



A kajszi és meggy gyümölcsök flavonoid-bioszintézisének jellemzése

Pfeiffer Péter

Doktori értekezés

Készült:

Budapesti Corvinus Egyetem

Genetika és Növénynevelés Tanszék

Budapest, 2012.

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztés és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna, MTA doktora
egyetemi tanár
BCE Kertészettudományi Kar
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

témavezetők: Dr. Hegedűs Attila, PhD
egyetemi docens
BCE, Kertészettudományi Kar
Genetika és Növénynevelés
Tanszék

Dr. Pedryc Andrzej, DSc
egyetemi tanár, tanszékvezető
BCE, Kertészettudományi Kar
Genetika és Növénynevelés
Tanszék

A doktori iskola- és a témavezetők jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Dr. Tóth Magdolna

Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Hegedűs Attila

A témavezető jóváhagyása

.....
Dr. Pedryc Andrzej

A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2012. évi június 5.-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Fodor Péter, DSc

Tagjai

Palkovics László, DSc

Szani Zsolt, PhD

Papp István, PhD

Fári Miklós, DSc

Opponensek

Sági László, PhD

Bisztray György Dénes, PhD

Titkár

Halász Júlia, PhD

1	Bevezetés	9
2	Irodalmi áttekintés	11
2.1	Csonthéjas gyümölcsök hazánkban	11
2.2	Oxidánsok és antioxidánsok	12
2.2.1	Oxidánsok	12
2.2.2	A nagymolekulás védelem	14
2.2.3	A kismolekulás védelem	15
2.3	Egészségvédő komponensek	15
2.3.1	Fenolos savak	16
2.3.2	Flavonoidok	18
2.3.2.1	A flavonoidok szerkezete és előfordulása	18
2.3.2.2	A gyümölcsök flavonoidtartalma	23
2.3.2.3	A flavonoidok funkciói	25
2.3.3	Antocianinok	26
2.4	A flavonoidok bioszintézise gyümölcsökben	27
2.4.1	Flavonoid vegyületek bioszintézise	27
2.4.2	A flavonoid-bioszintézis szabályozása	30
2.4.3	Flavonoid-bioszintézis a bogyós gyümölcsökben	32
2.4.4	A flavonoid-bioszintézis fán termő gyümölcsökben	35
2.5	Gyümölcsök flavonoid-bioszintézisének vizsgálati módszerei	38
2.5.1	Az antioxidáns kapacitás jellemzése	38
2.5.1.1	FRAP	39
2.5.1.2	TPC	39
2.5.1.3	TEAC	40
2.5.2	PCR	40
2.5.3	Valós idejű („real-time”) PCR	40
2.5.3.1	A valós idejű és hagyományos PCR összehasonlítása	41
2.5.3.2	A real-time PCR készülékek felépítése	43
2.5.3.3	Abszolút kvantifikálás	44
2.5.3.4	Relatív kvantifikálás	45
2.5.4	Tömegspektrometriás analízis	45
3	Célkitűzések	47
4	Kísérleti anyagok és módszerek	48
4.1	Növényanyag és minta-előkészítés	48
4.1.1	Az érési folyamatot jellemző paraméterek meghatározása	48
4.1.2	DNS-izolálás	49
4.1.3	RNS-izolálás	50
4.1.4	cDNS-szintézis	50
4.1.5	PCR-analízis saját primerekkel	50
4.1.6	A PCR-termékek ellenőrzése gélelektroforézissel	52
4.1.7	A PCR-termékek tisztítása, klónozása és szekvenálása	53
4.2	A valós idejű PCR	54
4.2.1	Gradiens PCR	54
4.2.2	Hígítási mátrix	54
4.2.3	A referenciagén kiválasztása	55
4.2.4	A célgének qPCR vizsgálata	56
4.2.5	Az adatok kiértékelése	58
4.2.6	Adatok illesztése („data pooling”)	60
4.2.7	A genomi DNS szennyeződésének kimutatása	61
4.2.8	A qPCR-reakcióelegy összeállítása	62
4.2.9	A génextpresszió színkódos ábrázolása	63
4.3	Antioxidáns kapacitás mérések	63
4.3.1	Összantioxidáns kapacitás meghatározása (FRAP módszer)	63
4.3.2	Összpolifenoltartalom mérése (TPC módszer)	63

4.3.3	TEAC módszer	64
4.4	Egyedi komponensek mérése LC-MS módszerrel.....	64
4.4.1	Minta-előkészítés.....	65
4.4.2	Kromatográfiás elválasztás.....	65
4.4.3	Tömegspektrometriás analízis	66
4.4.4	Adatok elemzése	66
5	Eredmények	67
5.1	A kajszi érési folyamatának jellemzése	67
5.1.1	Színmérés	67
5.1.2	Méret és tömeg.....	69
5.1.3	Oldható szárazanyag-tartalom.....	69
5.1.4	Antioxidáns kapacitás értékek.....	70
5.2	A meggy érési folyamatának jellemzése	73
5.2.1	Színmérés	73
5.2.2	Méret és tömeg.....	75
5.2.3	Oldható szárazanyag-tartalom.....	76
5.3	RNS-izolálás különböző érettségű kajszi és meggy gyümölcsökből.....	76
5.4	Parciális génszekvenciák meghatározása.....	77
5.5	A valós idejű PCR kísérletek optimalizálása	79
5.5.1	Gradiens PCR.....	79
5.5.2	Hígítási mátrix.....	79
5.5.3	Az optimális referenciagén kiválasztása.....	80
5.5.4	A genomi DNS-szennyeződés hatásának vizsgálata	82
5.6	Valós idejű PCR	84
5.6.1	Az adatok kiértékelése.....	84
5.6.2	A flavonoid gének expressziós vizsgálata kajszi gyümölcsben.....	85
5.6.3	A flavonoid gének expressziós vizsgálata meggy esetében.....	88
5.7	A kajszi gyümölcs egyedi polifenolos komponenseinek kimutatása	91
6	Eredmények megvitatása	94
6.1	A kajszi érési folyamatának jellemzése	94
6.1.1	A gyümölcsök színének változása az érés folyamán.....	94
6.1.2	A gyümölcsök fejlődését mutató egyéb paraméterek változása az egyes fejlődési állapotokban	94
6.1.3	Az antioxidáns kapacitás és összpolicifenol-tartalom változása a gyümölcsfejlődés során	95
6.2	A meggy érési folyamatának jellemzése	96
6.2.1	A gyümölcsök színének változása az érés során	96
6.2.2	A gyümölcsök fejlődését mutató egyéb paraméterek változása az érés során.....	97
6.3	RNS-izolálás kajszi és meggy gyümölcsökből.....	98
6.4	A kajszi és meggy flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítása	99
6.5	A valós idejű PCR kísérletek optimalizálása	101
6.5.1	Gradiens PCR.....	101
6.5.2	Hígítási mátrix.....	101
6.5.3	Az optimális referenciagén kiválasztása.....	101
6.5.4	A genomi DNS-szennyeződés hatásának vizsgálata	102
6.6	A kajszi flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének expressziós vizsgálata	104
6.7	A meggy flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének expressziós vizsgálata	107
6.8	A kajszi néhány polifenolos komponensének azonosítása	109
7	Új tudományos eredmények.....	111
8	Összefoglalás.....	112

9	Summary	114
10	Melléletek.....	116
10.1	Melléklet I. – Irodalomjegyzék	116
10.2	Melléklet II.....	131
10.3	Melléklet III.....	132
11	Köszönetnyilvánítás	133

Rövidítések, jelölések jegyzéke

18S rRNS – 18S riboszómális RNS

4CL – 4-kumaroil-CoA-ligáz

ACT – aktin

ANR – antocianidin-reduktáz

ANS – antocianidin-szintáz

Brix – oldható szárazanyag-tartalom (%)

C3H – *p*-kumarát-3-hidroxiláz

C4H – cinnamát-4-hidroxiláz vagy fahéjsav-4-hidroxiláz

cDNS – „copy” DNS; „copy” dezoxiribonukleinsav

CHI – kalkon-izomeráz

CHS – kalkon-szintáz

CT – kondenzált tannin

C_T – „threshold cycle”, küszöbciklus érték

DFR – dihidroflavonol-4-reduktáz

DNS – dezoxiribonukleinsav

dNTP – dezoxinukleozid-trifoszfát

E – „Efficiency”, azaz a PCR-reakció amplifikációs hatékonysága

EST – „Expressed Sequence Tag”

F3'5'H – flavonoid-3',5'-hidroxiláz

F3'H – flavonoid-3'-hidroxiláz

F3H – flavanon-3-hidroxiláz

FLS – flavonol-szintáz

GAPDH – gliceraldehid-3-P-dehidrogenáz

GC % – guanin-citozin tartalom

GMO – genetikailag módosított organizmus („Genetically Modified Organism”)

HCT – hidroxifahéjsav-transzferáz

HKG – „House Keeping Gene”, azaz „háztartási gén” (referenciagén)

HPLC- „High Performance Liquid Chromatography”, nagyteljesítményű folyadékkromatográfia

LAR – leukoantocianidin-reduktáz

LC – „Liquid Chromatography”, folyadékkromatográfia

MS – „Mass Spectrometer”, tömegspektrométer

NADH – a NAD⁺ (nikotinamid-adenin-dinukleotid) redukált formája

NADPH – a NADP⁺ (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) redukált formája

NCBI BLASTn – „National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment
Search Tool for Nucleotides”

PA – proantocianidin

PAL – fenilalanin-ammónia-liáz

PCR – polimeráz láncreakció

qPCR – kvantitatív polimeráz láncreakció

REST[®] – „Relative Expression Software Tool”

RNS – ribonukleinsav

RP-II – RNS-polimeráz II

T_a – „annealing” vagy tapadási hőmérséklet; primerek templáthoz való kötődése

TAE – Trisz-ecetsav-EDTA

TBE – Trisz-bórsav-EDTA

TEF-II – transzlációs elongációs faktor II

T_m – a kettősszálú DNS olvadási hőmérséklete

UBQ10 – ubikvitin 10

UFGT – UDP glükóz:flavonoid-3-*O*-glükoziltranszferáz

1 Bevezetés

Epidemiológiai tanulmányok sokasága igazolja, hogy az antioxidáns vegyületekben gazdag növényi táplálékok számos degeneratív betegség kialakulását gátolják. A gyümölcsök egészségvédő hatását ma már csonthéjas fajok esetében is egyre jelentősebb mértékben kapcsolják az antioxidáns hatású polifenolos, flavonoid vegyületekhez. A különböző gyümölcsfajok termésére igen eltérő polifenol-összetétel jellemző. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy ugyanazon fajon belül a fajták között is óriási mértékű eltérések mutathatók ki az összes polifenol-tartalomban és antioxidáns kapacitásban. Az egészséges táplálkozás forrásai lehetnek a nagy antioxidáns kapacitású gyümölcsök, melyek funkcionális élelmiszerek előállításához is felhasználhatók. Az antioxidáns kapacitás kialakításához jóllehet számos vegyület (aszcorbinsav, karotinoidok, betalainok stb.) hozzájárul, a polifenolos vegyületek szerepe meghatározónak tűnik.

Növényi szövetekben a polifenolok közé tartozó flavonoidok és fenolos savak kialakulása a fenilpropanoid útvonalhoz kötődik. A bioszintézis során az aromás aminosav, a fenilalanin először fahéjsavvá, majd *p*-kumársavvá és *p*-kumaroil-CoA-vá alakul. Ez utóbbi a sztilbénnek, auronok, ligninek, valamint a fahéjsav- és benzoésav-származékok kiindulási vegyülete. A fahéjsav- és benzoésav-származékok számos gyümölcs antioxidáns kapacitásának döntő hányadát képezik. A flavonoid-bioszintézis útvonal első enzimei katalizálják a *p*-kumaroil-CoA molekula flavonoid alapvázra történő átalakítását. A flavonoid-bioszintézis további enzimei a különböző flavonoidcsoportok kialakítását segítik.

Manapság számos növényfaj – pl. petúnia, szamóca, áfonya, rózsza, szőlő, narancs, alma, körte, őszibarack – flavonoid-bioszintézisét vizsgálják. Dísznövények esetén az antocianin-bioszintézis módosítása óriási gazdasági lehetőségeket rejt magában, mert ilyen módon előállíthatók különleges virágszínű változatok. Erre példa az EU-ban egyedülként termesztésre engedélyezett transzgenikus növény, a kék virágszínű ‘Moonlite’ szegfűfajta. Ehető növények esetében is sor került a karotinoid- vagy flavonoid-bioszintézis útvonal módosítására (pl. aranyrizs, karotinoidtermelő burgonya stb.). Egyes növényfajok – pl. lúdfű, szőlő, alma, őszibarack– teljes genomszekvenciájának meghatározása elősegíti a bioszintézis útvonalak alaposabb megismerését és szabályozásának felderítését. Ugyanakkor más csonthéjas gyümölcsfajok (pl. kajszi és meggy) flavonoid-bioszintézisével kapcsolatos információ munkánk kezdetekor még nem állt rendelkezésre.

A BCE Genetika és Növénynevelés Tanszéken célul tűztük ki a kajszi és a meggy gyümölcsének flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítását és jellemzését. A Tanszék nevelési programja kiterjed olyan kiemelkedően nagy polifenol-tartalommal

rendelkező ígéretes kajszifajták előállítására, melyek számos más agronómiai szempontból (pl. koronaforma, gyümölcsméret, íz, kórokozókkal szembeni ellenállóság stb.) is kedvező tulajdonságokkal rendelkeznek. A Tanszék rendelkezésére álló génbanki anyagok beltartalmi vizsgálatát (antioxidáns kapacitás mérése és polifenolos komponensek azonosítása) a BCE Alkalmazott Kémia Tanszékkal együttműködve végezzük. Magyarország a meggytermesztés és a genetikai tartalékok (tájfajták) szempontjából világviszonylatban is fontos ország. Az elmúlt évtizedekben számos perspektivikus fajtát és fajtajelöltet állítottak elő szelekciós nemesítéssel. Ezek között a nagy antocianintartalmú gyümölcsöt termő fajtáktól, fajtajelöltektől az antocianinban szegény, világos gyümölcsű fajtákig számos változat fellelhető. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy nemcsak a festőlevű, de az antocianinban szegény gyümölcsök antioxidáns kapacitása is kiemelkedő lehet bizonyos fajták esetében.

Egy nemesítési programban bizonyos tulajdonságok (pl. a meggy gyümölcshúsának antocianin-tartalma) öröklődése csak a keresztezés után 4-6 év elteltével válik értékelhetővé. Ennyi időt vesz igénybe, amíg a hibrid magoncokból termőképes fa fejlődik. A számos elérendő agronómiai tulajdonság optimális kombinációja a perspektivikus fajtajelöltekben ráadásul nem ritkán több keresztezést követel, ami igen nagymértékben megnyújtja a fajta-előállítás idejét. Ebben jelentene óriási előrelépést, ha a kívánt tulajdonságokhoz kapcsolt, DNS-alapú markereket sikerülne kifejleszteni. Ezek felhasználásával megvalósítható lenne a markerekre alapozott szelekció (MAS), ami óriási költség- és energiamegtakarítást jelenthet a gyümölcsnemesítő műhelyek számára. Ilyen marker előállításához azonban a flavonoid-bioszintézis út alapos ismerete szükséges.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Csonthéjas gyümölcsök hazánkban

A hazánkban termő legjelentősebb csonthéjas gyümölcsfák a kajszi (*Prunus armeniaca* L.), az őszibarack [*Prunus persica* (L.) Batsch], a cseresznye (*Prunus avium* L.), a meggy (*Prunus cerasus* L.) a szilva (*Prunus domestica* L.), a mandula [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] és a ringló (*Prunus domestica* L. subsp. *italica*). Rendszertanilag a *Rosaceae* család, *Prunoideae* alcsalád *Prunus* L. nemzetségébe tartoznak. Közös jellemzőjük többek között, hogy a gyümölcshússal körülölelt, magot tartalmazó endokarpium a gyümölcs már korai érési fázisában kősejtekből álló, csont keménységű szövetté szilárdul. Valamennyi csonthéjas gyümölcsfajnak számos fajtája ismert.

A kajszi és a meggy termesztése tekintélyes múltra tekint vissza hazánkban. A legtöbb termesztett kajszifajtát a *Prunus armeniaca* L. faj adja. A kajszi származási központja valószínűleg Kína északi, észak-keleti része, míg a meggy géncentruma Nyugat-Anatólia területére tehető (De Candolle, 1894). Hazánk klímájának és földrajzi adottságainak köszönhetően a szintén *Rosaceae* családba tartozó alma (*Malus × domestica*) mellett e két csonthéjas gyümölcs a gazdaságilag legjelentősebb, termesztett gyümölcsfajok közé tartozik. Mint minden gyümölcs, e két gyümölcs fogyasztása is fontos szerepet játszik egészségünk megőrzésében. Igen jelentős a fajták variabilitása beltartalmi értékek szempontjából (Papp és mts., 2010; Hegedűs és mts., 2010; 2011).

A világ kajszitermése évente 3,4 millió tonnára tehető (FAOSTAT, 2010). Az EU országainak évi termésmennyisége 2010-ben 796000 tonna, hazánké 33000 tonna volt (FAOSTAT, 2010). A világ meggytermése közel 1,2 millió tonnára tehető (FAOSTAT, 2010). Ugyanebben az évben az EU országaiban a meggy termése 730000 tonna, hazánkban pedig 52000 tonna volt (FAOSTAT, 2010). Nemzetközileg is elismert, kiváló magyar kajszi- és meggyfajtákat tartunk számon.

A kajszi és meggy gyümölcse frissen és feldolgozva is értékesíthető. Ezen csonthéjas gyümölcsök gazdasági potenciáljának fenntartásához időnként – más és más szempontok alapján nemesített – új fajtajelöltek szükségesek. Ehhez az eddigi szempontok, mint pl. húskeménység a szállíthatóság és eltarthatóság érdekében, íz- és aroma komponensek aránya az élvezeti érték szempontjából, betegségekkel szembeni ellenállóság, koronaforma, a gyümölcs érési ideje, a termékenyülési viszonyok stb. mellett újabb szempontok, mint pl. a beltartalmi értékek figyelembe vétele is szükséges lehet az új, versenyképes fajták előállításakor. Nap mint nap nagyobb teret hódítanak a funkcionális élelmiszerek, melyek igen gyakran gyümölcsalapú készítmények. A kiváló beltartalmi értékekkel rendelkező gyümölcsök nem csupán friss

fogyasztásra alkalmasak, hanem feldolgozásukkal a funkcionális élelmiszerek tárháza is bővíthető.

2.2 Oxidánsok és antioxidánsok

2.2.1 Oxidánsok

Az aerob élőlények számára nélkülözhetetlen elem az oxigén, amely szinte minden molekula, vegyület felépítésében és anyagcsere-folyamatában részt vesz. Paradox módon léteznek olyan származékai, melyek minden, az élő szervezet felépítésében részt vevő molekulára, sejtre vagy akár szövetre káros hatással vannak. Ezen vegyületeket reaktív oxigénszármazékoknak vagy aktív oxigénformáknak (AOF) nevezzük. Az oxigénalapú szabadgyökök mellett a nitrogénalapú szabadgyökök (pl. nitrogén-monoxid) is részt vesznek különféle biológiai reakciókban és folyamatokban.

A természetben előforduló atomok és molekulák páros számú elektront tartalmaznak. Ezen atomok és molekulák stabilak, alkotóelemként szolgálnak a makromolekulák számára. Egyes biológiai folyamatok során azonban rövid életidejű, reaktív molekulák keletkeznek. A párosítatlan elektronnal rendelkező molekulákat szabadgyököknek nevezzük. A szabadgyökök a páros elektronállapot visszaállítására törekednek. Így a keletkezési helyükhöz közel más molekulákat támadnak meg, és azoktól elektront elvonva saját stabil állapotuk kialakítására törekednek. Ekkor a szabadgyökök elvesztik reaktivitásukat, de az elektrondonor molekula oxidálódik. A molekulák, melyek ilyen veszélyeknek vannak kitéve, bármilyen biomolekulák lehetnek: lipidek, szénhidrátok, fehérjék vagy a DNS. Egy káros, elektronelevonással járó gyökös reakció láncreakcióként számtalan reaktív szabadgyök kialakítását eredményezheti (pl. a lipidperoxidáció során) (Szabó, 2006; Wei és Lee, 2002).

Az oxidánsok lehetnek – elektronállapotukat tekintve – stabilabb vegyületek (pl. H_2O_2), vagy instabil szabadgyökök. A szabadgyökök lehetnek oxigén- vagy nitrogénalapúak. Az oxigénalapúak közé tartozik a szuperoxidgyök (O_2^{\bullet}) és a hidroxilgyök (HO^{\bullet}). A szuperoxidgyök többek között a mitokondriális légzési lánc során részlegesen redukálódott oxigénmolekulából származhat. A hidroxilgyökök keletkezése elsősorban a Fenton-reakció útján valósul meg, forrása legfőképpen a szövetekben lejátszódó gyulladáshoz kapcsolódó reakció (Szabó, 2006). A nitrogénalapú szabadgyökök legfontosabb képviselője a nitrogén-monoxid szabadgyök (NO).

Ezen gyökök mellett léteznek olyan oxidánsok, melyek felépítésüket, reaktivitásukat és hatásmechanizmusukat tekintve nagyon hasonlítanak a szabadgyökökre, mégsem rendelkeznek párosítatlan elektronnal. Ilyen vegyületek többek között a gerjesztett szinglet oxigén (1O_2) (parallel spin állapotú elektronok), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hipoklórossav (HClO) és a

peroxi-nitrit (ONOO^-), melyek prekuzorként szolgálnak a szabadgyökök keletkezése során (Szabó, 2006; Benz és Yau, 2008; Aruoma, 1998; Morgenstern, 2004).

Az élő szervezetekben a szabadgyökök termelődése természetes folyamat. A képződő szabadgyökök különböző szabályozási mechanizmusokban és a patogének elleni védelemben vesznek részt. Mind teljes hiányuk, mind fokozott termelődésük ártalmas. A növényi és állati szervezetekben a szabadgyök-termelő és az azokat semlegesítő mechanizmusok ideális esetben egyensúlyban vannak. Túlzott oxidánsbevitel vagy -termelődés (*oxidative burst*) az egyensúly felborulásához, oxidatív stressz kialakulásához vezet. Az idősebb szervezet kevésbé képes ezen egyensúly felborulását kivédeni.

A károsító szabadgyökök igen változatos, külső vagy belső forrásokból származhatnak. A külső forrásból érkező vagy külső tényezők hatására keletkező szabadgyökök aránya megemelkedett a XXI. sz.-i életmód és fogyasztói társadalom kialakulásával. Közéjük tartoznak az UV-sugárzás, ózon, ionizáló sugárzások, egyes élelmiszerek, egyes vegyszerek, oxidálószerke, kipufogógáz, dohányzás, stressz stb. Az emberi táplálékkal bevitt oxidánsok közé tartoznak az aflatoxin, nitrátok, nitritek, heterociklusos aminok, policiklusos aromás szénhidrogének és az alkohol (Arteel, 2008).

A belső forrásokból származó szabadgyökök létrejöhetnek enzimatis vagy nem enzimatis úton. A növényi, állati és humán szervezetekben számos enzim (xantin-oxidáz, lipoxigenáz, ciklooxigenáz, citokró P-450 monooxigenáz, dopamin- β -hidroxiláz, D-aminosav-oxidáz, húgysav-oxidáz stb.) képes szuperoxidgyökök termelésére. A képződött gyökök káros hatását a szervezet gyakran ki is használja; egyes fehérvérsejtek (neutrofil granulociták) szabadgyökképző tulajdonsággal rendelkeznek, mely folyamat jelentős szerepet játszik a szervezet idegen kórokozók elleni védelmében (Szabó, 2006). Az enzimatis szabadgyöktermelő folyamatok közé tartozik az arachidonsav-metabolizmus (Singh és mts., 1981; Caccese és mts., 2000), míg a mitokondriális oxidatív foszforiláció (Cadenas és Davies, 2000; Turrens, 2003), vagy növények esetében a kloroplasztisban zajló fotoszintézis (Härtel és mts., 1992) nem enzimatis szabadgyöktermelő folyamatok. A mitokondriumban a légzési elektrontranszport közel 1-4 %-os, a fotoszintézis 10-25 %-os hatékonysággal termel szabadgyököket (Alscher és mts., 1997; Elstner, 1982). Ez a folyamat természetesen sokkal összetettebb, függ a sejtek és a szervezet korától, a különböző betegségektől, fiziológiai állapotoktól. Az aerob élőlények legáltalánosabb és leghatékonyabb energiatermelő mechanizmusa a biológiai oxidáció. A glikolízis, citromsavciklus és terminális oxidáció folyamata végeredményben ATP-t termel. Fokozott energiaigény, vagyis fokozott mitokondriális tevékenység esetén, vagy spontán módon előfordul, hogy az oxigénmolekula részlegesen

(legtöbbször egyszeresen) redukálódik elektron felvételével, így szuperoxid anion szabadgyök keletkezik (Bókkon és Salari, 2010; Dröge, 2002; Elstner, 1982; Hegedűs, 2002).

A szervezetben keletkező szabadgyökök közvetlenül a biomolekulákra fejtik ki káros hatásukat; az egyes aminosavak közötti szulfhidril-kötés bontásával enzimfehérjék veszítik el aktivitásukat vagy struktúrfehérjék változtatják meg konformációjukat, lipidperoxidációt okoznak, szénhidrátok szerkezetét módosítják, vagy a DNS-láncban okozhatnak mutációkat (Dröge, 2002; Hegedűs, 2002).

Oxidatív stressz által a szív- és érrendszerben bekövetkező betegségek közé tartozik többek között az érlemezésedés („atherosclerosis”) (Wu és mts., 2004). A fejlett országokban világszerte a keringési betegségekből eredő halálozások száma a legnagyobb. A világon hetente közel 50 000 ember veszíti el életét szív- és érrendszeri megbetegedésekben, mely esetek 90 %-át az érlemezésedés okozza. Magyarországra vonatkozó statisztika szerint hazánk az elsők között van a szív- és érrendszeri megbetegedések okozta halálozások tekintetében, évente közel 65 000 fő válik e betegség áldozatává (Hegedűs, 2007). Sajnálatos módon a daganatos megbetegedések és számos más betegség kialakulása és mortalitása tekintetében is az élvonalba tartozik hazánk az európai országok között. Napjainkban számtalan tudományos közlemény lát napvilágot arról, hogy a fenti betegségek kialakulásában jelentős szerepe van a szabadgyököknek (Bonomini és mts., 2008; Valko és mts., 2006).

2.2.2 A nagymolekulás védelem

Az evolúció során az élő szervezetek különféle védekező mechanizmusokat fejlesztettek ki az őket érő oxidatív támadások leküzdése érdekében. Mind a növényi, mind az állati és humán szervezetek két fő védekező rendszerrel rendelkeznek: a nagy molekulák és kis molekulák alkotta rendszerekkel. Az utóbbihoz a humán szervezet külső forrásból (pl. növények) jut hozzá. A nagymolekulák alkotta rendszert a szervezet saját enzimrendszere képezi, mely képes átalakítani, ártalmatlanítani az oxidánsokat. A kismolekulás védekező rendszer elemei közé tartoznak a vitaminok és más gyökfogó vegyületek.

Az élő szervezetekben a fotoszintézis és az aerob légzés stb. során reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok termelődnek. A szuperoxidgyököket a szuperoxid-dizmutáz enzim (SOD) – mint a szervezet enzimatisz védelmi rendszerének első tagja – képes hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) redukálni. A Fenton- vagy a Haber-Weiss reakciók során a hidrogén-peroxid bomlása megy végbe, ami a rendkívül reaktív hidroxilgyök keletkezéséhez vezet. Ez ellen nincs közvetlen enzimatisz védelem. Védekezésképpen annak prekursorát, a hidrogén-peroxidot bontjuk el, így csökkentve a hidroxilgyökök képződésének lehetőségét. A humán szervezetben a hidrogén-

peroxid bontására a kataláz és a glutation-peroxidáz enzimek alkalmasak, míg növényi sejtekben a kataláz mellett elsősorban az aszkorbinsav-peroxidáznak van szerepe (Gaetani és mts. 1989; Yamazaki és Lawrence, 1961).

2.2.3 A kismolekulás védelem

A kismolekulás védekező rendszer elemeit az endogén, nem enzimatis antioxiidánsok, valamint az exogén antioxiidánsok alkotják. Az endogén antioxiidánsokat képes, az exogén antioxiidánsokat nem képes a szervezet maga előállítani. Ez utóbbiak külső forrásból jutnak a szervezetbe. Az endogén, nem enzimatis antioxiidánsok közé tartoznak a redukált glutation (GHS), a mitokondriális koenzim-Q, a liponsav stb. A sejten kívüli térben a Cu^{2+} -kötő cöroloplazmin, a Fe^{2+} -kötő transzferrin, a piruvát, az albumin, a húgysav (a purinok lebontásának végterméke), a bilirubin (a hemoglobin lebontásából) bírnak antioxiidáns hatással. A fémionkötő fehérjék a Fenton-reakció gátlásával vesznek részt az antioxiidáns rendszerben. Exogén antioxiidánsok a vitaminok (A-, C- és E-vitamin), az A-vitamin provitaminja, a béta-karotin, tiol-tartalmú (szulfhidril-csoportot tartalmazó) vegyületek (pl. cisztein), a flavonoidok, a fenolsavak és azok származékai, a galluszsav, az ubikinon stb. A különböző ásványi anyagok és nyomelemek – pl. Mg, Se, Zn, Mn, Cu – közvetlenül nem rendelkeznek antioxiidáns tulajdonsággal, de kofaktorként nélkülözhetetlenek az antioxiidáns enzimrendszer működéséhez.

2.3 Egészségvédő komponensek

Az utóbbi tíz évben a tudomány és az élelmiszeripar egyre nagyobb érdeklődéssel fordult a polifenolok felé. Ezen érdeklődés legfőbb oka a polifenolok antioxiidáns tulajdonságában rejlik, valamint számos, oxidatív stresszel összefüggésbe hozható betegség (pl. a daganatos, szív-, ér- és idegrendszeri megbetegedések) megelőzésében nyújtott, feltételezett szerepében. Több ezer különböző szerkezetű polifenolos vegyületet azonosítottak már a növényvilágban, melyek közül több százat ehető növények termelnek (Manach és mts., 2004).

A humán és állati szervezetek számára egészségvédő tulajdonságokkal rendelkező komponensek közé leggyakrabban a vitaminokat, szerves savakat és a különböző fenolos, polifenolos vegyületeket, a karotinoidokat és a betalainokat sorolják. A fenolos vegyületek egy vagy több hidroxilcsoportot tartalmazó, aromás gyűrűvel rendelkező molekulák. A hidroxilcsoportok közvetlenül az aromás gyűrűhöz kapcsolódnak. Ezen hidroxilcsoportokon keresztül kapcsolódhatnak a molekulához különböző konjugátumok, melyek rendkívül nagy variabilitást mutatnak. A polifenolos vegyületek közé tartoznak az egyszerű fenolok, fahéjsav- és benzoésav származékok, fenilpropanoidok, kumársavak, flavonoidok, sztilbének, lignánok,

ligninek, szuberinek egyes alkotói, tanninok stb. Ezenfelül az egyes polifenolokhoz más polifenolok, szénhidrátok vagy szerves savak is kapcsolódhatnak, növelve ezzel a polifenolos vegyületek változatosságát (Manach és mts., 2004; Shahidi és Naczk, 2004).

A polifenolos vegyületek a növényi másodlagos anyagcsere termékei, amelyek fenilalaninból és bizonyos növények esetén tirozinból képződnek (Shahidi és Naczk, 2004). A fenolos vegyületek fontos szerepet játszanak a különböző növényi szövetek színeződésében, rendelkezhetnek antibiotikus, természetes peszticid, a megporzó rovarokat csalogató, vagy ultraibolya (UV) sugárzással szembeni védőhatással (Shahidi és Naczk, 2004; Winkel-Shirley, 2001). Egyes fenolos vegyületek a növények szerkezeti stabilitásában vesznek részt, vagy szigetelőanyagok, melyek a víz és gázok számára teszik imperemábilissá a sejtfalat (Shahidi és Naczk, 2004).

A polifenolos vegyületek sokrétű szerepet töltenek be a növényvilágban, melyek általában stresszfolyamatok hatására, saját szervezetük védelme érdekében termelődnek. A humán és állati szervezetek elsősorban növényi táplálékokon keresztül jutnak polifenolos vegyületekhez, melyek egészségvédő komponensekként funkcionálnak, vagyis részt vesznek a humán és állati szervezetek egészségének megőrzésében. A fenolos savakat, a flavonoidokat és az antocianinokat a következő fejezetekben mutatom be. A sztilbének közül a rezveratrol a legismertebb vegyület, mely a kékszőlő, így a vörösbor antioxidáns kapacitását növeli (Frémont és mts., 1999).

Különböző szerves savakat is egészségvédő komponensként tartanak számon. A fent említett polifenolos vegyületeken kívül számos antioxidáns vegyület vehet részt a gyümölcsök antioxidáns kapacitásának kialakításában. Ilyenek többek között a melatonin (Reiter és mts., 2001; 2003), a perillil-alkohol és az ellágsav (Wang és mts., 1998).

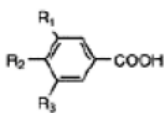
2.3.1 Fenolos savak

A fenolos savak közé tartoznak a fahéjsav és származékai, a benzoesav és származékai, valamint az egyszerű fenolok. E vegyületeket a növényi szervezetek a fenilpropanoid anyagcsere-útvonalon keresztül képesek előállítani. A kiindulási molekula leggyakrabban az aromás gyűrűvel rendelkező fenilalanin, vagy egyes növények (pl. fűfélék) esetén a tirozin (Shahidi és Naczk, 2004). Fenilalanin esetén a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL; EC 4.3.1.24), tirozin esetén a tirozin-ammónia-liáz (TAL; EC 4.3.1.23) eliminálja az aminocsoportot. A PAL enzim által kialakult *transz*-fahéjsav hidroxilációját a fahéjsav-4-hidroxiláz (C4H; EC 1.14.13.11) enzim végzi el, melynek következtében *p*-kumársav keletkezik.

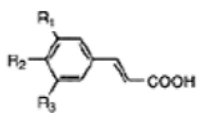
A tirozin TAL enzim általi dezaminálásával szintén *p*-kumársav keletkezik. A *transz*-fahéjsav, valamint a *p*-kumársav molekula két szénatommal való rövidítése benzoesav, valamint

p-hidroxi-benzoésav molekulák keletkezését eredményezi, melyek a benzoésav-származékok prekursorai. A *p*-hidroxi-benzoésav oldalláncának további rövidítése, vagyis a karboxilcsoport eliminálása fenolt eredményez. A benzoésav, valamint a *transz*-fahéjsav molekulák módosításával (hidroxiláció, metiláció) a növényi szervezetek fahéjsav- és benzoésav-származékokat állítanak elő. A benzoésav-származékok közé tartoznak a protokatechusav, vanilinsav, sziringinsav és galluszsav (Shahidi és Naczk, 2004). A fahéjsav-származékok közé tartoznak a *p*-kumársav, kávésav, ferulasav és mustársav. A főbb fenolos savak szerkezetét az **1.** és **2. táblázatok** mutatják.

1. táblázat. A főbb benzoésav-származékok szerkezete

		R ₁	R ₂	R ₃
benzoésav		H	H	H
<i>p</i> -hidroxi-benzoésav	4-hidroxi-benzoésav	H	OH	H
protokatechusav	3,4-dihidroxi-benzoésav	OH	OH	H
vanilinsav	4-hidroxi-3-metoxi-benzoésav	OCH ₃	OH	H
sziringinsav	4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoésav	OCH ₃	OH	OCH ₃
galluszsav	3,4,5-trihidroxi-benzoésav	OH	OH	OH

2. táblázat. A főbb fahéjsav-származékok szerkezete

		R ₁	R ₂	R ₃
fahéjsav		H	H	H
<i>p</i> -kumársav	4-hidroxi-fahéjsav	H	OH	H
kávésav	3,4-dihidroxi-fahéjsav	OH	OH	H
ferulasav	4-hidroxi-3-metoxi-fahéjsav	OCH ₃	OH	H
mustársav	4-hidroxi-3,5-dimetoxi-fahéjsav	OCH ₃	OH	OCH ₃

A *p*-kumársavra a 4-kumaroil-CoA-ligáz (4CL) enzim egy CoA-csoportot kapcsol, mely reakció révén *p*-kumaroil-CoA molekula keletkezik. Ez utóbbi molekula – a hidroxifahéjsav-transzferáz (HCT) enzim segítségével – kinasavval történő konjugáció révén *p*-kumaroil-

kinasavvá alakulhat. A *p*-kumaroil-kinasav *p*-kumarát-3-hidroxiláz (C3H) enzim általi hidroxilációja klorogénsavat eredményez. A klorogénsav keletkezésének egy másik lehetséges módja a kinasav kávéssavval való kondenzációja (Manach és mts., 2004). A klorogénsav és származékai antioxidáns tulajdonságokkal rendelkeznek (Shahidi és Naczk, 2004). Klorogénsavat számos növény termel, többek között a kávé tartalmazza nagy mennyiségben; egy csésze kávé 70-350 mg-ot (Clifford, 1999).

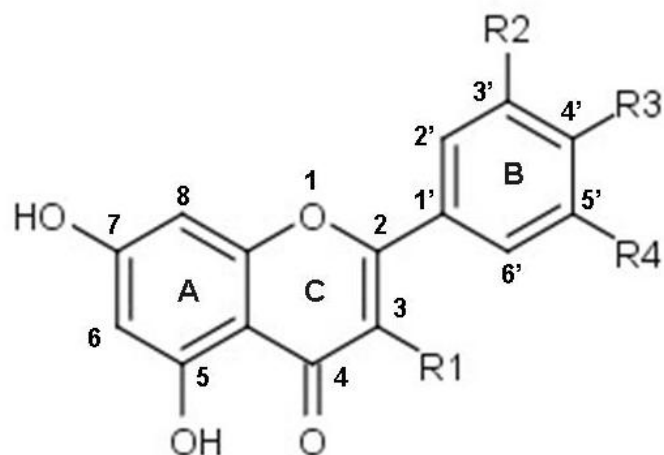
A hidroxi-benzoésav-származékok mennyisége az ehető növényekben általában kevés, néhány piros színű gyümölcstől, vörösrétektől és hagymától eltekintve (Shahidi és Naczk, 1995). A tealevél galluszsav-tartalma 4,5 g/kg friss tömeg is lehet. A benzoésav-származékoknál a fahéjsav-származékok elterjedtebbek a növényvilágban (Manach és mts., 2004).

2.3.2 Flavonoidok

A flavonoidok olyan polifenolos vegyületek, melyek alapvető szerepet töltenek be a növényi sejtek védelmében. A természetes forrásokból, vagyis zöldségekből és gyümölcsökből származó flavonoidok ugyanakkor sokrétű és előnyös hatást gyakorolnak az emberi szervezetre. Szent-Györgyi és munkatársai már 1936-ban felismerték a flavonoidok azon előnyös tulajdonságát, hogy csökkentik az érfalak, a kapillárisok falának átteresztőképességét, vagyis permeabilitását (Rusznayk és Szent-Györgyi, 1936). E felismerést követően P-vitaminnak nevezték el őket, valamint C2-vitaminnak, mivel számos flavonoid képes stabilizálni a C-vitamint. A későbbiekben a flavonoidok vitamintermészete nem igazolódott, így korábbi neveiket az 50-es években eltörölték. A 70-es években az egyik leggyakoribb növényi flavonoid, a kvercetin bizonyos körülmények között mutagén hatásának bizonyult. Ennek kivizsgálására később számos kísérletet végeztek, mégsem sikerült a flavonoidok karcinogén hatását igazolni. Manapság már tényként kezeljük, hogy szerepük a betegségek megelőzésében és az egészség megőrzésében bizonyos (Hollman és Katan, 1999; Lugasi, 2000; Perez-Vizcaino és Duarte, 2010).

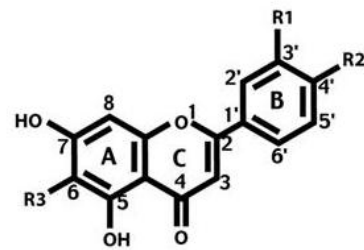
2.3.2.1 A flavonoidok szerkezete és előfordulása

A flavonoidokra a C₆-C₃-C₆ difenilpropán alapváz jellemző. A két benzolgyűrű (A és B) a C gyűrűn keresztül kapcsolódik. A C gyűrű egy oxigénatomot tartalmazó heterociklusos pirán- vagy pirongyűrű (**1. ábra**). Az alapváz ezen elrendezése rendkívüli változatosságot biztosít, jelenleg közel 4000 különböző szerkezetű flavonoid ismeretes (Lugasi, 2000).

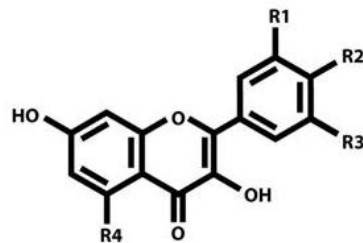


1. ábra. A flavonoidok alapszerkezete.

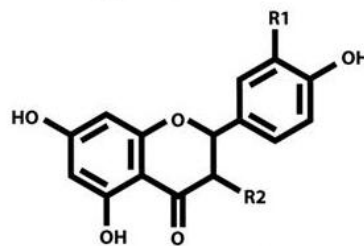
A legtöbb flavonoid természetes körülmények között glikozilált formában fordul elő, általában vízoldható, és a növényi sejtek vakuólumaiban halmozódik fel (Bohm, 1999; Seigler, 1998). A flavonoid-glikozidok cukor részét a D-apóz, D-arabinóz, D-galaktóz, D-glükóz, D-glükuronsav és D-ramnóz, vagy ezek kombinációja alkotja (Shahidi és Naczk, 2004). A legjelentősebb flavonoidcsoportok közé tartoznak a flavonok, flavonolok, flavanonok, flavanonolok, flavanolok, flavan-3-olok, antocianidinek és az izoflavonoidok (**2. ábra**).



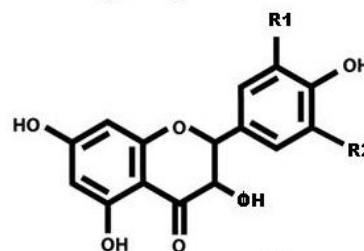
Flavon	R1	R2	R3
apigenin	H	OH	H
luteolin	OH	OH	H



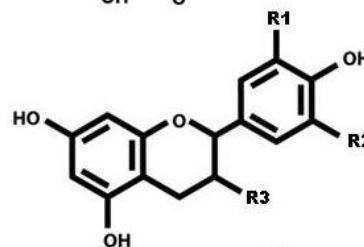
Flavonol	R1	R2	R3	R4
fizetin	OH	OH	H	H
galangin	H	H	H	OH
kvercetin	OH	OH	H	OH
kempferol	H	OH	H	OH
miricetin	OH	OH	OH	OH
izorhamnetin	H	OH	OCH ₃	OH



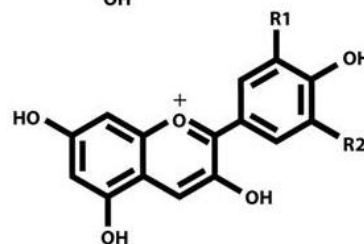
Flavanon	R1	R2
eriodiktiol	OH	H
naringenin	H	H
taxifolin	OH	OH



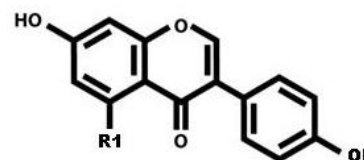
Flavanonol (3-OH flavanon)	R1	R2
dihidro Kempferol	H	H
dihidro kvercetin	H	OH
dihidromiricetin	OH	OH



Flavanol	R1	R2	R3
(+) katechin	OH	H	OH
(-) epikatechin	H	OH	OH
(+) gallokatechin	OH	OH	OH



Antocianidin	R1	R2
cianidin	OH	H
malvidin	OCH ₃	OCH ₃
peonidin	OCH ₃	H
pelargonidin	H	H



Izoflavon	R1
daidzein	H
genisztein	OH

2. ábra. Flavonoid csoportok és azok legfőbb tagjai (Hanneken és mts., 2006 alapján, átszerkesztve és kiegészítve).

Flavonok: Fémionokkal képzett komplexeik egyes növényi szövetek színének, és gyakran ízének kialakításában játszanak szerepet. Leggyakrabban gabonafélékben, gyógy- és fűszernövényekben (kakukkfű, rozmaring), zöldségfélékben (petrezselyem, zeller), valamint citrusfélék héjában fordulnak elő. Legismertebb flavonok az apigenin és a luteolin (Lugasi, 2000; Manach és mts., 2004).

Flavonolok: Általánosan elterjedtek a gyümölcsökben, zöldségfélék leveleiben. A legismertebb flavonolok a kvercetin és a kempferol. Elsősorban a gyümölcs napsugárzásnak kitett szöveteiben, azon belül is a felsőbb rétegekben akumulálódnak (Lugasi, 2000; Herrman, 1988; Lakhanpal és Rai, 2007; Shahidi és Naczk, 2004). Ezért egy adott fán termő gyümölcsök flavonoltartalma is eltérő lehet. Legfőbb flavonolforrások az áfonya, a brokkoli, a fodorkel és a hagyma. A vörösbor és a tea szintén tartalmaz flavonolokat. A természetben leggyakrabban nem szabad formában fordulnak elő, hanem cukormolekulák (pl. D-arabinóz, D-galaktóz, D-glükóz, D-ramnóz, D-xilóz) vagy cukorsavak (D-glükuronsav stb.) kapcsolódnak hozzájuk. A vöröshagyma flavonoltartalma 350-1200 g, a kajszi miricetintartalma 25-50 mg egy kg friss tömegre vonatkoztatva (Manach és mts., 2004).

Flavanonok: A flavanonok elsősorban a citrusfélékben szintetizálódnak, leginkább glikozidos formában találhatóak meg. A legfőbb aglikonok a grapefruitban található naringenin, a narancsban található heszperetin (glikozidja a heszperidin) és a citromban található eriodiktiol. A grapefruit keserű ízét a naringenin okozza. A naringenin aglikonra épülő diszacharid eredményezi a naringint, mely keserűbb a naringeninénél. A citrusféléken kívül a paradicsom, csicseriborsó, kömény, bors, berkenye és az édesgyökér tartalmaz flavanonokat nagyobb mennyiségben. A narancslé heszperidintartalma 215-685 mg, a grapefruit heszperidintartalma 100-650 mg/kg friss tömeg (Lugasi, 2000; Manach és mts., 2004).

Flavanonol (3-OH flavanon): A 3-OH flavanon vagy dihidroflavanon-glikozidok fungisztikus (gátolják a gombák növekedését) és gombaölő hatással rendelkeznek. Valószínűleg ez magyarázza a flavanonol-glikozidok előfordulását bizonyos gyümölcsök héjában. A csoport legfőbb képviselői a dihidrokempferol, a dihidrokvercetin (taxifolin) és a dihidromiricetin (Manach és mts., 2004).

Flavanolok (flavan-3-ol): A legegyszerűbb flavanolok a katechin és az epikatechin. Gyakran polimerek formájában fordulnak elő. A katechin, az epikatechin polimerjei, valamint a hozzájuk kapcsolódó fahéjsav és galluszav alkotják a kondenzált tanninokat. Legfőbb forrásai az

alma, a feketeribizli, az áfonya, a szőlő, a kajszi és a szamóca. Legjelentősebb flavan-3-ol-forrásnak a zöld és fekete teák tekinthetők. A kajszigyümölcs átlagosan 100-250 mg, a cseresznye 50-220 mg, az őszibarack 50-140 mg katechint tartalmaz 1 kg friss tömegre vonatkoztatva (Lugasi, 2000; Manach és mts., 2004).

Antocianidinek: A pigmentként is szolgáló antocianinok (vagy antociánok) az antocianidinek glikozidjai. Alapvázuk a flavilium kation. A flavonoid alapváz negyedik szénatomjáról hiányzik a karbonilcsoport, így a katechinekkel együtt nevezzük őket flavanoknak, mely csoportba a flavan-3-olok és flavan-3,4-diolok tartoznak (**3. ábra**). A növényekből közel 200 különböző antocianint sikerült izolálni (Shahidi és Naczk, 2004).

Izoflavonoidok: A flavonoidokra az 1,3-difenilpropán alapváz jellemző. Ezzel szemben az izoflavonoidok 1,2-difenilpropán elrendezést mutatnak. Más flavonoidokra is jellemző kedvező élettani hatásai mellett manapság nagy figyelem irányul az izoflavonoidok ösztrogénhatására. Legfőbb izoflavonoidok a daidzein és a genisztein. Elsősorban hüvelyes növényekben (*Fabaceae*) fordulnak elő, pl. szójababban, babban és borsóban. A szójababban 580-3800 mg izoflavonoidot tartalmaz 1 kg friss tömegre vonatkoztatva (Lugasi, 2000; Manach és mts., 2004).

A flavonoidok forrása a növényi táplálékok, elsősorban a gyümölcsök és zöldségfélék. Egyes növényi élelmiszerek összes polifenol-tartalmát a **3. táblázat** tartalmazza mg/kg friss tömeg értékekben.

3. táblázat. Egyes növényi élelmiszerek összes polifenol-tartalma (mg/kg) (Lugasi, 2000 és Manach és mts., 2004 alapján)

Élelmiszer	Összes polifenol-tartalom (mg/kg)
fekete ribiszke	1400 - 12000
bodzabogyó	5680
lóbab	1750 - 5900
szőlő	500 - 4900
vörösbor	1000 - 4000
alma	270 - 2980
cirok	600 - 1700
szilva	1260
narancs	500-1000
zöldtea	583

2.3.2.2 A gyümölcsök flavonoidtartalma

Egy magyarországi felmérés alapján a vizsgált gyümölcsök összes flavonoidtartalma 0 és 100 mg/100 g friss tömeg értékek között változott. Az átlagos koncentráció hozzávetőleg 3 mg/100 g volt friss tömegre vonatkoztatva (Lugasi és Hóvári, 2002). Az ugyanazon fajhoz tartozó különböző fajták gyümölcsének antioxidáns kapacitásában és az antioxidáns hatású vegyületek mennyiségében olykor 2-20-szoros különbségek is kimutathatók (Ercisli és mts., 2008; Hegedűs és mts., 2008; 2010; Papp és mts., 2010; Ruiz és mts., 2005a,b).

A szőlőben a vízoldható polifenolos vegyületek legnagyobb részét a flavonoidok képezik (Conde és mts., 2007). A szőlő gyümölcsében és magjában leggyakrabban előforduló polifenolok a tanninok, antocianinok, flavan-3-olok és flavonolok csoportjaiba tartoznak (Adams, 2006). A *Ribes*, *Rubus*, *Vaccinium* és *Vitis* nemzetségeken belül az egyes flavonoid vegyületek jelenlétét kemotaxonómiai szempontból is vizsgálták (Andersen és Antho, 1987; de Ancos és mts., 2000; Goldberg és mts., 1998; Jennings és Carmichael, 1980; Kalt és mts., 2001). A *Vaccinium* fajok gyümölcseiben a kvercetin flavonol és a cianidin antocianidin található meg legnagyobb mennyiségben. A miricetin flavonol és a delfinidinből származó antocianinok, nevezetesen a malvidin és peonidin glükozidjai, szintén megtalálhatók számos *Vaccinium* nemzetségbe tartozó faj gyümölcsében (Hakkinen és mts., 1999; Macheix és mts., 1990).

A közelmúltban meghatározták a legfőbb antioxidáns hatású vegyületek átlagos koncentrációját hat különböző almafajta gyümölcsében. A vizsgált fajták átlagosan 13,2 mg/100 g friss gyümölcs kvercetin-glikozidot, 12,8 mg/100g C-vitamint, 9,35 mg/100 g procianidin B-t, 9,02 mg/100 g klorogénsavat, 8,65 mg/100 g epikatechint és 5,59 mg/100 g floretin-glikozidot tartalmaztak (Lee és mts., 2003).

A fehér és sárga gyümölcshúsú őszibarackok karotinoidtartalma jelentős mértékű különbséget mutatott, de a polifenolos vegyületek közel azonos mennyiségben halmozódtak fel a gyümölcsökben (Gil és mts., 2002). A nektarin és molyhos őszibarack fő fenolos vegyületei között a hidroxicinnamátok, proantocianidinek, flavonolok és antocianinok mutathatók ki (Tomás-Barberán és mts., 2001; Veberic és Stampar, 2005). Kajsziiban a klorogénsav mellett neoklorogénsav, proantocianidinek, illetve kvercetin- és kempferol-glikozidok található nagyobb mennyiségben (Ruiz és mts., 2005a; Veberic és Stampar, 2005).

Az **4. táblázat** a kajszi flavonoid- és fahéjsavszármazék-tartalmára vonatkozó adatait mutatja be. Az értékek a Phenol-Explorer adatbázis kajszi gyümölcsre vonatkozó (http://www.phenol-explorer.eu/contents/total?food_id=55) adatai.

A komponensek koncentrációját egy vagy több publikációban közölt adat alapján tüntettük fel, a forrásmegjelölés a táblázat jobb oldali oszlopában található. A koncentrációadatok átlag, minimum és maximum értékei szerepelnek.

A piros fedőszínnel borított gyümölcsök héjában cianidin-glikozidokat is kimutattak. Ezzel szemben a meggy gyümölcsében az antocianinok a legjelentősebb antioxidáns hatású vegyületek közé tartoznak (Bonerz és mts., 2007; Chaovanalikit és Wrolstad, 2004; Ficzek és mts., 2011), de más flavonoidok és az ellágsav is jelentős mennyiségben fordulnak elő (Wang és mts., 1998).

4. táblázat. A kajszi gyümölcsében található néhány flavonoid és hidroxifahéjsav-származék komponens mennyisége (mg/kg friss tömeg, a Phenol-Explorer adatbázis alapján)

Flavonoidok		átlag (mg/kg)	min (mg/kg)	max (mg/kg)	hivatkozások
Flavanolok	(+)-katechin	35,2	3,1	66,2	Dragovic-Uzelac és mts., 2005, Pascual-Teresa és mts., 2000, Arts és mts., 2000
	(-)-epikatechin	41,9	0,2	82,8	Dragovic-Uzelac és mts., 2005, Pascual-Teresa és mts., 2000, Arts és mts., 2000
	procianidin dimer B1	0,9	0,9	0,9	Pascual-Teresa és mts., 2000
	procianidin dimer B3	0,5	0,5	0,5	Pascual-Teresa és mts., 2000
	procianidin dimer B7	0,1	0,1	0,1	Pascual-Teresa és mts., 2000
	procianidin trimer EEC	0,1	0,1	0,1	Pascual-Teresa és mts., 2000
Flavonolok	kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (rutin)	11,9	2,4	2,63	Dragovic-Uzelac és mts., 2005, Garcia-Viguera és mts., 1994
	kempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	5,2	0,1	28,1	Dragovic-Uzelac és mts., 2005, Garcia-Viguera és mts., 1994
Fenolos savak					
Hidroxi-fahéjsav-származékok	<i>p</i> -kumársav	6,9	0,0	21,8	Dragovic-Uzelac és mts., 2005, Moeller és Herrmann, 1983
	5- <i>p</i> -kumaroil-kinasav	0,6	0,0	3,0	Moeller és Herrmann, 1983
	kávésav	6,6	0,0	27,2	Dragovic-Uzelac és mts., 2005, Moeller és Herrmann, 1983
	ferulasav	2,0	0,0	7,0	Dragovic-Uzelac és mts., 2005, Moeller és Herrmann, 1983
	neoklorogénsav (3-kaffeoil-kinasav)	53,8	26,0	78,0	Moeller és Herrmann, 1983
	klorogénsav (5-kaffeoil-kinasav)	33,6	3,0	103,0	Dragovic-Uzelac és mts., 2005, Garcia-Viguera és mts., 1994, Moeller és Herrmann, 1983
	3- <i>p</i> -kumaroil-kinasav	3,8	2,0	7,0	Moeller és Herrmann, 1983
	5-feruloil-kinasav	0,4	0,0	2,0	Moeller és Herrmann, 1983
	3-feruloil-kinasav	6,0	4,0	12,0	Moeller és Herrmann, 1983

Almában, kiviben (*Actinidia deliciosa*) és citromban (*Citrus × limon*) a lutein aglikon koncentrációja 2 mg/100 g volt (Lugasi és Hóvári, 2002). A miricetin kimutatható volt ribizliben (*Ribes rubrum*), míg néhány más bogyós gyümölcsben (faeper 45,3 mg/100 g friss tömeg, málna 54,0 mg/100 g, szeder 63,6 mg/100 g, szamóca 99,4 mg/100 g) és dióban (456,5 mg/100 g) jelentős mennyiségben fordult elő. Kempferolt és apigenint nem találtak ezekben a gyümölcsökben. A flavonoidok felhalmozódása alapvetően meghatározza bizonyos citrusfélék gyümölcshízát. A grépfrút (*Citrus × paradisi*) nagy naringintartalmának köszönhetően keserű, míg a naringinnel szemben heszperidint tartalmazó narancs (*Citrus × sinensis*) és mandarin (*Citrus reticulata*) édes ízű (Nogata és mts., 2006).

2.3.2.3 A flavonoidok funkciói

A flavonoidok mind a növény-, mind az állatvilágban számos funkciót töltenek be. A növényekben hozzájárulnak a gyümölcsök ízének és színének kialakításához, ez utóbbi atraktánsként is szolgál. Számos káros hatás – UV-sugárzás, mikroorganizmusok – elleni védekező mechanizmus részét képezik (Winkel-Shirley, 2001). Részt vesznek enzimaktivitások regulációjában (Lugasi, 2000; Myhrstad és mts., 2002), szignálfunkcióval rendelkeznek a nitrogénmegkötő baktériumok számára (Siqueira és mts., 1991; Schijlen és mts., 2004).

Az állati és emberi szervezet számára az erős antioxidáns és gyökfogó, valamint *in vitro* fémkelátor tulajdonságuk a meghatározó (Terao, 2009). Szabadgyökfogó képességüket még a fémkelátokat képező flavonoidok is megtartják (Lugasi és mts., 2003). A közismerten nagy antioxidáns kapacitással rendelkező bogyósgyümölcsök esetében a teljes gyökfogó képesség szoros korrelációt ($r=0,681$) mutat az összes fenoltartalommal, ami igazolja, hogy a fenolos vegyületeknek döntő szerepük van a gyökfogó kapacitás kialakításában (Hegedűs és mts., 2008). Antioxidáns hatásuk mellett jól ismert a flavonoidok kedvező élettani hatása is, például az antiproliferatív és gyulladásgátló hatások (Middleton és mts., 2000). A legígéretesebb területek, melyeken a flavonoidok gyógyító hatása kihasználható lehet, többek között a krónikus gyulladással járó és allergiás megbetegedések, a szív- és érrendszeri betegségek, illetve a mellrák (Lugasi és mts., 2003; Manthey és Guthrie, 2002; Terao, 2009).

A közelmúltban és napjainkban számos epidemiológiai tanulmány azt mutatta, hogy a fokozott gyümölcsfogyasztás csökkenti különböző degeneratív betegségek, mint például az érszűkület, szívinfarktus és agyi érkatasztrófák vagy különböző típusú daganatos megbetegedések kialakulásának kockázatát (Block és mts., 1992; Dauchet és Dallongeville, 2008; Terry és mts., 2001). A kutatások középpontjában elsősorban a flavonoidok szív- és érrendszeri megbetegedésekre gyakorolt hatásai állnak. Az agyvérzés, érrendszeri és daganatos

megbetegedések aránya igen jelentős Magyarországon (KSH, 2005). Az eredmények szerint a flavonoidokban gazdagabb étrendet fogyasztók körében a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásának valószínűsége jóval kisebb (Harborne, 1988).

Szabadgyökfogyó és fémkelátor tulajdonságuknak köszönhetően lipidek és egyéb molekulák oxidációs folyamatait gátolják. A rutin, az apigenin, a kvercetin és a naringin szuperoxidgyökfogyó-hatása bizonyított (Lugasi, 2000; Robak és Gryglewski, 1988).

Az izolált formában elfogyasztott antioxidánsok nem pótolhatják a friss gyümölcsök fogyasztását (Halliwell, 2000), mivel a gyümölcsök potenciális antioxidáns és daganatellenes hatása több ezer növényi vegyület komplex hatásának tulajdonítható (Liu, 2003). Ennek megfelelően a felsorolt betegségek kialakulásának valószínűsége csökkenthető lehet a fokozottabb mértékű gyümölcsfogyasztással.

2.3.3 Antocianinok

Elsősorban bizonyos gyümölcsök (bodza, szeder, meggy, szőlő, cseresznye, szilva stb.), a padlizsán és a vöröskáposzta kékes-vöröses színét eredményezik. A kékszőlőben a petunidin, a delfinidin, a malvinidin stb. glikozidjai mutathatók ki (Shahidi és Naczk, 2004). Különböző fémionokkal (Fe, Mg) komplexet alkotva virágszirmok színének kialakításában vesznek részt. Különböző pH-tartományokban eltérő színeket mutatnak; a savastól a semlegesen át a lúgos tartományig pirosas, színtelen majd kékes színt eredményeznek. A gyümölcsök antocianintartalma az érés előrehaladtával fokozódik. Az antocianidinek legfőbb forrásaként a gyümölcsféléket tartják számon. A bogyósok gyümölcse mellett az alma- és körtefélékben, valamint csonthéjasokban legnagyobb mennyiségben a héjban halmozódnak fel. A zöldségek közül nagy mennyiségben fordulnak elő a vöröskáposztában, retekben, rebarbarában, valamint lilahagymában. A fekete ribiszke és a szeder antocianintartalma a 2-4 g-ot is eléri egy kg friss tömegre vonatkoztatva. A cseresznye malvidintartalma 350-4500 mg/kg, a szilváé 20-250 mg/kg friss tömeg között változik (Lugasi, 2000; Shahidi és Naczk, 2004).

A különböző szerkezetű antocianidinek és az azokból keletkező antociánok színét a hidroxiláció mértéke befolyásolja. A dihidrokempferol egyszeres, majd kétszeres hidroxilációját dihidrokvercetinné és dihidromiricetinné a flavonoid-3'-hidroxiláz (F3'H) és flavonoid-3'5'-hidroxiláz (F3'5'H) enzimek végzik. A dihidrokempferolból keletkező antociánok és származékaik narancssárga, a dihidrokvercetinből keletkezők piros, míg a dihidromiricetinből származók kék színűek (Katsumoto és mts., 2007).

A növényi sejtekben termelődő, a vakuólumokban felhalmozódó cianidin vörös, pelargonidin és peonidin piros, delfinidin, peonidin és petunidin kék színt eredményez. A

kérdésszerű gyümölcs, virág, mag stb. színét nem csupán egy típusú antocianin molekula határozza meg, hanem különböző molekulák együttesen nyújtanak színárnyalatokat (kopigmentáció), valamint a vakuoláris pH is nagy befolyással van a kérdésszerű molekulák fényelnyelésére, így látható színére (Mol és mts., 1998; Koes és mts., 2005).

Az utóbbi évtizedben a biotechnológiai módszereket is felhasználó virágtermesztők különböző virág szín-változatokat hoztak létre a flavonoid-bioszintézis módosításával. Bizonyos enzimek expressziójának fokozásával, vagy gátlásával a flavonoid-bioszintézist bizonyos antociánmolekulák termelése felé irányították. A túltermelést leggyakrabban konstitutív promóterek, a gátlást RNS interferencia elvén alapuló *sense* és *antisense* technika segítségével érték el. A leggyakoribb célpontok a CHS, F3'H és F3'5'H enzimek, vagy a MYB családba tartozó transzkripciós faktorok voltak (Martin és Paz-Ares, 1997). A virág színét számos esetben módosították petúnia (Napoli és mts., 1990; Holton és Cornish, 1995), pillangóvirág (Kazuma és mts., 2003), rózsa (Katsumoto és mts., 2007), szegfű (Chandler és Sanchez, 2012) stb. esetén.

2.4 A flavonoidok bioszintézise gyümölcsökben

A gyümölcsök a polifenolok gazdag forrásai. A különböző gyümölcsök flavonoidtartalmában jelentős különbségek mutathatók ki, ami alapján feltételezhető, hogy a különböző gyümölcsök flavonoid-bioszintézisének szabályozása eltérő lehet. A flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének kifejeződését mind a genotípus, mind a fejlődési állapot befolyásolja (Shahidi és Naczki, 2004). Különböző gyümölcsszínű szőlő, fekete áfonya és narancs mutáns genotípusok vizsgálatával sikeresen azonosították azokat a géneket, amelyek a megváltozott fenotípus kialakulásáért felelősek, és ez a stratégia feltehetően sikeres lesz más gyümölcsfajok esetén is.

A flavonoid váz kémiai módosításának változatos lehetősége számos természetes növényi vegyület létrejöttét eredményezi (Harborne és Williams, 2000). Ez az összetettség magyarázza a flavonoidok (és konjugátumaik) eltérő növény családotokban való előfordulását, és a vegyületek meghatározott szövetekben, szervekben, sejttípusban és különböző fenológiai fázisokban történő megjelenését, felhalmozódását.

2.4.1 Flavonoid vegyületek bioszintézise

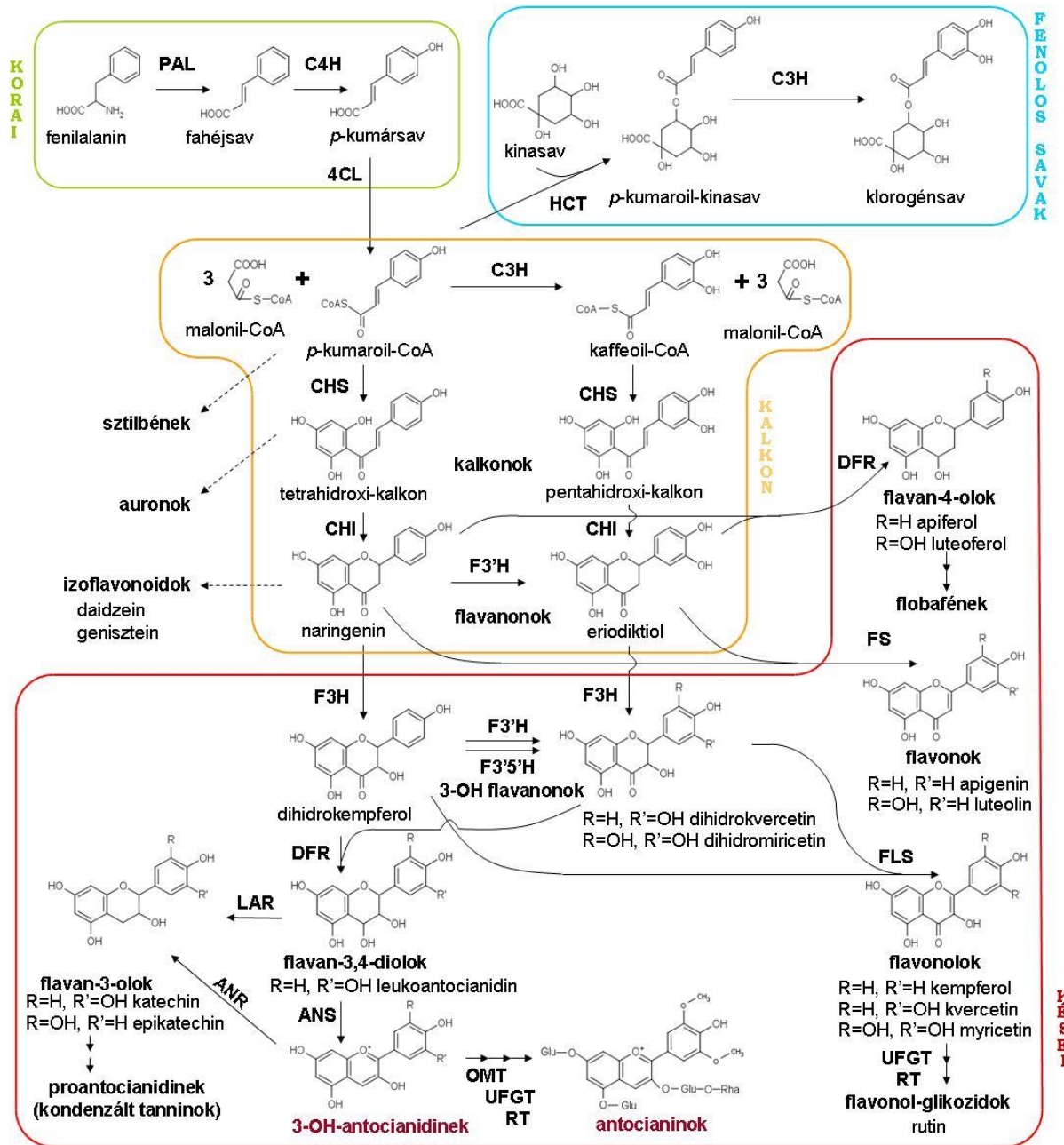
A flavonoidok az általános fenilpropanoid anyagcsere úton keresztül szintetizálódnak az endoplazmatikus retikulum citoplazma felőli oldalához lazán kötődő citoplazmás multienzim komplex hatására (Braidot és mts., 2008). A fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) a fenilpropanoid-

bioszintézis út első enzime, így jelentős befolyása van minden későbbi reakcióra, beleértve a flavonoid-bioszintézis lépéseit is. A PAL enzim a fenilalanin dezaminálását végzi. A keletkező *transz*-fahéjsavon a fahéjsav-4-hidroziláz (C4H) enzim hidrozilációt végez, mely reakció révén *p*-kumársav keletkezik. A *p*-kumársavhoz bizonyos növények tirozinon – tirozin-ammónia-liáz (TAL) általi dezamináláson – keresztül jutnak. A *p*-kumársavra a 4-kumaroil-CoA-ligáz (4CL; EC 6.2.1.12) enzim egy CoA-csoportot kapcsol, mely reakció révén *p*-kumaroil-CoA molekula keletkezik. A *p*-kumaroil-CoA több molekula (klorogénsav-származékok, flavonoidok, sztilbén) prekursorául is szolgálhat. A hidroxifahéjsav-transzferáz (HCT; EC 2.3.1.99) enzim segítségével kinasavval történő konjugáció révén *p*-kumaroil-kinasavvá alakulhat. A *p*-kumaroil-kinasav *p*-kumarát-3-hidroziláz (C3H; EC 1.14.13.36) enzim általi hidrozilációja klorogénsavat eredményez. A *p*-kumaroil-CoA hidrozilációját kaffeoil-CoA-vá szintén a C3H enzim végzi.

A flavonoid-bioszintézis egy molekula *p*-kumaroil-CoA vagy kaffeoil-CoA és három molekula malonil-CoA kondenzációjával kezdődik, mely tetrahydroxi- vagy pentahydroxi-kalkont eredményez (**3. ábra**). Ezt a reakciót a kalkon-szintáz enzim (CHS; EC 2.3.1.74) katalizálja. Az auronok a kalkonokból keletkeznek. A kalkonokból izomerizáció útján flavanonok – pl. naringenin vagy eriodiktiol – keletkeznek a kalkon-izomeráz enzim (CHI, EC 5.5.1.6) hatására. Ezekből a központi intermedierekből a bioszintézis több útvonal felé ágazhat el, melyek mindegyike különböző típusú flavonoid molekulák kialakulásához vezet. A flavanon-3-hidroziláz (F3H; EC 1.14.11.9) a flavanonok C-3 pozíciójú hidrozilációja révén 3-OH flavanonokat képez. Az F3H enzim által keletkezett dihidrokempferol C-3' pozícióban való hidrozilációját a flavonoid-3'-hidroziláz (F3'H; EC 1.14.13.21) enzim végzi, melynek következtében dihidrokvercetin keletkezik. A dihidrokempferol C-3' és C-5' pozícióban való kétszeres hidrozilációját a flavonoid-3'5'-hidroziláz (F3'5'H; EC 1.14.13.88) enzim végzi, melynek során dihidromiricetin keletkezik. A dihidrokempferol, dihidrokvercetin és dihidromiricetin a 3-OH flavanonok közé tartoznak. Az izoflavonoidok szintén a flavanonokból keletkeznek. Az antocianinok bioszintézise a dihidroflavonol-4-reduktáz (DFR; EC 1.1.1.219) enzim működésével kezdődik, melynek során a dihidroflavonolok flavan-3,4-diolokká (leukoantocianidinek) redukálódnak. Ez utóbbi vegyületeket az antocianidin-szintáz (ANS; EC 1.14.11.19) alakítja át antocianidinekké vagy a leukoantocianidin-reduktáz (LAR; EC 1.17.1.3) katechinné. Az epikatechin cianidinből keletkezik az antocianidin-reduktáz (ANR, EC 1.3.1.77) enzim által. A glikozidok képződését UDP glükóz:flavonoid-3-*O*-glükoziltranszferáz (UFGT; EC 2.4.1.91) enzim katalizálja, ami jelentős mértékben stabilizálja az antocianidinek szerkezetét.

A flavonoid-bioszintézis köztitermékeit azok szerkezeti ábrájával tüntettem fel a 3. ábrán. A bioszintézis útvonalban résztvevő enzimeket négy csoportra osztottam. A korai enzimek közé tartoznak a fenilpropanoid útvonal enzimeit, vagyis a PAL, C4H és 4CL. Fenolos savak

termelődését a HCT és C3H enzimek segítik elő. A kalkonok keletkezését és átalakítását katalizáló CHS és CHI a korai és kései csoportot kötik össze. A késői enzimek közé soroltam a hidroxilációban résztvevő enzimeket, mint a F3H, F3'H és F3'5'H. Emellett késői enzimként tüntettem fel a DFR, LAR, ANS, ANR, FLS és UFGT enzimeket is.



3. ábra. A flavonoid-bioszintézis enzimatis lépései. PAL: fenilalanin-ammónia-liáz, C4H: fahéjsav-4-hidroziláz, 4CL: 4-kumaroil-CoA-ligáz, HCT: hidroxifahéjsav-transzferáz, C3H: *p*-kumarát-3-hidroziláz, CHS: kalkon-szintáz, CHI: kalkon-izomeráz, FS: flavon-szintáz, F3H: flavanon-3-hidroziláz, F3'H: flavonoid-3'-hidroxiláz, F3'5'H: flavonoid-3'5'-hidroxiláz, FLS: flavonol-szintáz, DFR: dihidroflavonol-4-reduktáz, ANS: antocianidin-szintáz, LAR: leukoantocianidin-reduktáz, ANR: antocianidin-reduktáz, OMT: O-metil-transzferáz, UFGT: UDP glükóz:flavonoid-3-*O*-glükoziltranszferáz, RT: ramnozil-transzferáz. (Winkel-Shirley, 2001; Pfeiffer és Hegedűs, 2011 alapján, átszerkesztve és kiegészítve)

A flavonoid-bioszintézisben résztvevő gének közül elsőként az *FLS* és a *CHS* géneket izolálták petrezselyemből (*Petroselinum hortense*) (Kreuzaler és mts., 1979; 1983). A flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit az *Ericaceae* és *Rosaceae* családokba tartozó néhány gyümölcsfaj (pl. áfonya, őszibarack, alma, körte és szamóca) esetében is izolálták és jellemezték (Davies, 1993; Fischer és mts., 2003; 2007; Kim és mts., 2003; Pfeiffer és mts., 2006). Egymástól távolabbi rokonságban álló fajok (szőlő, szamóca, *Arabidopsis* és *Citrus*) DNS-szekvenciái szintén elérhetők, egyes esetekben azok expresszióját is vizsgálták (Aharoni és mts., 2001; Kobayashi és mts., 2001; Moriguchi és mts., 2001). Számos transzkripciósfaktort azonosítottak különböző kétszikű növényekben, ami ezen molekulák növényfajok közötti funkcionális konzerváltságát mutatja (Schijlen és mts., 2004). A transzkripciósfaktorok szekvenciáitól upstream irányba elhelyezkedő transzpozon indukálta mutációkat tartják felelősnek, vagy legalább is feltételezik ezek szerepét a különböző gyümölcsszín-változatok kialakulásában (Dondini és mts., 2008; Espley és mts., 2007; Kobayashi és mts., 2001).

Ezen enzimek közül sokat izoláltak egy vagy több növényfajból, és térszerkezetüket is meghatározták (PDB Protein Data Bank). Az adatbank tartalmazza az alábbi enzimeket (zárójelben azok a növények találhatóak, melyekből izolálták, valamint a polipeptidlánc hossza): PAL (*Petroselinum crispum*, 716 AS), CHS (*Medicago sativa*, 389 AS), CHI (*Medicago sativa*, 222 AS), DFR (*Vitis vinifera*, 337 AS), LAR (*Vitis vinifera*, 346 AS), ANS (*Arabidopsis thaliana*, 355 AS). A glükóziltranszferázok népes csoportjába tartozik többek között az UDP-glükóz:flavonoid-3-*O*-glükóziltranszferáz (*Vitis vinifera*, 456 AS).

A DFR-t sok növényfajban vizsgálták, de keveset tudtak a szerkezeti tulajdonságairól, amíg a *Vitis vinifera* enzimének NADP(+)-vel és természetes szubsztrátjával, a dihidrokvercetinnel (DHQ) képzett komplexének háromdimenziós szerkezeti képét le nem írták (Trabelsi és mts., 2008).

2.4.2 A flavonoid-bioszintézis szabályozása

Az eukarióta gének kifejeződése transzkripciósfaktoroktól függ. A transzkripciósfaktorok elősegíthetik vagy gátolhatják bizonyos gének kifejeződését. A transzkripciósfaktorok fehérjék, melyek szekvenciaspecifikus módon kötődnek bizonyos gének promóter régióihoz. A promóter régió összeépülő transzkripciósfaktor komplex segítségével az RNS-polimeráz II enzim meg tudja kezdeni a transzkripciót. A flavonoid-bioszintézis MYB és MYC családokba tartozó transzkripciósfaktorok szabályozása alatt áll (Lin-Wang és mts., 2010; Gantet és Memelink, 2002). Tehát ezek a faktorok jelenlétükkel serkentik vagy bizonyos esetekben gátolják a

flavonoid-bioszintézishez tartozó gének átírását. Termelődhetnek belső (pl. növényi hormonok) vagy külső (pl. UV, mikrobák) jelre adott válaszként. A MYC transzkripciós faktorok doménje a bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) fehérje, mely lehetővé teszi a MYC DNS-hez kötődését. A bHLH két alegységből áll, közel 60 aminosav építi fel. A bázikus aminosavakat tartalmazó hélix felelős a DNS-hez kötődésért (Blackwell és mts., 1990; Ferré-D'Amaré és mts., 1994; Martin és Paz-Ares, 1997; Vom Endt és mts., 2002). A MYC és MYB transzkripciós faktorok összekapcsolódva, transzkripciós komplexként kötődnek bizonyos struktúrgének promóteréhez.

Alma gyümölcsében kimutatták, hogy a MYB transzkripciós faktorok szövetspecifikusan fejtik ki hatásukat; míg a MYB10 transzkriptuma a hús-, a MYB1 transzkriptuma a héjszövetben van jelen nagyobb mennyiségben. A 'Stella' cseresznyefajta gyümölcshúsa vörös színű a több MYB10 transzkriptum, és ennek következtében keletkező nagyobb mennyiségű antocianinnak köszönhetően. Ezzel szemben a vizsgálatba vont másik fajta, a 'Rainier' sárga húsú és a MYB10 transzkriptum mennyisége hatszor kevesebb a 'Stella'-éhoz képest (Lin-Wang és mts., 2010).

A MYB transzkripciós faktorok bizonyos esetekben gátolhatják a fenilpropanoid, így a flavonoid-bioszintézist. Saud és mts. (2009) transzkriptomikai vizsgálatokat végeztek szamócán (*Fragaria × ananassa*) és erdei szamócán (*Fragaria vesca*) a flavonoid-bioszintézis legfőbb génjeire fókuszálva. A szamóca nagyobb antociántartalommal rendelkezett, mint a vizsgált erdei szamóca. Az erdei szamóca gyümölcsét kisebb transzkriptummennyiség jellemezte valamennyi flavonoidbioszintézis génre nézve, a MYB1 transzkripciós faktor expressziója viszont nagyobb volt. Vagyis a MYB1 transzkripciós faktor az erdei szamócában gátolta a flavonoid-bioszintézist.

Hasonló vizsgálatot végeztek hagyományos és vérnarancs mintákon Cultrone és mts. (2010). A kísérletekbe öt különböző genotípusú citrom (*Citrus limon*) levélszöveit is bevonták, melyek eltérő antociántartalommal rendelkeztek. A *CsMYC2* transzkripciós faktorért felelős transzkriptumszint meglehetősen kicsi volt mindkét narancsgenotípusban. Nagyobb expresszió mutatkozott a gyümölcs héjszöveiben, mint a hússzövetekben. Minimálisan nagyobb expressziós értékeket mutattak ki a vérnarancs fajtában. Ezzel szemben a különböző citromgenotípusok levélszöveiben mutatkozott a legnagyobb *CsMYC2* transzkriptummennyiség, ami korrelált a levél antocianintartalmával. Emellett a narancsminták zöld színű levélszöveiben is nagy *CsMYC2* transzkriptummennyiség volt kimutatható. Így nem mutatkozott összefüggés a két eltérő narancsgenotípus szöveinek antocianintartalma és a *CsMYC2* transzkriptum mennyisége között. Ezen eredmények arra utalnak, hogy még számos megválaszolatlan kérdés van a flavonoid-bioszintézis szabályozását illetően.

2.4.3 Flavonoid-bioszintézis a bogyós gyümölcsökben

A flavonoid-bioszintézis utat különböző növényfajokban részletesen jellemezték (Winkel, 2006). *Vitis vinifera*-ban a flavonoidszintézishez kapcsolódó gének expresszióját (főképpen antocianidinek és proantocianidinek) egyaránt vizsgálták a vörös és fehér szőlő bogyóiban és magjában (Bogs és mts., 2006; Boss és mts., 1996a; Castellarin és mts., 2007a,b). A génexpresszió jelentős különbségeket mutat gyümölcsrészek és fajták szerint, különösképpen az antocianinszintézis génjei esetében. A piros bogyójú szőlőfajtákban a bogyóhéjban minden enzim kifejeződik, jóllehet különböző időbeli mintázattal. A bogyó húzában expressziójuk kisebb mértékű, különösen a PAL és UFGT enzimek kifejeződése gátolt (Boss és mts., 1996b). Ez a két gén kódolja az antocianinok szintézise során az első és utolsó reakciót katalizáló enzimeket. Az UFGT végzi az antocianidinek glikolizációját az antocianinok (színes és stabil molekulák) termelése során. A fehér bogyójú fajták héjában az *UFGT* gén kifejeződése nem volt kimutatható, és más gének expressziója is kisebb mértékű volt a vörös héjszínű fajtákkal összehasonlítva (Boss és mts., 1996b). Ennek oka a *Gret1* retrotranszpozon inszerciója a *VvMYBA1* transzkripciósfaktort kódoló gén promóterébe (Azuma és mts., 2007).

A glikoziláció az élő sejtekben található számos kis molekula aktivitásának, anyagcseréjének és elhelyezkedésének összehangolásában játszik fontos szerepet. A növényekben sokféle *glikoziltranszferáz* gén vesz részt ebben a folyamatban, melyek különböző másodlagos anyagcseretermékek illetve mérgező anyagok glikozilációjával védik a sejt működését. A vörös szőlőben található UFGT enzim felelős az antocianinok képződéséért. Offen és mts. (2006) kimutatták, hogy a *VvUFGT1* enzim *in vitro* körülmények között számos flavonoidot elfogadott szubsztrátként. A cukormolekulával szembeni specificitása is szélesebb körűnek mutatkozott. A *VvUFGT1* enzim háromdimenziós szerkezetét is meghatározták.

A flavonoidok B-gyűrűjének hidroxilációját a flavonoid-3'-hidroxiláz (F3'H) és a flavonoid-3'5'-hidroxiláz (F3'5'H) enzimek katalizálják, de a folyamathoz citokróm-b5-re is szükség lehet. Bogs és mts. (2006) azonosították azokat a géneket, amelyek a F3'H, F3'5'H enzimeket, valamint egy feltételezett citokróm-b5 enzimet kódolnak, és vizsgálták transzkripciósfaktorok szabályozásukat a szőlő gyümölcsében. A *VvF3'H* virágzás előtt fejeződött ki, amikor 3'-hidroxilált flavonolok termelődnek. Virágzás után mindhárom gén kifejeződött, ekkor proantocianidinek (PA) keletkeznek. A gyümölcs héjában az érés kezdetén mindhárom gén expressziója kis mértékben volt kimutatható, ami később emelkedett. Mindez a 3'- és 3',5'-hidroxilált antocianinok felhalmozódását vonja maga után. A vörös szőlővel ellentétben, ahol az érés során a *VvF3'H*, *VvF3'5'HI* és *VvCytoB5* gének expressziója nagymértékű volt, fehér szőlőben a *VvF3'5'HI* és *VvCytoB5* gének expressziója gátolt, ami transzkripcionális szabályozásbeli különbségre utal.

Az F3'H és 3',5'-hidroxilázokat kódoló gének a szőlő minden, flavonoidokat tartalmazó szövetében kifejeződnek, legfőképpen az érő piros bogyók héjában, ahol főként antocianinok képződnek (Castellarin és mts., 2007b). A vörös cianidin és kék delfinidin aglikont tartalmazó antocianinok felhalmozódása és a génkifejeződés időbeli szabályozása közti összefüggés igazolta, hogy a *VvF3'H* és *VvF3'5'H* expressziója összhangban van az érő bogyók színváltozásával.

Az elérhető EST szekvenciák alapján két *LAR* cDNS-t azonosítottak levélből Pfeiffer és mts. (2006). Szőlő levélszövetéből *ANR* cDNS-eket is sikerült izolálni és jellemezni. A kismértékű szubsztrátspecificitás ellenére, *in vivo* mindkét enzim különbözőképpen hidroxilált katechineket és epikatechineket szintetizál. Vörös bogyójú fajták héjában a *VvLAR2* és *VvANR* gének expressziója a PA-szintézis időbeli szabályozottságát mutatja, mely szerint a génexpresszió a szőlőbogyó korai fejlődési állapotában kezdődik, és az érés kezdetéig tart (Bogs és mts., 2005).

Walker és mts. (2007) kutatása szerint két nagyon hasonló gén, melyek a *MYB* transzkripciós faktorok családjába tartoznak (*VvMYBA1* and *VvMYBA2*), képes szabályozni a bogyóban zajló antocianin-bioszintézist (és így a szín változását) az *UFGT* promóterén keresztül. A fehér szőlő *VvMYBA2* génjének funkcióvesztését két nem konzervatív aminosavcserével járó mutáció okozta. Ehhez hasonlóan, azonosítottak egy *VvMYBPA1* transzkripciós faktort, mely a szőlő magjában és héjában szabályozni képes a PA-ek képződését (Bogs és mts., 2007). A szőlőgenom megismerését követően (Velasco és mts., 2007), talán azonosíthatóvá válnak a közeljövőben a szabályozó elemek, és fény derülhet a flavonoid-bioszintézis struktúrgénjeinek genomon belüli elhelyezkedésére.

A málna (*Rubus idaeus*) gyümölcs színének és aromájának kialakulása nagymértékben függ a fenilpropanoid anyagcsereút termékeitől. Kumar és Ellis (2001) eredményei alapján a málnában kifejeződő PAL enzimét két gén (*RiPAL1* és *RiPAL2*) kódolja. A *RiPAL1* 88%-os hasonlóságot mutat aminosavszinten a *RiPAL2*-höz, de filogenetikai vizsgálatuk különböző csoportokba sorolta a *RiPAL1* és *RiPAL2* géneket. Habár minden vizsgált vegetatív és generatív szövetben kimutatható volt mindkét gén expressziója, a *RiPAL1* elsősorban a korai gyümölcseréssel hozható kapcsolatba, míg a *RiPAL2* expressziója a virág és gyümölcs fejlődésének későbbi szakaszában vált jelentőssé. A különböző szövetekben lévő transzkriptumok mennyiségének meghatározása azt mutatta, hogy levélben, gyökérben, hajtásban, illetve az éretlen és érett gyümölcsökben a *RiPAL1* gén transzkriptuma 3-10-szer nagyobb mennyiségben van jelen, mint a *RiPAL2* géné. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a két *RiPAL* gén eltérő szabályozási mechanizmus alatt áll.

A szamóca gyümölcse sok antocianint tartalmaz, ami az érett gyümölcsnek tetszetős piros színt ad. Egy feltételezett glükoziltranszferáz szekvenciát (*FaGT1*) sikerült klónozni szamóca gyümölcséből készített cDNS könyvtárból. A rekombináns *FaGT1* UDP-glükózt kapcsol antocianidinekhez és kisebb mértékben flavonolokhoz, 3-*O*-glikozidokat állítva elő (Griesser és mts., 2008). A kvantitatív polimeráz láncreakcióval végzett vizsgálatok felfedték, hogy az *FaGT1* gén transzkriptuma alig mutatható ki a zöld gyümölcsben, míg a génexpresszió félérett és érett, piros színű gyümölcsökben drámaian megnövekedett. Jelentős mennyiségű epiafzelechin – melyet az ANR képez pelargonidinből – volt azonban kimutatható *FaGT1*-csendesített gyümölcsökben, ami az *FaGT1* és *FaANR* között meglévő, a közös antocianidin szubsztrátokért zajló kompetícióra utal. Ennélfogva, az *FaGT1* enzim egy fontos elágazási pontot képvisel a flavonoid-bioszintézis során, hiszen hatására a bioszintézis az antocianinok vagy PA-ok képződésének irányába tolódik el.

A proantocianidinek szerepet játszanak a fejlődésben lévő gyümölcs gombafertőzésekkel szembeni védelmében (Mercier, 1997), ami a növényvédelem területén is felhasználható lehet. Ezért a kultúrnövények gyümölcsében és levelében zajló PA-bioszintézis intenzíven tanulmányozott folyamat. A PA-bioszintézis és az antocianin-bioszintézis számos reakciója megegyezik, de más útvonalon halad tovább a leukoantocianidin leukoantocianidin-reduktáz (LAR) általi, katechinné történő, vagy a cianidin antocianidin-reduktáz (ANR) általi, epikatechinné történő redukcióját követően (**3. ábra**).

Jaakola és mts. (2002) a flavonoid-bioszintézis génjeinek érés során történő expressziós változását tanulmányozták áfonya (*Vaccinium myrtillus*) gyümölcsében az antocianinok, PA-ok és flavonolok felhalmozódásával együtt. Vizsgálataikat vad típusú és színanyagokban hiányos mutáns genotípusokon végezték el. Az áfonyában zajló flavonoid-bioszintézis öt génjének (*PAL*, *CHS*, *F3H*, *DFR* és *ANS*) cDNS fragmentumait izolálták, megszekvenálták, és megvizsgálták expressziós mintázatukat. A málnában lévő *PAL* paralógokhoz hasonlóan (Kumar és Ellis, 2001), minden egyes génből több izoformát találtak. Ennek alapján feltételezhető, hogy az áfonya vizsgált flavonoid-bioszintézis génjei multigén családokat alkotnak.

Jaakola és mts. (2002) összefüggést mutattak ki az áfonya flavonoid-bioszintézisében résztvevő gének expressziója és az antocianinok felhalmozódása között. A bogyó fejlődésének korai szakaszaiban a PA-ek és a kvercetin voltak jelen a legnagyobb mennyiségben, ami jelentősen csökkent az érés során. Feltételezték, hogy az éretlen gyümölcsök fokozott PA-tartalma a gyümölcsök idő előtti elfogyasztása ellen nyújt védelmet, mivel a proantocianidinek fanyar ízű vegyületek (Harborne, 1997). Az érés későbbi szakaszai során az antocianinok mennyisége jelentősen megnövekszik, és az érett bogyó legnagyobb mennyiségben jelenlévő flavonoid komponenseivé válnak. Az áfonya flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének

kifejeződése már a legkorábbi érési állapotokban megfigyelhető, majd az érés végén újra, hasonlóan a szamóca (Manning, 1998) és szőlő (Boss és mts., 1996a; Kobayashi és mts., 2001) esetében kapott expressziós mintázathoz. A fehér vagy rózsaszínű mutánsokban a flavonoid-bioszintézis minden vizsgált génjének expressziója mérsékeltebb volt.

2.4.4 A flavonoid-bioszintézis fán termő gyümölcsökben

A *Rosaceae* család molekuláris genetikai és genomikai vizsgálata gyors fejlődést mutatott az utóbbi évtizedekben (Shulaev és mts., 2008). Mivel a legtöbb mérsékeltövi gyümölcsfa ebbe a családba tartozik, a flavonoid-bioszintézis molekuláris genetikai tanulmányozása jelentős perspektívákat nyújthat.

Az alma antocianin-bioszintézisének megismerése érdekében a gyümölcshéj szövetéből készült cDNS könyvtárak használatával azonosították az *F3H*, *DFR*, *ANS*, és *UFGT* géneket (Kim és mts., 2003). A cDNS-ekhez tartozó aminosav-szekvenciák nagy hasonlóságot mutattak más növényekből származó szekvenciákkal. Minden ide tartozó gén multigén család tagja. Az antocianin-bioszintézis génjeinek mRNS-eit elsősorban héjszövetben mutatták ki, és a gének expressziója fény hatására indukálódott. A piros héjú fajták héjában bőséges mennyiségű transzkriptumot mutattak ki, míg a piros fedőszínnel nem rendelkező fajták esetén jóval kevesebbet, ami arra utal, hogy a kérdéses gének döntő szerepet játszanak az alma héjszínének kialakításában.

Az alma érése során a héjban lévő UDPGal:flavonoid-3-*O*-glükoziltranszferáz (UFGalT) aktivitása szintén párhuzamot mutatott az antocianin-felhalmozódással (Ju és mts., 1995). A gyümölcsökben éretlentől érett állapotig állandó és viszonylag nagy CHS aktivitás és flavonoidtartalom volt kimutatható. Napfény hatásának kitett alma vizsgálata során az adatok azt mutatják, hogy a CHS nem játszik szabályozó szerepet az antocianinok bioszintézisében. A gyümölcs érése során az UFGalT aktivitás összefüggésben állt az antocianinszintézissel, de ebben a folyamatban nem ez az egyedüli szabályozó elem, miután ez az enzim 90 nappal a virágzás után is aktív volt, amikor antocianin még nem volt kimutatható. Ju és mts. (1995) feltételezték, hogy az UFGalT a kvercetin-glikozidok és antocianinok képződését is katalizálja, és az antocianinok keletkezése valószínűleg inkább a cianid jelenlétén múlik, mint az UFGalT aktivitásán. Az antocianin-bioszintézis szabályozásának legfőbb lépései azok, amelyek során dihidrokvercetinből cianidin keletkezik (a DFR és ANS enzimek segítségével).

Az antocianin-bioszintézis összehangolt szabályozása feltételezhetően egy általános transzkripciós faktoron keresztül történik. Egy R2R3 MYB transzkripciós faktort kódoló gént izoláltak almából ('Cripps Pink'), melyet *MdMYB1*-nek neveztek el (Tako és mts., 2006). Érő

almagyümölcsben az *MdMYB1* transzkripciója összefüggést mutatott az antocianin-bioszintézissel a piros fedőszínt tartalmazó héjszövetben. Amikor a sötétben fejlődő gyümölcsöket napfénynek tették ki, néhány nap alatt az *MdMYB1* transzkripció szintje megemelkedett a héj antocianin-tartalmával együtt. A piros héjú almafajtákban az *MdMYB1* gén transzkripciója jóval jelentősebb volt a nem piros héjú fajtákkal összehasonlítva. Az *MdMYB1* gén promóterében számos polimorfizmust azonosítottak. Egy polimeráz láncreakción és enzimes hasításon alapuló molekuláris markert (dCAPS: derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) terveztek, mely a héjszín öröklődésének megfelelő hasadást mutatott a piros és nem piros gyümölcsű szülők utódnemzedékében. Következésképpen az almahéjszín kialakulásának genetikai alapja az *MdMYB1* expresszió. Espley és mts. (2009) kimutatták, hogy a *MYB10* gén promóterének mutációja következtében az egész növényben megemelkedett az antocianinszint, és egy különleges, vörös lomboszínű és gyümölcshúsú fenotípus jött létre.

Fischer és mts. (2003) *Malus* és *Pyrus* *DFR* géneket klónoztak, szekvenáltak, és kimutatták, hogy az enzim flavanon-4-reduktáz aktivitással is rendelkezik. Prohexadion-Ca alkalmazása során *in vivo* körülmények között különleges 3-dezoxiflavonoidok keletkeztek almalevélben. Ezeket a vegyületeket a tüzelhalással szembeni fokozott rezisztenciával hozták összefüggésbe.

Míg az antocianin-bioszintézis molekuláris alapjait számos gyümölcs esetén vizsgálták, keveset tudunk arról, hogy a flavonoid struktúrgének hogyan szabályozzák a kondenzált tanninok (CT) és flavonolok termelődését. Mivel a PA-ek is fontos rezisztencia faktorok, az almalevél katechin- és epikatechin-bioszintézisének vizsgálatára is jelentős figyelem irányult (Pfeiffer és mts., 2006). *LAR* és *ANR* cDNS-eket izoláltak és funkcionálisan jellemezték azokat. Takos és mts. (2006) három – a CT szintézisben résztvevő – gént vizsgáltak; két *LAR*-t és egy *ANR*-t, a ‘Cripps Red’ piros gyümölcsű fajta héjszövetéből izolált cDNS felhasználásával. A vizsgált héjszövetek mind zöld, mind piros fedőszín esetén bőséges mennyiségben tartalmazták az *ANR* gén transzkriptumát az érés korai szakaszában, ami összhangban állt a CT-ok felhalmozódásával. A *LAR1* gén transzkriptumait kimutatták zöld héjban az érés korai szakaszában, míg a *LAR2* transzkriptuma csak fiatal gyümölcsökben volt jelen. A gyümölcs érése során a CT-szintézisében résztvevő gének transzkriptumai sokkal kisebb mértékben voltak jelen az antocianinok felhalmozódásának idejében, mint más flavonoid-bioszintézis gének transzkriptumai. Az eredmények arra utalnak, hogy az alma héjszövetében zajló CT-bioszintézis az antocianinoktól eltérő szabályozás alatt állt.

A körte (*Pyrus* sp.) és alma összehasonlító Southern-analízise kimutatta, hogy a két nemzetség flavonoid-bioszintézis génei hasonló genomi elrendeződést mutatnak (Fischer és mts., 2007). Homológia-alapú klónozási eljárást alkalmaztak, hogy a flavonoid-bioszintézis

legfőbb génjeihez eljussanak körte esetén, ami a *PAL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*, *DFR*, *LAR 1* és *2*, *ANS* és *ANR* gének esetében sikeres volt. Jelentős különbségeket mutattak ki a *Malus* nemzetséggel való összehasonlítás során az enzimek szubsztrátspecifitása és a gének kópiaszáma tekintetében.

A 'Red d'Anjou' körte gyümölcsön végzett expressziós analízis kimutatta, hogy a gyümölcs *PAL* transzkriptum-tartalma a tárolás során csökken (0–1 °C, 90–95 % RP, 126 nap), de a tárolást követő periódus során (szobahőmérséklet, 1 vagy 7 nap) újra növekszik a légzésintenzitás és etiléntartalom növekedésével párhuzamosan (MacLean és mts., 2007). Ezzel ellentétben a *CHS* transzkriptum mennyisége drámaian lecsökkent az egyhetes tárolást követő időszakban. A *PAL* aktiválódása, valamint a későbbi, tárolás utáni *CHS* inaktiválódás arra utal, hogy a folyamat a flavonoidmolekulák bioszintézisétől a klorogénsav felépítésének irányába tolódik el.

A hagyományos és vérnarancs összehasonlításával kívánták azonosítani azokat a géneket, melyek a vérnarancs hússzínének kialakításáért felelősek (Licciardello és mts., 2008). A vizsgálatok során az antocianin-bioszintézisben résztvevő géneket, például a *PAL*, *CHS*, *DFR*, *ANS*, *UFGT*, *GST* és egy szabályozó gént azonosítottak. A későbbiekben Cultrone és mts. (2010) azt találták, hogy a CsMYC2, a MYB és MYC család egy tagja a fenilpropanoidok bioszintézisét szabályozza a *Citrus* nemzetségben. A *CHS*, *ANS* és *UFGT* struktúrgének expressziós mintázata szintén párhuzamot mutatott a CsMYC2-vel mind a narancs, mind a vérnarancs hús-, héj- és levélszövetében.

Csonthéjas gyümölcsökből ezidáig csupán néhány flavonoid-bioszintézisben résztvevő gént izoláltak és szekvenáltak meg, beleértve a *PAL*-t őszibarackból (El Ghaouth és mts., 2003), cseresznyéből (Wiersma és Wu, 1998), kajsziból és egy *Prunus cerasifera* × *Prunus munsoniana* hibridből (Pina és Errea, 2008), *CHS*-t cseresznyeszilvából (nem közölt) és őszibarackból (Tsuda és mts., 2004); *DFR*-t cseresznyeszilvából (EF683133); és *ANS*-t cseresznyeszilvából (EF683132) és őszibarackból (Tsuda és mts., 2004).

Az őszibarack és nektarin gyümölcs héjában működő antocianin-bioszintézis géneken részletes vizsgálatokat végeztek Tsuda és mts. (2004). A piros héjú 'Akatsuki' őszibarackban és a sötétpiros 'Flavortop' nektarinban az antocianin-bioszintézis gének expressziója párhuzamot mutatott az antocianin-felhalmozódással a gyümölcs héjszövetében. A főbb struktúrgének expressziója jelentősen megnövekedett az érett gyümölcsben az antocianin koncentrációval együtt. Bár a fehér színű 'Mochizuki' őszibarack esetén a *CHS* és *DFR* gének expressziója nem volt kimutatható érett gyümölcsben, a *CHI*, *F3H*, *ANS* és *UFGT* gének kifejeződtek. Piros elszíneződést a héjon csak ritkán észleltek a 'Mochizuki' őszibarack vizsgálatokor. Ezekben a pirosra színeződött szövetekben a *CHS* és *DFR* gének is határozott expressziót mutattak az érett

gyümölcsben. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a héj antocianin-bioszintézis folyamatának legfőbb szabályozói a *CHS* és *DFR* gének az érett, piros színű őszibarack és nektarin esetén.

A flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének tanulmányozása kiemelkedően fontos abból a szempontból, hogy részletesebben megismerjük a gyümölcsfák polifenolos vegyületeinek anyagcseréjét. Ily módon a *Rosaceae* és más növénycsaládok flavonoid-bioszintézisének evolúciós kapcsolataira is fény derülhet.

2.5 Gyümölcsök flavonoid-bioszintézisének vizsgálati módszerei

Az elmúlt évtizedekben a tudományban egyre nagyobb teret hódítottak a genetikai kutatások. Nehéz lépést tartani a molekuláris genetikai, molekuláris biológiai kutatások eredményeivel. Ugyanezt mondhatjuk el az analitikai kémiáról, annak is a műszeres oldaláról. Számos molekuláris biológiai módszert és technikát, mint pl. klónozás, géncsendesítés, PCR, qPCR, cDNS könyvtárak, rekombináns technikák; fehérjék, gyógyszer alapanyagok stb. termeltetése mikroorganizmusokkal; transzkriptomikai, proteomikai vizsgálatok, genomszekvencia meghatározása stb. ismerünk már. Az analitikai kémiában a tömegspektrometria óriási fejlődésen ment és megy keresztül. A különböző elven működő tömegspektrométerek nagy pontossággal képesek molekulákat, fehérjéket, fehérje térszerkezeteket azonosítani és meghatározni. A biológia centrális dogmájának megfelelően a biológiai rendszerek komplex vizsgálatára a genomika, transzkriptomika, proteomika és metabolomika közösen kínál lehetőséget. A következő fejezetekben áttekintjük a vizsgálat során használt mérőmódszereket.

2.5.1 Az antioxidáns kapacitás jellemzése

Az utóbbi időben az élelmiszerek előállítása során egyre nagyobb figyelmet fordítanak az egészségvédő komponensekre, valamint azok mennyiségi vizsgálatára, így az antioxidánsokkal kapcsolatos kutatások száma is megnövekedett (Frankel és Finley, 2008; Gokmen és mts., 2009). Az egészségvédő komponensek közé tartozik számtalan olyan molekula, mely antioxidáns hatással rendelkezik. Az utóbbi évtizedekben több mint 100 különböző analitikai technika került kidolgozásra, melyek oldatok antioxidáns kapacitását hivatottak számszerűsíteni (Cornetti, 2009). Az antioxidáns kapacitást mérő módszereket alapvetően két csoportra oszthatjuk (Frankel és Meyer, 2000). Az elektronátmeneten alapuló (ET – elektrontranszfer) módszerek az oldatok redukálóképességét mérik. Színváltozással járnak, melynek mértékéből lehet következtetni az

antioxidáns kapacitásra (Huang és mts., 2005). A másik csoportba tartoznak a hidrogénatom átvitelén alapuló (HAT – hidrogén atomtranszfer) mérő módszerek, melyek a szabadgyök-semlegesítés hatékonyságát jellemzik, és elsősorban reakciókinetikán alapulnak.

A gyümölcsök antioxidáns kapacitásának jellemzésére leggyakrabban elektronátmeneten alapuló mérőmódszereket használunk, például a vasredukáló képességen alapuló módszert (FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power), az összes polifenol meghatározását Folin-Ciocalteu reagenssel (TPC – Total Phenol Content), a rézionnal szembeni redukálóképesség meghatározását (CUPRAC – CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity), a troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) és a DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás méréseket.

Gyakorlatilag mindegyik mérőmódszer rendelkezik előnyökkel és hátrányokkal. Önmagában egy módszer alkalmazása nem nyújt megbízható információt a vizsgált minta antioxidáns kapacitására vonatkozóan, ezért több különböző mérőmódszer használata ajánlott (Ghiselli és mts., 2000, Huang és mts., 2005). A kajszi antioxidáns kapacitását három különböző mérőmódszerrel (FRAP, TPC és TEAC) jellemeztük.

2.5.1.1 FRAP

A módszer kidolgozása Benzie és Strain (1996) nevéhez fűződik. Alapja, hogy a Fe(III) ionokat az antioxidánsok Fe(II) ionokká redukálják. A TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazin) komplexképző segítségével oldatban tartott Fe(II) ionok keletkeznek, ami kék színű terméket képez. A színváltozás spektrofotometriásan nyomon követhető (Benzie és Strain, 1996; Huang és mts., 2005). A módszer előnyei, hogy gyors, egyszerű, olcsó, reprodukálható, és nem igényel drága laboratóriumi felszerelést (Apak és mts., 2007; Pérez-Jiménez és mts., 2008). A módszer természetesen hátrányokkal is rendelkezik: a mérés a fiziológiai pH (enyhén savas, közel semleges) alatt zajlik, a módszer nem érzékeny a tiol típusú antioxidánsokra (pl. glutation) (Kranl és mts., 2005), a karotinoidok sem rendelkeznek vasredukáló képességgel, egyes komponensek (pl. kávésav, ferulasav) reakcióideje hosszabb az alkalmazottnál, ezért azokat a módszer nem méri (Apak és mts., 2007; Balogh, 2010).

2.5.1.2 TPC

Az eredeti módszer kidolgozása Singleton és Rossi (1965) nevéhez fűződik. A módszer alapja, hogy a Folin-Ciocalteu reagens sárga színű Mo(VI) ionja a vizsgált mintában található antioxidánsoktól elektront vesz fel, és kék színű Mo(V) ionná redukálódik. A keletkező kék szín spektrofotometriásan ($\lambda=765$ nm-en) detektálható. A módszer elnevezése nem teljesen pontos, mivel nemcsak a fenolok, hanem a vízdoldható, elektronleadásra képes antioxidánsok vizsgálatára

alkalmas. A módszer előnye, hogy egyszerű, olcsó, reprodukálható és nem igényel drága laboratóriumi felszerelést (Huang és mts., 2005). A módszer hátránya többek között, hogy lúgos (nem fiziológiás) pH-n zajlik a reakció (Frankel és Meyer 2000), az aszkorbinsav és a Cu(I) ionok is redukálják a reagenst (Apak és mts., 2007; Balogh, 2010).

2.5.1.3 TEAC

A módszer kidolgozása Miller és mts. (1993) nevéhez fűződik. A 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karboxilsavra (trolox) vonatkoztatott antioxidáns kapacitás mérőmódszer szintén színreakción alapul. Az ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav) oxidációjával sötétzöld színű $ABTS^{\cdot+}$ kation keletkezik, mely antioxidáns molekulák jelenlétében elszíntelenedik (Stratil és mts., 2007). A színreakció spektrofotometriásan ($\lambda=734$ nm-en) nyomkövethető. A módszer előnye, hogy olcsó, egyszerű, gyors (van den Berg és mts., 1999) és a gyök viszonylag stabil (Prior és Cao, 1999). A módszer hátrányai többek között a hosszú minta-előkészítés, és hogy a mesterségesen előállított gyök a természetben nem létezik (Miller és mts., 1996; Frankel és Meyer, 2000; Balogh, 2010).

2.5.2 PCR

A molekuláris biológia fejlődése lehetővé tette, hogy a természetben lejátszódó folyamatok mintájára *in vitro* DNS-sokszorosítást érjenek el. A PCR (Polymerase Chain Reaction = polimeráz láncreakció) eljárást Kary Banks Mullis fejlesztette ki a 80-as évek közepén. Találmányát Nobel-díjjal is elismerték. A módszer lényege, hogy tetszőleges DNS-szakasról (templát) rövid idő alatt korlátlan számú másolatot készíthetünk két iniciáló oligonukleotid szekvencia (primerpár) segítségével. A primerek közrefogják a megszokszorozásra szánt DNS-szakaszt és a DNS-polimeráz enzim közreműködésével megindul a replikáció. A reakció során alkalmazott primerek általában 20-25 nukleotidból álló, egyszálú nukleotidszekvenciák. A PCR-technikát széles körben alkalmazzák gének izolálására, alapvető módszere a gensebészeti technikáknak, alkalmas RNS- és DNS-analízisre, mutációk kimutatására, bakteriális, virális fertőzés ellenőrzésére, transzgénikus élőlények azonosítására.

2.5.3 Valós idejű („real-time”) PCR

A valós idejű vagy kvantitatív PCR technika gyorsan terjed a molekuláris biológiával foglalkozó kutatóintézetekben és laboratóriumokban. Eredetileg a polimeráz láncreakció kinetikájának tanulmányozására fejlesztették ki. Csak a későbbi megfigyelések és tapasztalatok mutattak rá, hogy számos további kísérlet (pl. génexpresszió vizsgálata) is elvégezhető ezzel a berendezéssel (Higuchi és mts., 1992). A hagyományos PCR technikán alapul. Lényege az, hogy

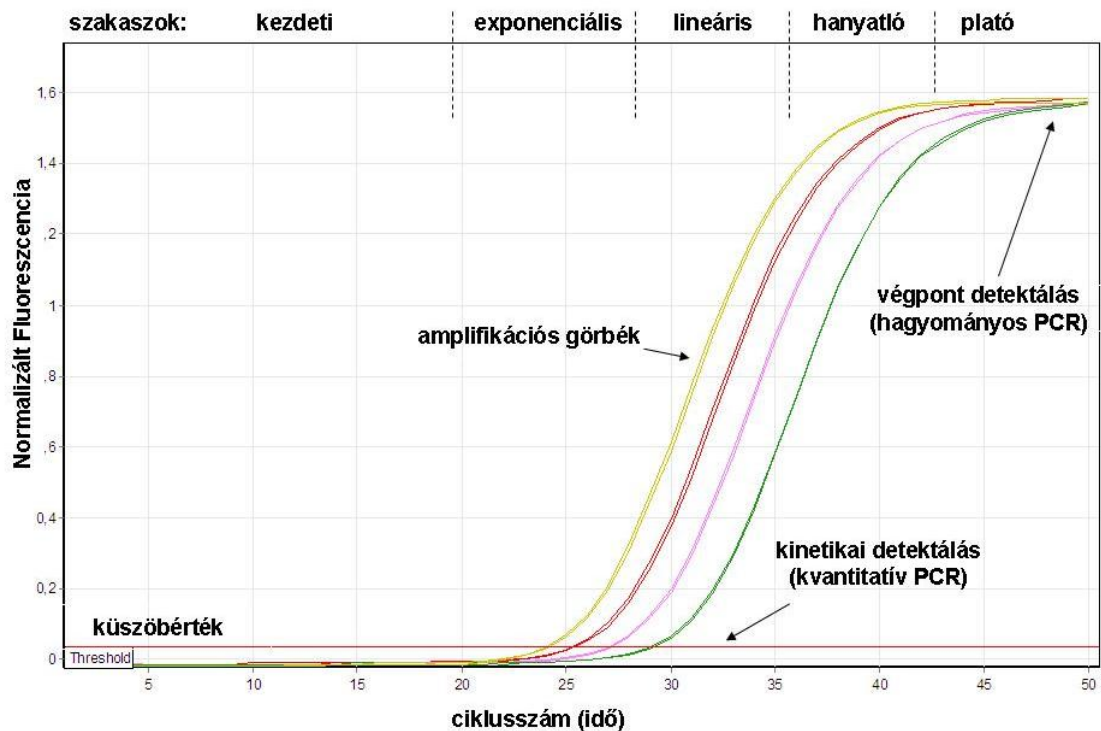
a ciklusról ciklusra sokszorozódó DNS-szálak szintézise folyamatosan (valós időben) detektálható. Valójában nem a DNS mennyisége detektálható, mivel a nyers adatok nem koncentráció-adatok, hanem a DNS mennyiségével arányos, fluoreszcens jelből számított értékek. A későbbiekben természetesen kifejlesztettek egy technikát (abszolút kvantifikálás), mely közvetett módon, bizonyos feltételek mellett egy adott DNS-szakasz pontos mennyiségi kimutatására is alkalmas (Sykes és mts., 1992).

A reakcióelegy egy speciális festéket tartalmaz, mely alkalmas arra, hogy a ciklusonként sokszorozódó amplikonok mennyiségével arányos fluoreszcens jelet bocsátson ki. Ezt a fluoreszcenciát egy fényforrás gerjeszti, a keletkezett fluoreszcens fény intenzitását egy detektor érzékeli. Ezen reakciósorozat minden ciklus végén végbemegy, és a valós idejű PCR készülékkel összekötött számítógép a folyton növekvő fluoreszcencia értéket egy diagrammon ábrázolja az idő (ciklusszám) függvényében. A mért pontokra illesztett görbe – a PCR görbe – mutatja meg, hogy a ciklusok előrehaladtával mikor éri el a DNS mennyisége a detektálhatósági szintet.

2.5.3.1 A valós idejű és hagyományos PCR összehasonlítása

A valós idejű, azaz kvantitatív PCR (qPCR) három fő lépése (denaturáció, primertapadás és lánchosszabbítás) megegyezik a hagyományos PCR-technika lépéseivel. A hagyományos PCR-től jelentős eltérés, hogy a termékek valós idejű detektálása fluorimetriás úton zajlik, melynek előfeltétele valamely fluoreszcens festék használata. A qPCR reakció során többféle fluorimetriás detektálási módszer egyaránt alkalmazható, melyek csoportosítása a szekvencia-specificitás alapján történhet. E szerint két csoportjukat különíthetjük el. Nem szekvencia-specifikus fluoreszcens próbák – mint például a *SYBR Green I* vagy a *BOXTO* (Zipper és mts., 2004; Bengtsson és mts., 2003) – illetve szekvencia-specifikus fluoreszcens próbák – mint például a hibridizációs próbák (Caplin és mts., 1999), a *TaqMan* próba (Holland és mts., 1991), Molecular Beacons (Tyagi és Kramer, 1996), valamint a *Lion*-próba (<http://www.biotoools.net>).

A valós idejű PCR készülékek különböző hullámhosszú gerjesztési fényforrásokat (LED vagy lézer) tartalmaznak, és számos, eltérő hullámhosszúságú fluoreszkáló jelet képesek – akár párhuzamosan is – detektálni. Maga a detektálás egyes esetekben nagy érzékenységgű FES-detektorral (fotoelektron-sokszorozó) vagy digitális CCD-kamerával történik.



4. ábra. A kinetikai (amplifikációs) görbék lefutása valós idejű PCR során.

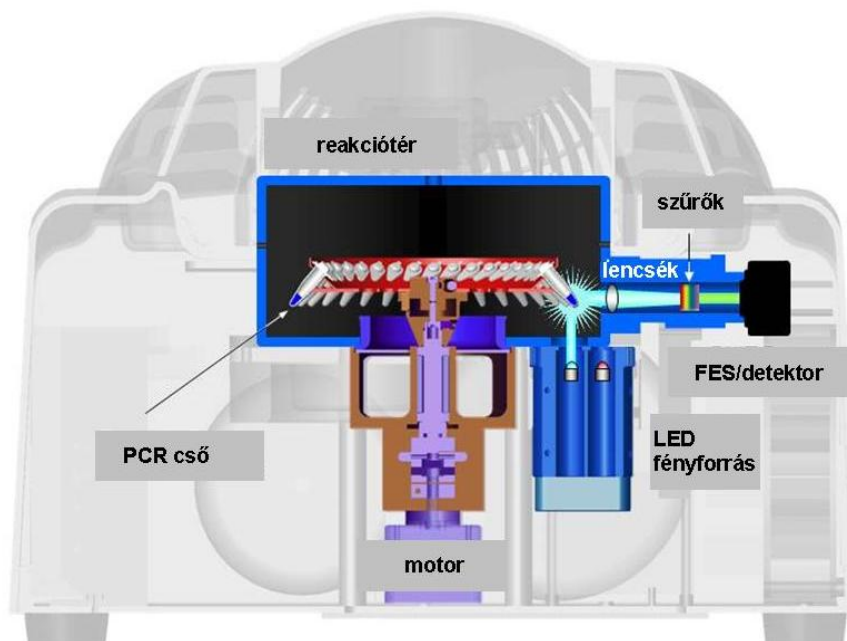
A valós idejű, kvantitatív PCR-reakció során a qPCR-készülék a detektált fluoreszcens jel nyomon követése érdekében reakciónként amplifikációs (kinetikai) görbét rajzol (**4. ábra**), mely alapján ciklusról ciklusra láthatóvá válik az általunk sokszorosítani kívánt termék mennyiségének növekedése. Az amplifikációs görbét öt fő részre bonthatjuk: kezdeti szakasz, exponenciális szakasz, lineáris szakasz, hanyatló fázis és végül a plató fázis. A reakció kezdeti szakaszában a PCR-termék fluoreszcenciája nem éri el a kimutathatósági határt. Egy idő után megjelenik a fluoreszcens jel, és egy ideig ciklusról ciklusra exponenciálisan nő. Ez után egy lassabb fluoreszcencia-növekedés figyelhető meg, aminek fő oka az enzim aktivitásának, valamint a reakciópartnerek (dNTP, primerek) fokozatos csökkenése (lineáris szakasz). A hanyatló fázisban a fluoreszcencia növekedése tovább lassul, majd ezt követően a reakció a plató fázisba lép, amelyben a termékképződés már elhanyagolhatóan csekély.

Az amplifikációs görbét az exponenciális szakaszban egy, az alapvonallal párhuzamos egyenes, a „threshold line” metszi el, mely azonos fluoreszcenciaérték mellett az egyes görbékhez hozzárendelhető ciklusszám (C_T) értékeket metszi ki az amplifikációs görbékből. C_T -értéknek (küszöbérték-, vagy áttörési ciklusszám) azt a ciklusszámot nevezzük, amelyben a görbe egyértelműen kiemelkedik a háttérből. A valós idejű PCR vizsgálatokat mindig az exponenciális fázisban végezzük. A „threshold line” generálása a szoftver által automatikusan,

vagy a felhasználó által manuálisan történik. A továbbiakban az adatok kiértékeléséhez a C_T és E (hatékonyság) értékeket szokás felhasználni.

A valós idejű PCR által végzett ún. kinetikai detektálással ellentétben a hagyományos (*szemi-kvantitatív*) PCR során csupán végpont-detektálás történik, azaz nem válik lehetővé az amplifikálható termék mennyiségi növekedésének feltérképezése, csupán egy „végeredményt” kapunk, melynek ellenőrzését gélelektroforetikus úton valósíthatjuk meg.

2.5.3.2 A real-time PCR készülékek felépítése



5. ábra. RotorGene 6000 real-time PCR készülék keresztmetszeti ábrája (www.qiagen.com).

A hagyományos PCR berendezések plate-es elrendezésűek, vagyis a minták egy fémlemezbe kerülnek, melynek hőmérséklete a beprogramozott ciklusok szerint pontosan változik. A valós idejű PCR készülékek mintatartói különböző elrendezéseket mutatnak. A kapillárisokba helyezett minták (*Roche*) hőmérséklete gyorsan változtatható, viszont magas üzemeltetési költséget von maga után. A hagyományos PCR-re emlékeztető plate-es (*Bio-Rad iCycler*) elrendezés a legelterjedtebb. Ezek mellett kifejlesztettek egy rotoros (*QIAGEN*) konfigurációt is. A kísérletekhez használt Rotor Gene 6000 típusú, 6 csatornás rotoros elrendezésű készülék keresztmetszeti ábrázolása az 5. ábra látható. A mintákat az ábrán piros színnel jelölt fém mintatartó rotorba helyezük el. A rotort az alatta elhelyezkedő motor forgatja meg, mely percenként 400 fordulatot tesz. A reakcióelegyben lévő fluoreszcens festéket a rotor alatt elhelyezkedő, változtatható hullámhosszon üzemelő LED fényforrás gerjeszti. Az így keletkezett fluoreszcens fényt egy lencse fókuszálja a szűrők irányába, melyek csak a megfelelő

hullámhosszúságú fényt engedik át. A fókuszált és szűrt fényt fotoelektron-sokszorozó erősíti, majd egy megfelelő detektor érzékeli. A ciklusokhoz szükséges hőmérsékletemelést a forgó rotor körüli térben elhelyezett fűtőszálak idézik elő. A csövekkel telített forgó rotor okozta belső turbulens légáramlat tökéletesen homogén hőmérsékletű teret nyújt. A reakcióelegyek, vagyis a rotor körüli tér hűtése a laboratórium levegőjével történik oly módon, hogy a berendezés levegőt szív be, mellyel kiszorítja a reakciótérből a forró levegőt.

A hagyományos és a valós idejű PCR berendezések között különbség, hogy az utóbbi fényforrással és detektorral lett felszerelve. A valós idejű PCR berendezések számítógéppel állnak összeköttetésben, mely regisztrálja a detektorba érkező jeleket, és egy szoftver segítségével a fluoreszcencia adatokat grafikonon jeleníti meg. A szoftver számos más feladatot is ellát, segítségével gyakorlatilag az összes kísérleti körülményt beállíthatjuk, majd a reakció végén a nyers adatokat matematikai algoritmusok segítségével kiértékelhetjük.

A kísérlet során nyert amplifikációs / kinetikai PCR-görbék a nyers adatok, melyeket a későbbiekben feldolgozunk és kiértékelünk. Különböző matematikai módszerek állnak rendelkezésünkre, melyek segítségével a nyers adatokból tényleges információkat számolhatunk. Ilyen információk pl. a DNS-koncentráció, DNS-kópiaszám, vagy egyes gének relatív expressziója. Attól függően, hogy milyen minták állnak rendelkezésünkre, és azokból milyen jellegű információkat szeretnénk megtudni, a kvantitatív real-time PCR két alapvető metodikája közül választhatunk. Ezek az abszolút és relatív kvantifikálás. A nyers adatok kiértékelésekor alkalmazott matematikai algoritmusok mindkét esetben megegyeznek. Az alapvető különbségek a kísérletek megtervezésében és a nyers adatok kiértékelési stratégiájában rejlenek.

2.5.3.3 Abszolút kvantifikálás

Az abszolút kvantifikálás lényege, hogy egy ismert DNS-szekvenciát tartalmazó DNS-oldatból koncentráció (vagy kópiaszám) adatot nyerjünk. Ehhez szükségünk van egy – a vizsgált szekvenciát pontos koncentrációban (vagy kópiaszámban) tartalmazó – DNS-oldatra, melyből hígítási sort készítünk. A kalibrációs oldat elkészítéséhez szükséges DNS-templátot leggyakrabban plazmidba zárva tárolják, és pontos koncentráció (vagy kópiaszám) adatokkal látják el. Ez a DNS-szakasz lehet izolált és tisztított formában tárolt, vagy mesterségesen szintetizált. A hígítási sor kalibrációs egyenest ad a valós idejű PCR reakció végén, melyről leolvasható a vizsgált mintára vonatkozó szükséges információ, vagyis a koncentráció (vagy a kópiaszám). Abszolút kvantifikálást leggyakrabban élelmiszerek szennyező komponenseinek (pl. GMO-tartalom) DNS-szintű mennyiségi kimutatására (Vaitilingom és mts., 1999), illetve mikroorganizmusok kvantitatív kimutatására növényi / állati / humán mintákban (Garson és mts., 2005) alkalmazzák.

2.5.3.4 Relatív kvantifikálás

Az abszolút kvantifikálással ellentétben a relatív kvantifikálás során nincs szükség a vizsgált DNS-szakaszra és hígítási sorozatra. A vizsgált gén, vagyis a célgén szekvenciájának ismerete természetesen szükséges a primertervezéshez. A relatív kvantifikálást többek között gének expressziójának vizsgálatára, gyógyszerhatóanyag, vagy más kémiai ágens hatására bekövetkező génexpresszió-változás nyomon követésére használják (Nellemann és mts., 2001). A módszert arra fejlesztették ki, hogy rá tudjunk világítani egy vagy több gén különböző körülmények közötti (pl. gyümölcs érési állapota, kezelt vagy kezeletlen növény, eltérő genotípusok, eltérő tárolási idő stb.) expresszióváltozására.

Minden génexpressziós vizsgálat az RNS izolálásával kezdődik, mivel egyes gének transzkripciójának mértékére vagyunk kíváncsiak. RNS-izolálás során a hírvivő és egyéb (rRNS, tRNS, snRNS) RNS-ek összességéhez jutunk. Az RNS nem alkalmas közvetlen PCR-vizsgálatra, ezért ezen oldatból cDNS-t (copy DNA) készítünk reverz transzkriptáz enzim segítségével. A reverz transzkripció, azaz a cDNS-átírás történhet szekvensspecifikus, random hexamer, vagy oligo(dT) primerek segítségével. Relatív kvantifikáció során leggyakrabban az oligo(dT) vagy random hexamer primerek használatosak.

Relatív génexpressziós kísérleti rendszerben szükségünk van egy viszonyítási alapra, amellyel egy adott gén – különböző mintákban való – expressziós különbségeit sikerül kimutatni. Ehhez olyan gének használhatók, melyek kifejeződése, vagyis expressziója az adott kísérleti körülmények között (pl. gyümölcsérési sor, kezelt vagy kezeletlen növény, eltérő genotípusok stb.) állandó szintet mutatnak. Ezeket a géneket referenciagéneknek nevezzük. A génexpressziós vizsgálatokban használatos referenciagéneket általában az ún. háztartási („housekeeping”) gének sorából választjuk ki. Ezek a gének legtöbbször az alap anyagcsere-folyamatokban vesznek részt, expressziójukat konstans szint jellemzi (pl. gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz, azaz GAPDH). Különböző kísérleti körülmények vagy kezelések során mindig a legstabilabb expresszióval rendelkező referenciagént kell választani. Ez azt jelenti, hogy valamilyen kezelés során egy kezeletlen és kezelt növény expressziója a *GAPDH* génre nézve nem változik, vagyis viszonyítási alapként szolgálhat, melynek használatával egy másik gén (célgén, vagy target gene) expressziójának megváltozása kimutatható. Ez a relatív génexpressziós vizsgálatok alapja.

2.5.4 Tömegspektrometriás analízis

Az antioxidáns kapacitás jellemzésével bizonyos minták szabadgyökfogó vagy redukáló képességét tudjuk meghatározni. E tulajdonságot kialakító molekulák minőségi és mennyiségi meghatározása napjainkban kapcsolt analitikai rendszerekkel lehetséges. E rendszerek

kromatográfiás szétválasztásból (mely során a mérendő komponensek szelektíven szétválaszthatók a minta mátrixtól) és tömegspektrometriás azonosításból állnak (mely során a tömeg/töltés arányuk alapján szelektíven azonosíthatók). Oldható komponensek esetén folyadék-, míg illékony komponensek vizsgálatkor gázkromatográfiát alkalmazunk (Pillonel és mts., 2002). Antioxidáns hatással rendelkező vegyületek vizsgálatára általában LC-MS rendszereket alkalmaznak. A szelektív tömegmérés miatt azonban nem szükséges ilyen rendszerek esetében tökéletes folyadékkromatográfiás elválasztásra törekedni (Rak és mts., 2010).

Különbéle működési elven alapuló tömegspektrométerek vannak forgalomban. Közös jellemzőjük, hogy ezek a műszerek egy ionforrásból, ionoptikából, analizátorból, detektorból, vákuum rendszerből és számítógépes rendszerből állnak. A minta először ionizálódik, majd az így keletkezett ionokat úgy nevezett ionoptikák és analizátor segítségével nagy vákuumban eljuttatják a detektorig, melyet egy számítógépes rendszer dolgoz fel (Zhang és Smith, 1993; Aebersold és Mann, 2003).

Számos ionforrás létezik, ám napjainkban az úgy nevezett lágyionizációs forrásokat részesítik előnyben, mivel ezek használatával több információ nyerhető a mintákban található komplex komponensekről. Ezek közül manapság az elektropray ionforrások (ESI: electrospray ionsource) a legelterjedtebb és legszélesebb körben alkalmazott ionforrások (Yamashita és Fenn, 1983; Abrankó és mts., 2011a). Az analizátorok tekintetében is többféle típusról beszélhetünk, melyek az ionok elválasztási módjában különböznek egymástól. Ezek közül két típust érdemes kiemelni: a manapság legelterjedtebben használt elektromos mezőt felhasználó (pl.: kvadrupól) és a repülési idő („Time-of-flight”, TOF) tömegspektrométereket, melyek közül az előbbit inkább mennyiségi, az utóbbit minőségi azonosításra alkalmazzák (Schwartz és mts., 2002; Fuchs és mts., 2009). Léteznek továbbá úgynevezett tandem tömegspektrométerek, melyek kettő vagy több MS-ből állnak, és ezáltal a vizsgált molekulák szerkezetéről jóval több és pontosabb információt képesek szolgáltatni. A kapcsolt rendszerek nagy előnye, hogy alkalmasak a kiválasztott komponensek szerkezetének és mennyiségének meghatározására, továbbá ismeretlen komponensek feltérképezésére (Ellis és Roberts, 1997). Kísérleteinket egy HPLC-ESI-(Q)TOF MS kapcsolt rendszeren végeztük.

3 Célkitűzések

Munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. A kajszi és a meggy flavonoid-bioszintézisének kulcsenzimeit kódoló gének azonosítására alkalmas primerek tervezése.
2. Az amplifikált szakaszok DNS-szekvenciájának meghatározása és azonosítása.
3. A szekvenciák alapján a valós idejű PCR kísérletekhez megfelelő primerek tervezése.
4. A gyümölcsminták valós idejű PCR technikával való vizsgálatának optimalizálása (RNS-kivonás, genomi szennyeződés befolyásoló hatásának értékelése, referenciagén kiválasztása, reakciókörmények optimalizálása).
5. Felmérni a kajszi gyümölcs antioxidáns kapacitásának változását az érés folyamán, eltérő gyümölcsrészek és genotípusok szerint.
6. Jellemezni a flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének expresszióját az egyes érési fázisokban két különböző antioxidáns kapacitású gyümölcsöt termő kajszi és meggy genotípus esetében.
7. Azonosítani az eltérő antioxidáns kapacitás hátterében álló géneket.
8. A kajszi mintasorozatok fő flavonoid komponenseinek minőségi és mennyiségi vizsgálata HPLC-ESI-(Q)TOF MS kapcsolt rendszer alkalmazásával, és ezen adatok összevetése a génexpressziós eredményekkel.

4 Kísérleti anyagok és módszerek

4.1 Növényanyag és minta-előkészítés

Vizsgálatainkhoz hat kajszigenotípust ('Auróra', 'Ceglédi arany', 'Gönci magyarkajszí', 'Harcot', 'Preventa' és 18/61-es hibrid), továbbá három meggygenotípust ('Pipacs 1', 'Újfehértói fürtös' és 'VN-1' hibrid árufajták) használtunk fel. A kajszigyümölcsök a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszék szigetcsépi és soroksári génbankjából származtak. A meggyfajtákat az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht. bocsátotta rendelkezésünkre. A kajszí- és meggy-gyümölcsöket öt különböző érési stádiumban szedtük le. Kajszí esetében az egyes érési állapotokra a következő fenotípusos jegyek voltak jellemzőek: 1: éretlen, kisméretű, zöld színű gyümölcs, 2: nagyobb méretű, zöld gyümölcs, 3: közel kifejlett méretű, zöld gyümölcs, 4: kifejlett méretű, színeződő gyümölcs, 5: teljesen érett, a fajtára jellemző méretű és színű gyümölcs. A meggy esetében: 1: éretlen, kisméretű, zöld gyümölcs, 2: a piros fedőszín megjelenik, 3: világospiros színű gyümölcs, 4: nagyobb, intenzívebb piros színű gyümölcs, 5: teljesen érett, a fajtára jellemző méretű és színű gyümölcs (9. ábra).

A minták előkészítése a gyümölcsök különböző részeinek szétválasztását, és azok folyékony nitrogénben való azonnali fagyasztását jelentette. A kajszí- és meggy-gyümölcsök héját és húsát használtuk mintaként, melyeket -80°C -on tároltunk.

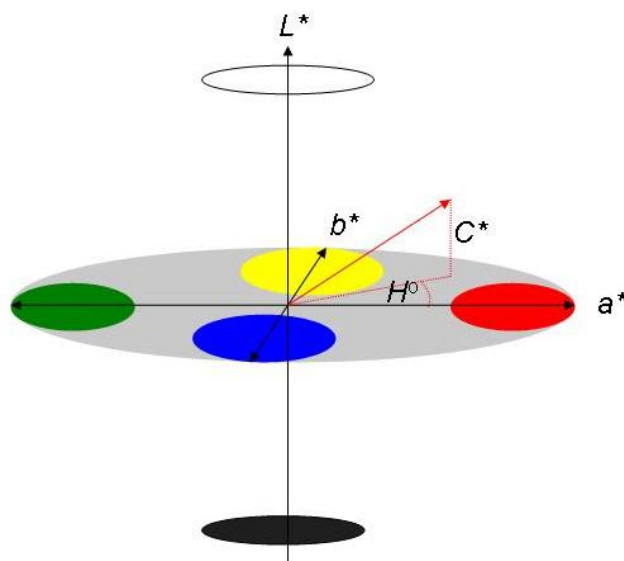
4.1.1 Az érési folyamatot jellemző paraméterek meghatározása

A gyümölcsök minden érési állapotáról fényképet készítettünk Canon PowerShot S5 IS típusú digitális fényképezőgéppel. A friss gyümölcsök méretét (magasság, varratra merőleges és varrattal párhuzamos átmérő), tömegét és színparamétereit 35 ismétlésben rögzítettük. A méreteket digitális tolómérővel vettük fel, mm-ben rögzítettük két tizedes jegy pontossággal, a tömegértékeket g-ban két tizedes jegy pontossággal. A gyümölcsökből préselt lé oldható szárazanyag-tartalmát (brix érték) digitális refraktométerrel (ATAGO Corporation, Tokió, Japán) mértük 3-10 ismétlésben.

A gyümölcsök érése során bekövetkező színváltozást a CIELAB színkoordináták (X, Y és Z) mérésével követtük Konica Minolta CR-410 típusú (Tokió, Japán) színmérő készülék használatával. A koordináta adatokból L^* , a^* és b^* értékek számíthatók, melyek szintén egy koordináta-rendszer tengelyeinek feleltethetők meg (6. ábra). Az L^* , a^* és b^* értékekkel, vagyis a háromdimenziós színtérben elhelyezkedő koordinátákkal egy színpont határozható meg. A színvektor a koordináta-rendszer origójából mutat a színpontra. Ez a színpont a minta színét jellemzi. A háromdimenziós koordináta-rendszerben az egyik koordinátatengely az a^* , a másik a

b^* , a harmadik pedig az L^* értékeit jelenti. Az a^*b^* síkon a négy alapszín helyezkedik el, az L^* tengely mentén a világosság mértéke változik. Az a^* és b^* tengelyek metszéspontjában mindkét tengely 0 értékkel rendelkezik. Az a^*b^* tengelyekre fektetett horizontális síkot a két tengely metszéspontjában metszi az L^* tengely. Az a^* és b^* értékek -100 és 100 között változnak, az L^* tengely 0 és 100 között. Az L^* tengely (lightness) a tengely 50-es értékénél metszi az a^* és b^* tengelyeket. A négy alapszín az alábbi koordinátaértékek között helyezkedik el: a vörös ($a^* = 0 - +100$), a zöld ($a^* = 0 - -100$), a sárga ($b^* = 0 - +100$) és a kék ($b^* = 0 - -100$). Ezen értékek a színezet (hue) értékét adják meg. A függőleges L^* tengelyen a világosság mértéke adható meg, mely a tengely közepén – vagyis az a^* és b^* értékekhez tartozó tengelyek metszéspontjánál – 50-es értékkel rendelkezik, mely szürke színnek felel meg. Az L^* tengely végpontjai a fehér (100) és fekete (0) színeket jelentik.

A CIELAB rendszer két további jellemzőt is fel szokott tüntetni: C^* és H^o . A telítettség, vagy más néven króma (C^*) a világosság tengelytől való távolságot jelenti; $C^*=(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$. A színezeti szög (H^o) a színtérben a színvektor irányának a vörös iránytól való elforgatását jelenti, értékét fokban adjuk meg; H^o =arkusz tangens (b^*/a^*) (Akin és mts., 2008, Ruiz és mts., 2005b).



6. ábra. A CIELAB színekoordináták.

4.1.2 DNS-izolálás

A genomi DNS-t meggyelevelekből DNeasy Plant Mini Kittel vontuk ki (QIAGEN, Németország) a gyártó utasításait (Plant Tissue Protocol) követve.

4.1.3 RNS-izolálás

Négy különböző protokollt hasonlítottunk össze:

1. Kit: QIAGEN RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Németország), a gyártó utasításai (Plant Tissue Protocol) szerint.
2. CTAB-alapú protokoll: Jaakola és mts. (2001) alapján.
3. Aceton-alapú protokoll: Asif és mts. (2006) alapján.
4. Forró bórsavas extrakció: Wan és Wilkins (1994) protokollja alapján.

Az RNS izolálása során közel azonos mennyiségű (~200 mg) mintát használtunk fel. Egyes RNS-oldatok DN-áz (Fermentas Life Sciences, Szeged) emésztését a gyártó utasításai szerint végeztük. Az RNS-oldatok koncentrációinak meghatározását és a cDNS oldatok koncentrációinak ellenőrzését Nano Drop ND-1000 (Bio-Science, Magyarország) spektrofotométerrel végeztük.

4.1.4 cDNS-szintézis

A tisztított RNS reverz transzkripcióját RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis kittel (Fermentas) végeztem. Minden reakcióba azonos mennyiségű, 1000 ng RNS-t mértünk be. A szintézis során külön oligo(dT)₁₈ vagy random hexamer primert alkalmaztunk annak felderítése érdekében, hogy a különböző primerekkel készített cDNS-oldatok milyen tulajdonságokban térnek el a valós idejű PCR kísérletek során. Ez a vizsgálat részét képezte a valós idejű PCR kísérletek optimalizálásának.

A cDNS-szintézis reakciói során reakciónként 1 µl RiboLock ribonukleáz inhibitor (20 U/µl), valamint 1 µl M-MuLV reverz transzkriptáz enzimet (200 U/µl) használtunk fel. A 19 µl végterméket hússzorosára hígítva, a PCR és qPCR reakciónként 1 µl, hozzávetőleg 50 ng cDNS-t használtunk fel.

4.1.5 PCR-analízis saját primerekkel

Az NCBI GenBank és EST adatbázisaiból letöltött szekvenciák alapján az alábbi enzimeket kódoló génekre (**3. ábra**) terveztünk primereket: *PAL* (fenilalanin-ammónia-liáz), *C4H* (cinnamát-4-hidroxiláz), *4CL* (4-kumaroil-CoA-ligáz), *CHS* (kalkon-szintáz), *CHI* (kalkon-izomeráz), *F3H* (flavanon-3-hidroxiláz), *F3'H* (flavonoid-3'-hidroxiláz), *F3'5'H* (flavonoid-3'5'-hidroxiláz), *DFR* (dihidroflavonol-4-reduktáz), *ANS* (antocianidin-szintáz), *ANR* (antocianidin-reduktáz), *LAR* (leukoantocianidin-reduktáz), *UFGT* (UDP-glükóz:flavonoid-3-O-glükoziltranszferáz), *FLS* (flavonol-szintáz) és *GAPDH* (glicerinaldehid-3-P-dehidrogenáz). A *PAL* génre a korábban cseresznyére tervezett primerpárt használtuk (Sonneveld és mts., 2003).

A polimeráz láncreakciók templátjaként a tisztított RNS-kivonatokból átírt cDNS-ek és a genomi DNS-izolálás során kapott DNS szolgáltak. A PCR-hez 50 ng DNS-t vagy cDNS-t használtunk 25 µl végtérfogatban. A PCR-elegy összetétele az alábbi volt: 10× reakciópuffer (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,3 µM az adott primerekből és 1 U *Taq* DNS-polimeráz (Fermentas). A PCR során alkalmazott hőmérsékleti ciklus a következő lépésekből állt: 95 °C 2 min, 35 ciklus során 95 °C 30 s, (primer szekvenciájától függően) 53-60 °C 1 min és 72 °C 1 min, majd 72 °C 5 min.

A PCR Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, USA) típusú PCR készülékben történt. A PCR során felhasznált primerek nukleotidsorrendjét, tapadási hőmérsékleteit (T_a), felhasznált templátot és a termék hosszát az **5. táblázat** tartalmazza.

5. táblázat. A PCR során felhasznált primerek nukleotidsorrendje

Primer neve	Primer szekvenciája	T_a^* (°C)	templát	termék hossza (bp)
PAL-F3	CAAATTGAAGCTGCAGCAATTATGGA	60	kajszi és meggy	1036
PAL-R4	GGTAAGACCTGCATTCCGTAATCCTGT			
C4H-F1	CTTCACBAACAARGTSGTSC	56,5	kajszi és meggy	678
C4H-R1	CYTTSAYCACRGCTTG VAG			
4CL-F1	GAGATTTGCATTAKAGGTGACCA	57	kajszi és meggy	442
4CL-R1	GCTMTCAASTCCTTCCGCAAGAT			
CHS-F1	GCTCAAAGAAAAATCCAGCG	56	kajszi és meggy	758
CHS-R	GGTGTGCAATCCAGAATAG			
CHI-F	GAARGGYAAGACSGCCSAGGAG	57,5	kajszi és meggy	481
CHI-R	TCSAMTTYCATTTCGGC			
F3H-F	GAWATYCCGATCATYTCSCT	53	kajszi és meggy	874
F3H-R	TCATCTTCTTCTTG TACATCTC			
F3'H-F	AGCTGCACAAGAGGTTTGATG	58	kajszi és meggy	886
F3'H-R	AGTAGCAGCTAGGAGGCAC			
F3'5'H-F1	TTACAAGCTGTGATGAAAGAAAC	55,5	kajszi és meggy	380
F3'5'H-R1	CCAAACTTCTCWGAAAGATCCA			
DFR-F1	GAAGAAGGTGAAGCATCTGYTGGA	60	kajszi és meggy	F1+R=498
DFR-F2	GACGCACYTGACGCTGTGGAAGG		kajszi	F2+R=459
DFR-R	GTAATGAGGCTTGGTGGCATGGA		kajszi és meggy	
ANS-F1	CTCARGTTCCMACCATTTGATTG	53	meggy	F1+R=769

Primer neve	Primer szekvenciája	T _a * (°C)	templát	termék hossza (bp)
ANS-F2	ATCCCAAARGAGTACATCAG	53	kajszi	F2+R=811
ANS-R	CATGAAATCCTCACCTTCTC		kajszi és meggy	
ANR-F	GAAACTTAGCAACTGAAAGAGC	55	kajszi	846
ANR-R	GCTCAGGAACACTGGTATTG		kajszi	
LAR-F	GTGCYACYGGYTTTCATCGGGAG	58	kajszi	F+R=751
LAR-R	CTTTCTGGTATRCGRTTMTCTGCAG		kajszi	
LAR-F2	GTTYGTVGCYGAAGCYAGCCT		kajszi	F2+R3=432
LAR-F3	CCTTCTAAGGCTGACAYCRTCAA		kajszi és meggy	F3+R3=362
LAR-R2	GGTGGVABAACCTCVGAAGG		meggy	F3+R2=395
LAR-R3	WAGTAGGGCCAAGARGCAAT		kajszi	
UFGT-F4	CCDCCGKTGTAYCCKGTGG	57	kajszi és meggy	F4+R1=410
UFGT-R1	TTCCACCCRCARTGRGABAC			
UFGT-F6	GMTYGCHGGRTTYGTSVTC	57	kajszi	F6+R3=1006
UFGT-R3	GCTCTTYTCACTMATYTCYTTCAC			
GAPDH-F3	GAYTGGAGRGGTGGAMRWG	60	kajszi	569
GAPDH-R5	GTGTAACCCAAGAYKCCSTT			

* T_a = T_m - 5 °C

4.1.6 A PCR-termékek ellenőrzése gélelektroforézissel

Az agaróz gélelektroforézist a Sambrook és Russell (2001) által leírt módon alkalmaztuk. A nukleinsavakat etídium-bromid (Merck) ill. GelRedTM (Biotium, USA) fluoreszcens festékanyag hozzáadásával tettük láthatóvá. A PCR-termékek agaróz gélelektroforézisét 1%-os, a qPCR termékek agaróz gélelektroforézisét 2,5%-os gélen végeztük (1,5 h 100 V). Az elektroforézis során a térerősség 10 V/cm volt. Az agarózt (Sigma) 1× TBE pufferben, gélből történő visszaizolálás esetén 1× TAE pufferben oldottuk fel. Az 500 bp-nál nagyobb fragmentumok méretének megállapításához 1-kb+ DNS-markert (Promega), a 200 bp-nál kisebb fragmentumok méretének megállapításához GeneRuler Low Range DNS-markert (Fermentas) használtunk.

4.1.7 A PCR-termékek tisztítása, klónozása és szekvenálása

A megfelelő mérettel rendelkező PCR-termékek agarózgélből történő kivágását éles szikével, visszaizolálását QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Németország) segítségével végeztük a gyártó utasításait követve.

A PCR-termékek 3' végén általában extra adenin van, ezért klónozásuk ebben az esetben olyan plazmiddal történik, melynek 3' végén extra timin található. Vizsgálatainkhoz a pGEM-T Easy Vector Systemet (Promega) használtuk. A ligálás egy éjszakán át 4 °C-on 10 µl végtérfogatban történt: 20-50 ng kitisztított PCR-termék, 3 U T4 DNS-ligáz, 50 ng pGEM-T Easy Vector, 2× puffer (60 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10 % polietilén-glikol) (Promega), desztillált vízzel kiegészítve. A klónozott fragmentumokat JM109 kompetens sejtekbe transzformáltuk. A teljes ligációs elegyet 80 µl -70 °C-on tárolt kompetens baktériumszuszpenzióval finoman összeráztuk, majd 20 percen át jégen tartottuk, azután 45 másodpercig 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd azonnal jégre tettük 2 percig. Végül 950 µl 37 °C-os folyékony, antibiotikummentes LB táptalajt adtunk hozzá, és másfél óráig rázattuk 37 °C-on, 150 rpm fordulatszámmal. Ezután 100-400 µl-nyi szuszpenziót szélesztettünk LB/ampicillin/IPTG/X-gal szilárd táptalajon: 10 g/l Bacto-tripton, 5 g/l Bacto-élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 7 g/l agar, 100 µg/ml ampicillin pH=7; a lemez felszínén 100 mM IPTG-t és 50 mg/ml X-Gal-t oszlattunk szét, fél óráig 37 °C-on tartottuk a szélesztés előtt. A kész lemezeket fordított helyzetben 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.

A ligáció sikerességére a baktériumkolóniák színe, majd a kolónia-PCR mutat rá. Minden lemezről legalább 3 db különálló, nagyméretű, fehér színű telepet oltottunk le steril pipettahegy segítségével, melyet először egy „masterplate”-hez érintettünk, majd beletettük a kolónia PCR reakcióelegybe. A kolónia-PCR reakcióelegy összetétele a már említett PCR reakcióelegy (ld. 4.1.4) összetételével megegyezett. A felhasznált primerek az M13-F (GTAAAACGACGGCCAGT) és M13-R (CAGGAAACAGCTATGAC) voltak, melyek az inszertet nem tartalmazó plazmidból 273 bp hosszúságú fragmentumot szaporítanak fel. Az inszertet tartalmazó plazmidon végzett kolónia-PCR az inszert méretét 273 bp-ral meghaladó méretű PCR terméket eredményezett. A kolónia-PCR során alkalmazott hőmérsékleti ciklus a következő lépésekből állt: 95 °C 2 min, 40 ciklus során 95 °C 30 s, 55 °C 45 s és 72 °C 1,5 min, majd 72 °C 5 min. A kolónia-PCR során keletkezett termékek méretét 1 % TAE agarózgélben ellenőriztük. A „masterplate”-en az eredeti telepeket szaporítottuk fel egy éjszakán át 37 °C-on.

A „masterplate”-en az inszertet is tartalmazó telepekhez steril fogpiszkálót érintettünk, melyet beletettük egy 2 ml folyékony LB táptalajt és 50 mg/ml ampicillint tartalmazó steril csavaros üvegedénybe. Az üvegeket jól lezárva egy éjszakán át 37 °C-on rázattuk 200 rpm fordulaton. A plazmidokat Rapid Plasmid DNA Mini-Prep Kittel (Biobasic, Kanada) izoláltuk. A

plazmidok emésztését – az inszertek méretének ellenőrzése céljából – *EcoRI* restriktációs enzimmel (Fermentas) végeztük 37 °C-on 2 órás emésztéssel. Szekvenciájuk meghatározása ABI PRISM 54 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) automata DNS-szekvenátorral történt. Valamennyi vizsgált gén esetében három klón szekvenálását végeztük el mindkét irányban. A DNS-szekvenciákat benyújtottuk a National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank nemzetközi adatbázisba (lásd 5.4).

4.2 A valós idejű PCR

A valós idejű PCR kísérleteket Corbett Research gyártmányú Rotor Gene 6000 készülékben (QIAGEN) végeztük, mely a kvantitatív analízis mellett jó felbontású olvadáspont-analízis („Melting Analysis”) funkcióval is rendelkezik. A zöld színhez tartozó csatornát használtuk, mely a SYBR Green és EvaGreen[®] (Biotium) fluoreszcens festékek által kibocsátott zöld fény gerjesztésére alkalmas.

Munkánk során az EvaGreen[®] nem szekvenancia-specifikus fluoreszcens festéket használtuk, mely a kettősszálú DNS-molekulák kis árkához kötődve teszi lehetővé azok fluorimetriás detektálását. Kísérleteinkben MyTaq[™] HS Mix (2×) komplex DNS-polimeráz oldatot (Bioline, Anglia) használtunk.

4.2.1 Gradiens PCR

A gradiens PCR kísérleteket PTC-200 (MJ Research, USA) készülékkel végeztük. A PCR során alkalmazott hőmérsékleti ciklus a következő lépésekből állt: 95 °C 2 min, 40 ciklus során 95 °C 20 s, 52-64 °C 20 s és 72 °C 20 s, majd 72 °C 1 min. A tapadási hőmérséklet 48 °C-tól 64 °C-ig fokozatosan változott (48,0 °C, 48,1 °C, 49,5 °C, 51,2 °C, 52,1 °C, 54,0 °C, 56,3 °C, 57,9 °C, 60,1 °C, 61,9 °C, 63,2 °C, 64 °C). A gradiens PCR segítségével a referenciagének primerjeinek optimális tapadási hőmérsékletét határoztuk meg.

4.2.2 Hígítási mátrix

Hígítási mátrix készítése során a primerkoncentrációkat: 0,05 μM, 0,3 μM, 1 μM és 2 μM végkoncentráció, valamint a cDNS mennyiségét 50, 100 és 150 ng értékek között vizsgáltuk. Az összes lehetséges primerkoncentrációt az összes lehetséges cDNS-mennyiséggel összemértük. Ezt követően egy másik hígítási mátrixot készítettünk, mely során a primerkoncentrációt egy szűkebb tartományban (0,1 μM, 0,3 μM, 0,6 μM) változtattuk, amikor különböző mennyiségű MgCl₂-ot adtunk az egyes PCR-elegyekhez. A MyTaq PCR mixet illetően a gyártó ajánlja a

gyári 3 mM MgCl₂ koncentráció emelését a hatékonyság növelése érdekében. A második hígítási mátrix során a MgCl₂ végkoncentrációja 3 mM, 4 mM és 5 mM volt a PCR-oldatokban. A hígítási mátrixokat a qCHI F1+R1 primerpárral (**7. táblázat**), a ‘Preventa’ gyümölcshús mintasorozat felhasználásával készítettük.

4.2.3 A referenciagén kiválasztása

Valós idejű PCR kísérleteink során hat különböző referenciagén expressziós stabilitását vizsgáltunk ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’, valamint ‘VN-1’ ‘Pipacs 1’ és gyümölcsök héj- és hússzöveveiből készített mintákon valamennyi érési fázisban. Ezek közül három korábban leírt (18S rRNS: 18S riboszómális RNS; UBQ10: ubikvitin 10; TEF-II: transzlációs elongációs faktor II) és három saját tervezésű (ACT: aktin; GAPDH: gliceraldehid-3-P-dehidrogenáz; RP-II: RNS-polimeráz II) primer szerepelt. A referenciagének stabilitásának vizsgálatokor alkalmazott primerek nukleotidsorrendje a **6. táblázatban** található.

6. táblázat. Az egyes referenciagének stabilitásának vizsgálatához szükséges primerek

Primer neve	Primer szekvenciája	Termék (bp)	T _a * (°C)	Forrás
18SRNS-F	TAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTG	114	60	Tong és mts., 2009
18SRNS-R	CTAAGCGGCATAGTCCCTCTAAG			
ACT-F	GTGCCTGCCATGTATGTTGCCA	226	60	saját tervezés
ACT-R	CAGTGGTGGTGAACATGTACCCYC			
UBQ10-F	AAGGCTAAGATCCAAGACAAAGAG	146	57	Tong és mts., 2009
UBQ10-R	CCACGAAGACGAAGCACTAAG			
RP-II-F3	CATGCCAAGTGGTCACCTGCAG	126	60	saját tervezés
PR-II-R3	GGTAGGACTACTTTCAACCCAAGCCTTC			
TEF-II-F	GGTGTGACGATGAAGAGTGATG	129	56	Tong és mts., 2009
TEF-II-R	TGAAGGAGAGGGAAGGTGAAAG			
GAPDH-F9	CTTGCAAGGTYATYMAYGAYAG	150	55	saját tervezés
GAPDH-R6	GCTRGGAATGATGTTGAAKG			

* T_a = T_m - 5 °C

A GAPDH F9-R6 degenerált primereket csak a kezdeti qPCR kísérletek során alkalmaztuk a vizsgált gén expressziós stabilitásának vizsgálatára. A célkísérletek során kizárólag nem degenerált és „assay” specifikus primereket használtunk. A hat primerkombináció

felhasználásával végzett kísérletek végén olvadáspont analízist végeztünk. A keletkezett termékek olvadási hőmérsékletei a következők voltak: 80,1 °C (18S RNS F+R), 82,4°C (ACT F+R), 89,5 °C (UBQ10 F+R), 78,7 °C (RP-II F3+R3), 88,3 °C (TEF-II F+R), 79,6°C (GAPDH F9+R6).

A hat referenciagén expressziós stabilitásának vizsgálatát követően a legnagyobb expressziós stabilitást mutató gént alkalmaztuk a qPCR kísérletek során.

4.2.4 A célgének qPCR vizsgálata

A célgének, vagyis a *PAL*, *C4H*, *4CL*, *HCT* (*hidroxifahéjsav-transzefráz*), *C3H* (*fahéjsav-3-hidroxiláz*), *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, *FLS*, *ANS*, *ANR*, *LAR*, *UFGT*, *MYB* (*MYB transzkripció faktor*) és *MYB10* (*MYB10 transzkripció faktor*) expresszióit saját tervezésű primerpárokkal vizsgáltuk. A *PAL*, *C4H*, *4CL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *LAR*, *ANS*, *ANR* és *UFGT* enzimek, valamint a *MYB* transzkripció faktor génexpressziós vizsgálata során felhasznált primerpárok saját szekvenciák alapján készültek. A *C3H* és *4CL* enzimet kódoló gén kifejeződésének vizsgálata Dardick és mts. (2010) által közölt *C3H* és *4CL* (F2 és R2) primerszekvenciával történt. A *HCT*, *FLS* és *F3'5'H* enzimek expressziós vizsgálatához szükséges primerek a kérdéses gének NCBI GeneBank adatbázisban található ortológ szekvenciák és az őszibarack genomszekvencia (<http://www.rosaceae.org/node/355>) alapján készültek. A *MYB10* transzkripció faktor expressziós vizsgálata a Lin-Wang és mts. (2010) által közölt primerszekvenciákkal történt. A valós idejű PCR kísérletek során felhasznált primerek szekvenciái, a felhasznált templát, valamint a primerek által felszaporított termék hossza a **7. táblázatban** található.

7. táblázat. A valós idejű PCR kísérletek során felhasznált, a célgénekre tervezett primerek

Primer neve	Primer szekvenciája	Templát	Termék hossza (bp)
qPAL-F	TGTCTGGAGGCAGGAACCCAAG	kajszi	147
qPAL-R	AGTTCACGTCTTGGTTGTGCTGCTC		
qPAL-F2	GCTAAGAAGTTGCACGAGCAGGA	meggy	115
qPAL-R2	TGGTGGAGTACCGGATCACTTCG		
qC4H-F1	GGCGGTTGCAGCTGATGATGTAC	kajszi és meggy	191
qC4H-R1	CAAGTAGCCTCTCAAGAAGGGTCTC		
q4CL-F1	CAAGGGCAACCATAGACAAGGAAGG	kajszi	205
q4CL-R1	TCATCCTTCATTGGGACAACAGC		
q4CL-F2*	CCAACCTCACCTACGCTCAACTCTG	meggy	
q4CL-R2*	CACCACTGGGAAGAAGATGGAG		

Primer neve	Primer szekvenciája	Templát	Termék hossza (bp)
qHCT-F1	CTGGTTACTTTGGCAATGTGATTTTCAC	kajszi és meggy	172
qHCT-R1	GACAGATCAGGCTGAAGCTCAAG		
qC3H-F*	TCAGACTACTTCCGTTTGGAGCAG	kajszi és meggy	166
qC3H-R*	ACAAGCCCTGGATTTTCCGAC		
qCHS-F2	AGTGGTGTGGACATGCCTGG	kajszi és meggy	133
qCHS-R2	AGTCCTTGGCCAACCGGAG		
qCHI-F1	CCACTAACCGGCCAGCAATA	kajszi és meggy	104
qCHI-R1	TTCTCAATGGCCTTGGCTTC		
qF3H-F1	TCTACCCAAAATGCCCCCAACC	kajszi	162
qF3H-R1	CGAAGGCTCCTTCCACTGGTT		
qF3H-F2	GTGGATCACCGTTCAACCAGTGG	meggy	146
qF3H-R2	GAATGTGGCTATGGACAGCCTGC		
qF3'H-F1	GACACGTCATCAAGCACAGTGGA	kajszi és meggy	212
qF3'H-R1	GCCATGCGAGGCAACGAG		
qF3'5'H-F1	GTGGGAGGCTACACCATTCC	kajszi és meggy	213
qF3'5'H-R1	CACCATCCTCTCAGCCATTGC		
qDFR-F2	TGAGTCCAAAGACCCCGAGAAC	kajszi	F2+R2=127
qDFR-R2	CACGGTTCCTGCTGAGGATGTA	kajszi	F3+R2=74
qDFR-F3	TTGAATTTTGCCGCTCTGTCAA	kajszi és meggy	F3+R3=143
qDFR-R3	AAATGGGCCAATCACAAGAGTTG	meggy	
qFLS-F1	GTGGTGGCTCACACCGACATGTC	kajszi és meggy	121
qFLS-R1	TGACAAGGGCATTAGGGATGTAC		
qANS-F1	GCTAAGGAAGTGGGGCGCT	kajszi	160
qANS-R1	CAAGCTCTGGCTGAGGGCAA		
qANS-F2	ATGCAGGGAGGAGTTGAAGAAGG	meggy	133
qANS-R2	TTGCTCAATGGGAAGATCGAAAA		
qANR-F1	CCACCCAACCCATCTCAAAG	kajszi és meggy	F1+R1=102
qANR-R1	TGACGGCATAGCCCTTCTCT		
qANR-R2	TCTTCTTCTGATTGTCAGGGTCTC	kajszi	F1+R2=138
qLAR-F1	GGCACTGATGGAGAACTGCTAAGAG	kajszi	F1+R1=171
qLAR-F2	AGGCGCTATAATCTTACATGGGGTGA		F2+R1=207
qLAR-R1	GGATCAGCCCTGTCCACATCG		
qLAR-F3	CCTCTTGACCCTTCTAAGGCTGAC	meggy	102
qLAR-R2	CAGTTTCTCCATCAGTGCCTTATCAG		
qUFGT-K-F1	AGTGGCTTGATGATCAGCCTC	kajszi	F1+R1=135
qUFGT-K-F2	GTGTTCTGTGCTTTGGGAGC		F2+R1=103
qUFGT-K-R1	CGTAGGGACCACAAGAACCG		
qUFGT-M-F1	GCTTTGGTGAGGACCAGGTG	meggy	156
qUFGT-M-R1	CGAGGAACCCTTCAGGCAAG		

Primer neve	Primer szekvenciája	Templát	Termék hossza (bp)
qMYB-F2	AGGAGCTTGGACTAGAGAGGAAGATGA	kajszi és meggy	239
qMYB-R2	GAGCAATCAATGACCACCTGTTTCCT		
qMYB10-F1	GGAAGAGCTGTAGACTAAGGTGGTTG	kajszi és meggy	131
qMYB10-R1	GAGCAATCAATGACCACCTGTTTC		

A *-gal jelölt primerek a Dardick és mts. (2010) által közölt, őszibarack gyümölcsének vizsgálatára tervezett primerek.

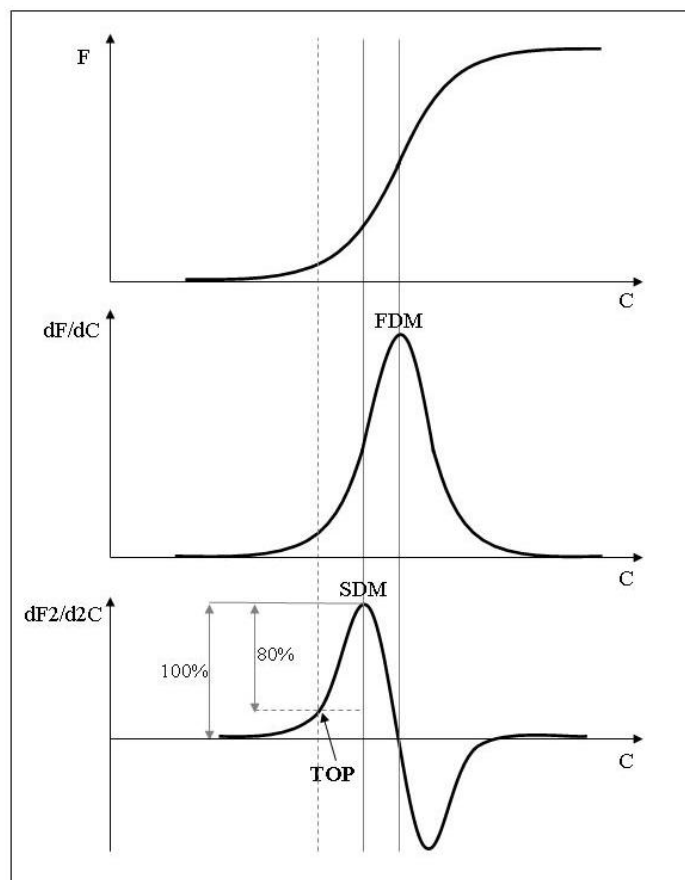
A valós idejű PCR kísérletek során alkalmazott primereket exonrégiókra terveztük. A primertervezés során bizonyos esetekben intronrégiót tartalmazó szekvenciákat is fel tudunk használni. Ez esetben olyan primereket terveztünk, melyek exon-exon határrégióra készültek (a primer egyik fele az egyik exonrégió 3' végének, a másik fele a következő exon 5' végének szekvenciájával komplementer), vagy intronrégiót íveltek át (az exonokra tervezett primerek között található egy intron). Exon-exon határrégióra a qDFR-F2, qANR-R2, qLAR-F2, q4CL-R1 és qMYB10-R1 primereket terveztük. A qF3H F2-R2, qLAR-F1-R1, qLAR-F2-R1 és qLAR-F3-R3 primerkombinációk intronrégiót fognak közre.

A célgénnek expressziós vizsgálatához szükséges primereket egy bizonyos qPCR protokollhoz, „assay”-hez terveztük. Ennek értelmében minden primer olvadási hőmérséklete (T_m) 65-66 °C, GC-tartalma 40 és 60%, hossza 18-27 bp, a felszaporított termék hossza 150-240 bp között mozgott. Az assay során minden qPCR paraméter (hőmérsékletek, időtartamok) változatlan volt. A PCR-reakciókat gátló másodlagos struktúrák (self-dimer, hetero-dimer, hajtű szerkezet) kialakulásának valószínűségét az IDT Oligo Analyzer (www.idtdna.com) és a Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) szoftverek segítségével ellenőriztük. Mivel a célgénnek azonos szempontok alapján, többek között 65 °C-os olvadási, vagyis 60 °C-os tapadási hőmérsékletre terveztem, a célgénnek optimális primerkötési hőmérsékletét nem ellenőriztük gradiens PCR technikával.

4.2.5 Az adatok kiértékelése

A valós idejű PCR-készülékkel összekötött számítógép egy szoftver (Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7) segítségével regisztrálja a kísérlet során keletkező adathalmazt, valamint a szoftver valós időben rajzolja ki a PCR-görbéket. Az adatok kiértékelése során a „Comparative Quantitation Analysis” funkciót választottuk. Ekkor a program a második derivált maximuma módszerével automatikusan TOP („Take Off Point”) értékeket számít, ami ciklusszám értéknek

feleltethető meg (McCurdy és mts., 2008; Pfeiffer és mts., 2012). A TOP számítását vázolja a **7. ábra**. Egy amplifikációs görbe exponenciális szakasza a TOP-tól az amplifikációs görbe második deriváltjának maximumáig tart.



7. ábra. A felső grafikon mutatja a fluoreszcencia értéket (F) a ciklusszám (C) függvényében. A középső ábrán a nyers fluoreszcencia görbe deriváltja látható. A görbe maximuma az első derivált maximum, angolul First Derivative Maximum (FDM). Az alsó görbe mutatja a nyers fluoreszcencia görbe második deriváltját a második derivált maximumával, mely angolul Second Derivative Maximum (SDM). A TOP értéket a fluoreszcencia görbe második deriváltjának maximuma, vagyis Second Derivative Maximum (SDM) segítségével állapítjuk meg. A TOP a második derivált görbe maximumához képest a függvény 80%-kal kisebb értékét jelenti. Az amplifikáció exponenciális szakasza a TOP és SDM értékek közötti szakaszon állapítható meg.

A szoftver segítségével akár manuálisan is beállíthatunk egy küszöbértéket, mely C_T (küszöbciklus) értékeket metsz ki a PCR görbékéből. Segítségünkre lehet ez esetben a fluoreszcencia görbe skálájának logaritmizálása, ugyanis a PCR-görbék exponenciális szakasza logaritmikus skálán lineáris függvényként jelenik meg. Kétszer nem tudunk manuálisan ugyanolyan küszöbértéket beállítani, csak hasonlót. Az így kimetszett C_T értékek kiértékelése, valamint egy hasonló küszöb által kimetszett hasonló C_T értékek kiértékelése a gyártó szerint elhanyagolható különbséget ad. Ezzel szemben a második derivált maximumát felhasználó módszerrel nyert TOP értékek teljes mértékben reprodukálhatók.

A „Comparative Quantitation” módszer másik előnye, hogy az egyes PCR görbék TOP értékei mellé feltünteti az egyes PCR-hatékonysági értékeket is. Ez egy 1-től 2-ig terjedő érték, mely a PCR hatékonyságot 0% és 100% között jellemzi. Egyes valós idejű PCR készülékek használatakor primerpáronként hígítási sor és kalibrációs egyenes készítése szükséges, melynek meredeksége a PCR hatékonyságáról ($E=10^{(-1/-m)}$, E = Efficiency, m = kalibrációs egyenes meredeksége) ad információt (Pfaffl és mts., 2002).

Az adatok kiértékelése során a TOP, valamint PCR-hatékonysági értékeket használtuk fel. Ezen értékeket a REST[®] („Relative Expression Software Tool”) 2009 V2.0.13 programba tápláltam (Pfaffl és mts., 2002). A program relatív expressziós értékeket, valamint az azokhoz tartozó szórást számítja ki. Mind a referencia-, mind a célgén adatainak betáplálása szükséges. A program az eredményeket táblázatosan, valamint oszlopdiagram formájában is megjeleníti. A programba táplált matematikai algoritmus alapja az alábbi egyenlet:

$$\text{Relatív expresszió} = \left[\frac{(E_{\text{referenciagén}})^{C_T \text{ kezelt}}}{(E_{\text{célgén}})^{C_T \text{ kezelt}}} \right] / \left[\frac{(E_{\text{referenciagén}})^{C_T \text{ kontroll}}}{(E_{\text{célgén}})^{C_T \text{ kontroll}}} \right]$$

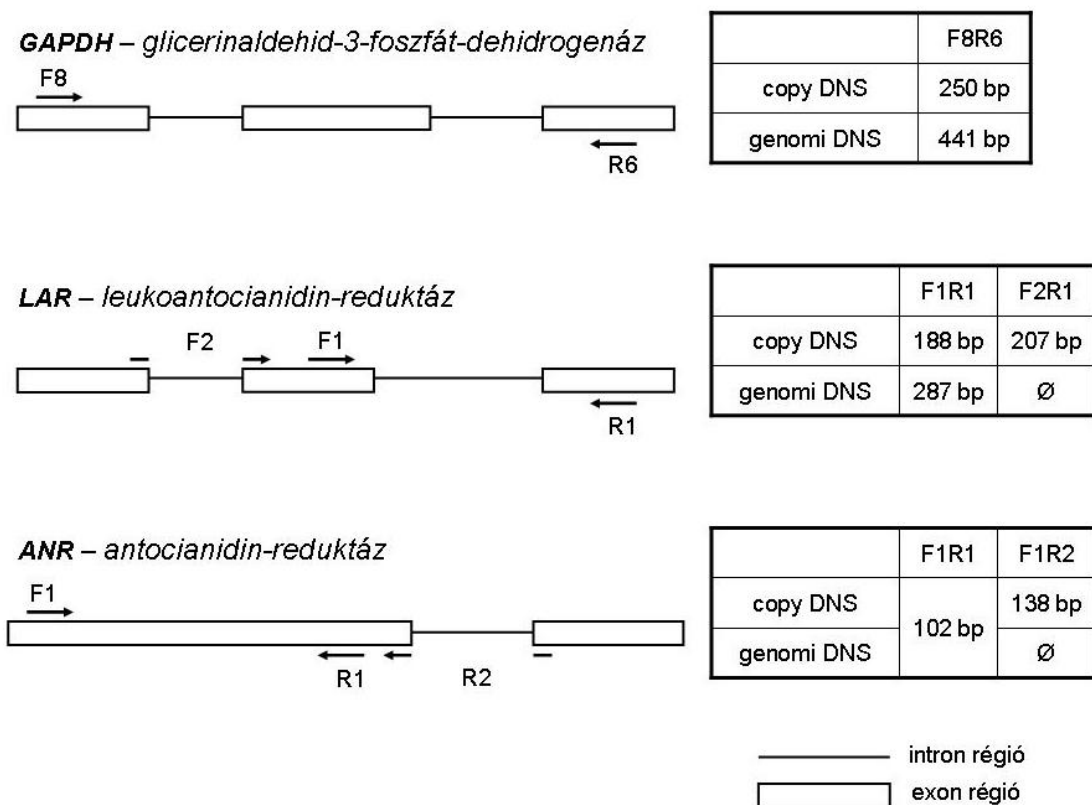
4.2.6 Adatok illesztése („data pooling”)

A kísérletek során egy reakció egy mintasorozatot tekintve az öt érési fázishoz tartozó referencia- és célgén együttes vizsgálatát jelentette. A REST[®]-metodika egy kontroll minta kiválasztását igényli. Mivel tapasztalataim szerint a legkevesebb transzkriptum általánosan az 5. érési fázisra volt jellemző, kontroll mintaként az 5. érési fázisú mintákat választottam. Ennek értelmében a fenti képletet kiértékelésenként négyszer alkalmazta a REST[®]-metodika. Az első négy érési fázist hasonlította össze az 5. érési fázissal. Az 5. érési fázis relatív expressziója volt a viszonyítási alap, így azt egy egységnyiként kezeltük. Ezzel a módszerrel egy adott gén transzkriptumszintű expressziós változását csupán az érés során tudjuk nyomon követni. Ugyanakkor nincs információnk az egyes génekhez tartozó transzkriptumok egymáshoz viszonyított arányáról.

Az egymáshoz viszonyított génexpressziók legalább olyan értékes információt nyújtanak számunkra, mint az érés során bekövetkező expressziós változás. Ugyanígy értékes információt nyújt a különböző szövetekben; gyümölcshéjban és gyümölcshúsban detektált transzkriptumok egymáshoz képesti aránya, vagy a különböző genotípusok (‘Preventa’ és ‘Gönci magyarkajszi’, vagy ‘Pipacs 1’ és ‘VN-1’), vagy akár az eltérő fajokban; kajsziiban és meggyben mért adatok összehasonlításáról.

4.2.7 A genomi DNS szennyeződésének kimutatása

Az RNS-oldatokból cDNS-oldatokat készítettük, majd PCR-alapú módszerekkel mutattam ki, hogy a cDNS-oldatok tartalmazzak-e genomi DNS-szennyeződést. A PCR-alapú genomi DNS detektálása két módszerrel valósult meg; hagyományos és valós idejű PCR technikával. Hagományos PCR kísérletekhez olyan primereket terveztem a *GAPDH* gén exon régióira, melyek két intront zártak közre. Így elméletileg különböző méretű terméket kapunk genomi- és cDNS templát felhasználásakor. A valós idejű PCR kísérletek során a *LAR* és *ANR* génekre tervezett szekvenciaspecifikus primereket használtuk fel. *LAR* esetén az F1+R1 primerkombináció – mivel azok exonrégiókra tapadnak – mind genomi-, mind cDNS esetén sikeres amplifikációt kell eredményezzen. Mivel az exonrégióra tervezett primerek között egy intronrégió is található, az intront is tartalmazó amplikon kimutatható. Az intront is tartalmazó amplikon olvadási hőmérséklete magasabb. Az F2 primer exon-exon régióra lett tervezve, így az genomi DNS-t nem képes amplifikálni. Ha az F1+R1 és F2+R1 primerkombinációk eltérő expressziós mintázatot mutatnak, vagy az F1+R1 primerpárt felhasználó reakció a közbezárt intronnal nagyobb méretű terméket (is) nyújt, akkor a cDNS oldataink genomi DNS-szennyeződést tartalmaznak. Hasonló elrendezést mutatnak az *ANR* génre tervezett primerpárok azzal a különbséggel, hogy az exonrégiókra tervezett primerek nem zárnak közre intron régiót. Az ANR-R2 primer csak intront nem tartalmazó, vagyis cDNS templátra képes tapadni. Az ANR F1+R1 és F1+R2 primerpárokkal végzett valós idejű PCR kísérletek azonos eredményeket mutatnak, ha a cDNS-oldatok nem tartalmaznak genomi DNS-szennyeződést. Ellenkező esetben a cDNS-oldatok feltételezhetően genomi DNS-sel szennyezettek. A primerek elrendeződését és a különböző típusú templátok felhasználásával keletkező amplifikátumok méretét a **8. ábra** mutatja.



8. ábra. A genomi DNS szennyeződésének kimutatásához felhasznált primerkombinációk.

4.2.8 A qPCR-reakcióelegy összeállítása

A valós idejű PCR kísérletekhez MyTaqTM HS 2× Master Mix-et használtunk. A mix hot start polimerázt tartalmazott, mely kiküszöbölte az összemérés során keletkező aspecifikus termékek keletkezését. A Master Mix-hez EvaGreen[®] 20× festéket adtunk 20-szoros hígításban. A 20 µl-es végtérfogatú reakcióelegy az alábbi összetevőket tartalmazta: 2× MyTaqTM HS Master Mix, 20× EvaGreen[®] (Biotium, USA, Hayward), 0,6 µM az adott primerekből és 50 ng cDNS.

Valamennyi valós idejű PCR reakciót az egyes mintákat illetően három párhuzamos beméréssel készítettük el. Így egy adott reakció három párhuzamos PCR-csőben zajlott. Az átfedő PCR-görbék mutatták a sikeres összemérést és PCR-reakciót. A szórást mutató minták az egyes kísérletek megismétlésének szükségességére utaltak.

A qPCR során alkalmazott hőmérsékleti ciklus a következő lépésekből állt: 95 °C 2 min, 40 ciklus során 95 °C 8 s, 60 °C 8 s és 72 °C 8 s. A kvantitatív PCR során lehetőségünk nyílik a PCR-termékek olvadáspont-vizsgálatra („Melting Analysis”) is. Az olvadáspont analízis során – 72 °C 90 s elteltével – a hőmérséklet 70 °C-ról 95 °C-ra emelkedett 0,25 °C-onként, a detektálás hőmérsékletenként 5 s eltelte után történt. A választott csatorna: *Melt A on Green* volt.

4.2.9 A génexpresszió színskódos ábrázolása

A valós idejű PCR kísérletekből származó adatokat a szemléletes megjelenítés érdekében színskódos ábrázolással is bemutatjuk. A cirkuláris elrendezésű ábra Krzywinski és mts. (2009) alapján készült. A színskálát a fehér → sárga → piros → bordó → fekete átmenet mentén 150 különböző árnyalatra osztottuk. A színskálában megfigyelhető sötétedés egyenesen arányos a relatív génexpresszió mértékével. A kisebb relatív génexpresszióhoz világosabb, a nagyobbhoz sötétebb szín tartozik. A 6000 és az annál nagyobb relatív génexpressziós értékeket a program egyöntetűen fekete színben tüntette fel.

4.3 Antioxidáns kapacitás mérések

A -80°C-on tárolt gyümölcs- és -hús mintákat liofilizáltuk (Scanvac CoolSafe™ 110-4, Lyngø, Dánia; -110 °C-os jégcsapda, 3-4 nap), folyékony nitrogénben eldörzsöltük, majd ismét liofilizáltuk (-110 °C-os jégcsapda, 2-3 nap). A mintákat a továbbiakban finom por formájában tároltuk lezárt Falcon csövekben, sötétben. Az antioxidáns kapacitás mérések során a mintasorozatok vízoldható komponenseit vizsgáltuk, így a mintákat Milli-Q (MQ) vízben (18.2 MΩcm) oldottuk fel az alábbiak szerint: 10 mg elporított minta + 1 ml MQ víz. Mintánként három párhuzamos kivonást és mérést végeztünk. A minták MQ vízben való oldódását vortexeléssel segítettük. Mivel a minták kis mennyiségben tartalmaztak vízben nem oldódó komponenseket is, az oldatokat centrifugálással (Mikro 22 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany; 8000 g, 10 perc, 23 °C) ülepítettük, majd a felülúszót új csövekbe pipettáztuk. Az így nyert mintákat a mérésekig -20 °C-on tároltuk, a minták felolvasztására közvetlenül a mérések előtt került sor. A méréseket Nicolet Evolution 300 BB (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK) típusú spektrofotométeren végeztük.

4.3.1 Összantioxidáns kapacitás meghatározása (FRAP módszer)

A FRAP-érték mérését Benzie és Strain (1996) módszere alapján végeztük. A keletkezett komplex mennyiségét fotometriásan, $\lambda=593$ nm-en mértük. Az abszorbanciaértékek mérésére 5 perc eltelté után került sor. Az eredmények kiértékelése aszkorbinsavval készített kalibrációs görbe segítségével történt. Az eredményeket mg aszkorbinsav/g szárazanyagban adtuk meg.

4.3.2 Összpolifenoltartalom mérése (TPC módszer)

A minták összfenol-tartalmának mérése Singleton és Rossi (1965) módszere alapján, Folin-Ciocalteu reagens használatával történt. A kalibrációs egyenest galluszsav segítségével

vettük fel. A kémcsöveket vízfürdőbe (50 °C) helyeztük 5 percre. A reakció során kék színű vegyület keletkezik, melynek mennyisége fotometriásan, $\lambda=760$ nm-en meghatározható. Az eredményeket mg galluszsav/g szárazanyagban adtuk meg.

4.3.3 TEAC módszer

A mérést Stratil és mts. (2007) alapján végeztük. Az ABTS gyökképzés a következők szerint történt: kálium-perszulfát (4,95 mmol/L) és ABTS (7 mmol/L) 1:1 arányú oldatát 12 órára sötétben, szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az oldatból 980 μ l-t 20 μ l mintaoldattal egészítettem ki, majd 1000 μ l desztillált vizet adtam hozzá. Az abszorbananciát $\lambda=734$ nm-en, az ABTS és mintaoldatok összeöntését követően 20 perc elteltével mértük. Különböző koncentrációjú trolox oldatokkal kalibrációt készítettünk, az eredményeket mg trolox/g szárazanyagban adtuk meg.

4.4 Egyedi komponensek mérése LC-MS módszerrel

A 'Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' gyümölcshéj és -hús mintasorozatokban található polifenolos vegyületek előzetes vizsgálata minőségi és félmennyiségi szempontok szerint HPLC-ESI-(Q)TOF MS kapcsolt rendszer segítségével történt. Előzetes kísérletekről lévén szó nem állt módunkban bármely lehetséges flavonoid komponens azonosítása, valamint az egyes komponensek pontos mennyiségi meghatározása. Az adatok kiértékelése során az m/z adatok segítségével rá tudtunk világítani a legtöbb flavonoid komponensre, azon belül is az aglikonra. Korábbi vizsgálatok alapján néhány komponensre (kvercetin- és kempferol-származékok) fókuszáltunk (Nagy és mts., 2009).

Az aglikonhoz tartozó cukor alegységek azonosítását cukorszám (1, 2 vagy 3) és cukor szénatomszám (pentóz vagy hexóz) szinten tudtuk meghatározni. Az adatokból azonban nem tudtunk olyan jellegű információt kinyerni, ami a cukor alegységek egymáshoz képesti elhelyezkedésére utalna, vagyis hogy több kisebb (mono- vagy diglikozid) vagy egy hosszabb (triglikozid) cukor oldallánccal van-e dolgunk. Ezen kísérleti rendszerben a félmennyiségi meghatározás alapján rá tudtunk világítani arra, hogy a vizsgált mintasorozatok a kérdéses komponenseket egymáshoz képest milyen arányokban tartalmazzák, valamint hogy az érés során hogyan változik az adott komponens mennyisége. Mivel a kiértékelés során csúcsterületekkel, vagyis azok arányával dolgoztunk, nem koncentráció – mint pl. mg/kg – jellegű információt, hanem csupán arányokat nyertünk. A (Q)TOF elsődlegesen „screening”-re használatos. Pontos

mennyiségi meghatározáshoz sztenderdek és pl. QQQ-MS rendszer szükséges. Így a mennyiségi meghatározás félmennyiségi meghatározásnak felel meg.

A minta-előkészítés a polifenolos vegyületek extrakcióját jelentette. Az elválasztást Agilent 1100 típusú HPLC készülékkel, a tömegspektrometriás analízist egy Agilent 6530 típusú, elektorspray ionforrással felszerelt kvadrupol repülési idő tömegspektrométerrel végeztük el.

4.4.1 Minta-előkészítés

A minta-előkészítés során a Harnly és mts. (2007) által leírt eljárást alkalmaztuk kis módosításokkal. Extraháló oldatként hangyasav-metanol-víz 1:60:39 arányú elegyét használtuk. A liofilizált és elporított mintákból 100 mg-ot mértük be 15 ml-es centrifugacsövekbe. Az egyes mintákból 3-3 párhuzamos kivonást végeztünk. A mintákhoz 100 µl 50 ppm-es belső standard – jelen mérésorozatban daidzein (Extrasynthese, Genay Cedex, Franciaország) oldatot, majd 5 ml végtérfogathoz szükséges mennyiségű extraháló oldatot mértünk be. Belső standard oldatot azért adtunk a mintákhoz, hogy könnyebben össze tudjuk hasonlítani a mintákat az egyes komponensek félmennyiségi meghatározása során, valamint hogy csökkentsük a műszer hibájából fakadó másodlagos hibát. A mintákat ultrahangos fürdőbe helyeztük 1 órára. A fürdő hőmérséklete legfeljebb 39 °C-ra emelkedett. Az ultrahangos feltárást követően a mintákat 6000 rpm mellett 10 percig centrifugáltuk, majd a tiszta felülúszóból 1 ml-t pipettáztunk át 2 ml MilliQ ioncserélt vizet tartalmazó 15 ml-es centrifugacsövekbe. A mintákat végül 0,45 µm pórusméretű PTFE membránszűrőn (Sigma) szűrtük át borostyán színű mintatartó edényekbe. Az így nyert oldatokat alkalmaztuk a mérés során.

4.4.2 Kromatográfiás elválasztás

Az oszlop védelmét egy belső „inline” 0,45 µm-es szűrő biztosította. A HPLC oszlop és tömegspektrométer nagy felbontás mellett képes üzemelni. Az elválasztás hosszú, 60 perces időtartam alatt zajlott.

A 45 perc alatt alkalmazott gradiens során az első 5 percben 8 % volt a B-eluens aránya. Ez az 5. és a 35. perc között 45 %-ra, majd a 40. percre 100 %-ra emelkedett és így maradt a 45. percig, amikor visszaállt a kezdeti 8 %-ra. Ez utóbbi „post time” kondicionálás, melynek során visszaállt a kezdeti oldószer-összetétel, 10 percig zajlott és már nem készült MS adatfelvétel.

A kromatográfia paramétereit:

Állófázis: 4.6×150 mm Phenomenex Kinetex C18 RP oszlop, 2.6 μm szemcseméret

Mozgófázis: A-eluens: $\text{H}_2\text{O} + 0,5\%$ HCOOH (Scharlau, Spanyolország)

és B-eluens: MeOH + 0,5 % HCOOH (Scharlau)

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

Időtartam: 60 perc

Injektálási térfogat: 15 μl

Oszlop hőmérséklete: 30 °C

4.4.3 Tömegspektrometriás analízis

A flavonoid komponensek detektálása ESI-(Q)TOF MS rendszerrel történt. A mintákban található egyes flavonoidok és származékaik meghatározásához pozitív ionizációs módot alkalmaztunk.

A tömegspektrometriás analízis paraméterei:

Tömegspektrométer: Agilent 6530 qTOF

Ionforrás: ESI dual-spray

Kapilláris feszültség: 4000 V

Porlasztó gáz nyomása: 40 psi

Szárító gáz térfogatárama: 9 l/perc

Gázhőmérséklet: 325 °C

Skimmer feszültség: 65 V

Fragmentor feszültség: 160V

Teljes letapogatás (full scan): 50–1000 m/z tömegszám tartományban

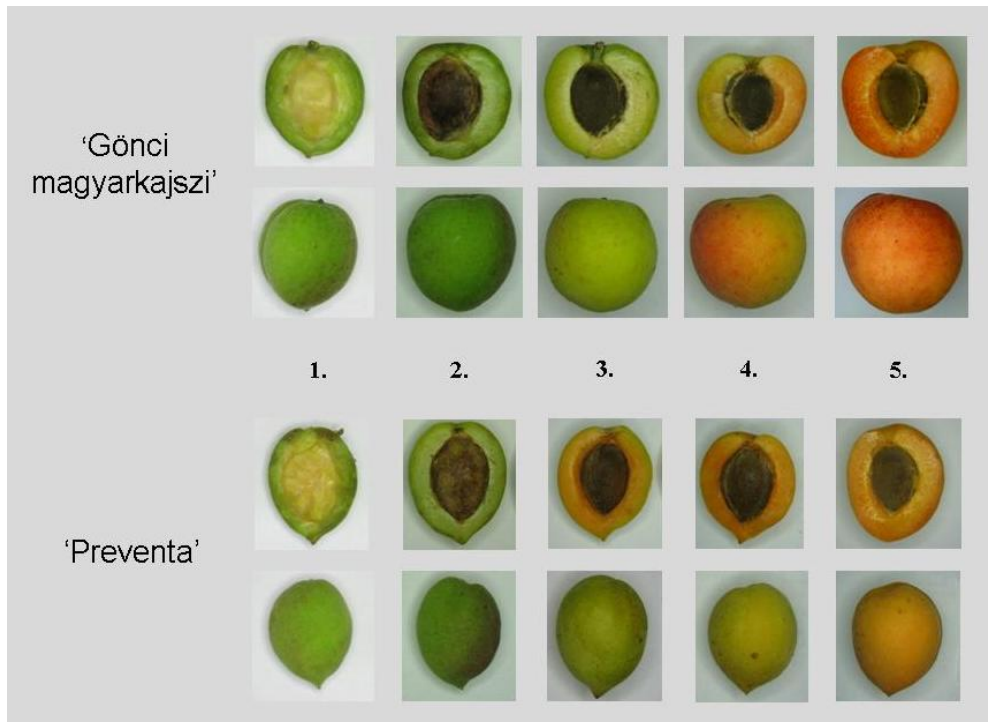
4.4.4 Adatok elemzése

A kiértékelést Agilent Mass Hunter program segítségével (± 5 mDa mass window érték mellett) végeztük. A kiértékelt adatokat oszlopdiagramokon tüntettük fel, melyek tartalmazzák a relatív flavonoid mennyiségeket, valamint szórásértékeket. Ez utóbbi értékek a három párhuzamos minta-előkészítésből adódnak. A relatív komponens mennyiség a 4.4.1 fejezetben említett minta-előkészítés során nyert extraktum 5 μl -ére vonatkozik.

5 Eredmények

5.1 A kajszi érési folyamatának jellemzése

A 'Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' kajszifajták gyümölcsének érési folyamatát a **9. ábra** mutatja.



9. ábra. 'Preventa' és 'Gönci magyarkajszi' gyümölcsei az öt érési fázisban.

5.1.1 Színmérés

A 'Gönci magyarkajszi' gyümölcsök érés során változó színparamétereit a **8. táblázat** tartalmazza. A zöld színű, éretlen 'Gönci magyarkajszi' gyümölcse az érés során narancssárga hús- és héjszint vesz fel, majd a napsütötte héjszövetek fedőszíne az antocianin pigmentáció következtében pirosra változik (**9. ábra**). Ezen színátmenetet az érés során változó L^* , a^* , b^* , C^* és H^0 paraméterekkel jellemeztük.

Az L^* érték az érés során az alapszín vizsgálatokor 52-től 64-ig, a fedőszín vizsgálatokor 42-től 55-ig, a hússzín vizsgálatokor 53-től 61-ig növekedett. Az a^* érték az érés során az alapszín vizsgálatokor -21-től 11-ig, a fedőszín vizsgálatokor -10-től 22-ig, a hússzín vizsgálatokor -19-től 17-ig növekedett. A b^* érték az érés során az alapszín vizsgálatokor 35-től 45-ig, a fedőszín vizsgálatokor 26-től 37-ig, a hússzín vizsgálatokor 35-től 50-ig növekedett. A C^* érték az érés során az alapszín vizsgálatokor 42-től 46-ig, a fedőszín vizsgálatokor 29-től 43-

ig, a hússzín vizsgálatakor 41-től 53-ig növekedett. A H^o érték az érés során az alapszín vizsgálatakor 120-tól 76-ig, a fedőszín vizsgálatakor 110-től 59-ig, a hússzín vizsgálatakor 119-től 71-ig csökkent.

8. táblázat. A 'Gönci magyarkajszi' színparamétereinek változása az érés során

		L^*	a^*	b^*	C^*	H^o
'Gönci magyarkajszi' 1. éf.	alapszín	52,4±1,6	-21,3±0,6	36,3±1,5	42,01±1,5	120,4±0,5
	fedőszín	42,6±2,7	-9,7±4,4	27,5±2,9	29,3±3,8	109,9±5,6
	hússzín	56,5±1,9	-19,4±1,1	35,7±1,7	40,6±1,9	118,6±0,6
'Gönci magyarkajszi' 2. éf.	alapszín	54,2±1,5	-18,6±1,2	35,1±1,6	39,7±1,9	117,9±0,8
	fedőszín	46,0±2,4	-5,9±3,6	26,5±2,6	27,3±3,1	103,4±4,6
	hússzín	53,5±2,4	-18,8±1,3	35,1±1,9	39,8±2,2	118,2±0,8
'Gönci magyarkajszi' 3. éf.	alapszín	60,3±2,2	-15,4±1,9	38,7±2,2	41,7±1,8	111,8±3,0
	fedőszín	54,6±3,2	-7,7±3,9	34,8±3,1	35,8±3,4	102,3±5,8
	hússzín	58,8±2,0	-16,1±2,1	36,5±2,3	39,9±2,4	113,8±2,7
'Gönci magyarkajszi' 4. éf.	alapszín	62,4±1,7	-10,9±3,7	43,2±3,0	44,7±2,3	104,2±5,3
	fedőszín	52,2±4,1	11,5±6,4	34,6±5,6	37,0±5,3	71,4±10,2
	hússzín	61,2±2,3	-10,3±4,4	43,1±4,3	44,6±3,5	103,8±6,6
'Gönci magyarkajszi' 5. éf.	alapszín	64,0±2,0	11,1±3,8	44,8±2,4	46,3±2,8	76,2±4,4
	fedőszín	55,8±4,2	21,7±4,6	36,6±5,3	42,9±3,8	59,1±7,9
	hússzín	60,7±2,4	17,5±2,3	49,9±1,5	52,9±2,0	70,8±2,1

A 'Preventa' gyümölcsök érés során változó színparamétereit a **9. táblázat** tartalmazza. A zöld színű, éretlen 'Preventa' gyümölcse az érés során narancssárga hús- és héjszínt vesz fel (**9. ábra**).

9. táblázat. A 'Preventa' szín paramétereinek változása az érés során

		L^*	a^*	b^*	C^*	H^o
'Preventa' 1. éf.	alapszín	56,1±2,6	-17,9±2,3	33,9±2,0	38,4±2,6	117,6±2,6
	fedőszín	55,9±2,7	-19,1±1,7	35,0±1,5	39,8±2,1	118,4±1,6
	hússzín	51,1±3,6	-12,6±3,8	30,5±2,7	33,1±3,79	112,0±4,7
'Preventa' 2. éf.	alapszín	58,6±1,6	-18,1±1,9	36,6±1,5	40,8±2,0	116,2±1,9
	fedőszín	51,2±3,2	-6,3±4,2	29,3±3,8	30,2±4,5	101,5±6,5
	hússzín	57,3±2,0	-17,8±2,3	38,0±2,0	42,0±2,02	115,0±3,0
'Preventa' 3. éf.	alapszín	61,3±1,6	-13,7±1,7	41,2±1,3	43,4±0,9	108,3±2,5
	fedőszín	58,7±1,6	-5,4±2,6	40,3±2,8	40,7±2,73	97,6±3,8
	hússzín	61,4±2,3	-6,2±2,7	43,4±3,5	43,9±3,4	98,2±3,7
'Preventa' 4. éf.	alapszín	63,9±1,5	-4,5±2,1	44,2±1,5	44,4±1,5	95,8±2,8
	fedőszín	59,8±2,1	5,2±3,2	41,7±2,6	42,1±2,7	83,0±4,2
	hússzín	62,2±1,7	3,8±2,4	45,8±2,2	45,9±2,2	85,2±3,0
'Preventa' 5. éf.	alapszín	63,1±1,5	9,1±2,7	47,3±1,57	48,2±1,8	79,1±3,1
	fedőszín	57,9±2,8	16,2±4,5	43,2±3,9	46,4±3,3	69,3±6,3
	hússzín	60,1±1,3	14,6±2,1	50,2±2,8	52,3±2,8	73,7±2,2

Az L^* érték változása nem mutat olyan szoros korrelációt a színváltozással, mint a zöld → piros színátmenetért felelős a^* érték, vagy a zöld → sárga → piros színátmenetet tükröző színezeti szög (H^0). A zöld → sárga színátmenet során az a^* érték az alapszín vizsgálatokor -18-tól 9-ig, a fedőszín vizsgálatokor -19-től 16-ig, a hússzín vizsgálatokor -18-tól 15-ig növekedett. A b^* érték az érés során az alapszín vizsgálatokor 34-től 47-ig, a fedőszín vizsgálatokor 29-től 43-ig, a hússzín vizsgálatokor 30-től 50-ig növekedett. Az C^* érték az érés során az alapszín vizsgálatokor 38-tól 48-ig, a fedőszín vizsgálatokor 30-től 46-ig, a hússzín vizsgálatokor 33-től 52-ig növekedett. A H^0 érték az érés során az alapszín vizsgálatokor 118-tól 79-ig, a fedőszín vizsgálatokor 118-tól 69-ig, a hússzín vizsgálatokor 115-től 73-ig csökkent.

5.1.2 Méret és tömeg

A ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ különböző érési állapotú gyümölcseinek méretét és tömegét a **10. táblázat** tartalmazza. Meghatároztuk a magasságot, a varrattal párhuzamos (D_{vp}) és a varratra merőleges átmérőt (D_{vm}).

10. táblázat. A ‘Gönci magyarkajszi’ méret és tömeg adatainak változása az érés folyamán

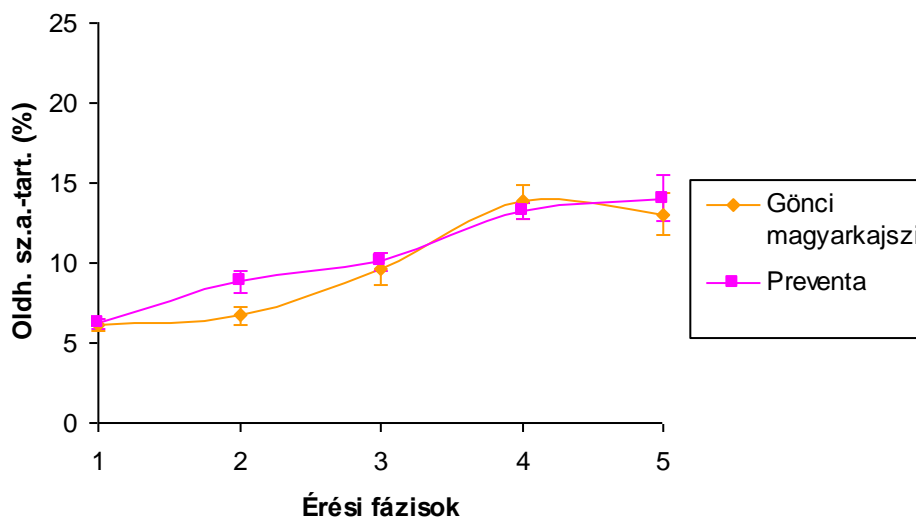
		1. éf.	2. éf.	3. éf.	4. éf.	5. éf.
‘Gönci magyarkajszi’	magaság (mm)	34,9±1,8	40,7±2,5	44,4±2,4	46,4±2,2	47,6±2,8
	D_{vp} (mm)	31,7±1,6	38,2±2,6	40,5±2,0	44,2±2,6	49,1±3,0
	D_{vm} (mm)	27,7±1,5	33,8±2,8	43,0±1,8	46,6±2,3	46,3±2,9
	tömeg (g)	17,2±2,5	29,8±6,0	43,8±5,6	54,7±8,1	62,8±9,8
‘Preventa’	magaság (mm)	40,7±2,3	41,9±2,6	44,5±1,9	47,2±2,2	51,1±3,2
	D_{vp} (mm)	30,3±1,3	32,2±2,2	30,7±1,7	34,0±1,5	39,2±1,8
	D_{vm} (mm)	24,9±1,1	28,3±2,7	34,8±1,7	38,5±1,7	41,5±2,3
	tömeg (g)	15,9±1,8	19,8±4,6	23,9±3,2	30,6±3,8	43,7±6,1

A ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcsének magassága 35 mm-ről 48 mm-re, szélességei és 32 mm-ről 49 mm-re (D_{vp}), valamint 28 mm-ről 46 mm-re (D_{vm}), tömege 17 g-ról 63 g-ra növekedett az érés során. A ‘Preventa’ gyümölcsének magassága 41 mm-ről 51 mm-re, szélességei 30 mm-ről 39 mm-re (D_{vp}), valamint 25 mm-ről 41 mm-re (D_{vm}), tömege 16 g-ról 44 g-ra növekedett az érés során.

5.1.3 Oldható szárazanyag-tartalom

A ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcsök oldható szárazanyag-tartalmának (% brixérték) változását a **10. ábra** tartalmazza. Mindkét kajszigenotípus közel azonos értéket mutatott az első érési fázisban, majd az érés során a ‘Preventa’ rendelkezik nagyobb

brixértékekkel, de a különbség a két genotípus között nem jelentős. Az érett gyümölcsök közel azonos brixértékeket mutattak; a ‘Gönci magyarkajszi’ 13 %-ot, a ‘Preventa’ 14 %-ot. A brixérték növekedése a gyümölcsökben az érés során lineárisnak tekinthető.



10. ábra. A ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcsök oldható szárazanyag-tartalma a különböző fenofázisokban.

5.1.4 Antioxidáns kapacitás értékek

A ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcshús és -háj antioxidáns kapacitás értékét három különböző módszerrel jellemeztük (**11. ábra**). Mindhárom mérőmódszer esetén a gyümölcshús viszonylag kisebb, a héj nagyobb antioxidáns kapacitás értékekkel rendelkezett. A legnagyobb antioxidáns kapacitás értéket mindhárom módszer szerint a ‘Preventa’ héjszövetében mutattuk ki. A ‘Preventa’ mezokarpium antioxidáns kapacitás értéke felülmúlta a ‘Gönci magyarkajszi’ mezokarpiumában mért antioxidáns kapacitás értékeket.

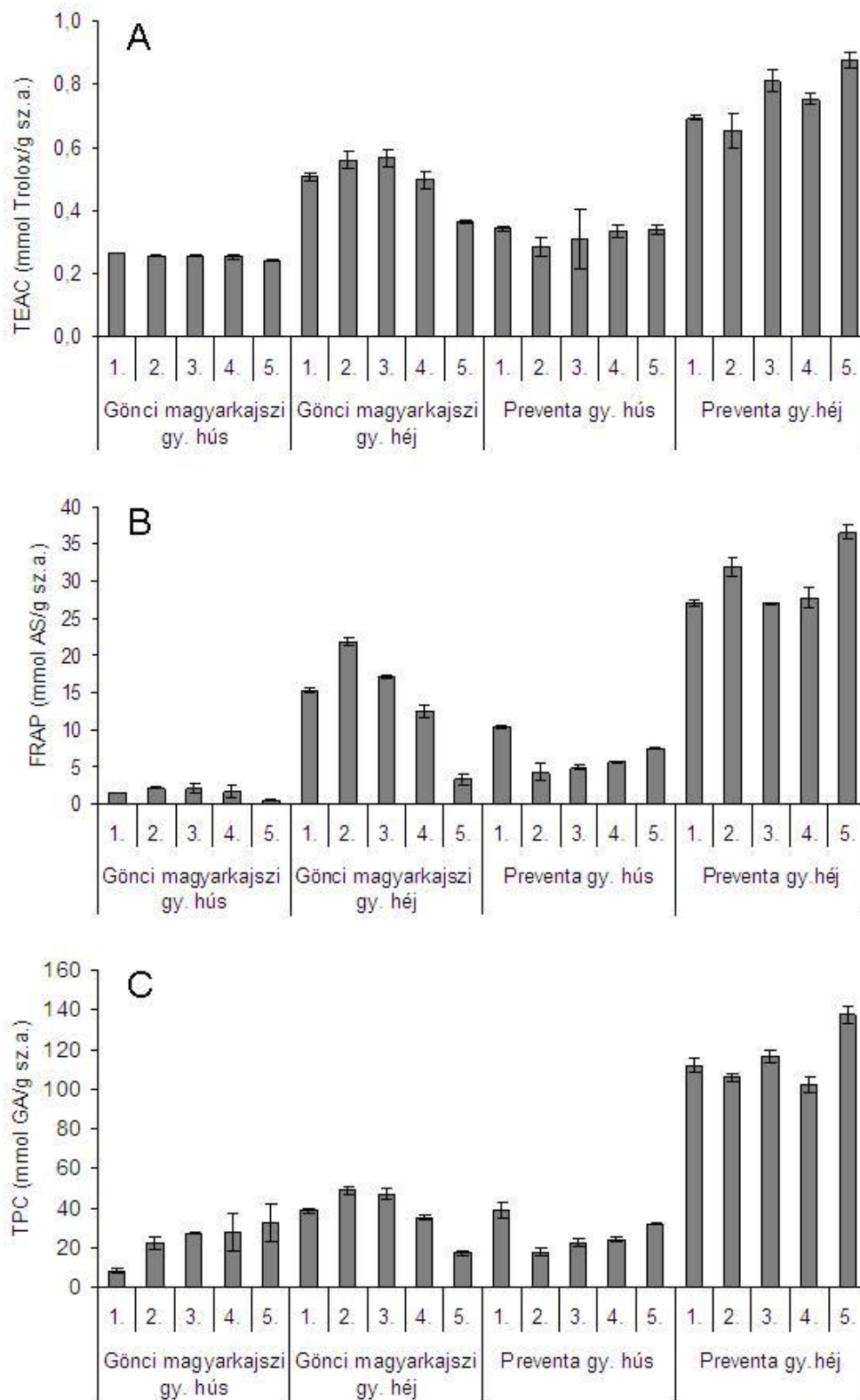
Az érés során mind a négy mintasorozatban kisebb mértékű változás volt megfigyelhető az antioxidáns kapacitás tekintetében: a ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshúsának TEAC értékei enyhe csökkenést (**11A. ábra**), FRAP értékei kismértékű növekedést, majd jelentős csökkenést (**11B. ábra**), összfenol-tartalma ugyanakkor folyamatos növekedést mutatott (**11C. ábra**). A ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshéjának antioxidáns kapacitása és összfenol-tartalma az érés első felében nőtt, majd csökkent.

A ‘Preventa’ gyümölcshúsa minden módszer esetében egy jelentősebb csökkenést követő lassú, folyamatos növekedést mutatott az érés során. Az érési fázisok között jelentkező kisebb-nagyobb eltérések mellett a ‘Preventa’ gyümölcshéja is növekvő tendenciát mutatott az érés folyamán.

Az antioxidáns kapacitást jellemző három mérőmódszer azonos tendenciákat mutatott a 'Preventa' hús-, valamint 'Gönci magyarkajsi' és 'Preventa' héjszöveiben. Az antioxidáns kapacitás értékek változása az érés folyamán a 'Gönci magyarkajsi' gyümölcshús vizsgálatokor kismértékű eltérést mutatott a három módszer használatakor.

A fajták és az érési állapotok közti különbségek a TEAC módszerrel sokkal kisebbnek látszottak, mint a FRAP és TPC esetében. Munkánk során a fenolos vegyületek felhalmozódásáért felelős enzimek transzkriptumszintű expressziós változásait vizsgáltuk, mellyel a két paraméter (FRAP és TPC) közül várhatóan az összfenoltartalom (TPC) mutathat közvetlenebb kapcsolatot.

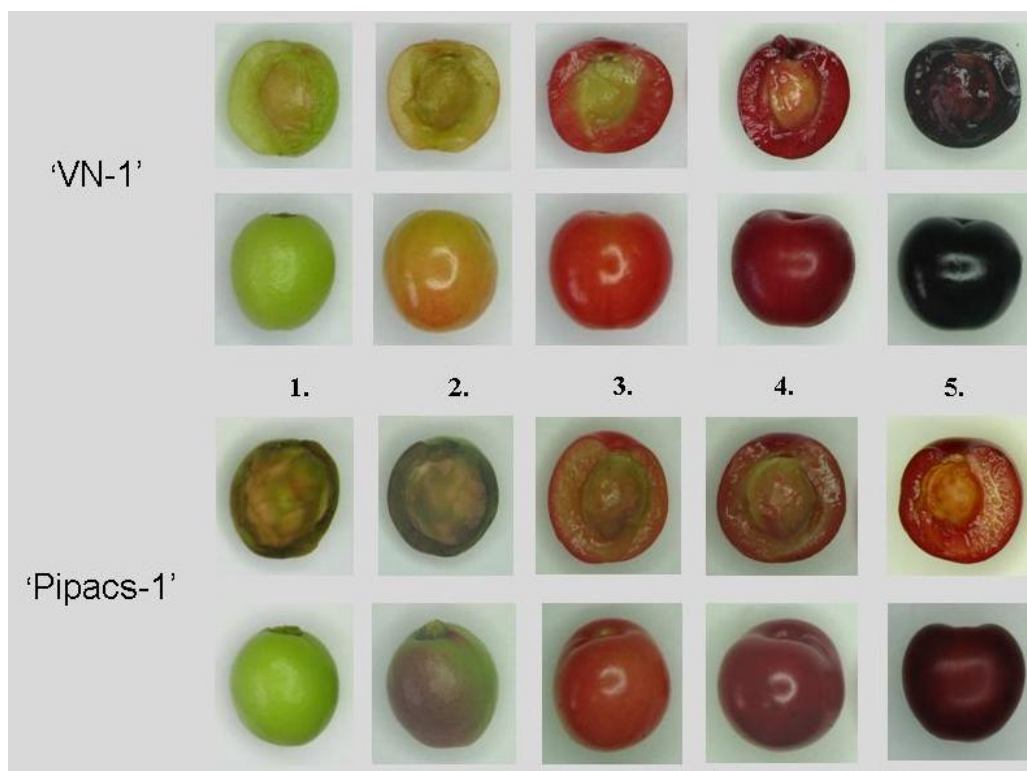
A 'Gönci magyarkajsi' gyümölcshús TPC módszerrel mért értéke az éretlen gyümölcsben 8,36 mmolGS/g sz.a.-ról az érés során 32,51-re növekedett, a gyümölcshéjban 39,06 mmolGS/g sz.a.-ról a következő érési fázisban 49,4-re nőtt, majd a teljesen érett állapotra 17,44-re csökkent. A 'Preventa' gyümölcshús éretlen állapotban nagyobb értéket, 39,54 mmolGS/g sz.a.-ot mutatott, mely érték a következő érési állapotban kevesebb, mint a felére csökkent, majd az érés során fokozatosan 32,2-ig növekedett. A 'Preventa' gyümölcshéjban kismértékű csökkenések és növekedések váltakoztak, míg a 'Preventa' gyümölcshéj összfenol-tartalma összességében az érés során 112,29 mmolGS/g sz.a.-ról 137,31-re növekedett.



11. ábra. A ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcs-húsban és -héjban három különböző módszerrel mért antioxidáns kapacitás értékek. A: TEAC (mmol trolox/g sz.a.) B: FRAP (mmol AS/g sz.a.) C: TPC (mmol GA/g sz.a.) értékek változása az érés során.

5.2 A meggy érési folyamatának jellemzése

A 'VN-1' és 'Pipacs 1' meggyfajták gyümölcsének érési folyamatát a **12. ábra** mutatja.



12. ábra. A 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsei az öt érési fázisban.

5.2.1 Színmérés

A zöld színű éretlen 'VN-1' gyümölcs az érés során sárga, piros, majd bordó héj- és hússzín mutat (**12. ábra**). E színátmenetet az érés során változó L^* , a^* , b^* , C^* és H^0 paraméterekkel jellemeztük. A 'VN-1' gyümölcsök érése során változó színparamétereket a **11. táblázat** tartalmazza.

A 'VN-1' gyümölcsök estén az L^* értékek a gyümölcsszín sötétedését jelzik: az érés során az alapszín vizsgálatokor 74-től 28-ig, a fedőszín vizsgálatokor 73-től 28-ig, a hússzín vizsgálatokor 70-től 24-ig csökkent az L^* értéke. Az a^* érték az érés során az alapszín vizsgálatokor -10-től 34-ig növekedett, majd 4-ig csökkent, a fedőszín vizsgálatokor -9-től 35-ig növekedett, majd 4-ig csökkent, a hússzín vizsgálatokor -9-től 30-ig növekedett, majd 9-ig csökkent. A b^* érték az érés során az alapszín vizsgálatokor 43-től 3-ig, a fedőszín vizsgálatokor 42-től 3-ig, a hússzín vizsgálatokor 40-től 4-ig csökkent.

11. táblázat. A ‘VN-1’ színparamétereinek változása az érés során

		L^*	a^*	b^*	C^*	H^o
‘VN-1’ 1. éf.	alapszín	73,9±1,7	-10,3±3,3	42,8±3,1	44,1±3,3	103,4±4,1
	fedőszín	73,5±2,2	-8,7±5,5	42,5±3,5	43,7±3,8	116,5±45,1
	hússzín	70,0±3,1	-9,1±3,7	40,1±2,8	41,2±3,2	102,6±4,8
‘VN-1’ 2. éf.	alapszín	55,9±3,5	28,9±5,4	28,9±2,1	41,2±3,6	45,4±6,5
	fedőszín	57,8±6,1	25,5±11,1	30,3±3,1	41,1±3,9	40,9±32,8
	hússzín	60,2±3,4	8,3±4,8	29,6±2,5	31,1±2,3	74,3±8,9
VN-1’ 3. éf.	alapszín	35,5±4,3	34,5±6,0	16,5±5,0	38,3±7,5	24,9±3,4
	fedőszín	35,5±4,0	35,3±4,9	17,0±4,7	39,2±6,5	25,2±3,2
	hússzín	36,4±6,4	30,0±3,0	17,5±3,4	34,9±2,8	30,2±6,2
‘VN-1’ 4. éf.	alapszín	35,2±3,1	29,1±5,2	13,7±4,3	32,2±6,5	24,7±3,0
	fedőszín	33,7±2,6	26,6±4,9	11,9±3,6	29,1±6,0	23,7±2,3
	hússzín	33,7±4,1	28,3±2,9	17,6±4,2	33,5±4,1	31,5±5,3
‘VN-1’ 5. éf.	alapszín	27,8±0,6	4,2±1,2	2,6±0,4	4,9±1,2	32,6±5,8
	fedőszín	27,7±0,5	4,4±1,2	2,5±0,3	5,1±1,2	31,2±6,0
	hússzín	24,1±1,2	9,5±3,1	3,6±1,1	10,1±3,3	21,1±2,1

Az C^* érték az érés során az alapszín és fedőszín vizsgálatok 44-től 5-ig, a hússzín vizsgálatok 41-től 10-ig csökkent. A H^o értékek változása az érés során a zöld → sárga → piros → bordó színátmenet tükrözte: az alapszín vizsgálatok 103-tól 25-ig csökkent, majd 33-ig növekedett, a fedőszín vizsgálatok 117-től 24-ig csökkent, majd 31-ig növekedett, a hússzín vizsgálatok 102-től 21-ig csökkent. A kajszimintákkal ellentétben a b^* értéke az érés során csökkent.

A ‘Pipacs 1’ gyümölcsök érés során változó színparamétereit a **12. táblázat** tartalmazza. A ‘Pipacs 1’ gyümölcsök az érés során zöld → sárga → piros színátmenetet mutattak. A gyümölcs éretten halványpiros színű, szemben a ‘VN-1’ feketés bordó gyümölcsével.

12. táblázat. A ‘Pipacs 1’ színparamétereinek változása az érés során

		L^*	a^*	b^*	C^*	H^o
‘Pipacs 1’ 1. éf.	alapszín	65,2±5,5	-19,6±3,1	39,6±4,9	44,2±5,5	116,3±2,4
	fedőszín	63,8±3,4	-21,1±2,3	40,8±1,8	45,9±2,4	117,3±2,3
	hússzín	62,3±4,2	-19,8±4,5	41,1±4,3	45,7±5,4	115,4±4,3
‘Pipacs 1’ 2. éf.	alapszín	65,9±2,2	-19,9±0,7	40,9±1,1	45,5±1,1	116,0±0,8
	fedőszín	56,6±3,7	-6,9±5,8	34,5±4,0	35,6±5,1	100,4±7,6
	hússzín	57,6±2,8	-18,2±2,0	41,7±1,9	45,6±2,3	113,5±2,0
‘Pipacs 1’ 3. éf.	alapszín	39,2±4,6	18,1±4,4	15,8±2,5	24,5±2,8	41,7±9,8
	fedőszín	36,5±5,3	25,0±5,5	16,1±2,6	30,1±4,4	33,5±8,3
	hússzín	43,0±5,0	2,6±4,5	17,7±3,0	18,4±2,8	45,6±68,0
‘Pipacs 1’ 4. éf.	alapszín	24,9±3,3	25,3±3,6	11,9±1,9	27,9±3,9	25,2±2,2
	fedőszín	22,3±2,3	20,6±3,7	8,4±2,3	22,2±4,2	21,9±3,3
	hússzín	31,031±3,7	8,1±3,6	11,4±3,3	14,4±3,2	54,8±15,3
‘Pipacs 1’ 5. éf.	alapszín	31,4±1,3	23,9±3,5	9,6±1,9	25,8±3,9	21,8±1,6
	fedőszín	30,3±0,9	20,4±2,6	7,7±1,3	21,8±2,9	20,6±1,2
	hússzín	37,3±2,2	17,9±3,3	15,9±1,7	24,0±2,7	42,0±6,3

A ‘Pipacs 1’ gyümölcsök estén az L^* érték szintén a termés színének sötétedését jelzi, vagyis az érés során az alapszín vizsgálatok 66-tól 25-ig csökken, majd 31-ig növekszik, a fedőszín vizsgálatok 62-től 22-ig csökkent, majd 30-ig növekszik, a hússzín vizsgálatok 62-től 31-ig csökkent, majd 37-ig növekedett. Az a^* érték az érés során az alapszín vizsgálatok -20-tól 25-ig növekedett, majd 24-ig csökkent, a fedőszín vizsgálatok -21-től 25-ig növekedett, majd 20-ig csökkent, a hússzín vizsgálatok -20-tól 20-ig növekedett. A b^* érték az érés során az alapszín vizsgálatok 41-től 10-ig, a fedőszín vizsgálatok 41-től 8-ig, a hússzín vizsgálatok 42-től 11-ig csökkent, majd 16-ig növekedett. Az C^* érték az érés során az alapszín vizsgálatok 45-től 26-ig csökkent, a fedőszín vizsgálatok 46-től 22-ig csökkent, a hússzín vizsgálatok 46-től 14-ig csökkent, majd 24-ig növekedett. A H^o érték az érés során az alapszín vizsgálatok 116-tól 22-ig, a fedőszín vizsgálatok 117-től 21-ig, a hússzín vizsgálatok 115-től 42-ig csökkent. Az L^* , C^* és H^o értékek csökkenése, a^* növekedése nem mutatott teljes linearitást, ugyanis az érés során egyes szövettípusokban előfordult kismértékű, ellenkező irányú változás is. A b^* a kajszli mintákkal ellentétben, de a ‘VN-1’ gyümölcsök értékeihez hasonlóan csökkenő tendenciát mutatott.

5.2.2 Méret és tömeg

A ‘VN-1’ és ‘Pipacs 1’ gyümölcsök érése során változó méret, valamint tömeg adatait a **13. táblázat** tartalmazza.

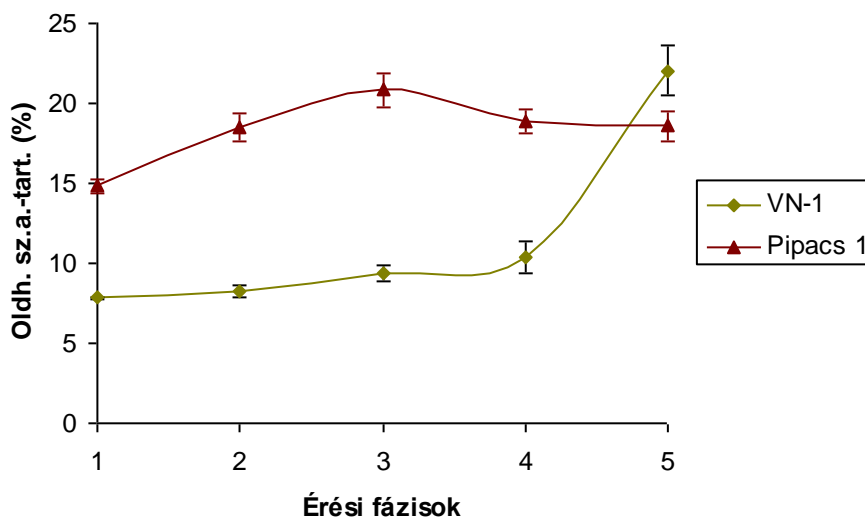
13. táblázat. A ‘VN-1’ és ‘Pipacs 1’ gyümölcsök méretének és tömegének változása az érés folyamán

		1. éf.	2. éf.	3. éf.	4. éf.	5. éf.
‘VN-1’	magasság (mm)	15,1±0,9	15,4±0,6	16,5±0,4	15,9±0,8	16,9±0,6
	D_{vp} (mm)	14,3±1,0	15,1±0,8	16,2±0,3	15,9±0,6	16,9±0,7
	D_{vm} (mm)	15,2±1,8	16,9±0,4	18,7±0,7	18,6±0,8	19,8±0,8
	tömeg (g)	2,2±0,2	2,8±0,3	3,2±0,3	3,2±0,4	4,1±0,4
‘Pipacs 1’	magasság (mm)	13,3±0,2	13,2±0,6	13,3±0,6	17,0±0,8	18,3±0,8
	D_{vp} (mm)	12,6±0,4	12,4±0,6	12,9±0,7	17,5±0,9	19,1±1,1
	D_{vm} (mm)	11,9±0,5	11,6±0,6	12,1±0,8	19,4±1,2	21,6±1,2
	tömeg (g)	1,0±1,5	1,1±0,1	1,3±0,2	3,8±0,6	5,6±0,8

A ‘VN-1’ gyümölcsének magassága 15 mm-ről 17 mm-re, szélessége 14 mm-ről 17 mm-re (D_{vp}), valamint 15 mm-ről 18 mm-re (D_{vm}), tömege 2 g-ról 4 g-ra növekedett az érés során. A ‘Pipacs 1’ gyümölcsének magassága 13 mm-ről 18 mm-re, szélessége 13 mm-ről 19 mm-re (D_{vp}), valamint 12 mm-ről 22 mm-re (D_{vm}), tömege 1 g-ról 6 g-ra növekedett az érés során.

5.2.3 Oldható szárazanyag-tartalom

A 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök oldható szárazanyag-tartalmának érés alatti változását a 13. ábra mutatja.



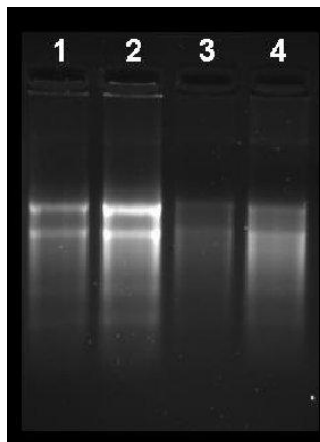
13. ábra. A 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök érés során változó oldható szárazanyag-tartalom értékei.

A 'Pipacs 1' gyümölcsében mért brixértékek a harmadik érési fázisig növekvő, majd ezt követően az ötödik érési fázisig csökkenő tendenciát mutatnak. A 'VN-1' esetében az oldható szárazanyag-tartalom az érés során folyamatosan növekszik, a gyümölcs érésének késői szakaszában óriási mértékű, több mint kétszeres növekedést mutat. A 'Pipacs 1' gyümölcse a negyedik érési fázisig nagyobb oldható szárazanyag-tartalommal rendelkezik, mint a 'VN-1', de a teljesen érett állapotú 'VN-1' gyümölcs oldható szárazanyag-tartalma (22,05 %) meghaladja a 'Pipacs 1' gyümölcsében mért értéket (18,58 %).

5.3 RNS-izolálás különböző érettségű kajszii és meggy gyümölcsökből

A QIAGEN RNeasy Mini Kit, a Jaakola és mts. (2001), valamint az Asif és mts. (2006) által kidolgozott RNS-izolálási eljárások alkalmazása nem eredményezett megfelelő minőségű és mennyiségű RNS-oldatot. A kajszii és meggy gyümölcsök különböző szöveteiből a Wan és Wilkins (1994) által kidolgozott, forró bórsavas RNS-izolálási eljárás azonban lehetővé tette a mind minőségi, mind mennyiségi szempontok alapján megfelelő RNS-oldatok izolálását. Négy

különböző gyümölcsmintából izolált RNS-oldat agaróz-gélelektroforetikus mintázatát a **14. ábra** mutatja. A gélképen jól elkülönülnek a különböző RNS-alegységek.



14. ábra. A forró bórsavas módszerrel izolált RNS-minták agaróz-gélelektroforetikus mintázata. A: 1. érési fázisú ‘Gönci magyarkajszai’ gyümölcs héjszöveve, B: 1. érési fázisú ‘Preventa’ gyümölcs héjszöveve, C: 5. érési fázisú ‘VN-1’ gyümölcshúsa, D: 5. érési fázisú ‘Pipacs 1’ gyümölcshúsa.

A forró bórsavas extrakció során nyert RNS-oldatok tisztaságát spektrofotométerrel (Nano-Drop ND-1000) ellenőriztük. Az oldat fehérjetartalmára utaló 260 és 280 nm-en mért abszorbancia aránya a megfelelő tartományba (1,8 - 2,05) esett. Az oldat szerves oldószertartalmára utaló 260 és 230 nm-en mért abszorbancia aránya szintén a megfelelő határértékek (2 - 2,6) között helyezkedett el.

5.4 Parciális génszekvenciák meghatározása

Az NCBI GenBank és EST adatbázisokban található, kajszai és meggy gyümölcsökre nézve ortológ szekvenciák felhasználásával primereket terveztünk a flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének PCR vizsgálatára (**14. táblázat**). A fragmentumokat klónoztuk, szekvenáltattuk. A szekvenciákat homológia-keresésnek vetettük alá az NCBI BLASTn keresőprogram segítségével. A kajszai és meggy gyümölcsökben azonosított parciális génszekvenciákat, a velük legnagyobb hasonlóságot mutató szekvenciák génbanki azonosító számát, valamint a BLASTn keresőprogram által számított E-értéket a **14. táblázat** tartalmazza.

14. táblázat. A kajszi és meggy gyümölcsökben zajló flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeinek parciális génszekvenciái, valamint a szekvenciákkal legnagyobb hasonlóságot mutató szekvenciák azonosító száma és a hasonlóság mértékére utaló E-érték

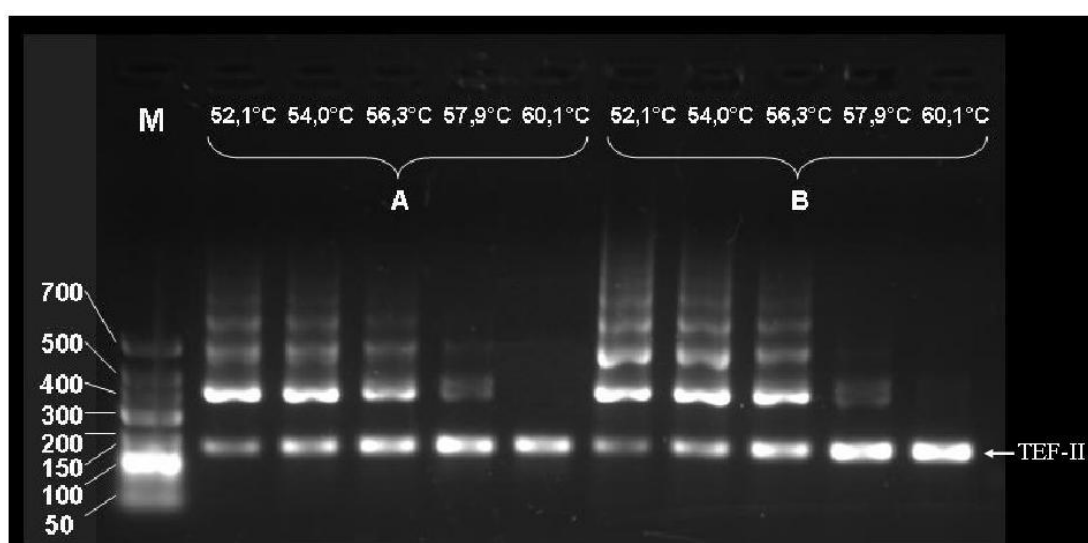
		Meghatározott szekvenciák	BLAST eredménye
kajszi	PAL	JQ622221 (982 bp, gDNS, 'Ceglédi arany')	EF031063 (<i>P. armeniaca</i>) PAL, E=0
		JQ622222 (982 bp, gDNS, 'Harcot')	EF031063 (<i>P. armeniaca</i>) PAL, E=0
	C4H	JQ622235 (609 bp, mRNS, 'Preventa')	GU990522 (<i>P. avium</i>) C4H, E=0
	4CL	JQ622236 (397 bp, mRNS, 'Preventa')	EF685345 (<i>E. japonica</i>) 4CL, E=10 ⁻¹⁵⁸
	CHS	JQ622223 (443 bp, mRNS, 'Preventa')	HM543568 (<i>P. persica</i>) CHS, E=0
		JQ622224 (503 bp, mRNS, 'Aurora')	HM543568 (<i>P. persica</i>) CHS, E=0
		JQ622225 (717 bp, mRNS '18/61'-es hibrid)	HM543568 (<i>P. persica</i>) CHS, E=0
	CHI	JQ622226 (440 bp, mRNS, 'Preventa')	GU990525 (<i>P. avium</i>) CHI, E=0
	F3H	JQ622228 (828 bp, mRNS, 'Preventa')	GU990526 (<i>P. avium</i>) F3H, E=0
	F3'H	JQ622227 (844 bp, mRNS, 'Preventa')	GU990527 (<i>P. avium</i>) F3'H, E=0
	F3'5'H	JQ622234 (334 bp, mRNS, 'Preventa')	GO511847 (<i>M. domestica</i>) F3'5'H EST, E=10 ⁻⁸⁵
	DFR	JQ622229 (450 bp, mRNS, 'Preventa')	HM543571 (<i>P. persica</i>) DFR, E=0
	ANS	JQ663361 (516 bp, mRNS, 'Aurora')	HM543572 (<i>P. persica</i>) ANS, E=0
		JQ663362 (810 bp, mRNS '18/61'-es hibrid)	HM543572 (<i>P. persica</i>) ANS, E=0
ANR	JQ622230 (804 bp, mRNS, 'Preventa')	JN035301 (<i>M. domestica</i>) ANR, E=0	
LAR	JQ254906 (704 bp, mRNS, 'Preventa')	DQ139836 (<i>M. domestica</i>) LAR, E=0	
	JQ254907 (391 bp, mRNS, 'Gönci magyarkajszi')	DQ139836 (<i>M. domestica</i>) LAR, E=0	
UFGT	JQ622231 (975 bp, mRNS, 'Preventa')	FJ854494 (<i>P. communis</i>) GT, E=10 ⁻¹⁶³	
GAPDH	JQ622232 (530 bp, gDNS, 'Harcot')	AB266450 (<i>P. pyrifolia</i>) GAPDH, E=10 ⁻⁵⁶	
meggy	C4H	JQ622242 (638 bp, mRNS, 'Pipacs 1')	GU990522 (<i>P. avium</i>) C4H, E=0
	4CL	JQ622243 (397 bp, mRNS, 'Pipacs 1')	EF685345 (<i>E. japonica</i>) 4CL, E=10 ⁻¹⁶⁰
	CHI	JQ622244 (441 bp, mRNS, 'Pipacs 1')	GU990525 (<i>P. avium</i>) CHI, E=0
	F3H	JQ622245 (832 bp, mRNS, 'Pipacs 1')	GU990526 (<i>P. avium</i>) F3H, E=0
	F3'5'H	JQ622246 (335 bp, mRNS, 'Pipacs 1')	GO511847 (<i>M. domestica</i>) F3'5'H EST, E=10 ⁻⁷⁷
	ANR	JQ622247 (804 bp, mRNS, 'Pipacs 1')	JN035301 (<i>M. domestica</i>) ANR, E=0
	LAR	JQ622248 (352 bp, mRNS, 'Pipacs 1')	DQ250190 (<i>P. communis</i>) LAR, E=0
			DQ139836 (<i>M. domestica</i>) LAR, E=0
	UFGT	JQ622249 (371 bp, mRNS, 'Pipacs 1')	DQ289587 (<i>F. ananassa</i>) GT, E=10 ⁻³⁶
	GAPDH	JQ622250 (209 bp, mRNS, 'VN-1')	AB266450 (<i>P. pyrifolia</i>) GAPDH, E=10 ⁻⁸²
MYB	JQ622251 (571 bp, mRNS, 'VN-1')	HM122625 (<i>M. domestica</i>) MYB, E=10 ⁻¹⁴¹	

PAL: fenilalanin-ammónia-liáz, C4H: fahéjsav-4-hidroxiáz, 4CL: 4-kumaroil-CoA-ligáz, CHS: kalcion-szintáz, CHI: kalcion-izomeráz, F3H: flavanon-3-hidroxiáz, F3'H: flavonoid-3'-hidroxiáz, F3'5'H: flavonoid-3'5'-hidroxiáz, DFR: dihidroflavonol-4-reduktáz, ANS: antocianidin-szintáz, ANR: antocianidin-reduktáz, LAR: leukoantocianidin-reduktáz, UFGT: UDP glükóz:flavonoid-3-O-glükoziltranszferáz, GAPDH: gliceraldehid-3-P-dehidrogenáz, MYB: MYB transzkripció faktor.

5.5 A valós idejű PCR kísérletek optimalizálása

5.5.1 Gradiens PCR

A valós idejű PCR kísérletek során alkalmazott, referenciagénekre tervezett primerpárok optimális tapadási hőmérsékletét gradiens PCR segítségével határoztuk meg. A primerek tapadási hőmérsékleteként az IDT – Oligo Analyzer szoftver segítségével kiszámított olvadási hőmérséklettől általában 5 °C-kal alacsonyabb hőmérséklet mutatkozott ideálisnak. Ez a hőmérséklet adott a gradiens PCR során specifikus, vagyis melléktermék nélküli amplifikációt. Az **15. ábra** a TEF-II F+R primerpárral végzett amplifikációból származó elektroferogramot mutatja, mely esetben a 60,1 °C bizonyult legkedvezőbbnek.



15. ábra. TEF-II F+R primerpár optimális tapadási hőmérsékletének meghatározása gradiens PCR segítségével. M: Marker, GeneRuler Low Range (Fermentas), A: 'Gönci magyarkajszi' hús 1. érési fázis, B: 'Pipacs 1' hús 1. érési fázis.

A gradiens PCR során a számított hőmérséklettől 3-4 °C-kal alacsonyabb tapadási hőmérsékleteken aspecifikus termékek is keletkeztek.

5.5.2 Hígítási mátrix

A primereket és MgCl₂-ot különböző koncentrációban, illetve a templátot különböző mennyiségben tartalmazó qPCR oldatokon végzett valós idejű PCR kísérletek különböző amplifikációs hatékonyságok mellett zajlottak, és különböző TOP értékeket eredményeztek. A valós idejű PCR kísérleteket a gyártó által javasolt 0,3 μM mellett 0,05 μM, 0,1 μM, 0,6 μM, 1 μM és 2 μM primerkoncentrációkkal is elvégeztük. A primerkoncentráció 0,3 μM-ról 0,6 μM-ra

való emelése hozzávetőleg 8-10 %-kal növelte a PCR kísérletek amplifikációs hatékonyságát. A nagyobb (0,6 μ M) primerkoncentráció mellett nem keletkeztek aspecifikus termékek.

A PCR-oldatok $MgCl_2$ koncentrációja 3 mM-os. A $MgCl_2$ koncentráció emelésével hozzávetőleg 2-3 %-kal csökkent a valós idejű PCR kísérletek amplifikációs hatékonysága. A 100 és 150 ng cDNS-t tartalmazó qPCR oldatok fluoreszcenciái átlagosan 1 vagy 2 ciklussal hamarabb érték el a detektálhatósági küszöböt, más különbség nem volt kimutatható, ezért a kísérletekben a 3 mM-os $MgCl_2$ -koncentrációt használtuk.

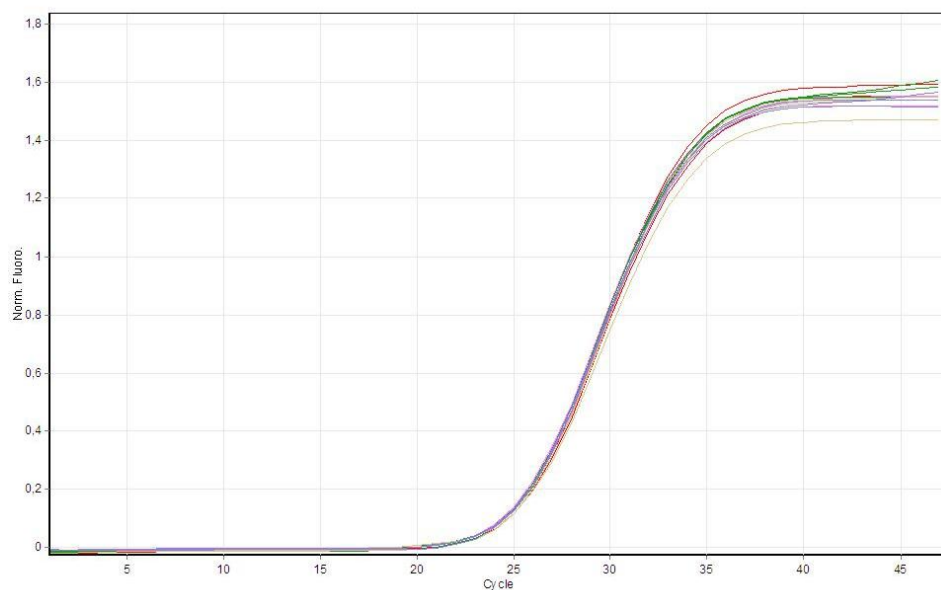
5.5.3 Az optimális referenciagén kiválasztása

A valós idejű PCR kísérletek optimalizálása során több referenciagén (*ACT*, *GAPDH*, *RP-II*, *TEF-II*, *UBQ10* és *18S rRNS*) expressziós stabilitását megvizsgáltuk. A kísérleti eredmények kiértékelésekor a PCR-hatékonyság és a ciklusszám értékeknek megfelelően TOP értékeket vettem figyelembe. Egy mintasorozat a gyümölcsöt jellemző öt érési fázisból, mintánként három párhuzamos reakcióból állt. A Rotor-Gene szoftvere meghatározta a párhuzamos minták PCR-hatékonyság és TOP értékeinek átlagát. A PCR-hatékonyságok (E) nem változtak az érés folyamán. Mintasorozatonként a legkisebb és legnagyobb TOP értékek különbségét, vagyis a Δ_{TOP} értékeket ($\Delta_{TOP} = TOP_{max} - TOP_{min}$) határoztuk meg. A Δ_{TOP} értékek a referenciagén expressziós stabilitását tükrözik oly módon, hogy a kisebb Δ_{TOP} érték állandóbb expressziót mutató referenciagénre utal. A vizsgált gyümölcsminták érése során az öt egymást követő érési állapotban meghatározott legkisebb és a legnagyobb TOP értékek különbségét, vagyis a Δ_{TOP} értékeket a **15. táblázat** tartalmazza.

A 'Preventa' gyümölcshéj és -húsban az *RP-II* mutatta a legnagyobb stabilitást. Ugyanez igaz a 'Gönci magyarkajszai' gyümölcshéjra és húsrá (**16. ábra**). A 'Pipacs 1' gyümölcshéjban az *RP-II* konstansabb expressziót mutatott, mint a *GAPDH* gén. A 'Pipacs 1' gyümölcshúsban egyedül az *RP-II* gén expresszióját vizsgáltuk, melyet az 1,8-as érték mellett megfelelően stabilnak találtunk. A 'VN-1' héj mintasorozatban szintén az *RP-II* expressziója mutatkozott a legstabilabbnak. A 'VN-1' gyümölcshús mintasorozatban az *UBQ10* valamint az *RP-II* mutatták a legnagyobb expressziós stabilitást az oligo(dT)₁₈ primerekkel készült cDNS alkalmazása esetén. A random hexamer primerekkel készült cDNS-ekkel végzett valós idejű PCR kísérletekben a 'VN-1' gyümölcshúsból készült mintasorozatban az *RP-II* gén mellett a *TEF-II*, *UBQ10* és *18S rRNS* gének is viszonylag stabil expresszióval rendelkeztek.

15. táblázat. Referenciagének expressziós stabilitása (Δ_{TOP})

		ACT F1+R1	GAPDH F9+R6	RP-II F3+R3	TEF-II F+R	UBQ10 F+R	18S RNS F+R
‘Preventa’ héj	oligo(dT) ₁₈	1,4	1	0,5	1,7	6,1	
	random hexamer	2,4		1,4	1,5	3,3	1,4
‘Preventa’ hús	oligo(dT) ₁₈		2,3	0,1			
	random hexamer		2,4	0,9			
‘Gönci magyarkajszi’ héj	oligo(dT) ₁₈		0,8	0,1			
	random hexamer						
‘Gönci magyarkajszi’ hús	oligo(dT) ₁₈	2,3		0,5	0,9		
	random hexamer	1,3		0,7	0,7		
‘Pipacs 1’ héj	oligo(dT) ₁₈		1,8	1,4			
	random hexamer						
‘Pipacs 1’ hús	oligo(dT) ₁₈			1,8			
	random hexamer						
‘VN-1’ héj	oligo(dT) ₁₈			1,8	3,2	5,4	
	random hexamer				2,3	4,4	
‘VN-1’ hús	oligo(dT) ₁₈	3,3	3,7	1,9	2,9	1,8	
	random hexamer	3		1,6	1	1,9	1,2



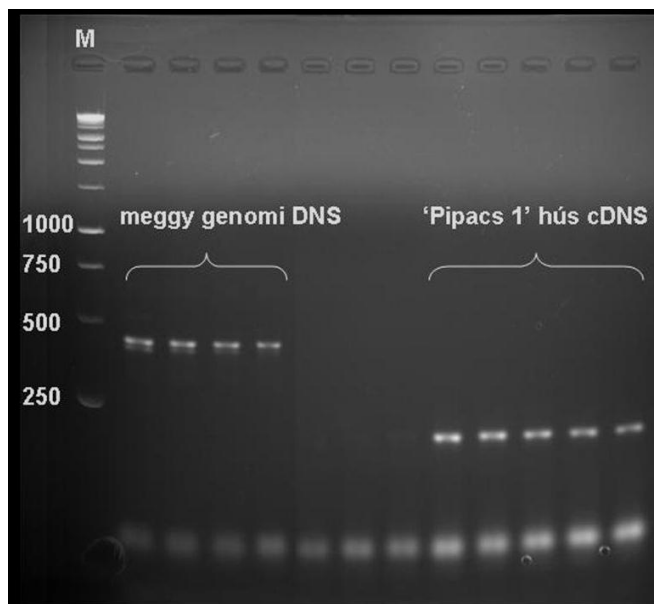
16. ábra. A ‘Gönci magyarkajszi’ öt különböző érési állapotú gyümölcs héjszövetén, az RP-II primerpár alkalmazásával végzett valós idejű PCR amplifikációs görbéi.

Összességében az oligo(dT)₁₈ és a random hexamer primerekkel készült cDNS oldatokon végzett kísérletek alapján a vizsgált referenciagének expressziói nagyon hasonló értékeket mutatnak. A random hexamer primerekkel készült cDNS-oldatok használatával az amplifikációs görbék ~2-3 ciklussal később érték el a detektálhatósági küszöböt, de az adatok kiértékelése során a relatív expressziós értékekben csak minimális különbség mutatkozott.

5.5.4 A genomi DNS-szennyeződés hatásának vizsgálata

A cDNS és genomi DNS mintákon végzett PCR a kajszi és meggy mintasorozatokon rendre ~250 és ~441 bp hosszúságú termékeket eredményezett a GAPDH F8 és R6 primerpár alkalmazásakor (**8. ábra**).

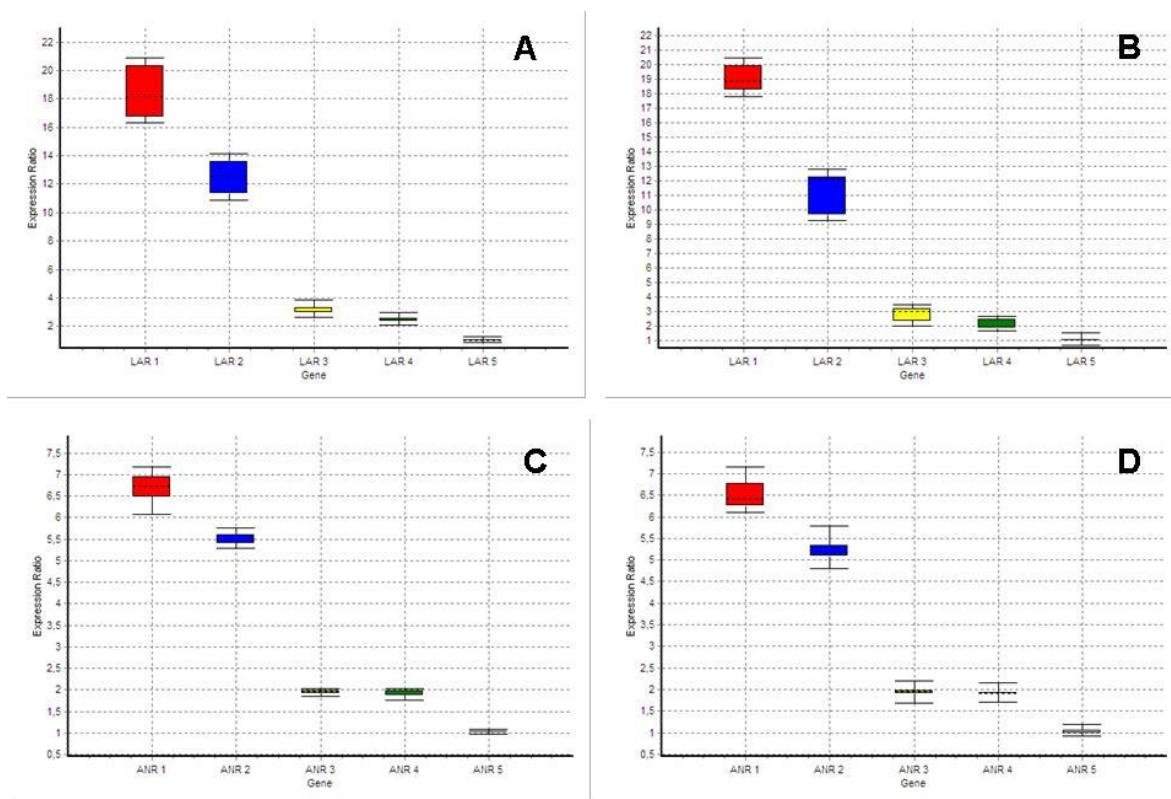
A cDNS illetve genomi DNS templáton keletkezett fragmentumok mérete a génben található intron méretével (~191 bp) különbözött egymástól (**17. ábra**). A várttól eltérő méretű PCR-termékek nem keletkeztek. A PCR során különböző meggyfajták genomi DNS-ét és eltérő érési állapotú 'Pipacs 1' gyümölcsök gyümölcshúsából készült cDNS-oldatokat használtunk templátként.



17. ábra. A cDNS oldatok tisztaságára, vagyis genomi DNS-szennyeződés jelenlétének kimutatására irányuló PCR során keletkezett ampliconok gélelektroforetikus mintázata. M: 1 kb marker (Promega).

Valós idejű PCR kísérletekkel is ellenőriztük a cDNS-oldatok genomi DNS-szennyeződéstől való mentességét. Két-két primerpár segítségével vizsgáltuk a *LAR* és *ANR*

gének expresszióit a ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshúsából készített mintasorozaton (8. ábra). Az eredményeket a 18. ábra mutatja.



18. ábra. Genomi DNS szennyeződés kimutatása valós idejű PCR technikával. A: ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshús vizsgálata qLAR F1R1 primerkombinációval, B: ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshús vizsgálata qLAR F2R1 primerkombinációval, C: ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshús vizsgálata qANR F1R1 primerkombinációval, D: ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshús vizsgálata qANR F1R2 primerkombinációval. (1. érési állapot: piros; 2. érési állapot: kék; 3. érési állapot: sárga; 4. érési állapot: zöld és 5. érési állapot: sötétszürke)

A ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshúsában kifejeződő *LAR* és *ANR* gének relatív expressziós értékei az érés során közel azonosak voltak a két-két különböző primerpár alkalmazása mellett.

A valós idejű PCR kísérletek eredményeinek kiértékelése során figyelembe vettük a PCR-termékek olvadási hőmérsékletét. A qLAR F2-R1 és qANR F1-R2 primerpár alkalmazása során amplifikált fragmentumok olvadási görbéi egy inflexiós ponttal rendelkeztek. A szoftver által automatikusan generált olvadási görbe deriváltja ennek megfelelően csupán egy maximumértéket mutatott. Ha a PCR-termékek tartalmaztak volna intront is, akkor annak megfelelően egy magasabb olvadási értéket is mutatott volna a szoftver.

5.6 Valós idejű PCR

5.6.1 Az adatok kiértékelése

A legfontosabb flavonoid gének expressziós vizsgálatára primereket terveztünk (7. táblázat). A génexpresszió vizsgálata akkor ad igazán értékes információt, ha lehetőségünk nyílik a különböző érési állapotok (éretlen → érett), különböző gyümölcsrészek (gyümölcshéj és -hús), eltérő genotípusok ('Preventa' és 'Gönci magyarkajszi', illetve 'Pipacs 1' és 'VN-1'), esetleg különböző fajok (kajszi és meggy) összehasonlítására. Ezért egy olyan adatkiértékelési módszert dolgoztunk ki, melynek segítségével a relatív expressziós értékek az összes mintasorra és vizsgált génre együttesen értelmezhetők. Az adatok egy halmazban való kiértékelését és az eredmények együttes, összevető ábrázolását nevezik „data pooling”-nak. Minden lehetséges laboratóriumi műveletet, pl. RNS-izolálás, cDNS-szintézis stb. azonos körülmények között végeztünk el. Azonos mennyiségű (1000 ng) RNS felhasználásával készültek a cDNS-oldatok, és a valós idejű PCR kísérleteket is azonos mennyiségű (50 ng) cDNS felhasználásával végeztük.

Az összes qPCR reakció során keletkezett TOP és E értéket összevetettük. Kiszámítottuk a legnagyobb és legkisebb expressziót mutató minták esetén az E^{TOP} hatványértéket. Ezen hatványértékeket a továbbiakban olyan szempont szerint értelmeztük, hogy a kérdéses mintákban lévő templát hány-szoros sokszorosítása szükséges a qPCR berendezés által az egyes mintákból kibocsátott fluoreszcens jel detektálhatósági szintjének eléréséhez. Másként megfogalmazva: adott PCR hatékonyság mellett hány ciklus szükséges ahhoz, hogy a templát mennyisége elérjen egy bizonyos fluoreszcenciaszintet. A legkisebb sokszorosítást igénylő minta E^{TOP} értéke volt a legkisebb, a legnagyobbat igénylő minta E^{TOP} értéke volt a legnagyobb érték. Ezek $1,79^{18,5} = 47619,08$ és $1,78^{35,7} = 870951722,53$. A TOP=18,5 és E=1,79 értékekkel rendelkező minta (1. érési fázisú 'Preventa' héj, *CHS*) mutatta a legnagyobb expressziót. A TOP=35,7 és E= 1,78 értékekkel rendelkező minta (4. érési fázisú 'VN-1' hús, *PAL*) mutatta a legkisebb expressziót. Ezeket a TOP és E értékeket betápláltuk minden egyes mintasorozathoz tartozó REST fájlba. Így minden mintasorozat kapott egy elméleti maximum- és minimumértéket is. Ezek az elméleti maximum- és minimumértékek minden kiértékelési fájlban azonosak voltak. A REST program az egyes mintasorozatok relatív expressziós értékeit az elméleti maximum (vagyis a TOP=18,5, E=1,79) és elméleti minimum (vagyis a TOP=35,7, E= 1,78) értékekhez viszonyítva állapította meg. Ez utóbbi értéket használtuk kontroll mintaként, mely egységnyi relatív expressziós értéket jelentett. A relatív expressziós értékek 14035,463 és 1,005 között változtak. E kiértékelési módszer lehetővé tette valamennyi relatív expressziós érték egymással való összevetését.

Az adatok kiértékelése során nyert értékek relatív transzkriptum-mennyiségbeli értékeket tükröznek, melyek 1 és 14035 között változnak. Minden további relatív génexpressziós értéket ezen értékekhez viszonyítva tüntettünk fel.

5.6.2 A flavonoid gének expressziós vizsgálata kajszigyümölcsben

A 'Gönci magyarkajszai' és 'Preventa' gyümölcshús- és héjszövetben valós idejű PCR technikával mért relatív génexpressziós értékeket a **16. táblázat** tartalmazza. A kajszai gyümölcsök relatív génexpressziós értékei az érés során csökkenő tendenciát mutatnak. A csökkenő tendencia gyakorlatilag valamennyi szövettípusra igaz. Az érés során nagyobb mértékű transzkriptumbeli csökkenés figyelhető meg a 'Preventa' gyümölcshúsban és -héjban. Ezzel szemben a 'Gönci magyarkajszai' hús- és héjszöveiben az érés során kisebb mértékű csökkenést tükröznek az adatok. A 'Gönci magyarkajszai' esetén az első és második érési fázis között általában kisebb mértékű relatív transzkriptumbeli növekedés, majd a második érési fázistól az ötödik érési fázisig nagyobb mértékű, fokozatos csökkenés figyelhető meg.

A gyümölcshús és -héj expressziós profilja között különbség figyelhető meg. Az első érési állapotú 'Gönci magyarkajszai' gyümölcshéja egyes gének esetén (*PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*, *DFR*, *ANS*, *ANR* és *LAR*) jelentősen felülmúlja a gyümölcshúsra jellemző expressziós értékeket, míg a többi gén esetében nincs, vagy csak kismértékű az eltérés. A következő érési állapotban ez a tendencia visszajára fordul: kevés kivételtől eltekintve (*F3H* és *FLS*) a génexpresszió mértéke a gyümölcshúsban meghaladja a héjra jellemző értéket. A harmadik érési állapotban mutatkozik a legkisebb eltérés a héj és hús között, jelentősebb különbség a *C4H*, *CHS*, *F3H*, *F3'H*, *FLS* és *ANS* gének esetében mutatható ki: a héj expressziós értéke ezekben az esetekben meghaladja a gyümölcshúsra jellemző adatokat.

A negyedik érési állapotban ez a különbség még kifejezettebb lesz, és több gén esetében is kimutatható. A negyedik érési állapotban a gyümölcshéjban számos gén (*PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *FLS*, *ANS* és a *hidroxilázok*) expressziója ismételten növekszik szemben a gyümölcshússal, ahol expresszióbeli növekedés csak elvétve (*CHI*, *F3H*, stb.), és igen kismértékben következik be. Az ötödik érési állapotban jelentős mértékű csökkenés látható, a gyümölcshéj és -hús között alig kimutatható különbséggel.

A 'Preventa' gyümölcshús és héj relatív transzkriptum-mennyiségében az első érési fázistól mindkét gyümölcsrészen nagymértékű csökkenés figyelhető meg az érés során. A 'Preventa' gyümölcshéja gyakorlatilag minden enzimre nézve és minden érési állapotban nagyobb transzkriptum-mennyiséggel rendelkezik a gyümölcshúshoz képest. A 'Preventa' gyümölcs szöveteiben hozzávetőleg kétszeres transzkriptum-mennyiség mutatható ki az első

érés állapotú héjszövetben a gyümölcshúshoz képest. A második, harmadik és negyedik érési fázisokban ez a különbség többszörösére (négy-nyolcszoros értékre) növekszik, majd az ötödik érési állapotban a különbség ismét csökken. A negyedik érési állapotban 'Preventa' esetében is látható egy kismértékű expresszió-növekedés, mely itt is elsősorban a héjra jellemző, ugyanakkor a gyümölcshúsban a 'Gönci magyarkajsi'-hoz képest több gén esetében következik be.

Érdekes a különböző genotípusok azonos típusú szöveteiben kimutatott transzkriptumtartalom összehasonlítása. Az első érési fázisban a 'Preventa' gyümölcshúsa többszörösen nagyobb transzkriptum-mennyiséget tartalmaz, mint a 'Gönci magyarkajsi'-é, elsősorban a *PAL*, *C4H*, *C3H*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *ANR* és *LAR* gének esetében. A második érési fázisra a 'Gönci magyarkajsi' gyümölcshúsában a transzkriptumok relatív mennyisége minden esetben meghaladja a 'Preventa'-ét. Viszont a 'Preventa' a 'Gönci magyarkajsi'-hoz képest nagyobb transzkriptumtöbbséggel rendelkezik az első érési fázisban, mint a 'Gönci magyarkajsi' a 'Preventa'-hoz képest a második érési fázisban. Érdekes a 'Preventa' gyümölcshúsának nagy *ANS* transzkriptumtartalma a gyümölcshús sárga színének, vagyis a piros antocianin pigmentáltság hiányának ellenére.

16. táblázat. ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcsök hús- és héjszövetekben mért relatív génexpressziók (az érési fázisok fentről lefelé növekednek)

		PAL	C4H	4CL	HCT	C3H	CHS	CHI	F3H	F3'H	F3'5'H	FLS	DFR	ANS	ANR	LAR	UFGT	MYB	MYB10
‘Gönci magyarkajszi’ hús	1	255	553	279	98	51	1196	352	750	763	692	17	681	718	256	335	140	430	7
	2	235	438	116	22	158	2410	661	915	1561	1485	20	1123	699	222	202	101	375	6
	3	27	59	56	8	132	278	205	467	595	1658	21	152	278	66	57	105	382	8
	4	13	21	53	13	106	160	264	597	273	1539	15	72	242	76	45	146	394	7
	5	7	6	46	3	27	92	179	459	24	719	9	5	60	38	22	63	131	4
‘Gönci magyarkajszi’ héj	1	595	655	282	81	50	3901	793	1630	770	686	74	960	1864	524	665	186	341	13
	2	106	195	111	10	109	1151	462	1006	1339	1065	240	560	590	114	188	239	629	41
	3	30	114	79	5	105	651	187	898	1253	1284	374	131	406	50	90	194	761	34
	4	101	261	98	5	119	1772	266	1047	1594	1624	818	391	929	57	106	287	414	99
	5	8	15	73	3	33	79	96	382	449	591	33	8	94	40	14	97	153	11
‘Preventa’ hús	1	1270	1793	330	30	292	8617	1140	4183	2113	1010	21	1671	3144	1240	1055	198	379	9
	2	16	58	23	5	66	154	283	767	1403	774	24	74	452	97	55	125	354	10
	3	7	15	27	4	34	32	154	719	429	1752	19	2	452	84	21	119	136	8
	4	8	19	28	4	61	25	176	878	627	1546	25	3	394	83	21	151	150	10
	5	8	9	29	2	9	34	185	458	637	815	15	8	111	67	31	107	89	7
‘Preventa’ héj	1	2175	3166	584	41	568	14035	1469	8158	3479	1482	59	3397	8330	1663	2337	310	495	37
	2	110	238	235	17	156	1186	392	1451	2137	1100	154	290	831	100	196	347	567	47
	3	32	148	136	5	123	437	232	1815	2263	2448	89	71	846	92	46	310	370	37
	4	50	247	111	3	138	1014	259	1824	3403	2781	305	121	1049	110	53	328	450	93
	5	34	57	86	6	75	82	198	814	3594	1542	27	11	247	130	27	573	362	21

A héjszöveteket vizsgálva a hússzövetekhez hasonló tendenciát figyelhetünk meg az első érési állapotban, ugyanis a 'Preventa' átlagosan három-, négyszeres transzkriptum-többséggel rendelkezik – a *HCT* és *FLS* géneket kivéve – a 'Gönci magyarkajszai'-hoz képest. A második érési fázisban – a gyümölcshússal ellentétben – a 'Gönci magyarkajszai' nem rendelkezik nagyobb transzkriptum-mennyiséggel, csak az *FLS* és *DFR* gének esetén, ami a későbbi érési állapotokban is megmarad. A harmadik és negyedik érési fázisban is nagyobb transzkriptum-mennyiség jellemzi a 'Preventa' gyümölcshéját, elsősorban a hidroxiláz enzimeket kódoló gének esetében. Az érett 'Preventa' gyümölcs héjszövetében a legtöbb gént nagyobb expresszió jellemzi, mint a 'Gönci magyarkajszai'-t; a legnagyobb különbség ismét a hidroxiláz gének esetében mutatkozott.

Az eredmények szemléletesebb bemutatása érdekében a **16. táblázat adataiból** szinkódos ábrázolást is készítettünk (**II. Melléklet**).

5.6.3 A flavonoid gének expressziós vizsgálata meggy esetében

A 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök hús- és héjszövegeiben valós idejű PCR technikával mért relatív génexpressziós értékeket a **17. táblázat** tartalmazza. A meggy érése során nem tapasztalható a relatív transzkriptummennyiség kajszigyümölcs esetében látott, folyamatosan csökkenő tendenciája. A vizsgált fajták gyümölcseinek érése során a legtöbb gén expressziója a negyedik érési fázisig folyamatosan növekszik (a 'VN-1' hússzövetét kivéve), majd az ötödik érési fázisra csökkenést mutat. A 'VN-1' hússzövetében csak igen kis transzkriptum-mennyiséget sikerült kimutatni, ami az érés során sem mutatott jelentős változást. A 'Pipacs 1' gyümölcshúsában a gének csupán egy része (*4CL*, *F3H*, *F3'H*, *F3'5'H* és *ANS*) mutat a 'VN-1' héjszövetéhez hasonló irányú – növekvő, majd a negyedik érési fázistól csökkenő – változást. A transzkripciós faktorokat kódoló gének csak a negyedik érési fázisban mutatnak nagy expressziót. A 'Pipacs 1' gyümölcshúsában az érés során a *PAL* és *C4H* gének növekvő, míg a gének többsége egy kezdeti (eltérő hosszúságú) növekedést követően csökkenő expressziót mutat. A hidroxiláz enzimeket kódoló gének, valamint a *DFR* és *ANS* expressziója csak a teljesen érett gyümölcsben esik vissza, míg a *CHS* és *CHI* géneké korábban.

A 'VN-1' hús- és héjszövetének génexpresszióit összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a gyümölcshús elenyésző mennyiségben tartalmaz transzkriptumokat a héjszövethez képest, mely különbség olykor többeszeres. A 'VN-1' gyümölcshéjában az érés során viszonylag kis expresszióval rendelkeznek a *HCT*, *C3H*, *FLS*, *ANR* és *LAR* gének. A többi gén kifejezetten nagy expressziót mutat a negyedik-ötödik érési fázisban.

A 'Pipacs 1' gyümölcshús és -héj génexpresszióit összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a szövetek transzkriptumtartalma a legtöbb gén esetében az első négy érési fázisban közel azonos. A héj több transzkriptumot tartalmaz, az ötödik érési fázisra a héjszövetben olyan mértékű transzkriptum-mennyiségbeli növekedés figyelhető meg, hogy a különböző szövetek transzkriptumtartalmának különbsége átlagosan a hatszorosára emelkedik. A 'Pipacs 1' gyümölcshúsa meglehetősen kis expressziókkal rendelkezik a *HCT*, *C3H*, *FLS*, *ANR* és *LAR* génekre nézve. Az *F3H* és *F3'5'H* gének, valamint a transzkripciós faktorok kifejezetten nagy expressziót mutatnak a negyedik érési fázisú 'Pipacs 1' hússzövetben. A 'Preventá'-hoz hasonlóan a 'Pipacs 1' gyümölcshúsa is nagy *ANS* transzkriptumtartalommal rendelkezik. A különböző génexpressziók egymáshoz képesti aránya nagy hasonlóságot mutat a 'Pipacs 1' gyümölcshús és -héj esetében.

Érdekes a különböző genotípusok szövetspecifikus transzkriptumtartalmának összehasonlítása. A 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök héjszöveteit vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a 'Pipacs 1' a legtöbb vizsgált génre nézve többszörös transzkriptummennyiséggel rendelkezik az első érési fázisban, mely különbség csökken az érés folyamán. Bizonyos gének (*4CL*, *C3H*, *F3'5'H* és *FLS*) és a transzkripciós faktorok nem mutatnak nagyobb expressziót 'Pipacs 1' gyümölcshéjban. A *PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *DFR*, *F3'H* és *ANS* gének, valamint a transzkripciós faktorok többszörös transzkriptummennyiséget mutatnak a 'VN-1' héjszövetben, különösen a harmadik-negyedik érési fázistól. Érdekes a *MYB10* transzkriptum mennyisége a 'VN-1' gyümölcshéjban, ami a 3. érési fázisban például 133-szoros mennyiséget mutat a 'Pipacs 1' gyümölcshéjhoz képest. Mindezek alapján a MYB és MYB10 transzkripciós faktorok szerepe valószínűsíthető a fenti gének transzkripciós szintű szabályozásában.

Az eredmények szemléletesebb bemutatása érdekében a **17. táblázat adataiból** színekódos ábrázolást is készítettünk (**III. Melléklet**).

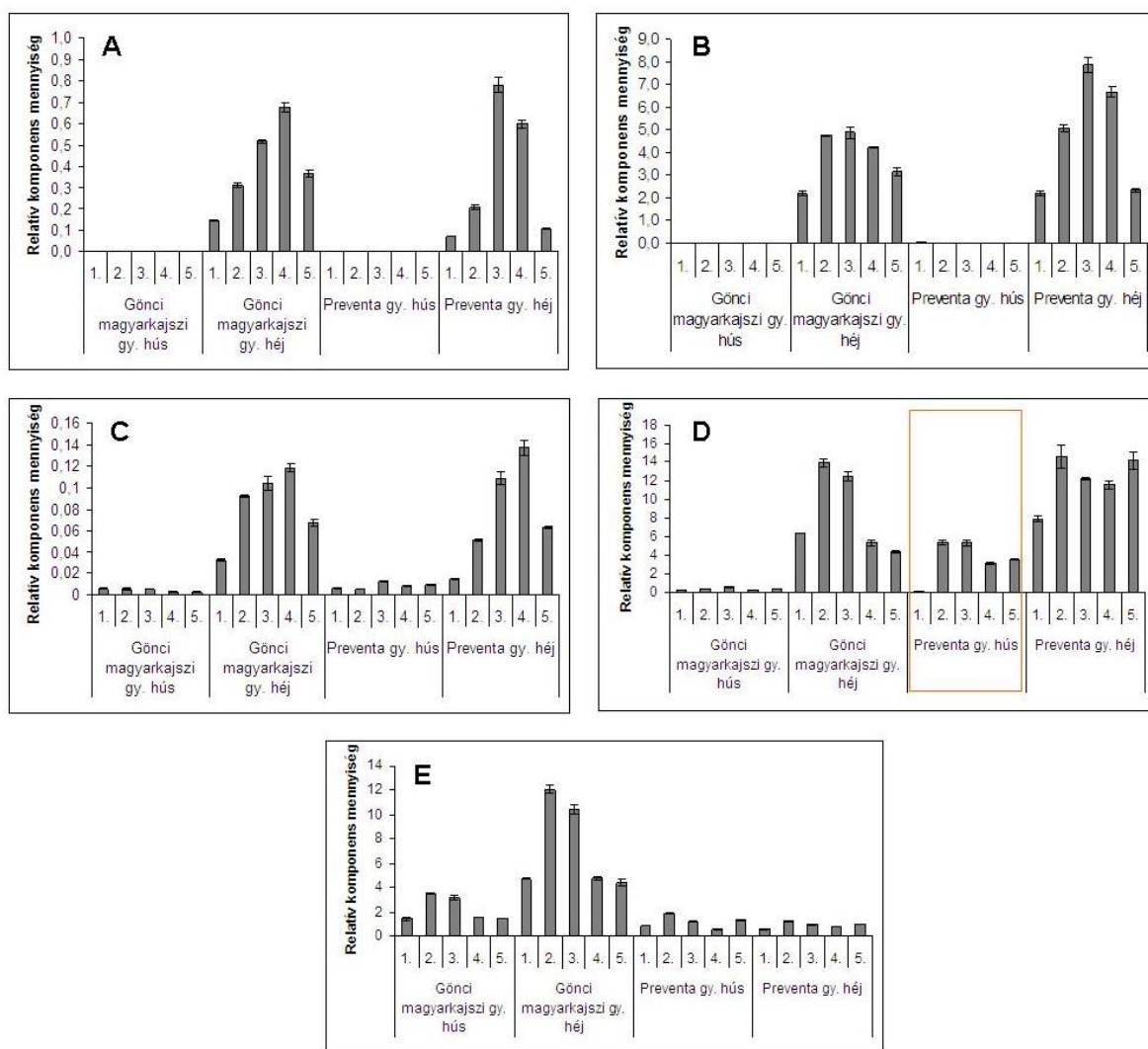
17. táblázat. A ‘VN-1’ és ‘Pipacs 1’ gyümölcsök hús- és héjszövetekben mért relatív génextpressziók (az érési fázisok fentről lefelé növekednek)

		PAL	C4H	4CL	HCT	C3H	CHS	CHI	F3H	F3'H	F3'5'H	FLS	DFR	ANS	ANR	LAR	UFGT	MYB	MYB10
‘VN-1’ hús	1	3	11	13	2	3	2	4	5	6	41	6	4	2	3	7	5	10	4
	2	5	17	12	2	7	3	8	22	6	113	9	14	12	6	8	8	13	6
	3	3	27	29	2	4	7	22	61	17	109	6	27	33	3	6	5	23	13
	4	1	9	8	2	2	2	5	11	5	57	6	12	3	2	5	4	19	11
	5	2	11	8	2	3	3	12	17	6	37	7	11	6	3	7	4	13	9
‘VN-1’ héj	1	20	153	66	6	34	18	56	152	90	451	39	144	186	17	25	57	160	36
	2	58	568	81	7	44	130	140	586	280	1287	33	291	1063	18	28	47	501	339
	3	473	2163	67	9	38	775	463	2748	1185	2845	31	119	2652	12	34	60	1228	1994
	4	2450	10337	138	11	38	2408	1134	5206	5704	5544	23	3864	10960	22	25	92	7038	5704
	5	1134	6677	147	18	30	2385	1347	2994	4296	2173	40	4232	9374	38	53	124	2278	1671
‘Pipacs 1’ hús	1	26	310	23	7	5	309	447	985	166	532	32	219	309	56	14	44	9	20
	2	28	311	72	15	5	349	321	886	278	899	28	426	743	79	18	203	11	22
	3	13	395	30	23	7	42	110	2275	219	1707	40	375	306	26	17	77	17	26
	4	96	845	81	7	9	43	170	6509	630	5366	24	503	1918	11	9	150	2721	1847
	5	134	1477	41	4	14	16	17	3289	353	1960	13	222	1173	12	6	21	106	91
‘Pipacs 1’ héj	1	34	400	57	14	12	565	576	3052	546	549	32	433	514	118	41	128	10	8
	2	36	401	90	18	32	273	214	1109	466	762	40	390	361	50	33	172	12	9
	3	16	509	56	30	13	52	148	3247	621	1785	19	350	212	33	27	153	34	15
	4	124	1090	96	11	11	201	186	6398	1142	4166	27	523	2068	22	20	159	1523	569
	5	173	1904	188	22	15	447	570	8714	1659	2449	44	1060	4068	33	24	141	555	234

5.7 A kajszigyümölcs egyedi polifenolos komponenseinek kimutatása

A tömegspektrometriás analízis során a ‘Gönci magyarkajszai’ és ‘Preventa’ gyümölcsök hús- és héjszövegeiben azonosított komponensek, valamint az azokat jellemző retenciós idők az alábbiak voltak: cianidin-hexozid (14,78 perc), katechin (13,45 perc), cianidin-dezoxihexozid-hexozid (15,29 perc), epikatechin (16,21 perc), kvercetin-dezoxihexozid-dihexozid (17,45 perc), kvercetin-dihexozid (18,65 perc), kempferol-dezoxihexozid-dihexozid (18,85 perc), kvercetin-dezoxihexozid-hexozid (20,37 perc), rutin (kvercetin-3-*O*-rutinozid, ahol a rutinozid csoport ramnóz-1,6-glükózt jelent) (20,59 perc), kvercetin-hexozid (21,33 perc), kempferol-3-*O*-rutinozid (22,25 perc), kempferol-hexozid (23,16 perc), naringenin-hexozid (23,26 perc), kvercetin-3-*O*-glükozid-6''-acetát (23,28 perc) és kvercetin-hexozid-acetát (23,82 perc). A daidzein standard 27,51 perc retenciós idő után érkezett a készülék detektorába.

A kvercetin-hexozid, rutin, naringenin-hexozid, katechin és epikatechin relatív mennyiségi értékeihez képest a többi komponens nagyságrendekkel kisebb mennyiségi értéket mutatott, így azok kiértékelésétől eltekintettünk. A kvercetin-hexozid, rutin, naringenin-hexozid, katechin és epikatechin relatív mennyiségi értékeit a **19. ábra** tartalmazza.



19. ábra. Egyedi komponensek relatív mennyisége ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcsök hús- és héjszöveteiben. A: kvercetin-hexozid, B: rutin, C: naringenin-hexozid, D: katechin, E: epikatechin.

A flavonoid komponensek mennyisége az érés során általában növekvő, majd csökkenő tendenciát mutat. A gyümölcsök héjszövete nagyobb mennyiségben tartalmaz flavonoidokat a mezokarpiumhoz képest.

A kvercetin-hexozid, a rutin és a naringenin-hexozid hozzávetőleg azonos, és a héjszövetekhez képest rendkívül kicsi értékeket mutatnak mindkét genotípus mezokarpiumában. A gyümölcsök mezokarpiumának fő komponensei a katechin és epikatechin, melyek átlagosan két nagyságrenddel nagyobb értékeket mutatnak, mint a kvercetin-hexozid, a rutin és a naringenin-hexozid. Az epikatechin nagyobb mennyiségben található meg a ‘Gönci magyarkajszi’ mezokarpiumában; az érés során átlagosan másfél-, két és félszeres mennyiségben. Az öt komponens közül a katechin nagyobb relatív mennyiségi értéket mutat a ‘Preventa’ mezokarpiumában, mint a ‘Gönci magyarkajszi’-ében. A ‘Preventa’ katechintöbblete

sokkal nagyobb mértékű, mint a 'Gönci magyarkajszi' epikatechin-többlete. Az első érési fázisban a 'Gönci magyarkajszi' tartalmazott nagyobb mennyiségben katechint, de a későbbi érési fázisokban ez az arány megfordult. Átlagosan tizenegyszer nagyobb relatív katechintartalom volt mérhető a 'Preventa' gyümölcshúsában, mint a 'Gönci magyarkajszi' éban. Az első érési fázisban meglehetősen kicsi a 'Preventa' mezokarpiumának relatív katechintartalma, majd a mennyiség a második és harmadik érési fázisokban tetőzik. A negyedik és ötödik érési fázisú 'Preventa' gyümölcsök mezokarpiuma 40 %-kal kevesebb katechint tartalmaz a második és harmadik érési fázisokhoz képest, ami még mindig tizenegyszer nagyobb, mint a 'Gönci magyarkajszi' -é.

A 'Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' gyümölcshéja nagyobb mennyiségben tartalmaz flavonoid komponenseket, mint a gyümölcsök mezokarpiuma. Mindkét kajszigenotípus esetén a héj meghatározó flavonoid komponensei a rutin, a katechin és az epikatechin. A kvercetin-hexozid és naringenin-hexozid közel azonos arányban található meg a 'Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' gyümölcsök héjszövetében. A harmadik és negyedik érési állapotú 'Preventa' héjszövege nagyobb mennyiségben tartalmaz rutint, mint a 'Gönci magyarkajszi' -é. A negyedik és ötödik érési állapotú 'Preventa' gyümölcsök héjszövege közel háromszoros katechintartalommal rendelkezik a 'Gönci magyarkajszi' -hoz képest. A gyümölcsök epikatechintartalma a 'Gönci magyarkajszi' -ban volt nagyobb, az érés során tíz, majd ötszörös különbséget mutattunk ki.

6 Eredmények megvitatása

6.1 A kajszii érési folyamatának jellemzése

A 'Gönci magyarkajszii' és 'Preventa' kajszifajták gyümölcseinek érési folyamatát (9. ábra) a szín, méret, tömeg és oldható szárazanyag-tartalom változásával jellemeztük.

6.1.1 A gyümölcsök színének változása az érés folyamán

A kajszibarack gyümölcse az érés során zöld → sárga → narancssárga színátmenetet mutat. Bizonyos fajták esetében a gyümölcs felületének egy része, vagy a teljes felület piros fedőszínt kap. Az éretlen gyümölcs zöld színét a klorofill adja. Az érés során a klorofill lebomlik, és a karotinoidok akkumulációja figyelhető meg, melynek eredményeként alakul ki a kajszira jellemző sárga gyümölcsszín (Katayama és mts., 1971; Marty és mts., 2005).

A 'Gönci magyarkajszii' esetén a gyümölcs alapszínének a^* és b^* értékei jól tükrözték a zöld → zöldessárga → sárga → világos narancssárga → színátmenetet. Hasonló tendencia mutatkozott a gyümölcsök hússzínének és fedőszínének változása során azzal a különbséggel, hogy az érett gyümölcsök esetében megjelenő piros fedőszínt a nagyobb a^* és kisebb b^* értékek jelezték.

A 'Preventa' gyümölcseire jellemző a^* és b^* értékek változása hasonlított a 'Gönci magyarkajszii' gyümölcsei esetében mért változáshoz a gyümölcs alap-, fedő- és hússzínében egyaránt. Mindkét genotípus gyümölcseinek különböző szöveteiben az érés során az a^* , a b^* és a színtelítettség (C^*) értékek növekvő, míg a színezeti szög (H^0) csökkenő tendenciát mutattak. Ezen eredmények korrelálnak Akin és mts. (2008), Ruiz és mts. (2005b), valamint Hegedűs és mts. (2011) korábbi eredményeivel.

6.1.2 A gyümölcsök fejlődését mutató egyéb paraméterek változása az egyes fejlődési állapotokban

Az érés korai szakaszában nagyobb ütemű növekedés figyelhető meg; érési fázisonként a 'Gönci magyarkajszii' magassága 6, 4, 2, majd 1 mm-rel, tömege 13, 14, 11 és 8 g-mal növekedett. A 'Preventa' magassága 1, 3, 3, majd 4 mm-rel, tömege 4, 4, 7, majd 13 g-mal nőtt, vagyis a két fajta növekedése némileg eltérő üteműnek bizonyult.

A kajszigyümölcs oldható szárazanyag-tartalma folyamatosan növekedett az érés során. Gómez és Ledbetter (1997) szintén az oldható szárazanyag-tartalom növekedését figyelték meg két különböző kajszifajta gyümölcseiben, melyek az érés során 10,8-ról 14,6 %-ra, valamint 8,4-

ról 11,4 %-ra növekedtek. Ezek az adatok nagy hasonlóságot mutatnak a ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcsök oldható szárazanyag-tartalmának változásával.

6.1.3 Az antioxidáns kapacitás és összpolicfenol-tartalom változása a gyümölcsfejlődés során

A ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcsök mezokarpiumában és héjszövetében az érés során változó, a két genotípus közt jelentős különbséget mutató antioxidáns kapacitás értékeket három különböző módszerrel jellemeztük. A ‘Preventa’ gyümölcs antioxidáns kapacitása és összfenoltartalma jelentősen meghaladta a ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcseire jellemző értékeket, ahogyan azt Hegedűs és mts. (2010) korábbi eredményei is megerősítik. A ‘Preventa’ összfenoltartalma valamennyi korábban vizsgált kajszifajta fenoltartalmát jelentős mértékben meghaladja (Akin és mts., 2007; Drogoudi és mts., 2008; Leccese et al., 2008).

Mindhárom módszer esetén a ‘Preventa’ gyümölcshéj mutatta a legnagyobb antioxidáns kapacitás értéket. A ‘Preventa’ értékeihez képest átlagosan 50-70 %-kal kisebb antioxidáns kapacitás jellemzi a ‘Gönci magyarkajszi’ héjszövetét. A ‘Gönci magyarkajszi’ vizsgálatok az érett gyümölcsök hússzövege közel kétszer nagyobb összes fenoltartalmat mutatott a héjhoz képest.

Az érés során a ‘Preventa’ gyümölcshéj összes fenoltartalma közel háromszoros értékeket mutatott a ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshéjához képest, majd ez a különbség a teljesen érett gyümölcsben több mint hétszeresére emelkedett. A gyümölcshéjhoz képest a gyümölcshús kisebb antioxidáns kapacitás értéket mutatott mindkét genotípus esetében. A ‘Preventa’ gyümölcshéj összes fenoltartalma átlagosan négyszerese volt a gyümölcshúsban mért értékeknek. Ezzel szemben az első érési állapotban a ‘Gönci magyarkajszi’ héj közel ötszörös összes fenoltartalmat mutatott a gyümölcshúshoz képest, majd az érés során az összes fenoltartalom a gyümölcshúsban nőtt, a héjban csökkent, így a teljesen érett gyümölcshús már csak közel kétszer akkora összfenol-tartalommal rendelkezett, mint a héj. A két különböző genotípusú kajszi gyümölcshúsának összes fenoltartalma az első érési fázisban mutatott nagy – közel ötszörös – különbséget a ‘Preventa’ javára, majd a későbbi érési fázisokban jelentős különbség nem volt kimutatható.

Az ABTS-gyökfogó kapacitás (TEAC értékek) vizsgálata során a két kajszigenotípus gyümölcshúsa szintén hasonló értékeket mutatott az érés során. A FRAP értékek aránya a ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ éretlen gyümölcseinek mezokarpiumában hasonlóan mutatkozott összes fenoltartalombeli különbségükhöz. A két genotípus gyümölcshúsában a FRAP értékek különbsége a későbbi érési fázisokban csökkent, majd a ‘Preventa’ teljesen érett gyümölcseiben

több mint tizenötszörösre emelkedett. Összességében a 'Preventa' gyümölcshús antioxidáns kapacitása meghaladta a 'Gönci magyarkajszai'-ra jellemző értékeket, különösen az éretlen (1. érési állapotú) és érett (5. érési állapotú) gyümölcsökben.

Viszonylag kevés szakirodalom áll rendelkezésünkre a *Prunus* nemzetségbe tartozó gyümölcsök érése során bekövetkező antioxidáns kapacitás változásáról. Korábbi vizsgálataink szerint mindkét fajta gyümölcsének antioxidáns kapacitása és összes fenoltartalma nőtt az érés során (Hegedűs és mts., 2011). A különbség oka lehet a vizsgált gyümölcsminták eltérő érési állapota és a két vizsgálat során alkalmazott eltérő extrakció (teljes gyümölcsökből készített homogenizált gyümölcsle). A Dragovic-Uzelac és mts. (2007) által vizsgált kajszifajták összes fenoltartalma – szemben a 'Gönci magyarkajszai'-val és 'Preventá'-val – az éretlen és félérett állapot között csökkent, majd az érett gyümölcs kialakulásáig nem mutatott jelentős változást.

Szilva esetében az antioxidáns kapacitás az érés során folyamatosan növekedett (Díaz-Mula és mts., 2008; Kristl és mts., 2011), míg cseresznye esetében a 'Preventá'-nál látott korai csökkenést az érés vége felé felváltó növekedés jellemezte (Serrano és mts., 2005).

6.2 A meggy érési folyamatának jellemzése

A 'VN-1' és 'Pipacs-1' meggyfajták gyümölcseinek érési folyamatát (12. ábra) a szín, méret, tömeg, és oldható szárazanyag-tartalom meghatározásával jellemeztük.

6.2.1 A gyümölcsök színének változása az érés során

A 'Pipacs 1' gyümölcshéjában, az érés korai szakaszán, a zöld fedőszín mellett antocianin pigmentáltság jelenik meg, míg a gyümölcshús – a klorofilltartalom miatt – zöld színű. Az éretlen 'Pipacs 1' gyümölcs színváltozása eltérő mértékű a gyümölcshéj és -hús esetében: a harmadik-negyedik érési állapotú gyümölcs a^* és H^0 értékei sokkal jelentősebb mértékű változást mutatnak a gyümölcs felületén, mint a gyümölcshúsban, vagyis az antocianinok először a gyümölcshéjon jelennek meg. A jelenség a 12. ábrán is nyomon követhető. A 'VN-1' esetében szintén a gyümölcshéj válik először pirossá, de a folyamat már a második érési állapotban megkezdődik, amit az alapszín és hússzín esetében meghatározott a^* és H^0 értékek is tükröznek. A 'Pipacs 1'-től eltérően a későbbi érési állapotokban a 'VN-1' a^* és H^0 értékei szinte megegyeznek a gyümölcshéj és hús esetében. Az érett gyümölcshús L^* értékei között is jelentős különbség van a 'VN-1' és 'Pipacs 1' között, az előbbi genotípust sokkal kisebb értékek jellemzik. Ennek oka, hogy a 'VN-1' egy festőlevű, *Morello* típusú meggy sötétbordó

gyümölcs hússal, míg az *Amarella* típusú 'Pipacs 1' gyümölcshúsa csaknem szintelen (Papp és mts., 2010).

A színparaméterek tekintetében különbség mutatható ki a két meggy-genotípus héjszövetének vizsgálatakor. A színezeti szög csökkenése a 'VN-1' gyümölcshéj esetén az érés során nagyobb mértékű, mint a 'Pipacs 1' gyümölcshéjára jellemző érték. Ez arra utal, hogy a 'VN-1' gyümölcshéj pirosodása intenzívebb és a korai érési fázisokban nagyobb mértékű.

Serrano és mts. (2005) cseresznye érési folyamatát jellemezték többek között a gyümölcshéj színparamétereinek rögzítésével. A cseresznye érése során a héjszövet a^* értéke -20-ról 40-re emelkedett, majd 12-re csökkent, b^* értéke 42-ről 2-re, L^* értéke 72-ről 30-ra csökkent. A 'VN-1' és 'Pipacs 1' meggyfajták gyümölcshéjára jellemző a^* , b^* és L^* értékek változása ehhez hasonló tendenciát követett.

6.2.2 A gyümölcsök fejlődését mutató egyéb paraméterek változása az érés során

A vizsgálatok során felhasznált, különböző genotípusú meggy gyümölcsök eltérő érésmenetet mutattak. Míg a 'VN-1' gyümölcsök tömege az érés során átlagosan 1,93 g-mal, a 'Pipacs 1' tömege átlagosan 4,59 g-mal nőtt. A közel két és félszeres tömegnövekedésbeli eltérés hatására a 'Pipacs 1' tömege 36 %-kal meghaladta a 'VN-1' gyümölcsök átlagtömegét.

Korábbi vizsgálataink alapján (Papp és mts., 2010) az érett 'VN-1' gyümölcsök tömege $4,37 \pm 0,33$ g, a 'Pipacs 1' gyümölcstömege $6,53 \pm 0,99$ g volt, mely adatok nagy hasonlóságot mutatnak a jelen dolgozatban bemutatott $4,13 \pm 0,43$ g és $5,61 \pm 0,82$ g értékekkel. Serrano és mts. (2005) a cseresznye érése során a tömegértékeket tizennégy érési fázisban rögzítették. A gyümölcs növekedése a hatodik érési fázisig mutatkozott gyorsabbnak, majd egy lassúbb növekedést követően a tizenegyedik és tizenkettedik érési fázisok között jegyeztek fel jelentősebb tömegnövekedést. A cseresznye tömegnövekedési tendenciája a 'VN-1' gyümölcs tömegnövekedéséhez hasonlóan alakult. A cseresznye és a 'VN-1' gyümölcsök tömegnövekedésével szemben a 'Pipacs 1' a 3.→4. és 4.→5. érési állapot között mutatta a legnagyobb mértékű gyarapodást. Gao és mts. (2003) a 'Montmorency' meggyfajta érése során szintén a késői érési fázisokban mutatták ki a legjelentősebb tömegnövekedést. Érdekes egybeesés, hogy ugyanilyen növekedési ütem jellemezte a 'Pipacs 1' fajtát, amit a 'Montmorency' alakkörébe tartozó, ahhoz gyümölcstulajdonságaiban nagy hasonlóságot mutató fajtaként tartanak számon (Pór és Faluba, 1982).

A 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök oldható szárazanyag-tartalma az érés során eltérő tendencia mellett növekedett. A 'VN-1' gyümölcsök oldható szárazanyag-tartalma a negyedik

érési fázist követően jelentősen megnőtt, míg a 'Pipacs 1' a harmadik érési fázisig növekvő, majd csökkenő tendenciát mutatott. A teljesen érett 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök hasonló – 22,05 % és 18,58 % – oldható szárazanyag-tartalmat mutattak. A Papp és mts. (2010) által vizsgált 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök oldható szárazanyag-tartalma 19,08 % és 23,1 % volt, mely adatok hasonlítanak az általunk mért értékekhez azzal a különbséggel, hogy a 'Pipacs 1' mutatta a nagyobb brixértéket.

6.3 RNS-izolálás kajszii és meggy gyümölcsökből

A vizsgálatokba vont kajszii és meggy gyümölcsök különböző szöveteiből történő RNS-izolálás a valós idejű PCR kísérletek egyik meghatározó lépése. A nagy szénhidrát- és fenoltartalmú növényi mintákból történő RNS-izolálásra számos protokollt fejlesztettek ki az utóbbi évtizedek során. Az RNS-izolálási eljárások alapvetően két csoportra oszthatók. Az egyik csoportba tartoznak a nukleinsavakat szelektív módon kötő, szilika-alapú membránt alkalmazó kitek. A gyümölcsök érése során végzett transzkriptomikai analízishez Dardick és mts. (2010) a QIAGEN RNeasy Kit segítségével izoláltak RNS-t liofilizált őszibarack gyümölcsszövetéből.

Az RNS-izolálási eljárások másik csoportjába tartoznak a hagyományos protokollok, melyek leggyakrabban különböző sókból, szerves oldószerekből, detergenszerekből álló extrakciós pufferre épülnek. Számos RNS-izolálási protokollt dolgoztak ki, melyek legfőképpen az extrakciós puffer összetételében különböznek egymástól. Asif és mts. (2006) acetonalapú extrakciós puffer segítségével izoláltak RNS-oldatot almagyümölcsből. Licciardello és mts. (2008) hagyományos narancs és vérnarancs gyümölcs antocianin-bioszintézisét vizsgálták, kísérleteik során az RNS-kivonás céljából fenolalapú Trizol reagenst alkalmaztak.

Igen elterjedt a CTAB (cetil-trimetil-ammónium-bromid) -alapú extrakciós puffer, mely detergensként szolgál, és elősegíti a nukleinsavak szénhidrátoktól való elválasztását (Jaakola és mts., 2001). Chang és mts. (1993) CTAB-alapú RNS-izolálási eljárást dolgoztak ki a szintén nagy polifenol-tartalmú fenyő (*Pinus pinea*) tűlevélre, mely protokollt széles körben használják transzkriptomikai kísérletekhez (Welling és mts., 2004). Kiefer és mts. (2000) polifenolokban és poliszacharidokban gazdag, fás növényi szövetekre dolgoztak ki CTAB-alapú RNS-izolálási eljárást. Jaakola és mts. (2001) az áfonya gyümölcs antocianin-bioszintézisét vizsgálták a Chang és mts. (1993) alapján kidolgozott, CTAB-alapú extrakciós puffer használatával. Tsuda és mts. (2004) az őszibarack gyümölcshéjban, míg Salvatierra és mts. (2010) a különböző genotípusú szamóca gyümölcsökben zajló antocianin-bioszintézist vizsgálták CTAB-alapú RNS-kivonó protokoll segítségével.

A szilikamembránt nem alkalmazó, vagyis a hagyományos RNS-izolálási eljárások utolsó lépései közé tartozik gyakran a kicsapott nukleinsav LiCl-dal történő mosása. Giuliano és mts. (1993) paradicsommintákból izoláltak RNS-t, mely kísérletek során az RNS LiCl-dal történő szelektív kicsapásának elvét használták fel. Gyapot mintákból történő RNS-izolálásra bórsav alapú protokollt dolgoztak ki Wan és Wilkins (1994), mely protokollt számos esetben hatékonyan alkalmaztak (Muñoz-Robredo és mts., 2012; González-Agüero és mts., 2011). Nakatsuka és mts. (2008) az álea (*Rhododendron simsii*) flavonoid-bioszintézisét, Hayama és mts. (2006) őszibarack gyümölcs etilén-bioszintézisét vizsgálták a Wan és Wilkins (1994) által kidolgozott, bórsav alapú RNS-izolálás segítségével.

A valós idejű PCR kísérletekhez megfelelő minőségű RNS-oldatokra van szükség. A kajszi és meggy gyümölcshéjból és -húsból az RNeasy Plant Kit-tel (QIAGEN), az Asif és mts. (2006) által kidolgozott, acetonalapú protokollal, a Jaakola és mts. (2001) által kidolgozott, CTAB-alapú eljárással, valamint a Wan és Wilkins (1994) által kidolgozott bórsav alapú módszerrel kísérletük meg az RNS-oldat tisztítását. Valamennyi protokoll közül a bórsavas extrakció bizonyult a leghatékonyabbnak, így összehasonlító vizsgálatainkhoz ezt használtuk.

A Wan és Wilkins (1994) által kidolgozott RNS-izolálási eljárás a szerzők szerint kiválóan alkalmazható a poliszacharidokban és fenolos vegyületekben gazdag növényi szövetek esetén. Az extrakciós puffer a bórsav mellett többek között spermidint is tartalmaz. A spermidin egy poliamin, mely gátolja az RNS-izolálás során a nukleinsavak poliszacharidokkal és fenollokkal való együttes izolálását (Wan és Wilkins, 1994). Az RNS-oldatokban maradt kis mennyiségű spermidin azonban gátló hatást fejthet ki a PCR során. Ezért kísérleteinkben spermidint nem tartalmazó extrakciós puffert használtunk. Elképzelhető, hogy a 'VN-1' gyümölcsök mezokarpiumán végzett valós idejű PCR kísérleteket az izolált RNS-oldatok nem megfelelő tisztasága hiúsította meg. Az RNS-oldatok gélelektroforetikus mintázata alapján a különböző RNS alegységek jól elkülönültek (**14. ábra**), de Wan és Wilkins (1994) szerint a spermidint nem tartalmazó extrakciós pufferrel izolált, kevésbé tisztított RNS befolyással lehet a későbbi reakciókra (cDNS-szintézis, valós idejű PCR reakciók).

6.4 A kajszi és meggy flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítása

A gyümölcsök flavonoid-bioszintézise napjainkban intenzíven kutatott tudományterület. A vizsgálat első lépése a kulcsenzimeket kódoló gének teljes vagy részleges DNS-szekvenciájának meghatározása.

Tsuda és mts. (2004), valamint Dardick és mts. (2010) az őszibarack gyümölcs flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó számos enzim (PAL, C4H, 4CL, C3H, CHS, CHI, F3H, DFR, ANR és UFGT) parciális génszekvenciáját határozták meg. Lister és mts. (1996) valamint Takos és mts. (2006) az almagyümölcs flavonoid-bioszintézis útvonalának kulcsenzimeit kódoló géneket (PAL, CHS, CHI, F3H, DFR, ANR, FLS, LAR, F3'H és UFGT) azonosították. A körte flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó géneket (PAL, CHI, F3H, FLS, DFR, LAR, ANS, ANR és UFGT) Fischer és mts. (2007) azonosították. A szamóca (*Fragaria chiloensis*) PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, DFR, ANS, ANR, LAR, FLS és UFGT géneket Saud és mts. (2009), illetve Salvatierra és mts. (2010) azonosították. Áfonya (*Vaccinium myrtillus*) gyümölcs és levél flavonoid-bioszintézisét (a PAL, CHS, F3H, DFR és ANS géneket) Jaakola és mts. (2002; 2004) vizsgálták. A hagyományos- és vérnarancs antocianin-bioszintézisét irányító géneket (PAL, CHS, F3H, DFR, ANS, UFGT) Licciardello és mts. (2008) azonosították. Az azálea (*Rhododendron simsii*) virágában zajló flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének (CHS, CHI, F3H, DFR, ANS, FLS, F3'H és F3'5'H) azonosítását Nakatsuka és mts. (2008) végezték el. Számos más növényfaj esetében is (pl. *Arabidopsis*) folynak hasonló vizsgálatok.

A vizsgálatok során felhasznált kajszigyümölcsökből ('Gönci magyarkajszí', 'Preventa', 'Ceglédi arany', 'Harcot', 'Aurora' és 18/61-es hibrid) az alábbi flavonoid-bioszintézis kulcsenzimek parciális génszekvenciáját azonosítottuk: PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, F3'H, F3'5'H, DFR, ANS, ANR, LAR és UFGT. Szintén kajsziból izoláltuk a referenciagénként használt a GAPDH gén egy szakaszát. A meggy gyümölcs ('VN-1' és 'Pipacs 1') flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó következő gének parciális szekvenciáját azonosítottuk: C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, F3'5'H, ANR, LAR és UFGT. A GAPDH és MYB gének részleges szekvenciáját is meghatároztuk.

A szekvenciákat homológia-keresésnek vetettük alá az NCBI BLASTn keresőprogram segítségével. A homológia-keresés során a szekvenciák nagyfokú hasonlóságot mutattak más fajok megfelelő génszekvenciájával. Az E=0 vagy nullához közeli értékek alapján feltételezhető, hogy a meghatározott szekvenciák valóban a vizsgálni kívánt enzimet kódoló gén szakaszát képezik.

A kajszí 4CL, F3'5'H, LAR és GAPDH (referenciagénként használtuk) gének esetében általunk meghatározott szekvenciák a *Prunus* nemzetségen belül az első megismert szekvenciák. A PAL gént (Pina és Errea, 2008) kivéve valamennyi többi vizsgált génről munkánk adta a kajszí faj esetében az első szekvenciaismeretet. A meggy 4CL, F3'5'H, LAR, GAPDH és MYB génszekvenciák a *Prunus* nemzetségen belül első ízben váltak ismertté, a többi szekvencia pedig meggy esetében számít újdonságnak.

6.5 A valós idejű PCR kísérletek optimalizálása

A valós idejű PCR kísérletek megbízhatóságának biztosítása érdekében számos körülményt (primerek tapadási hőmérséklete, primerkoncentráció, cDNS mennyisége, MgCl₂-koncentráció) optimalizáltunk.

6.5.1 Gradiens PCR

A referenciagénekre nem assay-specifikus szempontok szerint tervezett primerpárok tapadási hőmérsékletét gradiens PCR kísérletek során ellenőriztük. A primerekre kiszámított ($T_a = T_m - 5\text{ }^\circ\text{C}$) olvadási hőmérséklet alkalmazásakor specifikus PCR-termékek keletkeztek. A valós idejű PCR kísérletek során felhasznált, célgén-, valamint assay-specifikus primereket úgy terveztük, hogy olvadási hőmérsékletük 65-66 °C legyen, majd a kísérletek során a 60 °C-os tapadási hőmérsékletet használtunk.

6.5.2 Hígítási mátrix

A PCR reakcióelegy komponenseinek koncentrációja befolyásolhatja a reakció hatékonyságát (Tyler és mts., 1997). A MyTaqTM polimerázt gyártó cég (Bioline) 0,3 és 0,6 μM közötti primerkoncentrációt, valamint a 3 mM MgCl₂-koncentráció esetleges növelését (4 vagy 5 mM-ra) ajánlja, mely bizonyos esetekben növeli a PCR hatékonyságát. A valós idejű PCR kísérletek során az optimális cDNS-mennyiséget, primer- és MgCl₂-koncentrációt hígítási mátrixok alkalmazásával állapítottuk meg. Az 50 ng cDNS alkalmazásakor megfelelő ciklusszám és amplifikációs hatékonyság mellett keletkeztek PCR termékek, így a cDNS mennyiségét nem növeltük. A nagyobb primerkoncentráció mellett a valós idejű PCR kísérletek hatékonysága növekedett, az olvadáspont analízis ugyanakkor csak a specifikus PCR termékek keletkezését mutatta, így a primerkoncentrációt a gyártó által ajánlott 0,3 μM-ról 0,6 μM-ra emeltük. A PCR-oldatok MgCl₂-koncentrációja 3 mM-os. A PCR-oldatokhoz mért MgCl₂-többlet kismértékben rontotta az amplifikációs hatékonyságot, így az eredetileg meghatározott 3 mM-os MgCl₂-koncentráció mellett zajlottak a kísérletek.

6.5.3 Az optimális referenciagén kiválasztása

A valós idejű PCR technika a génexpresszió vizsgálatának hatékony módszere, de pontossága az adatok normalizálása során felhasznált referenciagén expressziós stabilitásán múlik. Kísérleteink során különböző érési állapotú kajszi és meggy gyümölcsökkel dolgoztunk,

azon belül is különböző genotípusokkal. Így nem volt könnyű olyan referenciagént találni, mely különböző érési állapotokban, különböző fajok és genotípusok, illetve szövettípusok vizsgálata esetében is stabil expressziót mutat.

Tong és mts. (2009) tizenegy különböző referenciagént teszteltek őszibarack gyümölcsseiben. A gyümölcsérés során a *TEF-II*, *UBQ10*, *TUB (tubulin)*, *GAPDH*, *ACT* és *RP-II* gének mutattak stabil expressziót. Marty és mts. (2005) kajszigyümölcs karotinoid-bioszintézisének vizsgálatakor a valós idejű PCR kísérletekhez szükséges referenciagénnek a 26S riboszómális RNS gént választották. González-Agüero és mts. (2009) a *DAP (dehidrodipikolinát-reduktáz)* gén expressziós stabilitását használták fel a kajszii érése során kialakuló aromakomponensek bioszintézisének vizsgálatához. Schmidt és mts. (2010) többek között a *18S rRNS* gén expressziós stabilitását vizsgálták dohány fejlődése során.

A referenciagének stabilitására irányuló valós idejű PCR kísérletek az *ACT*, *GAPDH*, *RP-II*, *TEF-II*, *UBQ10* és *18S rRNS* génekre tervezett szekvensspecifikus primerek felhasználásával zajlottak. Az *RP-II* gén mutatta a leginkább stabil expressziót valamennyi mintasorozatban. A célkísérletek során mind a kajszii, mind a meggy gyümölcsök különböző szöveteiből készült mintasorozatok vizsgálatakor az *RP-II* gént választottuk referenciagénnek. Mivel valamennyi célkísérlet során egy referenciagént alkalmaztunk, lehetőség nyílt valamennyi adat együttes elemzésére („data pooling”) is.

A kísérletek során a cDNS szintézis módja – oligo(dT)₁₈ vagy random hexamer primer alkalmazása – sem volt befolyással a relatív génexpressziós értékekre, ami egybevágott Hansen és mts. (2010) eredményeivel.

6.5.4 A genomi DNS-szennyeződés hatásának vizsgálata

Az RNS-, így a cDNS-oldatokban jelenlevő genomi DNS-ről szintén amplifikálódhat fragmentum a qPCR kísérletek során, ami befolyásolhatja az eredményeket. Ebből kifolyólag ajánlott a vizsgált mintákban lévő genomi DNS eliminálása. E célból az utóbbi években számos módszert fejlesztettek ki. A cDNS- és genomi DNS-oldatok szétválasztása Jaakola és mts. (2002) szerint lehetséges agaróz-gélelektroforézis alkalmazásával. Az elektroforézis során a rövidebb cDNS szálak gyorsabban vándorolnak a pozitív pólus felé, mint a genomi DNS, és a genomi DNS-től elválasztott cDNS a gélből izolálható. Tapasztalataink szerint az agarózgélből izolált cDNS nem volt alkalmas PCR-alapú kísérletekre. Gyakran alkalmazott eljárás az RNS-oldatok DN-áz I enzimmel kezelése, majd az enzim hőkezeléssel való irreverzibilis inaktiválása. Kísérleteink során a DN-áz I enzimmel emésztett RNS-oldatokból nem sikerült PCR reakciókra alkalmas cDNS-oldatot készíteni. Ezért olyan módszer kidolgozása volt szükséges, mely során az RNS-oldat nem károsodik, illetve gDNS-t nem tartalmaz.

A cDNS-oldatok genomi DNS-szennyeződéstől való mentességét PCR és valós idejű PCR technikákkal ellenőriztem. Hagyományos PCR kísérletekhez olyan primereket terveztem a *GAPDH* gén exonrégióira, melyek két intront zárnak közre. Így elméletileg különböző méretű terméket kapunk genomi és cDNS templát használatakor. A cDNS templátokon elvégzett PCR-t követően kizárólag az intronokat nem tartalmazó fragmentumméretet detektáltuk agarózgelen. Egyik esetben sem keletkezett a várt méret mellett eltérő méretű termék, vagyis a cDNS oldatok nem tartalmaztak genomi DNS-szennyeződést, vagy csak olyan kis mennyiségben, ami a PCR során a reakcióban résztvevő összetevőkért folyó kompetíció miatt nem amplifikálódott jelentősebb mértékben.

A genomi DNS-szennyeződés kimutatására egy új, valós idejű PCR-en alapuló vizsgálatot is kidolgoztunk. A kísérletek során a *LAR* és *ANR* génekre tervezett szekvensspecifikus primereket használtam fel. A *LAR* esetén az F1+R1 primerkombinációnak – mivel azok exonrégiókra tapadnak, genomi és cDNS templáton is sikeres amplifikációt kell eredményeznie. Mivel az exonrégióra tervezett primerek között egy intronrégió is található, az intront is tartalmazó fragmentum két módszerrel is kimutatható. Az egyik a gélelektroforézis, a másik az olvadáspont-analízis.

Az intront is tartalmazó amplicon olvadási hőmérséklete nagyobb lesz, mint az intront nem tartalmazó, rövidebb PCR termék olvadási hőmérséklete. A *qLAR-F2* primert két egymást követő exonrégióra terveztük, így a genomi DNS-t nem képes felszaporítani a PCR során. Ehhez hasonló eljárást alkalmaztak Wong és Medrano (2005). Ha a *qLAR-F1+R1* és *qLAR-F2+R1* eltérő expressziót mutatnak, vagy a *qLAR-F1+R1* primerpárt felhasználó reakció a közbezárt intronnal nagyobb méretű terméket is nyújt, akkor cDNS-oldataink genomi DNS-szennyeződést tartalmaznak. Hasonló elrendezést mutatnak az *ANR* génre tervezett primerpárok azzal a különbséggel, hogy az exonrégiókra tervezett primerek nem zárnak közre intronrégiót. A *qANR-R2* primer azonban csak az intront nem tartalmazó, vagyis cDNS templátra képes tapadni. A *qANR-F1+R1* és *qANR-F1+R2* primerpárokkal végzett valós idejű PCR kísérletek azonos eredményeket mutattak, így a cDNS oldatok nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű genomi DNS-szennyeződést. A primerek kötődését és a genomi és cDNS templátok felhasználásával keletkező ampliconok méretét a **8. ábra** mutatja.

A valós idejű PCR kísérletek eredménye az expressziós értékek és az olvadáspont-analízis, mely utóbbi a PCR-termékek olvadási hőmérsékletének meghatározását jelenti. Az olvadási görbék vizsgálata szerint egy reakcióban csupán egyféle PCR-termék keletkezett, vagyis egyik reakcióban sem keletkezett melléktermék.

A két kísérletsorozat értelmében a cDNS minták nem tartalmaztak olyan mennyiségű genomi DNS-szennyeződést, mely befolyással lehetett volna a valós idejű PCR reakciókra, így a kidolgozott stratégiával elkerülhető az RNS-oldatok felesleges DN-áz-kezelése.

6.6 A kajszi flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének expressziós vizsgálata

A 'Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' gyümölcsök relatív génextpresszióinak vizsgálatakor megállapíthatjuk, hogy a 'Preventa' gyümölcshús és -héj az első érési fázisban rendelkezett a legnagyobb transzkriptum-mennyiséggel az összes vizsgált gén esetében. A 'Gönci magyarkajszi' esetén ez a tendencia nem ennyire egyértelmű, hiszen a hús- és héjszövetben a relatív transzkriptum-mennyiségek az első és a második érési állapotban tetőznek. A 'Preventá'-ban már a korai érési fázisban szintetizálódnak azok az mRNS-ek, melyek a flavonoid-bioszintézisben résztvevő enzimek transzlációjához szükségesek, vagyis feltételezhetően már az éretlen gyümölcs óriási mennyiségben tartalmazza a flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit.

Hasonló expressziós változást mutattak ki Dardick és mts. (2010) a sárga húsú őszibarack flavonoid-bioszintézisének vizsgálata során. A *4CL*, *DFR* és *ANS* gének folyamatosan csökkenő, míg a *PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI* és *F3H* gének egy kis emelkedést követően csökkenő expressziót mutattak az érés során. Több gyümölcsfaj esetében és több flavonoid-bioszintézis génre vonatkozóan írtak le az érés során csökkenő génextpressziót: például körte esetében a *PAL* (Steyn és mts., 2004); zöld héjszínű alma esetében a *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *FLS*, *LAR*, *ANR* és *UFGT* (Tako és mts., 2006) génekre.

Jelentős különbség a két genotípus között, hogy a 'Preventa' gyümölcshúsa, de különösen gyümölcshéja többszörös transzkriptum-tartalommal rendelkezik a gyümölcs érésének korai szakaszában a 'Gönci magyarkajszi'-hoz képest. A 'Preventa' gyümölcseinek hús- és héjszövetében a *PAL* és *CHS* enzimeket – a fenilpropanoid- és flavonoid-bioszintézis első enzimeit – feltehetően kódoló gének szintén többszörös relatív expressziós értékekkel rendelkeznek a 'Gönci magyarkajszi'-hoz képest. A 'Preventa' gyümölcshúsa nagyobb *C4H* génextpressziót és flavonoidtartalmat mutatott, mint a 'Gönci magyarkajszi' gyümölcshúsa. Ehhez hasonló tendenciáról számoltak be Saud és mts. (2009) szamóca esetében.

A 'Preventa' többszörös antioxidáns kapacitás értékeket mutat, mint a 'Gönci magyarkajszi' (Hegedűs és mts., 2010). A különböző polifenolos vegyületek azonosítását követően feltételezhetjük, hogy a 'Preventa' gyümölcshúsában a 'Gönci magyarkajszi'-hoz képest sokkal nagyobb arányban akkumulálódó katechin is felelőssé tehető a két gyümölcs antioxidáns kapacitásában megmutatkozó különbségért. A katechin a flavan-3-olok csoportjába

tartozik. A katechin termeléséhez az alábbi enzimek szükségesek: PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, DFR és LAR. Ezen enzimeket kódoló gének expresszióját figyelembe véve a két különböző genotípus hús szövetében megállapíthatjuk, hogy a 'Preventa' gyakorlatilag valamennyi génre nézve átlagosan négyszeres relatív transzkriptumtartalommal rendelkezett az első érési állapotban. Feltehetően ez a transzkriptum-többlet tehető felelőssé a nagyobb antioxidáns kapacitásért és katechintartalomért. A katechintartalom a 'Preventa' gyümölcshéjban és –húsban az érés során növekszik, majd közel változatlan marad, míg a 'Gönci magyarkajszi' esetében csökken. Ezek alapján elképzelhető, hogy a 'Gönci magyarkajszi' gyümölcsében a katechin kondenzált tanninok (vagy más vegyületek) keletkezésére használódik fel. A piros héjú 'Cripps Red' almafajta gyümölcsében is a nagyobb mértékű ANR és LAR génexpresszió bizonyult felelősnek a kondenzált tanninok felhalmozódásáért (Tako és mts., 2006).

A 'Gönci magyarkajszi' mezokarpiuma átlagosan két-, háromszoros mennyiségben tartalmaz epikatechint a 'Preventa'-hoz képest. Mivel a katechin és epikatechin is a flavan-3-olok csoportjába tartoznak, a termelődésükhöz szükséges enzimek nagy része azonos, de a LAR helyett az ANS és ANR enzimek vesznek részt benne. A két genotípus közül a 'Preventa' rendelkezik a nagyobb PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, DFR, ANS és ANR relatív transzkriptum-mennyiséggel. Ezért a 'Gönci magyarkajszi' gyümölcsének nagyobb epikatechintartalma feltételezhetően annak köszönhető, hogy a 'Preventa' esetében elsősorban az epikatechinből keletkeznek kondenzált tanninok. Természetesen a flavan-3-olok tovább alakulása, lebomlása is választ adhat a két genotípus között látható különbségre.

A gyümölcsök pirosas fedőszínét az antocianin pigmentek felhalmozódása okozza. A flavonoid-bioszintézis kései enzimeit közül az ANS és UFGT enzimek termelik az antocianinokat. Az ANS által termelt 3-OH-antocianidinek az antocianinok mellett a szintelen flavan-3-olok irányába is tovább alakulhatnak az ANR enzim hatására. A 'Gönci magyarkajszi' gyümölcshéjában antocianinos elszíneződés látható a gyümölcs napsütötte oldalán, mely a 4. érési állapotban jelenik meg. A 'Preventa' gyümölcshéj ugyanakkor nem tartalmaz antocianint. Ezzel szemben az éretlen 'Preventa' gyümölcsök héja nagyobb relatív transzkriptum-mennyiséggel rendelkezett az ANS, ANR, LAR és UFGT génekre nézve, mint a 'Gönci magyarkajszi' gyümölcshéja. A 'Gönci magyarkajszi' héjszövetének pigmentáltsága feltételezhetően annak köszönhető, hogy az UFGT transzkriptuma – bár a 'Preventa'-hoz képest kisebb mennyiségben van jelen – a 'Gönci magyarkajszi' ANS, ANR és LAR gének transzkriptum-mennyiségéhez viszonyított aránya nagyobb, mint a 'Preventa' héjban lévő UFGT transzkriptum ANS, ANR és LAR transzkriptumokhoz viszonyított aránya. Vagyis a 'Gönci magyarkajszi' – a saját génexpresszióihoz képest – nagyobb UFGT expresszióval rendelkezik, mint a 'Preventa', mely jelenség szerepet játszhat az antocianin pigmentáltság kialakításában.

A 'Preventa' héjban az ANR és LAR expressziója nagyobb, mint 'Gönci magyarkajszi'-ban. Az antocianin-felhalmozódás idején a CT-szintézis génjeinek transzkriptuma kisebb mennyiségben van jelen (Tako és mts., 2006), mint más flavonoid-bioszintézis gének transzkriptuma. Ez alapján, az alma héjszövetéjez hasonlóan a CT-bioszintézis és az antocianin-bioszintézis a kajszi héjában is eltérő szabályozás alatt állnak.

Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy az azonosított *UFGT* génhomológ 'Preventa' gyümölcshúsában nem az ANS enzim által termelt 3-OH antocianidinek glikozilációját katalizáló enzimet termel, így azok az ANR által a flavan-3-olok irányába alakulnak tovább. Az *UFGT* enzimnek más gyümölcsök esetében is meghatározó szerepe van az antocianin-akkumulációban. Az *UFGT* végzi az antocianidinek glikozilációját az antocianinek (színes és stabil molekulák) termelése során. A fehér bogyójú szőlőfajták héjában az *UFGT* enzim nem volt kimutatható, és más gének expressziója is kisebb mértékű volt a vörös héjszínű fajtákkal összehasonlítva (Boss és mts., 1996b). Hasonló megfigyeléseket tettek Yamazaki és mts. (2002) petúnia vizsgálatakor.

Egyes MYB transzkripciós faktorok a flavonoid-bioszintézist szövetspecifikusan képesek serkenteni, vagy gátolni különböző növényi szövetekben. Lin-Wang és mts. (2010) kimutatták, hogy a vörös gyümölcshúsú alma hús- és héjszöveiben a MYB10 transzkripciós faktor a gyümölcshúsban volt jelen nagy mennyiségben, szemben a fehér húsú almával, melynek hússzövege nem mutatott nagy MYB10 transzkriptum-mennyiséget. A kajsziminták valós idejű PCR kísérletében a MYB10 transzkripciós faktort kódoló gén az érés során mindkét szövettípusban meglehetősen kis transzkriptum-mennyiséget mutatott. A gyümölcshéjban a *MYB10* transzkriptum mennyisége növekedett, majd az ötödik érési fázisban csökkenő tendenciát mutatott. Mivel sem a 'Gönci magyarkajszi', sem a 'Preventa' gyümölcshúsa nem tartalmaz antocianin pigmentet, a kis *MYB10* transzkriptum-mennyiség korrelált Lin-Wang és mts. (2010) megfigyeléseivel. Az általunk vizsgált *MYB* többszörös transzkriptum-mennyiséget mutatott az érés során, mint a *MYB10*. A 'Gönci magyarkajszi' héj a második, harmadik és negyedik érési fázisokban, a gyümölcshús pedig valamennyi érési fázisban nagyobb transzkriptum-tartalommal rendelkezett a MYB transzkripciós faktorra nézve, mint a 'Preventa' gyümölcshéj és -hús. Ezek alapján – a két genotípust összevetve – nem látható összefüggés a kajszi gyümölcsök flavonoid-bioszintézis enzimeikhez szükséges transzkriptum-mennyiség és a *MYB* transzkriptum-mennyisége között sem hús-, sem héjszövetekben. Bár a 'Gönci magyarkajszi' nagyobb relatív *MYB* expresszióval rendelkezik a héjban, mint a 'Preventa', ez a többlet nem feltétlenül magyarázza egyértelműen a héj antocianinok általi elszíneződését, ugyanis a különbség nem jelentős mértékű.

Mindkét kajszi genotípusban a korai érési fázisokban a gyümölcsök flavonoidtartalma a későbbi érési állapotú gyümölcsökhöz képest kifejezetten kicsi. Ez összefüggésbe hozható a nagy korai transzkriptum-tartalommal, amikor is a gyümölcsben a flavonoid komponensek szintéziséhez szükséges enzimek termelődnek. Az mRNS molekulák rövid életidejű (Singer és Penman, 1973), a termelődött flavonoid komponensek viszont stabilabb molekulák. A gyümölcsök korai érési fázisában a nagy transzkriptum-tartalom eredményeképpen a flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit szintetizálnak. A szintetizálódott enzimek termelik a flavonoid komponenseket, melyek nagy szerepet játszanak az antioxidáns kapacitás kialakításában. A 'Preventa' és 'Gönci magyarkajszi' gyümölcshúsának relatív transzkriptum-tartalma, antioxidáns kapacitása, valamint a mért flavonoid komponensek mennyisége szoros összefüggést mutatott.

6.7 A meggy flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének expressziós vizsgálata

A meggy – a kajszival ellentétben – általában a negyedik, ötödik érési fázisban rendelkezett a legnagyobb transzkriptum-mennyiséggel. E növekedés inkább exponenciálisnak írható le, mint lineárisnak. Az érés során az antocianinos színeződéssel párhuzamosan emelkedő mértékű expressziót mutattak ki piros héjú őszibarackfajták ('Akatsuki' és 'Flavortop') *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS* és *UFGT* (Tsuda és mts., 2004), piros héjú almák *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *FLS*, *LAR*, *ANR* és *UFGT* (Tako és mts., 2006), kékszőlő *F3H*, *F3'H*, *F3'5'H*, *FLS*, *DFR*, *ANS* és *UFGT* (Castellarin és mts., 2007a,b), áfonya *PAL*, *CHS*, *F3H*, *DFR* és *ANS* (Jaakola és mts., 2002) és a *Fragaria* × *ananassa* piros színű gyümölcseinek *PAL*, *C4H*, *4CL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS* génjei esetén (Saud és mts., 2009). A 'VN-1' gyümölcshéj nagyobb antocianinos pigmentáltságot és közel tízszeres *C4H* transzkriptum-mennyiséget mutatott a negyedik érési fázisban, mint a 'Pipacs 1' gyümölcshéj, ami szintén megegyezik a *F. ananassa*-ban kimutatott tendenciákkal.

A 'VN-1' gyümölcshúsa esetében a valós idejű PCR kísérletek eredménye – a többi adatsorral összevetve – nem tűnik megbízhatónak. Ezek alapján feltételezhető, hogy a 'VN-1' gyümölcse tartalmaz egy vagy több olyan komponenst, melyektől az alkalmazott RNS-izolálási eljárás során nem sikerült megszabadulni, és gátolták a cDNS szintézisét és/vagy a PCR-t.

Papp és mts. (2010) jellemezték a 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök antioxidáns kapacitását. A 'Pipacs 1' gyümölcsében nagyobb antioxidáns kapacitás értékeket és C-vitamin-tartalmat, a 'VN-1' gyümölcsében nagyobb antocianintartalmat mutattak ki. A 'VN-1' gyümölcshéj nagy antocianintartalma és génexpressziói jól korrelálnak egymással, míg a 'Pipacs 1' gyümölcs kis antocianintartalmához az antocianin-bioszintézis gének kisebb expressziója

társul. Korábbi kísérleteinkben (Papp és mts., 2010) a ‘Pipacs 1’ gyümölcsében a *PAL*, *CHS*, *DFR* és *ANS* gének kifejeződését vizsgáltuk nem kvantitatív PCR-rel. Mind a négy gén expressziót mutatott a gyümölcs héj- és hússzövetében, ezért feltételeztük, hogy a mérsékelt antocianin pigmentáltság kialakulásának hátterében más gének (pl. *UFGT*) illetve szabályozó elemek (pl. transzkripció faktorok) expressziójának hiánya vagy valamelyik gén expressziójának csökkent mértéke állhat.

Ennek tisztázása érdekében valós idejű PCR technikával megvizsgáltuk a ‘VN-1’ és ‘Pipacs 1’ gyümölcsöket öt különböző érési állapotban. A ‘Pipacs 1’ gyümölcshéj kisebb *PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *DFR*, *F3’H* és *ANS* transzkriptum-tartalommal rendelkezett, mint a ‘VN-1’, ami összhangban van a ‘Pipacs 1’ kisebb antocianintartalmával. Őszibarack esetében az antocianin kialakulását meghatározó géneknek a *CHS* és *DFR* bizonyultak, mert a piros héjú gyümölcshöz képest a fehér színű fajták héjában nem volt kimutatható *CHS* és *DFR* expresszió (Tsuda és mts., 2004). Az antocianin pigmenteket nem tartalmazó, vagyis fehér gyümölcsű szamóca (*Fragaria chiloensis*) számos (*PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *ANS* és *UFGT*) génre nézve kisebb expressziót mutatott, mint a piros gyümölcsű *F. ananassa* (Saud és mts., 2009). Narancs esetében a hagyományos és vérnarancs közötti különbség kialakításában szintén szerepe lehet a *PAL*, *CHS*, *DFR* és *ANS* géneknek (Licciardello és mts., 2008).

A *MYB10* transzkripció faktor expressziójában szembevetendő különbség, hogy a ‘VN-1’ gyümölcshéj valamennyi érési fázisban többszörös *MYB10* expressziót mutat, mint a ‘Pipacs 1’ gyümölcshéja. Ezzel együttesen nagyobb a fent említett gének (*PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *DFR*, *F3’H* és *ANS*) expressziója is. Ezzel az összefüggéssel megegyező tendenciát írtak le Lin-Wang és mts. (2010): két különböző antocianin pigmentáltságot mutató cseresznye eltérő *CHS*, *ANS* és *MYB10* expressziót mutatott. A festőlevű ‘Stella’ gyümölcse az érés során többszörös *CHS*, *ANS* és *MYB10* transzkriptumbeli mennyiséget mutatott, mint a sárga gyümölcshúsú ‘Rainier’ fajtáé. MYB transzkripció faktorok antocianin-bioszintézist szabályozó szerepét több gyümölcsfaj esetében igazolták (Azuma és mts., 2007; Cultrone és mts., 2010; Espley és mts., 2007).

A ‘Pipacs 1’ héj viszont nagyobb *F3H* expresszióval rendelkezett, mint a ‘VN-1’, ami alapján feltételezhető, hogy míg a ‘VN-1’ gyümölcsében a flavonoid-bioszintézis az antocianinok képződése irányába van eltolva, a ‘Pipacs 1’ gyümölcsében szintelen flavonoidok keletkeznek, melyek hozzájárulnak a gyümölcs antioxidáns kapacitásának kialakításához. A Budapesti Corvinus Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén a ‘Pipacs 1’ meggy geniszteintartalmát mutatták ki (Abrankó és mts., 2011b), ezért a közeljövőben érdekes kutatási terület lehet az izoflavonoidok bioszintézisének vizsgálata meggyfajtákban.

6.8 A kajszii néhány polifenolos komponensének azonosítása

A 'Gönci magyarkajszii' és 'Preventa' gyümölcshéjban többek között kvercetin-hexozidot és rutint mutattunk ki, ami megegyezik Ruiz és mts. (2005a), Dragovic-Uzelac és mts. (2005) és Garcia-Viguera és mts. (1994) eredményeivel. A 'Gönci magyarkajszii' és 'Preventa' gyümölcseiben azonosított naringenin-hexozidot első ízben mutattuk ki kajszii gyümölcsből (**4. táblázat**). A 'Gönci magyarkajszii' és 'Preventa' gyümölcshéjban legnagyobb mennyiségben katechint és epikatechint mutattunk ki hasonlóan más fajtákra vonatkozó korábbi adatokkal (Dragovic-Uzelac és mts., 2005; Pascual-Teresa és mts., 2000; Arts és mts., 2000; Garcia-Viguera és mts., 1994).

Ruiz és mts. (2005a), Dragovic-Uzelac és mts. (2005), Pascual-Teresa és mts. (2000), Arts és mts. (2000), Moeller és Herrmann (1983), valamint Garcia-Viguera és mts. (1994) a vizsgált kajszii gyümölcsöket – velünk ellentétben – nem szeparálták külön héj- és hússzövetekre.

Az általunk kimutatott flavonoid komponensek (kvercetin-hexozid, rutin, naringenin-hexozid, katechin és epikatechin) relatív mennyisége az érés során általában növekvő, majd csökkenő tendenciát mutatott. Ezzel szemben Dragovic-Uzelac és mts. (2007) eredményei szerint a vizsgált kajszifajták gyümölcseiben mérhető polifenolos vegyületek (hidroxifahéjsavszármazék, flavanol és flavonol) mennyisége az érés első felében csökkent, majd a második felében nem mutatott jelentős változást.

Mayr és mts. (1995) 'Golden delicious' almafajta fenolos vegyületeinek mennyiségét vizsgálták a gyümölcs érése során. A vizsgált almafajta fenolos vegyületeinek mennyisége a gyümölcs félérett állapotáig növekedett, majd az érés további szakaszain csökkent, mely tendencia egyezést mutat a 'Gönci magyarkajszii' és 'Preventa' gyümölcseiben kimutatott tendenciával. Mayr és mts. (1995) eredményeivel ellentétben a Burda és mts. (1990) által vizsgált almafajta gyümölcseinek fenolosvegyület-tartalma az érés során a Dragovic-Uzelac és mts. (2007) által kimutatott tendenciával mutat hasonlóságot.

A 'Gönci magyarkajszii'-ban és 'Preventa'-ban kimutatott flavonoid komponens-tartalom érés alatti növekedését követő csökkenéstől az áfonya gyümölcs flavonol (kvercetin és miricetin) tartalmának változása is eltért: az éretlen gyümölcsben tetőzött, majd az érés során fokozatosan csökkent (Jaakola és mts., 2002). A fenolos vegyületek mennyiségének csökkenését figyelték meg guava, banán, mangó és datolya gyümölcsök érése során is (Bashir és Abu-Goukh, 2003).

A katechin és az epikatechin erős antioxidánsok (Salah és mts., 1995; Cabrera és mts., 2006; Meyer és mts., 1998). A 'Preventa' gyümölcsök mezokarpiumában nagy relatív katechintartalmat sikerült kimutatnunk. A 'Gönci magyarkajszii' gyümölcsök mezokarpiumában az epikatechin-tartalom mutat nagy mennyiséget. A 'Preventa' gyümölcsök mezokarpiumának relatív katechintartalma több mint kétszerese a 'Gönci magyarkajszii' gyümölcsök

mezokarpiumában kimutatott relatív epikatechin-tartalomnak. Ez a különbség hasonlít a gyümölcshús antioxidáns kapacitásában kimutatott különbséghez (**11. ábra**).

A ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcsök héjszövegeinek kvercetin-hexozid, rutin és naringenin-hexozid tartalma közel azonos. A ‘Gönci magyarkajszi’ héjszövege az érés során először tíz-, majd ötször nagyobb mennyiségben tartalmaz epikatechint, mint a ‘Preventa’. Az érett ‘Preventa’ gyümölcsök héjszövege háromszoros, gyümölcshéja tizenkétszeres katechintartalommal rendelkezik a ‘Gönci magyarkajszi’-hoz képest. A kajszi gyümölcsben azonosított polifenolos vegyületeknek szerepe lehet az egészség-megőrzés terén. A katechinről kimutatták, hogy ha gyümölcsfogyasztás révén kerül az emberi szervezetbe, hatékonyan véd a felső emésztőszervi daganatok kialakulásával szemben (Arts et al., 2002). Mindezek alapján a ‘Preventa’ gyümölcsének egészségre gyakorolt hatása részletesebb vizsgálatokat érdemel.

7 Új tudományos eredmények

1. A flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit kódoló homológ génszekvenciák alapján PCR-primereket terveztünk, majd jellemeztük e primerek alkalmazhatóságát kajszi és meggy gyümölcs vizsgálatára.
2. Összesen 19 kajszi és 10 meggy flavonoid-bioszintézis gén részleges DNS-szekvenciáját határoztuk meg.
3. A szekvenciák alapján a valós idejű PCR kísérletekhez alkalmas primereket terveztünk.
4. Hatékony protokollt dolgoztunk ki a kajszi és meggy gyümölcsök valós idejű PCR vizsgálatára (megfelelő RNS-kivonás, genomi szennyeződés befolyásoló hatásának értékelése, referenciagén kiválasztása, reakciókörülmények optimalizálása).
5. Igazoltuk, hogy a két kajszi genotípus héjszövege nagyobb antioxidáns kapacitás értékkel bír, mint a gyümölcsök mezokarpiuma. A gyümölcsök érése során az antioxidáns kapacitás érték ‘Gönci magyarkajszi’ esetén általában csökkenő, míg ‘Preventa’ esetén növekvő tendenciát mutatott.
6. Igazoltuk, hogy a kajszi és meggy flavonoid-bioszintézis géneinek expressziója az érés során eltérő tendencia mentén változik: a kajszi esetében az éretlen (kisméretű, zöld) gyümölcsben a legnagyobb, a meggy esetében a teljes érettség eléréséig növekszik.
7. Kimutattuk, hogy a ‘Preventa’ gyümölcs kiemelkedő antioxidáns kapacitásának kialakításához számos gén (*PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *ANR* és *LAR*) hozzájárul, melyek a legkorábbi érési állapotban jelentősen nagyobb expressziót mutatnak, mint a ‘Gönci magyarkajszi’ esetében. A MYB és MYB10 transzkripciós faktorok szerepe valószínűsíthető a meggy antocianin-bioszintézisének transzkripciós szintű szabályozásában.
8. HPLC-ESI-(Q)TOF MS kapcsolt rendszer alkalmazásával meghatároztuk, hogy a ‘Preventa’ nagy antioxidáns kapacitása – legalább részben – a gyümölcshús nagyobb katechintartalmának köszönhető, ami a katechin-bioszintézisben résztvevő gének nagyobb mértékű expressziójának következménye.

8 Összefoglalás

Epidemiológiai tanulmányok sokasága igazolta, hogy a növényi táplálékok fogyasztása számos degeneratív betegség kialakulását gátolja. A gyümölcsök egészségvédő hatását ma már csonthéjas fajok esetében is egyre jelentősebb mértékben kapcsolják az antioxidáns hatású polifenolos vegyületekhez. Az antioxidáns kapacitás kialakításához jöllehet számos vegyület hozzájárul, a polifenolos vegyületek szerepe meghatározónak tűnik. A különböző gyümölcsfajok termésére igen eltérő polifenol-összetétel jellemző. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy ugyanazon fajon belül a fajták között is óriási mértékű eltérések mutathatók ki az összes polifenol-tartalomban és antioxidáns kapacitásban.

Munkánk során a kajszi (*Prunus armeniaca*) és meggy (*Prunus cerasus*) gyümölcs flavonoid-bioszintézisét jellemeztük molekuláris biológiai eszközökkel. Céljaink közé tartozott a flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének azonosítása ebben a két fajban, illetve az egyes gének expressziójának összehasonlító vizsgálata az érés folyamán és eltérő antioxidáns kapacitású gyümölcsöt adó genotípusok ('Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' kajszi, illetve 'VN-1' és 'Pipacs 1' meggy) esetében.

A mintaszedés öt érési állapotban történt, melyeket a gyümölcsméret, -tömeg, oldható szárazanyag-tartalom és színparaméterek alapján jellemeztünk. A kajszi és meggy mintasorozatokból a PCR és valós idejű PCR kísérletekhez forró bórsavas extrakcióval megfelelő minőségű RNS-oldatot izoláltunk, majd az RNS-oldatokból cDNS-oldatokat készítettünk. Az NCBI GenBank és az őszibarack EST on-line adatbázisokban található ortológ génszekvenciák alapján PCR-primereket terveztünk a flavonoid-bioszintézis útvonal kulcsenzimeit kódoló génekre, majd megvizsgáltuk e primerek alkalmazhatóságát a kajszi és a meggy esetében. Az amplifikált szakaszokat klónoztuk, és meghatároztuk DNS-szekvenciájukat. Összesen 19 kajszi és 10 meggy flavonoid-bioszintézis gén részleges DNS-szekvenciáját határoztuk meg.

A szekvenciák alapján „assay”-specifikus primereket terveztünk, hogy a valós idejű PCR kísérleteket azonos kísérleti körülmények között végezhessük el. Különböző referenciagéneket teszteltünk, melyek közül az *RP-II* gén mutatta a legnagyobb stabilitást. A cDNS oldatok genomi DNS-től való mentességének ellenőrzésére PCR és valós idejű PCR technikákon alapuló módszereket dolgoztunk ki. Meghatároztuk a valós idejű PCR kísérletek optimális körülményeit (pl. cDNS-mennyiség, primer- és MgCl₂-koncentráció). Az „assay”-specifikus primerek felhasználásával, valós idejű PCR technika segítségével jellemeztük azon gének expressziójának időbeli változását az egyes érési fázisokban, melyek feltételezhetően szerepet játszanak a vizsgált növények flavonoid-bioszintézis folyamatában.

Minden minta-előkészítés és reakció azonos körülmények között zajlott, így a valós idejű PCR kísérletekből származó adatok kiértékelésekor lehetőségünk nyílt az adatok együttes, egymáshoz képesti bemutatására. A kajszigyümölcs első és második érési fázisában nagy transzkriptum-mennyiséget mutattunk ki, ami az érés során csökkent. A 'Preventa' nagyobb transzkriptum-tartalommal (*PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *ANR* és *LAR*) rendelkezett, mint a 'Gönci magyarkajszai', különösen a gyümölcshéjban.

Meggy vizsgálatok az antocianinban gazdag 'VN-1' gyümölcshéj *PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR* és *ANS* transzkriptum-tartalma meghaladta a kisebb antocianin-tartalmú 'Pipacs 1' héj értékeit. A MYB és MYB10 transzkripciós faktorok szerepe valószínűsíthető a meggy antocianin-bioszintézisének transzkripciós szintű szabályozásában. A meggy érése során növekvő transzkriptum-mennyiséget mutattunk ki, ami korrelált az antocianinos pigmentáltság kialakulásával. Valamennyi mintasorozaton belül összességében a 'Preventa' és 'VN-1' héjszövegekben mutattuk ki a legnagyobb relatív génexpressziókat.

Elvégeztük a kajszai mintasorozatok antioxidáns kapacitásának jellemzését FRAP, TEAC és TPC (Folin-Ciocalteu) módszerek alkalmazásával. Megerősítettük a két különböző kajszigenotípus eltérő antioxidáns kapacitását és összpolicifenol-tartalmát. A 'Preventa' gyümölcshéj és -hús nagyobb antioxidáns kapacitást mutatott a 'Gönci magyarkajszinál', a legnagyobb értékeket a 'Preventa' héjában mutattuk ki. A 'Preventa' különböző szövegekben nőtt, a 'Gönci magyarkajszai' szövegekben összességében csökkent az antioxidáns kapacitás a gyümölcserés során.

HPLC-ESI-(Q)TOF MS kapcsolt rendszer alkalmazásával meghatároztuk a kajszai fő flavonoid komponenseit és azok relatív mennyiségét. A 'Gönci magyarkajszai' és 'Preventa' gyümölcsökben kvercetin-hexozid, rutin és naringenin-hexozid (első ízben mutattuk ki kajsziban) mellett katechin és epikatechin komponenseket találtunk legnagyobb mennyiségben. A 'Preventa' nagy antioxidáns kapacitása – legalább részben – a gyümölcshús nagyobb katechintartalmának köszönhető, ami a flavanol-bioszintézisben feltételezhetően résztvevő gének nagyobb mértékű expressziójának következménye.

Doktori munkám során elsőként azonosítottuk azokat a géneket, melyek nagy valószínűséggel a kajszai és a meggy flavonoid-bioszintézisének kulcsenzimeit kódolják, valamint információt adtunk ezen gének relatív expressziós változásáról a gyümölcserés során. Föltártuk az eltérő antioxidáns kapacitás kialakításának hátterében álló géneket.

9 Summary

Epidemiological studies confirmed that a fresh plant-based diet prevents the aetiology of several diseases. The health-promoting effects of stone fruits are now widely attributed to their high contents of antioxidant polyphenolics. Although many different compounds contribute to the antioxidant capacity of fresh fruits, polyphenolics are supposed to have a decisive role. Fruits of different species show great variations in their polyphenolic composition. In addition, earlier studies revealed that huge intraspecific variations (differences in polyphenolic composition in fruits of different cultivars of the same species) in the polyphenolic contents and antioxidant capacity can be also detected.

This study was carried out to characterize the flavonoid biosynthesis pathway of apricot (*Prunus armeniaca*) and sour cherry (*Prunus cerasus*) at the molecular level. We wanted to identify the genes encoding the key enzymes of flavonoid biosynthesis in these species and characterize their expression throughout ripening and in fruits of genotypes differing in antioxidant capacity ('Gönci magyarkajszai' and 'Preventa' apricot, as well as 'VN-1' and 'Pipacs 1' sour cherry).

Fruits were harvested at five different ripening stages characterized by fruit sizes, fruit weight, soluble solid content and colour indices. For PCR and real-time PCR, RNA was isolated using a hot borate extraction procedure and RNA was reverse transcribed into cDNA. To amplify the genes encoding the key enzymes in flavonoid biosynthesis, PCR primers were designed from homologous gene sequences retrieved from the NCBI GenBank and peach EST on-line databases. Suitability of the primers was tested by the amplification of apricot and sour cherry DNA. The amplicons were cloned and sequenced. Partial DNA sequences of 19 apricot and 10 sour cherry flavonoid biosynthesis genes were determined.

Based on these sequences, assay-specific primers were designed for real-time PCR analysis in order to have the possibility to compare the results of all reactions. Several reference genes have been tested and *RP-II* (RNA polymerase II) was found to have the most stable expression. PCR- and real-time PCR-based methods have been elaborated to check whether the cDNA solutions are free from residual genomic DNA contamination. All reaction conditions (e.g. cDNA quantity, primer and MgCl₂ concentrations) were optimized for the real-time PCR. The assay-specific primers were used for real-time PCR analysis of the flavonoid biosynthesis genes to characterize their expression throughout the ripening process of different fruits.

Since preparation of all samples and conditions of each reaction were identical, data of the real-time PCR analysis could be pooled for a collective analysis and comparison. We detected high transcript abundance in the first and second ripening stages of apricot fruit, which decreased

during subsequent ripening stages. Fruits of 'Preventa' were characterized by higher relative transcript quantities for several genes (*PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *ANR* és *LAR*) as compared with the fruits of 'Gönci magyarkajszí', especially in fruit skin.

The transcript abundance of *PAL*, *C4H*, *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR* and *ANS* in the fruit skin of 'VN-1' sour cherry (characterized by high anthocyanin content) exceeded the respective quantities in the skin of 'Pipacs 1' (containing less anthocyanins). Transcription factors MYB and MYB10 are likely to take part in the transcriptional regulation of some sour cherry flavonoid biosynthesis genes. The abundance of transcripts in sour cherry fruits increased throughout the ripening process, which was closely correlated with the evolution of anthocyanic pigmentation. Comparing all results, the highest relative gene expression values were detected in the fruit skin of 'Preventa' and 'VN-1'.

The antioxidant capacity of the tested apricot genotypes was determined using three different methods (FRAP, TEAC and TPC). Our results confirmed the great difference between the antioxidant capacity and total phenolic content of the two. Fruit skin and flesh of 'Preventa' had higher antioxidant capacity than those of the 'Gönci magyarkajszí'; the highest values were measured in the skin of 'Preventa' fruit. In general, fruits of 'Preventa' showed increasing, while those of 'Gönci magyarkajszí' exerted decreasing antioxidant capacities throughout the ripening process.

A hyphenated HPLC-ESI-(Q)TOF MS technique was used to identify the main flavonoid components in apricot and determine their relative quantities. Quercetin-hexoside, rutin, naringenin-hexoside (first time detected in apricot) as well as catechin and epicatechin were identified in higher quantities in apricot fruits. We concluded that the outstanding antioxidant capacity of 'Preventa' is, at least partly, due to the high catechin contents in fruit flesh, which is a consequence of the elevated expression of genes involved in the flavanol biosynthesis.

The most innovative parts of my PhD work are the following achievements: we were the first to identify the most important putative flavonoid biosynthesis genes in apricot and sour cherry and characterize their expression throughout the ripening process of fruits. We have also identified some differently expressed genes that might be responsible for the high antioxidant capacity.

10 Mellékletek

10.1 Melléklet I. – Irodalomjegyzék

1. Abrankó, L., García-Reyes, J., Molina-Díaz, A. (2011a): In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 46: 478-488.
2. Abrankó, L., Nagy, Á., Hegedűs, A. (2011b): Genistein izoflavon: egy ismeretlen ismerős a meggyben (*Prunus cerasus* L.), In: MKE 1. Nemzeti Konferencia, Adányiné Kisbocskói, N.; Wölfling, J. (eds.), Magyar Kémikusok Egyesülete, Sopron, 2011. május 22-25., p 50.
3. Adams, D. O. (2006): Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57: 249-256.
4. Aebersold, R., Mann, M. (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422: 198-207.
5. Aharoni, A., De Vos, C. H. R., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J. N. M., O'Connell, A. P. (2001): The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J.*, 28: 319-332.
6. Akin, E.B., Karabulut, I., Topcu, A. (2008): Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Food Chem.*, 107: 939-948.
7. Alscher, R. G., Donahue, J. L., Cramer, C. L. (1997): Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant*, 100: 224-233.
8. Andersen, O. M. Antho (1987): Cyanins in fruits of *Vaccinium japonicum*. *Phytochemistry*, 26: 1220-1221.
9. Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S. E., Bektasoglu, B., Berker, K. I. Ozyurt, D. (2007): Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.
10. Arteel, G. E. (2008): Alcohol-induced oxidative stress in the liver: *in vivo* measurements. *Methods Mol. Biol.*, 447: 185-197.
11. Arts, I. C. W., Jacobs, D. R., Gross, M., Harnack, L. J., Folsom, A. R. (2002): Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control*, 13: 373-382.
12. Arts, I. C. W., van de Putte, B., Hollman, P. C. H. (2000): Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1746-1751.
13. Aruoma, O. I. (1998): Free Radicals, Oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 75: 199-212.
14. Asif, M., Trivedi, P., Solomos, T., Tucker, M. (2006): Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus × domestica*) fruit. *J. Agr. Food Chem.*, 54: 5227-5229.
15. Azuma, A., Kobayashi, S., Yakushiji, H., Yamada, M., Mitani, N., Sato, A. (2007): VvmybA1 genotype determines grape skin color. *Vitis*, 46: 154-155.

16. Balogh, E. (2010): Antioxidáns kapacitás meghatározása és ennek kialakításában szerepet játszó vegyületek vizsgálata bogyós gyümölcsök esetében. PhD értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest. 149 p.
17. Bashir, H. A., Abu-Goukh, A. B. A. (2003): Compositional changes during guava fruit ripening. *Food Chem.*, 80: 557-563.
18. Bengtsson, M., Karlsson, J. H., Westman, G., Kubista, M. (2003): A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 31: e45.
19. Benz, C., Yau, C. (2008): Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nat. Rev. Cancer.*, 8: 875-879.
20. Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239: 70-76.
21. Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., Weintraub, H. (1990): Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*, 250: 1149-1151.
22. Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992): Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, 18: 1-9.
23. Bogs, J., Downey, M. O., Harvey, J. S., Ashton, A. R., Tanner, G. J., Robinson, S. P. (2005): Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol.*, 139: 652-663.
24. Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D., Robinson, S. P. (2006): Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiol.*, 140: 279-291.
25. Bogs, J., Jaffe, F. W., Takos, A. M., Walker, A. R., Robinson, S. P. (2007): The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol.*, 143: 1347-1361.
26. Bohm, B. A. (1999): Introduction to Flavonoids. Harwood, Amsterdam. 504 p.
27. Bókkon, I., Salari, V. (2010): Information storing by biomagnetites. *J. Biol. Phys.*, 36: 109-120.
28. Bonerz, D., Würth, K., Dietrich, H., Will, F. (2007): Analytical characterization and the impact of ageing on anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars. *Eur. Food Res. Technol.*, 224: 355-364.
29. Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., Rezzani, R. (2008): Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol. Histopathol.*, 23: 381-390.
30. Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996a): Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.*, 111: 1059-1066.
31. Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996b): Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.*, 32: 565-569.
32. Braidot, E., Zancani, M., Petrusa, E., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Macrì, F., Vianello, A. (2008): Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signal. Behav.*, 3: 626-632.
33. Burda, S., Oleszek, W., Lee, C. Y. (1990): Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 945-948.

34. Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R. (2006): Beneficial effects of green tea: a review. *J. Am. Coll. Nutr.*, 25: 79-99.
35. Caccese, D., Praticò, D., Ghiselli, A., Natoli, S., Pignatelli, P., Sanguigni, V., Iuliano, L., Violi, F. (2000): Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation - role of arachidonic acid metabolism. *J. Thromb. Haemost.*, 83: 358-519.
36. Cadenas, E., Davies, K. J. A. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 222-230.
37. Caplin, B. E., Rasmussen, R. P., Bernard, P. S., Wittwer, C. T. (1999): LightCycler™ hybridization probes – the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica*, 1: 5-8.
38. Castellarin, S. D., Matthews, M. A., Di Gaspero, G., Gambetta, G. A. (2007a): Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227: 101-112.
39. Castellarin, S. D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E., Di Gaspero, G. (2007b): Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environ.*, 30: 1381-1399.
40. Chandler, S. F., Sanchez, C. (2012): Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnol. J.*, (in press) <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-7652.2012.00693.x/pdf>
41. Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. (1993): A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11: 113-116.
42. Chaovanalikit, A., Wrolstad, R. E. (2004): Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *J. Food Sci.*, 69: 67-72.
43. Clifford, M. N. (1999): Chlorogenic acid and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 362-372.
44. Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H. (2007): Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1: 1-22.
45. Cornetti, U. (2009): Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin. Dermatol.*, 27: 175-194.
46. Cultrone, A., Cotroneo, P. S., Recupero R. G. (2010): Cloning and molecular characterization of R2R3-MYB and bHLH-MYC transcription factors from *Citrus sinensis*. *Tree Genet. Genomes*, 6: 101-112.
47. Dardick, C. D., Callahan, A. M., Chiozzotto, R., Schaffer, R. J., Piagnani, M. C., Scorza, R. (2010): Stone formation in peach fruit exhibits spatial coordination of the lignin and flavonoid pathways and similarity to *Arabidopsis* dehiscence. *BMC Biology*, 8: 13.
48. Dauchet, L., Dallongeville, J. (2008): Fruit and vegetables and cardiovascular disease: epidemiological evidence from the non-Western world. *Brit. J. Nutr.*, 99: 219-220.
49. Davies, K. M. (1993): A cDNA clone for flavanone 3-hydroxylase from *Malus*. *Plant Physiol.*, 103: 291.
50. de Ancos, B., Gonzalez, E. M., Cano, M. P. (2000): Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 4565-4570.
51. De Candolle, A. (1894): Termesztett növényeink eredete. K.M. Természettudományi Társulat, Budapest. 516 p.

52. Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M. (2008): Changes in physicochemical and nutritive parameters and bioactive compounds during development and on-tree ripening of eight plum cultivars: a comparative study. *J. Sci. Food. Agr.*, 88: 2499-2507.
53. Dondini, L., Pierantoni, L., Ancarani, V., Angelo, M. D., Cho, K. H., Shin, I. S., Musacchi, S., Kang, S. J., Sansavini, S. (2008): The inheritance of the red colour character in European pear (*Pyrus communis*) and its map position in the mutated cultivar 'Max Red Bartlett'. *Plant Breeding*, 127: 524-526.
54. Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., Boras, M. (2007): The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chem.*, 102: 966-975.
55. Dragovic-Uzelac, V., Pospisil, J., Levaj, B., Delonga, K. (2005): The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity. *Food Chem.*, 91: 373-383.
56. Drogoudi, P. D., Vemmos, S., Pantelidis, G., Petri, E., Tzoutzoukou, C., Karayiannis, I. (2008): Physical characters and antioxidant, sugar, and mineral nutrient contents in fruit from 29 apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars and hybrids. *J. Agr. Food. Chem.*, 56: 10754-10760.
57. Dröge, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82: 47-95.
58. El Ghaouth, A., Wilson, C. L., Callahan, A. M. (2003): Induction of chitinase, B-1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. *Phytopathol.*, 93: 349-355.
59. Ellis, L. A., Roberts, D. J. (1997): Chromatographic and hyphenated methods for elemental speciation analysis in environmental media. *J. Chromatogr. A*, 774: 3-19.
60. Elstner, E. F. (1982): Oxygen activation and oxygen toxicity. *Plant Physiol.*, 33: 73-96.
61. Ercisli, S., Akbulut, M., Ozdemir, O., Sengul, M., Orhan, E. (2008): Phenolic and antioxidant diversity among persimmon (*Diospyrus kaki* L.) genotypes in Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 59: 477-482.
62. Espley, R. V., Brendolise, C., Chagne, D., Kutty-Amma, S., Green, S., Volz, R., Putterill, J., Schouten, H. J., Gardiner, S. E., Hellens, R. P., Allan, A. C. (2009): Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *Plant Cell*, 21: 168-183.
63. Espley, R. V., Hellens, R. P., Putterill, J., Stevenson, D. E., Kutty-Amma, S., Allan, A. C. (2007): Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant J.*, 49: 414-427.
64. FAOSTAT (2010) FAO statistical database, <http://faostat.fao.org/> [2012. március 20.]
65. Ferré-D'Amaré, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G., Burley, S. K. (1994): Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J.*, 13: 180-189.
66. Ficzek, G., Végvári, Gy., Sándor, G., Stéger-Máté, M., Kállay, E., Szügyi, S., Tóth, M. (2011): HPLC evaluation of anthocyanin components in the fruit of Hungarian sour cherry cultivars during ripening. *J. Food Agr. Environ.*, 9: 30-35.
67. Fischer, T. C., Halbwirth, H., Meisel, B., Stich, K., Forkmann, G. (2003): Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus × domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 412: 223-230.

68. Fischer, T., Gosch, C., Pfeiffer, J., Halbwirth, H., Halle, C., Stich, K., Forkmann, G. (2007): Flavonoid genes of pear (*Pyrus communis*). *Trees*, 21: 521-529.
69. Frankel, E. N., Finley, J. W. (2008): How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J. Agr. Food Chem.*, 56: 4901-4908.
70. Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000): The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agr.*, 80: 1925-1941.
71. Frémont, L., Belguendouz, L., Delpal, S. (1999): Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.*, 62: 2511-2521.
72. Fuchs, B., Süß, R., Nimptsch, A., Schiller, J. (2009): MALDI-TOF-MS directly combined with TLC: A review of the current state. *Chromatographia*, 69: 95-105.
73. Gaetani, G. F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A. M. Kirkman, H. N. (1989): Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73: 334-339.
74. Gantet, P., Memelink, J. (2002): Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharmacol. Sci.*, 23: 563-569.
75. Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S. D., van Nocker, S., Loescher, W. (2003): Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiol.*, 131: 1566-1575.
76. Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. (1994): Influence of variety, maturity and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams. *Z. Lebensmitt.-unters. -Forsch. A (ma: Eur. Food Res. Technol.)*, 199: 433-436.
77. Garson, J. A., Grant, P. R., Ayliffe, U., Ferns, R. B., Tedder, R. S. (2005): Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *J. Virol. Methods*, 126: 207-213.
78. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000): Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 1106-1114.
79. Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Kader, A. A. (2002): Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J. Agr. Food. Chem.*, 50: 4976-4982.
80. Giuliano, G., Bartley, G. E., Scolnik, P. A. (1993): Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell*, 5: 379-387.
81. Gokmen, V., Serpen, A., Fogliano, V. (2009): Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends Food Sci. Technol.*, 20: 278-288.
82. Goldberg, D. M., Karumanchiri, A., Tsang, E., Soleas, G. J. (1998): Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49: 23-34.
83. Gómez, E., Ledbetter, C. A. (1997): Development of volatile compounds during fruit maturation: characterization of apricot and plum × apricot hybrids. *J. Sci. Food Agr.*, 74: 541-546.
84. González-Agüero, M., Cifuentes-Esquivel, N., Ibañez-Carrasco, F., Gudenschwager, O., Campos-Vargas, R., Defilippi, B. G. (2011): Identification and characterization of genes

- differentially expressed in cherimoya (*Annona cherimola* Mill) after exposure to chilling injury conditions. *J. Agr. Food Chem.*, 59: 13295-13299.
85. González-Agüero, M., Troncoso, S., Gudenschwager, O., Campos-Vargas, R., Moya-León, M. A., Defilippi, B. G. (2009): Differential expression levels of aroma-related genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, 47: 435-440.
 86. Griesser, M., Hoffmann, T., Bellido, M. L., Rosati, C., Fink, B., Kurtzer, R., Aharoni, A., Munoz-Blanco, J., Schwab, W. (2008): Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.*, 146: 1528-1539.
 87. Hakkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkanen, H. M., Torronen, A. R. (1999): Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 2274-2279.
 88. Halliwell, B. (2000): The antioxidant paradox. *Lancet*, 355: 1179-1180.
 89. Hanneken, A., Lin, F. F., Johnson, J., Maher., P. (2006): Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47: 3164-3177.
 90. Hansen, K. D., Brenner, S. E., Dudoit, S. (2010): Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Res.*, 38: e131.
 91. Harborne, J. (1997): Phytochemistry of fruits and vegetables: an ecological overview. In: Tomás-Barberán, F. A.; Robins, R. J. (eds.) *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Oxford University Press, New York, pp. 353-367.
 92. Harborne, J. B. (1988): *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall, London. 676 p.
 93. Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
 94. Harnly, J., Bhagwat, S., Lin, L. (2007): Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389: 47-61.
 95. Härtel, H., Haseloff, R. F., Ebert, B., Rank, B. (1992): Free radical formation in chloroplasts. Methyl viologen action. *J. Photochem. Photobiol.*, 12: 375-387.
 96. Hayama, H., Shimada, T., Fujii, H., Ito, A., Kashimura, Y. (2006): Ethylene-regulation of fruit softening and softening-related genes in peach. *J. Exp. Bot.*, 57: 4071-4077.
 97. Hegedűs, A. (2002): Eltérő érzékenységű növényfajták élettani válaszai különböző stresszfeltételek között. Doktori (PhD) értekezés, SZIE Kertészettudományi Kar. 157 p.
 98. Hegedűs, A. (2007): Gyümölcsfák nemesítését segítő biokémiai és molekuláris vizsgálatok. Habilitációs értekezés, Debreceni Egyetem, Debrecen. 56 p.
 99. Hegedűs, A., Balogh, E., Engel, R., Sipos, B. Z., Papp, J., Blázovics, A., Stefanovits-Bányai, E. (2008): Comparative nutrient element and antioxidant characterization of berry fruit species and cultivars grown in Hungary. *HortSci.*, 43: 1711-1715.
 100. Hegedűs, A., Engel, R., Abrankó, L., Balogh, E., Blázovics, A., Hermán, R., Halász, J., Ercisli, S., Pedryc, A., Stefanovits-Bányai, É. (2010): Antioxidant and antiradical capacities in apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruits: Variations from genotypes, years, and analytical methods. *J. Food Sci.*, 75: 722-730.

101. Hegedűs, A., Pfeiffer, P., Papp, N., Abrankó, L., Pedryc, A., Stefanovits-Bányai, É. (2011): Accumulation of antioxidants in apricot fruit through ripening: characterization of a genotype with enhanced functional properties. *Biol. Res.*, 44: 339-344.
102. Herrman, K. (1988): On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 186: 1-5.
103. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology*, 10: 413-417.
104. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilising the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7276-7280.
105. Hollman P. C. H., Katan , M. B. (1999): Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.*, 37: 937-942.
106. Holton, T. A., Cornish, E. C. (1995): Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1071-1083.
107. Huang, D. J., Ou, B. X., Prior, R. L. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agr. Food Chem.*, 53: 1841-1856.
108. Jaakola, L., Määtä, K., Pirttilä, A. M., Törrönen, R., Kärenlampi, S., Hohtola, A. (2002): Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidine, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.*, 130: 729-739.
109. Jaakola, L., Määtä-Riihinen, K., Kärenlampi, S., Hohtola, A. (2004): Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218: 721-728.
110. Jaakola, L., Pirttilä, A. M., Halonen, M., Hohtola, A. (2001): Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Mol. Biotechnol.*, 19: 201-203.
111. Jennings, D. L., Carmichael, E. (1980): Anthocyanin variation in the genus *Rubus*. *New Phytol.*, 84: 505-513.
112. Ju, Z., Liu, C., Yuan, Y. (1995): Activities of chalcone synthase and UDPGal: flavonoid-3-o-glycosyltransferase in relation to anthocyanin synthesis in apple. *Sci. Hortic.*, 63: 175-185.
113. Kalt, W., Ryan, D. A. J., Duy, J. C., Prior, R. L., Ehlenfeldt, M. K., Vander Kloet, S. P. (2001): Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4761-4767.
114. Katayama, T., Nakayama, T. O. M., Lee, T. H., Chichester, C.O. (1971): Carotenoid transformations in ripening apricots and peaches. *J. Food Sci.*, 36: 804-806.
115. Katsumoto, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Brugliera, F., Holton, T. A., Karan, M., Nakamura, N., Yonekura-Sakakibara, K., Togami, J., Pigeaire, A., Tao, G. Q., Nehra, N. S., Lu, C.Y., Dyson, B. K., Tsuda, S., Ashikari, T., Kusumi, T., Mason, J. G., Tanaka, Y. (2007): Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol.*, 48: 1589-1600.
116. Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M. (2003): Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, 64: 1133-1139.

117. Kiefer, E., Heller, W., Ernst, D. (2000): A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 18: 33-39.
118. Kim, S. H., Lee, J. R., Hong, S. T., Yoo, Y. K., An, G., Kim, S. R. (2003): Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin. *Plant Sci.*, 165: 403-413.
119. Kobayashi, S., Ishimaru, M., Ding, C. K., Yakushiji, H., Goto, N. (2001): Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci.*, 160: 543-550.
120. Koes, R., Verweij, W., Quattrocchio, F. (2005): Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.*, 10: 236-242.
121. Kranl, K., Schlesier, K., Bitsch, R., Hermann, H., Rohe, M., Bohm, V. (2005): Comparing antioxidative food additives and secondary plant products - use of different assays. *Food Chem.*, 93: 171-175.
122. Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Kuhn, D. N., Hahlbrock, K. (1983): UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2591-2593.
123. Kreuzaler, F., Ragg, H., Heller, W., Tesch, R., Witt, I., Dietrich, H., Hahlbrock, K. (1979): Flavanone synthase from *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.*, 99: 89-96.
124. Kristl, J., Slekovec, M., Tojnko, S., Unuk, T. (2011): Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L.): Evolution during on-tree ripening. *Food Chem.*, 125: 29-34.
125. Krzywinski, M. I., Schein, J. E., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., Marra, M. A. (2009): Circo: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.*, 19: 1639-1645.
126. KSH. (2005). Mezőgazdasági Statisztikai Évkönyv 2006. KSH, Budapest. 335 p.
127. Kumar, A., Ellis, B. E. (2001): The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiol.*, 127: 230-239.
128. Lakhanpal, P., Rai, D. K. (2007): Quercetin: a versatile flavonoid. *Int. J. Med.*, 2: 22-37.
129. Leccese, A., Bartolini, S., Viti, R. (2008): Total antioxidant capacity and phenolics content in fresh apricots. *Acta Aliment. Hung.*, 37: 65-76.
130. Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2003): Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6516-6520.
131. Licciardello, C., Russo, M. P., Vale', G., Recupero, R. G. (2008): Identification of differentially expressed genes in the flesh of blood and common oranges. *Tree Genet. Genomes*, 4: 315-331.
132. Lin-Wang, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T. K., Espley, R. V., Hellens, R. P., Allan, A. C. (2010): An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Rosaceae*. *BMC Plant Biol.*, 10: 50.
133. Lister, C. E., Lancaster, J. E., Walker, J. R. L. (1996): Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars. *J. Sci. Food Agr.*, 71: 313-320.

134. Liu, R. H. (2003): Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78: 517-520.
135. Lugasi, A. (2000): Élelmiszer eredetű flavonoidok potenciális egészségvédő hatása. *Orvosi Hetilap*, 141: 1751-1760.
136. Lugasi, A., Hóvári, J. (2002): Flavonoid aglycons in foods of plant origin II. Fresh and dried fruits. *Acta Aliment. Hung.*, 31: 63-71.
137. Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., Bíró, L. (2003): The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biol. Szeged.*, 47: 119-125.
138. Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990): Fruit Phenolics. CRC Press: Boca Raton. 392 p.
139. MacLean, D. D., Murr, D. P., DeEll, J. R., Mackay, A. B., Kupferman, E. M. (2007): Inhibition of PAL, CHS, and ERS1 in 'Red d'Anjou' pear (*Pyrus communis* L.) by 1-MCP. *Postharvest Biol. Technol.*, 45: 46-55.
140. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79: 727-747.
141. Manning, K. (1998): Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, 205: 622-631.
142. Manthey, J. A., Guthrie, N. (2002): Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 5837-5843.
143. Martin, C., Paz-Ares, J. (1997): MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.*, 13: 67-73.
144. Marty, I., Bureau, S., Sarkissian, G., Gouble, B., Audergon, J. M., Albagnac, G. (2005): Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *J. Exp. Bot.*, 56: 1877-1886.
145. Mayr, U., Treutter, D., Buelga, S., Bauer, H., Feucht, W. (1995): Developmental changes in the phenol concentrations of Golden Delicious apple fruits and leaves. *Phytochemistry*, 38: 1151-1155.
146. McCurdy, R. D., McGrath, J. J., Mackay-Sim A. (2008): Validation of the comparative quantification method of real-time PCR analysis and a cautionary tale of housekeeping gene selection. *Gene Ther. Mol. Biol.*, 12: 15-24.
147. Mercier, J. (1997): Role of phytoalexins and other antimicrobial compounds from fruits and vegetables in postharvest disease resistance. In: Tomás-Barberán, F. A.; Robins, R. J. (eds.), *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Oxford University Press, New York, pp. 221-241.
148. Meyer, A. S., Heinonen, M., Frankel, E. N. (1998): Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.*, 61: 71-75.
149. Middleton, E. J., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000): The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52: 673-751.
150. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84: 407-412.
151. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., Rice-Evans, C. A. (1996): Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.*, 384: 240-242.

152. Moeller, B., Herrmann, K. (1983): Quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in stone and pome fruit. *Phytochemistry*, 22: 477-481.
153. Mol, J., Grotewold, E., Koes, R. (1998): How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.*, 3: 212-217.
154. Morgenstern, R. (2004): Oxidative stress and human genetic variation. (Free radicals: The pros and cons of antioxidants). *J. Nutr.*, 134: 3173-3174.
155. Moriguchi, T., Kita, M., Tomono, Y., Endo-Inagaki, T., Omura, M. (2001): Gene expression in flavonoid biosynthesis: Correlation with flavonoid accumulation in developing citrus fruit. *Physiol. Plantarum*, 111: 66-74.
156. Muñoz-Robredo, P., Rubio, P., Infante, R., Campos-Vargas, R., Manríquez, D., González-Agüero, M., Defilippi, B. G. (2012): Ethylene biosynthesis in apricot: Identification of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) gene. *Postharvest Biol. Technol.*, 63: 85-90.
157. Myhrstad, M. C., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R., Moskaug, J. Ø. (2002): Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Rad. Biol. Med.*, 32: 386-393.
158. Nagy, A., Rak, G. P., Szilvássy, B., Hegedűs, A., Abrankó, L. (2009): Characterization of compounds providing the total antioxidant capacity in apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars and hybrids grown in Hungary. The 4th International Conference on Polyphenols and Health, Harrogate, United Kingdom, P268, p. 316.
159. Nakatsuka, A., Mizuta, D., Kii, Y., Miyajima, I., Kobayashi, N. (2008): Isolation and expression analysis of flavonoid biosynthesis genes in evergreen azalea. *Sci. Hort.*, 118: 314-320.
160. Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990): Introduction of a chimeric chalcon synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2: 279-289.
161. Nellemann, C., Vinggaard, A. M., Dalgaard, M., Hossaini, A., Larsen, J. J. (2001): Quantification of antiandrogen effect determined by Lightcycler technology. *Toxicology*, 163: 29-38.
162. Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohta, H. (2006): Flavonoid composition of fruit tissues of *Citrus* species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 178-192.
163. Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B. G., Tarling, C. A., Ford, C. M., Bowles, D. J., Davies, G. J. (2006): Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J.*, 25: 1396-1405.
164. Papp, N., Szilvássy, B., Abrankó, L., Szabó, T., Pfeiffer, P., Szabó, Z., Nyéki, J., Ercsli, S., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2010): Main quality attributes and antioxidants in Hungarian sour cherries: identification of genotypes with enhanced functional properties. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 45: 395-402.
165. Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. (2000): Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J. Agr. Food Chem.*, 48: 5331-5337.
166. Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Diaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goni, I. és Saura-Calixto, F. (2008): Updated methodology to determine antioxidant capacity in

- plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.*, 41: 274-285.
167. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2010): Flavonols and cardiovascular disease. *Mol. Asp. Med.*, 31: 478-494.
 168. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. (2002): Relative Expression Software Tool (REST[®]) Group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 30: e36.
 169. Pfeiffer, J., Kühnel, C., Brandt, J., Duy, D., Punyasiri, P. A. N., Forkmann, G., Fischer, T. C. (2006): Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiol. Biochem.*, 44: 323-334.
 170. Pfeiffer, P., Hegedűs, A. (2011): Molecular genetics of the flavonoid biosynthesis in two apricot genotypes. *Acta Aliment. Hung.*, 40: 150-163.
 171. Pfeiffer, P., Pedryc, A., Papp, N., Abrankó, L., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2012): Molecular genetics of the flavonoid biosynthesis in two apricot genotypes. XV International Symposium on Apricot Breeding and Culture, 20–24 June 2011, Yerevan, Armenia. *Acta Hort.* (in press).
 172. Pillonel, L., Bosset, J. O., Tabacchi, R. (2002): Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. *Food Sci. Technol.*, 35: 1-14.
 173. Pina, A., Errea, P. (2008): Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus* spp. *J. Plant Physiol.*, 165: 705-714.
 174. Pór, J., Faluba, Z. (1982): Cseresznye és meggy. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 362 p.
 175. Prior, R. L., Cao, G. H. (1999): *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.*, 27: 1173-1181.
 176. Rak, G., Fodor, P., Abrankó, L. (2010): Three-step HPLC-ESI-MS/MS procedure for screening and identifying non-target flavonoid derivatives. *Int. J. Mass Spectrom.*, 290: 32-38.
 177. Reiter, R. J., Tan, D. X., Burkhardt, S., Manchester, L. C. (2001): Melatonin in plants. *Nutr. Rev.*, 59: 286-290.
 178. Reiter, R. J., Tan, D. X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Leon, J., Czarnocki, Z. (2003): Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.*, 50: 1129-1146.
 179. Robak, J., Gryglewski, R. J. (1988): Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 837-841.
 180. Ruiz, D., Egea, J., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A. (2005b): Characterization and quantitation of phenolic compounds in new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9544-9552.
 181. Ruiz, D., Egea, J., Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I. (2005a): Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties and their relationship with flesh and skin color. *J. Agr. Food Chem.*, 53: 6368-6374.
 182. Rusznyák, S., Szent-Györgyi, A. (1936): Vitamin nature of flavones. *Nature*, 138: 798.
 183. Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., Rice-Evans, C. (1995): Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322: 339-346.

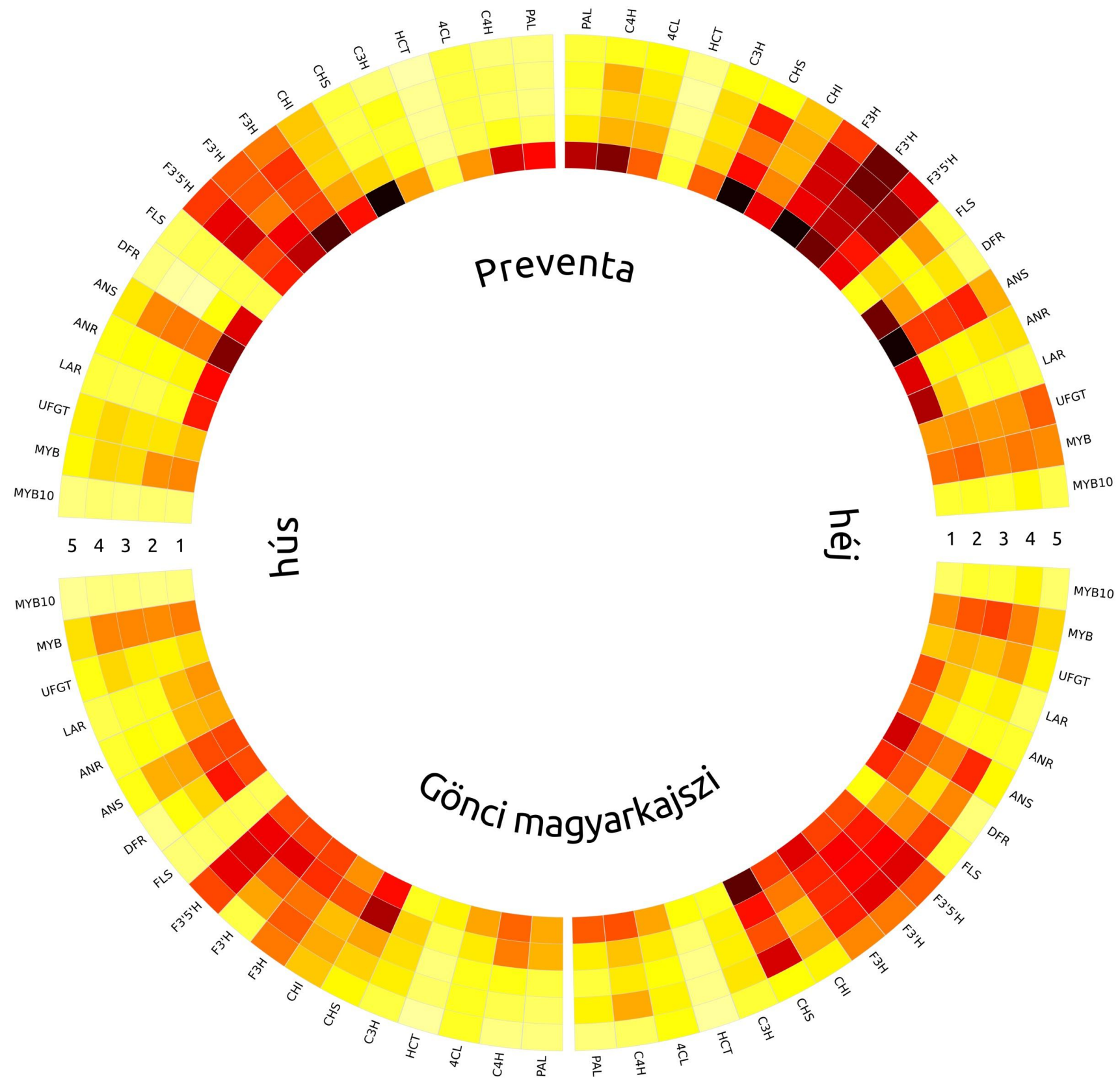
184. Salvatierra, A., Pimentel, P., Moya-Leon, M. A., Caligari, P. D. S., Herrera, R. (2010): Comparison of transcriptional profiles of flavonoid genes and anthocyanin contents during fruit development of two botanical forms of *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*. *Phytochemistry*, 71: 1839-1847.
185. Sambrook, J., Russell, D. W. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
186. Saud, G., Carbone, F., Perrotta, G., Figueroa, C. R., Moya, M., Herrera, R., Retamales, J. B., Carrasco, B., Cheel, J., Schmeda-Hirschmann, G., Caligari, P. D. S. (2009): Transcript profiling suggests transcriptional repression of the flavonoid pathway in the white-fruited Chilean strawberry, *Fragaria chiloensis* (L.) Mill. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 56: 895-903.
187. Schijlen, E. G. W. M., Ric de Vos, C. H., van Tunen, A. J., Bovy, A. G. (2004): Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65: 2631-2648.
188. Schmidt, G. W. Delaney, S. K. (2010): Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics*, 283: 233-241.
189. Schwartz, J. C., Senk, M. W., Syka J. E. P. (2002): A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 13: 659-669.
190. Seigler, D. S. (1998): Plant Secondary Metabolism. Kluwer, Norwell. 759 p.
191. Serrano, M., Guillen, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D. (2005): Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agr. Food. Chem.*, 53: 2741-2745.
192. Shahidi, F., Naczk, M. (1995): Food Phenolics, Sources, Chemistry, Effects, Applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co. Inc. 331 p.
193. Shahidi, F., Naczk, M. (2004): Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Press, Boca Raton, London New York Washington, D.C. 575 p.
194. Shulaev, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., Iezzoni, A., Main, D., Arús, P., Dandekar, A. M., Lewers, K., Brown, S. K., Davis, T. M., Gardiner, S. E., Potter, D., Veilleux, R. E. (2008): Multiple models for *Rosaceae* genomics. *Plant Physiol.*, 147: 985-1003.
195. Singer, R. H., Penman, S. (1973): Messenger RNA in HeLa cells: Kinetics of formation and decay. *J. Mol. Biol.*, 78: 321-334.
196. Singh, D., Greenwald, J. E., Bianchine, J., Metz, E. N., Sagone, A. L. Jr. (1981): Evidence for the generation of hydroxyl radical during arachidonic acid metabolism by human platelets. *Am. J. Hematol.*, 11: 233-240.
197. Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 161: 144-158.
198. Siqueira, J. O., Nair, M. G., Hammerschmidt, R., Safir, G. R. (1991): Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1: 63-121.
199. Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Robbins, T. P. (2003): Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (*S*) alleles *S*₁ to *S*₁₆ using consensus and allele-specific primers. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 1059-1070.
200. Steyn, W. J., Holcroft, D. M., Wand, S. J. E., Jacobs G. (2004): Regulation of pear color development in relation to activity of flavonoid enzymes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 129: 6-12.

201. Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V. (2007): Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71: 1741-1751.
202. Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., Morley, A. A. (1992): Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Bio/Technology*, 13: 444-9.
203. Szabó, Cs. (2006): Kamikaze molekulák, Typotex Kiadó, Budapest. 199 p.
204. Takos, A. M., Ubi, B. E., Robinson, S. P., Walker, A. R. (2006): Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant Sci.*, 170: 487-499.
205. Terao, J. (2009): Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum Nutr.*, 61: 87-94.
206. Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., Wolk, A. (2001): Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 525-533.
207. Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., Kader, A. A. (2001): HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4748-4760.
208. Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J., Zhang, Z. (2009): Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.*, 10: 71.
209. Trabelsi, N., Petit, P., Manigand, C., Langlois d'Estaintot, B., Granier, T., Chaudiere, J., Gallois, B. (2008): Structural evidence for the inhibition of grape dihydroflavonol 4-reductase by flavonols. *Acta Crystallogr. D.*, 64: 883-891.
210. Tsuda, T., Yamaguchi, M., Honda, C., Moriguchi, T. (2004): Expression of anthocyanin biosynthesis genes in the skin of peach and nectarine fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 129: 857-862.
211. Turrens, J. F. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 552: 335-344.
212. Tyagi, S., Kramer, F. R. (1996): Molecular beacons: probes that fluorescence upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 14: 303-308.
213. Tyler, K. D., Wang, G., Tyler, S. D., Johnson, W. M. (1997): Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 339-346.
214. Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F., Brignon, P. (1999): Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5261-5266.
215. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.-Biol. Interact.*, 160: 1-40.
216. van den Berg, R., Haenen, G., van den Berg, H., Bast, A. (1999): Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.*, 66: 511-517.
217. Veberic, R., Stampar, F. (2005): Selected polyphenols in fruits of different cultivars of genus *Prunus*. *Phyton*, 45: 375-383.
218. Velasco, R., Zharkikh, A., Troglio, M., Cartwright, D. A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, L. M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J. T., Perazzolli, M.,

- Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Demattá, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J. A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, S. M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S. K., Fontana, P., Gutin, A., Van de Peer, Y., Salamini, F., Viola, R. (2007): A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*, 2: 1326.
219. Vom Endt, D., Kijne, J. W., Memelink, J. (2002): Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, 61: 107-114.
 220. Walker, A. R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D. A. J., Thomas, M. R., Robinson, S. P. (2007): White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J.*, 49: 772-785.
 221. Wan, C. Y., Wilkins, T. A. (1994): A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal. Biochem.*, 223: 7-12.
 222. Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Booren, A. M., Gray, J. I. (1998): Novel antioxidant compounds from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J. Nat. Prod.*, 62: 86-88.
 223. Wei, Y. H., Lee, H. C. (2002): Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.*, 227: 671-682.
 224. Welling, A., Rinne, P., Viherä-Aarnio, A., Kontunen-Soppela S., Heino, P., Palva, E. T. (2004): Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *J. Exp. Bot.*, 55: 507-516.
 225. Wiersma, P. A., Wu, Z. (1998): Full length cDNA for phenylalanine ammonia-lyase cloned from ripe sweet cherry fruit (*Prunus avium*; accession no. AF036948). (PGR98-184). *Plant Physiol.*, 118: 1102.
 226. Winkel, B. S. J. (2006): The biosynthesis of flavonoids. In: E. Grotewold (ed.), *The Science of Flavonoids*. Springer, New York, pp. 71-95.
 227. Winkel-Shirley, B. (2001): Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.*, 126: 485-493.
 228. Wong, M. L., Medrano, J. F. (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39: 75-85.
 229. Wu, L., W., Ashraf, M. H. N., Facci, M., Wang, R., Paterson, P. G., Ferrie, A., Juurlink, B. H. J. (2004): Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 7094-7099.
 230. Yamashita, M., Fenn, J. B. (1983): Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.*, 88: 4451-4459.
 231. Yamazaki, I., Lawrence, H. P. (1961): Mechanism of free radical formation and disappearance during the ascorbic acid oxidase and peroxidase reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 50: 62-69.
 232. Yamazaki, M., Yamagishi, E., Gong, Z., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Tanaka, Y., Kusumi, T., Yamaguchi, M., Saito, K. (2002): Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression. *Plant Mol. Biol.*, 48: 401-411.

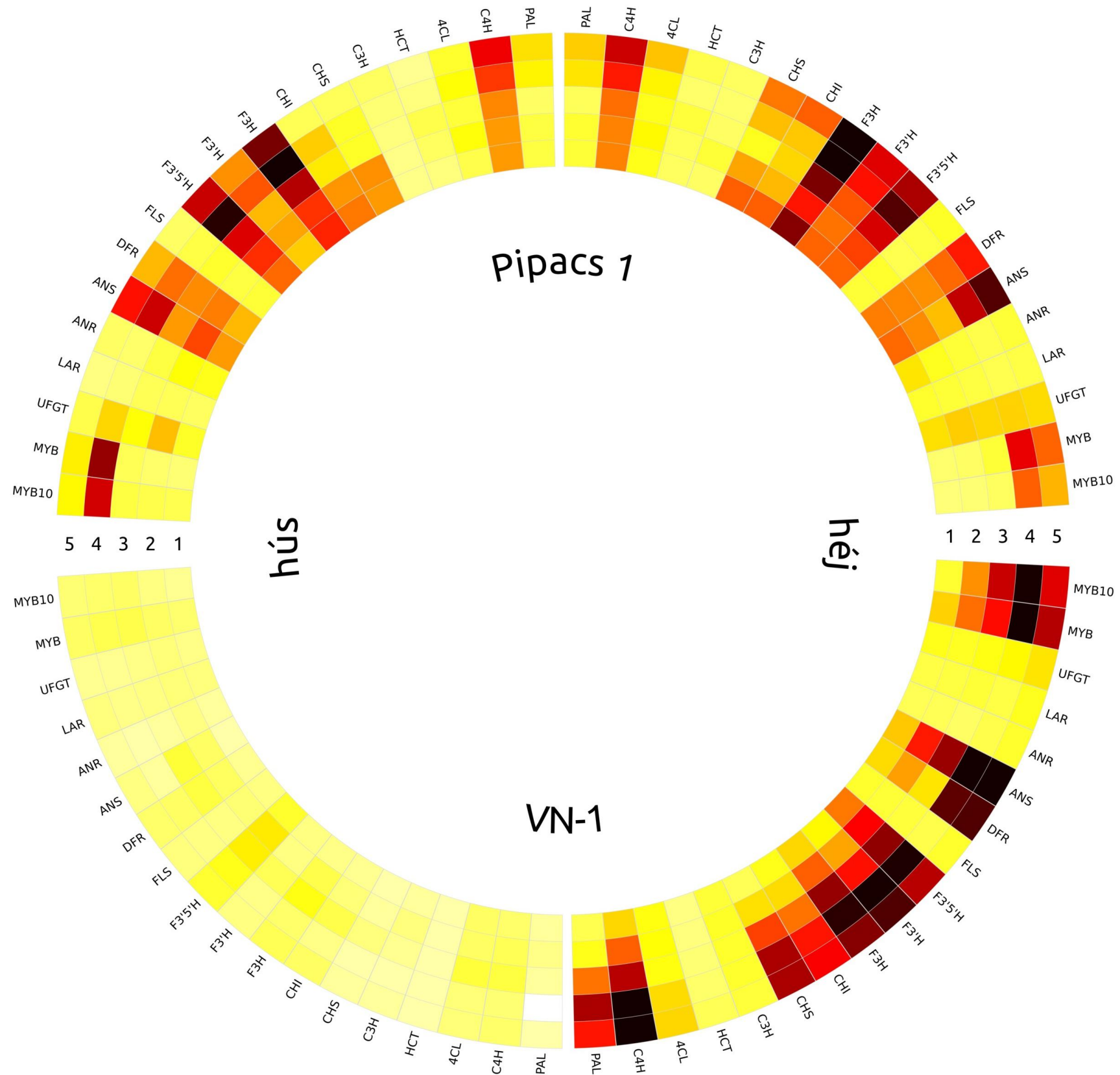
233. Zhang, Z., Smith D. L. (1993): Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci.*, 2: 522-531.
234. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32: 103.

10.2 Melléklet II.



A kajszi mintasorozatokon mért relatív génexpressziós értékek színekódos ábrázolása. A 'Preventa' gyümölcsökben mért értékeknek megfelelő színek a körív felső, a 'Gönci magyarkajszi' esetében a körív alsó felében található. A gyümölcsök héjszövetében mért relatív génexpressziós értékeknek megfelelő színek a kör jobb, a gyümölcshúshoz tartozó értékek a kör bal oldalán foglalnak helyet. A kisebb relatív génexpressziós értékekhez világosabb, a nagyobb értékekhez sötétebb szín tartozik. A színskálát 150 különböző árnyalatra osztottuk. Egy vizsgált gén relatív expressziójának változását egy köríckben tüntettük fel. A legbelső mező a teljesen éretlen (1. érési állapot), míg a legkülső mező az érett (5. érési állapot) értékeit reprezentálja.

10.3 Melléklet III.



A meggy mintasorozatokban mért relatív génexpressziós értékek szinkódos ábrázolása. A 'Pipacs 1' gyümölcszeiben mért értékeknek megfelelő színek a körív felső, a 'VN-1' esetében a körív alsó felében található. A gyümölcsök héjszövetében mért relatív génexpressziós értékeknek megfelelő színek a kör jobb, a gyümölcshúshoz tartozó értékek a kör bal oldalán foglalnak helyet. A kisebb relatív génexpressziós értékekhez világosabb, a nagyobb értékekhez sötétebb szín tartozik. A színskálát 150 különböző árnyalatra osztottuk. Egy vizsgált gén relatív expressziójának változását egy körképben tüntettük fel. A legbelső mező a teljesen éretlen (1. érési állapot), míg a legkülső mező az érett (5. érési állapot) értékeit reprezentálja. ja.

11 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Hegedűs Attilának, témavezetőmnek, aki önzetlenül, idejét és energiáját nem kímélve segített doktori munkám elkészítésében.

Köszönettel tartozom Dr. Pedryc Andrzej tanár úrnak, aki lehetőséget nyújtott a munka elvégzéséhez és többretűen támogatott az utóbbi években.

Külön szeretném kiemelni Dr. Halász Júliát, Szikriszt Bernadettet, Dr. Deák Tamást, Gutermuth Ádámot és Dr. Szani Zsoltot, akik számtalan esetben segítettek szakmai tanácsaikkal.

Szeretném megköszönni a Genetika és Növénynevelés Tanszék valamennyi munkatársának, hogy hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönetet szeretnék mondani az Alkalmazott Kémia Tanszék egyes munkatársainak, nevezetesen Stefanovitsné Dr. Bányai Évának, Papp Nórának, Kertész Katalinnak, valamint Dr. Abrankó Lászlónak és Nagy Ádámnak, hogy munkájukkal hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom Szőke Ferencnek és Dr. Szabó Tibornak (Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht.), amiért rendelkezésemre bocsátották a vizsgálatokba vont 'VN-1' és 'Pipacs 1' meggy gyümölcsöket.

A kísérletek elvégzését az OTKA K84290, NKTH-OTKA K68921 és TÁMOP 4.2.1./B-09/01-KMR-2010-0005 pályázatok támogatták.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családom, szüleim és menyasszonyom támogatását és segítségét.