

## **Összefoglaló szakmai zárójelentés:**

### **Szelekciós módszerek fejlesztése a fenntartható szőlőtermesztést szolgáló, kórokozókkal szemben magas fokon ellenálló innovatív fajták nemesítéséhez (OTKA K125474)**

#### **1. Felmerült problémák, akadályok**

A pályázat megvalósítására meglehetősen viharos időkben került sor. A vírusjárványhoz kapcsolódó korlátozások, valamint a konzorcium mindkét résztvevőjét érintő átszervezések, vagy akár a legutóbbi időben zajló nagyszabású felújítások kisebb-nagyobb mértékben hátráltatták, időnként lehetetlenné tették mind a növényes, mind pedig a laboros munkát.

A feketerothadás fenotipizálás a peronoszpórával, lisztharmattal ellentétben nem lehetséges levélkorongokon, vagy egyéb növényi részeken, a tesztelés a hosszú (2-3 hét) és összetett (biotróf és nekrotrof szakasz) kórfolyamat miatt csak élő növényen lehetséges. A különböző életkorú zöld részek eltérő érzékenysége, a természetes fertőzési nyomás hektikus volta nehezítik az egyértelmű fenotipizálást. Mivel a genotipizálás nagy költségű módszerrel történt, így csak azokat az egyedeket szekvenáltuk, amelyek fenotípusa mesterséges körülmények, valamint több év szabadföldi adatsor alapján következetesnek mutatkozott. A térképező populáció végső mérete, illetve az összes egyed így a tervezettnél később állt csak rendelkezésre, ami a laboros és bioinformatikai munkát is valamelyest késleltette. Ezt ellensúlyozandó a feketerothadás esetében sikerült olyan markereket bevonni a szelekciós munkába, amivel a komplex marker-támogatott szelekciót fejleszteni tudtuk.

#### **2. Marker-támogatott szelekció fejlesztése**

##### **2.1 A lisztharmat ellenállóság marker-támogatott szelekciója**

###### **2.1.1 A lisztharmat ellenállóság fenotipizálása és genotipizálása**

A kutatás során a lisztharmat rezisztencia markerezését – tesztelését több szinten végeztük:

1. A keresztezésből származó magoncok lisztharmat ellenállóság tesztelése üvegházban. A lisztharmat rezisztencia 1:1 arányban hasad tünetmentes és tünetes egyedekre.
2. A tünetmentes egyedek lisztharmat rezisztenciájának ellenőrzése mesterséges fertőzéssel.
3. A lisztharmat rezisztenciára szelektált kísérleti anyagok szabadföldi tesztelése.
4. Rezisztens és fogékony egyedek tesztelése az irodalomból ismert markerekkel.
5. Rezisztens és fogékony egyedek tesztelése újonnan fejlesztett markerekkel-

###### **2.1.2 Ren4 lisztharmat rezisztencia marker fejlesztése**

Az irodalomban korábban már leírtak a 18. kapcsoltsági csoportba térképezett Ren4 rezisztencia génnel szorosan kapcsolt mikroszatellit (VMC7f2) és egyetlen nukleotid polimorfizmuson (SNP) alapuló markereket, azonban ezek nem, vagy csak korlátozott mértékben alkalmasak a gyakorlati munkában. A szőlő referencia genom alapján a rezisztenciáért/fogékonyságért felelős báziscseréket magukba foglaló szakaszokra új primereket terveztünk és az amplifikált PCR termékeket szekvenáltuk. A szekvenciák restriktions térképének meghatározásával azonosítottuk azokat a pontmutációkat, amelyek restriktions enzim felismerő hely változást eredményeztek. Az elemzett

szekvenciákon összesen négy ilyen hasítóhelyet érintő mutációt találtunk, amelyekre PCR-RFLP markereket fejlesztettünk. Az amplifikált PCR termékek restriktív enzimekkel történő emésztését követően a HpyF10VI enzim bizonyult alkalmasnak a *Ren4* gént tartalmazó (*V. romanetii*) és nem tartalmazó genotípusok elkülönítésére. Ez lehetővé tette a *Ren4* gén két lépésben történő azonosítását. Következő lépésben továbbfejlesztettük a *Ren4* lisztharmat rezisztencia gén kimutatására alkalmas PCR-RFLP markereket. A korábban azonosított pontmutációkra speciális SNP primereket terveztünk, amelyek segítségével lehetővé vált, hogy egyetlen polimeráz láncreakcióval azonosítani tudjuk a *Ren4* gént hordozó genotípusokat. Ez a módszer a tetra-primer ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction), amely a hagyományos PCR-rel szemben 4 primert használt egy reakcióban és agaróz gélelektroforézist követően azonnal detektálhatók a pontmutációk típusai.

A kifejlesztett markereket olyan hibrid családokban teszteltük, amelyeket a *Run1* lisztharmat rezisztencia gént hordozó 01-1-797 nemesítési anyag és különböző *V. romanetii* (*Ren4*) genotípusok keresztezésével állítottak elő. Célunk azon lisztharmat ellenálló magoncok molekuláris szelekciója volt, amelyek mind a *Run1*, mind a *Ren4* rezisztencia géneket tartalmazzák. A két tünetmentes rezisztenciát biztosító gén kombinálása jelenti a magas fokú és tartós rezisztencia zálogát.

## 2.2. Feketerothadás marker-támogatott szelekció fejlesztése

### 2.2.1. Feketerothadás térképezési család

A több száz egyed tartalmazó térképezési család: **01-1-797** / VRH3082-1-42 (*Muscadinia rotundifolia* × *V. vinifera*) BC4 × Petra (*V. amurensis* × *V. vinifera*) BC2/ × **Csillám** (Seibel 4986 × Kékfrankos) a projekt kezdésére rendelkezésre állt. A 01-1-797 szülő nővirágú, az öntermékenyülés kizárása érdekében választottuk. A Csillám volt a feketeterothadás rezisztencia donor.

### 2.2.2. Fenotipizálás fejlesztése

A feketeterothadás fenotipizálást az első évben mesterséges körülmények között, kifejezetten erre a célra létrehozott létesítményben végeztük cserepes növényeken. A tesztkamrában történő fertőzést követően közel 200 magoncot átoltottunk a Pécsi Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetében egy olyan tesztelőkertben, ami kémiai növényvédelemben nem részesül és mikroklímája kiemelten alkalmas a gombás betegségekkel szembeni ellenállóképesség tesztelésére, mivel a kórokozó nyomás minden évben erősebb az átlagosnál. A következő években ezeket a növényeket bonitáltuk és meghatároztuk a feketeterothadás lombrezisztencia mértékét. Azokat az egyedeket jelöltük ki genotipizálásra, amelyek a szabadföldön legalább két évben a tesztkamrában kapott ellenállóság, illetve fogékonyság értékekkel legalább részben összhangban voltak (a bonitálást az OIV útmutatása alapján végeztük).

A kutatás során a feketeterothadás ellenállóképesség tesztelését és markerezését több szinten végeztük:

1. A keresztezésből származó magoncok feketeterothadás ellenállóság tesztelése tesztkamrában.
2. A szelektált magoncok újbóli tesztelése mesterséges fertőzéssel és molekuláris markerekkel.
3. A kísérleti anyagok szabadföldi tesztelése fertőzött területen.
4. A magas fokú lisztharmat és peronoszpóra rezisztens, de még ismeretlen feketeterothadás ellenállósággal bíró magoncok szaporítása, majd a szőlészeti szempontok alapján történő

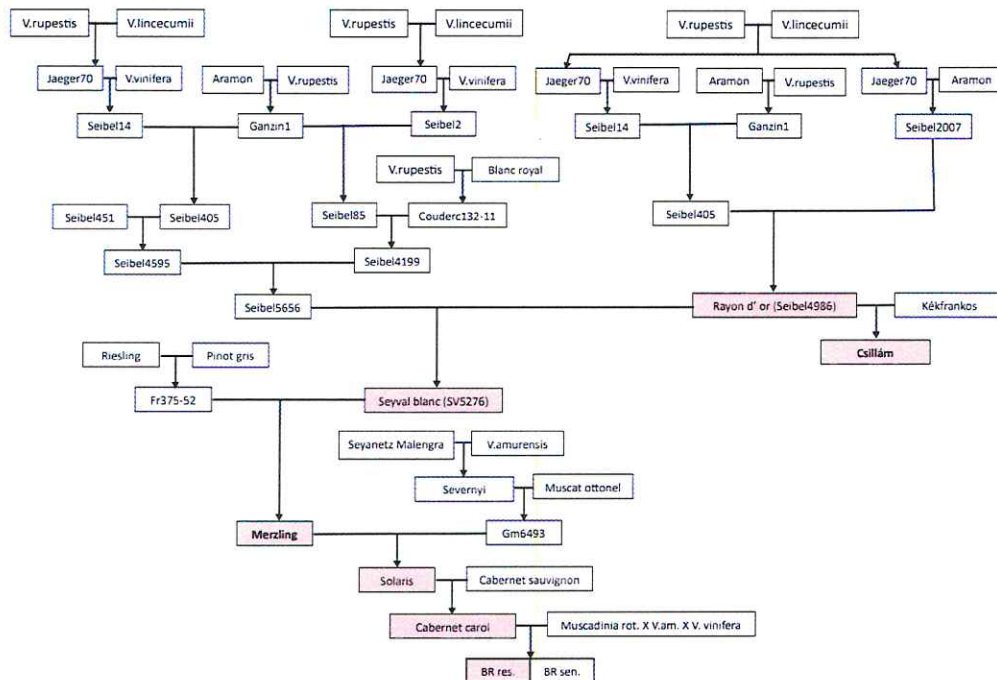
szelekcióval párhuzamosan a feketerothadás ellenállóság értékelése bonitálással és molekuláris markerrel.

Erre a követési folyamatra azért volt szükség, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a kezdetben molekuláris markerekkel kiemelt, valamint fertőzéssel is tesztelt egyedek esetében a kapcsoltság a marker és a rezisztencia között tartósan fennáll-e?

### 2.2.3. Feketerothadás rezisztencia források feltárása, értékelése

A pályázat futamideje alatt tovább nőtt az ismeretünk a nemesítésben potenciálisan felhasználható rezisztenciaforrásokról, bizonyos esetekben azok genetikai hátteréről is. A feketerothadás ellenállóság genetikai hátterével kapcsolatban az első – és sokáig egyetlen – publikáció 2014-ben jelent meg (Rex et al., 2014, Theor Appl Genet 127). A következő tanulmány (Bettinelli et al., 2023, Int J Mol Sci 24) közel 10 évet múlva került közlésre, amely a lomb rezisztencia mellett a virág / fűrt feketetrohadás rezisztenciához kapcsolt makert is közölte. Az első vizsgálatok a 'Börner' alnyfajta ellenállóságára alapoztak, amelyet eleinte a *V. cinerea* fajból eredeztettek, később azonban a *V. riparia* fajt jelölték meg az ellenállóképesség potenciális forrásának.

Időközben azonban nyilvánvalóvá vált, hogy a rezisztencia nemesítés számára az alanynemesítés helyett a borszőlő nemesítésből származó 'Rayon d'or' (1. ábra) és annak utódai (pl. 'Merzling' vagy 'Csillám') jelenthetik a jó feketerothadás rezisztencia forrást. Ez a rezisztencia feltehetően a *V. rupestris* fajból származik. Az elmúlt évek mesterséges fertőzései és több éves szabadföldi adatsorok alapján kiemelt feketerothadás ellenálló fajták, nemesítési alapanyagok lehetnek: 'Solaris', 'Merzling', 'Muscaris', 'Bronner', 'Souvignier gris', 'Cabernet carol', CsFT 61, CsFT 92, 'Csillám'.



1. ábra: A feketerothadás lombrezisztencia követése GF-14-42 markerrel 5 nemzedéken keresztül. A szín kiemelés a 'Rayon d'or' feketerothadás ellenállóságát követi.

Annak tisztázására, hogy a rendelkezésre álló, illetve újonnan kifejlesztett markerek ezen a vonalon alkalmazhatóak-e, teszteltünk az irodalomban rendelkezésre álló három markert 48 egyedben, amelyek között szerepeltek a *V. rupestris* eredetű családtagjai, feketeerőthadásra fogékony és ellenálló fajták, lisztharmattal és / vagy peronoszpórával szemben ellenálló, de feketeerőthadásra érzékeny fajták, illetve a térképezéshez használt fogékony és ellenálló egyedek.

Eredményeink alapján a levéllenállóság marker-támogatott szelekciójára alkalmas lehet a GF-14-42 marker *V. rupestris* genetikai háttérben annak ellenére, hogy azt a közlemények szerint eredendően *V. riparia* genetikai háttérben fejlesztették ki. Az állítólagosan fürtrezisztenciához kapcsolt VMC2C3 marker ugyanakkor annak ellenére sem tűnik alkalmazhatónak az ellenállóság előrejelzésére, hogy azt ugyanabban a *V. rupestris* genetikai háttérben fejlesztették ki, mint amiben ismereteink szerint a 'Csillám' fajtával mi is dolgozunk.

#### 2.2.4 Szekvenálás alapú genotipizálás

Mivel az előzetes RNS szekvenálás eredmények és az irodalmi adatok alapján legalább részben olyan gének határozzák meg a betegségellenállóságot, amelyek kiterjedt géncsaládok részét képezik, a rövid szekvencia olvasatok nem minden esetben adnak megbízható eredményt. Ezen kívül a rezisztenciáért felelős QTL-ek várhatóan olyan genomi régiókat is érintenek, amik a 'Pinot noir' referencia genomon nem feltétlenül találhatóak meg. A genetikai térkép fejlesztéséhez ezért szükségesnek találtuk a szülő genotípusok referencia genomjának meghatározását hosszú leolvasásokat biztosító szekvenálási technikával. Ilyen módon olyan markerek is azonosíthatóak, amelyeket a 'Pinot noir' referencia genomhoz való illesztés során nem találtunk meg. A minél pontosabb SNP azonosítás érdekében a két szülő egyed teljes genomját megszekvenáltuk Oxford Nanopore technikával.

A szülői genotípusok és a térképezési család 80 egyedének genomját megszekvenáltuk rövid leolvasást adó Illumina technológiával. Fás növények térképezése során általában gondot okoz ugyanis, hogy a térképezési keresztezés nem követi azokat az idealizált keresztezéseket, amelyekre a QTL azonosító algoritmusok kifejlesztésre kerültek. Vannak ugyan megoldások ezekre a populációkra is, de ezek jóval kevésbé hatékonyak. Az általunk választott megközelítéssel olyan nagy számú SNP-t azonosítottunk, hogy azok közül a QTL azonosításhoz ki tudtuk választani azokat a markereket, amelyek úgy viselkednek, mint a gondosan felépített kísérleti populációk. A szülők kapcsolási térképe elkészült, a QTL azonosítása folyamatban van mind kapcsolási térképezés alapján, mind pedig asszociációs térképezéssel.

Az SNP-ken kívül részletesen felmértük a hasadó nemzedékben a kópiaszám variánsokat (copy number variations, CNVs) is. Az ilyen változások meglehetősen gyakoriak a genomon és távoli keresztezések esetén viszonylag nagy mennyiségben fordulnak elő és kapcsolatba hozhatók a környezeti válaszokkal is. A térképezés során az azonosított CNV-eket is figyelembe vettük.

#### 2.2.5. A feketeerőthadás rezisztencia beépítése az új innovatív szőlőfajtákba

A kutatás és fejlesztés eredményeinek felhasználása gazdasági haszonra vezetnek, mivel a feketeerőthadás rezisztenciájának beépítése az új innovatív rezisztens fajtákba megkerülhetetlen feladat. A feketeerőthadás ellen biztonságos védelem jelenleg leginkább csak megelőző, felszívódó fungicidek használatával lehetséges.

Az immunitás szintű lisztharmat, magas fokú peronoszpóra rezisztenciával rendelkező új innovatív szőlőfajtáinkba megkezdük a feketerothadás beépítését 2018-ban. Nagy méretű hibridcsaládokat állítottunk elő, hogy kombinálni tudjuk a magas fokú, piramidált lisztharmat, piramidált peronoszpóra, valamint feketerothadás rezisztenciákat. Az első kiemelések megtörténtek és Villányban 2022-ben 9 kiemelt jelöltet idősebb tőkék átoltásával összehasonlító kísérletbe állítottunk.

Ehhez a programhoz kapcsolódik a lisztharmat, peronoszpóra és a feketerothadás rezisztenciájának beépítése a Furmint fajtába.

### 2.3. Komplex markerezés lehetőségei

A komplex markerezés tesztelésére a *Run1* lisztharmat, az *Rpv1* és *Rpv12* peronoszpóra rezisztencia géneket hordozó 01-1-797 nemesítési anyag és különböző *V. romanetii* genotípusok keresztezésével három hibridcsaládot állítottunk elő (17-4, 17-5, 17-6). A hibridcsaládok magoncait 9 mikroszatellit markerrel ellenőriztük, hogy kizárjuk a nem tervezett megporzást.

A *Run1* gén kimutatására a korábban már leírt VMC8g9 kapcsolt mikroszatellit markert használtuk. Célunk azon lisztharmat ellenálló magoncok molekuláris szelekciója volt, amelyek mind a *Run1*, mind a *Ren4* rezisztencia géneket tartalmazzák, amelyek mindegyike tünetmentes, immunitás szintű rezisztenciát biztosít. A szelekció csak genotipizálással oldható meg, mert csupán fenotipizálással a lisztharmatra ellenálló magoncokban nem tudjuk meghatározni, hogy tartalmazzák-e mindkét, vagy csak az egyik vagy másik rezisztencia gént. Az így szelektált egyedekből a megfelelő borászati értékekkel rendelkezők alapját képezhetik a tartós rezisztencia kialakítását célzó innovatív új fajták előállításának.

A feketerothadás ellenállóság markerezésére eredményeink alapján megfelelőnek tűnik a GF-14-42 marker a levélrezisztencia esetében, azonban a fürtrezisztencia nem teljesen megoldott továbbra sem. Bár a feketerothadás virágzaton / fürtön okozott kártétele rendkívül pusztító lehet és sikeres szőlőfajta csak fürtrezisztenciával képzelhető el, a levélrezisztencia a közvetlen kártétel mellett közvetetten is kiemelkedő jelentőséggel bír. A feketerothadás esetében a markeres szelekció jelentőségét tovább növeli, hogy a fenotipizálás a biotróf kórokozókhoz (peronoszpóra, lisztharmat) képest kifejezetten nehézkes, így egy jó marker kiemelkedően hasznos eleme a nemesítő szelekciós eszköztárának.

### 3. Publikációs tevékenység összefoglalása, a projekt hatása

Az eredmények publikációs szinten jelentősek, de a pályázat során fellépett akadályok miatt még nem hoztak a projekt jelentőségéhez mérhető elismerést, a legjelentősebb eredmények a publikációk szintjén még nem jelentek meg, a kéziratok előkészítése folyamatban van. Ugyanakkor a projekt eredményeinek jelentőségét mutatja, hogy a visszajelzések alapján a magyar nyelven megjelent publikációkat a versenypartnerek (külföldi nemesítő intézetek) magyarról lefordították maguknak, és felvették a kapcsolatot a csoporttal, hogy minden információt követni tudjanak. A téma fontosságát mutatja az is, hogy a feketetrohadásról a projekt keretében megjelent összefoglaló cikk a jelentés írásakor több mint két hónapja szerepel a folyóirat címlapján a kiemelt cikkek között, mint a legtöbbet megtekintett cikkek egyike. A munka során – részben a projekthez kapcsolódó genetikai anyagokkal – sikerült bekapcsolódnunk egy meghatározó nemzetközi projektbe is,

amelynek eredményeként egy kiemelten nagy hatású, a Science folyóiratban megjelent tanulmány született.

A projekt keretében született szakdolgozatok, diplomamunkák:

- OTDK
  - Szabados Fanni – Lisztharmat rezisztencia gének markerezése szőlőben
- TDK
  - Szabados Fanni - A Ren4 lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt molekuláris markerek fejlesztése szőlőben. Különdíj
- Diplomadolgozat
  - Szabados Fanni - A Ren4 lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt molekuláris markerek fejlesztése szőlőben
  - Czimer Balázs: Szőlő szaporítóanyag lisztharmattal szembeni ellenállósága marker gén alapján.
  - Kovács Gergely – Szomatikus embriogenezis indukciójának optimalizálása a Furmint szőlőfajta esetében (2022)
  - Polyák Ágnes - Ellenálló és fogékony szőlőfajta feketerothadás levélfertőzésre adott reakciójának összehasonlítása a levelek sztilben tartalma alapján (2021)
  - Azeze Wubie Kassa - Development of Single Nucleotide Polymorphism based marker for selection the Ren4 powdery mildew resistance gene in grapevine (2019)
- Szakdolgozat
  - Preiner Tamara - A Solaris fajta bemutatása Magyarországon (2022)

A kutatás időszakában 6 rezisztens borszőlő fajta kapott állami elismerést és 12 borszőlő fajtát jelentettünk be állami minősítésre. Ezek közül 2 fajta kapott EU (CPVO) fajtavédelmet, egy harmadik fajta szabadalmaztatása folyamatban van. A fajták nemesítésében a rezisztencia tesztelésében a kutatási programban szereplő molekuláris markerek nyújtottak segítséget. Így a kutatás tudományos eredményei a kutatás végső célját szolgáló rezisztens fajta előállítási program konkrét kézzel fogható, piacosítható eredményeihez járultak hozzá. Olaszországban három fajtát intenzíven szaporítanak, Svájcban és Brazíliában elkezdődtek a tájkísérletek.

A publikációkon kívül jelentős hatása volt a projektnek a résztvevők nemzetközi megjelenésére, kapcsolatrendszerére is. Európán belül San Micheleben (Olaszország) és Siebeldingenben (Németország) folyik kutatás a feketerothadás elleni rezisztencia további feltárására. Az olasz intézet együttműködést ajánlott föl a feketerothadás genetikai kutatására (markerezés, bioinformatika, adatbázis fejlesztés) és közös nemesítési programra, amely együttműködés keretei között hazai kutatók közvetlenül segítik az ott folyó nemesítési munkát is.

Kelt: Pécs, 2023. július 4.



Dr. Kozma Pál  
konzorcium vezető