemű	Rg	x		x
33.	Dinka ürömi	B	x		
34.	Dinka vörös	Rg	x		x
35.	Dinka zöld	B	x		
36.	Erdei	B	x		
37.	Ezerjő	B	x		
38.	Fodroslevelű	B	x		
39.	Furmint	B	x		
40.	Furmint piros	Rg	x	x	
41.	Furmint változó	B	x		
42.	Füger	B	x		
43.	Fügeszőlő	B	x		
44.	Fürjmoly	B	x		
45.	Gergely	B	x		
46.	Gohér fehér	B	x		
47.	Gohér piros	Rg	x		
48.	Gohér változó	B	x		
49.	Gorombaszőlő	N	x		x
50.	Halápi	N	x		x

	Fajták neve	Bogyószín	VvMybA1a	VvMybA1b	VvMybA1c
51.	Hamuszőlő	G	x		
52.	Hárslevelű	B	x		
53.	Hosszúnyelű	B	x		
54.	Izsáki	B	x		
55.	Járdovány fehér	B	x		
56.	Járdovány fekete	N	x		x
57.	Juhfark	B	x		
58.	Kadarka kék	N			x
59.	Kéklő piros	N	x		x
60.	Kéknyelű	B	x		
61.	Kéknyelű piros	Rg	x	x	
62.	Királyleányka	B	x		
63.	Királyszőlő	B	x		
64.	Kolontár	B	x		
65.	Kovácsi	B	x		
66.	Kovácskréger	B	x		
67.	Kozma	B	x		
68.	Ködös	N			x
69.	Kóporos	B	x		
70.	Kövérszőlő	B	x		
71.	Kövidinka	Rg	x		x
72.	Kövidinka fehér	B	x		
73.	Kübeli	B	x		
74.	Lágylevelű	B	x		
75.	Lányszőlő	B	x		
76.	Leányka	B	x		
77.	Leányka fekete	N	x		x
78.	Leányka rózsás	Rg	x		
79.	Lisztes fehér	B	x		
80.	Lisztes piros	Rg	x	x	
81.	Magyarka	B	x		
82.	Mézes fehér	B	x		
83.	Mézes fekete	N	x		x
84.	Muskotály csíkos	B	x		
85.	Muskotály fekete	N	x		x
86.	Muskotály piros	Rg	x	x	
87.	Muskotály sárga	B	x		
88.	Mustos	B	x		
89.	Papsapka	B	x		
90.	Pécsi szagos	B	x		
91.	Pettyesszőlő	Rs	x		x
92.	Pintes	Rs	x		x
93.	Piros gránát	Rg			x
94.	Piros szlanka	Rg	x		x
95.	Piros tökök	Rg	x		x
96.	Polyhos	B	x		
97.	Pozsonyi	B	x		
98.	Purcsin	N	x		x
99.	Rakszőlő	B	x		
100.	Rohadó	B	x		
101.	Rókafarkú	B	x		
102.	Rózsaszőlő	Rs	x		x
103.	Sárfehér	B	x		
104.	Sárpiros	Rs	x		x
105.	Somszőlő	B	x		
106.	Szagos bajnár	B	x		

	Fajták neve	Bogyószín	VvMybA1a	VvMybA1b	VvMybA1c
107.	Szekszárdi	Rg	x		x
108.	Szeredi	Rg	x		
109.	Szerémi	B	x		
110.	Szőkeszőlő	B	x		
111.	Tihanyi	B	x		
112.	Tihanyi kék	N			x
113.	Tótika	N			x
114.	Tökszőlő	B	x		
115.	Tulipiros	Rg	x		x
116.	Tükörszőlő	B	x		
117.	Tüskéspupú	B	x		
118.	Vékonyhéjú	B	x		

## 4.2 Szőlő rügymutánsok elkülönítése SNP polimorfizmus alapján

A több évezredes múltra visszatekintő szőlőkultúrát rendkívüli fajtagazdagság jellemzi. A szőlő génforrások megőrzésének és használatának, valamint a nemesítésben való felhasználásának elengedhetetlen feltétele a genotípusok pontos jellemzése, a homonímák és szinonímák kiszűrése. A termesztett fajtákban vannak olyan morfológiailag hasonló, a bogyó színében eltérő változatok, amelyeknek hasonló az elnevezésük.

ZHUKOVSKY (1950) vezette be a '*conculta*' fogalmát a szőlőfajták egyes színvariánsainak csoportosításához. Zhukovsky munkája alapján Németh Márton ampelográfus a magyarországi szőlőfajták morfológiai jellemzőihez illesztette a *conculta* fogalmát (NÉMETH 1966, 1967). Egy fajtacsoporton (*conculta*, bogyószínűvariáns) belül kék, szürke, fekete, piros, rózsaszín és fehér bogyójú fajták találhatóak, amelyek rügymutációval alakultak ki a kék alapfajtából. Németh Márton a Kárpát-medencében található fajtákat *conculta*-ba sorolta, amelyek azonban nem csak a bogyó színében térnek el egymástól, hanem egyéb morfológiai tulajdonságban is eltérést mutathatnak, mint például az őszi lombszínéződésben, a vitorla színében és szőrözöttségében is.

Korábbi munkákban vizsgálták már és próbálták elkülöníteni az egyes fajtacsoportokba tartozó szőlő fajtákat SSR és a *VvMybA1* transzkripciós faktor polimorfizmusa alapján (SZŐKE et al. 2012, BODOR & SZŐKE et al. 2014). Ezek közül azonban nem minden *conculta*-ba tartozó fajtát sikerült elkülöníteni egymástól.

Az elkülönítés érdekében kezdtük meg a fajták SNP alapú vizsgálatát, amelyet a *VvMybA2* transzkripciós faktort kódoló gén mutációja alapján határoztunk meg. A *VvMybA2* transzkripciós faktor génjének kódoló szekvenciában két olyan pontmutációt azonosítottak, amelyek a *VvMybA1* génhez hasonlóan a szőlőbogyó fehér/zöld színének kialakulását eredményezik (WALKER et al. 2007, CARRASCO et al. 2015). Mindkét pozícióban a vad típusú G (guanin) bázis T (timin)-re cserélődött a mutáció miatt, ami cisztein-glicin aminosav-cserét idézett elő. Ebben az esetben a kialakult nukleotid polimorfizmus (SNP) eredményeként a képződő fehérje  $\alpha$ -helix szerkezet változásának következtében a funkcióképtelen gén miatt nincs antocián bioszintézis (WALKER et al. 2007, CARRASCO et al. 2015).

FELLER és munkatársai (2011) szerint a cisztein aminosav az  $\alpha$ -helix szerkezetben fontos szerepet tölt be a DNS-hez való kötődésben vagy más fehérjékkel való összekapcsolódásában.



Az említett két pontmutáció (rövidítve: K980, C22) vizsgálatával több szőlőfajta SNP polimorfizmusát sikerült meghatározni, köztük kárpát-medencei rügymutánsok és egyéb európai fajtákét. Eredményeinket az 8. táblázat foglalja össze, amely a vizsgált fajták *VvMybA2* génre vonatkozó SNP polimorfizmusa mellett a *VvMybA1* gén allélösszetételét (*VvMybA1a*, *VvMybA1b*, *VvMybA1c*) is tartalmazza, amellyel korábbi munkákban már sikerült elkülöníteni rügymutánsokat: ‘Bajor’ kéket a szürkétől és feketefájútól, a ‘Furmint’ pirosat a fehértől és változótól, és a ‘Lisztes’ pirosat a fehértől (BODOR & SZŐKE et al. 2014).

Vizsgálatainkban referenciaként 3 fajtát alkalmaztunk: ‘Barbera’ (nincs *Gret-1* inszerció), ‘Pinot noir’ (heterozigóta a *Gret-1*-re) és ‘Chardonnay’ (homozigóta a *Gret-1*-re). A vizsgált 43 fajta közül mindössze 2 nem tartalmazta a *Gret-1* inszerciót: ‘Barbera’ és a ‘Szultán fekete’, és 4 fajta esetében volt megállapítható a *VvMybA1b* allél (*Gret-1* 3’LTR szekvenciája) jelenléte: ‘Furmint piros’, ‘Muskotály piros’ (BODOR & SZŐKE et al. 2014), és a ‘Kéknyelű piros’ és ‘Lisztes piros’ esetében.

A *VvMybA1* gén polimorfizmusa alapján különbség mutatható ki a következő fajtacsoportok között: ‘Bajor’, ‘Furmint’, ‘Muskotály’ (BODOR & SZŐKE et al. 2014), ‘Kéknyelű’, ‘Lisztes’, ‘Szultán’ és ‘Huszajne’. A ‘Kéknyelű’ homozigóta a *Gret-1*-re, vagyis *VvMybA1a* allélokot hordozza, míg a ‘Kéknyelű piros’ a *VvMybA1a* és *VvMybA1b* allélokkal rendelkezik, tehát egyik alléljában kimutatható a retrotranszpozon inszerció, míg a másik alléljából kivágódott, és a visszamaradt 3’LTR szekvencia mutatható ki. A ‘Lisztes fehér’ és ‘Lisztes piros’ esetében BODOR & SZŐKE és munkatársai (2014) megállapították a *Gret-1* inszerció jelenlétét, további vizsgálataink azonban kimutatták a ‘Lisztes piros’ által hordozott 3’LTR szekvenciát, tehát heterozigóta, amely a funkcióképes allél működése miatt antocián jelenléte figyelhető meg a bogyó héjában. A 3’LTR szakasz jelenléte pedig bizonyítja, hogy a ‘Lisztes’ piros bogyójú változata a fehérből alakult ki. A ‘Huszajne belűj’ és a ‘Huszajne krasznűj’ fajták között is sikerült különbséget tenni a *VvMybA1* gén polimorfizmusa alapján.

A fehér bogyóval rendelkező ‘Huszajne belűj’ homozigóta a *Gret-1*-re, míg a színes bogyószínnel rendelkező ‘Huszajne krasznűj’ heterozigóta, és a *VvMybA1a*- és ‘c’ allélt hordozza. A ‘Szultán fekete’ és ‘Szultán fehér’ esetében a ‘Szultán fehér’ homozigóta a *Gret-1*-re, a ‘Szultán fekete’ pedig homozigóta a vad típusú *VvMybA1c* allélra. A ‘Bajor’, a ‘Furmint’ és a ‘Muskotály’-ok esetében szintén sikerült egy korábbi munkában polimorfizmust kimutatni a *VvMybA1* gén alapján (BODOR & SZŐKE et al. 2014).

A 'Bajor kék' esetében a *VvMybA1c* allél jelenléte mellett a *VvMybA1a* allél megléte is bizonyítható volt. Eredményeink szerint tehát a 'Bajor' csoportba tartozó fajtákat sem lehet elkülöníteni a *VvMybA1* polimorfizmusa alapján.

A fajtacsoportok, amelyek esetében nem különíthetők el a fajták a *VvMybA1* gén polimorfizmusa alapján: 'Bajor', 'Bakator', 'Barátság', 'Csiljaki', 'Gohér', 'Korinthusi', 'Oportó' és a 'Piquepoul'. Valamennyi fajta ezek közül, a *VvMybA1a* és 'c' allélokot hordozza ('Bajor'-ok, 'Bakator'-ok, 'Barátság', 'Korinthusi'-ak, 'Oportó'-k és a 'Piquepoul'-ok). A 'Csiljaki belül' fehér bogyószínnel rendelkezik, és homozigóta formában hordozza a *Gret-1*-et, míg a 'Csiljaki krasznűj', amelynek színes a bogyószíne, szintén csak a *VvMybA1a* allélt tartalmazza.

A 'Gohér piros', 'Gohér fehér' és a 'Gohér változó' esetében, amelyet ugyan korábbi munkában már vizsgáltak és kimutatták mind a három esetben a *VvMybA1a* allél homozigóta formában való jelenlétét (BODOR & SZÓKE et al. 2014), mi magunk is érdekesnek találtunk és ismétléseinkkel igazoltuk is ugyanezt az eredményt. A 'Gohér piros' esetében igen különös, hogy annak ellenére, hogy színes bogyóval rendelkezik, az ezt igazoló genetikai hátteret *VvMybA1* gén polimorfizmusával nem sikerült igazolni. Emellett a vizsgált fajtacsoportok esetében több esetben sem sikerült elkülöníteni a színes bogyójú fajtákat egymástól. Ez áll fenn a 'Bajor kék', 'Bajor szürke', 'Bajor feketefájú' a 'Barátság kék' és 'Barátság szürke' és a 'Bakator tündőszínű' és 'Bakator piros' esetében is.

Vizsgálatunkba bevontunk még néhány olyan fajtát is, amelyek ugyan színes bogyóval rendelkeznek, de hasonlóan a fajtacsoportokban is kimutatható eredményekhez, ezt molekulárisan nem tudtuk bizonyítani a *VvMybA1* gén valamely funkcióképes alléljával. A 'Szeredi', amely piros bogyóval rendelkezik, homozigóta formában mutattuk ki a *Gret-1* jelenlétét, hasonlóan a 'Rózsás leányka' esetében, ahol szintén piros bogyószínű fajtáról van szó, azonban funkcióképes allél jelenlétét itt sem sikerült kimutatni.

Annak érdekében, hogy a fajták bogyószíneinek molekuláris hátterét megállapíthassuk, esetleg a színvariánsikat elkülöníthessük egymástól, a *VvMybA1* gén vizsgálatán kívül a *VvMybA2* gén SNP polimorfizmusát is jellemeztük. Mivel a bogyószín variációja a legtöbb vizsgált esetben a *VvMybA1* és *VvMybA2* gén polimorfizmusához köthető, feltételeztük, hogy azoknál a fajtáknál melyek színes bogyóval rendelkeznek, de a *VvMybA1* gén polimorfizmusa alapján ezt nem tudjuk alátámasztani, a megoldást a *VvMybA2* gén SNP vizsgálata adhat választ.

Így a kárpát-medencei rügymutánsok, más fajtacsoportok és néhány fajta esetében, összesen 43 fajta SNP szekvenálását végeztük el SNaPshot™ módszer segítségével (8. táblázat), amely alkalmas arra, hogy heterozigóta és homozigóta allélokat is megkülönböztessük egy reakció alatt.

Vizsgálatainkat WALKER és munkatársai (2007) által meghatározott pontmutáció (*VvMybA2R44* vagy K980) és CARRASCO és munkatársai (2015) vizsgálataiban azonosított SNP (*VvMybA2C22*, rövidítve C22) alapján végeztük el. Referenciaként ebben az esetben is a ‘Barbera’, ‘Chardonnay’ és ‘Pinot noir’ fajtákat használtuk.

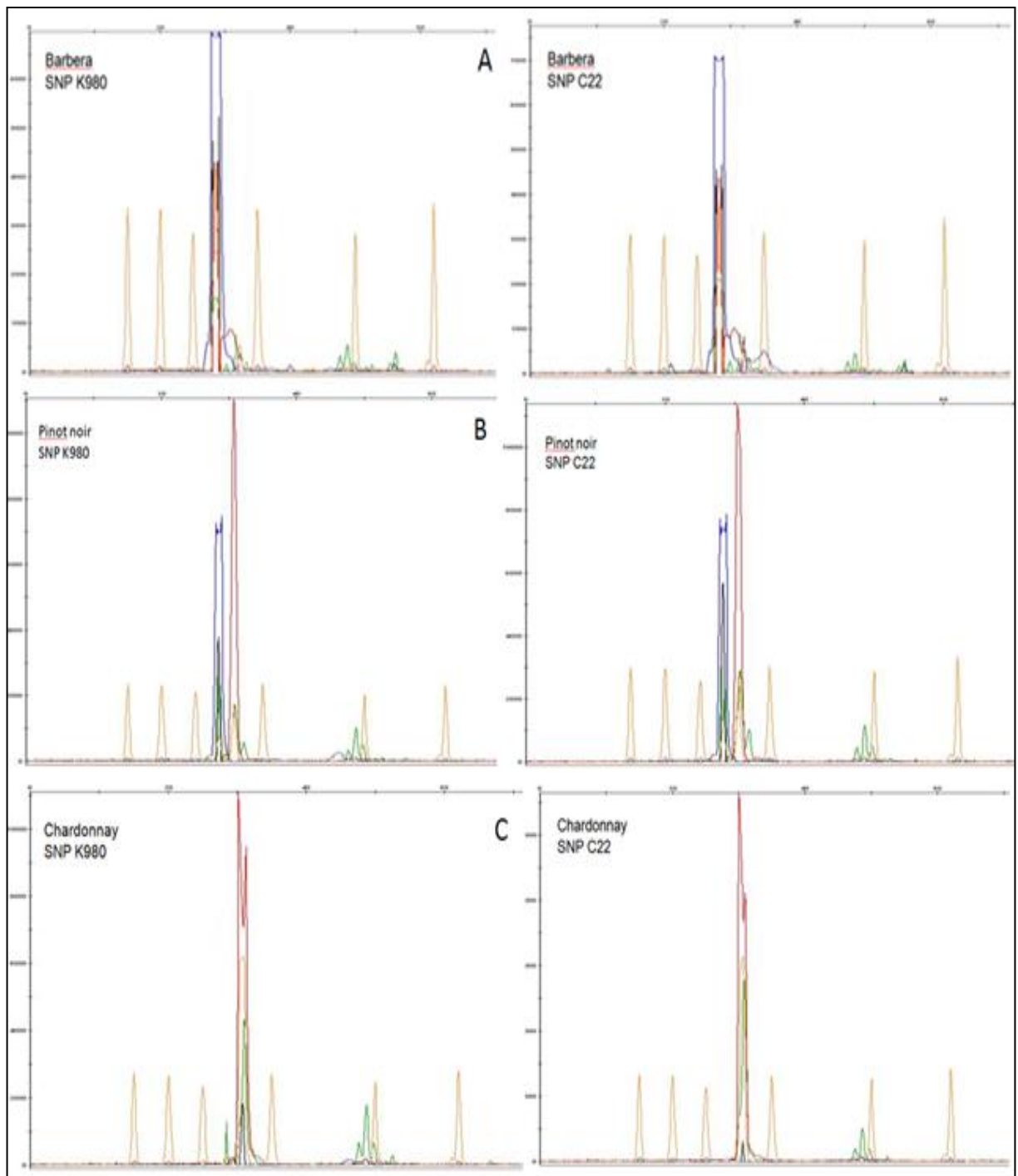
A ‘Barbera’, amely a *VvMybA1c*, vagyis az ősi vad típusú allélt homozigóta formában hordozza, a vizsgált SNP helyeken sem tartalmaz változást, mindkét SNP-t vizsgálva (K980, C22) a vad típusú G (guanin) allél van jelen, tehát nem történt pontmutáció (20. A ábra). A ‘Barbera’ az egyetlen olyan általunk vizsgált fajta, amely mindkét gén tekintetében az ősi vad típusú funkcióképes allélokat hordozza homozigóta formában.

A ‘Pinot noir’ sötét színe ellenére egyik alléljában benne van a *Gret-1*, míg a másik a vad típusú ‘c’ allél, tehát heterozigóta a *VvMybA1* génre. A *VvMybA2* gén vizsgálatánál megállapítottuk, hogy mindkét pontmutációt heterozigóta formában hordozza, tehát funkcióképes allélok a *VvMybA2* gén esetén is előfordulnak (20. B ábra).

A ‘Chardonnay’ homozigóta a *Gret-1*-re, és a vizsgált két pontmutáció esetében T allélt mutattunk ki, tehát guanin helyett timin kicserélődés következett be homozigóta formában (20. C ábra). Ez azt jelenti, hogy egyik gén egyik allélján sincs működőképes allélváltozat, ami így az antocián bioszintézis teljes blokkolását idézte elő.

A ‘Bajor’ fajtacsoporton belül a ‘Bajor szürke’ és ‘Bajor feketefájú’ esetében az SNP szekvenálás kimutatta, hogy mindkét vizsgált pontmutációra homozigóta, vagyis a mutáns T allélt tartalmazza, így bizonyítottuk, hogy a szín kialakításáért a *VvMybA1* gén polimorfizmusa a felelős. A ‘Bajor kék’ fajta a K980 allélra heterozigóta (T/G), így rendelkezik egy funkcióképes alléllal, míg a C22-es pozícióban homozigóta mutáns allél jelenlétét sikerült kimutatni (T/T). Amellett, hogy meghatároztuk a *VvMybA1a* allél jelenlétét a ‘Bajor kék’ fajtában, sikerült a K980 SNP pozícióban eltérő allélkombinációt kimutatnunk, amivel így elkülönítettük a ‘Bajor szürké’-től és a ‘Bajor feketefájú’-tól.

A ‘Bakator’ fajtacsoportba tartozó színes bogyószínnel rendelkező fajták közül a ‘Bakator tüdőszínű’ és a ‘Bakator piros’ mind a két SNP pozícióban a T allélt hordozza homozigóta formában, így működőképes allélok nincsenek jelen. A két színváltozatot tehát a *VvMybA1* és a *VvMybA2* monomorfizmusa miatt nem tudtuk elkülöníteni.



20. ábra: A három referencia fajta ('Barbera', 'Pinot noir', 'Chardonnay') SNP szekvenálásának kromatogramjai a vizsgált két SNP pozícióban (K980, C22). A: 'Barbera' kromatogramja a K980 (G/G) és a C22 (G/G) SNP pozíciójában. B: 'Pinot noir' kromatogramja a K980 (T/G) és a C22 (T/G) SNP pozíciójában. C: 'Chardonnay' kromatogramja a K980 (T/T) és a C22 (T/T) SNP pozíciójában.

A 'Barátságúha szürke' és a 'Barátságúka kék' heterozigóta allélokot hordoz mindkét SNP pozícióban (T/G), így a funkcióképes *VvMybA1c* mellett, funkcióképes *VvMybA2* allélokot is hordoznak. Ebben az esetben nem sikerült azonban SNP alapján különbséget kimutatnunk a két fajta között.

A 'Csiljaki belűj' és a 'Csiljaki krasznűj' homozigóta a *VvMybA1a* allélra, amely a 'Csiljaki belűj' esetében nem meglepő a fehér bogyószíne miatt, viszont a 'Csiljaki krasznűj' piros bogyószíne ellenére sem lehetett kimutatni funkcióképes *VvMybA1* allélt. Az SNP szekvenálással azonban nemcsak azt sikerült kiderítenünk, hogy a 'Csiljaki krasznűj' rendelkezik funkcióképes alléllal, de ezáltal sikerült molekulárisan el is különíteni a két fajtát egymástól. A 'Csiljaki belűj' homozigóta formában hordozza a T allélt, míg a 'Csiljaki krasznűj' heterozigóta mindkét SNP pozícióban (T/G).

A 'Furmint' színvariánsai között nem sikerült különbséget tennünk SNP elemzés alapján, viszont kiderítettük, hogy mind a három fajta esetében ('Furmint fehér', 'Furmint piros', 'Furmint változó') homozigóta T/T mutáns allél van jelen. A *VvMybA1* polimorfizmusa alapján korábban már bizonyították, hogy a piros változat a fehérből alakult ki a *Gret-1* deléciójával (BODOR & SZŐKE et al. 2014).

A 'Gohér fehér', a 'Gohér piros' és a 'Gohér változó' fajtákat a *VvMybA1* gén polimorfizmusa alapján nem lehetett megkülönböztetni, a 'Gohér piros' is homozigóta a *Gret-1* inszercióra (BODOR & SZŐKE et al. 2014). A *VvMybA2* régiókat szekvenálva azonban kiderült, hogy a 'Gohér fehér' és a 'Gohér változó' homozigóta T allélt hordoz mindkét SNP pozícióban (T/T), vagyis működőképes allélja sem a *VvMybA1*-, sem a *VvMybA2* gén esetében nincs. A 'Gohér piros', azonban mind a két pontmutációra heterozigóta (T/G), vagyis funkcióképes alléljai miatt mégis megjelenhet antocián a bogyóhéjában, ezáltal színes bogyó kialakítását teszi lehetővé.

A 'Huszajne belűj' fehér bogyójú fajta *VvMybA1a* allélt homozigóta formában tartalmazza, míg a 'Huszajne krasznűj' piros bogyószínű fajta heterozigóta a *Gret-1*-re, így a *VvMybA1a* allél mellett a *VvMybA1c* allélt is tartalmazza. A két vizsgált SNP-re nézve a 'Huszajne belűj' homozigóta T allél jelenlétét mutattuk ki, míg a 'Huszajne krasznűj' a T/G, T/G allélkombinációt hordozza.

A 'Kéknyelű' és a belőle rügmütációval kialakult 'Kéknyelű piros' fajták elkülönítése a *VvMybA1* gént vizsgálva is sikeres volt. A 'Kéknyelű' fehér fajta mindkét allélján hordozza a *Gret-1* inszerciót, míg a 'Kéknyelű' tőkén felfedezett színes bogyójú 'Kéknyelű piros' egyik alléljából kivágódott a *Gret-1* retrotranszpozon, visszahagyva 3' LTR szekvenciáját, vagyis *VvMybA1a* és *VvMybA1b* allélkombinációval rendelkezik.

A 'Kéknyelű' SNP vizsgálata kimutatta, hogy homozigóta T/T allélokat hordoz mindkét pontmutációban. Sajnos a 'Kéknyelű piros' esetében nem tudtuk meghatározni az SNP polimorfizmust, amelyet a 8. táblázatban 'nd' rövidítéssel jelöltünk.

A 'Korinthusi fekete' és 'Korinthusi piros' fajták heterozigóták a *VvMybA1*-re (*VvMybA1a/VvMybA1c*), így nem tudtuk elkülöníteni a két színes változatot. Az SNP szekvenálási eredményeink azonban bizonyították a két fajta közötti genetikai különbséget a bogyószínre nézve. Míg a 'Korinthusi fekete' T/T allélokat hordoz, addig a 'Korinthusi piros' a K980 pozícióban T/G genotípusú, tehát funkcióképes allélt is hordoz, viszont a C22 pozícióban T/T allélok vannak jelen homozigóta formában.

A 'Leányka' és a 'Fekete leányka' a *VvMybA1* allél polimorfizmusa alapján elkülöníthető, viszont a 'Rózsás leányka' a 'Leányka'-tól nem, hiszen mindkét fajta homozigóta a *Gret-1*-re. A 'Fekete leányka' a *VvMybA1a* és *VvMybA1c* allélkombinációval rendelkezik. Azonban SNP polimorfizmus alapján a 'Leányka' homozigóta a T mutáns allélra mindkét pozícióban, a 'Fekete leányka' és a 'Rózsás leányka' viszont T/G allélokat hordoz a K980 és C22 pontján is.

A 'Lisztes piros' és 'Lisztes fehér' esetében az SNP szekvenálás nem mutatott ki különbséget, mindkét fajta esetében T/T homozigóta allélok figyelhetők meg, így különbség közöttük csak a *VvMybA1* allél tekintetében van, vagyis, hogy a 'Lisztes piros' egyik allélján a *Gret-1*-et, másikon pedig a 3' LTR szekvenciát hordozza.

A 'Muskotály' fajtacsoportban mind a négy fajta homozigóta formában hordozza a T allélt, vagyis különbség közöttük csak a *VvMybA1* allél polimorfizmusa alapján van.

Az 'Oportó kék' és 'Oportó szürke' fajták között sem a *VvMybA1* gén allél polimorfizmusa-, sem pedig SNP szekvenálással nem tudunk különbséget kimutatni. Mindkét fajta esetében a *VvMybA1a/VvMybA1c* és T/G allélkombináció van jelen. A szürke/bronz színű fajták periklinális kimérák, így a két fajta genetikai elkülönítésére a bogyó L1 és L2 rétegének *VvMybA1* allélösszetétel meghatározása jelenthet megoldást (VEZZULI et al. 2012, MIGLIARO et al. 2014).

A 'Piquepoul gris' és a 'Piquepoul noir' egyaránt *VvMybA1c* és *VvMybA1a* allélokkal rendelkeznek. A 'Piquepoul gris' azonban mindkét SNP pozícióban homozigóta T allélt hordoz, míg a 'Piquepoul noir' T/G kombinációval rendelkezik, így ebben az esetben is sikerült különbséget tenni SNP polimorfizmus alapján. Az 'Oportó' consültával ellentétben itt a feltételezhetően szintén periklinális kiméra szürke változatot sikerült elkülöníteni *VvMybA2* mutációja alapján.

8. táblázat: *VvMybA2* és *VvMybA1* allél polimorfizmusa a vizsgált fajtákban

A bogyószín rövidítései: N (noir)- fekete, B (blanc)- fehér, Rs (rose)- rózsaszín, Rg (rouge)- piros, G (gris)- szürke; x: a megfelelő allélok jelenléte; +: már publikált adatok (BODOR & SZŐKE et al. 2014); nd: nincs eredmény (not detected)

Fajták	Bogyószín	<i>VvMybA2</i>						<i>VvMybA1</i>		
		K980			C22			<i>VvMybA1a</i> ( <i>Gret-1</i> )	<i>VvMybA1c</i> (nincs <i>Gret-1</i> )	<i>VvMybA1b</i> (3' LTR)
		T/T	G/G	T/G	T/T	G/G	T/G			
Barbera	N		x			x			x	
Chardonnay	B	x			x			x		
Pinot noir	N			x			x	+	+	
Bajor szürke	G	x			x			+	+	
Bajor kék	N			x	x			x	+	
Bajor feketefájú	N	x			x			+	+	
Bakator tüdősínű	Rs	x			x			+	+	
Bakator piros	Rg	x			x			+	+	
Bakator kék	N			x			x	x	x	
Barátcsuha szürke	G			x			x	x	x	
Barátcsuha kék	N			x			x	x	x	
Csiljaki belűj	B	x			x			x		
Csiljaki krasznűj	Rg			x			x	x		
Furmint fehér	B	x			x			+		
Furmint piros	Rg	x			x			+		+
Furmint változó	B	x			x			x		
Gohér fehér	B	x			x			+		
Gohér piros	Rg			x			x	+		
Gohér változó	B	x			x			+		
Huszajne belűj	B	x			x			x		
Huszajne krasznűj	Rg			x			x	x	x	
Kéknyelű	B	x			x			x		
Kéknyelű piros	Rg	nd	nd	nd	nd	nd	nd	x		x
Korinthusi fekete	N	x			x			x	x	
Korinthusi piros	Rg			x	x			x	x	
Leányka	B	x			x			x		
Leányka fekete	N			x			x	x	x	
Leányka rózsás	Rg			x			x	x		
Lisztés fehér	B	x			x			+		
Lisztés piros	Rg	x			x			+		x
Muskotály csíkos	B	x			x			x		
Muskotály fekete	N	x			x			x	x	
Muskotály piros	Rg	x			x			x		+
Muskotály sárga	B	x			x			x		
Oportó kék	N			x			x	x	x	
Oportó szürke	G			x			x	x	x	
Piquepoul gris	G	x			x			x	x	
Piquepoul noir	N			x			x	x	x	
Szilváni piros	Rg	nd	nd	nd	nd	nd	nd	x	x	
Szilváni zöld	B	x			x			x		
Szeredi	Rg	x			x			x		
Szultán fehér	B	x			x			x		
Szultán fekete	N	nd	nd	nd	nd	nd	nd		x	

A 'Szilváni piros' és a 'Szilváni zöld' esetében a fajták elkülönítése *VvMybA1* gén polimorfizmusa alapján is sikeres volt. A 'Szilváni piros' a *VvMybA1a* és a *VvMybA1c* allélokat hordozza, a 'Szilváni zöld' pedig homozigóta a *Gret-1*-re. Az SNP szekvenálás viszont csak a 'Szilváni zöld' esetében volt sikeres, és homozigóta T/T allélok jelenlétét mutattuk ki mindkét pontmutáció helyén.

A *VvMybA1* génre vizsgált kárpát-medencei fajták közül még érdekes eredményt mutatott a 'Szeredi', amely ugyan piros bogyójú, ezt molekulárisan mégsem tudtuk bizonyítani. Így az SNP szekvenálást ennél a fajtánál is elvégeztük, de a várt eredménnyel szemben funkcióképes allél jelenlétét nem sikerült kimutatni, így jelenleg nem ismerjük a piros bogyószín molekuláris hátterét.

Összefoglalva az SNP szekvenálási eredményeket megállapítható, hogy 25 fajta homozigóta a *VvMybA2* gén *K980* pozíciójában (24 T/T, 1 G/G), és 14 fajta heterozigóta (G/T). A *C22* polimorfizmusát vizsgálva 27 homozigóta (26 T/T, 1 G/G), és 12 heterozigóta (G/T) fajtát mutattunk ki.

SNP polimorfizmus alapján sikeresen elkülönítettük a következő fajtákat: 'Bajor kék'-et a szürkeétől és feketefájútól, 'Csiljaki krasznűj'-t a belűj-től, a 'Gohér piros'-at a fehértől és a változótól. Ezen kívül sikeresen elkülönítettük a 'Korinthusi piros-fekete', 'Piquepoul noir-gris' és a 'Huszajne krasznűj'-belűj' (*VvMybA1* alapján is) fajtákat is. Funkcióképes allél jelenlétét mutattuk ki a 'Rózsás leányka', a 'Gohér piros' és a 'Csiljaki krasznűj' fajták esetében. A 'Bakator kék'- amely már korábbi SSR elemzések alapján sem bogyószín-variánsa a 'Bakator piros' és tündőszínű fajtáknak (HALÁSZ et al. 2005, GALBÁCS et al. 2009)- mindkét SNP pozícióban T/G genotípusúnak bizonyult.



### 4.3 *Vitis* fajok filogenetikai vizsgálata

A termesztett szőlő (*Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera*) mellett, hogy az egyik legrégebbi és legfontosabb kultúrnövényünk, nagy gazdasági jelentőséggel is rendelkezik. Az Észak-Amerikában és Ázsiában őshonos *Vitis* fajok értékes forrásai lehetnek az abiotikus és biotikus stressz rezisztencia nemesítésnek (WAN et al. 2007, 2008). Annak ellenére, hogy peronoszpóra, lisztharmat és filoxéra ellenállóságuk miatt egyre nagyobb figyelmet fordítanak rájuk a nemesítési és a géntérképezési programokban, a *Vitis* fajok evolúciója még nincs teljesen tisztázva.

A nemzetség filogenetikai kutatásainak eredményei sokszor ellentmondásosak és a belőlük levont következtetések megkérdőjelezhetőek. Az eddig alkalmazott sejtmagi és kloroplasztisz markerekkel kapott eredmények gyakran szorosabb rokonsági kapcsolatokat jeleznek a fajok között, aminek következtében nem lehet éles határvonalat húzni az amerikai és ázsiai fajok között. Jelenleg a fajok száma sem ismert pontosan, mivel egyre több fajról állapítják meg, hogy nem önálló fajról, hanem fajhibridről van szó, amelyek elkülönítésére nagy áteresztőképességű rutin szekvenálási módszerek szükségesek.

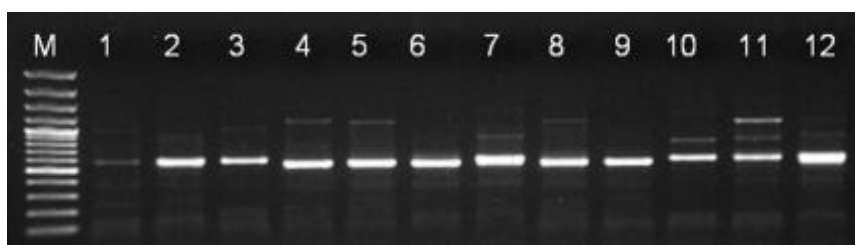
A fajok pontos száma bizonytalan, aminek legfőbb oka a fajok közötti hibridizáció és a fajon belüli klonális variabilitásból adódó szinonimitás (COMEAX et al. 1987). GALET (1988) elsősorban morfológiai bélyegek és elterjedési területük alapján a *Vitis* alnemzetség 11 sorozatába 59 fajt sorolt. Több vizsgálat is alátámasztotta, hogy a nagy morfológiai eltérések ellenére az alnemzetségbe sorolt fajok között szoros genetikai kapcsolat van (MULLINS et al. 1992). A molekuláris genetikai munkákban a sejtmagi és a kloroplasztisz szekvenciák kismértékű polimorfizmusa miatt az észak-amerikai és ázsiai fajokat nem tudták egyértelműen elkülöníteni egymástól (INGROUILLE et al. 2002, PÉLSEY 2007, PÉROS et al. 2011).

Az észak-amerikai és ázsiai szőlő fajok többségének bogyója fekete vagy sötétkék színű, ami az antocián bioszintézist szabályozó *Myb* transzkripció faktor génnek nagyfokú konzerváltságára utalhat. Ennek ellenére a *VvMybA1* gén kódoló és nem kódoló régiójában 31, különböző méretű inszerciót/deléción mutatott ki (PÉROS et al. 2015). A mutációk alapján szerkesztett filogenetikai fa alapján az észak-amerikai és ázsiai fajok azonban itt sem különültek el élesen egymástól, de bizonyos származási kapcsolatokra fényt derített.

A *Vitis* fajok filogenetikai vizsgálatát az irodalmi áttekintésben már ismertett különböző szekvenciák (kloroplasztisz, GAI, SSR stb.) felhasználásával ellentétben, mi az egyébként általában erősen konzervált struktúrgénnel kapcsolt marker szekvencia elemzésével próbáltuk elérni.

Munkánk során a *VvMybA1* és *VvMybA2* génekkel kapcsolt BAC könyvtár alapján tervezett (WALKER et al. 2007) 20D18CB9 marker szekvenciaszintű elemzésével egy új filogenetikai kapcsolatrendszer szerettünk volna felállítani a *Vitis* nemzetségben. Előzetes vizsgálataink alapján ez az egyébként CAPS marker már restriktációs emésztés nélkül, agaróz gélen is detektálható hosszpolimorfizmust mutatott a *V. vinifera* L. és a fajok között (21. ábra). Ezek az alapján úgy gondoltuk, hogy a 20D18CB9 marker alkalmas lehet a fajok elterjedési területük és származásuk alapján történő elkülönítésére.

A *V. vinifera* L. fajták közül a 'Barbera'-t használtuk referenciaként, mivel a *VvMybA1* és *VvMybA2* lokuszokban is a vad típusú allélokot hordozza (8. táblázat). A 20D18CB9 markerre tervezett primerek segítségével az előzetesen várt ~577 bp hosszúságú fragmentumokat sikerült felszaporítani (21. ábra), agaróz gélen is detektálható hosszpolimorfizmussal.



21. ábra: A 20D18CB9 primerrel végzett PCR eredménye különböző szőlő fajokban.

M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus)

1. *Vitis vinifera* 'Barbera', 2. *Vitis aestivalis*, 3. *Vitis amurensis*, 4. *Vitis berlandieri*, 5. *Vitis candicans*, 6. *Vitis andersoni*, 7. *Vitis arizonica*, 8. *Vitis champinii*, 9. *Vitis cinerea*, 10. *Vitis armata*, 11. *Vitis coignetiae*, 12. *Vitis doaniana*

A hosszpolimorfizmus pontos kimutatására, valamint a különböző fajokban amplifikált DNS szakaszok bázissorrendjének meghatározására a PCR termékeket kitisztítottuk, klónozó plazmidba ligáltuk és szekvenáltattuk. A vizsgálatainkban összesen 34 faj, 25 észak-amerikai, 8 ázsiai és a 2 eurázsiai faj szerepel (9. táblázat). A PCR fragmentumok szekvenálása és a szekvenciák illesztése alapján a vizsgált 25 észak-amerikai faj közül 15 ugyanabban a pozícióban egy 34 bp méretű deléciót hordoz.

A *V. californica* ENGELM. és *Muscadinia rotundifolia* SMALL. a többtől eltérő helyen, tartalmaz egy 21, illetve egy 26 bp méretű deléciót a 20D18CB9 allélben, amelyek a szekvenciák illesztésének ábráján jól látható (23. ábra).

Az ázsiai- és eurázsiai fajok egyike sem tartalmazza ezt a deléciót, így külön csoportot képeznek. Az észak-amerikai fajok közül 7, a *V. arizonica* BENTH., a *V. girdiana* MUNSON., a *V. tiliacea* HEMSL., a *V. longii* PRINCE, a *V. doaniana* MUNSON., a *V. rupestris* SCHEELE és a *V. solonis* ENGELM. nem hordozzák ezt a deléciót, így a dendogramon ezek elkülönülnek a deléciót hordozó észak-amerikai fajoktól. Legfőképpen a *V. arizonica* BENTH., a *V. girdiana* MUNSON., a *V. tiliacea* HEMSL., a *V. longii* PRINCE., amelyek az ázsiai és eurázsiai fajok közötti klaszterben helyezkednek el (22. ábra). Tehát szekvenciaszinten ezek az észak-amerikai fajok mutatnak legnagyobb hasonlóságot az eurázsiai és ázsiai fajokkal. Ez az eredmény a szőlő fajok terjedésével magyarázható. Feltételezések szerint a szőlő Ázsiából a Bering szoroson keresztül jutott át az Újvilágba (DONOGHUE et al. 2001).

Ezt az elképzelést támaszthatja alá az általunk kapott eredmény is, vagyis, míg az eurázsiai és Kelet-ázsiai fajok nem hordozzák a deléciót, Amerika északi féltekéjén kialakult fajok egy része hordozza, egy része pedig nem hordozza a deléciót. Az észak-amerikai fajok között tehát jelentős diverzitás figyelhető meg az általunk kimutatott delécióval. A 34 bp méretű szakasz kiesése a 20D18CB9 allélből az amerikai földrészre való áttérése során következhetett be valamelyik ősi változatban, és az ebből kialakuló fajok mindegyike hordozza ezt a mutációt.

Azok az észak-amerikai fajok, amelyek nem hordozzák a 34 bp méretű deléciót jól elkülönülnek azoktól, amelyek hordozzák azt (22. ábra). Ez alapján a dendogramon külön csoportot képeznek, és az eurázsiai és ázsiai fajok kládjával mutatnak közelebbi rokonságot.

A *M. rotundifolia* SMALL. -ban egy másik pozícióban 26 bp méretű deléciót mutattunk ki (22. ábra). A dendogramon ez különült el a legjobban, vagyis kulcscsoportot képez, ami nem meglepő, mert kromoszóma számában és bizonyos morfológiai tulajdonságokban is eltér a *Vitis* fajoktól (MULLINS et al. 1992).

A két eurázsiai faj, a *V. vinifera* L. és a *V. sylvestris* GMEL. a dendogramon két észak-amerikai csoport közé helyeződött, amelynek a tagjai szintén nem tartalmazzák a deléciót (22. ábra).

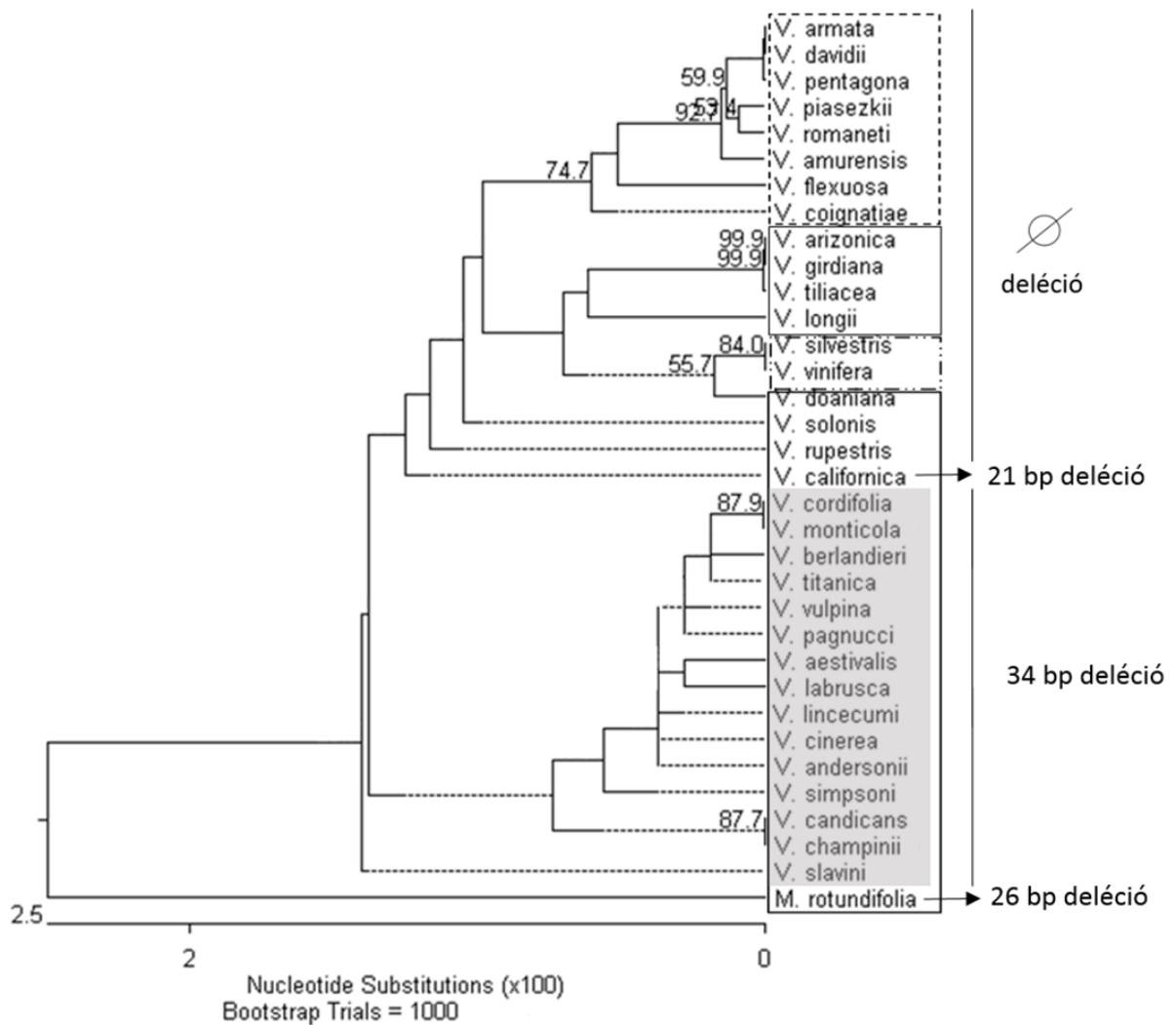
A *V. californica* ENGELM. esetében a többi észak-amerikai fajhoz képest egy másik pozícióban 21 bp méretű deléciót tudtunk kimutatni. Több biológiai ismétlés alkalmazásával, a szekvenálási eredmények kiértékelését követően is ezt az eredményt kaptuk, így a dendogramon jól elkülönül azoktól az észak-amerikai fajoktól, amelyek hordozzák a deléciót (22. ábra).

Az ázsiai fajok 20D18CB9 marker szekvencia elemzésének eredményei alapján nem tartalmazzák azt a 34 bp méretű deléciót, amelyet a 15 észak-amerikai faj hordoz, és a dendogramon jól elkülönült klasztert képez (22. ábra).

A szekvenciaillesztés alapján jól látható (23. ábra), hogy a kimutatott deléciókon kívül a pontmutációk jelenléte a fajok között nagymértékben befolyásolja a leszármazási kapcsolatok alakulását (22. ábra). A *M. rotundifolia* SMALL. a kimutatott 26 bp méretű deléciója mellett 21 SNP-t is tartalmaz, melyek nagy része csak ebben a fajban volt kimutatható. A deléciót tartalmazó észak-amerikai fajokban, a 286. pozícióban timin található, amely a többi fajban citozin, kivéve a *V. piasezkii* MAXIM., ahol szintén timin jelenik meg. Az 549. pozícióban a delécióval rendelkező észak-amerikai fajokban (kivéve a *V. slavini* REHDER.) guanin van jelen, míg ebben a pozícióban a többi fajban a citozin található.

Az ázsiai fajokban több pozícióban is találhatók olyan pontmutációk, amelyek csak erre a nyolc fajra jellemzőek. A 34. pozícióban citozin, míg a többi fajban guanin található. 128. pozícióban timin van a többi fajban megtalálható guaninnal szemben. A 179. pozícióban citozin figyelhető meg, míg a többi fajban timin. Végül a 228. pozícióban adenin volt kimutatható citozin helyett (23. ábra).

A szekvenciaillesztés alapján az is jól látható, hogy az SNP-k megjelenése nem csak szigorúan a földrajzi elterjedés alapján besorolható csoportok között jelennek meg, hanem keverten, vagyis egyes pontmutációk ázsiai és észak-amerikai fajok között is megjelennek, de nem mindegyik faj esetében. Így a pontmutációk nagyban befolyásolják azt, hogy a dendogramon milyen leszármazási kapcsolat jelenik meg az egyes fajok között.



22. ábra: A 20D18CB9 marker szekvenciájának illesztése alapján, Clustal W algoritmus alapján készített filogenetikai analízis az 50% < bootstrap-értékek feltüntetésével.

Jelölések: - - - - - ázsiai fajok, ——— észak-amerikai fajok, - · - · - · - eurázsiai fajok,  
szürke keret: 34 bp-os deléciót hordozó észak-amerikai fajok.

Az eredményeinket szemléltető dendrogram alapján az ázsiai fajok külön csoportot képeznek, mind az észak-amerikai, mind az eurázsiai fajokhoz képest, amit az általunk kimutatott deléció hiánya és a pontmutációk megléte döntően befolyásol. Azok az észak-amerikai fajok, amelyek hordozzák a deléciót, a dendrogramon szintén külön csoportban helyezkednek el, amelyet a deléció megléte alakított ki legnagyobb mértékben. E két klaszter között viszont észak-amerikai és a két eurázsiai fajok helyezkednek el, amelyek a deléció hiánya és a pontmutációk megléte miatti szorosabb rokonsági kapcsolat kialakulását tette lehetővé a dendrogramon. A *M. rotundifolia* SMALL. észak-amerikai fajként ugyan, de kulcscsoportot képez.

Az általunk készített dendrogramon közeli klaszterbe került a *V. doaniana* MUNSON. a *V. sylvestris* GMEL. -el és a *V. vinifera* L.-val (22. ábra). A földrajzi elterjedést figyelembe véve előbb feltételeznénk, hogy a 2 eurázsiai faj az ázsiai fajokkal kerülhetnek közelebbi klaszterbe, de a mi esetünkben nem így történt.

A vizsgált ázsiai fajok (melyek nem tartalmazzák a 34 bp-os deléciót) és az eurázsiai fajok (*V. vinifera* L., *V. sylvestris* GMEL, szintén nem tartalmazzák a 34 bp-os deléciót) közé azok az észak-amerikai fajok kerültek, amelyek szintén nem tartalmazzák az általunk kimutatott deléciót. A *V. doaniana* MUNSON., amely szintén azok közé az észak-amerikai fajok közé tartozik, amelyek nem hordozzák a deléciót, egy klaszterbe került az eurázsiai fajokkal. Véleményem szerint a *V. doaniana* MUNSON. és a két eurázsiai faj (*V. sylvestris* GMEL. és a *V. vinifera* L.) azért kerültek egy klaszterbe mert szekvenciaszinten nagyfokú hasonlóságot mutatnak. Nemcsak a 34 bp-os deléció hiánya okozza ezt, hanem 1-1 nukleotid polimorfizmusa is (23. ábra).

A *V. vinifera* L.-ban és a *V. sylvestris* GMEL. -ben 2 olyan nukleotid is megjelenik, amelyek közül egy, csak a *V. doania* MUNSON. -ban található meg a 76. pozícióban egy guanin, míg a többi faj esetében citozin van jelen. A 346. pozícióban megtalálható citozin csak a *V. vinifera* L.-ra és a *V. sylvestris* GMEL. -re jellemző, a többi faj esetében adenin van jelen, a *V. doaniana* MUNSON.-ban is. A szekvenciában megtalálható egy olyan eltérés is a 397. nukleotid pozícióban, ahol timin van a *V. sylvestris* GMEL. -ben, a *V. vinifera* L.-ban és a *V. doania* MUNSON. -ban is, de mellettük ez a timin megtalálható azokban az észak-amerikai fajokban is, amelyek nem hordozzák a 34 bp-os deléciót (*V. arizonica* BENTH., *V. girdiana* MUNSON., *V. tiliacea* HEMSL., *V. longii* PRINCE), és az ázsiai fajokban is (kivételem a *V. coignetiae* PULLIAT). A többi fajban adenin található meg. A *V. doaniana* MUNSON. -ban két olyan nukleotid van, amely a többi észak-amerikai fajban is megtalálható (346 pozíció adenin, és a 426 pozíció citozin) (23. ábra). Tehát csak két nukleotidban tér el a *V. doaniana* MUNSON. a *V. vinifera* L.-tól és a *V. sylvestris* GMEL. -től. Ez a nagyfokú hasonlóság, főleg a 76. pozícióban megtalálható guanin az, amely miatt a dendrogramon egy klaszterbe kerülhettek.

9. táblázat: A vizsgált növényanyag neve, származása, földrajzi eredete és a 34 bp hosszúságú deléció megléte vagy hiánya. Ger: Németország – Geweilerhof; Fr: Franciaország – Montpellier, Sor: Soroksár

Faj neve	Származás	Eredeti földrajzi elterjedés	34 bp deléció jelenléte/hiánya (+/-)
<i>V. vinifera</i> 'Barbera'	Pécs, Ger	Európa	-
<i>V. sylvestris</i>	Pécs, Ger, Sor	Európa	-
<i>V. amurensis</i>	Pécs, Ger, Sor	Ázsia	-
<i>V. armata</i>	Ger, Fr, Pécs	Ázsia	-
<i>V. pentagona</i>	Fr	Ázsia	-
<i>V. coignatiae</i>	Fr, Ger	Ázsia	-
<i>V. davidii</i>	Fr	Ázsia	-
<i>V. piasezkii</i>	Sor, Ger	Ázsia	-
<i>V. flexuosa</i>	Ger	Ázsia	-
<i>V. romaneti</i>	Pécs, Fr	Ázsia	-
<i>V. rupestris</i>	Fr, Ger	Észak-Amerika	-
<i>V. arizonica</i>	Pécs, Ger	Észak-Amerika	-
<i>V. tiliacea</i>	Ger	Észak-Amerika	-
<i>V. girdiana</i>	Fr, Ger	Észak-Amerika	-
<i>V. solonis</i>	Pécs	Észak-Amerika	-
<i>V. longii</i>	Ger, Pécs	Észak-Amerika	-
<i>V. doaniana</i>	Fr, Ger	Észak-Amerika	-
<i>V. californica</i>	Fr	Észak-Amerika	-
<i>M. rotundifolia</i>	Fr	Észak-Amerika	-
<i>V. labrusca</i>	Pécs, Ger	Észak-Amerika	+
<i>V. aestivalis</i>	Pécs, Ger	Észak-Amerika	+
<i>V. linsecumii</i>	Pécs	Észak-Amerika	+
<i>V. pagnucci</i>	Pécs	Észak-Amerika	+
<i>V. candicans</i>	Pécs, Ger	Észak-Amerika	+
<i>V. vulpina</i>	Pécs	Észak-Amerika	+
<i>V. cordifolia</i>	Pécs	Észak-Amerika	+
<i>V. simpsoni</i>	Fr	Észak-Amerika	+
<i>V. berlandieri</i>	Ger	Észak-Amerika	+
<i>V. cinerea</i>	Ger, Pécs	Észak-Amerika	+
<i>V. slavini</i>	Ger, Pécs	Észak-Amerika	+
<i>V. titanica</i>	Pécs	Észak-Amerika	+
<i>V. monticola</i>	Ger, Pécs	Észak-Amerika	+
<i>V. andersonii</i>	Ger	Észak-Amerika	+
<i>V. champinii</i>	Ger, Fr	Észak-Amerika	+











		530	540	550	560	570
<i>V. cordifolia</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. monticola</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. cinerea</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. lincecumi</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. titanica</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. vulpina</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. pagnucci</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. berlandieri</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. andersoni</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. aestivalis</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. labrusca</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. simpsoni</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. candicans</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. champinii</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. slavini</i>	487	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. doaniana</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. rupestris</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. solonis</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. arizonica</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. girdiana</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. tiliacea</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. longii</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. romaneti</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. pentagona</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. flexuosa</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. piasezkii</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. amurensis</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. coignatiae</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. armata</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. davidii</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. silvestris</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. californica</i>	521	GAAAATTTGG	A-----	-----	AGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>M. rotundifolia</i>	495	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
<i>V. vinifera</i>	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT
Consensus	521	GAAAATTTGG	ATTTGCAATC	TCAAAGTTCT	CAAGAAATTT	TGGTGGGACA AGGTCAT

23. ábra: A vizsgált szőlő fajok nukleotidsorrendjének szekvencia illesztése a 20D18CB9 marker alapján.

#### 4.4 Új tudományos eredmények

1. Meghatároztuk 118 kárpát-medencei fajta *VvMybA1* génre (*VvMybA1a*, *VvMybA1b*, *VvMybA1c*) vonatkozó polimorfizmusát.
2. Elsőként végeztük el a *VvMybA2* lokuszban 41 fajta SNP szekvenálását, köztük kárpát-medencei rügymutánsokét és más európai fajtákét.
  - 2/1. SNP polimorfizmusuk alapján a: ‘Korinthusi piros’, ‘Piquepoul noir’, ‘Bajor kék’, ‘Gohér piros’, ‘Csiljaki krasznűj’, ‘Huszajne krasznűj’ fajtákat sikerült elkülönítenünk a többi színváltozattól.
  - 2/2. SNP polimorfizmus alapján funkcióképes allél jelenlétét mutattuk ki a ‘Rózsás leányka’, ‘Gohér piros’ és a ‘Csiljaki krasznűj’ fajtákban.
3. Elsőként használtuk szőlőfajok filogenetikai elemzésére a bogyószínt meghatározó *VvMybA1* és *VvMybA2* transzkripciósfaktorokat kódoló génekkel kapcsolt 20D18CB9 markert.
  - 3/1. Ezek alapján egy új filogenetikai kapcsolatrendszerrel írtunk le a *Vitis* fajokban.
  - 3/2. Szekvenálási eredményeinkkel az észak-amerikai fajok között nagyobb mértékű polimorfizmust mutattunk ki, mint az ázsiai fajok esetében. A kapcsolt marker szekvencia elemzésével olyan 34 bp méretű deléciókat találtunk, amely csak az észak-amerikai fajokra jellemző.
  - 3/3. A *V. californica* ENGELM. -ban és a *M. rotundifolia* SMALL. -ban olyan egyedi deléciókat találtunk, amelyek a későbbiekben fajspecifikus markerként is használhatóak.

## 5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A régi kárpát-medencei fajták közül sokat ma már nem termesztene, vagyis csak gyűjteményes értékkel rendelkeznek, amelyeket génbankokban tartanak fent. Speciális tulajdonságaik miatt ezek azonban potenciális alapanyagként szolgálhatnak a későbbi nemesítési programokban, aminek egyik alapfeltétele a fontosabb tulajdonságokat meghatározó gének/allélek ismerete. Korábbi munkáink során a *VvMybA* transzkripciós faktorokat kódoló génekre tervezett PCR alapú markerekkel sikeresen elkülönítettünk olyan őshonos rügymutánsokat, amelyek a bogyóhéj színében különböznek (BODOR & SZŐKE et al. 2014, KERÉKES et al. 2015). A régi kárpát-medencei fajták *VvMybA1* allélösszetételének meghatározása során a *VvMybA1* és a 20D18CB9 allélspecifikus primereket használtuk (KOBAYASHI et al. 2004, WALKER et al. 2006).

Összesen 118 kárpát-medencei fajtát vizsgáltunk, és 78 *VvMybA1a/a*, 33 *VvMybA1a/c*, 4 *VvMybA1a/b* és 3 *VvMybA1c/c* genotípust különítettünk el. Az egyes fajtacsoportokra kapott eredményekből származási kapcsolatokra is következtetni tudunk. Mivel a ‘Lisztes piros’, a ‘Furmint piros’ és a ‘Muskotály piros’ a *VvMybA1b* allélt tartalmazzák, ezek a fehér színváltozatból alakultak ki a *Gret-1* retrotranszpozon kivágódásával. A muskotályos fajták közül a fekete színváltozatban kimutattuk az ősi retrotranszpozont nem tartalmazó *VvMybA1c* allélt, így ez tekinthető közülük a legrégebbinek.

A ‘Ködös’ (N), ‘Kék tihanyi’ (N) és a ‘Tótika’ (N) régi kárpát-medencei fajták homozigóta formában hordozzák a *VvMybA1c* allélt. A *VvMybA2* gén SNP polimorfizmusának vizsgálata még nem történt meg, amelyből megbízhatóbb következtetést tudnánk levonni a fajták ősi jellegéről, mindenesetre az, hogy homozigóta formában hordozzák a *VvMybA1c* allélt mindenképp ősi jellegre enged következtetni, hiszen a *Gret-1* retrotranszpozon inszerciója később történt meg. Ezt az evolúciós eseményt a *V. vinifera* L. fajtákban mutatták ki a többi fajtól való elválás után.

A vizsgált fajták jelentős része a bogyószínének megfelelő *VvMybA1* allél összetételt tartalmazza, de a ‘Gohér piros’ (Rg), a ‘Hamuszőlő’ (G), a ‘Rózsás leányka’ (Rg) és a ‘Szeredi’ (Rg) esetében nem sikerült funkcióképes *VvMybA1* allélt kimutatni. Ez az eredmény arra is utalhat, hogy a *VvMybA2* transzkripciós faktor génjének egy funkcióképes allélja alakítja ki a bogyószínt. Tehát egy funkcióképes alléllal rendelkezniük kell ahhoz, hogy színes bogyó alakulhasson ki.

A marker eredmények jól kiegészíthetik az őshonos, jelenleg gyűjteményes értékű vagy ma is termesztett régi fajtáink egyedi jellemzésére adott mikroszatellit ujjlenyomat eredményeit. Az Intézet már meglévő szőlő SSR adatbázisába feltöltve mindenki számára szabadon elérhetővé tehető. A fajták *VvMybA1* allélösszetételének ismeretében a keresztezéses nemesítési munkákban előre jelezhető az utódok bogyószíne, illetve a későbbiekben marker támogatta szelekcióra használva még termőre fordulásuk előtt meghatározható a magoncok bogyó színe.

Korábbi munkákban is vizsgálták már, és próbálták elkülöníteni az egyes fajtacsoportokba tartozó szőlő fajtákat SSR és a *VvMybA1* transzkripció faktor polimorfizmusa alapján (SZŐKE et al. 2012, BODOR & SZŐKE et al. 2014). Ezek közül azonban nem minden *concultá*ba tartozó fajtát sikerült elkülöníteni egymástól.

A sikeres elkülönítés érdekében kezdtük meg a fajták SNP alapú vizsgálatát, amelyet a *VvMybA2* transzkripció faktor kódoló gén mutációja alapján határoztunk meg. *VvMybA2* transzkripció faktor génjének kódoló szekvenciában történt pontmutációk miatt az antocián bioszintézis blokkolt. A kialakult SNP eredményeként a képződő fehérje  $\alpha$ -helix szerkezet változásának következtében a funkcióképtelen gén miatt, nincs antocián bioszintézis (WALKER et al. 2007).

Mindkét pozícióban a vad típusú G (guanin) allél T (timin)-re cserélődött a mutáció miatt, amely aminosavváltozást idézett elő. A nem konzervatív változás következtében cisztein- glicin aminosav kicserélődés figyelhető meg. FELLER és munkatársai (2011) szerint a cisztein aminosav az  $\alpha$ -helix szerkezetben fontos szerepet tölt be a DNS-hez való kötődésben vagy más fehérjékkel való összekapcsolódásában. Ennek alapján végeztük el a vizsgálatainkat kárpát-medencei és más európai fajták esetében.

SNP polimorfizmus alapján sikerült elkülönítenünk a 'Csiljaki belűj' és 'Csiljaki krasznűj', valamint a 'Huszajne belűj' és a 'Huszajne krasznűj' fajtákat. A 'Korinthusi fekete' T/T allélokot, míg a 'Korinthusi piros' a K980 pozícióban T/G funkcióképes allélt is hordoz, így ezeket a fajtákat is sikerült elkülönítenünk. A 'Piquepoul gris' és a 'Piquepoul noir' esetében is sikerült különbséget tenni SNP polimorfizmus alapján. A 'Bakator piros' és a 'Bakator tüdőszínű' szomatikus mutánsokat sem *VvMybA1*, sem *VvMybA2* polimorfizmusuk alapján nem tudtuk elkülöníteni, így az eltérő szín pontos genetikai hátterét nem ismerjük. A 'Gohér piros' fajtát is sikerült elkülöníteni a fajtacsoportjának többi tagjától, viszont a 'Gohér fehér' és a 'Gohér változó' fajtákat nem sikerült SNP polimorfizmus alapján sem elkülöníteni egymástól.

A 'Bajor kék' fajtát sikerült elkülöníteni a 'Bajor szürke' és 'feketefájú'-tól, de az előző fajtacsoporthoz hasonlóan ebben az esetben sem sikerült SNP polimorfizmust kimutatni a két fajta között. A 'Barátság' két színvariánsa között sem tudunk polimorfizmust kimutatni, hasonlóan az 'Muskotály'- és az 'Opórtó' fajtakörbe tartozó tagok között. A 'Lisztes piros' és a 'Furmint piros' fajtákat *VvMybA1* alapján igen, de *VvMybA2* alapján nem tudtuk elkülöníteni, vagyis SNP vizsgálat alapján azonos allélmintázatot sikerült kimutatnunk.

Az SNP szekvenálási eredmények alapján megállapítható, hogy 25 fajta homozigóta a *VvMybA2* gén K980 pozíciójában (24 T/T, 1 G/G), és 14 fajta heterozigóta (G/T). A C22 polimorfizmusát vizsgálva 27 homozigóta (26 T/T, 1 G/G), és 12 heterozigóta (G/T) fajtát mutattunk ki.

Vizsgálataink során a kárpát-medencei fajták közül 4 esetben tapasztaltuk, hogy vannak olyan színes bogyóval rendelkező fajták, amelyeknél színes allél jelenlétét nem lehetett kimutatni a *VvMybA1* transzkripció faktor kódoló gén alapján.

A 'Szeredi' (Rg), 'Hamuszőlő' (G), 'Gohér piros' (Rg), 'Rózsás leányka' (Rg): homozigóta formában tartalmazzák a *Gret-1* inszerciót (*VvMybA1a/VvMybA1a*), és ez a molekuláris háttér nem teszi lehetővé az antocián bioszintézist.

A *VvMybA2* gén SNP polimorfizmusát vizsgálva a 'Gohér piros' (Rg) és a 'Rózsás leányka' (Rg) esetében két funkcióképes allélt mutattunk ki (K980: T/G, C22: T/G), ami lehetővé teszi a színanyag termelést. A 'Hamuszőlő' (G) esetében nem végeztünk SNP vizsgálatot.

A 'Szeredi' (Rg) esetében az SNP polimorfizmus homozigóta mutáns allélt mutatott ki (K980: T/T, C22: T/T), tehát a *VvMybA1* és *VvMybA2* gének vizsgálata fehér bogyószín kialakulásának molekuláris hátterét igazolja. Fenotípusos megjelenése alapján azonban egyértelmű, hogy zajlik antocián bioszintézis. Ezekben az esetekben további markerrendszerekkel való vizsgálatok jelenthetnek megoldást, hogy kimutathassuk a színanyag megjelenésének genetikai hátterét.

AZUMA és munkatársai (2009) funkcióképes *VvMybA1* allél polimorfizmusról számoltak be. A *VvMybA1<sup>BEN</sup>* allél (*VvMybA1a* és a *VvMybA3* közötti homológ rekombináció eredményeként kialakult funkcionális allél) visszaállította a *VvMybA1* transzkripcióját, tehát ez az allél felelős a 'Benitaka' színes bogyójának kialakulásáért. Mindezek alapján elsődlegesen a *VvMybA1<sup>BEN</sup>* lokuszra tervezett primerrel lehetőség nyílna arra, hogy vizsgálatainkat tovább folytathassuk azoknak a fajtáknak az esetében, ahol nem sikerült funkcióképes allélt kimutatnunk színes bogyószínük ellenére.



Emellett szintén jó megoldást jelenthetnek a funkcionális allélok kimutatására LIJAVETZKY és munkatársai (2006) vizsgálatainak eredményeit felhasználva. A ‘Sugraone’ (B) fajta és két szomatikus mutánsának vizsgálatával igazolták, hogy önmagában nemcsak a 3’ LTR szekvencia teszi újra funkcióképesé a gént a *Gret-1* kivágódását követően, hanem a retrotranszpozon 5’ és 3’ LTR szekvenciái közötti homológ rekombináció is. Ezekre a szekvenciákra tervezett primerrel szintén lehetőségünk nyílna további funkcióképes allélok kimutatására.

A monofiletikus eredetű *Vitis* nemzetség (*Vitaceae*) megközelítőleg 70 fajt foglal magába, amelyek többsége az északi félteke mérsékelt égövén fordul elő. A hibridizáció és a klonális variabilitás miatt azonban pontos számuk jelenleg sem ismert (MULLINS et al. 1992). A DNS szekvenálási technikák fejlődése mind kloroplasztisz mind sejtmagi szinten lehetővé tette a különböző növényfajok evolúciós történetének jobb megértését, így a *Vitaceae* család kutatásaiban is több markerrendszert használtak sikeresen (ARADHYA et al. 2008, 2013; DI GASPERO et al. 2000, PELSÝ et al. 2007). A *Vitis* nemzetség molekuláris filogenetikai kutatásával sok tanulmány foglalkozott, de a nemzetség filogenetikai, biogeográfiai és taxonómiai kutatásainak eredményei sokszor ellentmondásosak és a belőlük levonható következtetések nem teljesen egyértelműek (DI GASPERO et al. 2000, PELSÝ et al. 2007, ARADHYA et al. 2008, TRÖNDLE et al. 2010).

Az észak-amerikai és ázsiai szőlő fajok többségének bogyója fekete vagy sötétkék színű, amely az antocián bioszintézist szabályozó *Myb* transzkripciós faktor gének nagyfokú konzerváltságára utalhatnak (PÉROS et al. 2015). Ennek ellenére, munkánk során a *VvMybA* génekkel kapcsolt 20D18CB9 markerrel már agaróz gélen is detektálható hosszpolimorfizmust figyeltünk meg a fajok között. Szekvenciaszintű elemzéseink alapján egyes észak-amerikai és az ázsiai fajok között különbséget találtunk egy 36 bp méretű deléció, és több pontmutáció formájában. Azok az észak-amerikai fajok, amelyek nem hordozzák ezt a deléciót, az ázsiai fajokkal mutatnak szorosabb rokonsági kapcsolatot. Ez az eredmény a szőlő fajok terjedésével magyarázható, amely alátámasztja DONOGHUE és munkatársai (2001) feltételezését, miszerint a szőlő Ázsiából a Bering szoroson keresztül jutott át az Újvilágba. Az északi félteke történeti biogeográfiája régóta nagy érdeklődéssel tölti el a botanikusokat. Kelet-Ázsia és Észak-Amerika keleti része közötti szoros kapcsolatokat kiemelten érdekesnek tartotta sok kutató (BOUFFORD és SPONBERG 1983, WEN 1999).

Az Észak-Amerikában fellelhető növények eredete így igen izgalmas és vitákkal, ellentmondásokkal teli kutatási témát jelentett számos kutatónak, azóta, hogy az első dokumentációk napvilágot láttak az Észak-Amerikában és Ázsiában élő növények hasonlóságáról. Számos Észak-Amerikában megtalálható fásszárú nemzetség elterjedését tudták nyomon követni fosszilis minták alapján az északi félteke más kontinensein is (GRAHAM 1972, WOLFE 1975, MAI 1995).

Észak-Amerika keleti régiója és Kelet-Ázsia közötti azonos vagy egymással szorosan összefüggő növényi taxonok nem folyamatos megoszlási mintázat jellemzi, amelyek a harmadidőszakban alakultak ki. Ezek közül azonban a "klasszikus" észak-amerikai-kelet-ázsiai minta kétségtelenül a legismertebb és leggyakrabban példaként hozható elterjedési mintázat, amellyel az olyan szoros kapcsolatban lévő taxonokat lehet jellemezni, amelyeket több ezer kilométer választ el egymástól a különböző kontinenseken.

Annak ellenére, hogy a két régióban fellelhető taxonok nagy részéről kimutatták, hogy különböznek egymástól (a kapcsolatok elsősorban azonos nemzetségű vagy hasonló családok szorosan összefüggő fajai), a biogeográfusok megerősítették a két régió közötti biológiai kapcsolat jelenlétét. Másrészt a botanikusok nagymértékű hasonlóságot véltek felfedezni Japán, Közép-Kína és az Appalach-hegység déli része között (BOUFFORD és SPONBERG 1983). BOUFFORD és SPONBERG (1983) munkájukban olyan botanikusok feljegyzéseiket gyűjtötték össze, amelyekben már felismerték Észak-Amerika és Kelet-Ázsia közötti nagymértékű hasonlóságot a növényvilágban. Frederick Pursh, Thomas Nuttall és Asa Gray mind rámutattak erre a hasonlóságra. Nuttall többek között azt a megállapítást tette a Körtikefélék (*Ericaceae*) családjába tartozó két fajról (*Chimaphila umbellata*, *Chimaphila maculata*), hogy Amerika észak-nyugati partjainál őshonos, és valószínűleg Ázsiában és Európában is e fajok találhatóak meg.

Az Észak-Amerika és Ázsia között kialakult biogeográfiai mintázat felismerését követően mintegy 65 nemzetség tagjait határozták meg e két elterjedési területen belül. A kezdeti kutatási eredmények ugyanazon fajhoz tartozó tagként kezelték, de a legtöbbet ezek közül később interkontinentális fajpároknak titulálták. Az újabb filogenetikai vizsgálatok megerősítik a rokoni viszonyt a földrajzilag eltérő taxonok között, de azt is jelzik, hogy ezek a fajok ritkán egymás legközelebbi rokonai. A filogenetikai, molekuláris, geológiai és a fosszilis adatok mindegyike alátámasztja azt a feltételezést, hogy a kelet-ázsiai és Észak-amerikai keleti régióján elterjedt növényi mintázat a Harmadidőszakban alakult ki, amely kialakulásban meghatározó szerepet töltött be a két földrész között kialakult természetes földhíd, a Bering-szoros (WEN 1999).

A molekuláris biológiai módszerek fejlődésével DNS szinten tudták tovább vizsgálni ezeket a hasonló, feltehetően szoros leszármazási kapcsolattal rendelkező növényeket és bizonyítani közöttük lévő rokoni kapcsolatot (DONOGHUE et al. 2001).

Hasonlóan több, a szőlő fajok leszármazási kapcsolatát vizsgáló tanulmánnyal (DI GASPERO et al. 2000, PELSAY et al. 2007, ARADHYA et al. 2008, TRÖNDLE et al. 2010, PÉROS et al. 2011, ZECCA et al. 2012), az általunk kapott eredmények alapján sem lehet egyértelmű különbséget tenni az észak-amerikai és ázsiai fajok között, hiszen a kimutatott deléció 7 észak-amerikai fajban nem, míg 17 észak-amerikai fajban viszont kimutatható. Így azok az észak-amerikai fajok, amelyek nem tartalmazzák a deléciót szorosabb rokonsági kapcsolatban vannak az ázsiai fajokkal, amelyek egyike sem tartalmazza a deléciót. Ez az eredmény a szőlőfajok elterjedésével magyarázható, amelynek során a *VvMybA* génekkel kapcsolt 20D18CB9 lókuszában bekövetkezett ez a deléció.

## 6 ÖSSZEFOGLALÁS

A szőlő bogyó héj színének mutációja gyakori jelenség, hiszen a ma termesztett szőlőfajták között a feketétől a piroson át, egészen a fehérig (zöld) sokféle szín megfigyelhető. A *VvMybA* markerek használata lehetőséget nyújt, hogy a különböző szőlőfajtákat (gazdasági jelentőségüktől függetlenül) egyedileg jellemezhessük, kiegészítve az SSR eredményeket. A *VvMybA* allél összetétel alapján a keresztezéses nemesítési munkákban eredményeink elősegíthetik a marker támogatta szelekciót, amely fenofázistól független azonosítást, és esetünkben bogyószín előrejelzést is lehetővé tehet.

Vizsgálatainkat egy korábbi kutatás eredményeire alapozva kezdtük meg, amelynek célja volt, hogy az azonos SSR mintázatot adó kárpát-medencei rügymutáns fajtákat a *VvMybA1* génre tervezett primerekkel elkülönítsék. Így munkánk során (1) jellemeztük 118 kárpát-medencei fajta *VvMybA1* allélösszetételét, (2) meghatároztuk 43 fajta (26 kárpát-medencei, és 17 egyéb európai fajta) *VvMybA2* gén SNP polimorfizmusát, valamint (3) 34 szőlőfaj (25 észak-amerikai, 8 ázsiai, 2 eurázsiai) filogenetikai vizsgálatát végeztük el a bogyószínt meghatározó *VvMybA1* és *VvMybA2* transzkripciós faktorokkal kapcsolt 20D18CB9 markert alapján.

Összesen 118 kárpát-medencei fajtát vizsgáltunk, és 78 *VvMybA1a/a*, 33 *VvMybA1a/c*, 4 *VvMybA1a/b* és 3 *VvMybA1c/c* genotípust különítettünk el. A vizsgált fajták jelentős része a bogyószínének megfelelő *VvMybA1* allél összetételt tartalmazza, de a ‘Gohér piros’ (Rg), a ‘Hamuszőlő’ (G), a ‘Rózsás leányka’ (Rg) és a ‘Szeredi’ (Rg), amelyek mind színes bogyóval rendelkeznek, nem sikerült funkcióképes *VvMybA1* allélt kimutatni, sem a *VvMybA1* allélspecifikus primerekkel, sem a 20D18CB9 marker segítségével, amely alátámasztaná fenotípusos megjelenésüket. A ‘Gohér változó’ és ‘Furmint változó’ fajták fehér bogyóval rendelkeznek, de az érés késői fázisában antocián felhalmozódás figyelhető meg a héjban, azonban ez a rózsaszín elszíneződés később eltűnik. E jelenségek megértésének, valamint a funkcióképes allélok kimutatására és a fajták lehetséges elkülönítésének érdekében a *VvMybA2* gén SNP alapú vizsgálatát kezdtük meg.

Munkánk során a *VvMybA2* génben található két SNP polimorfizmust vizsgáltuk, *VvMybA2R44* (K980) *VvMybA2C22* (C22), melyek szintén szerepet játszanak a bogyó héj színének kialakításában. Ezek vizsgálatára SNaPshot<sup>TM</sup> módszert alkalmaztunk.

A minták szekvenálása során a vad típusú bázis (G-guanin) mellett mindkét SNP pozíció esetében detektáltuk a mutáns T (timin) allélt, ami hatással van az antocián bioszintézisre. Ha ez a pontmutáció homozigóta (T) formában van jelen, akkor az allél funkcióképtelen, míg, ha heterozigóta (T/G) akkor az funkcióképes, vagyis színes bogyó kialakítását eredményezheti. Az SNP szekvenálási eredmények alapján 25 fajta homozigóta a *VvMybA2* gén K980 pozíciójában (24 T/T, 1 G/G), és 14 fajta heterozigóta (G/T). A C22 polimorfizmusát vizsgálva 27 homozigóta (26 T/T, 1 G/G), és 12 heterozigóta (G/T) fajtát mutattunk ki.

SNP polimorfizmus alapján sikerült elkülönítenünk: 'Bajor kék' fajtát a 'Bajor szürke', és 'Bajor feketefájú'-tól, 'Gohér piros'-at a 'Gohér fehér'-től és a 'Gohér változó'-tól. Továbbá sikeresen elkülönítettük a következő fajtákat: 'Csiljaki krasznűj'- belűj', 'Korinthusi piros- fekete', 'Piquepoul noir- gris', 'Huszajne krasznűj'- belűj'. A 'Szeredi' (Rg), 'Hamuszőlő' (G), 'Gohér piros' (Rg), 'Rózsás leányka' (Rg): homozigóta formában tartalmazzák a *Gret-1* inszerciót (*VvMybA1a/VvMybA1a*), és ez a molekuláris háttér nem teszi lehetővé az antocián bioszintézist. A *VvMybA2* gén SNP polimorfizmusát vizsgálva a 'Gohér piros' (Rg) a 'Rózsás leányka' (Rg) és a 'Csiljaki krasznűj' (Rg) esetében is sikerült két funkcióképes allélt kimutatni (K980: T/G, C22: T/G). A 'Szeredi' (Rg) esetében az SNP polimorfizmus homozigóta mutáns allélt mutatott ki (K980: T/T, C22: T/T), tehát a *VvMybA1* és *VvMybA2* gének vizsgálata sem támasztotta alá a fenotípusnak megfelelő genetikai hátteret.

Kutatásunk további célja volt a különböző földrajzi eredetű szőlő fajok filogenetikai kapcsolatrendszerének vizsgálata. Munkánk során 34 *Vitis* fajt, 25 Észak-amerikai, 8 Ázsiai és 2 eurázsiai fajt vizsgáltunk a 20D18CB9 lokuszban. A 25 észak-amerikai faj közül 15 faj ugyanabban a pozícióban egy 34 bp méretű deléció hordoz. A *V. californica* ENGELM. egy másik pozícióban egy 21 bp méretű, míg a *M. rotundifolia* SMALL. ugyancsak másik pozícióban 26 bp méretű deléció hordoz. Az ázsiai és eurázsiai fajok egyike sem tartalmazza az általunk kimutatott deléció, így ezek külön klasztert képeznek. 8 észak-amerikai faj közül, amelyek nem hordozzák a deléció, 4 faj (*V. arizonica* BENTH., *V. girdiana* MUNSON., *V. tiliacea* HEMSL., *V. longii* PRINCE) az ázsiai és eurázsiai fajok közötti csoportba kerültek. Érdekes módon a *V. doaniana* MUNSON. észak-amerikai faj, (amely szintén nem hordozza a deléció), került a legközelebb az eurázsiai fajokhoz, amely a nagyfokú szekvencia hasonlóság miatt lehetséges, hiszen az általunk kimutatott 34 bp méretű deléció mellett számos nukleotid polimorfizmus is befolyásolja a fajok elhelyezkedését a dendogramon.

## 7 SUMMARY

Colour mutations in grape berry skin are relatively frequent events. Skin colour in grapes has become largely diversified, and includes black, red, pink, grey, and white (yellow–green) berries.

The use of *VvMybA* markers provides an opportunity to characterize different grape varieties (regardless of their economic importance), complementing the SSR pattern results. Based on the *VvMybA* allele composition, our results may facilitate marker-assisted selection in cross-breeding work, which may allow for phenophase-independent identification and, in this case, berry colour prediction.

We started our research based on the results of a previous study, which aimed to distinguish the Carpathian basin cultivars which have the same SSR pattern by primers designed for the *VvMybA1* gene. In our work (1) we characterized the *VvMybA1* allele composition of 118 Carpathian basin varieties, (2) determined the *VvMybA2* SNP polymorphism of 43 genotypes (26 Carpathian basins and 17 other European varieties), and (3) we have carried out the examination of 34 grape species (25 North American, 8 Asian, 2 Eurasia), using the 20D18CB9 marker linked to *VvMybA* transcription factor genes.

We have analyzed a total of 118 Carpathian Basin varieties and 78 *VvMybA1a/a*, 33 *VvMybA1a/c*, 4 *VvMybA1a/b* and 3 *VvMybA1c/c* genotypes were identified. ‘Gohér piros’ (Rg), ‘Hamuszőlő’ (G), ‘Rózsás leányka’ (Rg) and ‘Szeredi’ (Rg) which have a colored berries, nevertheless, no functional *VvMybA1* allele could be detected, either with the *VvMybA1* allele-specific primers or with the 20D18CB9 marker, which would support their phenotypic appearance. The ‘Gohér változó’ and ‘Furmint változó’ varieties have white berries, but anthocyanin accumulation can be observed in the late stages of maturation but this pink color disappears later. In order to understand these phenomena and to differentiate the varieties, we examined the *VvMybA2* gene.

We have tested two SNP positions (K980, C22) of the *VvMybA2* gene by SNaPshot™ method. During the sequencing of the samples, the mutant T (thymine) allele and the functional G (guanine) allele was detected for both SNP positions, affecting anthocyanin biosynthesis. If this point mutation is present in homozygous (T) form, the allele is inactive, whereas if heterozygous (T/G) is functional, the berry skin is colored.

25 cultivars were homozygous for *K980* (24 T/T and 1 G/G) and 14 samples were heterozygous (G/T), where T is the nonfunctional allele and G the functional one. Based on the other nucleotide polymorphism (*C22*), 27 cultivars were homozygous (26 T/T and 1 G/G) and 12 samples were heterozygous (G/T), with G and T, wild type and mutated allele, respectively.

Based on SNP polymorphism, we distinguish the following varieties: ‘Bajor kék’ from ‘Bajor szürke’, and ‘Bajor feketefájú’, ‘Gohér piros’ from ‘Gohér fehér’ and ‘Gohér változó’. In addition, the following varieties were also successfully distinguished: ‘Csiljaki krasznűj’- belűj’, ‘Korinthusi piros- fekete’, ‘Piquepoul noir- gris’, ‘Huszajne krasznűj’- belűj’.

The ‘Szeredi’ (Rg), ‘Hamuszőlő’ (G), ‘Gohér piros’ (Rg), ‘Rózsás leányka’ varieties contain the *Gret-1* insertion (*VvMybA1a/VvMybA1a*) in homozygous form and this molecular background does not allow anthocyanin biosynthesis.

Examination of the SNP polymorphism of the *VvMybA2* gene, two functional alleles we were also detected in ‘Gohér piros’ (Rg), ‘Rózsás leányka’ (Rg) and ‘Csiljak krasznűj’ (Rg) (*K980*: T/G, *C22*: T/G ).

In the case of ‘Szeredi’ (Rg), the SNP polymorphism revealed a homozygous mutant allele (*K980*: T/T, *C22*: T/T), so this genetic background of this variety phenotype was not confirmed by the *VvMybA1* and *VvMybA2* genes.

Objectives of this study are to construct a new phylogenetic relationship of *Vitis* species using the 20D18CB9 marker linked to *VvMybA1* transcription factor gene.

Based on the sequenced PCR fragments, generated with the 20D18CB9 primer pair, the North American species have a 34-bp deletion, so they form a separate group on the dendrogram. The Asian species, which do not contain this deletion form a distinct group, but some North American species got also here, as they lacked the 34 bp DNA deletion. The *V. californica* ENGELM. contain 21 bp-insertion, and the *M. rotundifolia* SMALL. have a 26-bp insertion in the 20D18CB9 allele. Interestingly, *V. doaniana* MUNSON. (which does not contain the deletion) is closest to the Eurasian species, which is possible due to the high sequence similarity, since besides the 34 bp deletion we detected, several nucleotide polymorphisms also influence the species location on the dendrogram.

## 8 IRODALOMJEGYZÉK

1. Abe, H., Yamaguchi Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D, Shinozaki, K. (1997): Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell Online* 9: 1859-1868.
2. Aharoni, A., Ric De Vos, C. H., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J. N. M., O'Connell, A. P. (2001): The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 28 (3): 319-332.
3. Antus, S., Mátyus, P. (2014) Szerves kémia III. Nemzedékek Tudása Tankönyvkiadó Zrt.
4. Aradhya, M. K., Dangl, G. S., Prins, B. H., Boursiquot, J. M., Walker, M. A., Meredith, C. P., Simon, C. J. (2003): Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. *Genetics Research* 81: 179–191.
5. Aradhya, M., Koehmstedt, A., Prins, B. H., Dangl, G. S., Stover, E. (2008): Genetic structure, differentiation, and phylogeny of the genus *Vitis*: implications for genetic conservation. *Acta Horticulturae* 799: 43–49.
6. Aradhya, M., Wang, Y., Walker, M. A., Prins, B. H., Koehmstedt, A. M., Velasco, D., Gerrath, J. M., Dangl, G. S., Preece, J. E. (2013): Genetic diversity, structure, and patterns of differentiation in the genus *Vitis*. *Plant Systematics and Evolution* 299: 317–330.
7. Arroyo-Garcia, R., Ruiz-Garcia, L., Bolling, L., Ocete, R., Lopez, M. A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezoglu, G., Uzun, H. I., Cabello, F., Ibáñez, J., Aradhya, M. K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J. L., Costantini, L., Goris-Lavets, S., Grando, M. S., Klein, B. Y., McGovern, P. E., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikiri, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K. A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J. M., Lefort, F., Martinez-Zapater, J. M. (2006): Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. *ssp sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* 15: 3707–3714.
8. Azuma, A., Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Shiraishi, M., Mitani, N., Yakushiji, H., Koshita Y. (2009): Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) ‘Benitaka’, a bud sport of ‘Italia’, is caused by a novel allele at the *VvMybA1* locus. *Plant Science* 176: 470–478.



9. Azuma, A., Kobayashi, S., Mitani, N., Shiraishi, M., Yamada, M., Ueno, T., Kono, A., Yakushiji, H., Koshita, Y. (2008): Genomic and genetic analysis of Myb-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape skin, *Theoretical and Applied Genetics* 117: 1009–1019.
10. Azuma, A., Udo, Y., Sato, A., Mitani, N., Kono, A., Ban, Y. (2011): Haplotype composition at the color locus is a major determinant of skin color variation in *Vitis x labruscana* grapes. *Theoretical and Applied Genetics* 122: 1427-1438.
11. Azuma, A., Yusuke, B., Sato, A., Kono, A., Shiraishi, M., Yakushiji, H., Kobayashi, S. (2015): Myb diplotypes at the color locus affect the ratios of tri/di-hydroxylated and methylated/non-methylated anthocyanins in grape berry skin. *Tree genetics and genomes* 11: 31.
12. Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Joshi, S. S., Pruess, H. G. (2000): Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148: 187–197.
13. Bai, Y., Pattanaik, S., Patra, B., Werkman, J. R., Xie, C. H., Yuan, L. (2011): Flavonoid-related basic helix-loop-helix regulators, *NtAn1a* and *NtAn1b*, of tobacco have originated from two ancestors and are functionally active. *Planta* 234: 363-375.
14. Bailey, L. H. (1934): The species of grapes peculiar to North America. *Gentes Herbarium* 3: 154–244.
15. Ban, Y., Honda, C., Hatsuyama, Y., Igarashi, M., Bessho, H., Moriguchi, T. (2007): Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant and Cell Physiology* 48: 958-970.
16. Ban, Y., Mitani, N., Hayashi, T., Sato, A., Azuma, A., Kono, A., Kobayashi, S. (2014): Exploring quantitative trait loci for anthocyanin content in interspecific hybrid grape (*Vitis labruscana* x *Vitis vinifera*). *Euphytica* 198: 101-114.
17. Barrett, L. W, Fletcher, S., Wilton, S. D. (2012): Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3613–3634.
18. Barton, D., Meth-Cohn, O. (1999): Comprehensive natural products chemistry: *Newnes*.
19. Bessis, R. (2007): Evolution of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) imprinted by natural and human factors. *Canadian Journal of Botany* 85: 679–690.

20. Bényei, F., Lőrincz, A., Szendrődy, Gy., Sz. Nagy, L., Zanathy, G. (1999): Szőlőtermesztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
21. Bényei, F., Lőrincz, A. (2005): Borszőlőfajták, csemegeszőlő-fajták és alanyok. Fajtaismeret- és használat. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
22. Blattner F. R. (1999): Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. *Biotechniques* 29: 1180–1186.
23. Bodor, P., Szőke, A., Tóth-Lencsés, K., Veres, A., Deák, T., Bisztray, Gy. D., Kiss, E., (2014): Differentiation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *conculta* members based on molecular tools. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 28: 14-20.
24. Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996a): Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes, *Plant Molecular Biology* 32: 565–569.
25. Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996b): Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2: 163–170.
26. Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996c): Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv ‘Shiraz’ grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology* 111: 1059–1066.
27. Boss, P. K., Thomas, M. R. (2002): Association of dwarfism and floral induction with a grape ‘green revolution’ mutation. *Nature* (London), 416: 847–850.
28. Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A., Lamb, C. (2000): Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell Online* 12: 2383-2393.
29. Bosch, T., Quandt, D. (2008): Mutational dynamics and phylogenetic utility of chloroplast non-coding DNA. *Plant Systematics and Evolution Suppl.*
30. Borsch, T., Quandt, D., Koch, M. (2009): Molecular evolution and phylogenetic utility of non-coding DNA: applications from species to deep level questions. *Plant Systematics and Evolution* 282: 107–108.
31. Boufford, D. E., Spongberg, S. A. (1983): Eastern Asia–Eastern North American phytogeographical relationships—a history from the time of Linnaeus to the twentieth century. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70: 423–439.
32. Bouquet, A. (2011): Grapevines in viticulture. In: Adam-Blondon A. F., Martinez-Zapater J. M., Kole C. (eds). *Genetics, Genomics and Breeding of Grapes*, vol 1. *CRC Press*, Boca Raton, 1-29 p.

33. Bradshaw, H. D., Schemske, D. W. (2003): Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkey flowers. *Nature* 426: 176–178.
34. Branas J. (1974): Viticulture générale. Cycle végétatif. In: ENSA (ed) Viticulture. Montpellier, 241-298 p.
35. Busk P. K. and Pages M. (1988): Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* 37: 425–435.
36. Cadle-Davidson, M. M., Owens, C. L. (2008): Genomic amplification of the *Gret-1* retroelement in white-fruited accessions of wild *Vitis* and interspecific hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 1079–1094.
37. Calonje, M., Martín-Bravo, S., Dobes, C., Gong, W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, C., Kiefer, M., Paule, J., Schmickl, R., Koch, M. A. (2008): Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. Review. *Plant Systematics and Evolution* 282 (3-4): 257–280.
38. Carrasco, D., De Lorenzis G., Maghradze D., Revilla E., Bellido A., Failla O., Arroyo-García R. (2015): Allelic variation in the *VvMYBA1* and *VvMYBA2* domestication genes in natural grapevine populations (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*). *Plant Systematics and Evolution* 301: 1613–1624.
39. Castañeda-Ovando, A., Ma. de Pacheco-Hernández, L., Ma. Páez-Hernández, E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009): Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113: 859–871.
40. Castillo-Davis, C. I. (2005): The evolution of noncoding DNA: how much junk, how much func? *TRENDS in Genetics* 21 (10): 533-536.
41. Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R. A., Hills, H. G., Qiu, Y-L., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Clark, D.W., Hedren, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K-J., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q-Y., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. M., Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Learn, G. H., Jr. Graham, S. W., Barrett, S. C. H., Dayanandan S., Albert, V. A. (1993): Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 528-580.

42. Chen, Z. D., Ren, H., Wen, J. (2007): *Vitaceae*. In: Wu Z-Y, Hong D-Y, Raven P (eds) *Flora of China*, Vol. 12, *Science Press and Missouri Botanical Garden Press*, Beijing, China and St. Louis, 210–222 p.
43. Chong, J., Poutaraud, A., Hugueney, P. (2009): Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 117: 143–155.
44. Clegg, M. T. (1993): Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 363–367.
45. Clegg, M. T., Learn, G. H., Golenberg, E. M. (1991): Molecular evolution of chloroplast DNA. In: Selander R. K., Clark A. G., Whittam T. S. (eds) *Evolution at the Molecular Level*. 135–149 p.
46. Comeaux, B. L., Nesbitt, W. B., Fantz, P. R. (1987): Taxonomy of the native grapes of North Carolina. *Castanea* 52: 197–215.
47. Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D. V., Vlietinck, A. J. (2004): Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current Medicinal Chemistry* 11: 1345–1359.
48. Da Costa, C. T., Nelson, B. C., Margolis, S. A., Horton, D. (1998): Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 799 (1–2): 321–327.
49. Donoghue, M. J., Bell, C. D., Li, J. (2001): Phylogenetic patterns in Northern Hemisphere plant geography. *International Journal of Plant Science*. 162: S41–S52.
50. Demesure, B., Sodzi, N., Petit, R. (1995): A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129–131.
51. Di Gaspero, G., Peterlunger, E., Testolin, R., Edwards, K.J., Cipriani, G. (2000): Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 301–308.
52. Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, C. P., Edwards, K. J. (2002): Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 780–795.
53. Dooner, H. K., Robbins, T. P., Jorgensen, R. A. (1991): Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review of Genetics* 25: 173–199.
54. Du, H., Huang, Y., Tang, Y. (2010): Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1293–1312.

55. Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X. F., Yang, W. J., Wu, Y. M. (2009): Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry* 74: 1-11.
56. Dubos, C., Le Gourrierc, J., Baudry, A., Huep, G., Lanet, E., Debeaujon, I. (2008): MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55: 940-953.
57. Elomaa, P., Uimari, A., Mehto, M., Albert, V. A., Laitinen, R. A., Teeri, T. H. (2003): Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (*Asteraceae*) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots. *Plant Physiology* 133: 1831-1842 p.
58. Emanuelli, F., Lorenzi, S., Grzeskowiak, L., Catalano, V., Stefanini, M., Troglio, M., Myles, S., Martinez-Zapater, J. M., Zyprian, E., Moreira, F. M., Grando, M. S. (2013a): Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC Plant Biology* 13:39.
59. Emanuelli, F., Sordo, M., Lorenzi, S., Battilana, J., Grando, M. S. (2013b): Development of user-friendly functional molecular markers for *VvDXS* gene conferring muscat flavor in grapevine. *Molecular Breeding* 33 (1): 235–241.
60. Espley, R. V., Hellens, R. P., Putterill, J., Stevenson, D. E., Kutty-Amma, S., Allan, A.C. (2007): Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal* 49: 414-427.
61. Falcone Ferreyra M. L., Rius, S. P., Casati, P. (2012): Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science* 3 (222): 1-15.
62. Fang, J., Jogaiyah, S., Guan, L., Sun, X., Abdelrahman, M. (2018): Coloring biology in grape skin: a prospective strategy for molecular farming. *Physiologia Plantarum* 164 (4): 429-441.
63. Feller, A., Machemer, K., Braun, E. L., Grotewold, E. (2011): Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal* 66: 94-116.
64. Ferrer, J., Austin, M., Stewart, C.J., Noel, J. (2008): Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 356–370.

65. Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S. E. (2006): Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *European Journal of Nutrition* 45 (1): 7–18.
66. Fournier-Level, A., Lacombe, T., Le Cunff, L., Boursiquot, J. M., This, P. (2009a): Evolution of the *VvMybA* gene family, the major determinant of berry colour in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Heredity* 104: 351–362.
67. Fournier-Level, A., Le Cunff, L., Gomez, C., Doligez, A., Ageorges, A. et al. (2009b): Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) berry: a QTL to QTN integrated study. *Genetics* 183: 1127–1139.
68. Fujita Y., Fujita M., Satoh R., Maruyama K., Parvez M. M., Seki M., Hiratsu K., Ohme-Takagi M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2005): AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3470–3488.
69. Galbács, Z., Molnár, S., Halász, G., Kozma, P., Hoffmann, S., Kovács, L., Veres, A., Galli, Z., Szőke, A., Heszky, L., Kiss, E. (2009): Identification of grapevine cultivars using microsatellite-based DNA barcodes. *Vitis* 48 (1): 17-24.
70. Galet, P. (1988): Cépages et vignobles de France. Tome 1. Lesvignes Américaines, 2nd edn. Pierre Galet, Montpellier.
71. Galet, P. (2000): General viticulture. Oenoplurimedia, France.
72. Gerats, T., Strommer, J. (2009): Evolutionary, Developmental and Physiological. *Genetics*, DOI 10.1007/978-0-387-84796-2.
73. Gerrath, J., Lacroix, C., Posluszny, U., (1998): Phyllotaxis in the *Vitaceae*. World Scientific, *Symmetry in plants* 89–107.
74. Glories, Y. (1988): Anthocyanins and tannins from wine: organoleptic properties. *Progress in clinical and biological research* 280: 123–134.
75. Goldy, R. G., Onokpise, O. U. (2001): Muscadine grapes. Genetics and breeding In: Basiouny FM, Himelrick DG (eds) ASHS crop production series. ASHS Press, Alexandria, 51–90 p.
76. Goff, S. A. et al. (1992): Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes & Development* 6: 864–875.
77. Goodrich, J. et al. (1992): A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. *Cell* 68: 955–964.

78. Goor, A. (1966): The history of the grapevine in the Holy Land. *Economic Botany* 20: 46–64.
79. Graham, A. (1972): Outline of the origin and historical recognition of floristic affinities between Asia and eastern North America. In ‘Floristics and Paleofloristics of Asia and Eastern North America (A. Graham, Ed.), 1–18 p.
80. Grando, M. S., De Micheli, L., Scienza, A. (1996): Characterization of *Vitis* germplasm using random amplified polymorphic DNA markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43: 187-192.
81. Grotewold, E. (2005): Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. *TRENDS in Plant Science* 10 (2): 57-62.
82. Grotewold, E., Sainz, M. B., Tagliani, L., Hernandez, J. M., Bowen, B., Chandler, V. L. (2000): Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 13579-13584.
83. Guasch-Jane, M. R., Andres-Lacueva, C., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R. M. (2006): First evidence of white wine in ancient Egypt from Tutankhamun’s tomb. *Journal of Archaeological Science* 33: 1075-1080.
84. Guo, D., Zhang, J., Liu, C., Zhang, G., Li, M., Zhang, Q. (2012): Genetic variability and relationships between and within grape cultivated varieties and wild species based on SRAP markers. *Tree Genetics & Genomes* 8: 789-800.
85. Halász, G., Veres, A., Kozma, P., Kiss, E., Balogh, A., Galli, Zs., Szőke, A., Hoffmann, S., Heszky, L. (2005): Microsatellite fingerprinting of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties of the Carpathian Basin. *Vitis* 44 (4): 173–180.
86. Harborne, J. B., Grayer, R. J. (1993): Flavonoids and insects. In J. B. Harborne, ed. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, 589–618 p.
87. Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55 (6): 481-504.
88. Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., Santos-Buelga, C. (1998): Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. *Food Chemistry* 63 (4): 491–498.
89. Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S., Lauvergeat, V. (2011): Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* 62: 2465-2483.

90. Hichri, I., Heppel, S. C., Pillet, J., Léon, C., Czemmel, S., Delrot, S. (2010): The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. *Molecular plant* 3: 509-523.
91. Hocquigny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, M. C., Merdinoglu, D. (2004): Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome* 47: 579–589.
92. Holton, T. A., Cornish, E. C. (1995): Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083.
93. Ingrouille, M. J., Chase, M.W., Fay, M. F., Bowman, D., Bank, M., Bruijn, A. D. E. (2002): Systematics of Vitaceae from the viewpoint of plastid *rbcL* DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 138: 421–432.
94. Jang, I. C., Yang, S. W., Yang, J. Y., Chua, N. H. (2007): Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling. *Genes & development* 21: 2100-2111.
95. Jansen, R. K., Kaittanis, C., Saski, C., Lee, S-B., Tomkins, J., Alverson, A. J., Daniell, H. (2006): Phylogenetic analyses of *Vitis* (*Vitaceae*) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. *BMC Evolutionary Biology* 6: 32.
96. Jiao, J., Fu, X., Liu, C., Fan, X., Zhang, Y., Jiang, J. (2014): Study of the relationship between the cultivars of *Vitis vinifera* and the white-fruited and hermaphrodite Chinese wild grapes. *Molecular Breeding* 34: 1401-1411.
97. Jin, H., Martin, C. (1999): Multifunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family. *Plant Molecular Biology* 41: 577–585.
98. Jones, S. (2004): An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* 5: 226.
99. Juven-Gershon, T., Hsu, J. Y., Theisen, J. W., Kadonaga, J. T. (2008): The RNA polymerase II core promoter- the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology* 20: 253-259.
100. Karaagac, E., Vargas, A. M., de Andrés, M. T., Carreno, I., Ibanez, J., Carreno, J., Martinez-Zapater, J. M., Cabezas, J. A. (2012): Marker assisted selection for seedlessness in table grape breeding. *Tree Genetics and Genome* 8 (5): 1003-1015.
101. Kayesh, E., Shangguan, L., Korir, N. K., Sun, X., Bilkish, N., Zhang, Y., Han, J., Song, C., Cheng, Z-M., Fang, J. (2013): Fruit skin color and the role of anthocyanin. *Acta Physiologiae Plantarum* 35 (10): 2879–2890.



102. Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., Jones, G. P. (2001): Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5348–5355.
103. Kennedy, J. A., Waterhouse, A. L. (2000): Analysis of pigmented high-molecularmass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 866 (1): 25-34.
104. Kerekes, A., De Lorenzis, G., Szöke, A., Kiss, E., Failla, O. (2015): Analysis of *VvMybA1* and *VvMybA2* genes in grape bud sports. *Vitis* (54): 45-48.
105. Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Hirokawa, H. (2004): Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 304: 98.
106. Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Hirochika, H. (2005): Association of *VvMybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 74 (3): 196-203.
107. Kobayashi, S., Ishimaru, M., Ding, C. K., Yakushiji, H., Goto, N. (2001): Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Science* 160: 543–550.
108. Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K., Honda, C. (2002): *Myb*-related genes of the ‘Kyoho’ grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* 215: 924-933.
109. Konczak, I., Zhang, W. (2004): Anthocyanins-more than nature’s colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004 (5): 239–240.
110. Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. (2003): Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64 (5): 923–933.
111. Kumar, A., Bennetzen, L. J. (1999): Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics* 33: 479-532.
112. Levadoux, L. (1956): Les Populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. Annales de l’ame´lioration des plantes, Vol 1. INRA: Paris, France, 59–119.
113. Lijavetzky, D., Ruiz-Garcia, L., Cabezas, J. A., De Andres, M. T., Bravo, G., Ibanez, A. et al. (2006): Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics* 276: 427-435.
114. Lin, L. C., Kuo, Y. C., Chou, C. J. (2002): Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*. *Journal of Natural Products* 65: 505-508.

115. Lule, S. U., Xia, W. (2005): Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Reviews International* 21 (4): 367-388 p.
116. Mai, D. H. (1995): Tertiäre Vegetationsgeschichte Europas- Methoden und Ergebnisse. Feddes Repertorium: *Journal of botanical taxonomy and geobotany* 106: 1-5.
117. Martin, C., Gerats, T. (1993): The control of flower coloration. In: Jordan B. R. ed. The molecular biology of flowering. CAB International, Wallingford, 219–255 p.
118. Mathews, H., Clendennen, S. K., Caldwell, C. G., Liu, X. L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D. K., Menasco, D. J., Wagoner, W., Lightner, J., Wagner, R. J. (2003): Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15: 1689-1703.
119. Matus, J. T., Aquea, F., Arce-Johnson, P. (2008): Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. *BMC Plant Biology* 8: 83.
120. Matus, J., Poupin, M., Cañón, P., Bordeu, E., Alcalde, J., Arce Johnson, P. (2010): Isolation of *WDR* and *bHLH* genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant molecular biology* 72: 607-620.
121. Mazza, G. (1995): Anthocyanins in grapes and grapes products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 341–371.
122. Mazza, G., Miniati, E. (1993): Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains, CRC Press, Boca Raton, FL.
123. Mc Govern, P. E. (2003): Ancient Wine the Search for the Origins of Viniculture, 2nd edn. Princeton University Press: New Jersey, 400 p.
124. Miadoková, E. (2009): Isoflavonoids- an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology* 2: 211-218.
125. Migliario, D., Crespan, M., Munoz-Organero, G., Velasco, R., Moser, C., Vezzulli, S. (2014): Structural dynamics at the berry colour locus in *Vitis vinifera* L. somatic variants. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20: 485-495.
126. Mitani, N., Azuma, A., Fukai, E., Hirochika, H., Kobayashi, S. (2009): A retrotransposon-inserted *VvMybA1a* allele has been spread among cultivars of *Vitis vinifera* but not North American or East Asian *Vitis* species. *Vitis* 48: 55–56.
127. Mol, J., Grotewold, E., Koes, R. (1998): How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3: 212-217.

128. Moore, M. O. (1991): Classification and systematics of eastern North American *Vitis* L. (*Vitaceae*) north of Mexico. *SIDA Contributions to Botany* 14: 339–367.
129. Mori, A., Nitasaka, E. Y., Saitoh, M., Hoshino Iida, S. (2006): Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of c and ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant and Cell Physiology* 47: 457-470.
130. Mullins, M. G., Bouquet, A., Williams, L. E. (1992): The grapevine and its relatives. *Biology of the grapevine* 17– 27.
131. Munson, T. V. (1909): Foundations of American grape culture. T.V. Munson and Son, Denison. Texas. 252 p.
132. Murre, C., McCaw, P. S., Baltimore, D. (1989): A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56: 777-783.
133. Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C. L., Brown, P. J., Grassi, F., Aradhya, M. K., Prins, B., Reynolds, A., Chia, J. M., Ware, D., Bustamante, C. D., Buckler, S. (2011): Genetic structure and domestication history of thegrape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 3530-3535.
134. Nakatsuka, T., Haruta, K. S., Pitaksutheepong, C., Abe, Y., Kakizaki, Y., Yamamoto, K. (2008): Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers. *Plant and Cell Physiology* 49: 1818-1829.
135. Németh, M. (1966): Borszőlőfajták határozókulcsa (Ampelographic description of wine grapes). Mezőgazdasági Press, Budapest.
136. Németh, M. (1967): Ampelográfiai album. Termesztett borszőlőfajták I. (Ampelographic album. Cultivars of wine grapes I). Mezőgazdasági Press, Budapest.
137. Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., Exon, J. H. (2006): A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (2): 161–183.
138. Niu, S., Hao, F., Mo, H., Jiang, J., Liu, C., Wang, H. (2017): Examination of molecular mechanism for the color mutation in Chinese wild grapevine (*Vitis davidii*). *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 171.
139. Olmo, H. P. (1976): Grapes. In: Evolution of Crop Plants. Longman: London, 294-298 p.

140. Palmer, J. D., Jansen, R. K., Michaels, H. J., Chase, M. W., Manhart, J. R. (1988): Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1206.
141. Paneto, G. G., Köhnemann, S., Martins, J. A., Cicarelli, R. M. B., Pfeiffer, H. (2011): A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups. *Mitochondrion* 11: 296-302.
142. Park, K. I., Ishikawa, N., Morita, Y., Choi, J. D., Hoshino, A., Iida, S. (2007): A *bHLH* regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *The Plant Journal* 49: 641-654.
143. Pattanaik, S., Kong, Q., Zaitlin, D., Werkman, J. R., Xie, C. H., Patra, B. (2010): Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco. *Planta* 231: 1061-1076.
144. Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P., Saedler, H. (1987): The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO Journal* 6: 3553.
145. Pelsy, F. (2007): Untranslated leader region polymorphism of Tvv1, a retrotransposon family, is a novel marker useful for analyzing genetic diversity and relatedness in the genus *Vitis*. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 15-27.
146. Peng, J., Carol, P., Richard, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., Harberd, N. P. (1997): The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* 11: 3194-3205.
147. Pesch, M., Hülskamp, M. (2004): Creating a two-dimensional pattern de novo during *Arabidopsis* trichome and root hair initiation. *Current opinion in genetics & development* 14: 422-427.
148. Peters, D. J., Constabel, C. P. (2002): Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Journal* 32: 701-712.
149. Petroni, K., Tonelli, C. (2011): Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant science* 181: 219-229.

150. Péros, J. P., Berger, G., Portemont, A., Boursiquot, J. M., Lacombe, T. (2011): Genetic variation and biogeography of the disjunct *Vitis* subg. *Vitis* (*Vitaceae*). *Journal of Biogeography* 38: 471-486.
151. Péros, J. P., Launay, A., Berger, G., Lacombe, T., This, P. (2015): *MybA1* gene diversity across the *Vitis* genus. *Genetica* 143: 373-384.
152. Planchon, F. (1887): Monographie des Arnpelideae vraies. *Monographia Phanerogamerum* 5: 305-368.
153. Pleines, T., Jakob, S. S., Blattner, F. R. (2009): Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. *Plant Systematic Evolution* 282: 281-294.
154. Pollastri, S., Tattini, M. (2011): Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany* 108: 1225–1233.
155. Quattrocchio, F., Verweij, W., Kroon, A., Spelt, C., Mol, J., Koes, R. (2006): PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *The Plant Cell Online* 18: 1274-1291.
156. Quattrocchio, F. M., Wing, J. F., Leppen, H. T. C., Mol, J. N., Koes, R. (1993): Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes, *Plant Cell* 5: 1497-1512.
157. Ramsay, N., Glover, B. (2005): MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science* 10: 63-70.
158. Rein, T., Warmund, U., Groth-Malonke, M., Frahm, J. P., Knoop, V. (2008): Fifty mosses and three trees: comparing non-coding loci in the mitochondrial DNA in bryophyte phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 282 (3-4): 241–255.
159. Reisch, B. I., Owens, C. L., Cousins, P. S. (2012): Grape. *Fruit Breeding* 225-262.
160. Rossetto, M., Jackes, B. R., Scott, K. D., Henry, R. J. (2002): Is the genus *Cissus* (*Vitaceae*) monophyletic? Evidence from plastid and nuclear ribosomal DNA. *Systematic Botany* 27: 522-533.
161. Scacheri, C. A., Scacheri, P. C. (2015): Mutations in the non-coding genome. *Current Opinion in Pediatrics*. 27 (6): 659-664.
162. Schmickl, R., Kiefer, C., Dobes, C., Koch, M. A. (2009): Evolution of *trnF* (GAA) pseudogenes in cruciferous plants. *Plant Systematics and Evolution* 282: 229–240.
163. Schwinn, K. et al. (2006): A small family of *MYB*-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell* 18: 831–851.

164. Schweizer, F., Fernández Calvo, P., Zander, M., Diez Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G. (2013): Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors *myc2*, *myc3*, and *myc4* regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *The Plant Cell Online* 25: 3117-132.
165. Sefc, K. M., Lopes, M. S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakis-Angelakis, K. A., Ibanez, J. et al. (2000): Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 498-505.
166. Shen, T., Wang, X.N., Lou, H. X. (2009): Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports* 26: 916-935.
167. Shimazaki, M., Fujita, K., Kobayashi, H., Suzuki, S. (2011): Pink colored grape berry is the result of short insertion in intron of color regulatory gene. *PLoS One* 6, e21308. doi:10.1371/journal.pone.0021308
168. Shiraishi, S., Watanabe, Y. (1994): Anthocyanin pigments in the grape skins of cultivars (*Vitis* spp.). *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture - Kyushu University* (Japan). 48 (3-4): 255–262.
169. Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., Sun, T. P. (1998): The *Arabidopsis* *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10: 155-169.
170. Slinkard, K. W., Singleton, V. L. (1984): Phenol content of grape skins and the loss of ability to make anthocyanins by mutation. *Vitis* 23: 175-178.
171. Smale, S. T., Kadonaga, J. T. (2003): The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Genetics* 72: 449-479.
172. Sobrino, B., Brión, M., Carracedo, A. (2005): SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* 154: 181-194.
173. Soejima, A., Wen, J. (2006): Phylogenetic analysis of the grape family (*Vitaceae*) based on three chloroplast markers. *American Journal of Botany* 93: 278-287.
174. Sompornpailin, K., Makita, Y., Yamazaki, M., Saito, K. (2002): A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant molecular biology* 50: 485-495.
175. Song, S., Hernandez, M. M., Provedo, I., Menendez, C. M. (2014): Segregation and associations of enological and agronomic traits in Graciano x Tempranillo wine grape progeny (*Vitis vinifera* L.) *Euphytica* 195: 259-277.

176. Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., Tonelli, C. (1994): Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.), *Plant molecular biology* 24: 743-755.
177. Stafford, H. A. (1991): Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology* 96: 680-685.
178. Stintzing, F. C., Carle, R. (2004): Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 15 (1): 19-38.
179. Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B. (2001): The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 447-456.
180. Suganuma, T., Workman, J. L. (2010): WD40 repeats arrange histone tails for spreading of silencing. *Journal of molecular cell biology* 2: 81-83.
181. Szőke, A., Tóth-Lencsés, K., Heszky, L., Kiss, E. (2012): Red or white? Genetic basis of grape berry colour. *Hungarian Agricultural Research* 21: 4-6.
182. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
183. Takos, A. M., Jaffé, F. W., Jacob, S. R., Bogs, J., Robinson, S. P., Walker, A. R. (2006): Light-induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiology* 142: 1216-1232.
184. This, P., Lacombe, T., Cadle-Davidson, M., Owens, C. L. (2007): Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvMybA1*. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 723-730.
185. This, P., Lacombe, T., Thomas, M. R. (2006): Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22: 511-519.
186. Tóth-Lencsés, A. K., Kerekes, A., Szőke, A., Lajter-Farkas, B., Lönhard, T., Kiss, E., Kocsis, L. (2015): Marker assisted selection for berry colour in a ‘Nektár’ x ‘Jacquez’ grape progeny. *Vitis* 54: 51-52.
187. Tröndle, D., Schröder, S., Kassemeyer, H. H., Kiefer, C., Koch, M. A., Nick, P., (2010): Molecular phylogeny of the genus *Vitis* (*Vitaceae*) based on plastid markers. *American Journal of Botany* 97: 1168-1178.
188. Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000): *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic

- aciddependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (10): 11632-11637.
189. Unwin, P. T. H. (1991): *Wine and the Vine: an Historical Geography of Viticulture and the Wine Trade*. Routedledge: New York.
190. Van Nocker, S., Ludwig, P. (2003): The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC genomics* 4: 50.
191. Verries, C., Guiraud, J. L., Souquet, J. M., Vialet, S., Terrier, N., Olle, D. (2008): Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. 'Shiraz') to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5896-5904.
192. Vezzulli, S., Leonardelli, L., Malossini, U., Stefanini, M., Velasco, R., Moser, C. (2012): 'Pinot blanc' and 'Pinot gris' arose as independent somatic mutations of 'Pinot noir'. *Journal of Experimental Botany* 63 (18): 6359-6369.
193. Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, W., Waters, E. (2004): The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry* 85 (4): 519-525.
194. Vom Endt, D., Kijne, J. W., Memelink, J. (2002): Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* 61: 107-114.
195. Walker, A. R., Lee, E., Robinson, S. P. (2006): Two new grape cultivars, bud sports of 'Cabernet Sauvignon' bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant Molecular Biology* 62: 623-635.
196. Walker, A. R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D. A. J., Thomas, M. R., Robinson, S. P. (2007): White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes, *Plant Journal* 49 (5): 772-785.
197. Wan, Y., Schwaninger, H. R., Baldo, M. A., Labate, J. A., Zhong, G-Y., Simon, C. J. (2013): A phylogenetic analysis of the grape genus (*Vitis* L.) reveals broad reticulation and concurrent diversification during neogene and quaternary climate change. *BMC Evolutionary Biology* 13: 141.
198. Wan, Y., Schwaninger, H., He, P., Wang, Y. (2007): Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis* 46 (3): 132-136.



199. Wan, Y., Schwanninger, H., Li, D., Simon, C. J., Wang, Y., He, P., (2008): The ecogeographic distribution of wild grape germplasm in China. *Vitis* 47: 77-80.
200. Wang, X. (2011): Structure, function, and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. *Functional & Integrative Genomics* 11: 13-22.
201. Wang, Y., Chen, J., Lu, J., Lamikanra, O. (1999): Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes. *Scientia Horticulturae* 82: 85-94.
202. Weising, K., Gardner, R. C. (1999): A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
203. Wen, J. (1999): Evolution of eastern Asian and eastern North American disjunct distributions in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 30: 421-455.
204. Wen, J., Nie, Z. L., Soejima, A., Meng, Y. (2007): Phylogeny of *Vitaceae* based on the nuclear *GAI1* gene sequences. *Canadian Journal of Botany* 85: 731-745.
205. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 315-322 p.
206. Winkel-Shirley, B. (2004): Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55: 85-107.
207. Winkel-Shirley, B. (2001): Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485-493.
208. Winkel-Shirley, B. (2002): Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 218-223.
209. Winkel-Shirley, B. (2006): "The biosynthesis of flavonoids" in *The Science of Flavonoids*, ed. Grotewold, E. (New York, NY: Springer), 71-95 p.
210. Wolfe, J. A. (1975): Some aspects of plant geography of the Northern Hemisphere during the late Cretaceous and Tertiary. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 264-279.
211. Xu, Y., Jiang, N., Zhang, Y., Wang, M., Ren, J., Tao, J. (2017): A SNP in the promoter region of the *VvmybA1* gene is responsible for differences in grape berry color between two related bud sports of grape. *Plant Growth Regulation* 82 (3): 457-465.

212. Yakushiji, H., Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Jeong, S. T., Sueta, T., Mitani, N., Azuma, A. (2006): A skin color mutation of grapevine, from black-skinned 'Pinot Noir' to whiteskinned 'Pinot Blanc', is caused by deletion of the functional *VvMybA1* allele. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70: 1506-1508.
213. Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G. (2006): The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant molecular biology* 60: 107-124.
214. Yu, O., Mcgonigle, B. (2005): Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. *Advances in Agronomy* 86: 147-190.
215. Yuan, Y., Chium, L. W., Li, L. (2009): Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage. *Planta* 230: 1141-1153.
216. Zecca, G., Abbott, J. R., Sun, W. B., Spada, A., Sala, F., Grassi, F. (2012): The timing and the mode of evolution of wild grapes (*Vitis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 736-747.
217. Zimmermann, I. M., Heim, M. A., Weisshaar, B., Uhrig, J. F. (2004): Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant Journal* 40: 22-34.
218. Zhou, Y., Massonnet, M., Janjak, J., Cantu, D., Gaut, B. S. (2017): The evolutionary genomics of grape (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (44): 11715-11720.
219. Zhukovsky, P. M. (1950): Kulturnije rasztyenyija i ih szorodicsi (Cultivated plants and their wild relatives). Moskva: Akad. Izd.
220. Zohary, D., Hopf, M. (2000): Domestication of Plants in the Old World. Oxford University Press: London. No. Ed. 3.
221. Zohary, D., Spiegel-Roy, P. (1975): Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science* 187: 319-327.

## 9 MELLÉKLETEK

### M1.1

CTCGATGGAGAGCTTAGGAGTTAGAAAGGGTGCATGGACCCAAGAAGAGATG  
TTCTCCTGAGGAAATGCATTGAGAAATATGGAGAAGGAAAGTGGCATCTGGTT  
CCCCTCCGAGCAGGTGACATGAAAGAGAAAGGGATCAGTATTAATTTGTGTTT  
TTTTACTTCTGTTTTGCTTAAAGAGTTTCGTTTTCTTGAGTTTGCAGGGTTGAA  
TAGATGCCTAAAGAGCTGCAGATTGAGATGGCTCAATTATTTGAAGCCAGATA  
TCAAGAGAGGAGAGTTTGCATTAGACGAGGTTGATCTCATGATTAGGCTTCAC  
AATTTGTTGGGGAACAGGCAAGTCTATAATAACTCAAGTACTAGCTTGATAAT  
GATATTATATTAGTTCTGAAGCTGTTCAGAACTTACAAAAGAGCTGTTCAAGTTG  
ATACTTTGTCTGATGTTGTGCGTGTATAGATGGTCCTTGATTGCGGGTAGGCTT  
CCAGGGAGGACTGCTAATGATGTCAAAGAACTATTGGCATGGTCACCCACTG  
AAAAAGAAGGTTCCAGTTCAGGAAGAAGGGAGAAAAAACCCCAAACACATT  
CTAAAACCAAAGCTATAAAGCCTCACCTCACAAGTTCTCAAAGCCTTGCCA  
AGGTTTGAACATAAACTACAGCTGTGGATACTTTTGACACACAAGTAAGTAC  
TTCCAGTAAGCCATCATCCACGTCACCACAACCGAATGATGACATCATATGGT  
GGGAAAGCCTGTTAGCTGAGCATGCTCAAATGGATCAAGAACTGACTTTTCG  
GCTTCTGGAGAGATGCTTATCGCAAGCCTCTGGACAGAAGAACTGCAACACA  
GAAAAAGGGAACACATTCTAAAACCAAAGCTATAAAACCTCACCTCACAAG  
TTCTCAAAGCCTTGCCAAGGTTTGAACATAAACTACAGCTGTGGATACTTTT  
GACACACAAGTAAGTACTTCCAGTAAGCTGATCCACGTCACCACAACCGAATG  
ATGACATCATATGGTGGGAAAGCCTGTTAGCTGAGCATGCTCAAATGGATCAA  
GAAACTGACTTTTCGGCTTCTGGAGAGATGCTTATCGCAAGCCTCAGGACAGA  
AGAACTGCAGCACAGAAAAAGGGACCCATGGATGGTATGATTGAACAAATC  
CAGGGAGGTGAGGGTGATTTTCCATTTGATGTGGGCTTCTGGGATACACCCAA  
CACACAAGTAAATCATTGATCTGATTA

24. ábra: A *VvMybA2* kódoló régiójára alkalmazott primerek segítségével felszaporított 1250 bp hosszúságú szakaszt, és az SNP primerek kapcsolódása a 'Bakator piros' fajtában. Aláhúzott: C22 primer kapcsolódási helye, szürke keret: a K980 primer kapcsolódási helye.

## M1.2.: DNS kivonás

1. 100 mg friss vagy 20 mg liofilizált levelet (növényi szövetet) elporítunk folyékony nitrogénnel a -20°C-on előhűtött dörzsmozsarakban. A finom port Eppendorf csövekbe helyezük.
2. A mintákhoz 400 µl AP1 puffert, majd 4 µl RNase A-oldatot pipetázunk. A mintákat vortexeljük, majd 10 percre 65°C-ra helyezzük. Inkubálás közben 2-3-szor megforgatjuk a mintákat.
3. Az AP1 puffert és az RNase A-t ne keverjük össze használat előtt.
4. Hozzámérünk 130 µl AP2 puffert, összerázzuk, 5 percre jégre tesszük. Ezután 5 percig centrifugáljuk maximális fordulatszámon, és a felülúszót visszük tovább.
5. A mintákat *QIAshredder* csövekbe (Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit-hez mellékelt lila centrifugacső) pipetázunk, és 2 percig centrifugáljuk maximális fordulatszámon.
6. Az átfolyót új csövekbe mérjük.
7. A mintákhoz hozzáadunk 1,5 térfogatnyi AP3/E oldatot, pipetával elkeverjük.
8. Ebből 650 µl-nyi mennyiséget pipetázunk a DNeasy mini spin nevű oszlopba (fehér centrifugacső), majd 1 percig centrifugáljuk 8000 rpm-nél nagyobb fordulatszámon. Az alul megjelenő folyadékot kiöntjük.
9. A maradék oldattal megismételjük az előző lépést. A folyadékot itt is kiöntjük.
10. A DNS-t tartalmazó felső részt áthelyezzük a mellékelt Eppendorf csőbe, és hozzámérünk 500 µl AW puffert, 1 percig centrifugáljuk 8000 rpm-nél nagyobb fordulatszámon. Az alul megjelenő folyadékot kiöntjük.
11. Megismételjük az előző lépést, de itt 2 percig centrifugálunk maximális fordulatszámon.
12. Az oszlopot új Eppendorf csőbe tesszük.
13. 100 µl 65°C-os AE puffert mérünk a membránra, 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 1 percig centrifugáljuk 8000 rpm-nél nagyobb fordulatszámon.
14. Az előző pontot megismételjük a mintákon. Az átfolyó oldat tartalmazza a DNS-t.

## 10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni és hálámat kifejezni témavezetőimnek, Dr. Kiss Erzsébet professzor asszonynak és Dr. Szőke Antal egyetemi docensnek, hogy nagyfokú szakmai segítségükkel és erkölcsi támogatásukkal folyamatosan végigkísérték PhD tanulmányaimat. Külön köszönöm nekik, hogy lehetőséget kaptam bekapcsolódni az Intézetben folyó kutatásokba és ezáltal megismerni a molekuláris genetika világát, és elsajátítani számos laboratóriumi gyakorlati módszert. Köszönettel tartozom a publikációk elkészítésében nyújtott segítségükért és a támogatásért, amelynek révén külföldi tanulmányúton és konferencián is résztvehettem.

Köszönettel tartozom Dr. Varga László intézetigazgatónak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a Genetikai, Mikrobiológiai- és Biotechnológiai Intézetben végezhessem el kísérleteimet.

Köszönöm Osvaldo Failla és Gabriella De Lorenzis, a Milánói Egyetem munkatársainak, hogy a COST FA1003 pályázat keretében náluk végezhettem kísérleteim egy részét. A Milánóban töltött egy hónapot megkönnyítette mérhetetlen kedvességük, és segítőkészségük.

Külön köszönöm Dr. Halász Júliának és Dr. Hegedűs Attilának határtalan türelmüket, és azt, hogy mindvégig támogattak, és lehetőséget biztosítottak számomra a disszertációm befejezéséhez. Ezúton szeretném megköszönni a jelenlegi munkahelyem, a Genetika és Növénynevelés Tanszék minden dolgozójának a támogatásukat. Köszönöm Bacskainé Papp Annának és Dr. Sárdi Évának, hogy mindvégig támogattak és biztattak. Köszönöm mindannyiuknak a nyugodt baráti munkahelyi légkör megteremtését, amely hozzájárult az eredményes munkavégzéshez.

Hálás köszönettel tartozom barátaimnak és munkatársaimnak: Tóth-Lencsés Kittinek, Bedzsó Gabriellának, Kovács Lászlónak, Katona Melindának, Kovács Zsófiának, Bedő Jankának, Veres Anikónak, Bakos Györgyné Marikának, Ócsai Sándorné Évikének, Mendel Ákosnak, Makovecz-Tóth Zsófiának és a Genetikai, Mikrobiológiai- és Biotechnológiai Intézet összes dolgozójának, hogy tanácsaikkal, önzetlen segítségükkel és jó tanácsaikkal mindvégig támogattak.

Köszönet illeti meg testvéreimet és családját, valamint barátnőimet Pivarcsi Edinát és Makoviczné Zsohár Noémit folyamatos támogatásukért és biztató szavaikért.

Nagyon nagy hálával és köszönettel tartozom kedvesemnek, Norbinak, aki mérhetetlen türelemmel, bizalommal és szeretettel az elmúlt tíz évben mindvégig mellettem állt. Köszönöm szüleinek, testvéreinek és nagymamájának, hogy mindig támogattak.

Végül, de nem utolsó sorban a legnagyobb köszönettel Édesanyámnak és Édesapámnak tartozom, akik lankadatlanul hitték bennem és támogattak, mindent elkövetve azért, hogy tanulmányaimat elvégezhessem. Nélkülük nem sikerült volna!