

Szent István Egyetem

Doktori értekezés tézisei

**Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása a szőlő
lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciára nemesítésében**

HOFFMANN SAROLTA

Gödöllő

2008

A doktori iskola megnevezése: Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

vezetője: Dr. Virányi Ferenc
Egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem
Növényvédelmi Intézet

doktori program: Növénygenetika, Nemesítés és Biotechnológia

programvezető: Dr. Heszky László
Egyetemi tanár, az MTA tagja
Szent István Egyetem
Genetika és Biotechnológiai Intézet

témavezető: Dr. Kiss Erzsébet
Egyetemi tanár, a mezőgazdasági tudomány kandidátusa
Szent István Egyetem
Genetika és Biotechnológiai Intézet

társtémavezetők: Dr. Kozma Pál
Tudományos főmunkatárs, a mezőgazdasági tudomány kandidátusa
FVM Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet- Pécs

Dr. Gabriele DiGaspero
docens, PhD
Udinei Egyetem, Agrár és Környezettudományi Tanszék

.....
Dr. Virányi Ferenc
doktori iskola vezetője

.....
Dr. Kiss Erzsébet
témavezető

A munka előzményei, a kitűzött célok

A szőlő a mezőgazdaság környezetszennyező kultúrái közé tartozik a felhasznált növényvédőszer miatt, amit legnagyobb mértékben a szőlőlisztharmat (*Erysiphe necator* Schwein) és a szőlőperonoszpóra (*Plasmopara viticola* Berk. et Curtis), a két fő gombás betegség ellen kell kijuttatni. Mind a lisztharmat, mind a peronoszpóra önmagában is 100%-os termésveszteség előidézésére képes járványos években, ha az érzékeny fajta esetén nem alkalmazunk kémiai növényvédelmet.

Az anyagi ráfordítás, a környezeti terhelés és ezzel együtt egészségünk védelme érdekében is az jelentene megoldást a szőlő növényvédelmében, ha rezisztens fajtákat termesztenénk. A lisztharmat és a peronoszpóra Európába hurcolása után, a 19. század végén megindult a rezisztenciára nemesítés észak-amerikai szőlőfajok felhasználásával. Ezek a poligénes rezisztenciaforrások azonban nem tették lehetővé, hogy nemzedékeken keresztül *Vitis vinifera* fajtákkal végzett visszakeresztezőkkel a vad fajok hátrányos tulajdonságaitól megszabaduljunk, ezért a minőség és a rezisztencia terén kompromisszumot kellett kötni. A 20. század első felében Európa szerte elterjedt rezisztens fajtákat mára kizárták az üzemi termesztésből hátrányos tulajdonságaik miatt.

Nagy szükség van azonban olyan rezisztens fajtákra, melyek növényvédelem nélküli termesztetőségük mellett, a minőségben versenyre tudnak kelni a legkedveltebb világfajtákkal. Ennek érdekében mono- vagy oligogénes rezisztenciát hordozó donorokra kell alapozni az új rezisztencia nemesítési programokat. Kiváló donor a *Muscadinia rotundifolia*, mely a lisztharmat és a peronoszpóra ellen egy illetve két génes rezisztenciát biztosít. A *Vitis amurensis* abiotikus toleranciáján kívül a peronoszpóra elleni oligogénes rezisztenciája miatt használják a nemesítésben. Az általában érzékeny *Vitis vinifera* fajták között is találhatók igen kis számban lisztharmat és peronoszpóra ellenállóságot hordozó fajták. A dolgozatban elsőként számolunk be egy *Vitis vinifera* fajta, a Kismis vatkana lisztharmat rezisztencia donorként való felhasználásáról és a rezisztenciájának genetikai térképezéséről.

A különböző rezisztenciaforrásoktól eredő, ugyanazon betegség ellen ható gének felhalmozása egy genotípuson belül megelőzi, hogy virulensebb kórokozótörzsek idővel áttörjék a rezisztenciát. Több rezisztenciaforrás géneit egyesítő hibridcsaládokban az egyedek genotípusát fenotípus alapján nem tudjuk meghatározni. A génpiramidálás ellenőrizhetőségéhez, a legkomplexebb rezisztencia gén készletet tartalmazó utódok szelektálásához szükség van a rezisztencia gének molekuláris markerekkel való követésére.

Ennek érdekében az utóbbi időben nagy erővel folyik a szőlő rezisztencia donorainak genetikai és fizikai térképezése.

A gyakorlati nemesítés céljainak elérése érdekében a hagyományos keresztezéses nemesítés módszerét a markerekkel támogatott szelekcióval kiegészítve olyan új hibridek létrehozásán dolgozunk, melyek mindkét gombás betegség ellen több rezisztenciaforrás génjeit tartalmazzák, tünetmentes és tartós rezisztenciával rendelkeznek. A rezisztenciagének nemzedékeken keresztüli követhetőségével lehetőségünk van a versenyképes minőségi tulajdonságokra szelektálni.

Munkánk célja:

Lisztharmat és peronoszpóra rezisztencia gének térképezése és azokkal kapcsolt markerek azonosítása, hogy a nemesítés során a halmozott rezisztenciával rendelkező genotípusokat markerekkel támogatott szelekcióval emelhessük ki.

A dolgozat keretein belül célunk volt a peronoszpóra rezisztenciagének vizsgálatának megalapozása a térképezési család létrehozásával, fenotípusos vizsgálatával és a térképezési munka elkezdésével.

A lisztharmat rezisztenciára nemesítésben egy rezisztenciadonornak még nem használt, üzbeisztáni autochton szőlőfajta, a Kismis vatkana értékelése és tanulmányozása rezisztenciadonorként való felhasználhatóság szempontjából.

Célunk volt a Kismis vatkana rezisztencia szintjének, stabilitásának, öröklődésének vizsgálata, továbbá a genombeli lokalizációjának meghatározása, a molekuláris szelekciót lehetővé tévő molekuláris markerek keresésével együtt.

Anyag és Módszer

A térképezési populációk előállítása és fenntartása

A különböző eredetű peronoszpóra rezisztencia gének térképezéséhez készítettük a 04-7 számú hibridcsaládot irányított beporzással, 2004-ben a Pécsi Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetben. A 99-1-48 (*Muscadinia rotundifolia* x *Vitis amurensis* x franko-amerikai hibrid x *Vitis vinifera*) BC₅ hibrid az anya, mely hímnős virágú, így kasztrálásra volt szükség. Az apa a *Vitis vinifera* cv. Pinot noir P1 klónja volt.

A *Vitis vinifera* eredetű lisztharmat rezisztencia tanulmányozására készült a 04-10 számú hibridcsalád 2004-ben, szintén a Pécsi Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetben. A *Vitis vinifera* subconvarietas *antasiatica* cv. Nimrang funkcionálisan nővirágú fajta az anya, a *Vitis vinifera* subconvarietas *antasiatica* cv. Kismis vatkana sztenoszpermokarp fajta az apa.

A növényeket első évben üvegházban, konténerekben neveltük fel, majd fagymentes teleltetés után szabadföldre ültettük ki.

A populációk fenotípusos értékelése

A peronoszpóra rezisztencia értékelése

A 04-7 hibridcsalád peronoszpóra rezisztenciáját mesterséges fertőzéssel és szabadföldi természetes fertőződés után is értékeltük. A mesterséges fertőzést Petri-csészében végeztük 5×10^4 /ml sporangiumot tartalmazó inokulumot permetezve a leválasztott és nedves szűrőpapírra fektetett levelekre. 1 hét után értékeltük a sporangiumtartó gyep által borított levélfelület nagyságát százalékban kifejezve genotípusonként 3 ismétlésben. A százalékosan kifejezett mesterséges fertőzési eredmények a hiperszenzitív reakcióval együtt megfeleltethetők a szabadföldi bonitálásnál alkalmazott rezisztencia csoportoknak.

Intakt növényeken természetes szabadföldi körülmények között létrejött fertőzésnél a növény aktív védekezési válaszreakciója és a tünetek súlyossága alapján értékeltünk. 2006 nyarán a jó csapadékellátás hatására optimális feltételek voltak a peronoszpóra járvány kialakuláshoz. A növényeket augusztus hónap folyamán háromszori ismétléssel bonitáltuk, a tünetek fejlődését a különböző korú leveleken nyomon követtük.

A lisztharmat rezisztencia értékelése

A *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana rezisztenciadonor a taskenti génbankban természetes lisztharmat fertőződés után mutatott tünetmentes rezisztenciája alapján került kiválasztásra. Magyarországon a rezisztenciát üvegházban, mesterséges fertőzéssel, gravitációs úton kijuttatott konidiospórákkal ellenőriztük.

A Kismis vatkanától származó 04-10-es hibridcsaládot szintén üvegházi mesterséges fertőzéssel értékeltük, 10 napos időközönként háromszor végezve 2005-ben és 2006-ban. Az értékelést a szemmel látható tünet (epifita micélium a konídiumláncokkal) megléte vagy hiánya alapján végeztük. Ezek szerint rezisztens az az utód, melyen semmilyen tünetet nem találtunk, és érzékeny az, melyen valamilyen mértékben megjelent a lisztharmat micéliuma.

Genetikai térkép készítés a peronoszpóra rezisztenciára hasadó 04-7 hibrid családon

A 04-7 hibridpopuláció 60 véletlenszerűen kiválasztott egyedén ellenőriztük a kontrollált keresztezésből való származást. A térképezéshez 46 utódot használtunk fel. A szülőkön 395 SSR primert teszteltünk allél polimorfizmusra, reakciónként 1 primerpárral dolgozva. A polimorf primerekkel az egész populáción végrehajtott analízisnél egy PCR-ben multiplikáltunk három, különböző fluorophore-okkal (6-FAM, HEX, TAMRA) jelölt, vagy nem átfedő allélhosszúság tartományú primert. A 10 µl térfogatban végzett PCR elegy összetétele a következő volt: 30 ng DNS templát, 2.5 mM MgCl₂-dal kiegészített puffer, 200 µM dNTP-k, 1 U Hotmaster Taq polimeráz (Eppendorf, Milánó, IT), 0,25 pM minden reverse és forward primerből. A következő PCR protokollt használtuk: denaturáció: 94 C°, 1 percig ezt követően denaturáció 92 C°, 30s-ig, annealing: 48-56 C°, 40s-ig, amplifikáció: 72 C°, 50s-ig, a primernél ajánlott ciklusszámban ismételve, majd végső amplifikáció 72 C°, 7 percig.

A DNS fragmentumok elválasztását kapilláris gélelektroforézissel végeztük (GE Healthcare, Milánó, IT). Három primer párPCR termékét multiplikáltuk egy futtatáshoz, szintén a fluoreszcens festékek kombinálásával és az azonos festékek esetében az alléltartományok átfedésének elkerülésével. Az allélméreteket a Fragment Profiler v 2.1 (GE Healthcare) segítségével határoztuk meg.

94 RGA (Rezisztencia Gén Analóg) primert teszteltünk polimorfizmusra a populáció szülein. A rezisztenciát hordozó szülőben polimorf markerekkel genotipizáltuk az utódpopulációt. Az RGA markerek genotípus meghatározásához SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) analízist végeztünk vertikális poliakrilamid gélen. A gél 3% glicerint, 6 X TBE puffert és 0,5 X MDE poliakrilamidot tartalmazott. Az elektroforézis 16 órán keresztül, szobahőmérsékleten 6-8W-on zajlott. A gélek festésére az ezüst-nitrátos módszert használtuk.

A Grattapaglia és Sederoff (1994) által felállított modellt alkalmaztuk a térképezésnél, mely szerint a fás növényeknél a heterozigóta szülőkkel végzett keresztezést kétirányú áltesztkeresztezésnek (double pseudo-testcross) tekintjük. A genetikai térkép elkészítéséhez a CarthaGene 0.999R (de Givry 2005) szoftvert használtuk. A Carthagene multipontos maximum valószínűség becslést végez a marker sorrend meghatározásához. A markerek távolságát a Kosambi függvényel számoltuk ki. LOD 4.0 értéket és 30 cM maximum távolság küszöböt használtunk a kapcsoltsági csoportok kialakításához.

A *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana lisztharmat rezisztenciájának BSA (Bulked Segregant Analysis) analízise és térképezése

A BSA analízis során 1 reakcióban 1 primerpárt használtunk fel. A mikroszatellit markereket a Doligez és munkatársai (2006) valamint DiGasparo és munkatársai (2007) által közölt térképekről választottuk ki. A markerek kiválasztásánál a 10 cM-nál kisebb távolságra és a teljes genom egyenletes lefedésére törekedtünk.

A BSA-t a 2 szülői DNS mintán és a rezisztens és érzékeny utódok összekevert (bulked) mintáin végeztük el. A csoportokba (bulk) 15-15 utód DNS-e került RT-PCR-en végzett koncentráció ellenőrzés után, mely biztosította, hogy minden utód DNS templátjáról egyforma mértékben menjen végbe amplifikáció. A csoportok DNS-éből 30 ng (2 ng/egyed) a szülők DNS-éből 6,6 ng került egy reakcióba. A 10 µl térfogatban végzett reakció összetétele és protokollja, a kapilláris gélelektroforézis és az allélméret meghatározás megegyezett a 04-7 családnál leírttal.

A szülőket és az érzékeny és rezisztens csoportokat minden primer lókusznál az allélhosszal és a detektált fluoreszcens görbe alatti területtel jellemeztük, az utóbbi az adott

allél amplifikációját kvantifikálja. A kapcsolt marker jelöltek kiválasztására a Kismis vatkana alléljainak részesedését vizsgáltuk a csoportokban. Csak a Kismis vatkanában heterozigóta markereket tudtuk felhasználni. A Kismis vatkana alléljait A és a -val jelöljük, a $\text{Terület}_A / \text{terület}_a$ hányadost kiszámoltuk a rezisztens és az érzékeny csoportra. A rezisztens csoport $\text{Terület}_A / \text{terület}_a$ hányadosából kivontuk az érzékeny csoport $\text{Terület}_A / \text{terület}_a$ hányadosát, mely szám abszolútértéke utalt az adott primer kapcsoltságának szorosságára. Feltételeztük, hogy a Nimrang lisztharmatra érzékeny szülő nem járul hozzá a rezisztencia kialakításához, és az alléljai egyenletesen oszlanak el a 15-15 utód között. A Nimrangban szegregáló B és b allélokra azonos módon kiszámoltuk a $\text{Terület}_B / \text{terület}_b$ hányadost, melynek a két csoport közötti különbségét a kísérleti hibának vettük. A kapcsolttságot mutató primerekkel újabb PCR-t végeztünk a csoportokban szereplő egyedi DNS-eken.

A csoport szegregációs analízis alapján ki tudtuk választani azt a kapcsolttsági csoportot (kromoszómát), és azt a régiót, ahol a rezisztencia lókuszt elhelyezkedik. A teljes 04-10 populáción: 310 utódon és a szülőkön elvégeztük a PCR-t a rezisztencia lókuszt tartalmazó 13-as kapcsolttsági csoporton elhelyezkedő primerekkel. A 13-as kapcsolttsági csoport helyi genetikai térképének elkészítéséhez a CarthaGene 0.999R szoftvert használtuk. A kapcsolttság megállapításához LOD 9 küszöbértéket használtunk és 30 cM maximum távolság küszöböt. A térkép távolságokat a Kosambi függvényel számoltuk ki.

Eredmények

Genetikai térkép készítés a peronoszpóra rezisztenciára hasadó 04-7 hibrid családon (99-1-48 x Pinot noir P1)

A 04-7 hibridcsalád rezisztencia fenotípusának vizsgálata

A mesterséges fertőzés eredményei alapján a 04-7 hibridcsalád hasadt a peronoszpóra rezisztenciára. Minden rezisztencia fokozatba kerültek egyedek, ez jelzi a poligénesen öröklődő rezisztencia szegregálását. A 2006-os augusztusi-szeptemberi időjárás optimális feltételeket teremtett a peronoszpóra számára, ez lehetőséget teremtett arra, hogy a ne csak az 5 rezisztencia fokozatba, hanem az 1-2 és 4-5 fokozatok köztes kategóriáiba is soroljunk egyedeket.

Polimorf primerek kiválogatása

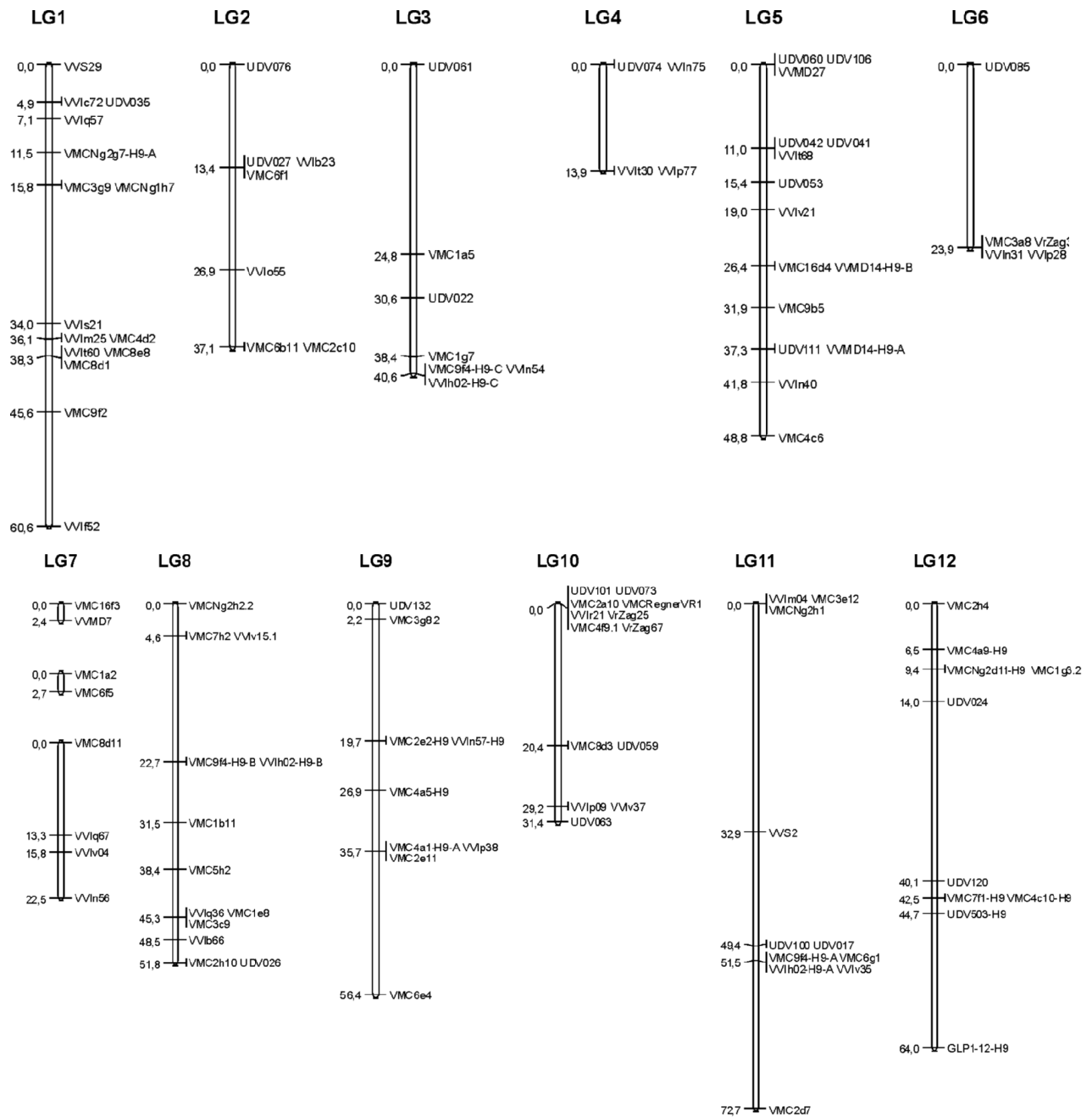
A 04-7 hibridcsalád szülein 395 SSR primert teszteltünk, hogy kiválaszthassuk a legalább egyik szülőben heterozigótákat. 331 SSR primer bizonyult alkalmasnak a 04-7 populáció genotipizálásához. 94 RGA primert teszteltünk a szülőkön, amiből 51 volt alkalmas a térképezésre.

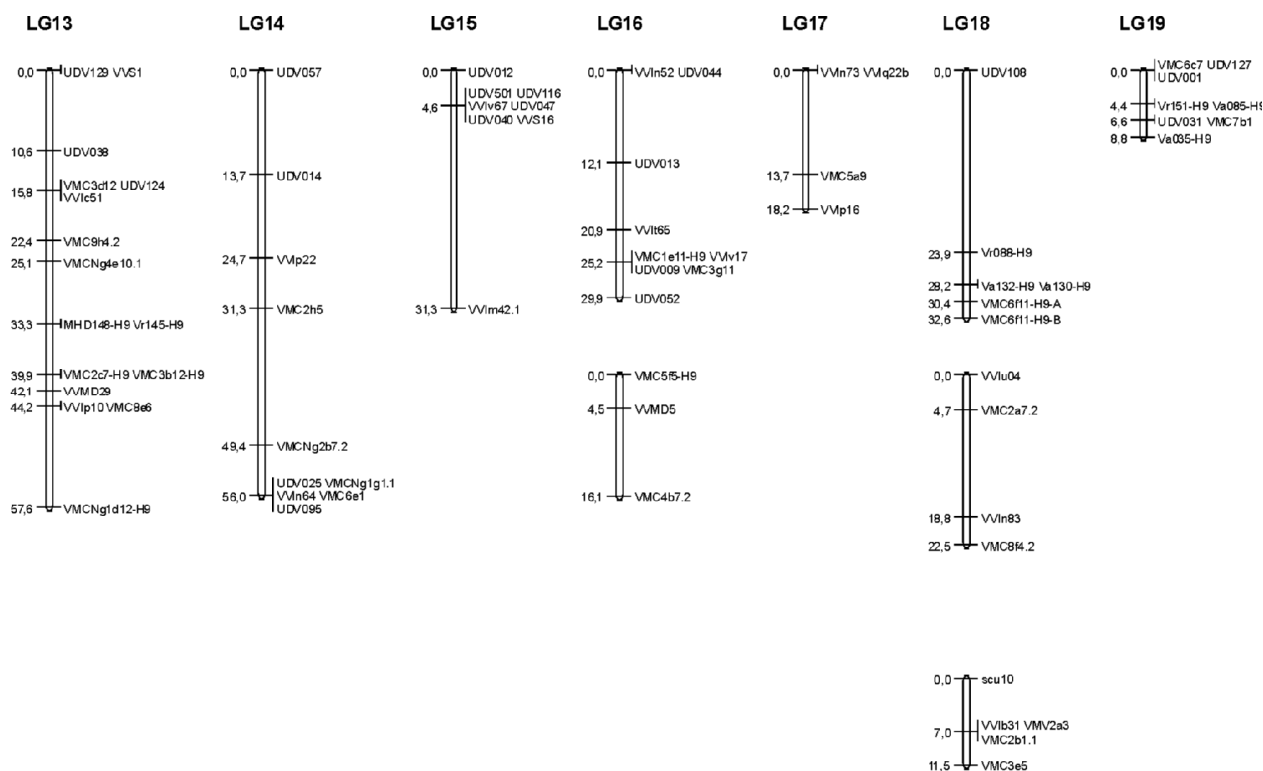
A szülői térképek

A 04-7-es populáció genotipizálása során 265 db SSR és 24 db RGA primerrel végeztünk PCR-t, a többi heterozigóta primerrel tovább folytatódik ez a munka. A primerek közül a szülői térképekre annyi primer került rá, amennyi az adott szülőben heterozigóta volt. Az anyai térképre 166 db SSR és 11 RGA primer került, az apai térképre 160 SSR és 12 RGA. Az anyai kapcsoltsági csoportok térképét a 1. ábra tartalmazza. A konszenzus térképet a mindkét szülőben heterozigóta primerek közös pontként való felhasználásával hoztuk létre. Mindkét szülőnél 19 kapcsoltsági csoport alakult ki, amely megegyezik a *Vitis vinifera* haploid kromoszómaszámával.

A kapcsoltsági csoportok egy része fragmentált, az anyai térképen a 7-es, 16, os 18-as, az apai térképen a 7-es kapcsoltsági csoport áll több darabból. Az egy darabban álló kapcsoltsági csoportok sem fedik még le teljesen a kromoszómákat. A markerek között igen nagy, 20-30 cM közötti távolságok is gyakoriak. Ezek azonban csak részeredmények, a térkép

telítésével a fedettség megfelelő lesz. Ezután a fenotípus eredmények felhasználásával a rezisztencia lókuszok kirajzolhatók a térképen.





1. ábra: A 19 anyai kapcsoltsági csoport (LG= linkage group; kapcsoltsági csoport). A függőleges vonalak mentén, bal oldalon a kapcsoltsági csoportra térképezett 1. primertől számított genetikai távolság (cM), jobb oldalon a primerek nevei vannak feltüntetve.

A *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana lisztharmat rezisztenciájának BSA analízise és térképezése

A rezisztenciaforrás és a 04-10 hibridcsalád rezisztencia fenotípus értékelése

1994-ben az Üzbég Kertészeti Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet taskenti fajtagyűjteményében a Kismis vatkana fajtán nem volt lisztharmat fertőzési tünet, míg az ültetvény erősen fertőzött volt. Magyarországi üvegházi megfigyelések igazolták a tünetmentes lisztharmat rezisztenciát. A szabadföldön természetes fertőződés mellett végzett rezisztencia értékelés eredménye szintén bizonyította a tünetmentességet a Kismis vatkanán. Ezen eredmények alapján érdemesnek találtuk rezisztenciaforrásként való felhasználásra.

A Nimrang x Kismis vatkana keresztezés 310 utódjából 150 az érzékeny és 160 a rezisztens egyed. Az elméleti 1:1 arányú hasadást a $\chi^2 = 0,32$ igazolja. Ez monogénes rezisztencia esetében érvényes, mely heterozigóta formában van jelen a Kismis vatkanában és

dominánsan fejeződik ki. Ezt a rezisztencia lókuszt REN1 (Resistance to Erysiphe necator) névvel láttuk el.

BSA analízis

314 SSR markert választottunk ki a Doligez és munkatársai (2006) illetve a DiGaspero és munkatársai (2007) által publikált genetikai térképekről a teljes genom lefedéséhez, melyből 195 marker volt heterozigóta a Kismis vatkanában. Csak a Kismis vatkanában heterozigóta markerek informatívak a REN1 gén BSA analízisének és térképezésének.

Átlagosan 10.3 informatív marker jutott egy kapcsoltsági csoportra, a markerek közötti átlagos távolság 8,2 cM. A kapcsoltsági csoportok elnevezésében az IGGP (International Grape Genom Program) számozását követjük. A Kismis vatkanában 33%-nyi volt homozigóta markerek aránya, ezért a genom lefedése nem volt tökéletes: a 7. kapcsoltsági csoporton üresen maradt egy 49 cM hosszúságú régió, egy 35 cM hézag maradt a 18. kapcsoltsági csoporton, a 16. kapcsoltsági csoporton pedig 2 darab 27-30 cM rés maradt. 20-30 cM közötti fedetlen szakaszok találhatóak még a 6., 8., 10., 11., 13., 15., 18. kapcsoltsági csoportokon.

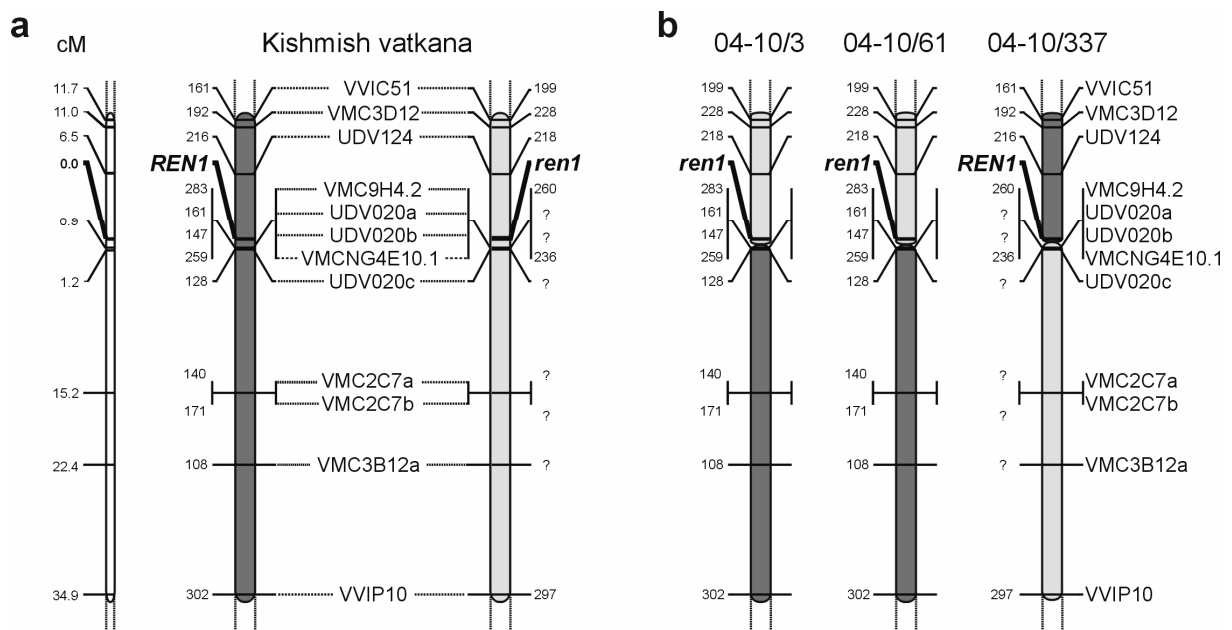
A BSA során egy csoport kapcsoltsági elhelyezkedő markert találtunk a 13-as kromoszómán melyeknél torzított volt a szülői allélok megoszlása az allél specifikus fluoreszcencia mérés alapján a rezisztens és érzékeny csoportokban. Az anyag és módszer fejezetben részletesen leírt módon a csoportok terület_A /terület_a hányadosát összehasonlítva 7 markernél kaptunk szignifikáns különbséget a csoportok között. A legnagyobb differenciát mutató markerek sorrendben a következők: VMC2C7, UDV020, VMC9H4.2, VMCNG4E10.1, VMC3B12, VMC3D12 és UDV038. A legmagasabb terület_A /terület_a hányados különbség ezen markereknél 32 volt. Az összes többi kapcsoltsági csoporton ez az érték 5 alatt volt, 0,85 átlaggal, 1,02 standard hibával. A Doligez (2006) térkép alapján számolt távolságok szerint mindezen markerek egy 47,6 cM méretű szakaszon helyezkednek el a rezisztens fenotípust biztosító lókuszt körül.

A 13-as kromoszóma és a REN1 lókuszt helyi genetikai térképe

A BSA analízis alapján azonosított REN1 fenotípust tartalmazó genomi régióban genetikai térképet készítettünk. 12 SSR primert választottunk ki, melyek egyenletesen befedik a 13 kapcsoltsági csoportot és az összes REN1 körüli markert tartalmazzák. Ezen markerekkel (UDV020, VMC3D12, VMC9H4.2, VVIN62, VMC5G11, VMC2C7, VMCNG4E10.1, UDV124, VVIP10, VVIC51, VMC3B12, VMC3D8) genotipizáltuk a Nimrang x Kismis

vatkana utódpopuláció 310 egyedét. 9 marker felhasználásával elkészítettük a REN1 lókuszt helyi térképét.

A REN 1 még LOD 9 értéknél szilárdan ebben a régióban helyezkedik el. Négy marker lókuszt egy pontban, 0,9 cM-ra helyezkedik el tőle, melyek a VMC9H4.2, a VMCNG4E10.1 és a multilókuszos UDV020 marker két lókusza. A Kismis vatkana REN1 és ren1 haplotípusait a 2a ábra szemlélteti. A 4 legszorosabban kapcsolt marker lókuszzal és a REN1 fenotípus lókuszával a 310 F1 utódból három rekombináns egyedet találtunk. Mindhárom rekombináns utódban egy ponton történt 'crossing-over' a két Kismis vatkana homológ között (2.b ábra).



2. Ábra: Helyi genetikai térkép a REN1 lókuszt körülíró 46,6 cM nagyságú régióról a Kismis vatkana 13-as kapcsoltági csoportjában. A rezisztens REN1 allélt hordozó homológ sötétszürkével az érzékeny ren1 allélt hordozó homológ világosszürkével van ábrázolva.

Új tudományos eredmények

1. Molekuláris genetikai térképet készítettünk egy peronoszpóra rezisztenciára hasadó hibridcsaládon, melynek rezisztencia donorai egy észak-amerikai *Vitis* fajokból származó Franko-amerikai hibrid, egy *V. amurensis* hibrid és egy *M. rotundifolia* hibrid voltak, hogy a peronoszpóra rezisztencia géneket elhelyezhessük rajta, és markerekkel támogatott szelekcióhoz (MAS) kapcsolt molekuláris markereket azonosíthassunk.
2. Lisztharmat rezisztenciára hasadó hibridcsaládot hoztunk létre a *V. vinifera* convar. *orientalis* subconvar. *antasiatica* cv. Kismis vatkana üzbeisztáni autochton szőlőfajtaival, melyet nemesítési célra még nem használtak fel. Megállapítottuk, hogy ezen rezisztencia szemmel értékelve tünetmentességet biztosít a lisztharmattal szemben, monogénesen, dominánsan öröklődik, és a Kismis vatkanában heterozigóta formában van jelen. Feljegyeztük, hogy a rezisztencia üvegházi körülmények között, kizárólag a szenescens leveleken legyengül, és gyér lisztharmat fertőződés következik be.
3. BSA analízissel meghatároztuk, hogy a lisztharmat rezisztenciáért felelős REN1 lókuszt helye a genomban a 13-as kromoszómán van, majd a 13-as kromoszómáról helyi genetikai térképet készítettünk.
4. A genomi elhelyezkedés meghatározásával molekuláris úton is bizonyítottuk, hogy a Kismis vatkana *V. vinifera* eredetű lisztharmat rezisztencia génje különbözik az eddig rezisztenciaforrásnak használt észak-amerikai *Vitis* fajok vagy a *M. rotundifolia* faj rezisztenciájától.
5. A REN1 lókusztól 0,9 cM távolságban, 3 szorosán kapcsolt SSR markert találtunk, melyek lehetővé teszik a REN1 lókuszt tartalmazó egyedek molekuláris markerekkel végzett szelekcióját.

Következtetések és javaslatok

A peronoszpóra rezisztencia térképezése a 04-7 családon

A rezisztencia típusának pontos meghatározásához nemcsak a sporuláció mértékét, hanem a többi tünetet és a növényi válaszreakciót is figyelembe kell venni, ami szabadföldi intakt növényeken felvételezhető. Azonban szabadföldi peronoszpóra rezisztencia értékelésnél azonos genotípus esetén is különböző mértékű a tünetek megjelenése (a sporangiumtartó kivirágzása, az olajfolt és a nekrotikus folt) a levél korának, a fertőzés súlyosságának és a környezeti körülmények szigorúságának függvényében. Emellett a járványos és viszonylag járványmentes évek 1-2 rezisztencia fokbeli különbséget okozhatnak ugyan annál a genotípusnál, ezért szükséges a mesterséges fertőzési eredményekkel való megerősítést.

A dolgozatban egy 265 db SSR és 24 db RGA primert tartalmazó genetikai térképet készítettünk, mely még nem elég sűrűn és egyenletesen lefedett a peronoszpóra rezisztencia gének lokalizálásához. Ezért további primerekkel folytatódik a térkép telítése az Udinei Egyetemen. A magoncok fenotípusának véglegesítéséhez egy újabb ellenőrző rezisztencia értékelés szükséges. A peronoszpóra rezisztencia gének helyét és a kapcsolt markereket is tartalmazó térkép a közeljövőben készül el.

Negyvenhat egyedből álló térképezési populáció meglehetősen kicsi, főleg hogy három rezisztenciaforrást kombináltunk ebben a családban. A kis egyedszám viszont előnyt jelent abban, hogy meggyorsítja és költségtakarékosná teszi a térképezést. A kisméretű populáción térképezett rezisztencia lókuszok és ezekkel kapcsolt markerek valódiságát egy kiterjesztett populáción ellenőrizni kell. Ehhez az újabb egyedek felnevelése rezisztencia fenotípus értékelése és a kapcsolt markerekkel történő genotípezálása szükséges.

Peronoszpóra rezisztencia gének térképezése témában két hibridcsaládon már elkészült a genetikai térkép az Udinei Egyetemen. E dolgozatban tárgyalt térkép befejezése után lehetőségünk lesz a három térkép összevetésével a három különböző eredetű rezisztencia (franko-amerikai hibridek, *Vitis amurensis*, *Muscadinia rotundifolia*) genetikai meghatározottságának összehasonlítására. Az eredményeket a gyakorlati nemesítésben a keresztezések megtervezéséhez, és az elit magoncok szelekciójához használjuk fel.

A *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana lisztharmat rezisztenciája

Minden fajnál az egyes tulajdonságokra jellemző a variabilitás, ez vonatkozik a rezisztenciára is. A fajon belül megfigyelhető a nagyfokú érzékenységtől az igen magas fokú rezisztenciáig az ellenállóképesség teljes skálája. A *Vitis vinifera* fajtákban megtalálható különböző fokú lisztharmat rezisztenciát és a *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana magasfokú lisztharmat rezisztenciáját korábbi publikációkban megemlítették, de a rezisztencia tulajdonságait nem vizsgálták elmélyülten, és nem alkalmazták rezisztencia donornak nemesítési programokban. Ennek oka valószínűleg, hogy nagyon kevesen hittek egy *Vitis vinifera* fajta rezisztenciájában, és nem ellenőrizték a leírt megfigyelések helyességét.

A csoport szegregációs analízist (BSA), domináns markerekkel használják általánosan, azonban kodomináns markerekre (pl SSR) is alkalmazható, ha az allélok dózist mérni tudjuk a DNS csoportokban. Az allélok fluoreszcenciás intenzitásának mérésével mennyiségileg meghatároztuk, hogy a szülői allélok milyen arányban találhatók meg a rezisztens és érzékeny csoportokban minden egyes marker lókusznál.

A BSA során azonosítottuk, majd a helyi genetikai térkép készítés során igazoltuk, hogy a Kismis vatkana monogénes lisztharmat rezisztenciája a 13. kromoszómán helyezkedik el. A többi, nemesítésben szőlő rezisztencia forrásként használt faj lisztharmat rezisztencia génjei, QTL-jei a 12-es, 18-as kromoszómákon helyezkednek el. A Kismis vatkana REN1 lókusza a 13-as kromoszómán található, ezért a Kismis vatkana egy új és hatékony lisztharmat rezisztencia forrásnak tekinthető.

A REN1 rezisztencia nemesítésben való felhasználásának előnye, hogy a rezisztencia donor Kismis vatkana a *Vitis vinifera* fajba tartozik, nem kell interspecifikus vagy intergenerikus keresztezést végezni, majd több generáción keresztül végzett visszakereszteзésekkel a hátrányos, idegen fajból származó tulajdonságoktól megszabadulni. A Kismis vatkana mind a csemegeszőlő, mind a borszőlő nemesítéshez megfelelő, ideális szülőpartner. Fürtszerkezete, fürtmérete, bogyószáma, növekedési erélye nem igényel korrigálást. Sztenospermokarp magvatlansága, a lisztharmat rezisztencián kívül, másik fontos tulajdonsága.

A REN1 lókussszal kapcsolt molekuláris markerek segítségével a Kismis vatkana REN1 génjének más lisztharmat rezisztencia források génjeivel való kombinálására és azoknak generációkon keresztüli követésére is lehetőség nyílt.

Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Tudományos publikációk impakt faktoral

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. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 427-438. **IF:3,14**

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 (4): 212-213. **IF: 0,753**

Tudományos publikációk impakt faktor nélkül

Halász G., Kozma P., Molnár S., Veres A., **Hoffmann S.**, Galbács Zs., Kiss E., Heszky L. (2005): Szőlőhibridek elemzése rezisztenciagénekhez kapcsolt molekuláris markerekkel. *Kertgazdaság, különszám* 127-132.

Molnár S., Galbács Zs., Halász G., **Hoffmann S.**, Veres A., Szőke A., Galli Zs., Szádeczky-Kardoss B., Kozma P., Kiss E., Heszky L. (2007): Lisztharmat ellenálló és fogékony genotípusok szelekciója molekuláris markerekkel. *Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények, Acta Agraria Debreceniensis* 2007/27:100-104.

Konferencia kiadványok

Kozma P., Molnár S., Galbács Zs., Halász G., **Hoffmann S.**, Veres A., Galli Zs., Szőke A., Heszky L., Kiss E. (2006): Markerekre aklapozott szelekció lisztharmat rezisztenciára szőlő back-cross nemezedékben. *Agrárgazdaság, vidék, régiók, multifunkcionális feladatok lehetőségek*". XLVIII. Georgikon Napok, *48th Georgikon Scientific Conference*, 2006. szeptember 21-22. CD:\Teljes anyagok\Kozma et al.

Hoffmann S., Cindric P., Kozma jr., P. (2007): Breeding resistant cultivars to downy and powdery mildew. OIV 30. Kongresszusa Budapest 2007. június 10-16. CD kiadvány.

Kozma P., Kiss E., **Hoffmann S.**, Galbács Zs., Dula T. (2008): Using the powdery mildew resistant *Muscadinia rotundifolia* and *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana for breeding new cultivars. 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, July 2-7, 2006. Udine, Italy, *ISHS Acta Horticulturae (in press)*.

Előadás és poszter összefoglalók

Kozma P. jr., **Hoffmann S.**, Dula B.-né. (2005): Gombabetegségeknek ellenálló szőlőfajták előállítása. XI. Növénynemesítési Tudományos Napok. Budapest, MTA 2005. március. 3-4. Összefoglalók, p 106.

Kozma P.jr, **Hoffmann S.**, Dula B.-né (2006): A *Muscadinia rotundifolia* és a *Vitis vinifera* cv. Kismis vatkana lisztharmat rezisztenciájának felhasználása a szőlő nemesítésében. XII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2006. 03. 07-08. Budapest, MTA 2006. március 7.-8. Összefoglalók, p. 29.

Kozma P., Molnár S., Galbács Zs., Halász G., **Hoffmann S.**, Veres A., Galli Zs., Szőke A., Heszky L., Kiss E. (2006): Markerekre alapozott szelekció lisztharmat rezisztenciára szőlő back-cross nemzedékben. Agrárgazdaság, vidék, régiók, multifunkcionális feladatok lehetőségei. XLVIII. Georgikon Napok, 48th Georgikon Scientific Conference, Keszthely, 2006. szeptember 21-22. p. 179.

Kozma P. jr., **Hoffmann S.** Kiss E., Dula B.-né (2007): Peronoszpóra és lisztharmat rezisztens szőlőfajták nemesítése. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, MTA 2007. március 12. Összefoglalók, p. 42.

Molnár S., Galbács Zs., Halász G., Veres A., Galli Zs., Szőke A., **Hoffmann S.**, Wichmann B., Kiss E., Heszky L., Kozma P. (2007): A *Muscadinia rotundifolia* eredetű Run1 génnel kapcsolt DNS markerek alkalmazása lisztharmattal szemben rezisztens szőlő genotípusok szelekciójára. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred 2007. április 15-17. Összefoglalók p. 150.

Kiss E., Molnár S., Galbács Zs., Halász G., **Hoffmann S.**, Kozma P., Veres A., Galli Zs., Szőke A., Heszky L. (2007): Marker assisted selection in grapevine for powdery mildew resistance. ENDURE Workshop RA4.2, Exploitation of Plant Genetic Resistance, Angers, France, 5-6. July 2007. p. 18.

Molnár S., Galbács, Zs., Debreceni-Katula D., Szőke A., Veres A., **Hoffmann S.**, Kozma P., Galli Zs., Kiss E., Heszky L. (2008): Application of Molecular Markers Linked to Run1 Powdery Mildew Resistance Gene, International Conference; Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants, Abstract of Poster Presentation, p. 67.

Katula-Debreceni D., Lencsés A.K., Szőke A., Veres A., **Hoffmann S.**, Kozma P., Galli Zs., Kiss E., Heszky L. (2008). Powdery and Downy Mildew Resistance in Grapevine: MAS-Based Gene Pyramiding in *Vitis vinifera* L. Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants, 2008 February 3-6. Vienna, Austria p 75.

Az értekezés témaköréhez nem közvetlenül kapcsolódó publikációk

Tudományos publikációk impakt faktoral

Halász G., Veres A., Kozma P., Kiss E., Balogh A., Galli Zs., Szőke A., **Hoffmann S.**, Heszky L. (2005). Microsatellite fingerprinting of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties of the Carpathian Basin. *Vitis* 44:173-180. **IF: 0,897**

Galbács Zs., Molnár S., Halász G., **Hoffmann S.**, Kozma P. Kovács L., Veres A., Galli Zs., Szőke A., Heszky L. Kiss E., (2008). Identification of grapevine cultivars with microsatellite based DNA barcodes. *Vitis* (in press). **IF: 0,753**

Tudományos publikációk impakt faktor nélkül

Galbács Zs., Molnár S., Halász G., **Hoffmann S.**, Galli Zs., Szőke A., Veres A., Heszky L. Kozma P., Kiss E. (2007): „DNS-ampelográfia”: Szőlőfajták elemzése DNS vonalkóddal. *Agrár- és Vidékfejlesztési Szemle 2007. vol. 2. (2) 93-99.*

Kiss E., Kozma P., Halász G., **Hoffmann S.**, Galbács Zs., Galli Zs., Molnár S., Szőke A., Veres A., Heszky L. (2008): DNA Ampelography: Grapevine variety characterization using DNA barcodes. *Hungarian Agricultural Research* 2008/1:19-23.

Konferencia kiadványok

Kiss E., Kozma P., Halász G., Galbács Zs., Molnár S., **Hoffmann S.**, Veres A., Galli Zs., Szőke A., Heszky L. (2008): Pedigree of Carpathian Basin and Hungarian grapevine cultivars based on microsatellite analysis. 9th International Symposium on Grape Genetics and Breeding, July 2-7, 2006. Udine, Italy, ISHS Acta Horticulturae (*in press*).

Kozma P., Halász G., Galbács Zs., Molnár S., **Hoffmann S.**, Veres A., Galli Zs., Kiss E., Heszky L. (2008): Analysis of grapevine hybrid family with molecular markers linked to powdery mildew resistance gene. 9th International Symposium on Grape Genetics and Breeding, July 2-7, 2006. Udine, Italy, ISHS Acta Horticulturae (*in press*).

Előadás és poszter összefoglalók

Kiss, E., Kozma, P., Halász, G., Veres, A., **Hoffmann, S.**, Molnár, S., Heszky, L. (2005): Mikroszatellit markerek alkalmazása szőlőfajták pedigré elemzésére. XI. Növénynevelési Tudományos Napok, MTA, Budapest, 2005. március 3-4. p. 24.

Kiss E., Kozma P., Halasz G., Veres A., Szoke A., Galli Zs., **Hoffmann S.**, Molnar S. Balogh A., Heszky L. (2005): Microsatellite based fingerprints and pedigree analysis of grapevine cultivars of Carpathian Basin origin. International Grape Genomics Symposium 2005. július 12-14. Saint Louis, Missouri, USA. Book of Abstracts, p. 41.

Halász G., Kozma P., Molnár S., Veres A., **Hoffmann S.**, Kiss E., Heszky L. (2005): Szőlő hibridek elemzése rezisztencia génekhez kapcsolt molekuláris markerekkel. Lippay János - Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak. Budapest 2005. október 19.-21. Összefoglalók, Kertészettudomány p. 266-267.

Kiss E., Kozma P., Veres A., Galbács Zs., Halász G., Molnár S., **Hoffmann S.**, Galli Zs., Szőke A., Heszky L. (2006): Szőlő fajták pedigré elemzése mikroszatellit markerekkel. Molekuláris markerek felhasználása a növénygenetikai és nemesítési kutatásokban, MAE Genetikai Központi Szakosztály ülése, Martonvásár, 2006. január 19.

Kozma P., Galbács Zs., Halász G., Molnár S., **Hoffmann S.**, Veres A., Kiss E., Heszky L. (2006): Lisztharmat rezisztenciagénnel kapcsolt molekuláris markerek alkalmazása szőlő hibridek szelekciójára. Molekuláris markerek felhasználása a növénygenetikai és nemesítési kutatásokban, MAE Genetikai Központi Szakosztály ülése, Martonvásár, 2006. január 19.

Halász G., Molnár S., Galbács Zs., Veres A., **Hoffmann S.**, Kozma P., Galli Zs., Kiss E., Heszky L. (2006): Szőlőfajták pedigréjének elemzése mikroszatellit ujjlenyomat alapján. XII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest MTA 2006. március 7-8. Összefoglalók, p. 34.

Molnár S., Galbács Zs., Halász G., Veres A., **Hoffmann S.**, Kozma P., Galli Zs., Kiss E., Heszky L. (2006): Szőlő lisztharmat rezisztencia gén molekuláris markerezése. XII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest MTA 2006. március 7-8. Összefoglalók, p. 35.

Halász G., Molnár S., Galbács Zs., **Hoffmann S.**, Veres A., Galli Zs., Szőke A., Kiss E., Kozma P., Heszky L., (2006): Kárpát-medencében őshonos és mai szőlőfajták genotípusának és genetikai távolságának meghatározása mikroszatellit elemzéssel. XLVIII. Georgikon Napok, *48th Georgikon Scientific Conference*, 2006. szeptember 21-22. CD:\Teljes anyagok\Halász et al.

Galbács Zs., Molnár S., Halász G., **Hoffmann S.**, Veres A., Galli Zs., Szőke A., Tóth Zs., Pilinszky K., Wichmann B., Kiss E., Kozma P., Heszky L., (2007): Mikroszatellit ujjlenyomat alkalmazása "hungaricum" szőlőfajták pedigré elemzésére. Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények, *Acta Agraria Debreceniensis* 2007/27. 71-77.

Kiss E., Molnár S., Galbács Zs., Halász G., **Hoffmann S.**, Kozma P., Veres A., Galli Zs., Szőke A., Heszky L. (2007): Marker assisted selection in grapevine for powdery mildew resistance. ENDURE Workshop RA4.2, Exploitation of Plant Genetic Resistance, Angers, France, 5-6. July 2007. p. 18.

Galbács Zs., Molnár S., Lencsés A. Szőke A. Veres A., **Hoffmann S.**, Kozma P., Galli Zs., Kiss E. Heszky L. 2008. SSR Based Genotyping of Grapevine varieties, International Conference; Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants, Abstract of Poster Presentation, p. 46.