

SZAKDOLGOZAT

Takács Kata

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Szőlészeti és Borászati Intézet

szőlész-borász mérnök alapképzési szak

Szőlő feketerothadáshoz kapcsolt DNS markerek validálása

Belső konzulens: Dr. Deák Tamás

Egyetemi docens

Belső konzulens

intézete/tanszéke: Szőlészeti és Borászati Intézet,
Szőlészeti Tanszék

Készítette: Takács Kata

Budai Campus

2024

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzések	4
2.	Irodalmi áttekintés.....	6
2.1.	Történelmi áttekintés	6
2.2.	A feketerothadás	7
2.2.1.	Feketerothadás betegség tünetei.....	8
2.2.2.	Tünetek a szőlő levelén és hajtásán	8
2.2.3.	Tünetek szőlő bogyón és fürtön	9
2.3.	Feketerothadással szembeni védekezés lehetőségei	11
2.4.	Szőlő nemesítés	11
2.4.1.	A Szőlőnemesítés első hulláma	12
2.4.2.	Franko-Amerikai Hibridek.....	13
2.4.3.	A Szőlőnemesítés második nagy hulláma	13
2.4.4.	A rezisztencianemesítés Magyarországon.....	14
3.	Anyag és módszer	16
3.1.	A legfontosabb feketerothadás rezisztencia források származása	18
3.2.	A vizsgálatba vont genotípusok	20
3.3.	DNS kivonás	20
3.3.1.	Szőlőlevélből történő DNS kivonás menete	21
3.3.2.	Molekuláris genetikai markerek	23
3.3.3.	DNS ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel	23
3.3.4.	Restrikciós fragmenshossz polimorfizmus.....	23
3.4.	PCR.....	24
3.5.	Kapilláris elektroforézis	25
3.6.	Mikroszatellit PCR.....	25
4.	Eredmények és megvitatásuk	28
4.1.	DNS kivonás	28
4.2.	PCR.....	28
4.3.	Kapilláris elektroforézis	29
5.	Összefoglalás	32
	Irodalomjegyzék	33

Ábrajegyzék

1. A: Súlyos feketerothadás fertőzés következtében összefolyó tünetek V. vinifera szőlőlevelén; B: A levélfoltokban fejlődő piknídiumok és a kiszabaduló érett konidiospórák, Pécs, 2015 (Roznik, 2019)
2. A szőlő hajtáson kezdetben fekete, majd kiszürkülő közepű enyhén besüppedő piknídiumokat tartalmazó feketerothadás foltok, Pécs, 2014 (Roznik, 2019).
3. A feketerothadással fertőzött bogyók kezdetben világosbarnára színeződnek a fürtben; B: néhány nap alatt fekete múmiává zsugorodnak, Pécs, A4 tábla, 2016 (Roznik, 2019).
4. Fertőzött bogyók felszínüket sűrűn borító piknídiumokkal, Pécs, 2016 (Roznik, 2019)
5. Feketerothadással szembeni rezisztenciára vonatkozó Rgb1 mennyiségi tulajdonsági lókusz (Rex et al., 2014)
6. Jelenlegi és korábbi tanulmányok integrációja látható a PN40024.v4 (Velt et al., 2022) markerpozíciója (Mb) alapján
7. Merzling szőlő családfája
8. Csillám szőlő családfája
9. Rayon d'Or szőlő családfája
10. A cézium klorid sűrűséggradiens ultracentrifugálás elve
11. A mikroszatellit markerek alapját adó mikroszatellit régió felépítése
12. A 12 mintából kivont DNS gélelektroforézis képe: 1. CSFT-61, 2. CSFT-92, 3. S-10-6, 4. S-11-2, 5. 01-1/474, 6. Muscaris, 7. Solaris, 8. Cabernet carol, 9. Sauvignier gris, 10. Merzling, 11. SV-5276, 12. Seibel 4995.
13. PCR termékek a 17. Chancellor, 18. Malverina, 19. Rinot, 23. I-14-20/3, 28. R187, 32. Sz113, 33. Sz112, 34. Sz83 minták esetében.
14. Csillám fragmenshossz analízis eredményei

Táblázatjegyzék

1. Vizsgált szőlő fajták
2. Felhasznált primerek
3. A PCR reakcióhoz szükséges termékek és mennyiségük
4. A PCR program ciklusai
5. Fragmenshossz analízis eredményei a GF14-42P és VMC2C3 markereknek megfelelően

1. Bevezetés és célkitűzések

Az európai szőlő- és borágazat napjainkban komoly kihívásokkal néz szembe. A szőlőültetvények termésbiztonságát biotikus tényezők, mint a vírusok, baktériumok, gombák és kártevők, valamint abiotikus tényezők, például szárazság és fagy fenyegetik. Világszerte mintegy 7,2 millió hektáron termesztnek szőlőt (OIV 2023). A termesztésben lévő 8-10 ezer *Vitis vinifera* fajta különböző mértékben fogékony a különféle betegségekre, amelyek a termés minőségét és mennyiségét egyaránt veszélyeztetik. A növényvédelmi kihívások közt ismét felbukkant egy korábban már feledésbe merült kórokozó, a feketerothadás, amellyel hazánkban és néhány európai országban újra szembesülnek a gazdák. Ez a kórokozó a 19. század végén, a lisztharmat és a peronoszpóra behurcolása után került Európába Amerikából, és mindhárom betegség jelentős terméskiesést okozott a szőlőültetvényekben. A mai intenzív szőlőtermesztés nagymértékben épít a megelőző vegyszeres növényvédelemre, ám a nagy mennyiségben alkalmazott növényvédő szerek nemcsak a környezetre és az emberi egészségre ártalmasak, hanem költségesek is, és a termesztési összköltség jelentős részét teszik ki. A fenntartható szőlőtermesztés érdekében a legígéretesebb megoldás a rezisztens fajták nemesítése és termesztése lehet, amely jelentősen csökkentené a vegyszerek alkalmazását. Ez kedvezne a bio- és ökológiai gazdaságoknak, és illeszkedne a környezetkímélő társadalmi elvárásokhoz. Az új, rezisztens fajták kifejlesztése azonban idő- és forrásigényes, hiszen a keresztezés után az utódok fenntartása nagy tenyész területet és hosszú időt igényel. Az új fajták termőre fordulása és értékelése legalább 5-6 évig tart. A kórokozók elleni tartós és magas szintű rezisztencia több gén kombinálásával érhető el. Elsőként a gazdaságilag jelentős kórokozók, mint a peronoszpóra, lisztharmat és szürkerothadás ellenálló fajtákat kell kifejleszteni, majd a kevésbé hangsúlyos kórokozók, például a feketerothadás és antraknózis elleni rezisztencia integrálása következhet. A feketerothadást az 1853-ban azonosított *Guignardia bidwellii* gombafaj okozza, amely Észak-Amerikából származik. Magyarországon a 2010-es járványos fellépésig nem volt növényvédelmi jelentősége, így ellene célzott vegyszeres kezelésre sem volt szükség. A gomba képes a szőlő minden növekvő zöld részét megfertőzni, és járványos években akár a termés 80-100%-át is elpusztíthatja. A leveleken megjelenő tünetek csökkentik a fotoszintetizáló felületet, ami a tőkék gyengüléséhez vezethet, a fertőzött bogyók pedig fekete múmiákká száradnak, teljesen tönkretéve a termést. A legnagyobb kárt virágzáskor okozza a fertőzés. A manapság már egyre inkább elterjedt bio művelés miatt egyre jelentősebb az olyan fajták termesztése melyek ellenállóak majdnem mindenre, így lecsökkentve a növényvédő szerek használatát és egy fenntarthatóbb jövő elérését a szőlő termesztésben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Történelmi áttekintés

A szőlőtermesztés eredete a mai Törökország, Irán és Örményország területére, azaz a Transzkaukázus régiójába vezethető vissza. Itt, körülbelül 5-6000 évvel ezelőtt, kezdték el termesztetni a ligeti szőlőt (*Vitis silvestris*). Ezeknek az egyedeknek a kiválasztásával, gondozásával, majd szaporításával alakult ki az ősi kerti szőlő (*Vitis vinifera*), amely a termesztés során jelentős változásokon ment keresztül. Az amerikai kontinensen a szőlőtermesztés az 1500-as években vette kezdetét, miután Európából eljutott az Újvilágba. Dél-Amerikában Perun, Chilén és Argentínán keresztül terjedt a szőlő, míg Észak-Amerikába csak az 1600-as évek végén jutott el. Itt azonban a kerti szőlő (*V. vinifera*) nem tudott megtelepedni az európai betegségek ellenállása híján, ezért az őshonos amerikai fajokat, a *V. labrusca*-t és *V. rotundifolia*-t kezdték termesztetni (Rakonczás, 2014).

A XIX. század közepén, amikor a szőlőtermesztés területe világszerte elérte a 8,5 millió hektárt, az észak-amerikai betegségek és kártevők jelentős károkat okoztak az európai szőlőültetvényeken. Az 1800-as évek végén került át Észak-Amerikából Európába a lisztharmat (*Uncinula necator*), amely súlyosan megtizedelte az európai fajtákat. A lisztharmatot követően jelent meg a filoxéra (*Daktulosphaira vitifoliae*), amely az 1860-as években Franciaországba is eljutott, és mindössze két évtized alatt a szőlőültetvények kétharmadát elpusztította.

A filoxéra megfékezésére ellenálló amerikai szőlőfajtákat hoztak Európába. Ezekkel a fajtákkal azonban újabb kórokozó, a peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) is megérkezett, amely tovább növelte a szőlőtermesztők kihívásait. Az amerikai szőlőfajták és azok hibridjei, például a Delaware, Isabella és Noah, sikeresnek bizonyultak, mivel filoxéra-rezisztenciájuk miatt saját gyökéren is termesztethők voltak, így ezek a direkttermő fajták széles körben elterjedtek az amerikai keleti partvidéken (Rakonczás, 2014).

A szőlőtermesztés során számos betegség és kártevő veszélyezteti a termést, amelyek közül kiemelkedik a filoxéra (szőlőgyökértetű) okozta járvány. A szőlőt gombás, bakteriális és vírusos betegségek is támadhatják, melyek eltérő környezeti feltételek mellett terjednek. Ezen kártevők ellen lehet védekezni permetezéssel, lisztharmat esetében kén tartalmú szerekkel, peronoszpóra esetében réz tartalmú készítményekkel, a filoxéra védekezési módszere pedig oltványok készítése volt.

2.2. A feketerothadás

A szőlő feketerothadását a *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz nevű aszkospórás gombafaj okozza, amely Észak-Amerikában őshonos. Az 1853-ban elsőként leírt kórokozó szőlőszaporító anyagok révén jutott el Európába. 1853-ban azonosították először a tüneteit Franciaország délnyugati, csapadékos, meleg szőlőterületein, majd elterjedt Svájcba, Németországba és dél-európai országokba, köztük Magyarországra is (Roznik et al., 2017). Hazánkban 1999-ben Mikulás József jelentette a betegséget, amikor piknídiumos tüneteket észlelt a Kecskemét és Tokaj-Hegyalja szőlőültetvényein (Mikulás et al., 1999).

A black rot (feketerothadás) elnevezést amerikai szőlőtermesztők adták a betegségnek, a színesedő bogyókon 24-48 órán belül megjelenő hirtelen, feketedéssel járó rothadás miatt. A feketerothadást megjelenésekor a szőlő egyik legpusztítóbb betegségeként emlegették, mivel nehéz volt ellene védekezni. Először Franciaország csapadékos, meleg délnyugati szőlőterületein észlelték a *G. bidwellii* jelenlétét, nem sokkal a lisztharmat és a peronoszpóra megjelenését követően. A következő évtizedben a feketerothadás csak szórványosan, kisebb területeken és minimális károkat okozva jelent meg Franciaország egyes tartományaiban. Magyarországra egészen 1892-ig csupán a betegség híre jutott el. Mivel az Egyesült Államokban már jelentős károkat okozott, a magyar kormány zárlatot rendelt el a francia szőlővesszők behozatalára. A kétéves tilalom alatt hazai mikológusok felmérték a betegség kockázatát, és végül csak olyan vesszők behozatalát engedélyezték, amelyek feketerothadás-mentes területekről származtak és fertőtlenítésen estek át (Linhart György, 1892).

Az óvintézkedések, valamint a kórokozó magas hőmérséklet- és nedvesséigénye, továbbá a lisztharmat és peronoszpóra ellen alkalmazott növényvédő szerek együttes hatása megakadályozta, hogy a feketerothadás hosszú ideig jelentős kárt okozzon az európai szőlőültetvényekben (Hoffmann et al., 2018). Több mint száz évvel a kórokozó megjelenése után, 2000-től kezdődően egyre több ország jelentette a feketerothadás felbukkanását és járványszerű pusztítását (Loskill et al., 2009). A fertőzés gócpontja Franciaország volt, ahonnan először Svájcba és Németországba, majd később délebbi országokba terjedt tovább, így elérte Románia, Magyarország, Bulgária, Ausztria, Olaszország és Spanyolország szőlőterületeit is (Mohr and Herrmann, 2005, Lipps and Harms, 2004).

Magyarországon és a mediterrán régió szőlőültetvényeiben 2010 óta rendszeresen jelennek jelentős feketerothadás okozta károkat a gazdák; egyes helyeken a termésveszteség elérte a 100%-ot is (Rinaldi et al., 2013). A járványok kialakulása több tényezőnek tulajdonítható. Egyrészt a csökkentett vegyszeres védelem mellett termesztett, lisztharmat- és peronoszpóra-rezisztens fajták elterjedése, valamint az ökológiai gazdálkodás térhódítása miatt az

ültetvények védelme a feketerothadás ellen kevésbé hatékony. Emellett egyre több a gondozatlan, vegyszeres kezelés nélkül hagyott szőlőültetvény, amelyek spóra rezervoárként szolgálnak, növelve a fertőzés kockázatát. Továbbá a klímaváltozás okozta szélsőséges időjárási körülmények, különösen a hosszabb csapadékos időszakok, kedveznek a betegség terjedésének.

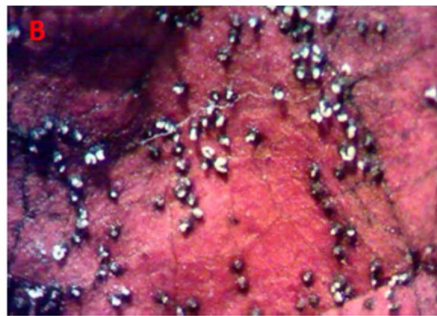
2.2.1. Feketerothadás betegség tünetei

A tünetek kialakulásához három feltétel együttes megléte szükséges: a fogékony szőlőszövet jelenléte, a kórokozó életképes spórája, valamint a spóra csírázásához kedvező környezeti tényezők, mint a megfelelő hőmérséklet, felületi nedvesség és relatív páratartalom. A feketerothadás tünetei a szőlő minden zöld részén – levelek, levélnyél, hajtás, kacs és fürt – megjelenhetnek, azonban a gomba kizárólag a fiatal, növekedésben lévő szöveteket képes megfertőzni (Kuo and Hoch, 1996).

2.2.2. Tünetek a szőlő levelén és hajtásán

Az első tünetek jellemzően tavasszal jelentkeznek, és a kiterült levelek színén válnak láthatóvá. A fertőzést követő 14–21. napon a levél erek mentén szabálytalan foltok jelennek meg, amelyek kezdetben krémszínűek, majd barnás-vöröses, sötét szélű foltokká alakulnak (Ramsdell and Milholland, 1988).

A foltok mérete 2-10 mm között változik, zseme leveleken a levéllemez elszíntelenedésével kezdődik majd idővel sötétebb szegélyek alakulnak ki, végül pedig a foltok nekrotizálódása következtében színük barnára/ szürkére színeződik. A fertőzés mértékétől függ, hogy milyen tünetek jelennek meg, súlyos fertőzés esetén az egész levél felülete elhalhat. A kórokozó ivartalan szaporító képletei, a fekete színű piknidiumok nagy számban fejlődnek ki, a foltokban legtöbbször kör alakba rendeződve, kiemelkedve a levél kutikulájából (1/A. ábra). A piknidiumokból nedves időben tömegesen szabadulnak ki a 2-3 hét alatt megérő konidiospórák (1/B. ábra). A fertőzés súlyosságát jellemzi az egy levélen megjelenő foltok mérete és száma, és a piknidiumok sűrűsége.



1. Ábra: A: Súlyos feketeterhadás fertőzés következtében összefolyó tünetek *V. vinifera* szőlőlevelén; B: A levélfoltokban fejlődő piknídiumok és a kiszabaduló érett konidiospórák, Pécs, 2015 (Roznik, 2019).

A hajtásokra, levélnyélre, kocsányra oválisabb, hosszúkás sötétebb foltok a jellemzőek, bennük szintén kifejlődnek a fekete piknídiumok. A léziók, melyek mérete akár 2 cm hosszát is eléri, benyomódhatnak, ronszolva a kapcsolódó szállítószöveteket (2. ábra), ezzel a hajtás-vég, virág- és fürtkocsány pusztulását okozva (Ramsdell and Milholland, 1988).



2. Ábra: A szőlő hajtáson kezdetben fekete, majd kiszürkülő közepű enyhén besüppedő piknídiumokat tartalmazó feketeterhadás foltok, Pécs, 2014 (Roznik, 2019).

A levélnyélen megnyúlt fekete foltok körülölelik a nyelet, ami ennek következtében eltörhet, a levél pedig teljesen elhervad (Wilcox, 2003). Luttrell és munkatársai (1946) számoltak be arról, hogy a muscadinia szőlők (*Muscadinia rotundifolia*) vesszőin és hajtásain található feketeterhadás léziók milyen fontos szerepet töltenek be a kórokozó áttelelésében és a kórokozó életciklusában.

2.2.3. Tünetek a szőlő bogyón és fürtön

A gazdasági kárt a fürtök pusztítása, és az ebből eredő termés kiesés jelenti. A betegség eleinte a fürtöknek csak bizonyos bogyóit érinti, azokról fertőzi tovább a többi bogyót, ilyenkor a fürtökön a betegség különböző stádiumait lehet nyomon követni. A fertőzés a fejlődő zöld bogyó oldalán apró (1-6 mm) fehér ütődésre hasonlító foltként jelentkezik. Ez, ahogy terjed, kékes-barna foltta válik, majd 24 órán belül eléri az 1 cm nagyságot, végül az egész

bogyót átéri. A bogyóhéj barnulásával a bogyó húsa szivacszerűen meglágyul. Ekkor indul meg a bogyó ráncosodása, kiszáradása. A ráncosodó bogyókon megjelennek a fekete piknídiumok. A betegség előrehaladtával a bogyók lilás-feketés színbe mennek át, és méretük kb. a felére zsugorodik. Ezeken a változásokon a bogyók rendkívül gyorsan esnek át, a barnulás 24-48 óra alatt, a teljes rothadás pedig 4-5 nap alatt lezajlik (Wilcox, 2003).

A megfertőzött bogyók múmiává válásának folyamatát a 3. ábra mutatja be.



3. Ábra: A feketerothadással fertőzött bogyók kezdetben világosbarnára színeződnek a fürtben; B: néhány nap alatt fekete múmiává zsugorodnak, Pécs, A4 tábla, 2016 (Roznik, 2019).

A fekete bogyómúmiák nem peregnek ki, fent maradnak a fürtkocsányon (4. ábra) felületük érdes a kiemelkedő sok piknídiumtól. A fertőzött fürtökben vegyesen lehetnek ép bogyók és bogyómúmiák, a fertőzés súlyosságának függvényében. Az ilyen vegyes fürtök nem szüretelhetők, mert a fertőzött bogyómúmiák már kis százalékban minőségi romlást okoznak, erős keserű ízük miatt.



4. Ábra: Fertőzött bogyók felszínüket sűrűn borító piknídiumokkal, Pécs, 2016 (Roznik, 2019).

A virágzás időszakában csak a kocsányon keresztül képes fertőzni a kórokozó, ilyenkor megtörténhet, hogy az egész fürt elhal.

A bogyók esetében a virágzást követő 4-5 hét a kritikus. Fajtánként eltérő a bogyók fogékony fenofázisának hossza, de zsendüléskor már minden fajtánál lezárul. A *Muscadinia* szőlők bogyóin azt figyelték meg, hogy a klasszikus tünetekkel ellentétben, egyes esetekben

a bogyó héján keletkező fekete, későbbiekben a bogyó szöveteibe süppedő, foltok fejlődtek, amikben felfedezhetőek a *G. bidwellii* piknídiumai (Luttrell, 1946).

2.3. Feketerothadással szembeni védekezés lehetőségei

A védekezés lehet agrotechnikai, kémiai és biológiai. Agrotechnikai eljárás alatt a fizikai beavatkozást értjük. A fertőzésekért felelős aszkospórák és konídiumok áttelelésre képesek bogyómúmiák formájában, ezek megsemmisítésével csökkenthető a kockázat az újboli fertőzésre (Onesti et al., 2018). Kémiai növényvédelem alatt a növényvédőszer használatát értjük. Védekezésre több nagy hatóanyag csoport használható, melyek jól ismertek és széleskörűen alkalmazottak szőlő peronoszpóra és/vagy lisztharmat ellen (Harms et al., 2005). Ezek a hagyományos feketerothadással szemben is hatékony szerek a kórokozót eddig az észlelési szint alatt tartották. Hazánkban a BASF által működtetett előrejelzési rendszer értékes információkat nyújt a feketerothadás fertőzések előrejelzéséhez. Biológiai védekezésre pedig főként az ökológiai gazdálkodásokban van szükség, hiszen az ott használható vegyszerek listája korlátozott. Organikus ültetvényekben még a hetente kijuttatott kén és réz készítmények sem kielégítően hatékonyak a feketerothadás fertőzés megfékezésére (Harms et al., 2005, Loskill et al., 2009). Sokoldalú és érdekes csoportját képezik az antimikrobiális anyagoknak a szaponin tartalmú természetes termékek. Miután több esetben kimutatták a szaponinok növényekben való jelenlétének kapcsolatát a patogénekkal szembeni rezisztenciával (Schönbeck and Schlösser, 1976). Elsőként *Yucca schidigera* kivonatának feketerothadással szembeni aktivitását mutatták ki cserpes szőlőnövények vizsgálatával (Travis et al., 2005), ezt követően MOLITOR és munkatársai (Molitor et al., 2010) számoltak be a kínai szappanfa kivonat hatékonyságáról szőlőnél. KOCH munkatársaival (Koch et al., 2013) végzett kísérleteiben a *Hedera helix* és *Primula* gyökérkivonatának hatékonyságát bizonyították szőlő feketerothadással szemben.

A MATE Szőlészeti Tanszékének kutatásaiban vizsgálták mesterségesen fertőzött fogékony és rezisztens szőlőfajták transzkriptom szintű válaszát feketerothadást okozó *G. bidwellii*-vel szemben. Újgenerációs szekvenálási technológián (mRNS szekvenálás) alapuló eredményeik szerint a gomba támadására rezisztens 'Csillám' fajta és a fogékony 'Csaba gyöngye' fajta génműködésében találtak eltérést. Azonosítottak olyan sztilbén szintáz géneket, melyek alaphelyzetben csak a 'Csillám' fajtában működtek, míg 'Csaba gyöngye' fajtánál csak a fertőzés hatására aktivizálódtak. Ebből arra következtettek, hogy a 'Csillám' fajta kiemelkedő feketerothadás rezisztenciájának egyik fontos eleme a sztilbén szintézise (Kellner, 2022).

2.4. Szőlő nemesítés

A tudatos szőlőnemesítés az 1800-as évek elejére tehető, igazán intenzíven Észak-Amerikában kezdődött a folyamat. Ezt követően mintegy 100-150 éven keresztül a nemesítők

elsősorban a filoxéra, a lisztharmat és a peronoszpóra problémáját próbálták megoldani. Kielégítő megoldást a valójában máig nem sikerült nyújtani. Mivel a kezdeti időszakban a nyomás a szőlőnemesítőkön a betegségellenállóság kialakítására nagy volt, a borminőség háttérbe szorult. Ennek köszönhető, hogy az új nemesítésű, betegségekkel szemben ellenálló fajtáknak nagyon rossz volt a híre borértő körökben. Ez sokszor még mindig tetten érhető, holott azóta sok minden megváltozott, immár kiemelt hangsúlyt fektetnek a nemesítők a minőségre is.

Az első nagy nemesítési hullámot követően a fajtaelőállítás intenzitása visszaesett, a filoxéra fenyegetést az alanyhasználat megoldotta a lisztharmat és a peronoszpóra ellen pedig sikerült kémiai védekezést kidolgozni. Nem szabad megfeledkeznünk azonban arról, hogy egyes országok – pl. Magyarország vagy Németország – éppen ebben az időben indított hatékony nemesítési programokat.

Az idő előrehaladtával egyrészt új szempontok kerültek előtérbe, mint pl. a környezetvédelem vagy a biotermesztés fontossága, másrészt új lehetőségek nyíltak a szőlőnemesítők számára mind a módszertan (molekuláris markerek, genomika), mint pedig rezisztenciaforrások (újonnan azonosított ellenálló észak-amerikai és ázsiai szőlőfajok) tekintetében. Az új lehetőségek a szőlőnemesítés újabb nagy hullámát indították el, ami magas minőségű, több betegséggel szemben magas fokú ellenállóságot mutató fajtákat eredményezett világszerte.

2.4.1. A Szőlőnemesítés első hulláma

A szőlőnemesítés első nagy hulláma az Amerikai Egyesült Államokban kezdődött. A kivándorló európaiak nem tudták termesztetni azokat a szőlőfajtákat, amelyeket odahaza megszoktak, hiszen a *Vitis vinifera* fajtákat észak-amerikában olyan kártevők (elsősorban a filoxéra), illetve kórokozók (a lisztharmat és a peronoszpóra) támadták meg, amelyekre az európai szőlőfajták nem voltak felkészülve. Bort tudtak készíteni az őshonos fajokból, de ennek íze nagyon eltért a megszokottól. A Harvard Egyetem kutatói 1822-ben javasolták, hogy kombinálják az észak-amerikai fajok ellenállóképességét (szempont volt a betegségellenállóság mellett a téltűrés is) az európai fajták minőségével (Cattell and Miller, 1980).

Ennek hatására indult meg az intenzív szőlőnemesítés olyan nemesítők munkásságával, mint William W. Valk, Nicholas Herbemont, Hermann Jäger vagy Thomas Munson. Az ebben az időszakban nemesített fajtákat hívjuk általában amerikai, vagy direkttermő hibrideknek (Reynolds, 2015).

A nemesítésnek Európában az adott lökést, hogy 1845-ben megjelent a lisztharmat, 1863-ban a filoxéra, 1878-ban a peronoszpóra. A legnagyobb kárt egyértelműen a filoxéravész okozta, a szőlőültetvények Európa-szerte megtizedelődtek. Franciaországban ekkor

magánnemesítők elkezdtek az európai fajtákat intenzíven keresztezni az észak-amerikai fajtákkal. Az ekkor keresztezett fajtákat hívjuk franko-amerikai hibrideknek (Galet, 1988).

A direkttermők és a franko-amerikai hibridek képezik a szőlőnemesítés első hullámát. Közös jellemzőjük, hogy európai és észak-amerikai fajok keresztezésével jöttek létre, kisebb-nagyobb mértékű ellenállóképességet mutatnak lisztharmattal és peronoszpórával szemben, a direkttermők filoxerával szemben ellenállóak. Ezek mellett a pozitív tulajdonságok mellett azonban abban is hasonlítanak egymásra a fajták, hogy borminőségük általában elmarad a *V. vinifera* minőség mögött.

2.4.2. Franko-Amerikai Hibridek

A filoxéra probléma az oltással megoldódni látszott tehát, de a lombot fertőző peronoszpóra és lisztharmat továbbra is komoly fejtörést okozott. Ekkor kezdtek francia magánnemesítők bele abba a közel több mintegy 50 évig tartó nemesítési munkába, amelynek során észak-amerikai szőlőfajok és európai fajták keresztezésével több ezer hibridet állítottak elő. A legaktívabb nemesítők a teljesség igénye nélkül Albert Seibel, Francois Baco, Georges Couderc, Bertille Seyve, Joannes Seyve és Victor Villard voltak (Galet, 1988).

A minőséggel kapcsolatos aggodalmak azonban továbbra is fennálltak, ráadásul időközben sikerült a két legfontosabb gombás betegség ellen a kémiai védekezést is megalapozni: a peronoszpóra ellen a réz, a lisztharmat ellen az elemi kén bizonyult hatásosnak. A kezdeti pánikhangulatot követően a kedélyek lenyugodtak tehát. Az alanyhasználat és a kémiai növényvédelem lehetővé tette a hagyományos európai szőlőfajták használatát, a rend helyreállni látszott, a nemesítés lendülete alábbhagyott.

2.4.3. A Szőlőnemesítés második nagy hulláma

A 20. sz. végére szőlőtermesztésünk sokat változott. A szőlészeken egyre nagyobb a nyomás környezetkímélő művelésmódok alkalmazására, a felhasznált növényvédő szer mennyiségének csökkentésére. A felhasználható genetikai források száma nő. Míg a nemesítés első nagy hulláma elsősorban az észak-amerikai fajokra összpontosított, ezek közül is főleg azokra, amelyek a *Vitis vinifera*-val könnyen keresztezhetőek, addig napjainkban akár más nemzetségek, ázsiai fajok, sőt akár a *Vitis sylvestris* vagy *vinifera* fajták is szóba kerülnek rezisztencia forrásként.

A nemesítés számára rendelkezésre álló eszközök is sokat változtak. A DNS alapú markerezési technikák olyan szelekciós hatékonyságot tesznek lehetővé, amire korábban nem volt példa. Napjainkban a genomikai módszerek fejlődésével további kapuk nyílnak meg: a molekuláris szelekciót immár genom szinten lehet művelni. Ennek divatos elnevezése a

molekuláris nemesítés, ami a molekuláris módszerek nemesítési folyamatba történő integrálását jelenti. A biotechnológia eszköztára szintén a nemesítés rendelkezésére áll. Hagyományos genetikai transzformációval, vagy az utóbbi pár évben a gén-szerkesztéssel egészen új horizontok nyílnak a nemesítés előtt.

Bár a GMO és a genomszerkesztés csábító új lehetőségek és már számos szőlőben szabadalmaztatott gén, genetikailag módosított növény áll rendelkezésre, a szőlőtermesztés és a borászat különösen hagyománytisztelő volta miatt a kutatók ezeket egyelőre a polcon tartják, kereskedelmi forgalomban ezek a fajták, vonalak nem találhatók meg.

Az új kényszerek és az új lehetőségek együtt teremtették meg a közeget a nemesítés második hulláma számára. A rezisztencianemesítésből kialakított fajták komoly tudományos alapokon nyugvó, célzott nemesítés eredményeként a legfontosabb gombás betegségekkel szemben ellenállóak, miközben borminőség szempontjából már felveszik a versenyt a tiszta vinfera fajtákkal.

2.4.4. A rezisztencianemesítés Magyarországon

Innovatív rezisztens szőlőfajták előállítása Magyarországon jelenleg csak a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetében folyik. Itt monogén rezisztenciaforrásokra alapozva 2000-ben indult az új szőlőnemesítési program, melynek célja olyan új komplex hibridek előállítása, melyek a versenyképes minőséget ötvözik a peronoszpóra, lisztharmat és szürkerothadással szemben magas szintű rezisztenciával. Ehhez nagy segítséget nyújt a Pécsen található közel 1600 tétellel rendelkező szőlő génbank, mely a legnagyobb hazai, s világviszonylatban a 6. legnagyobb szőlő génbank. A sokrétű rezisztenciaforrásokra alapozva sikeresen kombinálták a *M. rotundifolia*, a *V. vinifera* cv. 'Kismis vatkana', valamint a *V. Romanetii* eredetű lisztharmat rezisztenciákat, valamint a *M. rotundifolia* és a *V. amurensis* eredetű peronoszpóra rezisztenciákat egy genotípusba. Egy Run1+Ren1 vagy Ren4+Rpv1+Rpv8 génkonstrukciót tartalmazó rezisztens fajta valószínűleg hosszú távon is meg fogja őrizni rezisztenciáját. Ezen új fajták már a 6. és 7. nemzedéket jelentik a *V. vinifera* fajtákkal történő visszakeresztezésben, melyek csupán 3-4% vadfajokból származó idegen genomot tartalmaznak (Kozma et al., 2010).

Ezeknek a keresztezéseknek nemcsak a sikeres (rezisztens és kiváló minőségű) fajták előállításában van jelentőségük, hanem a genomikai kutatásokhoz nélkülözhetetlen térképezési populációk szerepét is betöltik, molekuláris marker térképek szerkesztését és ismeretlen rezisztencia gén lokuszok azonosítását is lehetővé teszik. Az így létrejött családok megfelelnek a modernkori lisztharmat és peronoszpórával szembeni rezisztencianemesítést jellemző génpiramidálási módszereknek. A 2000-es évek óta egyre gyakrabban felbukkanó feketerothadás azonban veszélyeztette ezen innovatív fajták kémiai növényvédelem nélküli termesztését. Ezért

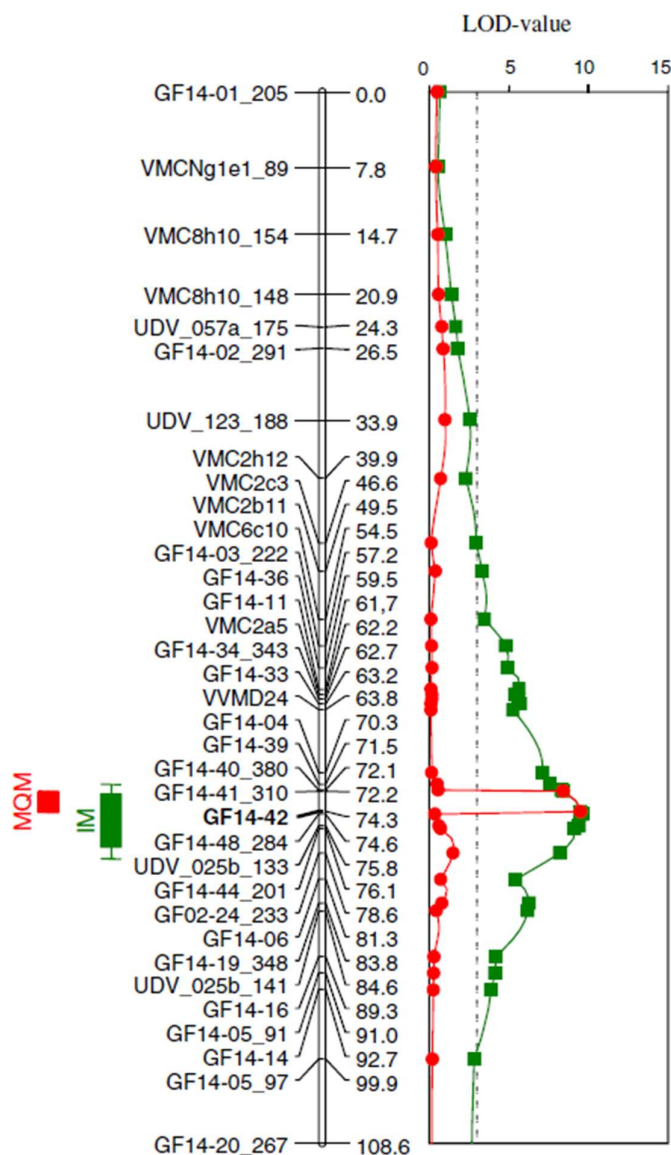
további cél a feketerothadás ellenállóság beépítése az ígéretes fajtákba, fajtajelöltekbe. Ezek a fajták jelenthetik a biológiai alapot a környezetbarát mezőgazdasági gyakorlat és a biogazdálkodás számára.

3. Anyag és módszer

A szakdolgozat egyik alapja egy tanulmány (Bettinelli et al., 2023), ahol egy szegregáló populációt értékelték, amely a 'Merzling' (hibrid, ellenálló) és a 'Teroldego' (*V. vinifera*, érzékeny) keresztezéséből származik, és a feketerothadás ellenállást a hajtás és a fürt szintjén vizsgálták. A leszármazottakat GrapeReSeq Illumina 20K SNPchip segítségével genotipizálták, 7175 SNP-t kombinálva 194 SSR-rel, hogy egy magas sűrűségű összefüggési térképet készítsenek, amely 1677 cM hosszú. A hajtásokkal végzett kísérleteken alapuló QTL analízis megerősítette a már korábban azonosított *Guignardia bidwellii* ellenállás (R_{gb1}) lókuszt a 14. kromoszómán, amely a fenotípiai variancia akár 29,2%-át is megmagyarázta, csökkentve a genom intervallumát 2,4-ről 0,7 Mb-ra. Az R_{gb1} fölött a tanulmány egy új QTL-t tárt fel, amely a fürt ellenállás varianciájának akár 79,9%-át magyarázza, R_{gb3} néven. A két QTL-t körülvevő fizikai régió nem tartalmaz annotált ellenállási (R) géneket. Az R_{gb1} lókuszt a floem dinamikájához és a mitokondriális protontranszferhez tartozó génekben gazdagodott, míg az R_{gb3} a patogenezissel kapcsolatos Germin-féle fehérje gének, a programozott sejthalál promótereinek klaszterét mutatta. Ezek a eredmények a mitokondriális oxidatív robbanás és a floem elzáródás erős részvételére utalnak a feketerothadás rezisztencia mechanizmusokban, és új molekuláris eszközöket biztosítanak a szőlő markerekkel támogatott nemesítéséhez (Bettinelli et al., 2023).

A feketerothadást okozó kórokozó életciklusának tanulmányozása érdekében végzett intenzív munkák (Spotts, 1977, Ferrin and Ramsdell, 1978, Jailloux, 1992, Kuo and Hoch, 1996, Shaw and Hoch, 1999, Hoffman et al., 2002, Northover, 2008, Ullrich et al., 2009, Wicht et al., 2012, Onesti et al., 2017) ellenére azonban a betegséggel szembeni ellenállás genetikai alapjait még nem sikerült teljes mértékben feltárni (Bettinelli et al., 2023).

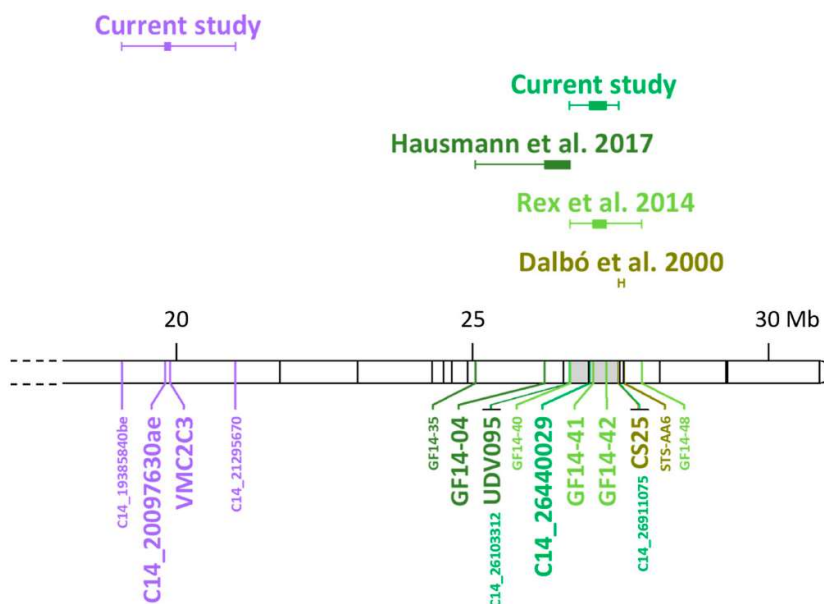
Rex és munkatársai (Rex et al., 2014) azonosították a 14. kromoszómán található, a feketerothadással szembeni rezisztenciára vonatkozó R_{gb1} mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókuszt (QTL), amelyet nagyfelbontású térképezés után a teljes adatsorral elemeztek (5.ábra).



5. Ábra: Feketerothadással szembeni rezisztenciára vonatkozó Rgb1 mennyiségi tulajdonsági lókuszt (Rex et al., 2014)

Bettinelli és munkatársai (Bettinelli et al., 2023) tovább fejlesztették a térképet. A 6. ábrán a jelenlegi és korábbi tanulmányok integrációja látható a PN40024.v4 (Velt et al., 2022) markerpozíciója (Mb) alapján. A dobozdiagramok az MTL-intervallumokat (mennyiségi tulajdonsági lókuszt) ábrázolják a ko-szegregáló markerek (nagyobb betű) alapján, a legközelebbi, nem asszociált határoló markerekhez (kisebb betűt) kiterjesztve (hibasávok). A tanulmányban (Bettinelli et al., 2023) kimutatott fűterezisztenciához kapcsolódó Rgb3 lila színnel van jelölve. A levélrezisztenciával társított Rgb1 lókuszt a jelenlegi és korábbi munkákban (Rex et al., 2014, Hausmann et al., 2016, Dalbó et al., 1998) azonosított markereket különböző zöld árnyalatokkal

jelölték. Ugyanez a színkód szerepel a megfelelő markereknél is. Az elemzések átfedése szűr-
kével van kiemelve (6. ábra).

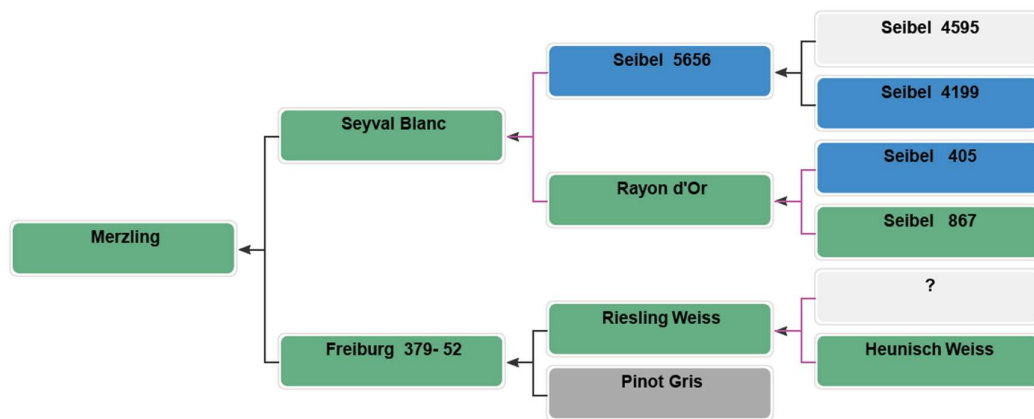


6. Ábra: Jelenlegi és korábbi tanulmányok integrációja látható a PN40024.v4 (Velt et al., 2022) markerpozíciója (Mb) alapján

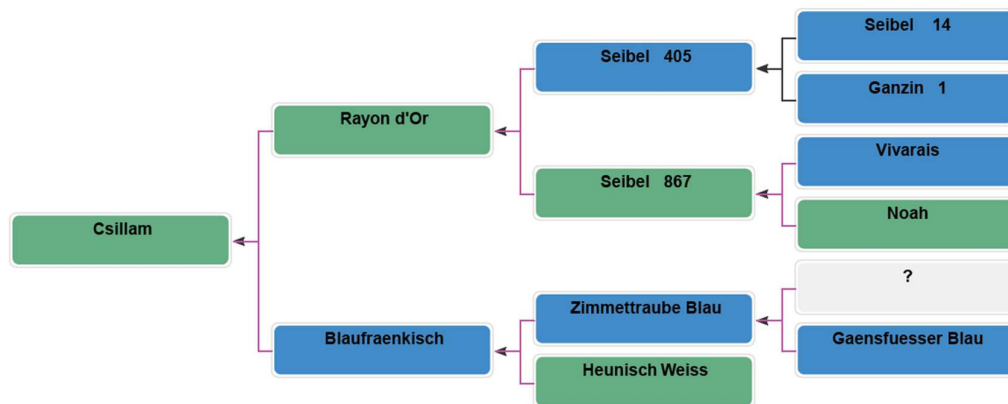
Ezen eredményekre alapozva készült a szakdolgozat, ahol Dr. Kozma Pállal együttműködve a nemesített fajtáiból végeztünk vizsgálatokat ezen markerek felkutatására.

3.1. A legfontosabb feketerothadás rezisztencia források származása

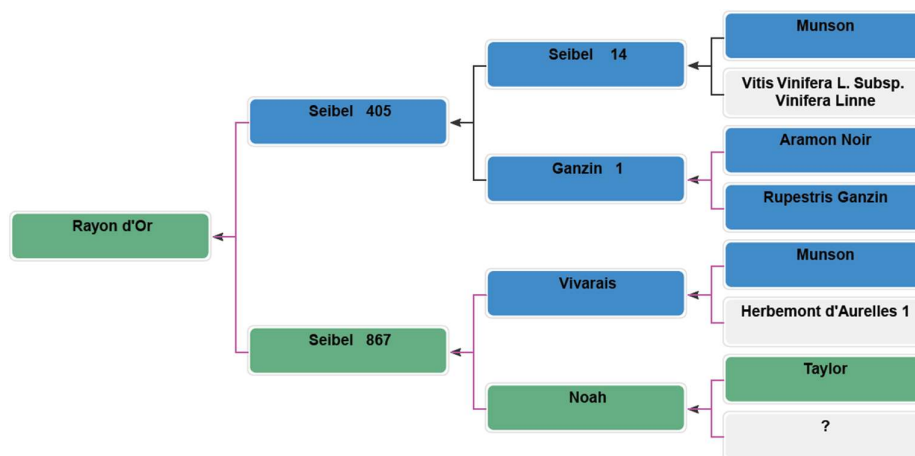
A korábbi eredmények alapján a rezisztens Merzling és Csillám fajtában megvan a feketerothadás ellenállóság, így az ő családfáikat illesztettem be ide (7-9. ábra), hiszen a genetikai markerek az ő szüleiktől öröklődhetnek. A 2 szőlő fajta őseiben közös Rayen d'Or fajta lehet az, akiben megvan az ellenállóság. Emellett azonban fontos azt is vizsgálni, hogy mely fajták fogékonyak, ezért 51 különböző genotípust vizsgáltunk a kutatás során.



7. Ábra: Merzling szőlő családfája



8. Ábra: Csillám szőlő családfája



9. Ábra: Rayon d'Or szőlő családfája

3.2. A vizsgálatba vont genotípusok

A kutatás során az 1. táblázatban felsorolt szőlő fajták / genotípusok vizsgálatát végeztük el.

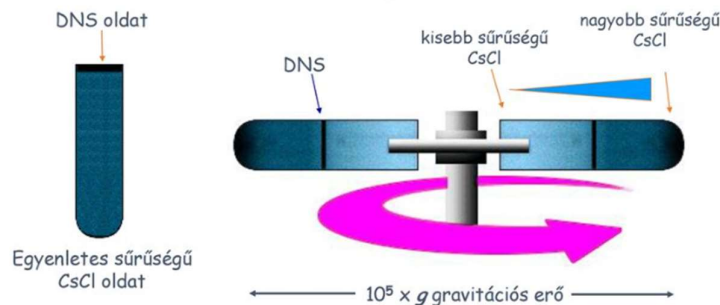
1. Táblázat: Vizsgált szőlő fajták

CSFT-61	Seibel 4995	I-14-20/3	Sz83	I-14-4/3
CSFT-92	Seibel 4986	Csillám	Jázmin	I-14-7/2
5-10-6	Bronner	01-1/797	Felícia	I-14-8/1
5-11-2	BR-16	Sz234	Seibel 4643	I-15-7/5
01-1/474	Cabernet cortis	R140	Seibel 5656	Piros tramini
Muscaris	Chancellor	R187	5-11-6	Merlot
Solaris	Malverina	R95	I-3-11/2	Furmint
Cabernet carol	Rinot	Sz241	I-3-11/3	
Souvignier gris	I-13-6/2	Sz213	I-3-11/4	
Merzling	I-15-6/2	Sz113	I-13-4/7	
SV-5276	I-13-2/1	Sz112	I-14-2/3	

3.3. DNS kivonás

DNST több szinten lehet jellemezni. A legpontosabb információt egy genomról a teljes DNS-szekvenálás révén nyerhetjük, ami azt jelenti, hogy meghatározzuk a bázissorrend teljes sorozatát. A molekuláris genetikai markerezés széles spektrumot ölel fel, melynek segítségével a genom vagy különböző DNS-szakaszok alapján nyerhetünk információt, általában szekvenciaspecifikus adatokat. Továbbá, a genomok jellemzése során figyelembe vehetjük a benne található ismétlődő szekvenciák arányát, valamint a bázisösszetételt (GC arány). Ezek az alapvető információk lehetővé teszik, hogy különbségeket fedezzünk fel az egyes szervezetek genomjai között.

Az egyensúlyi sűrűséggradiens centrifugálás a DNS tisztítására és molekulatömegének meghatározására is lehetőséget ad. Egy kettősszalú DNS molekula tömege az azt felépítő nukleotidok számától és azok egymáshoz viszonyított arányától függ. Ez megfordítva, a DNS molekulatömegéből következtethetünk annak méretére és bázisösszetételére. A CsCl nagy molekulatömegű só. Sűrű oldata nagy fordulatszámú centrifugálás (ultracentrifuga) során gradienst hoz létre, mivel a só a cső alja felé kezd ülepedni. Ha a centrifugálás előtt az oldathoz DNSt keverünk, a centrifugálás során a DNS a kialakuló CsCl gradiensben abba az irányba fog vándorolni, ahol a saját sűrűsége megegyezik a környezete sűrűségével. A folyamat végére (kb. 12 óra) a DNS zónát képez a gradiensben, ezáltal tisztán elválik az egyéb sűrűségű molekuláktól, pl. fehérjéktől vagy RNStől. A módszer a G–C tartalom becslésére is alkalmas, mivel 1.691–1700 g/ml sűrűség ~40–50 % GC tartalom, illetve 1,660±0,098 % (G+C) értéknek felel meg.



A centrifugálás során a DNS a faj súlyának megfelelő sávban gyűlik össze

10. Ábra: A cézium klorid sűrűséggradiens ultracentrifugálás elve

Denaturációnak, vagy olvadásnak nevezzük azt a jelenséget, amikor a DNS két szálát hő, vagy sóoldatok segítségével egymástól elválasztjuk és ezzel a hidrogénhid kötések felszakítjuk. A denaturáció mértékét a DNS oldat fényelnyelése alapján tudjuk követni. A két szálú DNS fényabszorpciója a két egyszálú fonál fényelnyeléséhez képest kisebb. Így a DNS denaturációja spektrofotometriás úton nyomon követhető az optikai denzitás növekedésével. Az olvadáspont görbe egy jellegzetes szigmoid görbe. A DNS olvadása, denaturációja egy viszonylag szűk hőmérséklettartományban következik be. Ennek a hőmérséklettartománynak a helye azonban nagymértékben függ a DNS bázisösszetételétől. A görbe inflexió pontja (T_m) az a hőmérséklet, amely hőmérsékleten a DNS molekulának 50 %-a denaturált állapotban van. Mivel a DNS olvadása a hidrogénhid kötések felbomlásának eredménye, a reakció szempontjából nem mindegy, hogy AT vagy CG bázisokról van szó. A citozin és guanin ugyanis három, míg az adenin és a timin csak két hidrogénhid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Minél magasabb egy DNS citozin és a bázispárosodás miatt egyben guanin aránya, annál nehezebben válik el a két szál egymástól, annál magasabb lesz az olvadáspontja. A GC tartalom 1 % növekedése a T_m érték 0,4 °C-os emelkedését eredményezi.

3.3.1. Szőlőlevélből történő DNS kivonás menete

A DNS kivonás (Xu et al., 2004) tanulmány alapján készült.

Felhasznált pufferek, oldatok:

- Mosópuffer (WB): 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0), 350 mM glükóz, 2% PVP, 4% β -merkaptotanol (közvetlenül felhasználás előtt adtuk hozzá)
- Extrakciós puffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8,0), 4% β -merkaptotanol, 3% (w/v) CTAB
- Kloroform-izoamilalkohol (24:1 [v/v]) (ChIsAm)
- 5 M kálium-acetát (pH 4,8) (3 M kálium, 5 M acetát)

- 3 M nátrium-acetát (pH 5,2)
- TE puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)
- 10 mg/ml RN-áz A
- Izopropanol
- 70% etanol

Protokoll:

A centrifugálási sebesség egy Eppendorf MiniSpin asztali centrifugához lett számítva

1. Gyorsan összetörtünk kb. 50 mg friss/fagyasztott növényi mintát 1 ml WB-ben (+40 µl β-merkaptotanol) egy mozsárban
2. Az anyagot áthelyeztük egy steril 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe
3. Inkubáljuk jégen 30 percig
4. Centrifugáltuk 6000 rpm-en 10 percig, majd eltávolítottuk a felülúszót
5. Hozzá adtunk 600 µl EB-t (+24 µl β-merkaptotanol) – a Genie-t használtuk
6. Hozzá adtunk 5 µl 10 mg/ml RNase A oldatot (opcionális)
7. Inkubáltuk a mintákat 65°C-on 30 percig, az inkubálás során 3-4 alkalommal meg-ráztuk a csöveket
8. Hozzá adtunk 600 µl ChIsAm-ot és 60 µl kálium-acetátot, össze ráztuk a csöveket 1 percig
9. Centrifugáltuk 13,000 rpm-en 10 percig
10. Átvittük 600 µl felülúszót egy új csőbe, hozzá adtunk 600 µl ChIsAm-ot, majd ráz-tuk a csöveket 1 percig
11. Centrifugáltuk 13,000 rpm-en 10 percig
12. Átvittünk 500 µl felülúszót új csövekbe
13. Hozzá adtunk 500 µl izopropanolt és 50 µl 3 M nátrium-acetátot
14. Inkubáltuk -20°C-on 30 percig
15. Centrifugáltuk 13,000 rpm-en 10 percig, majd eltávolítottuk a felülúszót
16. Hozzá adtunk 1 ml jéghideg 70% etanolt, inkubáltuk 5 percig szobahőmérsékleten
17. Centrifugáltuk 13,000 rpm-en 10 percig, eltávolítottuk a felülúszót
18. Megismételtük a 17. és 18. lépést
19. Eltávolítottuk a felülúszót, hagytuk levegőn száradni a pelletet (5-10 perc gyorszárí-tás)
20. Feloldottuk a pelletet 50 µl TE pufferben (vagy vízben)

3.3.2. Molekuláris genetikai markerek

A marker szó jelölő funkciójú objektumot jelent és a genetikában abban az értelemben használatos, hogy az adott bélyeg jelzi egy számunkra fontos tulajdonság meglétét. A molekuláris markerezés két szélsőséges esete: a tulajdonság (gén vagy gének) követése molekuláris markerekkel, vagy genomok azonosítása, illetve genomok közötti különbség megállapítása akár egyetlen bélyeg szintjén is. A nukleinsav alapú molekuláris markerek általában a genom egyes részleteinek (fragmentumainak) fizikai méretkülönbsége alapján (gélben elválasztott fragmensek méretének, meglétének megállapításával), vagy bizonyos szekvenciák meglétének kimutatásával (pl. hibridizációval) valamint e módszerek kombinálásával tudnak azonosítást végezni. A fragmensek képzésének két alapvető módszere a restrikciós enzimek használata, vagy genomrészletek amplifikálása PCR technikával.

3.3.3. DNS ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel

Egy oldatban található különböző hosszúságú DNS darabokat agaróz gélelektroforézissel választhatunk el egymástól. Az agaróz egy olyan biopolimer, melynek térhálós szerkezetében a nagy molekulatömegű nukleinsavak lassabban, a kicsik gyorsabban tudnak haladni. A nukleinsavak mozgása a gélben töltésük alapján történik. A negatív töltésű nukleinsavak a negatív pólustól (katód) a pozitív pólus (anód) felé vándorolnak. A nukleinsavakat legegyszerűbben etidiumbromidos festést követően UV fényben fluoreszkáló csíkokként detektálhatjuk. Az elválasztandó nukleinsavak mellett ismert méretű fragmenseket futtatva meghatározhatjuk az ismeretlen szakaszok méretét.

3.3.4. Restrikciós fragmenshossz polimorfizmus

A restrikciós endonukleázok szekvenciaspecifikus hasításán, technikák közül az RFLP (restrikciós fragmenshossz polimorfizmus) a legelterjedtebb. A restrikciós endonukleázok egy rövid (általában 4–8 b hosszú) DNS szekvenciát felismernek, és ott a kettősszalú DNSt elvágják. A vizsgálni kívánt DNSt ill. genomot ilyen restrikciós endonukleázokkal emésztve feldaraboljuk, majd a keletkezett különböző méretű fragmenseket gélelektroforézissel elválasztjuk.

Ha két mintát vizsgálunk, és az egyikben az endonukleáz felismerő helyén mutáció következett be, az egy hasítóhely elvesztését jelenti. Ennek következtében a megváltozott mintában két fragmens elvész, ugyanakkor keletkezik egy hosszabb, amelyet az enzim nem vágott ketté. A hasítás után kapott fragmenseket méretük szerint elválasztva ez a különbség detektálható. A mintázatban látható eltérés oka a DNS bázis sorrendjének változása, tehát szekvenciaspecifikusan tudtunk különbséget tenni a két vizsgált minta között, bár ez a

szekvenciárészlet a genomnak csupán elenyészően kis hányadát (~4–8 bp, azaz az enzimek felismerő helyekeit) érinti.

Ha azonban ez az apró különbség egy számunkra fontos gén kódoló részében vagy annak közvetlen közelében található, akkor lehetőségünk adódik az adott gén két változatának, azaz alléljének megkülönböztetésére, ezáltal egy tulajdonság nyomon követésére. A nemesítési munka során egy fásszárú gyümölcsfaj gyümölcsminőségét meghatározó tulajdonság elbírálására leghamarabb a fák termőre fordulásakor adódik lehetőségünk, erre azonban 2–3 évet várnunk kell. A molekuláris genetikai markerek segítségével adott esetben már magonc korban meghatározhatjuk az egyedek genotípusát, így eldönthetjük, melyik csemetéket tartjuk meg és neveljük termő fává.

Az RFLP vizsgálat közvetlenül csupán kis (bakteriális vagy citoplazmás) genomok vizsgálatára alkalmas. Annak a valószínűsége, hogy egy a genomból véletlenszerűen kiválasztott négy nukleotid hosszú szakasz éppen ezt a bázissorrendet mutatja $1/4^4$, mivel mind a négy helyen négyféle bázis (adenin, timin, citozin és guanin) szerepelhet. Egy nagyobb, eukarióta magi genom esetén az RFLP megszámlálhatatlan mennyiségű és különböző hosszúságú DNS szakaszt eredményez tehát, amelyek gélelektroforézissel sem különíthetők el egymástól.

3.4. PCR

A Polimeráz-lánreakció (PCR, Polymerase Chain Reaction) egy olyan technika, amely lehetővé teszi a DNS egy kis szakaszának többszörözését, így alkalmas további vizsgálatok elvégzésére. A módszert széles körben alkalmazzák különböző kutatásokban, például genetikai ujjlenyomat elemzéshez, orvosi diagnosztikai vizsgálatokhoz, fertőző és örökletes betegségek azonosításához, illetve olyan tudományágakban, mint az őslénytán, a régészet, és az evolúció molekuláris szintű kutatása. A PCR-hez szükséges DNS minta származhat növényi, emberi, bakteriális vagy virális forrásból.

A PCR technika alapelve a DNS szakasz in vitro replikációja, amely több lépésből álló ciklusokban valósul meg. Az első lépésben a kettős szálú DNS-t 92-95°C-ra hevítik, amely denaturációt idéz elő, így a két szál szétválik. A mintát ezután 30-65°C-ra hűtik, ahol a primerek hozzákötődnek a DNS komplementer részeihez. Ezt követően a hőmérsékletet 65-75°C-ra emelik, ahol a DNS polimeráz enzim segítségével a DNS szál szintézise megy végbe. A teljes ciklus folyamata 20-40 alkalommal ismétlődik, és eredményeképpen a kiindulási DNS szakasz körülbelül 10^6 -szorosára sokszorozódik.

Korábban az *Escherichia coli* DNS polimeráz enzimjét alkalmazták, de mivel ez az enzim hőérzékeny, minden ciklus után új adag enzimre volt szükség, ami nem volt hatékony.

Manapság egyre inkább hőstabil enzimeket használnak, közülük a leggyakoribb a *Thermus aquaticus* (Taq) baktérium DNS polimeráz enzimje. A *Thermus aquaticus* baktérium, amely gejzírekben él, optimális működési hőmérséklete 75°C körül van, és másodpercenként hozzávetőlegesen 150 nukleotid szintézisére képes.

Ahhoz, hogy a PCR során keletkező DNS fragmentumok érzékelhetők legyenek a fragmentumanalízis készülék számára, fluoreszcens festékkel kell jelölni őket. A jelölés legegyszerűbb módja az, ha a PCR termékbe fluoreszcensen jelölt primert építünk be. Bár ez a megoldás lehetőséget ad a fragmentumok azonosítására, nagy költséggel járhat, ha sokféle primerre van szükség. Egy költséghatékonyabb megoldás a „farokkal” ellátott primer módszere, ahol egy standard szekvenciát („farkat”) adnak a specifikus primer 5' végéhez.

A „farokkal” ellátott primer módszer (angolul tailed primer method) olyan primert alkalmaz, amely két részből áll: a specifikus primer mellett egy „farok”, amely megegyezik egy univerzális primer szekvenciájával, mint például az M13. Így a rendszerben elegendő, ha csak az egyik primer van fluoreszcensen jelölve, míg a PCR reakció minden további ciklusában az univerzális M13 primer (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') gondoskodik a fluoreszcens festékről.

3.5. Kapilláris elektroforézis

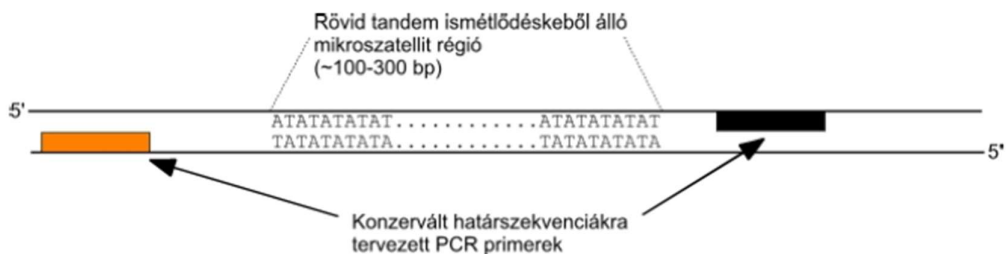
A genotipizálás egyik kulcsfontosságú lépése a PCR-termékek kapilláris szekvenáló gépen történő futtatása, ami az egyik legmegbízhatóbb módszer a genotípusok azonosítására. Ezzel a technikával pontosan meg tudjuk határozni egy adott DNS-fragmens hosszát. A kapilláris gélelektroforézis során az elválasztás egy 10-100 µm külső átmérőjű, folyékony polimerrel töltött üvegkapillárisban történik. A PCR reakció során használt primerek fluoreszcens jelölése lehetővé teszi a fragmentumok kimutatását. A vizsgálat során a fluoreszcens festéket lézerrel gerjesztik, ennek hatására különböző hullámhosszú fénykibocsátások keletkeznek. A kapilláris csőben egy meghatározott ponton elhelyezett szenzorok érzékelik ezeket az emissziós jeleket, amelyeket a számítógép rögzít. A készülék az így kapott termékek intenzitását és hosszát egy előre meghatározott standard értékhez hasonlítva elemzi (Csizmár et al., 2016).

3.6. Mikroszatellit PCR

A genomban előforduló ismétlődő szatellit szekvenciák az egymást követő (tandem) ismétlődések számának különbözősége miatt, mint molekuláris markerek használhatók. A változószámú tandem ismétlődéseket vizsgáló eljárás az ismétlődések fajon ill. nemzetségen belül konzervált határszekvenciáira specifikus primereket alkalmazva PCR reakció során

szaporítja fel az ismétlődéseket tartalmazó régiókat. Amennyiben az ismétlődések száma két minta esetében különbözik, azt méretük alapján detektálhatjuk.

A mikroszatellitek (1–5 nukleotidnyi) tandem ismétlődések (11. ábra), melyek a genom-ban szórtan helyezkednek el. A határszekvenciákra specifikus primereket igényel a vizsgálat. A fragmentumok analízise automatizálható (fragmensanalizátorok, szekvenátorok).



11. Ábra: A mikroszatellit markerek alapját adó mikroszatellit régió felépítése

2. Táblázat: Felhasznált primerek

Primer neve	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplimer hossz
GF14-42	AAAACCTTACAT-GCAGACCACC,26425685	CCTTCCC-GTACCTTCCAACACAA T [3848259]	335 bp
GF14-42P	TGGAGTAGCATGAGA-ACACCAT, 26712889	AGAAG-TGCAAACCTTACCAAGC A [3561060]	330 bp
VMC2C3F	TGCAATCCCATTAT-TATCTCTT, 20194293	AATATTTGTAGAATGG-TGCTTTT, [10079790]	196 bp

A PCR reakciókat 20 µl végtérfogatban végeztük. A reakcióelegy összetételét a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. Táblázat: A PCR reakcióhoz szükséges termékek és mennyiségük

Törzsoldat	Végkoncentráció	100 µl Mastermix	150 µl Mastermix
10x puffer ((NH₄)₂SO₄)	1x	10 µl	15 µl
25 mM MgCl₂	2 mM	8 µl	12 µl
10 mM each dNTP	0,2 mM	2 µl	3 µl

5x primer mix	1x	20 µl	30 µl
M13F (0,05 µM)	0,01µM	-	-
FAM-M13 (0,625 µM)	0,125 µM	-	-
R (0,625 µM)	0,125 µM	-	-
1 U/µl Taq	1U/rxn	5 µl	7,5 µl
DNS	2 µl/rxn	10 µl	-
3x DW	1,35x	45 µl	67,5 µl

A polimeráz láncreakció folyamatának működési elvét és mechanizmusát a 4. táblázat ismerteti.

4. Táblázat: A PCR program ciklusai

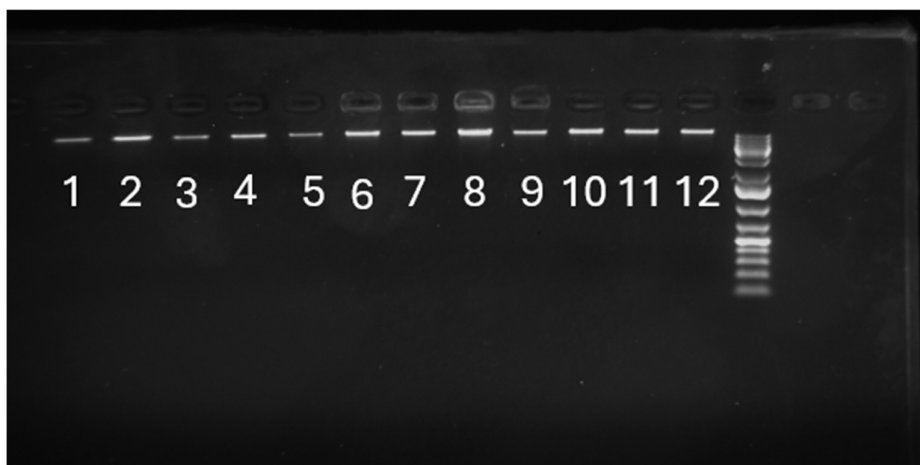
Hőfok (°C)	Idő (min)	Ciklusok száma
94	5	1 (elődenaturáció)
94	0,5	40x
50	0,5	
72	1,5	
72	30	1 (lánczáró denaturáció)
4	∞	1 (lehűtés)

4. Eredmények és megvitatásuk

A kutatás során 51 szőlő mintát és 3 különböző primert használtunk. A minták előkészítésében, DNS kivonásban, PCR termékek elkészítésében a hallgatók és témavezetőm is sokat segítettek, így nem egyedül végeztem az összes mintának az előkészítését. A minták szőlőlevél formában álltak rendelkezésre melyet a DNS kivonásig fagyasztoóban tároltunk

4.1. DNS kivonás

A DNS tisztítást 51 szőlőfajtából vett mintán végeztük el, és nyertük ki az örökítőanyagot. A DNS kivonás sikerességét PCR-rel ellenőriztük és azon minták esetében, ahol a DNS ki-nyerés nem volt megfelelő ott megismételtük a DNS kivonását a 3.3.1.-es fejezetben leírtak-nak megfelelően. A DNS kivonás sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A gélen 2 ul DNS futtatási képe látható (12. ábra).

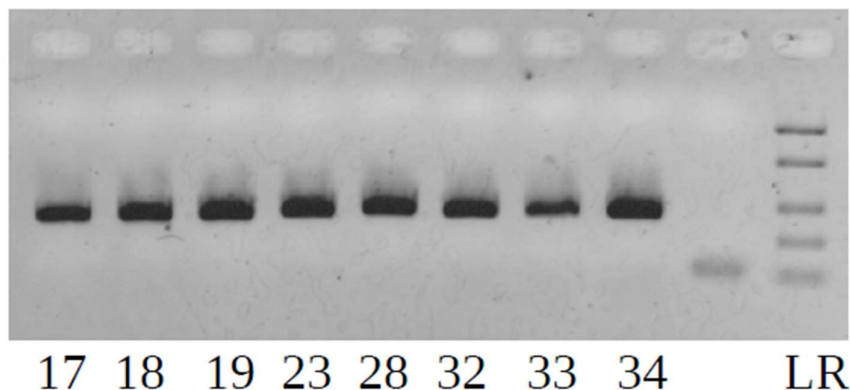


12. Ábra: A 12 mintából kivont DNS gélelektroforézis képe: 1. CSFT-61, 2. CSFT-92, 3. S-10-6, 4. S-11-2, 5. 01-1/474, 6. Muscaris, 7. Solaris, 8. Cabernet carol, 9. Sauvignier gris, 10. Merzling, 11. SV-5276, 12. Seibel 4995.

4.2. PCR

A DNS kivonatok reakcióképességének ellenőrzése érdekében a mintákon mikroszatellit PCR analízist végeztünk a 2. Táblázatban jelölt 3 különböző markerrel, amelyek közül a GF-14-42 markert végül nem értékeltük ki, mivel az a munkánk alapjául szolgáló tanulmányban tévesen szerepel.

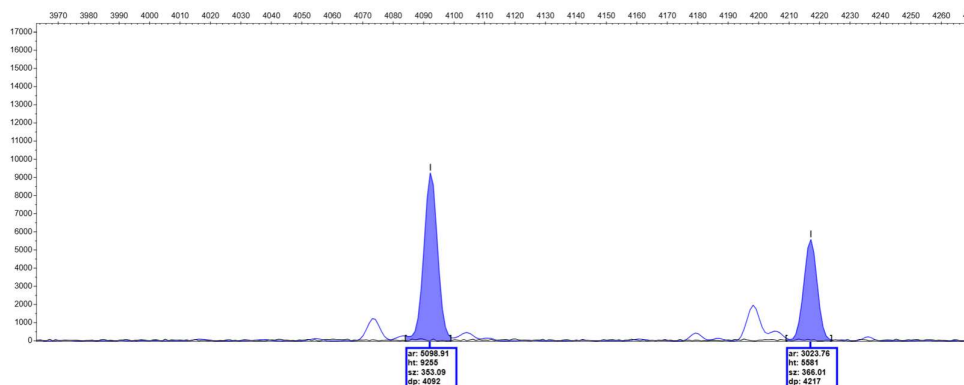
A 13. ábrán néhány minta PCR termékét mutatom be. A géleken 8 ul minta futott, a méretmarker 4 ul Thermo FastRuler LowRange.



13. ábra: PCR termékek a 17. Chancellor, 18. Malverina, 19. Rinot, 23. I-14-20/3, 28. R187, 32. Sz113, 33. Sz112, 34. Sz83 minták esetében.

4.3. Kapilláris elektroforézis

A fluoreszcens festékekkel megjelölt PCR termékeinket a Biomi Kft. DNS laboratóriumának küldtük el kapilláris gélelektroforézis vizsgálatra a fragmenshosszak meghatározásához. A PeakScanner nevű szoftver segítségével leolvastuk a méretmarker csúcsokhoz tartozó fragmenshosszakokat és megkaptuk a várt bázispár nagyságú peak-eket. A kiértékelés menetét a Csillám eredményein mutatom be. A fekete csúcsokra és a 6-FAM fluoreszcens festékekkel jelölt PCR-termékek görbéire (kék görbék) összpontosítottunk, így a többi görbe színét ki-kapcsoltuk. Ezzel a csúcsokhoz tartozó fragmenshosszak jól kivehetővé váltak. Ezt követően leolvastuk 4100 sec körül a legnagyobb a csúcsokhoz tartozó adatokat.



14. Ábra: Csillám fragmenshossz analízis eredményei

A rezisztenciához köthető allél a 354-es, így ezeket vörös színnel kiemeltük az 5. táblázatban, és amikre 354 körüli értéket kaptunk ott kézzel átjavítottuk 354-re. Az így kapott minták a következők: CSFT-61, CSFT-92, 5-10-6, Muscaris, Solaris, Cabernet carol, Souvignier gris, Merzling, SV-5276, Seibel 4995, Seibel 4986, Bronner, BR-16, Cabernet cortis,

Chancellor, Malverina, Rinot, Jázmin, Seibel 5656, 5-11-6, I-3-11/2. A további allél párokat azonos színnel jelöltük (5. táblázat).

Érdekes, hogy eredményeim alapján a Csillám szőlőfajta nem azt az allélt (354 bp) örökölte a Rayon d'or szülőtől, mint a Nyugat-Európában nemesített, feketerothadás ellenálló szőlőfajták, mégis mutat ellenállóságot. Mivel a Rayon d'or fajta másik allélja (353 bp) más feketerothadás ellenálló fajtákban is megtalálható nem zárható ki, hogy a kérdéses lókuszhoz kapcsolt *rgb1* génre nézve homozigóta nemesítési vonalak is rendelkezésre állnak (pl. Rayon d'or, BR16, Seibel 5656).

A bogyó, illetve fürt ellenállóságát részben meghatározó *rgb3* lókuszhoz kapcsolt VMC2C3 marker esetében nem találtunk olyan allélt, amely a vizsgált ellenálló mintákban jelen lenne, míg a fogékony mintákban nem található meg. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy sok hibrid, vagy akár fajta esetében nem rendelkezünk információval a fürt feketerothadás ellenállóságának mértékéről.

5. Táblázat: Fragmenshossz analízis eredményei a GF14-42P és VMC2C3 markereknek megfelelően

No.	Minta	Rezisztencia	Fürtrezisztencia?		GF14-42P tisztázva		VMC2C3 tisztázva	
1	CSFT-61	R	R	Csillám tesó	354	367	181	184
2	CSFT-92	R	R	Csillám tesó	354	367	184	185
3	5-10-6	R	R	V. amurensis	354	356	184	189
4	5-11-2	R	R	V. amurensis	348	350	184	189
5	01-1/474	S	S		367	375	189	215
6	Muscaris	R	R		351	354	181	184
7	Solaris	R	R		354	357	181	198
8	Cabernet carol	R	R		350	354	198	198
9	Souvignier gris	R	R		354	367	181	209
10	Merzling	R	R		354	356	181	189
11	SV-5276	R	R	Seyval blanc	354	355	181	212
12	Seibel 4995	R	R		354	367	181	214
13	Seibel 4986	R	R	Csillám szülő (Rayon d'Or)	353	354	181	184
14	Bronner	R	R	Fürt kevésbé	351	354	181	212
15	BR-16	R	R	SV × V rup	353	354	182	212
16	Cabernet cortis	S	S		350	366	198	198
17	Chancellor	R	S		354	362	188	189
18	Malverina	R	S/R		350	354	184	198
19	Rinot				353	354	188	188
20	I-13-6/2	?			350	366	184	198
21	I-15-6/2	?			350	366	198	214
22	I-13-2/1	?			353	366	198	214
23	I-14-20/3	?			357	374	214	214
24	Csillám	R			353	366	184	209
25	01-1/797	S		Hibrid szülő	366	374	189	214
26	Sz234	S			353	366	189	209
27	R140	R			353	366	189	209
28	R187	R			353	366	184	189
29	R95	R			353	366	189	209
30	Sz241	S			366	374	209	214
31	Sz213	S			364	366	189	209
32	Sz113	S			364	366	189	209
33	Sz112	S			366	374	209	214
34	Sz83	S			366	374	209	214
35	Jázmin	S			354	366	184	212
36	Felícia	R?			351	366	184	198
37	Seibel 4643				353	366	181	184
38	Seibel 5656				353	354	184	212
39	5-11-6				354	356	184	188
40	I-3-11/2				350	354	188	198
41	I-3-11/3				353	366	181	184
42	I-3-11/4				366	366	184	198
43	I-13-4/7				353	366	198	214
44	I-14-2/3				351	366	198	214
45	I-14-4/3				366	374	188	214
46	I-14-7/2				353	366	198	214
47	I-14-8/1				351	366	189	214
48	I-15-7/5				353	366	198	214
49	Piros tramini				351	366	184	188
50	Merlot				351	351	188	198
51	Furmint				ND	ND	184	198

Bár úgy tűnik, hogy a GF-14-42 marker ígéretes lehet a marker-alapú szelekcióban a levelek feketetrohadással szembeni rezisztenciájának azonosítására, a bogyók rezisztenciáját célzó marker kérdése még nem megoldott, ezért további vizsgálatok szükségesek.

5. Összefoglalás

A szakdolgozatom során a szőlő feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) elleni védekezési stratégiákról és DNS-markereken alapuló genetikai módszerek lehetőségeiről szólni szeretnék. A feketerothadás, amely Észak-Amerikából került be Európába a 19. század végén, súlyos problémát jelent az európai szőlőültetvények számára, különösen csapadékos években, amikor a fertőzés a termés akár 80-100%-át is megsemmisítheti. Az egyik leghatékonyabb fenntartható megoldás a rezisztens szőlőfajták nemesítése, amelyek termesztése révén csökkenthető a vegyszerhasználat. Az ellenálló szőlőfajták előállítása idő- és költségigényes, mivel a nemesítési folyamat során a keresztezett utódokat hosszú időn keresztül, nagy területen kell fenntartani. Az új rezisztens fajták kifejlesztése gyakran legalább 5-6 évet igényel, mivel a kórokozókkal szembeni tartós rezisztencia több gén kombinálásával érhető el. A kísérleti részben különböző marker-alapú molekuláris genetikai vizsgálatokat végeztünk, amelyekkel a feketerothadás-rezisztens géneket azonosítottuk.

A szakdolgozat gyakorlati részét a DNS kivonással kezdtük, majd PCR vizsgálattal ellenőriztük a DNS kinyerés sikerességét. A fluoreszcens festékkel megjelölt PCR termékeinket a Biomi Kft. DNS laboratóriumának küldtük el kapilláris gélelektroforézis vizsgálatra a fragmenshosszak meghatározásához.

Magyar viszonylatban a feketerothadással szembeni rezisztens fajták nemesítése különösen fontos szerepet kap a környezetkímélő, bio- és ökológiai gazdálkodás térnyerése miatt. A kutatás során az ellenálló Merzling és Csillám fajták genetikai marker-alapú vizsgálatával feltártuk a rezisztencia forrását, így ezek a fajták fontos genetikai alapot nyújthatnak a jövőben nemesítendő, fenntartható szőlőfajták számára. A rezisztens szőlőfajták elterjesztése hosszú távon jelentős előrelépést hozhat a fenntartható szőlőtermesztésben, és csökkentheti a környezetre és az egészségre káros növényvédő szerek használatát.

Irodalomjegyzék

- <https://slideplayer.hu/slide/12051799/> [Online]. [Accessed 2024.11.06].
- BETTINELLI, P., NICOLINI, D., COSTANTINI, L., STEFANINI, M., HAUSMANN, L. & VEZZULLI, S. 2023. Towards Marker-Assisted Breeding for Black Rot Bunch Resistance: Identification of a Major QTL in the Grapevine Cultivar 'Merzling'. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 3568.
- CATTELL, H. & MILLER, L. 1980. The Wines of the East–Native American Grapes. Eastern Wine Publications.
- DALBÓ, M., WEEDEN, N. & REISCH, B. QTL analysis of disease resistance in interspecific hybrid grapes. VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding 528, 1998. 217-222.
- FERRIN, D. M. & RAMSDELL, D. 1978. Influence of conidia dispersal and environment on infection of grape by *Guignardia bidwellii*. *Phytopathology*, 68, 892-895.
- HARMS, M., HOLZ, B., HOFFMANN, C., LIPPS, H. & SILVANUS, W. 2005. Occurrence of *Guignardia bidwellii*, the causal fungus of black rot on grapevine, in the vine-growing areas of Rhineland-Palatinate, Germany.
- HAUSMANN, L., REX, F. & TÖPFER, R. Evaluation and genetic analysis of grapevine black rot resistances. X International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology 1188, 2016. 285-290.
- HOFFMAN, L. E., WILCOX, W. F., GADOURY, D. M. & SEEM, R. C. 2002. Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length. *Phytopathology*, 92, 1068-1076.
- HOFFMANN, S., ROZNIK, D., KOZMA, P. & DULA, T. 2018. Fokozódó jelentőségű, új kihívást jelentő betegség a szőlőültetvényekben: a feketerothadás. *Agrofórum extra*, 76, 60-63.
- JAILLOUX, F. 1992. In vitro production of the teleomorph of *Guignardia bidwellii*, causal agent of black rot of grapevine. *Canadian journal of botany*, 70, 254-257.
- KELLNER, N. 2022. A szőlő (*Vitis vinifera*) feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) fertőzésre adott transzkriptom szintű válasza és a fertőzött bogyók finomanalitikai összetétele. Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem.
- KOCH, E., ENDERS, M., ULLRICH, C., MOLITOR, D. & BERKELMANN-LÖHNERTZ, B. 2013. Effect of Primula root and other plant extracts on infection structure formation of *Phyllosticta ampellicida* (asexual stage of *Guignardia bidwellii*) and on black rot disease of grapevine in the greenhouse. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120, 26-33.
- KOZMA, P., WERNER, J., CSIKÁSZINÉ-KRIZSICS, A. & HOFFMANN, S. 2010. Német Márton hagyatéka Pécsen, kutatásainak hatása a mai szőlőkultúrára. *Kertgazdaság*, 42, 56-72.
- KUO, K. & HOCH, H. 1996. Germination of *Phyllosticta ampellicida* Pycnidiospores: Prerequisite of Adhesion to the Substratum and the Relationship of Substratum Wettability. *Fungal Genetics and Biology*, 20, 18-29.
- LINHART GYÖRGY, M. G. 1892. A szőlő „black rot” betegsége. *Természettudományi Közlöny XXIV. Kötet*.
- LIPPS, H. & HARMS, M. 2004. Schwarzfäule ein neues Problem im deutschen Weinbau. *Die Winzer-Zeitschrift*, 19, 28-29.
- LOSKILL, B., MOLITOR, D., KOCH, E., HARMS, M., BERKELMANN-LÖHNERTZ, B., HOFFMANN, C., KORTEKAMP, A., PORTEN, M., LOUIS, F. & MAIXNER, M. 2009. Strategien zur Regulation der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) im ökologischen Weinbau.
- LUTTRELL, E. 1946. Black rot of muscadine grapes.

- MIKULÁS, J., LÁZÁR, J. & NYESTI, P. 1999. Hazai szőlőültetvényeink új gombabetegségének (Feketerothadás-Guignardia Bidwellii) jelentősége Tokaj-Hegyalján. *Tiszántúli Növényvédelmi Fórum (1999)(Debrecen). Összefoglalók*, 25-26.
- MOHR, H. D. & HERRMANN, J. V. 2005. *Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nutzlinge an der Weinrebe*, Ulmer.
- MOLITOR, D., HEIBERTSHAUSEN, D., BAUS, O., LOSKILL, B., MAIXNER, M. & BERKELMANN-LÖHNERTZ, B. 2010. Einsatz eines Sapindus mukorossi-Extraktes zur Regulierung von pilzlichen Pathogenen an Weinreben—eine Alternative für den ökologischen Rebschutz? *Journal für Kulturpflanzen-Journal of Cultivated Plants*, 62, 444.
- NORTHOVER, P. R. 2008. *Factors influencing the infection of cultivated grape (Vitis spp. section Euvitis) shoot tissue by Guignardia bidwellii (Ellis) Viala & Ravaz*, The Pennsylvania State University.
- ONESTI, G., GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E. & ROSSI, V. 2017. Production of pycnidia and conidia by Guignardia bidwellii, the causal agent of grape black rot, as affected by temperature and humidity. *Phytopathology*, 107, 173-183.
- ONESTI, G., GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E., MANSTRETTA, V. & ROSSI, V. 2018. Release of Guignardia bidwellii ascospores and conidia from overwintered grape berry mummies in the vineyard. *Australian journal of grape and wine research*, 24, 136-144.
- RAKONCZÁS, N. 2014. Szőlőtermesztés.
- RAMSDELL, D. & MILHOLLAND, R. 1988. Compendium of Grape Diseases. Pearson, RC.
- REX, F., FECHTER, I., HAUSMANN, L. & TÖPFER, R. 2014. QTL mapping of black rot (Guignardia bidwellii) resistance in the grapevine rootstock ‘Börner’ (V. riparia Gm183 × V. cinerea Arnold). *Theoretical and Applied Genetics*, 127, 1667-1677.
- REYNOLDS, A. 2015. Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 268, 397.
- RINALDI, P. A., SKAVENTZOU, M., ROSSI, M., COMPARINI, C., SOFIA, J., MOLITOR, D. & MUGNAI, L. 2013. Guignardia bidwellii: Epidemiology and symptoms development in Mediterranean environment. *Journal of Plant Pathology*, S1. 80-S1. 80.
- ROZNIK, D. 2019. *A feketerothadás (Guignardia bidwellii (Ellis) Viala et Ravaz) elleni rezisztencia források azonosítása és felhasználhatósága a szőlő rezisztencia nemesítésében*.
- ROZNIK, D., HOFFMANN, S. & KOZMA, P. 2017. Feketerothadás, az új kihívás a szőlő rezisztencia nemesítésében. *Jelenkori Társadalmi és Gazdasági Folyamatok*, 12, 113-117.
- SCHÖNBECK, F. & SCHLÖSSER, E. 1976. Preformed substances as potential protectants. *Physiological plant pathology*. Springer.
- SHAW, B. & HOCH, H. 1999. The pycnidiospore of Phyllosticta ampellicida: surface properties involved in substratum attachment and germination. *Mycological Research*, 103, 915-924.
- SPOTTS, R. A. 1977. Effect of leaf wetness duration and temperature on the infectivity of Guignardia bidwellii on grape leaves. *Phytopathology*, 67, 1378-1381.
- TRAVIS, J., HED, B. & MUZA, A. 2005. Control of black rot in organic grape production systems. Research Report to the New York Wine/Grape Foundation, The Grape Production
- ULLRICH, C. I., KLEESPIES, R. G., ENDERS, M. & KOCH, E. 2009. Biology of the black rot pathogen, Guignardia bidwellii, its development in susceptible leaves of grapevine Vitis vinifera.
- VELT, A., FROMMER, B., BLANC, S., HOLTGRÄWE, D., DUCHÊNE, É., DUMAS, V., GRIMPLET, J., HUGUENEY, P., LAHAYE, M. & KIM, C. 2022. An improved reference of the grapevine genome supports reasserting the origin of the PN40024 highly-homozygous genotype. *BioRxiv*, 2022.12. 21.521434.
- WICHT, B., PETRINI, O., JERMINI, M., GESSLER, C. & BROGGINI, G. A. L. 2012. Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete Guignardia

- bidwellii, agent of grape black rot: a polyphasic approach to fungal identification. *Mycologia*, 104, 1036-1045.
- WILCOX, W. F. 2003. Black rot.
- CSIZMÁR, N., JÁVOR, A. & KUSZA, S. 2016. Mikroszatellit markerek vizsgálata dorper juh fajtában.
- GALET, P. 1988. *Cépages et vignobles de France: Les vignes américaines*, C. Déhan.
- XU, Q., WEN, X. & DENG, X. 2004. A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii* tratt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 301-302.

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Takács Kata
A Hallgató Neptun kódja: IE70C1
A dolgozat címe: Szőlő feketerothadáshoz kapcsolt DNS markerek validálása
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szőlészeti és Borászati Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Szőlészeti Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottnak tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumába. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumában.

Kelt: 2024. év 11. hó 12. nap

Takács Kata

Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Takács Kata (név) (hallgató Neptun azonosítója: IE70C1) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védeésre **javaslom / nem javaslom.**

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2024. év november hó 11. nap



belső konzulens