

DIPLOMADOLGOZAT

Marton Mirjam

Mezőgazdasági biotechnológus MSc

Gödöllő

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Mezőgazdasági Biotechnológus MSc szak

**GENETIKAI MARKEREK HASZNÁLATA A SZŐLŐNEMESÍTÉS
HATÉKONYSÁGÁNAK NÖVELÉSÉRE**

Belső konzulens: : Dr. Szőke Antal

egyetemi docens

Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kitti

egyetemi adjunktus

Intézete/Tanszéke: Genetika és Genomika Tanszék

Készítette: Marton Mirjam

AHZMSG

levelező tagozat

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Gödöllői Campus

MATE Genetika és Biotechnológiai Intézet, Genetika és Genomika Tanszék

2024

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
2. CÉLKITŰZÉS.....	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. A szőlő.....	5
3.2. Szőlőtermesztés és éghajlatváltozás: Kihívások és megoldások.....	7
3.3. A szőlő lisztharmat (<i>Erysiphe necator</i>).....	8
3.4. A szőlő peronoszpóra (<i>Plasmopara viticola</i>).....	9
3.5. Rezisztencia gének	10
3.5.1. Lisztharmat rezisztencia gének	11
3.5.2. Peronoszpóra rezisztencia gének.....	15
3.6. A genetikai markerek szerepe a szőlőnemesítésben.....	18
3.7. Markerrel kapcsolt tulajdonságok	22
3.8. A nemzetközi szőlőnemesítési eredmények és a genetikai kutatások fejlődése.....	24
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	26
4.1. Vizsgált fajták/ genotípusok	26
4.2. DNS izolálás.....	27
4.3. PCR (Polimeráz Láncreakció).....	28
4.4. Agaróz gélelektroforézis	29
4.5. Rezisztencia gének kimutatása Automata Lézer Fluorométer segítségével	30
5. EREDMÉNYEK	31
5.1. A szőlő bogyószín markerezése	31
5.2. A lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia gének vizsgálata	33
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	34
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	36
FORRÁSOK	37

1. BEVEZETÉS

A szőlő, mint egyik legjelentősebb mezőgazdasági kultúrnövény, évszázadok óta kiemelt szerepet játszik a világ különböző tájain. A szőlőtermesztés és a borászat nemcsak gazdasági, hanem kulturális és társadalmi szempontból is meghatározó iparág. Azonban az elmúlt évtizedekben az éghajlatváltozás következtében jelentős kihívásokkal néz szembe a szőlőtermesztés: a hőmérséklet emelkedése, a csapadék eloszlásának változásai, a szélsőséges időjárási események gyakoribbá válása és a betegségek terjedése mind komoly fenyegetést jelentenek a hagyományos termesztési módszerekre.

Az éghajlatváltozás hatásai miatt a szőlőtermesztési környezet folyamatosan változik, és a korábban bevált termesztési technikák egyre kevésbé képesek fenntartani a stabil terméshozamot és minőséget. A fajták variabilitása csökken, a betegségekre való hajlam növekszik, és a növényvédő szerek hatékonysága is fokozatosan csökken. Az új termesztési környezetben a kórokozók ellenállóbbá válnak, és egyre több kihívást jelentenek a szőlőtermesztők számára. Ez a helyzet sürgetővé teszi a szőlőnemesítési módszerek megújítását és hatékonyságának növelését.

A szőlőnemesítés egyik legígéretesebb iránya a genetikai markerek alkalmazása. A genetikai markerek olyan specifikus DNS-szekvenciák, amelyek kapcsolatosak bizonyos tulajdonságokkal. Ezek a markerek lehetővé teszik a szőlőfajták tulajdonságainak gyors és pontos felismerését, így segítve a nemesítők munkáját abban, hogy célzottan válasszanak ki olyan genotípusokat, amelyek a kívánt tulajdonságokkal rendelkeznek.

A genetikai markerek segítségével a szőlőfajták nemesítése jelentősen felgyorsítható, hiszen a nemesítési folyamat során nem szükséges hosszú éveket várni a fenotípusos megnyilvánulások megfigyelésére. A markerek lehetőséget adnak arra, hogy már korai szakaszban kiválasszák azokat a genotípusokat, amelyek például magasabb ellenállóképességgel rendelkeznek a betegségekkel szemben, vagy jobb alkalmazkodóképességet mutatnak a megváltozott éghajlati körülményekhez.

Az éghajlatváltozás hatásainak figyelembevételével világossá vált, hogy a hagyományos szőlőtermesztési módszerek hosszú távon nem fenntarthatók. A korábban jól működő termesztési rendszerek veszélybe kerültek, és az iparágban nincsenek évtizedei arra, hogy lassú, fokozatos változásokkal reagáljon a kihívásokra. Ehelyett gyors és hatékony megoldásokra van szükség, amelyeket a genetikai markerek alkalmazása kínál.

2. CÉLKITŰZÉS

A biotechnológia iránti érdeklődésem és a borászati alapidiplomám együttesen vezettek ahhoz, hogy elmélyüljek a növényi biotechnológia világában. A szőlőtermesztésben tapasztalható kihívások, mint a globális felmelegedés, a rovarok növekvő rezisztenciája és a népességnövekedés következtében növekvő élelmiszer-ellátási igény, mind olyan tényezők, amelyek befolyásolják a modern szőlőnemesítést. Ezért célom volt, hogy a genetikai markerek alkalmazása révén megértsem a szőlő rezisztenciájának növelését és a termés javítását célzó módszereket, különös tekintettel a bogyószín, a kombinált lisztharmat- és peronoszpóra rezisztencia gének azonosítására szolgáló molekuláris technikákat.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A szőlő

A szőlő (*Vitis vinifera*) eredete több millió évre nyúlik vissza, és régészeti bizonyítékok alapján már a késő miocén időszakban (7-5 millió évvel ezelőtt) is léteztek szőlőfajok. Ezt a paleobotanikai kutatások is alátámasztják, amelyek szerint a szőlő ősei vadon éltek a Földközi-tenger térségében, Kis-Ázsiában és a Kaukázus vidékén (This et al., 2006). E területeken találták meg a legkorábbi bizonyítékokat, amelyek utalnak a szőlő termesztésbe vonásának kezdeteire.

A termesztett szőlő, *Vitis vinifera* subsp. *vinifera*, az emberi beavatkozás eredményeként alakult ki a vadon élő szőlő, *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* alfajból. A termesztés legkorábbi nyomai a Kaukázus vidékéről származnak, mintegy 6000-8000 évvel ezelőtről, amikor a borászat kezdetét vette ezen a területen (McGovern, 2003). A régészeti leletek, például agyagedények és bor maradványok, megerősítik a borászat korai történetét. A szőlőtermesztés ezután a Földközi-tenger medencéjében, különösen a Közel-Keleten és Egyiptomban terjedt el, majd a görögök és rómaiak terjesztették tovább Európa többi részére, ahol a szőlő végül az egyik legfontosabb termesztett növényé vált (McGovern, 2003).

Az évezredek során a szőlőfajták diverzitása és a termesztési technikák fejlődése lehetővé tette a különböző borfajták létrejöttét, amelyeket ma is ismerünk és fogyasztunk. A nemesítés és szelekció révén a modern szőlőfajták széles genetikai variációval rendelkeznek, ami hozzájárult a világ különböző borvidékeinek gazdag borkultúrájához (This et al., 2006).

A szőlő (*Vitis vinifera*) a kétlaki, fás szárú, kúszónövények közé tartozik, amely eredetileg a Földközi-tenger térségéből származik. A mai formájában láthatjuk az 1. ábrán.



1. ábra Furmint szőlő (www.garamvari.hu)

A szőlő jelentős szerepet játszik az emberi történelemben, főként a borászat révén, amely már az ókori civilizációk idején is virágzott. Botanikai szempontból a szőlő az zárvatermők közé tartozik, a *Vitaceae* család tagja. A szőlő termesztése során a növény vegetatív és generatív részei (levelek, szár, fűrtök, bogyók) egyaránt fontos szerepet játszanak, mivel ezek befolyásolják a növény életciklusát és terméshozamát. A szőlő különösen alkalmazkodóképes növény, amely jól tűri a mérsékelt éghajlatot, és viszonylag sokféle talajtípusokon képes növekedni. A növény hosszú élettartamú, gyakran 30-50 évig produktív maradhat, ha megfelelő gondozást kap, bár vannak példák ennél hosszabb életű tőkékre is. A szőlő fotoszintetikus aktivitása, vízfelhasználása, és stressztoleranciája nagyban befolyásolja a bogyók érettségét és minőségét, ami közvetlen hatással van a bor készítésére. A modern szőlőtermesztés során a különböző fajták nemesítése és a genetikai diverzitás fenntartása kulcsfontosságú a fenntartható termelés szempontjából, különösen az éghajlatváltozás kihívásainak tükrében (Mullins et al., 1992).

3.2. Szőlőtermesztés és éghajlatváltozás: Kihívások és megoldások

Az éghajlatváltozás hatásai egyre inkább érezhetők a világ szőlőültetvényein. A hőmérséklet emelkedése, a csapadék időbeli és térbeli eloszlásának változásai, valamint a szélsőséges időjárási jelenségek, mint például az aszályok és a heves esőzések, mind jelentős kihívást jelentenek a szőlőtermesztők számára. Ezen változások következtében a szőlőtermesztés hagyományos módszerei egyre kevésbé képesek biztosítani a stabil terméshozamot és a borok minőségét.

A hőmérséklet emelkedése különösen kritikus a szőlőtermesztés szempontjából, mivel a szőlő érése szoros összefüggésben van a hőösszeggel, amelyet a növény egy adott termesztési szezon során felhalmoz (Duchêne & Schneider, 2005).

A magasabb hőmérséklet felgyorsítja az érési folyamatot, ami korai szüretet eredményezhet, és befolyásolja a bogyók cukor- és savtartalmát. Azért, hogy a minőséget megőrizték magas anyagi befektetésekre kényszerülnek a szőlősgazdák, ilyen például a szüretelőgép, melynek gyorsasága nagyjából 10x-se az emberi munkához képest. Az optimális hőmérsékleti tartományból való kilépés a szőlőminőség romlásához vezethet, különösen a magasabb savtartalmú borok esetében, amelyek előállítása egyre nehezebbé válik.

A csapadék változása és az aszályok gyakoribbá válása szintén komoly problémát jelent a szőlőtermesztők számára. Az aszályos időszakok vízhiányt eredményeznek, ami gátolja a szőlőnövény fejlődését, csökkenti a bogyók méretét és terméshozamát, valamint növeli a növények stresszszintjét, ami még inkább sebezhetővé teszi őket a betegségekkel szemben. Ugyanakkor a heves esőzések és a nedves környezet kedvez a különféle gombás betegségek, például a lisztharmat terjedésének, amelyek komoly károkat okozhatnak a szőlőültetvényekben.

A hagyományos szőlőtermesztési módszerek nem képesek megfelelően alkalmazkodni ezekhez a változó környezeti feltételekhez. A termelők számára új, rugalmasabb és fenntarthatóbb megoldásokra van szükség, amelyek segítségével csökkenthető a termés kiesés és megőrizhető a borok minősége. Ezen a területen a genetikai markerek alkalmazása egyre nagyobb szerepet kap.

A genetikai markerek segítségével a nemesítők olyan szőlőfajtákat fejleszthetnek ki, amelyek jobban alkalmazkodnak a változó éghajlati feltételekhez. Például azonosíthatók

olyan markerek, amelyek kapcsolatban állnak a szőlő növények szárazságtűrő képességével, és ezek segítségével célzottan lehet kiválasztani azokat a genotípusokat, amelyek jobban ellenállnak az aszályos körülményeknek (Trebbi & McClean, 2012).

Ugyanígy azonosíthatók olyan gének, amelyek növelik a szőlő betegségekkel szembeni ellenállóképességét, mint például a lisztharmat, amely komoly problémát jelenthet a nedvesebb éghajlati zónákban (Riaz et al., 2011).

A szőlőtermesztés egyik kiemelkedő kihívása a változó klímával szembeni rugalmasság biztosítása, miközben megőrizzük a borok minőségi jellemzőit. A genetikai markerek lehetővé teszik a nemesítők számára, hogy gyorsabban reagáljanak a környezeti változásokra, és célzottan fejlesszék azokat a fajtákat, amelyek képesek alkalmazkodni az új körülményekhez. Ez a megközelítés hozzájárul a szőlőtermesztés hosszú távú fenntarthatóságához és a borászati ipar stabilitásához.

3.3. A szőlő lisztharmat (*Erysiphe necator*)

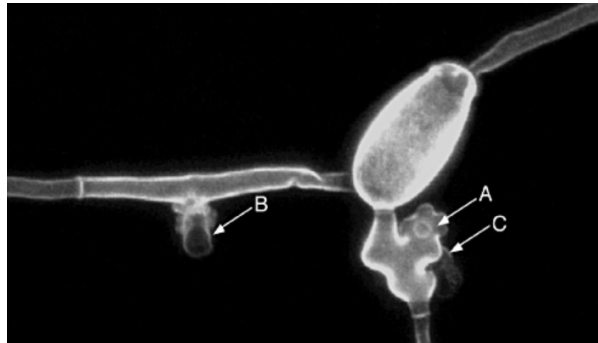
A szőlő lisztharmat (*Erysiphe necator*) egy obligát biotróf kórokozó, amely rendkívül súlyos veszélyt jelenthet a szőlőtermesztésre. A gomba a gazdanövényen belül kizárólag élő sejteken képes életben maradni és táplálkozni, ezért az évről évre visszatérő fertőzések folyamatos kihívást jelentenek a szőlőtermesztők számára. A lisztharmat különösen nagy veszélyt hordoz magában, mivel ha nem kontrollálják a fertőzést a virágzás és bogyófejlődés korai szakaszában, akár teljes termésvesztést is okozhat, különösen kedvezőtlen évjáratokban (Calonnec et al., 2004; Gadoury et al., 2001).

Eredete nagy valószínűséggel Észak-Amerikához köthető, amelyet a rezisztencia megléte is alátámaszt több amerikai *Vitis* fajban. Ez a gazdanövény és a kórokozó közötti hosszú távú koevolúciós folyamat eredménye lehet. Az európai kontinensre a betegség fertőzött növényi anyag révén került be, és először 1845-ben, Angliában jegyezték fel. Rövid időn belül elterjedt Európa-szerte, és a 19. század végén Magyarországon is jelentős károkat okozott (Rakonczás, 2014).

Az elmúlt évtizedek kutatásai során a nemesítők figyelmét Kínában talált vad *Vitis* fajokra irányították, amelyek természetes ellenálló képességgel rendelkeznek lisztharmat és peronoszpóra ellen. Meglepő módon bizonyos *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* egyedekben is találtak rezisztenciát, amely azért különös, mert a Kaukázus és Közép-Ázsia térségében korábban nem találtak lisztharmatra utaló nyomokat (Wan et al., 2007; Riaz et al., 2013).

Az ázsiai *Vitis* fajok lisztharmat elleni rezisztenciájának eredete továbbra is kérdéses, azonban egyes bizonyítékok arra utalnak, hogy a lisztharmat gomba jóval régebben jelen lehetett Ázsiában, mint azt eddig gondolták. Ezért feltételezhető, hogy a vadon élő *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* együtt fejlődhetett a kórokozóval, rezisztenciát alakítva ki ellene (Riaz et al., 2020).

Az *Erysiphe necator* hifái 4–5 µm átmérőjűek, hialin (áttetsző) színűek, és a bőrszöveti sejtek felszínén helyezkednek el. Ezek a látható jelei a szőlészek számára, melyek júliustól egészen a metszésig, esős párás időszakban megjelenhetnek a szőlőültetvények levelein (2.ábra).



2. ábra *Erysiphe necator* hifái (Gadoury et al., 2011)

A lisztharmat minden szőlőtermesztő régióban megtalálható, és a fertőzés mértékét nagyban befolyásolja a fertőzés időpontja, valamint az időjárási viszonyok alakulása.

A védekezési módszerek közé tartozik az agrotechnikai megoldások alkalmazása, például a fertőzött hajtások eltávolítása és a zöldválogatás. Emellett a kémiai védekezés is hatékony lehet, azonban a legmegbízhatóbb módszert a lisztharmat-rezisztens szőlőfajták termesztése jelenti (Bán, 2006).

3.4. A szőlő peronoszpóra (*Plasmopara viticola*)

A szőlő peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) egy rendkívül pusztító betegség, amely jelentős károkat okoz a szőlőültetvényekben világszerte. A betegség Észak-Amerikából származik, és Európába a 19. század végén került be, valószínűleg fertőzött szaporítóanyaggal. Az első európai fertőzéseket 1878-ban észlelték Franciaországban, ahonnan gyorsan elterjedt az egész kontinensen. Magyarországon az 1880-as években jelentek meg az első súlyosabb fertőzések (Bán, 2006; Gessler et al., 2011).

Különbségek a lisztharmathoz képest

Míg a lisztharmat főként száraz, meleg időjárás mellett terjed, a peronoszpóra elsősorban nedves, csapadékos időjárás során aktivizálódik. A két betegség közötti különbség abból is adódik, hogy a peronoszpóra zoospórákat termel, amelyek nedves környezetben

képesek úszni és fertőzni, míg a lisztharmat konídiumokkal terjed a száraz levegőben. Továbbá, a peronoszpóra a növény mélyebb szöveteibe hatol be, míg a lisztharmat csak a növény felszínén terjed (Bán, 2006; Gessler et al., 2011).

Védekezés

Az EU-ban a szőlőtermesztésben használt növényvédő szerek akár 70%-át is a lisztharmat és a peronoszpóra megelőzésére használják. Ebből:

- Lisztharmat: A védekezés költségeinek körülbelül 30-40%-a a lisztharmat ellen irányul. A meleg, párás körülmények kedveznek a lisztharmat kialakulásának, ami az egyik legnagyobb veszélyt jelenti a szőlőültetvényekre
- Peronoszpóra: Az összes növényvédőszer-használat körülbelül 30-35%-a a peronoszpóra elleni védekezésre fordítódik, amely különösen nedves, esős időjárásban okoz nagy károkat. A peronoszpóra megelőzésére gyakran réz-alapú fungicideket használnak

Világszinten:

Globálisan a szőlőtermesztésben használt növényvédő szerek szintén nagy arányban, 60-70%-ban szolgálnak a lisztharmat és a peronoszpóra megelőzésére. Világszerte az alábbi megoszlás figyelhető meg:

- Lisztharmat: A globális fungicid használat körülbelül 25-35%-át lisztharmat elleni védekezésre fordítják.
- Peronoszpóra: A fungicid használat körülbelül 30-40%-a a peronoszpóra elleni védekezést célozza meg, különösen nedves régiókban, mint például Észak-Európa vagy Dél-Amerika, ahol a betegség gyorsan terjed

Mindkét betegség súlyos gazdasági károkat okozhat, ha nincs megfelelő védekezés, és a védekezés növényvédelmi költségei jelentősek. Az újabb fenntartható megoldások, például rezisztens fajták nemesítése, illetve precíziós mezőgazdasági technikák segíthetnek csökkenteni a vegyszerhasználatot, miközben megőrzik a termés minőségét.

3.5. Rezisztencia gének

A növények a fejlődésük során számos védekezési mechanizmust alakítottak ki, amelyek lehetővé teszik számukra a különböző környezeti stresszhatásokkal, például a

kórokozókkal, szárazsággal és hőstresszel szembeni ellenállást. Ezek a mechanizmusok lehetnek passzív védekezési formák, amelyek állandó jelleggel jelen vannak a növényekben, például a vastag viaszréteg, a szőrözöttség vagy a méreganyagok termelése. Az ilyen passzív mechanizmusok segítik a növények fizikai és kémiai védelmét, még mielőtt bármilyen fertőzés vagy stresszhelyzet bekövetkezne (Dudits & Heszky, 2014).

A növények másik védelmi rendszere az indukált rezisztencia, amely akkor aktiválódik, ha a növényt közvetlen környezeti stressz éri. Az indukált védelmi mechanizmusok között található a hiperszenzitív válasz (HR), amely során a fertőzött sejtek programozott sejthalált, azaz nekrozist szenvednek, ezáltal a fertőzés terjedése megállítható. Emellett szerepet játszanak a növényi sejtfalat erősítő anyagok, az aktív oxigénfajták (ROS) képződése, valamint a fitoalexinek termelése, amelyek a növények természetes antibiotikumai. Ezenkívül számos enzim és fehérje túltermelése is része az indukált védekezésnek, amelyek hatékonyan akadályozzák meg a kórokozók további terjedését (Dangl et al., 1996; Dudits & Heszky, 2014).

A genetikai markerek alkalmazása a szőlőnemesítésben különösen fontos a betegségekkel szembeni rezisztencia fokozásában. Az olyan betegségek, mint a lisztharmat, komoly veszélyt jelentenek a szőlőültetvényekre világszerte. „A lisztharmat-rezisztenciáért felelős gének azonosítása és alkalmazása a nemesítési programokban lehetővé teszi olyan fajták kifejlesztését, amelyek kevésbé érzékenyek erre a betegségre” (Riaz et al., 2011), ezáltal csökkentve a növényvédő szerek használatának szükségességét.

A genetikai markerek azonban nemcsak a betegségekkel szembeni rezisztenciában játszanak fontos szerepet, hanem a minőségi jellemzők javításában is. Például „a szőlő bogyószínének változásai vagy a bogyók cukortartalma is olyan tulajdonságok, amelyeket genetikai markerek segítségével lehet nyomon követni és fejleszteni (Ibáñez & Carreño, 2014). Ezek a tulajdonságok kulcsfontosságúak a borászati termékek minőségének és piaci értékének növelésében.

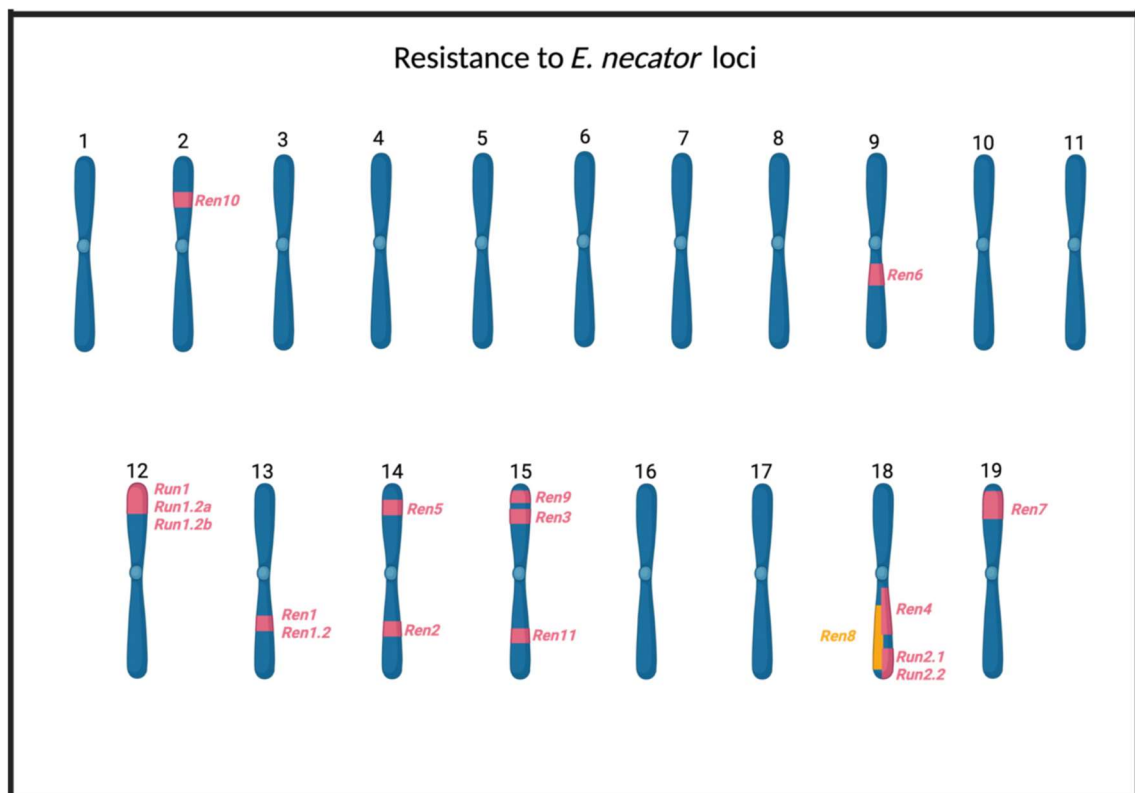
3.5.1. Lisztharmat rezisztencia gének

Az egyik kiemelt cél a szőlőnemesítés során a lisztharmat-rezisztencia gének azonosítása. Ezen gének jelenléte lehetővé teszi a szőlőnövények számára, hogy ellenálljanak ennek a gyakori és pusztító betegségnek, amely jelentős károkat okozhat a szőlőültetvényekben. A genetikai markerek használata lehetővé teszi a rezisztencia gének gyors és hatékony

azonosítását, így a nemesítők célzottan választhatják ki azokat a genotípusokat, amelyek képesek ellenállni a lisztharmat fertőzésnek (Riaz, et al.,(2011).

A szőlő lisztharmattal szembeni rezisztenciáját számos gén irányítja, amelyek közül néhány különösen fontos a modern szőlőnemesítési programokban. A lisztharmat-rezisztenciát különböző rezisztenciagének kontrollálják, amelyek védekező mechanizmusokat aktiválnak a fertőzés korai szakaszában. Az ilyen gének közé tartozik a Run1, Ren1, Ren3 és Ren4, amelyek különböző mértékű védelmet nyújtanak a lisztharmattal szemben.

A lisztharmat rezisztencia gének elhelyezkedését a kromoszómán a 3.ábra mutatja.



3.ábra Az eddig ismert lisztharmat rezisztencia gének és kromoszómális lokalizációjuk (Viviana Sosa-Zuniga et. al,2022)

A lisztharmat-rezisztencia gének többsége *Vitis amurens*, *Vitis rotundifolia*, és más vad *Vitis* fajokból származik. Ezek a gének általában a fertőzés korai szakaszában aktívak, és megakadályozzák a gombafonál (hifa) növekedését, valamint a penetrációt a gazdanövény sejtjeibe. A védekező mechanizmusok közé tartozik a hiperszenzitív válasz

(HR), amely során a fertőzött sejtek programozott sejthalált szenvednek, megakadályozva ezzel a fertőzés továbbterjedését (Feechan et al., 2015).

3.5.1.1. Ren3

A Ren3 gént először a 'Regent' szőlőfajtában azonosították, amelyet széles körben használnak lisztharmat-rezisztens szőlőfajták kifejlesztésére. A génhez kapcsolódó védekező mechanizmusok a fertőzés korai szakaszában aktívak, így hatékonyan csökkentik a gomba terjedését. A kutatások alapján a Ren3 génhez tartozó régióban két különálló genetikai hely található, amelyek közvetlenül kiváltják a hiperszenzitív választ (HR), és fontos szerepet játszanak a gomba terjedésének gátlásában (Feechan et al., 2015; Hoffmann et al., 2008).

A Ren3 gén a 15. kromoszómán található, és domináns módon öröklődik, azaz egyetlen másolat is elegendő ahhoz, hogy a növény ellenálló legyen a lisztharmattal szemben. A gén működése azzal kezdődik, hogy amikor a *Erysiphe necator* spórái a szőlőnövénnyel felületére kerülnek, a Ren3 gyorsan aktiválja a növény immunválaszát. A legfontosabb védekezési mechanizmusok közé tartozik a hiperszenzitív válasz (HR), amely során a fertőzött sejtek gyors sejthalálon mennek keresztül, meggátolva a gomba további terjedését. A HR reakció nem csupán a fertőzés lokális visszaszorítását szolgálja, hanem az egész növényben szisztematikus védelmi mechanizmusokat indít be (Di Gaspero et al., 2012; Ramming et al., 2011).

A marker-asszisztált szelekció (MAS) kulcsszerepet játszik a Ren3 gén azonosításában, amely lehetővé teszi a nemesítők számára, hogy specifikus genetikai markerek alapján válasszák ki a rezisztens növényeket. A finom térképezési vizsgálatok során a Ren3 génhez kapcsolódó régiókat markerkombinációkkal, mint a GF15-10 és ScORA7 lokalizálták a 2,2 Mb-tól 9,4 Mb-ig terjedő intervallumban a 15. kromoszómán (Zendler et al., 2017; Fischer et al., 2004).

A kutatások során az is megfigyelték, hogy a Ren3 által közvetített rezisztencia nemcsak a levelekre, hanem a szőlő bogyóira is kiterjed, így megakadályozva a lisztharmat-fertőzés által okozott károkat a termésen is. Ez a tulajdonság különösen fontos a magas minőségű borok előállításában, ahol a bogyók egészsége és minősége elsődleges szempont (Cadle-Davidson et al., 2011).

A Ren3 gén működésében hasonlóságokat mutat a Ren1 és Ren4 génekkel, amelyek szintén a lisztharmat elleni védekezést szolgálják. Azonban a Ren3 egyedi abban a tekintetben, hogy szorosan kapcsolódik a sejtfalszerkezet megerősítéséhez, amely különösen hatékony módja a fertőzés korai szakaszának blokkolásában. Míg a Ren1 főként a penetrációt akadályozza meg, és a Ren4 általános immunválaszt biztosít, a Ren3 központi szerepe a hifanövekedés megállítása és a fertőzés lokalizálása (Feechan et al., 2015; Hoffmann et al., 2008).

3.5.1.2. Run1

A Run1 gén, amely az *Uncinula necator* (lisztharmat) ellenállásért felelős, az egyik első olyan rezisztencia lokusz volt, amelyet leírtak a szőlőben (Bouquet et al., 1986). A rezisztencia működési mechanizmusának egyik fő eleme a gyors programozott sejthalál (PCD), amely megakadályozza a gomba másodlagos hifáinak kialakulását és sporulációját (Feechan et al., 2013). A sejtekben a fertőzést követően megfigyelhető a reaktív oxigénfajták (ROS) termelésének növekedése, valamint a PCD felgyorsulása. Egy másik válaszreakció a Run1 által, hogy kalóz lerakódások figyelhetők meg a fertőzési helyeken (Barker et al., 2005).

A Run1 lokuszt először Bouquet et al. írta le, amikor egy pszeudo-visszakeresztelési stratégiával rezisztens *Vitis vinifera* és *Muscadinia rotundifolia* fajták hibridjeit hozták létre, amelyek ellenálltak a lisztharmatnak. A Run1 domináns, monogénes öröklődési mintázatot mutatott. Később Pauquet et al. AFLP markereket fejlesztett ki, amelyek kapcsoltak a Run1 rezisztencia génhez, és ezzel lehetővé tették a jelölésalapú szelekciót (Donald et al., 2002).

Feechan et al. (2013) kutatásai során azonosították a MrRGA10 gént, amely a Run1 lokusból származó TIR–NBS–LRR típusú rezisztenciaproteint kódolja. A vizsgálatok alapján a MrRGA10 gén a felelős a lisztharmat elleni rezisztenciáért, míg a lokuszon található egyéb gének kisebb mértékben járulnak hozzá a védekezéshez (Barker et al., 2005).

A Run1 gén egy olyan domináns rezisztenciagén, amely képes megakadályozni a gombás fertőzést. A kutatók a bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) könyvtár segítségével

azonosítottak több, a Run1 génhez kapcsolódó genetikai markert, és finomították a gén helyzetét a 12-es kapcsolási csoporton belül (Barker et al., 2005).

A BAC könyvtárban találtak két többgénese csoportot, amelyek rezisztenciagéneket tartalmaznak. Az ilyen típusú gének általában NBS-LRR moduláris fehérjéket kódolnak, amelyek fontosak a növények immunválaszában. A kutatás eredményei szerint a Run1 gént tartalmazó régióban az átrendeződés (rekombináció) jelentősen visszaszorult, valószínűleg a beágyazott *M. rotundifolia* DNS diverzitása miatt (Pauquet et al., 2001; Donald et al., 2002).

3.5.2. Peronoszpóra rezisztencia gének

A peronoszpóra ellenállóságot szőlőben számos gén határozza meg, amelyek fontos szerepet játszanak a védekezésben. Az egyik legfontosabb ilyen rezisztenciagén a Rpv1 és Rpv3, amelyek erős rezisztenciát biztosítanak a szőlő számára e betegséggel szemben.

A szőlőperonoszpóra (DM) rezisztenciájának genetikai alapjait különféle megközelítésekkel vizsgálták, mint például a hagyományos Quantitative Trait Loci (QTL) elemzés, családfák elemzése, és az asszociációs vizsgálatok, mint például a Genome Wide Association Studies (GWAS). Ezek a módszerek lehetővé teszik a poligén háttérű tulajdonságok, például a szőlő minőségének tanulmányozását. Az új generációs szekvenálási (NGS) technológiák gyors fejlődése lehetővé tette a nagyszabású genotípus-meghatározást, amelyhez a szőlő genom egyenletes marker-lefedettsége társul, megnyitva az utat a fontos agronómiai tulajdonságok, köztük a peronoszpóra-ellenállósággal kapcsolatos QTL-ek azonosításához (Di Gaspero and Foria 2015., Salvi, S., & Tuberosa, R. 2015). A peronoszpóra rezisztencia gének táblázatos összefoglalóját az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Peronoszpóra rezisztencia gének, kapcsolt markerek és a gének eredete

Rezisztencia gén	Kapcsolt marker	Rezisztencia forrás	Hivatkozás
Rpv1	VVb132	<i>M. rotundifolia</i>	Merdinoglu et al. (2003)
Rpv1	VMC18g2.2	<i>M. rotundifolia</i>	Katula-Debreceni et al. (2010)
Rpv2	UDV-112	<i>M. rotundifolia</i>	Wiedermann-Merdinoglu et al. (2006)
Rpv3-1	UDV-305	<i>V. rupestris</i>	Welter et al. (2007)
Rpv3-1	VMCTf2	<i>V. rupestris</i>	Bellin et al. (2009)

Rpv3-1	UDV-305	Seibel 4614	van Heerden et al. (2014)
Rpv3-2	UDV-305	<i>V. rupestris</i>	Zyprian et al. (2016)
Rpv3-2	GF18-08	<i>V. rupestris</i> or <i>V. laceicunii</i>	Di Gaspero et al. (2016)
Rpv3-3	UDV-305	<i>V. labrusca</i> or <i>V. riparia</i>	Di Gaspero et al. (2012)
Rpv3 321-312	UDV-305	<i>V. labrusca</i> or <i>V. riparia</i>	Di Gaspero et al. (2012)
Rpv3 361-199	UDV-305	<i>V. rupestris</i>	Di Gaspero et al. (2012)
Rpv3 309-134	UDV-305	<i>V. rupestris</i> or <i>V. labrusca</i>	Di Gaspero et al. (2012)
Rpv4	VMCTn3		Welter et al. (2007)
Rpv5	VVM05b2	<i>V. riparia</i>	Marguerit et al. (2009)
Rpv6	VMC69g2	<i>V. riparia</i>	Marguerit et al. (2009)
Rpv7	UDV-097		Bellin et al. (2009)
Rpv8	Chr14V015	<i>V. amurensis</i>	Blasi et al. (2011)
Rpv9	IN006	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)
Rpv10	GF09-46	<i>V. amurensis</i>	Schwander et al. (2012)
Rpv11	VVMd27	Chardonnay	Fischer et al. (2004)
Rpv12	VCHR005C		Bellin et al. (2009)
Rpv13	UDV-014	<i>V. amurensis</i>	Venuti et al. (2013)
Rpv14	UDV-304	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)
Rpv15	VMC13g2.13	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)

3.5.2.1. Rpv10 rezisztencia gén

Az Rpv10 gén szerepe a *Vitis vinifera* ellenálló képességében a peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) ellen kiemelkedő. A gén az ázsiai *V. amurensis*ből származik (Barker et al., 2005; Di Gaspero és Cipriani, 2003).

A gén a 9. kromoszómán található, és a NBS-LRR típusú ellenálló gén analógok csoportjához tartozik. Az Rpv10 körüli régióban huszonhat ilyen gén található, amelyek nagy része három különálló klaszterben helyezkedik el. Ezek a gének különböző rezisztenciát biztosító fehérjéket kódolnak, amelyek segítenek felismerni a patogéneket és elindítani a növény védekezési mechanizmusait. Az Rpv10 különböző rezisztenciamechanizmusokkal bír, például a jelátvitelben részt vevő serin/treonin protein kinázokkal és etilénre reagáló transzkripciós faktorokkal, amelyek fontos szerepet játszanak a biotikus stressz elleni védekezésben (Blasi P. et. al. 2011).

Az Rpv10 rezisztencia génnel kapcsolt markereknek fontos eszköz lehet a marker-alapú szelekcióban (MAS), ami a rezisztenciagének piramidálásával javíthatja a szőlő betegségekkel szembeni ellenálló képességét, különösen a hosszú távú termesztésben. keresztezés eredménye, amely erőteljes rezisztenciát mutat a peronoszpórával szemben

Az Rpv10 jelátviteli molekulák között találhatók serin/treonin protein kinázok és etilén-érzékelő transzkripciós faktorok, amelyek közvetlenül részt vesznek a növény stresszre adott válaszában. Ezek a molekulák a növény immunválaszában kulcsfontosságú elemei, amelyek különféle rezisztenciamechanizmusokat támogatnak a peronoszpóra elleni küzdelemben (Donald et al., 2002).

Fontos szerepet játszanak a szőlő védekező mechanizmusában, és kiváltják a hiperszenzitív választ (HR), amely során a fertőzött sejtek gyorsan elhalnak, ezzel megakadályozva a fertőzés terjedését. Emellett fitoalexinek termelését is elősegítik, amelyek olyan antimikrobiális vegyületek, amelyek közvetlenül gátolják a kórokozó terjedését a növényben (Moreira et al., 2011; Di Gaspero et al., 2012).

3.5.2.2. Rpv3 rezisztencia gén

Az Rpv3 gén a szőlő egyik legfontosabb rezisztenciagén a peronoszpóra ellen, amelyet *Vitis rupestris* és *Vitis vinifera* hibrid fajtákban fedeztek fel. Az Rpv3 gén a 18-as kromoszómán található, és erőteljes rezisztenciát biztosít a peronoszpórával szemben. Ez a gén komplex védekezési mechanizmust biztosít, amely magában foglalja a fitoalexinek termelését, a sejtfalak megerősítését, valamint az aktív oxigénfajták (ROS) felhalmozódását, amelyek segítenek a gomba terjedésének megakadályozásában. Az Rpv3 gén alapvető szerepet játszik az indukált rezisztencia kialakításában, és széles körben használják a szőlőnemesítési programokban a peronoszpóra-rezisztens fajták fejlesztésére (Bellin et al., 2009; Welter et al., 2007).

3.5.2.3. Rpv12 rezisztencia gén

Az Rpv12 egy domináns rezisztencia gén, amelyet a kelet-ázsiai szőlőfajból, *Vitis amurensis*-ből introgressáltak a *Vitis vinifera* fajtákba. Ez a gén kulcsfontosságú szerepet tölt be a növények védekezési mechanizmusában, és jelentős rezisztenciát biztosít a peronoszpóra ellen. Az Rpv12 által közvetített védelem a betegségek elleni korai immunválaszban mutatkozik meg, ami megakadályozza a kórokozó terjedését a növényben.

A tudományos vizsgálatok azt mutatták, hogy az Rpv12 gén egy NBS-LRR típusú rezisztenciagént kódol, amely a kórokozók felismerésében és a növényi immunválasz kiváltásában játszik központi szerepet. Ez a mechanizmus gyors sejthalált, úgynevezett programozott sejthalált (PCD) eredményez a fertőzött sejtekben, ami megakadályozza a

fertőzés további terjedését, különösen a peronoszpóra kórokozója ellenihez kapcsolódó vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a gén a rezisztenciáját dominánsan örökíti, így lehetőséget nyújt a szőlőnemesítésben olyan új fajták előállítására, amelyek minimális vegyszerhasználat mellett is védettek a kórokozóval szemben. Venuti és munkatársai (2013) kutatásai alapján az Rpv12 gén történelmi introgressziója jelentős hatással volt a modern szőlőfajták ellenálló képességére (D, Foria S, et al. 2013., Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, et al. (2009).

Kutatási eredmények

Az Rpv10 és Rpv12 génekhez kapcsolódó kutatások azt mutatják, hogy ezek a gének különösen fontosak a modern szőlőnemesítésben, mivel a hagyományos *Vitis vinifera* fajták általában nagyon érzékenyek a peronoszpórára. Az Rpv10 gén elsősorban a *Vitis amurensis* fajtákban van jelen, míg az Rpv12 különböző európai és ázsiai szőlőfajokban fordul elő. A kutatások azt is kimutatták, hogy ezek a gének nemcsak a levél, hanem a szőlő bogyóinak rezisztenciáját is befolyásolják, ami különösen fontos a borászati termelés minőségének megőrzése érdekében (Schwander et al., 2012; Zyprian et al., 2016). A peronoszpóra-rezisztens szőlőfajták nemesítése során fontos szerepet játszik a marker-asszisztált szelekció (MAS), amely lehetővé teszi, hogy specifikus genetikai markerek alapján azonosítsák a rezisztenciát biztosító géneket. Az Rpv1 és Rpv3 génekhez kapcsolódó SSR és SNP markerek fejlesztése kulcsfontosságú volt a nemesítési programok sikeréhez. A marker-alapú szelekció lehetővé teszi a rezisztens fajták gyorsabb és hatékonyabb azonosítását, különösen a különböző populációkban történő térképezés során. Az Rpv1 gén esetében például az SSR marker VMCNG4A8 és a SNP marker Vitis9KSNP genotípus-kombinációi nagy pontossággal jelezték a rezisztencia jelenlétét a szőlőfajtákban (Bellin et al., 2009).

3.6. A genetikai markerek szerepe a szőlőnemesítésben

A genetikai markerek alkalmazása a szőlőnemesítésben egyre inkább elengedhetetlen eszközzé válik a változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodás és a fenntarthatóság megőrzése érdekében. A nemesítők számára a genetikai markerek használata lehetővé teszi, hogy gyorsabban és hatékonyabban válasszák ki azokat az genotípusokat, amelyek a kívánt tulajdonságokkal rendelkeznek, például a szárazságtűrés, a betegségekkel szembeni ellenálló képesség vagy a magasabb termés hozam tekintetében.

A genetikai markerek alkalmazásának kutatása a szőlőnemesítésben az 1990-es évek elején vett lendületet, amikor a molekuláris biológia eszközei szélesebb körben hozzáférhetővé váltak a növénynemesítők számára. Az első alkalmazott markerek a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) típusúak voltak, amelyeket a DNS fragmentumok hosszkülönbségein alapuló genetikai variációk kimutatására használtak. Ezek a markerek lehetővé tették a genetikai sokféleség és rokonsági viszonyok vizsgálatát különböző szőlőfajták között. A szőlő genomjának feltárásában játszott szerepük különösen fontos volt a 90-es években, amikor a genetikai sokféleséget még csak korlátozott eszközökkel tudták vizsgálni (This et al., 2006).

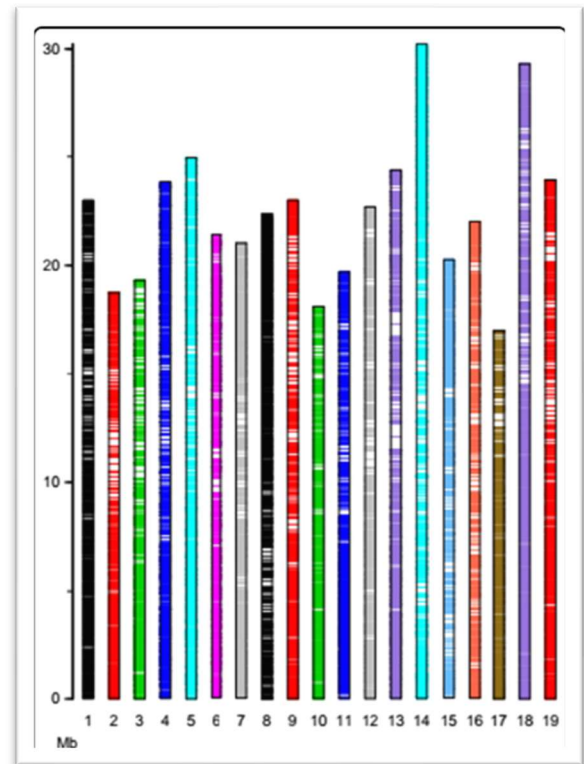
Az RFLP markerek hatékonysága ellenére egyre nagyobb hangsúlyt kaptak a mikroszatellita markerek, amelyek rövid, ismétlődő DNS-szekvenciákból állnak. Ezeket az SSR (Simple Sequence Repeats) markereket először az 1990-es évek végén kezdték használni a szőlőfajták genetikai jellemzésére. This és társai (2006) kutatása az SSR markerek alkalmazását célozta meg a szőlőfajták genetikai diverzitásának mérésére, és kimutatta, hogy ezek a markerek rendkívül megbízhatóak a fajtaazonosításban és a nemesítési programokban. Az SSR markerek lehetővé tették a szőlőgenom finomabb részleteinek feltárását, és különösen hasznosnak bizonyultak a genetikai térképek felállításában, amelyek alapján a nemesítők a kívánt tulajdonságokkal rendelkező növényeket tudták kiválasztani.

A genetikai markerek alkalmazása a szőlőnemesítésben nem korlátozódott a genetikai diverzitás mérésére, hanem gyorsan a marker-asszisztált szelekció (MAS) egyik fő eszközévé vált. Az 1990-es évek végén és a 2000-es évek elején megjelent MAS módszerek jelentősen felgyorsították a nemesítési programokat, mivel lehetővé tették a specifikus gének azonosítását és célzott szelekcióját. Ibáñez és Carreño (2014) kutatásai például kimutatták, hogy a marker-asszisztált szelekcióval gyorsabban lehetett lisztharmat-rezisztens szőlőfajtákat nemesíteni. Ezekben a programokban a genetikai markerek segítségével azonosították a rezisztencia géneket, és a nemesítők ez alapján választották ki a megfelelő genotípusokat.

A 2000-es évek elején az újabb genetikai markerek, különösen az SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) markerek bevezetése jelentős előrelépést hozott. Az SNP-k egyetlen nukleotid helyzetben bekövetkező genetikai variációkat jelentenek, és rendkívül pontosak a genetikai különbségek feltárásában. Az SNP markerek használata lehetővé tette a

szőlőgenom részletesebb térképezését, és pontosabb eredményeket adott a genetikai tulajdonságok, például a szárazságtűrés vagy a betegségekkel szembeni ellenállás azonosításában (Myles et al., 2011). Ezt a 4. ábra szemlélteti.

A szőlőgenom teljes szekvenálása 2007-ben valósult meg, amely az első jelentős genetikai térképezés volt a szőlőnél. Az INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) és olasz kutatók vezették ezt a projektet, amely a szőlőgenomot elsőként tárta fel, így új lehetőségeket nyitott a nemesítők számára (Riaz et al., 2013).



A genomszekvenálás lehetővé tette a nemesítési programokban a genetikai markerek még hatékonyabb használatát, mivel a kutatók pontosan tudták, hogy mely gének felelősek bizonyos agronómiai tulajdonságokért.

Az elmúlt évtizedekben a genetikai markerekkel végzett kutatások szorosan összekapcsolódtak az új technológiákkal, mint például a genomszerkesztés és a digitális adatgyűjtés. A genomszerkesztési technikák, mint például a CRISPR/Cas9, forradalmasították a szőlőgenetikai kutatásokat. Ezzel a módszerrel lehetővé vált a specifikus DNS szekvenciák célzott módosítása, ami még pontosabb genetikai változtatásokat eredményezhet a szőlőnemesítésben. (Zinelabidine et al., 2019).

Myles és társai (2011) és Zinelabidine és társai (2019) kutatásai szerint a genomszerkesztés alkalmazása a szőlőtermesztésben lehetővé teszi a növények környezeti alkalmazkodásának javítását, mint például a szárazságtűrés fokozása vagy a betegségekkel szembeni ellenálló képesség erősítése.

A CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) markerek a molekuláris markerek egyik típusát képviselik, amelyek két fő csoportba oszthatók: hibridizáción alapuló (pl. RFLP) és PCR-alapú technikák. A PCR-alapú módszerek tovább oszlanak olyanokra,

amelyek nem igényelnek szekvencia információt (pl. RAPD, AFLP), és olyanokra, amelyek specifikus szekvencia ismereten alapulnak (pl. EST, SSR, CAPS, SNP) (Semagn et al., 2006).

A Single Nucleotide Polymorphism (SNP) egyetlen nukleotid különbség a DNS szekvenciában, amely gyakran és szétszórtan fordul elő a genomban. A SNP-k kimutatására alkalmazott egyik módszer a CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), amelyet PCR-RFLP néven is ismerünk. Ez a módszer restrikciós endonukleázokat használ, amelyek felismerik vagy megszüntetik a szekvencia specifikus enzimes hasítási helyeket (Kiss, 2005).

A CAPS markerek egyik előnye a kodomináns öröklődés, ami azt jelenti, hogy mindkét szülőtől örökölt allélek megkülönböztethetők. A PCR-rel kombinálva a módszer egyszerűbb és gyorsabb, mint az RFLP, és az eredmények könnyen detektálhatók agaróz gélen, így a rutin laboratóriumi munkában is jól alkalmazható (Konieczny & Ausubel, 1993).

A CAPS markerek működése azon alapul, hogy a PCR-rel amplifikált szekvenciák gyakran monomorfak, de az SNP-k jelenléte miatt restrikciós enzimes emésztéssel polimorf mintázatot mutathatnak, ami különböző genotípusok megkülönböztetésére alkalmas (Nagy, 1999).

A precíziós mezőgazdaság szintén fontos szerepet játszik a modern szőlőnemesítésben. Az olyan digitális eszközök, mint a térinformatikai rendszerek (GIS), drónok és szenzorok, lehetővé teszik a növények fenotípusos jellemzőinek folyamatos monitorozását, amelyek alapján a nemesítők valós időben tudják nyomon követni a szőlő növekedését és környezeti reakcióit. Ezek a fejlesztések segíthetnek abban, hogy a szőlőtermesztés alkalmazkodjon a globális éghajlatváltozáshoz és fenntarthatóbbá váljon.

„A jövő szőlőnemesítési programjai valószínűleg még inkább támaszkodnak majd a genetikai kutatásokra és az új technológiákra, mint például a genomszerkesztésre, a precíziós mezőgazdaságra és a digitális adatgyűjtésre.” (Myles et al., 2011; Trebbi & McClean, 2012). Ezek a fejlesztések segíthetnek abban, hogy a szőlőtermesztés alkalmazkodjon a globális kihívásokhoz, és fenntartható maradjon a jövő generációi számára is (Zinelabidine et al., 2019).

3.7. Markerrel kapcsolt tulajdonságok

A szőlőnemesítés során számos genetikai markert, köztük SSR (Simple Sequence Repeat) és SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markereket használnak különféle tulajdonságok vizsgálatára, például a bogyó méretéhez, színéhez, magméretéhez, valamint különböző rezisztenciákhoz.

-Bogyóméret:

A bogyóméret, amely a szőlőfajták egyik legfontosabb gazdasági jellemzője, számos génhez kapcsolódik. SNP és InDel (inzerció/delécio) markerek is kimutathatók a bogyó méretéhez kapcsolódóan, különösen a 18-as kromoszómán, ahol a legnagyobb sűrűségben találhatók ezek a genetikai variációk. A markerek használata lehetővé teszi a bogyóméret gyorsabb növelését és a bogyó textúrájának javítását. (Muñoz-Espinoza et al.,2020)

-Magméret:

A mag nélküli vagy kis magú szőlőfajták keresettek a piacon, és az erre vonatkozó genetikai markereket, például a SNP markereket, sikeresen azonosították a 18-as kromoszómán. Ezek a markerek lehetővé teszik a vetőmag méretének és a magmentesség szabályozásának pontosabb megértését és fejlesztését a nemesítési programokban (Wang, X.,et al.,2020).

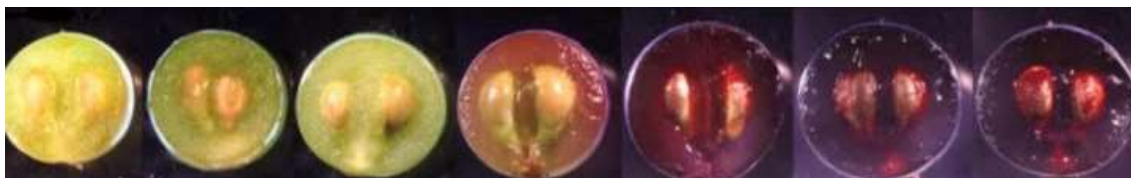
-Bogyószín

A flavonoidok szerepe az élővilágban igen összetett és sokrétű. Ezek a vegyületek színes jelzőrendszert alkotnak, amely fontos az élőlények, például rovarok, madarak és növényevő állatok számára, mivel befolyásolják a növényekkel való interakcióikat. Emellett fontos szerepük van a növények szaporodásában, hozzájárulnak a beporzáshoz, valamint a magok és termések terjesztéséhez is (Antus és Mátyus, 2014). A flavonoidok biokémiai szempontból fenilalaninból és malonil-koenzim A-ból származnak, és változatos aromás vegyületek formájában vannak jelen, amelyek hat főbb alcsaládra oszthatók: chalkonok, flavonok, flavonolok, flavonoidok, antociánok és tanninok (Winkel-Shirley, 2001, 2006).

A virágok és gyümölcsök színéért elsősorban az antociánok és glikozidjaik felelnek. Ezek a színek sokféleségét a molekulákhoz kapcsolódó szubsztituensek, valamint az

antocianidinek pH-függő szerkezetváltozásai fokozzák, ezáltal színváltásokat eredményezve a növényvilágban (Antus és Mátyus, 2014).

A szőlő esetében a főbb flavonoidok a proantocianidinek (PA) és az antociánok. A PA legnagyobb mértékben a bogyófejlődés korai szakaszában, zöld állapotban halmozódik fel, míg az antociánok az érett bogyókban jelennek meg (Kennedy et al., 2001; Verries et al., 2008; Boss et al., 1996) (5. ábra).



5.ábra: Antociánok felhalmozódása a szőlő különböző érettségi szakaszaiban (Leskó Annamária)

A VvMybA1 és VvMybA2 gének jelentős szerepet játszanak az antocianinok bioszintézisének szabályozásában, amelyek meghatározzák a szőlőbogyók színét. Az antocianinok a flavonoid család főbb csoportjai közé tartoznak, és ők felelnek a növények vörös és kék színéért (Harbone et al., 2000). A szőlőszín variációi az évszázadok során nagy mértékben diverzifikálódtak, és a VvMybA1 és VvMybA2 gének mutációi kapcsolódnak a bogyószín-változásokhoz.

A termesztett szőlő őse fekete bogyójú volt, a fehér bogyószín a VvMybA1 és VvMybA2 gén egymástól független mutációira vezethetők vissza. A VvMybA1 gén inaktivációja a Gret1 retrotranszpozon promoter régióba történő inszerciójával történt, amely homozigóta formában gátolja az antocianin bioszintézist. A génnek három fő allélvariánsát különböztetjük meg: VvMybA1a (Gret-1 inszerció - „fehér allél”), VvMybA1b (a Gret1 kivágódásával létrejött allél – „színes allél”), VvMybA1c (vad típus – „színes allél”) (Kobayashi et al. 2004).

A VvMybA2 gén szerepe szintén fontos a bogyószín kialakulásában. Két SNP a kódoló régióban egy funkcionálisan inaktív allélt eredményez (Walker et al., 2007, Carrasco et al. 2015). Ha ez a három mutáció homozigóta állapotba kerül, a transzkripciós faktorok nem tudják aktiválni az antociánok bioszintézisének kulcsenzimét kódoló az UFGT gént. A VvMybA1 és a VvMybA2 gén egyéb polimorfizmusai miatt további változatos bogyószínek jöhetnek létre, például fekete, piros, rózsaszín és szürke árnyalatok jönnek létre (Carrasco et al., 2015).

3.8. A nemzetközi szőlőnemesítési eredmények és a genetikai kutatások fejlődése

A szőlőnemesítés és a genetikai kutatások területén az utóbbi évtizedekben jelentős előrelépések történtek világszerte. A nemzetközi szőlőnemesítési programok célja a szőlőfajták fejlesztése, amelyek jobban alkalmazkodnak a változó környezeti feltételekhez, ellenállóbbak a betegségekkel szemben, és biztosítják a borok minőségének fenntartását.

- **Európa: Innováció és hagyomány találkozása**

Európa, különösen Franciaország, Olaszország és Spanyolország, a világ szőlőtermesztésének és borászatának egyik legfontosabb központja. Az európai szőlőnemesítési programok a hagyományos fajták megőrzésére és fejlesztésére összpontosítanak, miközben egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a fenntarthatóságra és az éghajlatváltozás hatásainak kezelésére. Franciaországban például a *Vitis vinifera* hagyományos fajtáinak nemesítése mellett jelentős erőfeszítések történtek a *Vitis rotundifolia* és más rezisztens fajok bevonásával a lisztharmat és más gombás betegségek elleni védekezésre (Ibáñez & Carreño, 2014). A Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) számos új fajtát fejlesztett ki, amelyek jobb ellenállóképességgel rendelkeznek a betegségekkel szemben, és javítják a borászati minőséget. Olaszországban a szőlőnemesítés célja nemcsak az új, rezisztens fajták kifejlesztése, hanem a hagyományos helyi fajták genetikai variabilitásának megőrzése is (Forni & Mattivi, 2009).

Spanyolországban az éghajlatváltozás hatásai különösen súlyosak, mivel a mediterrán térségben a hőmérséklet emelkedése és a vízhiány egyre nagyobb kihívásokat jelent (Martínez, Pérez & Ibáñez, 2017).

- **Amerika: Innovatív genetikai kutatások és új technológiák**

Az Egyesült Államokban, különösen Kaliforniában, amely a világ egyik legnagyobb bortermelő régiója, a szőlőnemesítési kutatások jelentős technológiai újításokat alkalmaznak. A University of California, fontos szerepet játszik a genetikai kutatásokban, és számos új fajtát fejlesztettek ki, amelyek jobban ellenállnak a betegségeknek, és alkalmazkodnak a változó éghajlati körülményekhez.

Az amerikai kutatók különösen nagy hangsúlyt fektetnek a genetikai módosításokra és a genomszerkesztésre, mint például a CRISPR/Cas9 technológia alkalmazására a

szőlőnemesítésben (Myles et al., 2011). Ezek az innovatív módszerek lehetővé teszik, hogy célzottan módosítsák a szőlő DNS-ét, és olyan tulajdonságokat fejlesszenek ki, mint például a fokozott szárazságtűrés vagy a jobb betegségellenállás. Az ilyen technológiák gyorsabb és hatékonyabb megoldásokat kínálnak a szőlőnemesítés kihívásaira, különösen a klímaváltozás következményeinek kezelésében.

Az amerikai szőlőnemesítők továbbá aktívan dolgoznak a szőlő genetikai diverzitásának megőrzésén és bővítésén (Cousins & Walker, 2015). A kutatások során új genetikai markereket azonosítanak, amelyek lehetővé teszik a szőlőfajták gyorsabb és pontosabb kiválasztását a nemesítési programokban. Ezen markerek használata jelentős előrelépést jelent a nemesítési folyamat hatékonyságának növelésében, különösen a rezisztens és fenntartható fajták kifejlesztésében.

- **Ausztrália: Alkalmazkodás a szélsőséges körülményekhez**

Ausztrália különleges földrajzi helyzete és éghajlati viszonyai miatt a szőlőtermesztés itt is komoly kihívásokkal néz szembe. Az éghajlatváltozás hatásai, mint például a hőmérséklet emelkedése és az aszály, különösen erőteljesen érezhetők a kontinensen. Az ausztrál szőlőnemesítési programok középpontjában ezért a szélsőséges körülményekhez való alkalmazkodás áll.

Az Australian Wine Research Institute (AWRI) vezetésével végzett kutatások célja, hogy olyan szőlőfajtákat hozzanak létre, amelyek nemcsak a helyi klímához alkalmazkodnak, hanem a borászati minőséget is megőrzik (Robinson & Harding, 2015). Az ausztrál szőlőnemesítők továbbá olyan innovatív technikákat alkalmaznak, mint a precíziós mezőgazdaság, amely lehetővé teszi a termelők számára, hogy pontosabban kezeljék az erőforrásokat, például a vizet és a tápanyagokat, és minimalizálják a környezeti terhelést.

- **Ázsia: Hagyomány és modernitás ötvözése**

Ázsiában, különösen Kínában és Japánban, a szőlőtermesztés és nemesítés terén egyre nagyobb figyelmet fordítanak a genetikai kutatásokra. Kína például az utóbbi években jelentős beruházásokat eszközölt a szőlőnemesítési kutatásokban, hogy növelje saját bortermelési kapacitását és versenyképességét a nemzetközi piacon.

Kínában a szőlőnemesítési programok célja, hogy olyan fajtákat fejlesszenek ki, amelyek ellenállnak a szélsőséges időjárási viszonyoknak, például a hideg teleknek és a forró nyaraknak, amelyek jellemzőek az ország különböző régióira (Liu & Li, 2013). Emellett

nagy hangsúlyt fektetnek a szőlőfajták betegségellenállóságának javítására is, különösen a helyi kórokozókkal szemben, amelyek jelentős károkat okozhatnak a szőlőültetvényekben.

Japánban a szőlőtermesztés hagyományos módszereinek megőrzése mellett a kutatók egyre inkább beépítik a modern genetikai technológiákat is (Ogata & Yamamoto, 2011). A marker-alapú szelekció és a génbankok használata lehetővé teszi a japán szőlőnemesítők számára, hogy fenntartsák a genetikai diverzitást, miközben új, ellenálló fajtákat fejlesztenek ki.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Vizsgált fajták/ genotípusok

A bogyószín markerezéséhez a PTE Szőlészeti és Borászati Intézetének keresztezéssel előállított 19 csemegeszőlő nemesítési anyagát használtuk fel. A genotípusok jelöléseit az Eredmények fejezetben mutatjuk be.

A lizstharman (Ren3, Run1)- és peronoszpóra (Rpv3, Rpv10 és Rpv12) rezisztencia gének markerezésére Kozma Pál által előállított különböző génpiramidált családok egyedeit használtuk fel.

KT101-105: 00-1/7 x Csillám

KT1-17: Abigél x Csillám

KT106: 797 x Csillám

KT301-303: Furmint x Solaris

KT304: 00-1/7 x Furmint

A szakirodalom alapján nem egyértelmű, hogy a magyar nemesítésű Csillám fajta tartalmazza-e a Ren3 és Rpv3 géneket, így ennek eldöntését is célul tűztük ki. Kontrollként a Merczling (Ren3, Rpv3), az Abigél (Run1, Rpv12) és a Solaris (Ren3, Rpv3, Rpv10) fajtákat használtuk.

4.2. DNS izolálás

Az DNS izolálási eljárás során mintánként 100 mg fiatal levélmintát használtunk fel, amelyeket $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a feldolgozásig. A leveleket cseppfolyós nitrogén segítségével elporítottuk dörzsmozsárban, majd Eppendorf csövekbe helyeztük. A DNS kivonása a Macherey-Nagel NucleoSpin® Plant II készlettel történt. A homogenizált levélmintához $400\text{ }\mu\text{l}$ PL1 Puffert adtunk, és alaposan vortexeltük. Ezt követően $10\text{ }\mu\text{l}$ RNase A oldatot adtunk hozzá, majd újra vortexeltük. Az oldatot $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk 10 percig.

érdekében, hogy az optimális koncentrációt elérjük. A PCR reakciókhoz ideális koncentráció $10\text{ ng}/\mu\text{l}$, ezért minden mintát erre a szintre hígítottunk a további Az inkubáció után a mintákat $11,000\text{ x g}$ sebességgel 5 percig centrifugáltuk. A kapott felülúszót a NucleoSpin® Filteren keresztül átszűrtük, majd az átfolyóhoz $450\text{ }\mu\text{l}$ PC Puffert adtunk, melyet vortexelés vagy pipettázás segítségével homogenizáltunk. A DNS megkötéséhez $600\text{ }\mu\text{l}$ homogenizált mintát NucleoSpin® Plant II Column membránnal ellátott gyűjtőcsőbe töltöttünk, és egy percig centrifugáltuk ($11,000\text{ x g}$). Ezt a lépést ismételtük, hogy minél több DNS-t nyerjünk.

A membrán mosásához első lépésben $400\text{ }\mu\text{l}$ PW1 Puffert alkalmaztunk, majd centrifugáltuk (1 perc, $11,000\text{ x g}$). A második mosás során $700\text{ }\mu\text{l}$ PW2 Puffert használtunk, újabb egy perces centrifugálást követően. A harmadik mosáshoz további $200\text{ }\mu\text{l}$ PW2 Puffert adtunk, és két percig centrifugáltuk a szilikon membrán alapos tisztítása érdekében.

A DNS leoldása érdekében a NucleoSpin® Plant II Column-t friss, $1,5\text{ ml}$ -es Eppendorf-csőbe helyeztük, majd $50\text{ }\mu\text{l}$ előmelegített Elution Puffert adtunk hozzá ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on). Az oldatot 5 percig inkubáltuk $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd egy percig centrifugáltuk. A lépést megismételtük egy újabb $50\text{ }\mu\text{l}$ Elution Puffer hozzáadásával, így nyerve ki a DNS-t az Eppendorf-csőbe.

Ez az eljárás megbízható és gyors DNS izolálást biztosít, amely alkalmas további molekuláris biológiai vizsgálatokhoz.

A DNS mennyiségét és minőségét a NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel mértük. Amennyiben a minták koncentrációja meghaladta a 10 ng/μl értéket, hígítást végeztünk annak elemzések során.

4.3. PCR (Polimeráz Láncreakció)

A bogyószín és a rezisztencia gének markerezésére felhasznált primereket és szekvenciáikat az 2. táblázatban adjuk meg.

2.táblázat: A vizsgálatokban szereplő primerek és szekvenciái

Primer név	Forward primer szekvencia 5'-3'	Gén	Referencia
GF09-44-F	CATCGTTCCTTTCTTACTCGCT	Rpv10	Schwander et al 2011
GF09-44-R	GCTAATGGAGGGTAGTGCTCAA	Rpv10	Schwander et al 2011
UDV343-F	TCTCAATCGGGGATCTCAAG	Rpv12	Venuti et al 2013
UDV343-R	TCATGGCTGCAAAGGACATA	Rpv12	Venuti et al 2013
UDV737-F	TTTGCATGCGATACCTGAAG	Rpv3	Di Gaspero et al 2012
UDV737-R	TCCTGCAGCTGTTGACGATA	Rpv3	Di Gaspero et al 2012
VVIV67-F	TATAACTTCTCATAGGGTTTCC	Ren3	Zendler et al 2013
VVIV67-R	TTGGAGTCCATCAAATTCATCT	Ren3	Zendler et al 2013
VMC8g9-F	AACATTATCAACAACATGGTTTTA	Run1	Barker et al 2005
VMC8g9-R	ATATTCATCCTTCCCATCACTA	Run1	Barker et al 2005
MybA1a	AAAAAGGGGGGCAATGTAGGGACC C	VvMyb A1	Kobayashi et al 2004
MybA1b	GAACCTCCTTTTTGAAGTGGTGACT	VvMyb A1	Kobayashi et al 2004
MybA1c	GGACGTTAAAAAATGGTTGCACGT G	VvMyb A1	Kobayashi et al 2004

A fehér bogyószínt meghatározó VvMybA1a allél amplifikálására a MybA1a-MybA1c, a színes bogyószínt kialakító VvMybA1b és c allélok kimutatására a MybA1b-MybA1c primerpárokat használtuk.

A reakcióelegy összetevői a következők voltak:

- -2 µl templát DNS
- -2 µl PCR Puffer
- -0,05 µl (0,25U) GoTaq polimeráz (Promega)
- -0,2 µl (0,1 mM) dNTP
- -0,75 µl (0,75 µM) forward primer
- -0,75 µl (0,75 µM) reverse primer
- -4,25 µl víz.

A PCR-t Bioer Gene Explorer PCR készülékben végeztük el Touchdown program alapján az alábbi reakciókörülmények között:

2 perc elődenaturálás 94°C-on, majd 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 hőmérsékletet ciklusonként 1°C-kal csökkentettük. Ezt követően 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.

4.4. Agaróz gélelektroforézis

A bogyószín markerezésre kapott PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével választottam el. Az 1%-os agaróz gél elkészítéséhez 120 ml 0,5x TBE puffer és 1,2 g agaróz került összekeverésre, majd a keveréket mikrohullámú sütőben melegítettük, amíg teljesen felolvadt. A gél elkészítése után 40 °C-ra hűtöttük le, ezt követően 5 µl etídium-bromidot adtunk a DNS fragmentumok láthatóvá tételére.

Felvittem a 19 mintát a gélre az első zsebbe beinjektáltam a markert: GeneRuler 100 bp Plus.

Majd 30 percet váraкоztunk, hogy a gél végig fusson.

A PCR termékek megjelenítését UV fényben végeztük. A géleket UV fény alatt készítettük elő, majd azok fotódokumentációját az UVITEC Essential V6 (UVITEC Cambridge) gél dokumentációs rendszerrel végeztük.

4.5. Rezisztencia gének kimutatása Automata Lézer Fluorométer segítségével

A poliakrilamid gélen végzett ALF (Automated Laser Fluorometer) módszer a DNS fragmentumok pontos méretmeghatározására használt érzékeny technika. Az ALF rendszer alapja, hogy a DNS molekulákat fluoreszcensen jelölt primerekkel amplifikálják, majd ezeket elektromos mezőben elválasztják a poliakrilamid gélen. A lézerrel detektált fluoreszcens jelek alapján meghatározható a DNS fragmentumok mérete és koncentrációja.

Az ALF rendszer különösen fontos genotipizálásban és marker alapú szelekcióban, mivel gyors és pontos eredményeket nyújt, amelyek szükségesek a különféle genetikai tulajdonságok, például rezisztenciagének kimutatásához (pl. lisztharmat-rezisztencia).

Poliakrilamid gél összetétele:

✓ Acrylamid/ Bis-acrylamide solution BioRad	43 ml
✓ Urea	126 g
✓ 5x TBE	60 ml
✓ <u>mQ víz</u>	
Végtérfogat	300 ml

Majd ehhez a gélhez hozzáadok 30 µl 25% os APS és 30 µl TEMED-t.

Majd UV-fény alatt 40 percet várok, míg megszilárdul a gél.

Standardok betöltése 6.ábrán látható, a következőképpen:

A Külső /External wellsbe adok: 5 µl externalstandard + 5 µl víz

A Belső/Internal wellsbe adok: 3 µl internalstandard +5 µl víz +1 µl PCR termék

Futtatás paraméterei:

- -áramerősség: 35-40 mA
- -hőmérséklet: 55°C
- -feszültség: 850 V (konstans)



6.ábra Standardok betöltése

- -futási idő: 70-75 perc
- -teljesítmény: 30-40 W

Az Internal és External standardok-at 7.ábra mutatja be, itt látszik, hogy miért kell használnunk őket a minták kiértékeléséhez. Az ExS adja a 2 vég bp-ját míg a InS a belső bp -t.

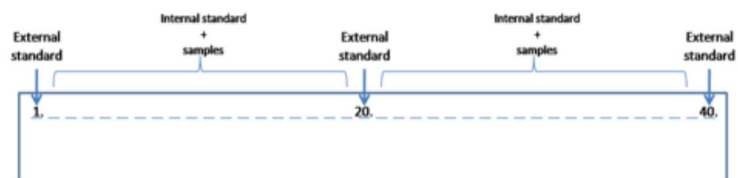
A minták felvitele a következőképpen történt:

1-2: External, 3-19: Internal, 20: External

Internal standard:

- 70 bp, 300bp or
- 95 bp, 300 bp or
- appropriate sizes according to your sample

External standard: 70 bp, 95 bp, 150 bp, 275 bp, 300 bp



7.ábra Az Internal és External standardok (Tóth-Lencsés Kitti alapján)

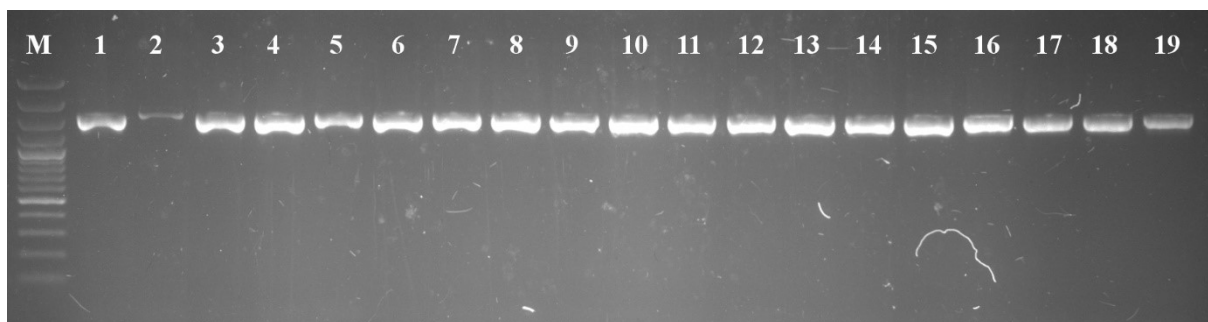
Az eredmény kiértékeléséhez és dokumentálásához a FragmentAnalyser1.0 számítógépes programot használtuk.

Az ismert nukleotidhosszúságú külső és belső standardok segítségével, a futtatás során, a gélben történő esetleges vándorlási különbségeket kiegyenesítettük, majd a programmal meghatároztuk az egyes allélek pontos méretét.

5. EREDMÉNYEK

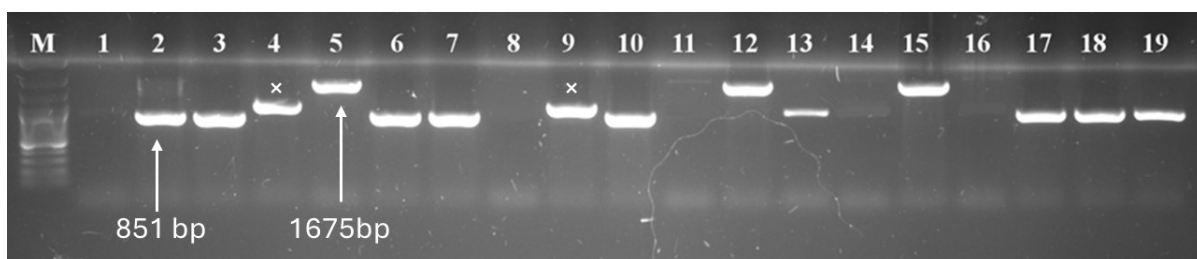
5.1. A szőlő bogyószín markerezése

A bogyószín markerezésére 19 pécsi csemegeszőlő nemesítési anyagot használtam fel. Első lépésben a fehér színt meghatározó VvMybA1a allélvariánst markereztük. A PCR termékek gélelektroforézisét követően minden mintában amplifikálódott a VvMybA1a allél jelenlétét igazoló 1560 bp méretű DNS fragmentum (8.ábra).



8.ábra: A VvMybA1a (fehér) allél kimutatására végzett PCR eredménye. M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus), 1. PTESZsz, 2. PTERR, 3. PTEBS, 4. PTE01, 5. PTE02, 6. PTE03, 7. PTE04, 8. PTE05, 9. PTE06, 10. PTE07, 11. PTE08, 12. PTE09, 13. PTE10, 14. PTE11, 15. PTE12, 16. 1824 1/4, 17. 1824 9/1, 18. 1824 1XA2, 19. 1824 4/1

Következő lépésben a funkcionális VvMybA1 allélok kimutatására alkalmas primerkombinációkkal végeztem el a PCR-t. A vad típusú VvMybA1c allél jelenlétét a 851 bp méretű, a Gret1 kivágódásával kialakult funkcióképes VvMybA1b allélt az 1657 bp méretű fragmentum jelezte (9.ábra).



9.ábra: A funkcióképes VvMybA1b és c allélok kimutatására végzett PCR eredménye. M: molekula méret marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus), 1. PTESZsz, 2. PTERR, 3. PTEBS, 4. PTE01, 5. PTE02, 6. PTE03, 7. PTE04, 8. PTE05, 9. PTE06, 10. PTE07, 11. PTE08, 12. PTE09, 13. PTE10, 14. PTE11, 15. PTE12, 16. 1824 1/4, 17. 1824 9/1, 18. 1824 1XA2, 19. 1824 4/1

Az 1., 8., 11., 14. és 16 mintákban nem kaptunk semmilyen PCR terméket, amely jelzi, hogy ezek a genotípusok fehér bogyószínnel rendelkeznek. A többi genotípus színes bogyójú és heterozigóta a színt kialakító allélekre. A 2., 3., 6., 7., 10., 13., 17, 18. és 19. minták a vad típusú VvMybA1c, az 5., 12. és 15 minták a VvMybA1b alléllal

rendelkeznek. A PTE01 (4) és a PTE06 (9) mintákban nem a várt méretű allélok amplifikálódtak, valószínűleg új allélvariánsokat találtunk, amelyek pontos meghatározásához további szekvenálási munkákra lesz szükség.

5.2. A liztharmat és peronoszpóra rezisztencia gének vizsgálata

A Run1, Ren3 liztharmat és az Rpv3, Rpv10, Rpv 12 peronoszpóra rezisztencia gének kimutatására a génekkel szorosan kapcsolt mikroszatellit markereket használtunk. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat: A liztharmat és peronoszpóra rezisztencia génekkel kapcsolt SSR markerekkel kapott adatok. Sárga színnel a rezisztencia génnel kapcsolt allélméreteket tüntettük fel.

Minták nevei	UDV15b	VVIV67	GF0944	UDV343	UDV737	VMC8g9	Rezisztencia gének
Csillám	167:179	346:356	231:231	186:198	270:292	168:176	Rpv3, Rpv10
Merczling	177:189	332:362	247:247	186:186	270:284	174:184	Rpv3, Rpv10, Ren3
Abigél	167:183	354:354	231:245	162:186	294:294	160:198	Run1, Rpv10, Rpv12
Solaris	167:189	332:354	231:247	186:213	270:270	178:184	Rpv3, Rpv10, Ren3,
KT101	179:179	354:354	231:254	186:186	270:278	160:168	Rpv3, Rpv10, Run1
KT102	179:189	332:354	231:245	198:198	278:292	160:176	Ren3, Run1, Rpv10
KT103	179:179	346:352	231:237	186:186	278:292	160:168	Run1, Rpv10
KT104	179:179	346:352	231:237	186:186	278:292	160:168	Run1, Rpv10
KT105	179:179	346:352	231:245	186:186	270:278	160:168	Rpv3, Rpv10, Run1
KT1	167:167	356:356	231:245	162:198	292:292	160:168	Rpv12, Rpv10, Run1
KT2	167:167	356:356	231:245	162:162	292:292	160:198	Rpv12, Rpv10, Run1
KT3	167:167	356:356	231:231	198:213	292:292	160:168	Run1, Rpv10
KT4	167:167	356:356	231:231	198:213	270:292	160:176	Rpv3, Rpv10, Run1
KT5	167:167	356:356	231:231	162:198	292:292	160:168	Rpv12, Rpv10, Run1
KT6	179:179	346:356	231:245	162:198	270:270	160:176	Rpv12, Rpv3, Rpv10, Run1
KT7	177:183	356:362	231:231	162:213	284:292	160:220	Rpv12, Rpv10, Run1
KT8	167:179	346:356	231:231	186:186	270:270	160:176	Rpv3, Rpv10, Run1
KT9	167:167	356:356	231:245	162:186	292:292	160:168	Rpv12, Rpv10, Run1
KT10	167:167	356:356	231:231	186:213	292:292	160:176	Run1, Rpv10
KT11	167:167	356:356	231:231	162:198	270:270	160:176	Rpv12, Rpv3, Rpv10, Run1
KT12	167:167	356:356	231:231	162:186	292:292	160:168	Rpv10, Rpv12, Run1
KT13	167:179	356:362	231:231	162:192	278:292	160:220	Rpv10, Rpv12, Run1
KT14	183:189	332:356	231:231	162:192	284:292	160:184	Ren3, Rpv10, Rpv12, Run1
KT15	167:167	356:356	231:245	186:186	270:292	160:176	Rpv10, Rpv3, Run1

KT16	167:179	346:356	231:245	162:198	270:292	160:176	Rpv10, Rpv12, Rpv3, Run1
KT17	179:183	346:356	231:231	162:186	270:292	160:168	Rpv10, Rpv12, Rpv3, Run1
KT106	167:183	356:356	231:245	198:198	270:278	160:168	Rpv10, Rpv3, Run1
KT301	169:189	332:346	231:245	192:213	292:294	168:190	Ren3, Rpv10
KT302	169:169	354:354	231:245	186:186	270:270	174:184	Rpv10, Rpv3
KT303	169:189	332:354	231:231	192:213	292:292	170:178	Ren3, Rpv10
KT304	169:189	332:354	231:245	192:192	278:278	160:174	Ren3, Rpv10, Run1
Rezisztencia gén	Ren3	Ren3	Rpv10	Rpv12	Rpv3	Run1	
Rezisztencia-génnel kapcsolt allél	189	332	231	162	270	160	

A referencia fajták az alábbi rezisztencia génekkel rendelkeznek:

Merczling: Rpv3, Ren3

Abigél: Run1, Rpv1, Rpv12

Solaris: Rpv3, Ren3, Rpv10

Mikroszatellit vizsgálataink ezt minden esetben meg is erősítették.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A szőlő az egyik legjelentősebb kultúrnövény, amely gazdasági és kulturális szerepet is betölt világszerte. A szőlőtermesztés alapját adja a borászatnak, amely nemcsak gazdasági értéket képvisel, hanem mély történelmi és kulturális kötődéssel is bír. Azonban a szőlő növényvédelme komoly kihívás elé állítja a termelőket, hiszen számos károsító fenyegeti, például a lisztharmat és a peronoszpóra, amelyek jelentős termésvesztést okozhatnak. A lisztharmat (*Erysiphe necator*) és a peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) különösen nagy károkat okoznak a szőlőültetvényekben világszerte, így fontos, hogy a nemesítési programokban olyan fajtákat fejlesszenek ki, amelyek ellenállóak ezekkel a betegségekkel szemben. A rezisztenciát biztosító gének és a szorosan kapcsolódó genetikai markerek felfedezése és alkalmazása lehetővé teszi, hogy ezek a kártevőkkel szemben védett fajták gyorsabban és pontosabban kerüljenek a termelésbe.

A szőlő bogyószíne szintén lényeges tulajdonság, amelyet genetikai markerek segítségével tanulmányoznak. A bogyószín nemcsak esztétikai szempontból fontos, hanem befolyásolja a bor minőségét és jellemzőit is. A VvMybA1 génvariánsok, például a VvMybA1b és VvMybA1c allélek markerezésével meghatározható a szőlő bogyószínéért felelős genetikai háttér, amely hasznos információt nyújt a nemesítők számára a színes bogyójú fajták kiválasztásában és fejlesztésében.

A bogyószín genetikai vizsgálatának keretében 19 pécsi csemegeszőlő nemesítési mintát választottam ki, hogy megvizsgáljam a fehér bogyószín genetikai alapját. Ennek érdekében első lépésként a fehér bogyószínt meghatározó VvMybA1a allélvariáns jelenlétét kerestem. Ehhez PCR (polimeráz láncreakció) technikát alkalmaztam, amely során specifikus primerek (MybA1a-MybA1c) segítségével olyan DNS fragmentumot amplifikáltam, amely a VvMybA1a allél jelenlétére utal. A kapott PCR termékeket gélelektroforézissel választottam szét, ahol minden mintában megfigyelhető volt az 1560 bp hosszúságú DNS fragmentum. Ez a fragmentum jelzi, hogy az összes minta tartalmazta a VvMybA1a allélt. Tehát minden egyes mintában kimutatható volt a VvMybA1a allél jelenléte, arra lehet következtetni, hogy a vizsgált pécsi csemegeszőlő minták mindegyike hordozza a fehér bogyószínért felelős allélt. Ez azt jelenti, hogy a fehér bogyószín jelen van ezekben a genotípusokban, azaz a DNS állományukban megtalálható a fehér színt meghatározó gén.

Ezután a szőlő bogyószínét meghatározó VvMybA1 gének különböző alléltípusait vizsgáltam, hogy pontosan meghatározzam, mely genotípusok felelnek a színes vagy fehér bogyószínért. A PCR során kétféle DNS fragmentum amplifikálódhatott, attól függően, hogy melyik allél van jelen: a 851 bp méretű fragmentum a vad típusú VvMybA1c allélt, míg a 1657 bp méretű fragmentum a Gret1 transzpozon kivágódásával kialakult funkcionális VvMybA1b allélt jelzi.

A PTE01 (4) és PTE06 (9) mintákban a PCR során nem a várt méretű allélok amplifikálódtak, ami azt jelenti, hogy valószínűleg új allélvariánsokat találtunk. Ezek pontos meghatározása érdekében további szekvenálási elemzések szükségesek.

A lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia gének vizsgálata a következő összefüggésekre adott választ. Az Rpv10 génnel kapcsolt GF0944 marker nem volt alkalmas a hibrid családokban a rezisztencia gén követésére, mert olyan esetekben is megkaptuk a rezisztenciával kapcsolt allélméreteket, amelyek szülői genotípusai nem tartalmazták ezt.

Ebben az esetben egy szorosabban kapcsolt markert kell kiválasztanunk a következő vizsgálatokra.

Markeres vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a Csillám fajta nem hordozza a Ren3 lisztharmat rezisztencia gént, viszont az Rpv3 peronoszpóra rezisztencia gént igen.

A molekuláris genetika markerek használata elengedhetetlen a rezisztencia nemesítési programokban. A szorosan kapcsolt markerek használatával elhagyható a sokszor körülményes mesterséges fertőzés és az azt követő fenotípusos értékelés. A hasznos gének piramidálását és a tartós rezisztencia kialakítását célzó nemesítési programok sem nélkülözhetik ezen genetikai markerek használatát. A vegetatív szaporítás miatt a szőlő erősen heterozigóta, így a legtöbb esetben a rezisztencia génekre is az. Ha egy betegséggel szemben több, különböző forrásból származó és eltérő hatásmechanizmusú rezisztencia géneket szeretnénk egyesíteni egyetlen genotípusban, kizárólag szorosan kapcsolt molekuláris markerek segítségével tehető meg. Csak fenotipizálással nem állapítható meg, hogy a rezisztens genotípusok milyen rezisztencia géneket tartalmaznak.

Összességében a molekuláris genetikai markerek alkalmazása nélkülözhetetlen a rezisztencia nemesítési programokban. A genetikai markerek használatával lehetőség nyílik a tartós rezisztenciát biztosító gének piramidálására, így a szőlőültetvények hatékonyabb védelme érhető el.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton fejezem ki hálámat témavezetőmnek, Dr. Szőke Antalnak, aki szakértelmével, idejével és értékes tanácsaival jelentős mértékben hozzájárult szakdolgozatom elkészítéséhez. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kittinek is, aki segített a laboratóriumi munkálatokban. Köszönöm a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézete, Genetika és Genomika Tanszékének a vizsgálatok elvégzéséhez biztosított lehetőséget és a munkatársak támogató hozzáállását. Végül, külön köszönet illeti a családomat a tanulmányaim során nyújtott türelmükért, megértésükért és folyamatos támogatásukért.

FORRÁSOK

- Antus, S., Mátyus, P. (2014). *Flavonoidok és antociánok a természetben*. Magyar Biokémiai Szemle, 39(2), 85-90
- Bán, R. (2006). A szőlő védelme. *Mezőgazdasági Kiadó*.
- Barker, C. L., et al. (2005). Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical and Applied Genetics*, 111, 370–377.
- Barker, C.L., et al. (2005). Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical and Applied Genetics*.
- Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, et al. (2009). Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(1), 163–176.
- Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A. F., Cipriani, G., Testolin, R., Morgante, M., & Di Gaspero, G. (2009). Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(1), 163-176.
- Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., et al. (2011). Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv10, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, pp. 1–11.
- Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996). *Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes*. *Plant Molecular Biology*, 32(3), 565-569. DOI: 10.1007/BF00019116
- Bouquet, A. Introduction Dans l'espèce *Vitis vinifera* L. d'un Caractère de Résistance à l'oidium (*Uncinula necator* Schw. Burr.) Issu de l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. *Vignevine* **1986**, 12, 141–146.
- Cadle-Davidson, M. M., Gadoury, D. M., Kozma, P., & Reisch, B. I. (2011). Exploiting germplasm diversity to develop powdery mildew resistant grapevines. *Plant Pathology*, 60(4), 533-543

- Calonnec, A., Cartolaro, P., Poupot, C., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2004). Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and consequences on wine quality. *Plant Pathology*, 53(4), 434-445.
- Carrasco, D., et al. (2015). Allelic variation in the VvMybA1 and VvMybA2 domestication genes in natural grapevine populations. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 1613-1624.
- Cousins, P., & Walker, M. (2015). Maintaining grapevine genetic resources: Preservation and utilization. *Journal of American Society for Enology and Viticulture*, 66(3), 313-320.
- D, Foria S, et al. (2013). Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *PLoS ONE*, 8 doi:10.1371/journal.pone.0061228.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., & Richberg, M. H. (1996). Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *The Plant Cell*, 8(10), 1793-1807.
- Di Gaspero G, Foria S (2015) Molecular grapevine breeding techniques. In: Elsevier (ed) Grapevine breeding programs for the wine industry. Elsevier, New York, pp 23–37
- Di Gaspero, G., & Cipriani, G. (2003). Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(5), 612–623.
- Di Gaspero, G., Copetti, D., Coleman, C., Magris, G., Blasi, P., Marroni, F., & Morgante, M. (2012). Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(2), 277-286
- Donald, T. M., et al. (2002). Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 610–618.
- Dry, P., & Coombe, B. (2004). Viticulture: Australian and New Zealand Grape Growing. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 1-11.
- Duchêne, E., & Schneider, C. (2005). Grapevine and climatic changes: A glance at the situation in Alsace. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(1), 93-99
- Dudits, D., & Heszky, L. (2014). Növényi biotechnológia és géntechnológia. Mezőgazdasági Kiadó

- Feechan, A., Jermakow, A., Torregrosa, L., Panstruga, R., Dry, I. B. (2015). Molecular events of powdery mildew disease on grapevine. *Molecular Plant Pathology*, 16(2), 165-179.
- Fischer, B. M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K. J., Töpfer, R., & Zyprian, E. M. (2004). *Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine*. Theoretical and Applied Genetics, 108(3), 501-515.
- Forni, G., & Mattivi, F. (2009). Grapevine genetic diversity and the preservation of traditional Italian cultivars. *Vitis Journal*, 48(1), 12-20.
- Gadoury, D. M., Seem, R. C., Pearson, R. C., & Wilcox, W. F. (2001). Effects of Powdery Mildew on Vine Growth, Yield, and Quality of Grapes. *Phytopathology*, 91(9), 976-983.
- Gessler, C., Pertot, I., & Perazzolli, M. (2011). *Plasmopara viticola*: A review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1), 3-44.
- Harbone, J. B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Z., Testolin, R., Morgante, M., & Oláh, R. (2008). *Resistance to Erysiphe necator in Vitis vinifera and Vitis species*. Theoretical and Applied Genetics, 116(4), 427-439.
- Ibáñez, J., & Carreño, J. (2014). Application of molecular markers in grapevine breeding. *OENO One*, 48(4), 293-302.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A., Waterhouse, A. L. (2001). *Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening*. *Phytochemistry*, 55(1), 77-85. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00362-7
- Kiss, J. (2005). *Molecular markers in grapevine breeding*. *Journal of Grapevine Research*, 41(3), 219-231.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin colour. *Science*, 304, 982.
- Konieczny, A., & Ausubel, F. M. (1993). *A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers*. *The Plant Journal*, 4(2), 403-410.

- Liu, X., & Li, X. (2013). Advances in grape breeding in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(2), 238-245
- Martínez, L., Pérez, A., & Ibáñez, J. (2017). Adaptation of Spanish grapevines to climate change. *International Journal of Agricultural Sustainability*, 15(3), 320-333.
- McGovern, P. E. (2003). Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture. *Princeton University Press*.
- Moreira, F. M., Madini, A., Marino, R., Zulini, L., Stefanini, M., Velasco, R., & Moser, C. (2011). Genetic linkage maps of two downy mildew resistant grapevine cultivars, Mgaloblishvili and Mtsvane, and localization of resistance related regions. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(3), 575-593.
- Mullins, M. G., Bouquet, A., & Williams, L. E. (1992). Biology of the Grapevine. *Cambridge University Press*.
- Muñoz-Espinoza, C., Di Genova, A., Sánchez, A., Correa, J., Espinoza, A., Meneses, C., Maass, A., Orellana, A., & Hinrichsen, P. (2020). Identification of SNPs and InDels associated with berry size in table grapes integrating genetic and transcriptomic approaches. *BMC Plant Biology*, 20, Article 365.
- Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C. L., Brown, P. J., Grassi, F., & Aradhya, M. K. (2011). Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3530-3535.
- Nagy, I. (1999). *PCR-based methods for genetic mapping in plants*. In *Genetic Mapping in Plants* (pp. 89-110).
- Ogata, T., & Yamamoto, N. (2011). Genetic analysis of Japanese grape varieties. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 45(4), 353-362.
- Pauquet, J., et al. (2001). Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 1201-1210.
- Rakonczás, N. (2014). A lisztharmat és peronoszpóra elleni rezisztencia a szőlőfajtákban. *Mezőgazdasági Kutatások*.
- Ramming, D. W., Gabler, F., Smilanick, J., Cadle-Davidson, L., Barba, P., Mahanil, S., & Cadle-Davidson, M. (2011). A Single Dominant Locus, Ren4, Confers Non-Race-Specific Resistance to Grapevine Powdery Mildew. *Phytopathology*, 101(4), 502-508.

- Riaz S., Vezzulli S., & Walker M.A. (2011). Genetic characterization and mapping of powdery mildew resistance loci in grapevine. *Phytopathology*, Volume, Page Range.
- Riaz, S., Huerta-Acosta, K. G., Tenschler, A. C., & Walker, M. A. (2020). Genetic mapping of powdery mildew resistance in wild and cultivated *Vitis* species: implications for breeding strategies. *Frontiers in Plant Science*.
- Riaz, S., Tenschler, A. C., Ramming, D. W., & Walker, M. A. (2011). Using marker-assisted selection to breed for powdery mildew resistance in grapevine
- Riaz, S., Tenschler, A. C., Smith, B. P., Ng, D., & Walker, M. A. (2013). Resistance to Grapevine Powdery Mildew (*Erysiphe necator*) in Wild *Vitis* Species. *American Journal of Enology and Viticulture*.
- Robinson, J., & Harding, J. (2015). *The Oxford Companion to Wine*. Oxford University Press.
- Salvi S, Tuberosa R (2015) The crop QTLome comes of age. *Curr Opin Biotechnol* 32:179–185. doi:10.1016/j.copbio.2015.01.001
- Schwander, F., Eibach, R., Fechter, I., Hausmann, L., Zyprian, E., & Töpfer, R. (2012). Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(1), 163-176.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjioudjop, M. N. (2006). *An overview of molecular marker methods for plants*. *African Journal of Biotechnology*, 5(25), 2540-2568.
- This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511-519.
- Trebbi, D., & McClean, P. (2012). Marker-assisted selection for drought resistance in cereals. *Frontiers in Plant Science*, 3, 347.
- Venuti S, Copetti D, Foria S et al (2013) Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *PLoS ONE* 8:e61228. doi:10.1371/journal.pone.0061228
- Verries, C., et al. (2008). *Phenolic composition of grape and wine: Influence of ripening and winemaking practices*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 160-170. DOI: 10.1021/jf072897q

- Viviana Sosa-Zuniga 1,2 , Álvaro Vidal Valenzuela 3 , Paola Barba 4 , Carmen Espinoza Cancino 5 ,Jesus L. Romero-Romero 6 and Patricio Arce-Johnson 1,7,*(2022) Powdery Mildew Resistance Genes in Vines: An Opportunity to Achieve a More Sustainable Viticulture
- Walker, A. R., et al. (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant Journal*, 49, 772-785.
- Wan, Y., Schwaninger, H., Baldo, A. M., Labate, J. A., Zhong, G. Y., & Simon, C. J. (2007). Discovery of Phylloxera-resistant Grape Species and Development of Molecular Markers for Grape Breeding. *BMC Plant Biology*.
- Wan, Y., Schwaniniger, H., He, P., Wang, Y. (2007). Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis* 46: 132-136.
- Wang, X., Xu, K., Jia, D., Chen, H., Li, T., Xu, X., & Zhang, S. (2020). Identification of SNPs associated with seedlessness and seed trace size in grapevine using high-throughput genotyping. *BMC Plant Biology*, 20, Article 510. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02663-2>
- Welter, L. J., Göktürk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R., & Zyprian, E. M. (2007). Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting downy mildew resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Molecular Breeding*, 20(4), 359-374.
- Winkel-Shirley, B. (2001). *Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology*. *Plant Physiology*, 126(2), 485-493. DOI: 10.1104/pp.126.2.485
- Zendler, D., Schneider, P., Töpfer, R., & Zyprian, E. (2017). *Fine mapping of Ren3 reveals two loci mediating hypersensitive response against Erysiphe necator in grapevine*. *Euphytica*, 213(3), 68.
- Zhou, Y., Zhang, D., An, X., et al. (2020). *New quantitative trait locus (QTLs) and candidate genes associated with the grape berry color trait identified based on a high-density genetic map*. *BMC Plant Biology*, 20, Article 2630.
- Zinelabidine, L. H., Vivoda, V., Ljubojević, M., & Šimon, S. (2019). Advances in genomic selection and breeding applications in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1507.

- Zyprian, E., Ochssner, I., Schwander, F., et al. (2016). Mapping the RUN1 and RPV1 loci for resistance to grapevine downy and powdery mildew in the grapevine breeding program. *Plant Breeding*, 135(2), 107-114.

NYILATKOZAT

Marton Mirjam (AHZMSG) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: 2024 év 11 hó 01 nap



belső konzulens