Tartós rezisztencia szőlőben: markerekre alapozott génpiramidálás és két, *Vitis vinifera* eredetű lisztharmat rezisztenciagén összehasonlítása

PD 72424
Veres Anikó

Bevezetés, a pályázat célkitűzései

A szőlőnemesítés egyik alapvető célkitűzése a két legjelentősebb gombabetegséggel a lisztharmattal (*Uncinula necator*) és a peronoszpórával (*Plasmopara viticola*) szemben tartós rezisztenciát hordozó fajták előállítása.
A tartós rezisztencia kialakítása, az egyes rezisztencia gének piramidálása, a major géneken kívül kvantitatív rezisztencia gének bevitele a legértékesebb genotípusokba megbízható molekuláris markerek nélkül nem valósítható meg.
A rezisztencia génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek segítségével korai szelekció végezhető a keresztezési populációban a rezisztencia gén jelenlétére. Ez különösen fontos, mivel a betegség fogékonyságra illetve toleranciára/rezisztenciáta irányuló fenotípusos kiértékelés meglehetősen nehezen kivitelezhető.

A pályázat célkitűzései:

1. A fő rezisztenciagéneket piramidálva hordozó genotípusok szelekciója egy lépésben multiplex PCR-rel a VHR 3082-1-42 x 'Kismis vatkana' utódnemzedékben. A Run1, Ren1, Rpv1 génekkel kapcsolt markerek tesztelése VHR 3082-1-42 x Kismis vatkana utódnemzedék 100 egyedén külön-külön, majd multiplex PCR-ben.
2. A 'Dzsandzsal kara' és a 'Kismis vatkana' lisztharmat rezisztenciagénjének összehasonlítása molekuláris markerek alapján. A 'Dzsandzsal kara' fajta elemzése a 12, 13, 15, 18, 19 kapcsoltsági csoportokban található SSR markerekkel.
3. A (Dzsandzsal kara x Laszta) x *V. vinifera* térképezési populáció vizsgálata MRG (major resisance gene) és QTL-ekkel kapcsolt markerekkel: elsősorban a 12, 13, 15, 18, 19 kapcsoltsági csoportokban található SSR markerekkel, illetve a 'Dzsandzsal kará'-val kapott eredmények függvényében többi kapcsoltsági csoporthoz tartozó markerekkel is. Multiplex PCR módszer kidolgozása az összes célgén (MRG és QR) egy lépéses detektálására.

A FŐ REZISZTENCIAGÉNEKET PIRAMIDÁLVA HORDOZÓ GENOTÍPUSOK SZELEKCIÓJA EGY LÉPÉSBEN MULTIPLEX PCR-REL A VHR 3082-1-42 X 'KISMIS VATKANA' UTÓDNEMZEDÉKBEN. A RUN1, REN1, RPV1 GÉNEKKEL KAPCSOLT MARKEREK TESZTELÉSE VHR 3082-1-42 X KISMIS VATKANA UTÓDNEMZEDÉK 100 EGYEDÉN KÜLÖN-KÜLÖN, MAJD MULTIPLEX PCR-BEN.

Magyarországon a XIX. század első feléig nem volt szükség rezisztens fajták nemesítésére, mert az őshonos fajták védettséggel rendelkeztek az Európában előforduló kártevők és kórokozók ellen. Az 1840-es, 1860-as és 1870-es években viszont sorra jelentek meg a napjainkig is legnagyobb károkat okozó kórokozók, mint a lisztharmat, filoxéra és peronoszpóra. Ezeket a kórokozókat Amerikából hurcolták be kontinensünkre feltételezhetően a direkttermő fajták (pl: Izabella, Noah, Concord, Taylor) elterjedésével.

Először Franciaországban kezdtek a szőlő rezisztencia nemesítésével foglalkozni. Az Amerikából bekerült betegségek ellen az amerikai fajok rezisztensek voltak, így ezeket használták fel a keresztezéses nemesítésekben, mint szülőpartnerek. Ezek terjedtek el franko-amerikai hibridek néven. A hibridek jobb minőségűek voltak, mint a direkttermők, és gombás betegségekkel (lisztharmat, peronoszpóra) szemben sokkal ellenállóbbnak bizonyultak. A

Couderc, Baco és Siebel a menesítők nevei fémjelezik a legelterjedtebb, a későbbi keresztezésekben közkedvelt hibrideket.

A franko-amerikai hibrideket Magyarországon Egerben és Kecskeméten is felhasználták a nemesítési programokban. A franko-amerikai hibridek és származékaik felhasználásával igen nehéz keresztezéses nemesítéssel egy genotípusban kombinálni a különböző rezisztenciáért és a jó minőségért felelős géneket, mivel a minőségi tulajdonságok is poligénikusan öröklődnek. Emiatt a nemesítők az elmúlt 100 év során nem alkalmazhatták a visszakeresztezés módszerét, hanem a legjobb rezisztens hibrideket és fajtákat egymás között keresztezték, így viszont a minőséget illetően nagyon lassú volt a genetikai előrehaladás.

A szőlő keresztezéses nemesítésének hatékonyságát nagymértékben növelte, mikor a *Muscodinia rotundifolia*-t bevonták a rezisztencia nemesítés szülőpartnerei közé. A *M. rotundifolia* egy nagyhatású domináns rezisztenciagént/QTL-t tartalmaz (run1) (Pauqet et al. 2001), amely *V. viniferával* történő visszakeresztezések során a minőségi fajtákban is nagyfokú rezisztenciát biztosít.

Egyes közép-ázsiai csemegeszőlőfajták a lisztharmattal szemben jól ellenállnak. A közép-ázsiai származású ‘Dzsandzsal kara’-t írták le először lisztharmat rezisztens fajtaként (Filippenko és Stin 1977), majd bevonták nemesítési programokba. Később kilenc újabb rezisztens fajtát is azonosítottak: ‘Kahét’ (örmény), ‘Gordin’ (moldáv), ‘Sampancsik’ (orosz), ‘Tsitska saheris’, ‘Alexandruli’, ‘Dzveli szamahre’, ‘Dzvelsavi saheris’ (grúz), ‘Tagobi’ és ‘Kismis vatkana’ (üzbég) (Vojtovic 1987). Ezek a fajták értékes genetikai forrásként szolgálnak a szőlő rezisztencianemesítés számára szemben a többi *Vitis* fajjal, hiszen nem befolyásolják kedvezőtlenül a minőséget.

A Kozma Pál irányításával működő Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben, Pécsett a rezisztencia gének piramidálásának céljából előállították a *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera* BC_4 hibrid, (VHR 3082-1-42) X ’Kismis vatkana’ keresztezést (1. ábra). A hibridcsalád tagjai (BC_5), így a lisztharmat rezisztenciáért felelős RUN1 és REN1 gént, valamint a peronoszpóra rezisztenciáért felelős *Rpv1* gént egyaránt hordozhatták. Célunk a piramidált rezisztenciagéneket hordozó genotípusok szelekciójára alkalmas módszer kidolgozása volt, valamint a működő rendszerrel a VHR 3082-1-42 x ’Kismis vatkana’ utódnemzedék száz egyedének szűrése.

A VRH 3082-1-42 BC_4 x ‘Kismis vatkana’ keresztezés összesen 1185 utódot eredményezett (06-1-es populáció). Üvegházi fertőzést követően, Pécsett a Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetben Kozma Pál és Hoffmann Sarolta bonitálták a növényeket, és aszerint, hogy hordoztak-e lisztharmat (PM) tüneteket vagy nem, két csoportra osztották az utódpopulációt: 286 PM szenzitív és 899 PM rezisztens egyedet határoztak meg. A tünetmentes: érzékeny egyedek hasadási aránya a hibridpopulációban 3:1. A fertőzési tünetek fenotípusos értékelése hosszadalmas és nehézkes folyamat, és ezzel a hagyományos módszerrel a különböző eredetű PM rezisztencia géneket hordozó, de azonos fenotípust mutató egyedeket nem lehet egymástól elkülöníteni.

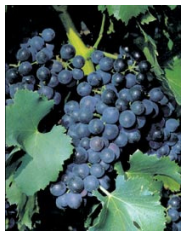
Az azonos fenotípust mutató, tünetmentes *Run1+, Ren1+* vagy *Run1+/Ren1+* genotípusokat molekuláris markerek segítségével azonosítottuk. A marker alapú szelekcióhoz (MAS) véletlenszerűen kiválasztottunk 410 PM rezisztens egyedet a 899-ből, és 30-at a 286 fogékonyból. Ezeken a növényeken teszteltük, hogy a *Run1* és/vagy *Ren1* specifikus markerek együtt hasadnak-e a PM rezisztenciával. A mintákon három *Ren1*-gyel kapcsolt SSR markerrel, kettő *Run1*-gyel kapcsolt SSR markerrel, továbbá BAC szekvencia alapján tervezett további három markerrel, és egy *Rpv1* génhez kapcsolt SSR markerrel követtük a fenti rezisztencia gének (*Run1*/*Rpv1* és *Ren1*) öröklődését (1. táblázat).

V. vinifera ‘Malaga’ seedling No. 1’ (2n=38) x *M. rotundifolia* ‘G-52’ (2n=40)

↓

‘Cabernet Sauvignon’ x F1 NC 6-15

↓



BC_1 VRH 8628 x ‘Grenache noir’

↓

‘Merlot noir’ x BC_2 VRH 5-18-79

↓

BC_3 VRH 1-28-82 x ‘Aubun’

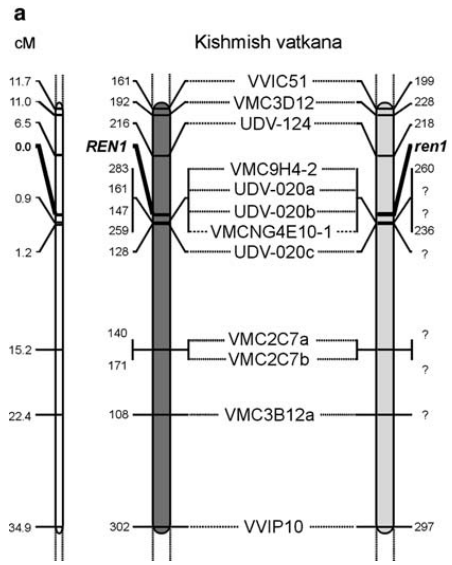
↓

BC_4 VRH 3082-1-42 x ‘**Kismis vatkana**’
(Bouquet, 1986) ‘Kismis moldavszkij’
‘Cabernet Sauvignon’
‘Petra’
‘Superior seedless’

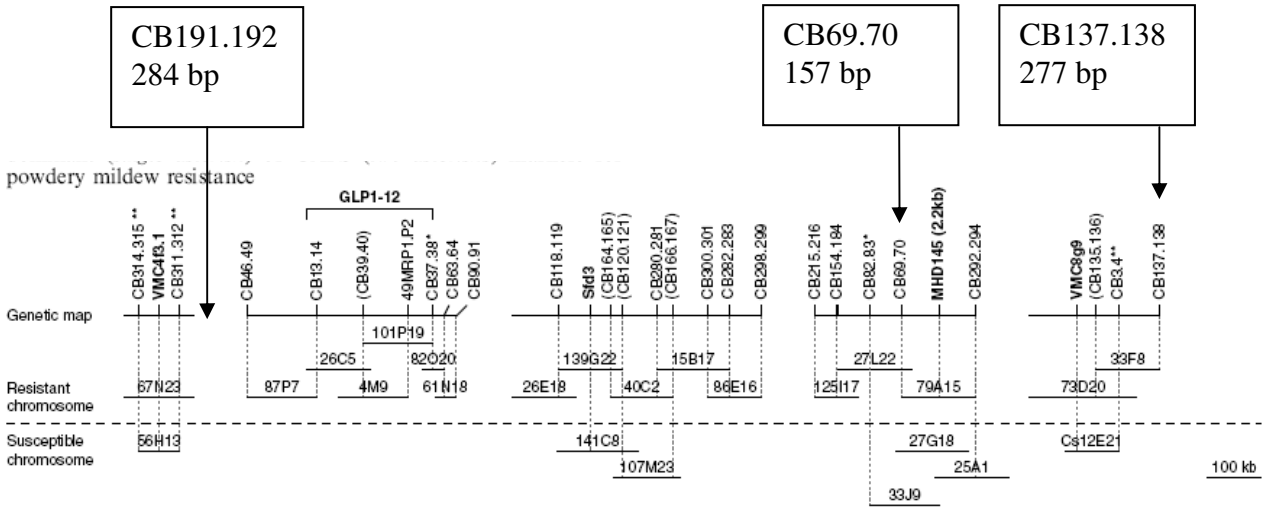
↓

BC_5 hibrid család
(Kozma et al. 2006)

1. ábra: A BC_5 hibridcsaládok előállítási sémája.



2. ábra: A *Ren1* gén fizikai térképe (Hoffmann et al. 2008).



3. ábra: A *Run1* gén fizikai térképe (Barker et al. 2005).

Olyan, az irodalomban korábban leírt markereket kerestünk (1. táblázat), amelyek *Ren1*-gyel (Hoffmann et al. 2008), illetve *Run1*-gyel (Barker et al. 2005) kapcsoltak, és rutinszerűen alkalmazhatók a MAS-ra (2.3. ábra)

1. táblázat MAS-ra alkalmazott rezisztenciával kapcsolt SSR markerek

	Primer neve	Szekvencia 5' – 3'	
		forward	reverse
Ren1	UDV020	tgt tgg tgt gtg ttt gta cgt g	tgt tgg cct gat gtt gag ag
	VMC9h4.2	gca gtt gat gca aaa caa cag t	cac atc att cat tga tga ggc t
	VMCNg4e10.1	aat gca gca gcg cca gat g	gca ggc tgc tgc tgt ttt g
Run1	VMC4f3.1	aaa gca cta tgg tgg gtg taa a	taa cca ata cat gca tca agg a
	VMC8g9	aac att atc aac aac atg gtt tta	ata ttc atc ctt ccc atc act a
	CB69.70	gaa agt aag gag aca agg cg	cac ttg ctt ctc cat tac cc
	CB137.138	gga tag gac atg cta tcg	cat cttttc agg gat cga g
	CB191.192	gtc aac ggt ttg ttt gac c	ctg cag agt tag gtt acc
Rpv1	VMC1g3.2	gat agt tac cat act tag tcg ga	gat agt tac cat act tag tcg ga

A *Run1Ren1* génnel kapcsolt markerekek eredményei

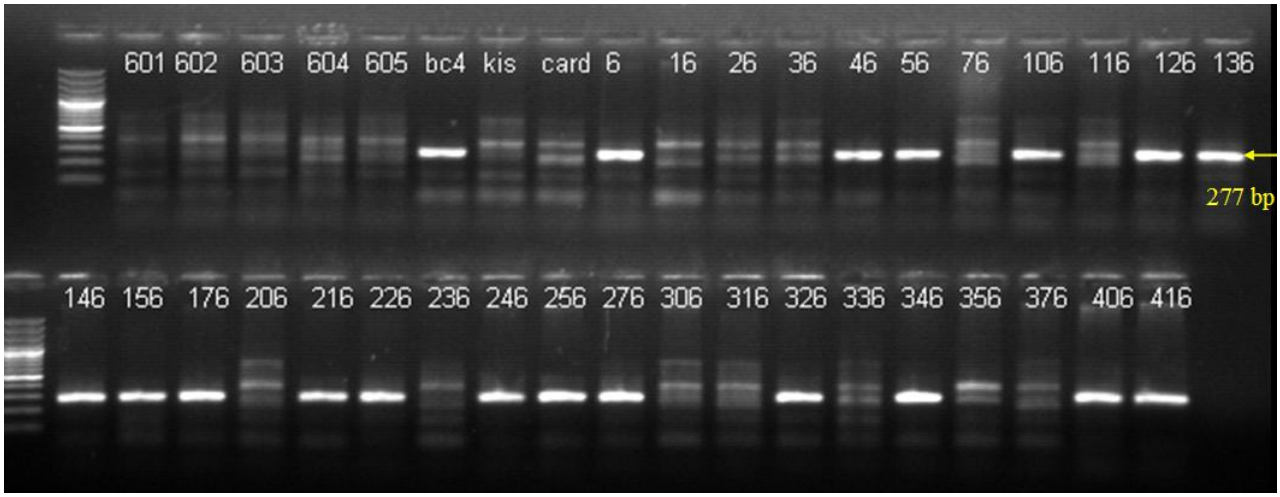
Run1 génnel kapcsolt markerként a VMC8g9 és a VMC4f3.1 primereket használtuk Barker et al. (2005) szerint, akik a VRH3082-1-42 BC_4 x *V. vinifera* 'Cabernet Sauvignon' hibridcsaládot vizsgálva megállapították, hogy a VMC8g9 minden esetben együtt hasadt a PM-rezisztens fenotípussal, míg a VMC4f3.1 SSR lókuszt 0,6 cM és a VMC1g3.2 lókuszt 4,4 cM távolságra térképezték a *Run1* géntől (3. ábra).

A VMC8g9-cel kapott allélméretek (**2. táblázat**) 160, 167 és 174 bp, ahol a 160 bp méretű allél kapcsolt a *Run1* génnel. Az egyes allélok egymástól jól és egyértelműen elkülöníthetőek voltak. A VMC8g9 alkalmas a *Run1* rezisztencia gént hordozó egyedek szelektálására.

A VMC4f3.1 markerrel a BC_4 hibridcsaládnál egy 184 és egy 186 (*Run1* kapcsolt) bázispár méretű allél szaporodott fel, míg a 'Kismis vatkana'-nál 160 és 186 bp (2. táblázat). A 2 bp méretkülönbség olyan csekély, hogy az utódpopuláció 160:184 és 160:186 genotípusainál nem lehetett minden esetben egyértelműen kijelenteni, mely egyedek tartalmazzák a rezisztenciával kapcsolt 186 bp méretű allélt, ezért ezt a markert kizártuk a későbbi vizsgálatokból. A BC_4 és a 'Kismis vatkana' szülők mellett, a PM-érzékeny 'Cardinal' fajta referenciaként szerepel a táblázatban.

Mivel csak egy informatív *Run1* kapcsolt marker állt a rendelkezésünkre, úgy gondoltuk, fontos, hogy olyan markert keressünk, ami a VMC8g9-cel kapott eredményeket egy attól független módszerrel megerősíti. Ezért teszteltük a domináns CB191.192, CB69.70, és CB137.138 markereket, hogy együtt hasadnak-e az SSR markerrel. A CB primereket Barker et al. (2005) tervezte BAC szekvencia alapján.

A CB domináns markerekre végzett PCR a BC_4 és az utódpopuláció rezisztens egyedeiben a várt méretű fragmentum felszaporodásával: CB191.192 primerpár esetén 284 bp, CB69.70 primerpár esetén 157 bp és CB137.138 primerpár esetén 277 bp (**4. ábra**) jelezte a *Run1* gén jelenlétét.



4. ábra: A 06-1-es populáció elemzése a *Run1*-kapcsolt CB137.138 markerre nézve.
Az 1. zsebben molekulatömeg marker található (GeneRuler 100 bp Ladder Plus), a 601-605. számú minták szenzitívek (*Run1*-), BC_4: *Run1*+, 'Kismis vatkana': *Run1*-,'Cardinal' szenzitív genotípus (*Run1*-), 6-416 számú minták tünetmentes egyedek. A nyilak a rezisztenciát jelző 277 bp méretű fragmentumokra mutatnak.

Az összes egyed, ami tartalmazta a VMC8g9-cel a *Run1* rezisztencia génnel kapcsolt allélt, pozitív lett a CB markerekkel is, tehát a kapott eredmények megerősítették egymást. A CB69.70 marker esetében azonban négy tünetmentes mintánál (76, 116, 236, 636) felszaporodott a várt 157 bp méretű fragmentum, de csak nagyon kis mennyiségben a biztosan pozitív minták nagyon erős jeléhez képest.

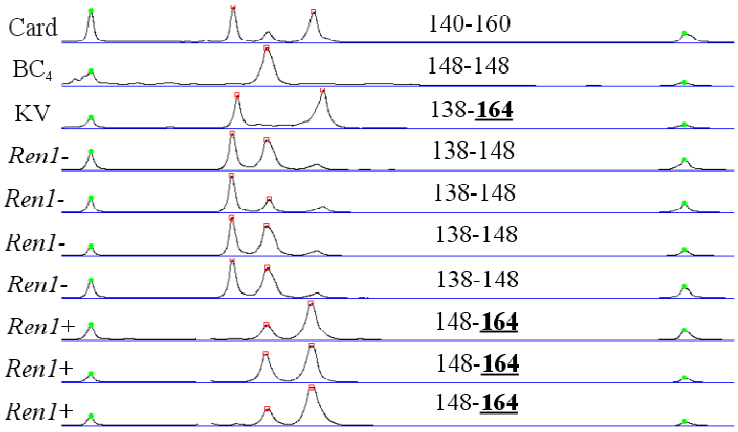
A *Ren1* rezisztencia génnel kapcsolt mindhárom marker (VMC9h4.2, UDV020a, VMCNg4e10.1) eredménye egybeesik (2. táblázat, 5. ábra), így a *Ren1*+ genotípusok könnyen szelektálhatóak. A *Run1* rezisztencia génnel kapcsolt markerek eredményei alapján, a VMC8g9, a CB191.192 és a CB137.138 primerek adatait tekintettük megbízhatónak, mivel azok eredményei minden esetben megegyeztek.

A 2. táblázatban szereplő adatok bizonyítják a VMC8g9 és a CB markerek szoros kapcsoltságát ugyanazoknál a növény egyedeknél, melyek CB eredményei a **4. ábrán**

láthatóak. Azok a növények, amelyek nem tartalmazzák a *Run1* gént (pl. 16, 26, 36, 76, stb.) és mégis tünetmentesek a lisztharmatfertőzésre, a 'Kismis vatkana'-tól örökölték az ugyancsak PM rezisztenciáért felelős *Ren1* gént. Azok az egyedek, amelyek mindkét rezisztencia gént tartalmazzák értékes alapanyagul szolgálnak a növénynemesítés számára, mivel két, különböző genetikai forrásból származó, és különböző kromoszómán lévő domináns PM rezisztencia gént hordoznak.

Az összes növény, ami tartalmazza a *Run1*-gyel kapcsolt markereket, PM-tünetmentes fenotípust mutatott, és a 30 fogékony egyed egyike sem tartalmazta a rezisztenciával kapcsolt allélokat egyik markerrel sem.

Az összes RUN1 gént hordozó egyed RPV1 génre is pozitívnak bizonyult, ami újabb megerősítése a két gén között szoros kapcsoltságnak.



5. ábra: *Ren1* génnel kapcsolt marker (UDV20a) elemzése a 06-1-es populációban.
Card: 'Cardinal', fogékony referencia fajta, Szülők: BC_4: 148-148 *(Ren1-)*, KV: 'Kismis vatkana': 138-**164** *(Ren1+)*, Utódpopuláció egyedei: 138-148 genotípusú: *Ren1-*, 148-**164** genotípusú: *Ren1+*. A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

2. táblázat A rezisztencia génekhez kapcsolt, a vizsgálataink során alkalmazott SSR markerekkel felszaporított pontos allélméretek

	Ren1			*Run1*		*Rpv1*
	VMC 9h4.2	UDV20a	VMC Ng4e10.1	VMC 8g9	VMC 4f3.1	VMC 1g3.2
'Kismis vatkana'	262:**286**	138:**164**	240:**260**	167:174	160:186	122:140
BC_4	282:298	148:148	260:260	**160**:167	184:**186**	**122**:140
'Cardinal'	289:307	140:160	265:286	179:179	162:162	135:140
BC_4 x 'Kismis vatkana'						
Rezisztens genotípusok	282:**286** **286**:298	148:**164**	260:**260**	**160**:167 **160**:174	160:**186** 186:**186**	**122**:140 **122**:122
Szenzitív genotípusok	262:282 262:298	138:148	240:260	167:167 167:174	160:184 184:186	122:140 140:140

A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

A 06-1 populáció 440 egyedét vizsgálva, a szenzitív fenotípust mutató növények egyike sem tartalmazza egyik rezisztencia gén egyik kapcsolt markerét sem. A PM tünetmentes 410 növény közül – a markerelemzés szerint – 36% tartalmazza mind a *Run1*,

mind a *Ren1* rezisztencia géneket, míg 28% *Run1* pozitív és 36% *Ren1* pozitív. A *Ren1*+ genotípusok javára való eltolódást okozhatja az, hogy míg a *Run1* egy főhatású (major) QTL, amely a *M. rotundifolia*-ból introgresszálódott a visszakeresztezések során a BC_4 hibridbe, addig a *Ren1* PM rezisztencia gén egy domináns, monogénes rendszer

Az *Rpv1* génnel kapcsolt markerek eredményei

Merdinoglu et al. (2003) a VMC1g3.2 SSR markert a peronoszpóra rezisztenciával kapcsoltan öröklődőnek találták, így annak követésére alkalmas marker.

Az *Rpv1* gén jelenlétének kimutatására alkalmazott VMC1g3.2 marker a BC_4 és a 'Kismis vatkana' szülőkben azonos méretű (122.140) allélokat eredményezett (2. táblázat), ezért *Rpv1*+ genotípusként csak azokat a növényeket azonosíthattuk, amelyek homozigóták a 122 bp méretű allélre. A heterozigóták elemzése újabb marker bevonását igényli. A VMC1g3.2 marker lókusz közvetlen közelében található két újabb markerrel (VVim11 és VVib32) kezdtük el a vizsgálatokat (Doligez et al. 2006). Azok az egyedek, amelyek homozigóták a 122-es allélre, tehát *Rpv1*+-ak, egyben mind *Run1*+-ak is (**3. táblázat**). Megerősítettük a Merdinoglu et al. (2003) által más anyagon megfigyelt jelenséget, miszerint a *Run1* és *Rpv1* gének szorosan kapcsoltan öröklődnek.

VVim11-es primernél a 06-1-es populáción tesztelve a markert azt az eredményt kaptuk (3. táblázat), hogy a 'Kismis vatkana' esetében egy 260 és egy 285 bp méretű fragmentum szaporodott fel. Ez azt jelenti, hogy ennél a populációnál nincs allélegyezőség, tehát még egyértelműbben szét lehet válogatni a szenzitív egyedeket a rezisztensektől. A feltételezésünk szerint peronoszpóra rezisztenciával kapcsolt 295-ös allél a BC_4 x 'Kismis vatkana' populáció szenzitív egyedeinél nem szaporodott fel. A VMC1g3.2-vel kapott 122 bp méretű allélre homozigóta egyedeknél a 295 bp méretű allél (3. táblázat) minden esetben felszaporodott, míg a 122-es allélt nem tartalmazó egyedeknél (140:140 homozigóta szenzitív) nem, így a marker alkalmazható az *Rpv1* gén követésére. Megállapíthatjuk, hogy a biztosan *Rpv1* gént hordozó egyedek VVim11-gyel tartalmazzák az adott méretű, 295 bp méretű allélt. A marker nagy előnye, hogy így a heterozigóta (122:140) egyedeket is szét tudjuk válogatni, tehát el tudjuk különíteni a peronoszpórára szenzitív és rezisztens genotípusokat. Ahhoz, hogy eredményeinket alá tudjuk támasztani, szükség lesz a populáció mesterséges peronoszpóra fertőzésére és a bonitálási adatokra. A VVim11-et korábban még nem használták MAS-ra, mi alkalmaztuk először a szenzitív és rezisztens genotípusok elkülönítésére.

3. táblázat A 06-1-es (BC_4 x 'Kismis vatkana') populáció véletlenszerűen kiválasztott egyedének allélösszetétele

	Ren1		*Run1*			*Rpv1*	
	VMC 9h4.2	UDV 20a	VMC 8g9	CB191 .192	CB137 .138	VMC 1g3.2	VVim 11
BC_4	282:298	148:148	**160**:167	+	+	**122**:140	270:**295**
KV	262:**286**	138:**164**	167:174	-	-	122:140	260:285
Rezisztens genotípus	282:**286** **286**:298	148:**164**	**160**:167 **160**:174	+	+	**122**:140	260:**295**
Szenzitív genotípus	262:282 262:298	138:148	167:167 167:174	-	-	122:140	260:270
5	286:298	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
10	282:286	148:164	167:174	-	-	122:140	260:270
15	286:298	148:164	167:174	-	-	122:140	260:270
30	262:298	138:148	160:174	+	+	122:140	260:270
35	262:282	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295

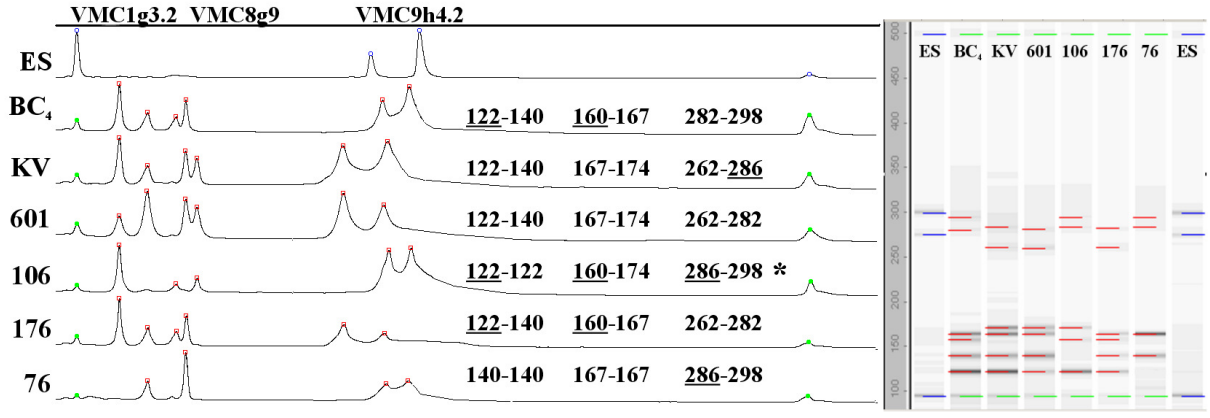
40	286:298	148:164	160:174	+	+	122:140	260:270
45	262:298	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
50	282:286	148:164	167:167	-	-	140:140	270:285
55	286:298	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
60	282:286	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
65	262:282	138:148	160:167	+	+	122:122	260:295
70	262:282	138:148	167:174	-	-	122:140	260:270
75	262:282	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
80	262:282	138:148	160:167	+	+	122:140	285:295
85	262:282	138:148	167:174	-	-	122:140	260:270
90	282:286	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
95	286:298	148:164	160:174	+	+	122:122	260:295
100	282:286	148:164	160:167	+	+	122:140	285:295
105	286:298	148:164	167:167	-	-	140:140	270:285

A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással és vastag betűvel jelöltük.

A multiplex PCR eredményei

A szelekciós folyamat továbbfejlesztésének céljából, kidolgoztunk egy multiplex PCR-en és agaróz alapú gélelektroforézisen alapuló módszert. Bár az alapvető célunk a két különböző PM rezisztencia gént hordozó genotípusok kiválogatása, illetve az egyes rezisztencia gének jelenlétének bizonyítása volt, az *Rpv1* génnel kapcsolt VMC1g3.2 markert is alkalmaztuk a peronoszpóra rezisztencia követésére. Az eredményeink alátámasztották, hogy a *Run1* és *Rpv1* kapcsolt markerek koszegregálnak. Az adataink bizonyítják, hogy a marker alapú szelekció gyors és pontos módszert kínál a nemesítési célkitűzésnek megfelelő, halmozott rezisztenciagéneket hordozó genotípusok szelekciójára.

Célkitűzéseink között szerepelt a halmozott rezisztencia géneket hordozó genotípusok szelekciója egy lépésben, multiplex PCR reakcióban. Ehhez úgy kellett kiválogatni az egyes primerpárokat, hogy az amplifikálódott allélméretek ne fedjék egymást, és a primerek kapcsolódási hőmérséklete a PCR reakció során megegyezzen. Ennek alapján a következő primerpárok alkalmasak multiplex PCR-re: VMC9h4.2/VMC8g9, VMCNg4e10.1/VMC8g9, VMC1g3.2/VMC9h4.2, VMC1g3.2/VMCNg4e10.1 és VMC1g3.2/VMC8g9/VMC9h4.2 (6. ábra).



6. ábra: VMC1g3.2, VMC8g9 és VMC9h4.2 markerekkel végzett triplex PCR ALF kromatogramja.
(a) ES: külső standard (95, 275, 300, 500 bp), BC_4 (*Run1*+/*Ren1*−), KV: 'Kismis vatkana' (Run1−/*Ren1*+), BC_5 utódpopuláció: 601: *Run1*−/*Ren1*−, 106: *Run1*+/*Ren1*+, 176: *Run1*+/*Ren1*−, 76: *Run1*−/*Ren1*+. A rezisztencia génnel kapcsolt allélt aláhúzással jelöltük. A *Run1*+/*Ren1*+ genotípust csillaggal jelöltük. (b) A multiplex PCR virtuális gél fotója.

Ennek a módszernek nagy előnye, hogy egy lépésben, időt, pénzt, energiát megtakarítva szelektálhatjuk ki az értékes genotípusokat. Gyorsan és hatékonyan tudjuk a rezisztencia gének jelenlétére tesztelni a VRH 3082-1-42 BC_4 x 'Kismis vatkana' BC_5 utódnemzedék mind a 899 tünetmentes egyedét, ill. ez a módszer más olyan hibridcsaládok tesztelésére is kiválóan alkalmas, amelyek ugyanezeket a szülői partnereket tartalmazzák. Lehetőség nyílik a halmozott rezisztenciagéneket hordozó genotípusok szelekciójára, rutinszerűen vizsgálhatjuk az utódpopulációt multiplex PCR reakcióban a *Run1* és *Ren1* gén együttes jelenlétére.

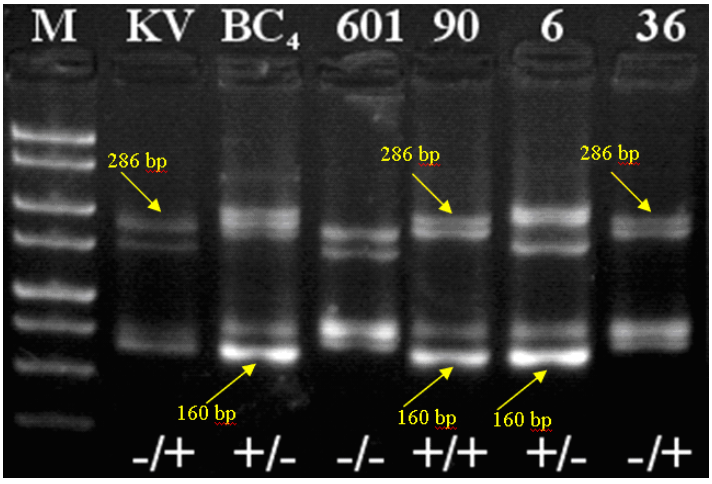
Molnár et al. (2007) korábban már leírták, hogy a (VRH 3082-1-42 BC_4 x *V. vinifera* 'Cardinal') BC_5 utódnemzedékben a VMC8g9 markerrel felszaporított allélok nagy felbontóképességű 4%-os Metaphor gélen is elválaszthatóak. Ennek a módszernek az az előnye, hogy nem igényli a költséges és körülményes poliakrilamid gélelektroforézist, ALF Express II. készüléket, és a primerek fluoreszcens jelölését.

Munkánk során duplex PCR reakciót alkalmaztunk, VMC8g9 markert a *Run1*+ genotípusok, és VMC9h4.2 markert a *Ren1*+ genotípusok kiválogatására. A PCR reakció során kapott termékeket mind 1,2%-os agarózon, mind 4%-os Metaphor agarózon elválasztottuk.

Az utódpopuláció egyedei közül kiválasztottunk négyet (06-1-601, 06-1-90, 06-1-6, 06-1-36), amelyek a négy különböző genotípust reprezentálják (*Run1-/Ren1-; Run1+/Ren1+; Run1+/Ren1-; Run1-/Ren1+).*

Ezek genotípusa a következő:

	VMC8g9	VMC9h4.2	*Run1/Ren1*
06-1-601:	167:174	262:282	*Run1-/Ren1-*
06-1-90:	**160**:167	282:**286**	*Run1+/Ren1+*
06-1-6:	**160**:174	262:298	*Run1+/Ren1-*
06-1-36:	167:174	282:**286**	*Run1-/Ren1+*



7. ábra: a) VMC8g9 és VMC9h4.2 markerekkel végzett duplex PCR 4%-os Metaphor agarózon elválasztva.
M: molekulatömeg marker (BioLine HyperLadder V., Izinta Kft, Budapest, Hungary), 2. 'Kismis vatkana': *Run1-/Ren1*+ 3. BC_4: *Run+/Ren1-*, 4-7. utódpopuláció (06-1) egyedei 601: *Run1-/Ren1-*, 90: *Run1+/Ren1+,* 6: *Run1+/Ren1-,* 36: *Run1-/Ren1*+. A rezisztencia génnel kapcsolt allélokat nyíllal jelöltük.

A 7. ábrán jól látható, hogy az az egyed, amelyik örökölte a BC_4 szülő 160 bp méretű *Run1* lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt alléljét, az *Run1*+ genotípusú, amelyik utód a 'Kismis vatkana' 286 bp méretű *Ren1* lisztharmat rezisztencia génnel kapcsolt alléljét

örökölte, az *Ren1+* genotípusú, ill. amelyik mindkettőt tartalmazza, *Run1+/Ren1+* genotípus. Ezzel a módszerrel egyszerű agaróz alapú elektroforézissel is elkülöníthetők a rezisztens egyedek.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy azok az SSR markerek, amelyeket a *Run1* és *Ren1* lisztharmat rezisztencia gének térképezésére fejlesztettek, alkalmasak marker alapú szelekcióra. Ezekkel a markerekkel bizonyítani tudtuk a halmozott rezisztencia gének jelenlétét a BC_5 hibridpopulációban. Az azonos fenotípust meghatározó halmozott rezisztenciagéneket (*Run1, Ren1*) tartalmazó növények azonosítása csak DNS-szintű elemzéssel lehetséges. Bizonyítottuk, hogy a *Ren1* génnel kapcsolt SSR markerek rutinszerűen használhatók MAS-ra.

Az eredményeket közlő publikációk:

Katula-Debreceni, D., Lencsés, A.K., Szőke, A., Veres, A., Hoffmann, S., Kozma, P., Kovács, L.G., Heszky, L. Kiss E. 2010. Marker-assisted selection for two dominant powdery mildew resistance genes introgressed into a hybrid grape family. Sci. Horticult. 126: 448-453.

Katuláné Debreceni, D., Lencsés, A. K., Szőke, A., Veres, A., Hoffmann, S., Erdélyi Sz., Heszky, L., Kiss, E., Kozma, P. 2009. Muscadinia rotundifolia Mich. Small és Vitis vinifera L. eredetű lisztharmat rezisztencia felhasználása a szőlő nemesítésben markerekre alapozott szelekcióval. Kertgazdaság, 41 (2):82-91

Katuláné D.D., Lencsés A.K., Szőke A., Veres A., Hoffmann S., Kozma P., Heszky L., Kiss E. 2009. Piramidált rezisztencia gének molekuláris szelekciója szőlőben. Hagyomány és haladás a növénynemesítésben. XV. Növénynemesítési Tudományos Napok. 2009. március 17. Budapest. 228-232. CD:// ISBN: 978-963-8351-34-0.

Kozma P., Halász G., Galbács Zs., Molnár S., Hoffmann S., Veres A., Galli Zs., Kiss E., Heszky L. 2009. Analysis of grapevine hybrid familiy with molecular markers linked to powdery mildew resistance gene. IX. International Conference on Grape Genetics and Breeding Udine, Italy May 2009 ISHS Acta Horticulturae, 827:627-629 ISBN: 978-90-66055-02-5

D. Katula-Debreceni, A. Veres, K.A. Lencsés, A. Szoke, P. Kozma, S. Hoffmann, L. Heszky, E. Kiss (2009) Durable resistance in grapevine: MAS-Based gene pyramiding of *vitis vinifera* origin Plant genomics Euoropean Meeting Lisbon 07-10. October 2009 p. 105

Katuláné Debreceni Diána (2011) Gombarezisztens Szőlő genotípusok molekuláris azonosítása PhD disszertáció

A 'DZSANDZSAL KARA' ÉS A 'KISMIS VATKANA' LISZTHARMAT REZISZTENCIAGÉNJÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA MOLEKULÁRIS MARKEREK ALAPJÁN. A 'DZSANDZSAL KARA' FAJTA ELEMZÉSE A 12, 13, 15, 18, 19 KAPCSOLTSÁGI CSOPORTOKBAN TALÁLHATÓ SSR MARKEREKKEL.

Egyes közép-ázsiai csemegeszőlőfajták közül 'Dzsandzsal kara'-t írták le először lisztharmat rezisztens fajtaként (Filippenko és Stin 1977), majd bevonták nemesítési programokba.

Célunk a 'Dzsandzsal kara' fajta rezisztencia génjének vizsgálata és összehasonlítása volt más ázsiai eredetű fajtával ('Kismis vatkana'). Ezért elvégeztük a Pécsi szőlészeti és Borászati Kutató Intézet által már előállított, ('Dzsandzsal kara' x 'Laszta') x *V. vinifera* térképezési populáció vizsgálatát MRG (major resisance gene) és QTL-ekkel kapcsolt markerekkel: elsősorban a 12, 13, 15, 18 kapcsoltsági csoportokban található SSR markerekkel. A kapott eredményeket összehasonlítottuk több keresztezési populáció eredményeivel. A vizsgált minták a következők voltak:

'Kismis vatkana' (*Ren1* rezisztencia gént hordoz),

’Génuai zamatos’ x ’Kismis vatkana’ (a rezisztens utód *Ren1* rezisztencia gént hordoz),
VHR 3082-1-42 X ’Kismis vatkana’ (a rezisztens utód *Run1*, vagy *Ren1*, vagy *Run1+Ren1* rezisztencia gént/géneket hordoz,
BC_4 (Run1 rezisztencia gént hordoz)
BC_4 x ’Kismis moldavszkij’ (a rezisztens utód *Run1* rezisztencia gént hordoz)
’Laszta’ (Szenzitív egyed)
’Katta kurgán’ x ’Perlette’ (szenzitív egyed)
’Dzsandzsal kar’a (azonosítandó rezisztencia gént hordoz)
’Dzsandzsal kara’ x ’Laszta’ (a rezisztens utód a ’ Dzsandzsal’ kara rezisztencia génjét hordozza
(Dzsandzsal kara x Laszta) x (Katta kurgán x Perlette) szenzitív utódok,
(Dzsandzsal kara x Laszta x) x (Katta kurgán x Perlette) rezisztens utódok (a ’Dzsandzsal kara’ rezisztencia génjét hordozza
Az alkalmazott markerek a következők voltak
Ren1-el kapcsolt SSR markerek
13-as kapcsoltsági csoportban (UDV 020a, VMC9h4.2, VMCNg4e10.1)
Run1/Rpv1-el kapcsolt SSR markerek
12-es kapcsoltsági csoportban (VMC8g9, VVim 11, VMC1g3,2)

A szenzitív és a rezisztens fenotípusú egyedek nem válogathatóak szét a *Run1/Rpv1* kapcsolt markerekkel, ez arra utal, hogy a hibridpopuláció nem tartalmazza ezeket a géneket (4. táblázat).

Mind a ‘Kismis vatkana’, mind pedig a ‘Dzsandzsal kara’ *Ren1*-gyel kapcsolt alléljei pontosan megegyeznek, és mind a hibridpopulációt létrehozó rezisztens szülő (‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’), mind pedig a hasadó utódpopuláció lisztharmat rezisztens egyedeinek *Ren1*-gyel kapcsolt allélméretei is (4. táblázat).

Eredményeink azt bizonyítják, hogy csak a *Ren1*-gyel kapcsolt allélméretek hasadnak együtt a lisztharmat rezisztens fenotípussal, ami arra enged következtetni, hogy a ‘Dzsandzsal kara’ domináns lisztharmat rezisztencia génje megegyezik a ‘Kismis vatkana’ *Ren1* génjével.

4. táblázat: Különböző rezisztenciagéneket hordozó hibridpopulációk és szülőpartnereik allélméretei a *Ren1*-gyel és a *Run1/Rpv1*-gyel kapcsolt SSR markerekkel

Hibrid populáció/fajta		*RUN1/RPV1*			*REN1*		
		VMC8g9	VVim11	VMC1g3.2	VMCNg4 e10.1	VMC9h 4.2	UDV20a
BC_4 x ’ Kismis vatkana’	BC_4	160-167	272-294	122-142	260-260	282-298	148-148
	’ Kismis vatkana’	167-174	260-284	122-142	240-260	262-286	138-164
	Fogékony utódok	167-167 167-174	272-284 260-272	122-142 142-142	240-260	262-282 262-298	138-148
	Tünetmentes utódok	160-167 160-174	260-294 284-294	122-142 122-122	260-260	282-286 286-298	148-164
’ Génuai zamatos’ x ’ Kismis vatkana’	’ Génuai Zamatos’	RUN1 gént nem tartalmaz					138-164
	’ Kismis vatkana’						138-138
	Fogékony utódok						138-148 138-164 148-164
	Tünetmentes utódok						138-164

	’ Dzsandzsal kara’	167-174	124-128	255-260	280-286	150-164
	’ Laszta’	162-178	128-134	230-268	252-290	150-150
(Dzsadzsal kara x Lazsta x) x (Katta kurgán x Perlette)	’ Dzsandzsal kara’ x ’ Laszta’	162-174	124-128	260-268	286-290	150-164
	’ Katta kurgán’ x ’ Perlette’	178-178	122-128 128-128	238-260	262-286	138-150
	Fogékony utódok	162-178 174-178	122-124 124-128 122-128 124-128	238-268 260-268	262-290 286-290	138-150 150-150
	Tünetmentes utódok	162-118 174-178	122-128 122-124 128-128	238-260 260-260	262-286 286-286	138-164 150-164

Az eredményeket közlő publikációk:

D. Katula-Debreceni, A. Szőke, AK. Lencsés, P. Kozma, S. Hoffmann E. Kiss and A. Veres (2010) Screening grape hybrid families with molecular markers linked to resistance genes. 10th International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, in Geneva, New York, 1 – 5 August 2010. ISHS Acta Horticulturae *(in press).*

Katuláné D.D., Lencsés A.K., Szőke A., Veres A., Hoffmann S., Kozma P., Heszky L., Kiss E. (2009). Piramidált rezisztencia gének molekuláris szelekciója szőlőben. Hagyomány és haladás a növénynemesítésben. XV. Növénynemesítési Tudományos Napok. 2009. március 17. Budapest.228-232

Katuláné Debreceni Diána (2011) Gombarezisztens Szőlő genotípusok molekuláris azonosítása PhD disszertáció

A (DZSANDZSAL KARA X LASZTA) X *V. VINIFERA* TÉRKÉPEZÉSI POPULÁCIÓ VIZSGÁLATA MRG (MAJOR RESISANCE GENE) ÉS QTL-EKKEL KAPCSOLT MARKEREKKEL: ELSŐSORBAN A 12, 13, 15, 18, 19 KAPCSOLTSÁGI CSOPORTOKBAN TALÁLHATÓ SSR MARKEREKKEL, ILLETVE A DZSANDZSAL KARÁ-VAL KAPOTT EREDMÉNYEK FÜGGVÉNYÉBEN TÖBBI KAPCSOLTSÁGI CSOPORTHOZ TARTOZÓ MARKEREKKEL IS.

Miután megállapítottuk, hogy a ’ Dzsandzsal’ kara rezisztencia génje a *Ren1* génnel kapcsolt SSR markerekkel jól követhető, leteszteltük a 07-12-es populáció (*Vitis vinifera* ‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’) x (*Vitis vinifera* ‘Katta kurgán’ x Vitis vinifera ‘Perlette’) összes egyedét. A hibridpopuláció egyszerre több eredetű rezisztencia gént is hordoz. A célunk, az volt, hogy rezisztenciával kapcsolt markerekkel kiválogassuk a halmozott rezisztenciagéneket hordozó genotípusokat (PM rezisztenciagén a ‘Dzsandzsal kara’-ból, QTL-ek a ‘Laszta’-ból), illetve az egyes rezisztencia géneket kövessük az utódpopulációban, tehát szét tudjuk válogatni a rezisztens és szenzitív egyedeket. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a *Run1/Rpv1*-gyel, illetve a *Ren1*-gyel kapcsolt markerek alkalmazhatóak-e ennél a populációnál. Mivel a ‘Laszta’ rezisztens fajta ‘Seyve Villard’ eredetű, pedigréjében megtalálható mind a ‘SV 20365’, mind a ‘SV 12375’ (‘Villard blanc’), PM kapcsolt QTL markereket is teszteltünk.

Összesen 126 egyedet vizsgáltunk a hibridpopulációból, ebből fertőzési tüneteket mutatott 30, és tünetmentes volt 96. A szenzitív és a rezisztens fenotípusú egyedek nem válogathatóak szét a *Run1/Rpv1* kapcsolt markerekkel, ez arra utal, hogy a hibridpopuláció nem tartalmazza ezeket a géneket.

A 07-12 populáció tünetmentes egyedei közül két feltételezett rekombináns egyedet azonosíttottunk, amelyek lisztharmat rezisztens fenotípust mutatnak, de a *Ren1* kapcsolt markerrel *Ren1*- genotípust mutató egyedek. PM tüneteket mutató, szenzitív genotípust mutató egyedek közül szintén két *Ren1*+ genotípust találtunk.

A rekombinánsok azonosításához ismételt fenotipizálásra van szükség.

PM QTL analízis

Az UDV15b marker, amit Di Gaspero et al. (2005) fejlesztettek ki, multilókuszos marker, ezért előfordul, hogy egyes genotípusoknál több allélt kapunk. A hibridpopuláció vizsgálatakor mind a rezisztens szülőnél, mind az utódpopuláció egyedeinél három-öt-hét csúcsot detektáltunk, ami nehézkessé teszi az eredmények kiértékelését, nehezen követhetőek az allélok, így ezt a markert kizártuk a későbbi vizsgálatokból. A másik két markerrel (VMC4d9.2 és VViV67) kapott allélméretek szórtak a rezisztens és a szenzitív fenotípusú utódok között, illetve a rezisztens szülő, a 'Dzsandzsal kara' x 'Laszta' mindkét markerre nézve homozigóta (5. táblázat). MAS-ra olyan markerek alkalmazhatóak, amelyek a követni kívánt tulajdonságot hordozó szülőnél heterozigóta formában vannak jelen, ezért ezek a markerek ebben az utódpopulációban nem alkalmazhatóak a PM QTL követésére. A 'Regent','Seibel','Seyve Villard' fajtákkal és a *Vitis* fajokkal kapott adatok valószínűsítik, hogy a lisztharmat QTL-lel kapcsolt allél a VViV67 marker esetén a 352 bp méretű allél. A VMC4d9.2 marker esetén nem tudtuk meghatározni, hogy melyik allélméret kapcsolt a rezisztenciával, mivel mind a 235, mind a 240 bp méretű allél megtalálható a rezisztens fajtákban

5. táblázat: A 15-ös kapcsoltsági csoporton lévő PM QTL-lel kapcsolt SSR markerekkel kapott allélméretek

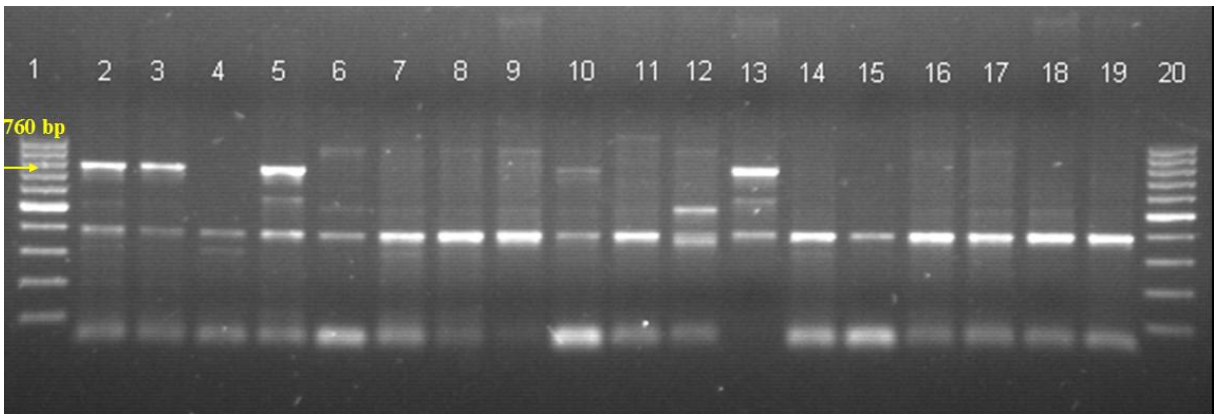
	VMC4D9.2	VViV67
'Regent'	235:240	334:352:364
'S 7053'	230:235	334:352
'Laszta'	235:240	352:364
'SV 20365'	235:240	334:352:364
'SV 12375'	230:235	334:352:364
BC_4	244:244	352:364
V. labrusca	230:240	344:352:358
V. rupestris	235:240	358:358
V. berlandieri	235:235	330:352
V. lincecumii	235:235	330:338:352
Rezisztens szülő: 'Dzsandzsal kara' x 'Laszta'	240:240	352:352
Szenzitív szülő: 'Katta kurgán' x 'Perlette'	226:240	352:364
A hasadó utódpopuláció PM tünetmentes egyedei:		
108	240:240	352:352
109	240:240	352:352
110	240:240	352:352
111	240:240	352:352

112	240:240	352:352
113	226:240	352:364
114	226:240	352:364
115	226:240	352:352
116	226:240	352:364
117	240:240	352:364
A hasadó utódpopuláció PM fertőzési tünetet hordozó egyedei		
I/2/1	240:240	352:352
I/2/2	226:240	352:352
I/2/3	226:240	352:352
I/3/1	226:240	352:352
I/3/2	226:240	352:352
IV/1/1	240:240	352:364
IV/1/2	226:240	352:352
IV/1/3	226:240	352:364
IV/2/1	226:240	352:364
IV/2/2	240:240	352:364

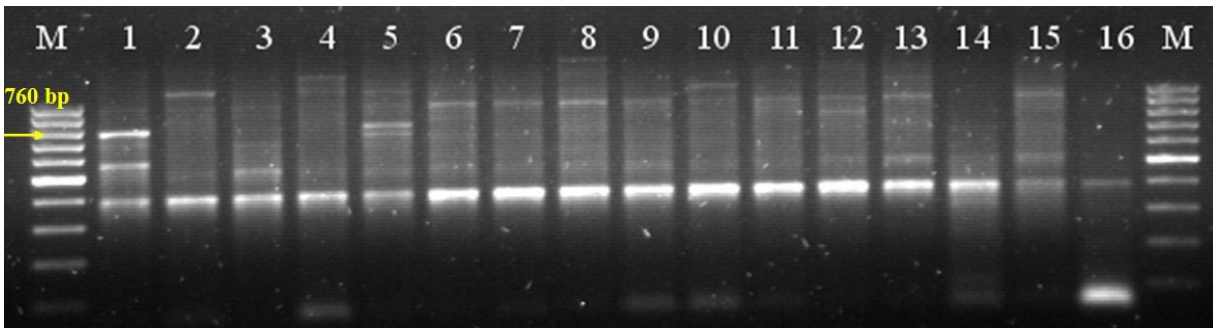
Akkurt et al. (2007) RAPD markereket (Fischer et al. 2004) alakítottak át SCAR markerekké. Céljuk az volt, hogy olyan molekuláris markereket fejlesszenek, amelyek marker alapú szelekcióra és a növénynemesítés számára hasznos genetikai források jellemzésére alkalmasak. A ScORA7-760 markert ajánlják marker alapú szelekcióra, mert nagymértékben (LOD 8,1-10,2) korrelációt mutatott a leveleken felvételezett lisztharmat rezisztenciával.

Az előbbiek alapján alkalmaztuk a ScORA7-760 markert, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mely fajtákban, fajokban követhető a 15-ös kapcsoltsági csoporton lévő lisztharmat QTL, amit a PCR során felszaporodó 760 bp méretű fragmentum jelez.

A ‘Regent’, ill a pedigréjében szereplő ‘S 7053’ (=‘Chancellor’; nagyszülő) esetén felszaporodott a várt 760 bp méretű fragmentum, ami megegyezik Akkurt et al. (2007) eredményeivel. A ‘Laszta’ pedigréjében szereplő ‘SV 20365’ és az ‘SV 12375’ (‘Villard blanc’) esetén felszaporodott a várt fragmentum, de a ‘Laszta’-ban nem. Akkurt et al. (2007) tesztelték a markert különböző genetikai hátterű, de eredetüket nézve rokonságban lévő genotípusokon: ‘Regent’ és pedigréjében szereplő genotípusok (‘Chambourcin’, ‘Diana’, ‘Chancellor’, ‘Seibel 880’, ‘Seibel 5163’, ‘Seibel 6468’, ‘Subberux’), Gf. GA-47-42 rezisztens nemesítési vonal (‘Bacchus’, ‘Seyval’, ‘Seibel 5656’, ‘Seibel 4199’, ‘Seibel405’, ‘Rayon d’Or’, ‘Aramon du Gard’), ‘Villard blanc’ pedigréjében: ‘Seibel 6468’, ‘Bayard’, ‘Afuz Ali’, ‘Seibel 4614’, ‘Seibel 2003’ x *V. berlandieri*, ‘Seibel 405’, ‘Subereux’, ‘Seibel 85’). Ezek a szülői vonalak különböző mértékben kapcsolódnak egymáshoz, ill. a ‘Regent’ fajtához, ami az irodalomban is megjelent pedigréjükből egyértelmű. Leírták, hogy a ScORA7-760 megközelítőleg 90%-ban korrelál a lisztharmat rezisztenciával a különböző genetikai hátterű keresztezésekben. Ennek ellenére azt találták, hogy nem mindegyik ‘Seibel’ ill. ‘Seyve Villard’ eredetű fajtában szaporodik fel a rezisztenciát jelző fragmentum. Akkurt et al. (2007) nem vizsgálták a ‘Villard blanc’-t, de a két szülőt a ‘Seibel 6468’-at és a ‘Subereux’-t igen. Az utóbbi két fajtában felszaporodott a 760 bp méretű fragmentum. Vizsgálataink során a ‘Villard blanc’-ban (‘SV 12375’) is felszaporodott a várt méretű fragmentum.



8. ábra: Interspecifikus hihridek (‘Regent’, ‘Laszta’), a pedigréjükben szereplő fajok, fajták és a 07-12-es populáció elemzése a ScORA7-760 markerrel.
1. Marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 2. ‘Regent’ 3. ‘S 7053’ 4. ‘Laszta’ 5. ‘SV 20365’ 6. ‘Dzsandzsal kara’ 7. ‘Kismis vatkana’ 8. BC_4 9. *V. yeshanensis* 10. *V. lincecumii* 11. *V. labrusca* 12. *V. amurensis* 13. ‘Villard blanc’ 14. 07-12 hibridpopuláció szenzitív szülő (‘Katta kurgán’ x ‘Perlette’) 15. 07-12 hibridpopuláció rezisztens szülő (‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’) 16-17. 07-12 hibridpopuláció rezisztens utódai 18-19. 07-12 hibridpopuláció szenzitív utódai 20. Marker (GeneRuler 100 bp Ladder).



9. ábra: ‘Villard blanc’, a pedigréjében szereplő *Vitis* fajok és PM rezisztens ázsiai fajták elemzése a ScORA7-760 markerrel.
Marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 1. ‘Villard blanc’ (‘SV 12375’) 2. *V. labrusca* 3. *V. rupestris* 4. *V. berlandieri* 5. *V. lincecumii* 6. *M. rotundifolia* 7. ‘Kabarcik’ 8. ‘Iszpiszár’ 9. ‘Icskimár’ 10. ‘Rezisztens magvatlan’ 11. ‘Tagobi’ 12. ‘Gordin’ 13. ‘Alexandroulii’ 14. ‘Tsitska’ 15. ‘Bazaletouri tsolikouri’ 16. ‘Csaba gyöngye’ (szenzitív kontroll).

A ‘Laszta’ ‘Seyve Villard’ eredetű szülője, a ‘SV 20365’, ami az analízis során mutatta a PM rezisztenciát jelző fragmentumot. Sajnos sem a ‘Laszta’-ban, sem az általunk vizsgálni kívánt hibridpopuláció rezisztens szülő partnerében (‘Dzsandzsal kara’ x ‘Laszta’) nem szaporodott fel a fragmentum, tehát a 07-12 populációt lisztharmat QTL-re ezzel a markerrel nem tudjuk vizsgálni (8. ábra). A ‘Villard blanc’ pedigréjében szereplő *V. labrusca*, *V. rupestris, V. berlandieri*, *V. lincecumii* fajokat is vizsgáltuk (9. ábra), azonban csak a *V. lincecumii* esetén szaporodott fel a várt fragmentum, tehát a ‘Villard blanc’ ezt a fragmentumot a *V. lincecumii*-tól örökölte. Más lisztharmat rezisztens vad fajokat vizsgálva: *V. yeshanensis* és *V. amurensis* esetén sem szaporodott fel, ami azzal magyarázható, hogy ez a két faj Kelet-Ázsiából, Kínából és Mandzsúriából származik és nem Amerikából. Ahogy vártuk, a *V. vinifera* eredetű, de lisztharmat rezisztens fajták, ‘Kismis vatkana’, ‘Dzsandzsal kara’, ‘Kabarcik’, ‘Rezisztens magvatlan’, ‘Tagobi’, ‘Gordin’, ‘Alexandrouli’, ‘Tsitska’, ‘Bazaletouri tsolikouri’ nem tartalmaznak QTL-t, ezért nem szaporodott fel a lisztharmat QTL-t jelző fragmentum. Mivel a két közép-ázsiai származású fajtáról, az ‘Iszpiszár’-ról és az ‘Icskimár’-ról nincs adatunk, hogy lisztharmat ellenállóak-e vagy nem, ezeket is bevontuk a vizsgálatokba. Ahogy a többi ázsiai származású fajtánál sem, úgy ezeknél sem szaporodott fel a 760 bp méretű fragmentum. Sem a *M. rotundifolia*, sem a *M. rotundifolia* eredetű

lisztharmat rezisztens BC_4 (VRH3082-1-42) esetén nem kaptuk meg a specifikus fragmentumot, hiszen a *M. rotundifolia*-ban és a BC_4-ben megtalálható *Run1/Rpv1* nagyhatású QTL a 13-as kapcsoltsági csoporton, míg a 'Regent' fajta lisztharmat QTL-je a 15-ös kapcsoltsági csoporton található.

Az eredményeket közlő publikációk:

Katula-Debreceni, D., Veres A., Szőke A., Lencsés A.K., Kozma P., Hoffmann S., Kiss E. 2010. Marker-based selection for powdery mildew resistance genes in different grape hybrid families. Proceedings of the **6th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew.** July 4-9, 2010 Bordeaux, France. 42-45 INRA ISBN: 978-2-7380-1279-1

Katuláné Debreceni Diána (2011) Gombarezisztens Szőlő genotípusok molekuláris azonosítása PhD disszertáció

MAGYAR NEMESÍTÉSŰ LISZTHARMAT REZISZTENS SZŐLŐ FAJTÁK JELLEMZÉSE LISZTHARMAT QTL-LEL KAPCSOLT SCAR MARKERREL

Miután a Laszta fajta nem volt alkalmas a PM QTL követésére, más Villard blanc eredetű fajtákat is megvizsgáltunk.

A XIX. században először Franciaországban kezdtek a szőlő rezisztencia nemesítésével foglalkozni. Az Amerikából bekerült betegségek ellen az amerikai fajok rezisztensek voltak, így ezeket használták fel a keresztezéses nemesítésekben, mint szülőpartnerek. Ezek terjedtek el franko-amerikai hibridek néven. A hibridek jobb minőségűek voltak, mint a direkttermők, és gombás betegségekkel (lisztharmat, peronoszpóra) szemben sokkal ellenállóbbnak bizonyultak. A Couderc, Baco és Siebel a menesítők nevei fémjelezik a legelterjedtebb, a későbbi keresztezésekben közkedvelt hibrideket.

A franko-amerikai hibrideket Magyarországon Egerben és Kecskeméten is felhasználták a nemesítési programokban. A francia Siebel nemesítő hibridjei közül a SV ('Seyve Villard','Villard Blanc') 12375, és az SV 18315 ('Villard noir') volt a legkedveltebb szülőpartner. A 'Villard Blanc' mindhárom gombabetegséggel (lisztharmat, peronoszpóra, szürkepenész) szemben ellenállónak bizonyult. Származása: 56% *Vitis vinifera*, 3% *Vitis labrusca*, 30% *Vitis rupestris*, 6% *Vitis berlandieri*, 5 % *Vitis lincecumii*) (csepregi és Zilai 1998). Egerben Csizmadia D. József és Bereznai László munkássága révén jöttek létre a kíváló minőségű magyar fajták ('Csabagyöngye','Gárdonyi Géza','Medoc noir') és a franko-amerikai hibridek keresztezésével a 'Néró','Zalagyöngye','Bianca','Göcseji zamatos','Medina', rezisztens fajták. Kecskeméten Szegedi és munkatársai állítottak elő interspecifikus hibrideket 'Pölöskei muskotály','Teréz','Eszter', nevű fajtákat, Kozma Pál és munkatársai pedig a 'Dunagyöngye','Viktóriagyöngye','Csillám' és 'Palatina 'fajtákat.

Célunk lisztharmat QTL-lel kapcsolt SCAR marker (ScORA7-760) alkalmazásával jellemezni a különböző Seibel, 'Seyve Villard' fajtákat, illetve Seibel/'Seyve Villard' eredetű, magyar nemesítésű rezisztens fajtákat: 'Duna gyöngye','Viktória gyöngye','Csillám','Nero','Zala gyöngye','Palatina','Bianca','Göcseji zamatos' és 'Medina'. Arra kerestük a választ, hogy mely genotípusokban követhető a 15-ös kapcsoltsági csoporton lévő lisztharmat QTL.

A vizsgált magyar nemesítésű interspecifikus, rezisztens szőlőfajták (zárójelben feltüntettük a pedigéjüket):
'Duna gyöngye' ('Seibel 4986' x 'Csaba gyöngye')
'Viktória gyöngye' ('Eger 2' (SV 12375) x 'Csaba gyöngye')
'Csillám' ('Eger 2' (SV 12375) x 'Csaba gyöngye')
'Nero' ('Eger 2' (SV 12375) x 'Gárdonyi Géza')

‘Zala gyöngye’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Csaba gyöngye’)
‘Palatina’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Szőlőskertek királynője muskotály’)
‘Bianca’ (‘Eger 2’ (SV 12375) x ‘Bouvier’)
‘Göcseji zamatos’ (‘Eger 1’ (SV 12286) x ‘Medoc noir’)
‘Medina’ (‘Eger 1’ (SV 12286) x ‘Medoc noir’)

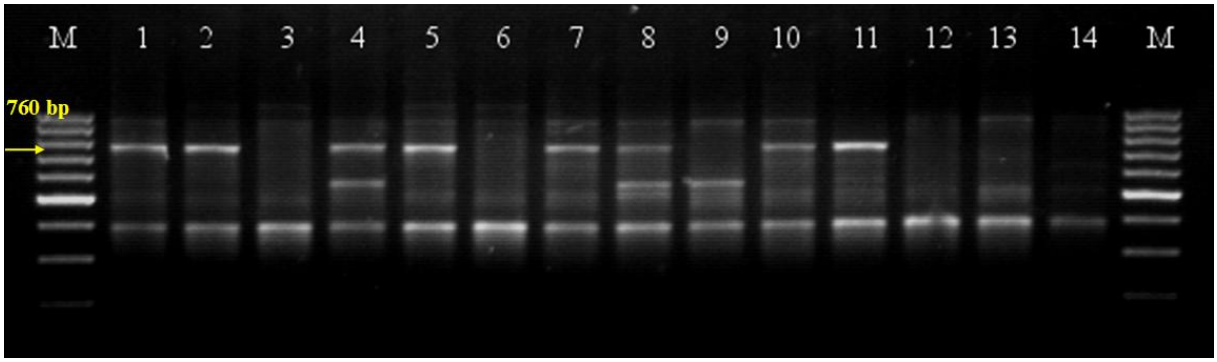
A ‘Seibel’, ‘Seyve Villard’ eredetű fajták pedigréjében szereplő vizsgált fajták:‘S 4986’, ‘SV 12286’, ‘Villard blanc’ (‘SV 12375’),

A ‘Regent’ fajtát használtuk pozitív kontrollként, Akkurt et al. (2007) szerint. A rezisztens magyar fajták mellett azokat a ‘Seibel’, ‘Seyve Villard’ fajtákat is vizsgáltuk a SCAR markerrel, amelyeket a fajták előállítása során használtak, úgymint: ‘Seibel 4986’, ‘SV 12375’, ‘SV 12286’. Úgy vittük fel a gélre a mintákat, hogy az egyes ‘Seibel’, ‘Seyve Villard’ fajták után azok a fajták következnek, amelyeknek a pedigréjükben szerepelnek.

A ‘Duna gyöngye’ pedigréjében szereplő ‘S 4986’ (10. ábra) tartalmazza a 760 bp méretű, lisztharmat QTL-t jelző fragmentumot, de a ‘Duna gyöngyében’ nem szaporodott fel. A ‘Villard blanc’ utódai közül a ‘Viktória gyöngye’, a ‘Nero’ , a ‘Zala gyöngye’ és a ‘Bianca’ örökölte a specifikus fragmentumot, míg a ‘Csillám’ és a ‘Palatina’ nem. A pedigréjükben ‘SV 12286’-ot tartalmazó, és lisztharmat rezisztens fajták, a ‘Göcseji zamatos’ és a ‘Medina’ esetében nem szaporodott fel a lisztharmat QTL-t jelző fragmentum, míg a szülőben, az ‘SV 12286’-ban igen.

Ezek az eredmények is alátámasztják Akkurt és mts. megfigyelését, hogy nem mindegyik tünetmentes egyed adja a specifikus fragmentumot. Eredményeink alapján azokat a rezisztens fajtákat javasoljuk további nemesítési programokban felhasználni, illetve rezisztencia gének halmozásának céljából keresztezési partnerként alkalmazni, amelyekben a lisztharmat QTL követhető a ScORA7-760 markerrel, így esetükben alkalmazható a MAS. A ‘Viktória gyöngye’, a ‘Nero’ és a ‘Zala gyöngye’ nemcsak rezisztens fajták, hanem kiváló tulajdonságokkal rendelkező csemegeszőlő fajtáink, érésüket tekintve koraiak, amit a méltán világhírű ‘Csaba gyöngyétől’ örököltek. Ezeket a fajtákat keresztezve a rezisztens ‘Dzsandzsal kara’-val, vagy a ‘Kismis vatkana’-val, és a *M. rotundifolia* rezisztencia génjét hordozó BC_4 hibriddel, génhalmozással tartós rezisztenciát érhetünk el. Marker alapú szelekcióval ki tudjuk válogatni a keresztezést követően azokat az egyedeket, amelyek tartalmazzák mind a domináns lisztharmat rezisztencia gént (*Ren1, Run1*), mind a ‘Seibel’/’Seyve Villard’ eredetű PM QTL-t, olyan új, rezisztens fajták állíthatók elő, melyeknek rezisztenciája szinte áttörhetetlen.

Eredményeinkkel ajánlást tudunk tenni arra nézve, hogy mely fajták lisztharmat QTL-je követhető az adott markerrel, tehát egy komplex rezisztencia-nemesítési programban mely fajták javasolhatók szülői partnerként, ha marker alapú szelekciót szeretnénk alkalmazni. Ez különösen fontos és nélkülözhetetlen, ha génhalmozással, azaz egy genotípusba több rezisztenciagén bevitelével hozunk létre tartós rezisztenciával rendelkező új genotípusokat, fajtákat.



10. ábra: Magyar nemesítésű rezisztens fajták elemzése a ScORA7-760 markerrel.
Marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 1. 'Regent' (rezisztens kontroll) 2. 'S 4986' 3. 'Duna gyöngye' 4. 'Villard blanc' ('SV 12375') 5. 'Viktória gyöngye' 6. 'Csillám' 7. 'Nero' 8. 'Zala gyöngye' 9. 'Palatina' 10. 'Bianca' 11. 'SV 12286' 12. 'Göcseji zamatos' 13. 'Medina' 14. 'Csaba gyöngye' (szenzitív kontroll).

Az eredményeket közlő publikációk:

Katuláné Debreceni Diána, Szőke Antal, Kiss Erzsébet, Kozma Pál, Veres Anikó. (2011) Magyar nemesítésű lisztharmatrezisztens szőlő fajták jellemzése lisztharmat QTL-lel kapcsolt SCAR markerrel. IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok 2011. 03. 25-27.

Veres A, Katula-Debreceni D., Szőke A., Kozma P., Kiss E. (2011) Analysis of powdery mildew QTL in grape for gene pyramiding purposes 21. International Geisenheim Grapevine Propagation Conference July 21 to 23, 2011 (in press)

Veres Anikó, Katuláné Debreceni Diána, Szőke Antal, Kozma Pál, Kiss Erzsébet,. (2011) Magyar nemesítésű rezisztens szőlőfajták lisztharmat QTL-jeinek követése molekuláris markerekkel. Kertgazdaság (In press)

Katuláné Debreceni Diána (2011) gombarezisztens Szőlő genotípusok molekuláris azonosítása PhD disszertáció

Irodalom

Akkurt, M., Welter, L., Maul, E., Töpfer, R., Zyprian, E. 2007. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis* vinifera L. and Vitis sp.). Mol. Breeding 19: 103-111.

Barker, C.L., Donald, T., Adam-Blondon, A.F., Pauquet, J., Ratnaparkhe, M.B., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.-F., Thomas, M., Dry, I. 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. Theor. Appl. Genet. 111: 370-377

Bouquet, A. 1986. Introduction dans l'espèce *Vitis vinifera* L. d'un caractère de resistance a l'oïdium (*Uncinula necator* Schw. Burr) issu l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. Vignevini 12 (suppl): 141-146

Csepregi, P., Zilai, J. 1988. Szőlőfajta-ismeret és használat. Mezőgazda Kiadó, Bp.

Di Gaspero, G., Cipriani, G., Marazzo, M.T., Andreetta, D., Prado Castro, M.J., Peterlunger, E., Testolin, R. 2005. Isolation of (AC)n-microsatellites in *V. vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. Mol. Breeding 15: 11-20.

Doligez, A., Adam-Blondon, A.F., Cipriani, G., Di Gaspero, G., Laucou, V., Merdinoglu, D., Meredith, C.P., Riaz, S., Roux, C., This, P. 2006. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. Theor. Appl. Genet 113: 369-382.

Filippenko, I.M., Stin, L.T. 1977. In: Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Zs., Testolin, R., Kozma P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. Theor. Appl. Genet. 116: 427-438.

Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K.J., Töpfer, R., Zyprian, E.M. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. Theor. Appl. Genet. 108: 501-515.

Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Zs., Testolin, R., Kozma P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is

controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. Theor. Appl. Genet. 116: 427-438.

Kozma, P., Kiss, E., Hoffmann, S., Galbács, Zs., Dula, T. 2006. Using the powdery mildew resistant *Muscadinia rotundifolia* and *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana for breeding new cultivars. 9th Internatinal Conference on Grape Genetics and Breeding. Udine, Italy Book of abstracts, p. 170.

Merdinoglu, D., Wiedeman-Merdinoglu, S., Coste, P., Dumas, V., Haetty, S., Butterlin, G., Greif, C., Adam-Blondon, A.F., Bouquet, A., Pauquet, J. 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. Acta Horticult. 603: 451-456.

Molnár, S., Galbács, Zs., Halász, G., Hoffmann, S., Kiss, E., Kozma, P., Veres, A., Galli, Zs., Szőke, A., Heszky, L. 2007. Marker assisted selection (MAS) for powdery mildew resistance in a grapevine hybrid family. Vitis 46: 212-213.

Pauquet, J., Bouquet, A., This, P., Adam-Blondon, A.F. 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powderly mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assement of their usefulness for marker assisted selection. Theor. Appl. Genet. 103: 1201-1210

Vojtovic, K.A. 1987. Vospriimchivost sortov vinograda k oidiumu (Powdery mildew susceptibility of grapevine cultivars). In: Novüje kompleksno - ustojchevüje stolovüje sorta vinograda i metodü ih polichenija. (New complex resistant table grape cultivars and methods for breeding) Kishinev: Kisinev Kartja Moldovenjaske; 1987: 42-46.