



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

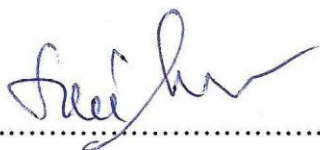
vezetője: Dr. Tóth Magdolna, MTA doktora
egyetemi tanár
BCE Kertészettudományi Kar
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI

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 (aszorbinsav, 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 transzgénikus 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 nemesítési 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 Tanszékkel 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. 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, reakciókörülmények optimalizálása).
5. Felmérni a kajszi gyümölcs antioxidáns kapacitásának változását az érés folyamán, eltérő gyümölcscrészek 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 háttérében 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.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. 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 Növénynemesítés 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.

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.

3.2. 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.

3.3. DNS- és RNS-izolálás, cDNS-szintézis

A genomi DNS-t meggylevelekből DNeasy Plant Mini Kittel vontuk ki. A 'Gönci magyarkajszí', 'Preventa', 'VN-1' és 'Pipacs 1' gyümölcsök héj- és hússzövetéből forró

bórsavas extrakció segítségével izoláltuk az RNS-mintákat. A tisztított RNS reverz transzkripciója során mintánként azonos mennyiségű, 1000 ng RNS-t használtunk fel.

3.4. PCR-analízis saját primerekkel

Az NCBI GenBank és EST adatbázisaiból letöltött szekvenciák alapján az alábbi enzimeket kódoló génekre 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* (glicerin-aldehid-3-P-dehidrogenáz). A *PAL* génre a korábban cseresznyére tervezett primerpárt használtuk. A megfelelő mérettel rendelkező PCR-termékeket az agarózgélből izoláltuk, klóztuk és szekvenáltattuk.

3.5. A valós idejű PCR

A klónozás során nyert és az adatbázisokban található szekvenciák alapján valós idejű PCR kísérletekre optimalizált primereket terveztünk. 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. Munkánk során az EvaGreen[®] nem szekvencia-specifikus fluoreszcens festéket használtuk. A genomi DNS szennyeződés befolyásoló hatásának értékelése érdekében PCR és valós idejű PCR kísérletekre alkalmas primereket terveztünk. Hat különböző referenciagén expressziós stabilitását vizsgáltuk a gyümölcsök érése során. A PCR és valós idejű PCR reakciók kísérleti körülményeinek optimalizálását gradiens PCR, az egyes komponensek optimális koncentrációinak meghatározását hígítási mátrixok segítségével végeztük. A valós idejű PCR kísérletek során keletkező adatok kiértékelése során a TOP, valamint PCR-hatékonysági értékeket használtuk fel. Ezen adatokat a REST[®] („Relative Expression Software Tool”) 2009 V2.0.13 program segítségével értékeltük ki. Az adatok kiértékelése során az adatokat illesztettük („data pooling”), így a relatív expressziós értékek nem csupán az érés során, hanem bármely mintasorozatban expressziós értékhez képest is vizsgálhatók.

3.6. Antioxidáns kapacitás mérések

A gyümölcs mintasorozatok antioxidáns kapacitását három különböző mérőmódszerrel; összantioxidáns kapacitás (FRAP), összpolicifénoltartalom mérése (TPC) és trolox ekvivalens antioxidáns kapacitás (TEAC) módszerével határoztuk meg.

3.7. Egyedi komponensek mérése LC-MS módszerrel

A 'Gönci magyarkajszai' és 'Preventa' gyümölcshéj és -hús mintasorozatokban található policifénolos 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.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. A kajszi érési folyamatának jellemzése

A 'Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' kajszifajták gyümölcsseinek érési folyamatát a szín, méret, tömeg és oldható szárazanyag-tartalom változásával jellemeztük.

4.1.1. A gyümölcsök színének változása az érés folyamán

A 'Gönci magyarkajszi' esetén a gyümölcs alapszínének a^* és b^* értékei jól tükrözték a zöld → zöldessárga → sárga → világos narancssárga → 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' gyümölcsseire jellemző a^* és b^* értékek változása hasonlított a 'Gönci magyarkajszi' gyümölcssei esetében mért változáshoz a gyümölcs alap-, fedő- és hússzínében egyaránt. Mindkét genotípus gyümölcsének különböző szöveteiben az érés során az a^* , a b^* és a színtelítettség (C^*) értékek növekvő, míg a színezeti szög (H^0) csökkenő tendenciát mutattak.

4.1.2. A gyümölcsök fejlődését mutató egyéb paraméterek változása az egyes fejlődési állapotokban

Az érés korai szakaszában nagyobb ütemű növekedés figyelhető meg; a két fajta növekedése némileg eltérő üteműnek bizonyult. A kajszi gyümölcs oldható szárazanyag-tartalma folyamatosan növekedett az érés során.

4.1.3. Az antioxidáns kapacitás és összpolicifenol-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 – FRAP, TEAC és TPC (Folin-Ciocalteu) – jellemeztük. A 'Preventa' gyümölcs antioxidáns kapacitása és összfenoltartalma jelentősen meghaladta a 'Gönci magyarkajszi' gyümölcsére jellemző értékeket. A 'Preventa' összfenoltartalma valamennyi korábban vizsgált kajszifajta fenoltartalmát jelentős mértékben meghaladja.

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 magyarkajszai' héjszövetét.

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 magyarkajszai' 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.

4.2. A meggy érési folyamatának jellemzése

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

4.2.1. 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 '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 gyümölcshússal, míg az *Amarella* típusú 'Pipacs 1' gyümölcshúsa csaknem színtelen (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.

4.2.2. A gyümölcsök fejlődését mutató egyéb paraméterek változása az érés során

A vizsgálatok során felhasznált, különböző genotípusú meggy gyümölcsök eltérő érésmenetet mutattak. 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.

4.3. RNS-izolálás kajszi és meggy gyümölcsökből

A vizsgálatokba vont kajszi 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. A kajszi és meggy gyümölcshéjből 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 kíséreltük meg az RNS-oldat tisztítását. Valamennyi protokoll közül a bórsavas extrakció bizonyult a leghatékonyabbnak, így összehasonlító vizsgálatainkhoz ezt használtuk.

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 fenolokkal 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, 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).

4.4. A kajszi és meggy flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítása

A vizsgálat első lépése a kulcsenzimeket kódoló gének teljes vagy részleges DNS-szekvenciájának meghatározása volt. A felhasznált kajszi gyümölcsökből ('Gönci magyarkajszi', '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 kajszi izolatból a referenciagénként használt *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 kajszi *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 kajszi 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.

4.5. A valós idejű PCR kísérletek optimalizálása

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

4.6. Hígítási mátrix

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 MgCl_2 -koncentrációja 3 mM-os. A PCR-oldatokhoz mért MgCl_2 -többlet kismértékben rontotta az amplifikációs hatékonyságot, így az eredetileg meghatározott 3 mM-os MgCl_2 -koncentráció mellett zajlottak a kísérletek.

4.7. 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*, *GAPDH*, *ACT* és *RP-II* gének mutattak stabil expressziót. Marty és mts. (2005) kajszi gyümölcs karotinoid-bioszintézisének vizsgálatokor a valós idejű PCR kísérletekhez szükséges referenciagénnek a 26S riboszómális RNS gént választották. González-Agüero és mts. (2009) a *DAP* (*dehidro-dipikolinát-reduktáz*) gén expressziós stabilitását használták fel a kajszi érése során kialakuló aromakomponensek bioszintézisének vizsgálatához.

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 kajszi, mind a meggy gyümölcsök különböző szöveteiből készült mintasorozatok vizsgálatokor az *RP-II* gént választottuk referenciagénnek. Mivel az összes 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 egybevágtott Hansen és mts. (2010) eredményeivel.

4.8. 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. 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 agarózgélben. 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 amplikon olvadási hőmérséklete nagyobb lesz, mint az intront nem tartalmazó, rövidebb PCR termék olvadási hőmérséklete. A q*LAR*-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 q*LAR*-F1+R1 és q*LAR*-F2+R1 eltérő expressziót mutatnak, vagy a q*LAR*-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 q*ANR*-R2 primer azonban csak az intront nem tartalmazó, vagyis cDNS templátra képes tapadni. A q*ANR*-F1+R1 és q*ANR*-F1+R2 primerpárokkal végzett

valós idejű PCR kísérletek azonos eredményeket mutattak, így a cDNS oldatok nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű genomi DNS-szennyeződést.

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.

4.9. A kajszi flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének expressziós vizsgálata

A ‘Gönci magyarkajszi’ és ‘Preventa’ gyümölcsök relatív génexpresszióinak 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 translációjához 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 génexpressziót: 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*

génexpressziót és flavonoidtartalmat mutatott, mint a ‘Gönci magyarkajszi’ gyümölcshúsa. Ehhez hasonló tendenciáról számoltak be Saud és mts. (2009) számóca 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 különbséért. 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 gyümölcshúsában megállapíthatjuk, hogy a ‘Preventa’ gyakorlatilag valamennyi génre nézve átlagosan négyszeres relatív transzkriptumtartalommal rendelkezik 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’ gyümölcseben a katechin kondenzált tanninok (vagy más vegyületek) keletkezésére használódik fel. A piros héjú ‘Cripps Red’ almafajta gyümölcseben is a nagyobb mértékű *ANR* és *LAR* génexpresszió bizonyult felelősnek a kondenzált tanninok felhalmozódásáért (Takos és mts., 2006).

A ‘Gönci magyarkajszi’ mezokarpiuma átlagosan két-, háromszoros mennyiségben tartalmaz epikatechint a ‘Preventá’-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’ gyümölcseinek nagyobb epikatechin-tartalma 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 enzimei 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 magyarkajszai’ gyümölcshéja. A ‘Gönci magyarkajszai’ héjszövetének pigmentáltsága feltételezhetően annak köszönhető, hogy az *UFGT* transzkriptuma – bár a ‘Preventá’-hoz képest kisebb mennyiségben van jelen – a ‘Gönci magyarkajszai’ *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 magyarkajszai’ – 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 magyarkajszai’-ban. Az antocianin-felhalmozódás idején a CT-szintézis génjeinek transzkriptuma kisebb mennyiségben van jelen (Takos és mts., 2006), mint más flavonoid-bioszintézis gének transzkriptuma. Ez alapján, az alma héjszövetéhez hasonlóan a CT-bioszintézis és az antocianin-bioszintézis a kajszai 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., 1996).

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 héjszöveteiben 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 magyarkajszai’, 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 transzkripció 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 életűek (Singer és Penman, 1973), a termelődött flavonoid komponensek viszont stabilabb molekulák. A gyümölcsök korai érési fázisában a nagy transzkriptum-tartalom eredményeképpen a flavonoid-bioszintézis kulcsenzimeik szintetizálódnak. 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.

4.10. A meggy flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének expressziós vizsgálata

A meggy – a kajszihoz ellentétben – általában a negyedik, ötödik érési fázisban rendelkezik 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 gyümölcsöknek *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. transzkripciós 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* transzkripciós 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 gyümölcsű 'Rainier' fajtaé. MYB transzkripció faktorok antocianin-bioszintézist szabályozó szerepét több gyümölcsfaj esetében igazolták (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 genisztein-tartalmát mutatták ki (Abrankó és mts., 2011b), ezért a közeljövőben érdekes kutatási terület lehet az izoflavonoidok bioszintézisének vizsgálata meggyfajtákban.

4.11. A kajszi néhány polifenolos komponensének azonosítása

HPLC-ESI(Q)TOF MS kapcsolt rendszer alkalmazásával meghatároztuk a kajszi fő flavonoid komponenseit és azok relatív mennyiségét. A 'Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' gyümölcsökben kvercetin-hexozid, rutin és naringenin-hexozid (első ízben mutattuk ki kajsziiban) mellett katechin és epikatechin komponenseket találtunk legnagyobb mennyiségben.

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 kajszi fajták gyümölcsében mérhető polifenolos vegyületek (hidroxifahéjsav-származék, 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 magyarkajszi' és 'Preventa' gyümölcsében kimutatott tendenciával.

A katechin és az epikatechin erős antioxidánsok (Meyer és mts., 1998). A 'Preventa' gyümölcsök mezokarpiumában nagy relatív katechin-tartalmat sikerült kimutatnunk. A 'Gönci magyarkajszi' gyümölcsök mezokarpiumában az epikatechin-tartalom mutat nagy mennyiséget. A 'Preventa' gyümölcsök mezokarpiumának relatív katechintartalma több mint kétszerese a 'Gönci magyarkajszi' gyümölcsök mezokarpiumában mért relatív epikatechin-

tartalomnak. Ez a különbség hasonlít a gyümölcshús antioxidáns kapacitásában kimutatott különbséghez. A 'Preventa' nagy antioxidáns kapacitása – legalább részben – a gyümölcshús nagyobb katechintartalmának köszönhető, ami a flavanol-bioszintézisben résztvevő gének nagyobb mértékű expressziójának következménye.

A 'Gönci magyarkajszi' és 'Preventa' gyümölcsök héjszöveteinek kvercetin-hexozid, rutin és naringenin-hexozid tartalma közel azonos. A 'Gönci magyarkajszi' héjszöve az érés során először tíz-, majd ötször nagyobb mennyiségben tartalmaz epikatechint, mint a 'Preventa'. Az érett 'Preventa' gyümölcsök héjszöve háromszoros, gyümölcshéja tizenkétszeres katechin-tartalommal rendelkezik a 'Gönci magyarkajszi'-hoz képest.

A kajszi gyümölcsben azonosított polifenolos vegyületeknek szerepe lehet az egészségmegőrzés 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.

Doktori munkám során elsőként azonosítottuk azokat a géneket, melyek nagy valószínűséggel a kajszi 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.

5. 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 kapacitással 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.

IRODALOMJEGYZÉK

- 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.
- 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.
- 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.
- Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996): Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.*, 32: 565-569.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hansen, K. D., Brenner, S. E., Dudoit, S. (2010): Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Res.*, 38: e131.
- 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.
- Jaakola, L., Määttä, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Papp, N., Szilvássy, B., Abrankó, L., Szabó, T., Pfeiffer, P., Szabó, Z., Nyéki, J., Ercisli, 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.
- 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.
- 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.
- Singer, R. H., Penman, S. (1973): Messenger RNA in HeLa cells: Kinetics of formation and decay. *J. Mol. Biol.*, 78: 321-334.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wong, M. L., Medrano, J. F. (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39: 75-85.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Impaktfaktoros folyóiratcikk

- 1) Papp, N., Szilvássy, B., Abrankó, L., Szabó, T., Pfeiffer, P., Szabó, Z., Nyéki, J., Ercisli, 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. Technol.* 45(2): 395–402. **IF 1,123**
- 2) 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. **IF 0,67**
- 3) Pfeiffer, P., Hegedűs, A. (2010): Review of the molecular genetics of flavonoid biosynthesis in fruits. *Acta Aliment.*, 40(Suppl.): 150–163. **IF 0,379**

Nem impaktfaktoros idegennyelvű folyóiratcikk

- 1) Pfeiffer, P., Halász, J., György, Z., Pedryc, A., Hegedus, A. (2009): Optimization of RNA isolation from stone fruits at different ripening stages. *International Journal of Horticultural Science*, 15: 101–104.

Nem impaktfaktoros magyar nyelvű folyóiratcikk

- 1) Kordás, T., Pfeiffer, P., Hegedűs, A. (2010): A csonthéjas gyümölcsök polifenolos vegyületeinek bioszintézisében szerepet játszó *anr* gén vizsgálata. *Kertgazdaság*, 42(3–4): 155–161.
- 2) Pfeiffer, P., Szikriszt, B., Hegedűs, A. (2012): Valós idejű PCR alkalmazása a növénybiológiai kutatásokban. *Kertgazdaság*, (in press)

Magyar nyelvű konferencia-kiadványok (full paper)

- 1) Pfeiffer P., Hermán R., Pedryc A., Hegedűs A. (2009): RNS-kivonás optimalizálása különböző érettségű kajszi, őszibarack és meggy gyümölcsökből. *Hagyomány és haladás a növénynevelésben (A XV. Növénynevelési Tudományos Napok proceedings-kötete)*, Veisz O. (szerk.), MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési bizottsága, Budapest, 2009. március 17. ISBN 978-963-508-575-0, pp. 392–396.
- 2) Hegedűs A., Pfeiffer P., Pedryc A., György Zs., Halász J. (2009): A kajszi gyümölcs flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítása. *Hagyomány és haladás a növénynevelésben (A XV. Növénynevelési Tudományos Napok proceedings-kötete)*, Veisz O. (szerk.), MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési bizottsága, Budapest, 2009. március 17. ISBN 978-963-508-575-0, pp. 189–193.

Idegennyelvű konferencia-összefoglaló (abstract)

- 1) Hegedűs, A., Papp, N., Pfeiffer, P., Abrankó, L., Hermán, R., Pedryc, A., Blázovics, A., Stefanovits-Bányai, É. (2009): Antioxidant characterisation of perspective apricot hybrids. *Acta Biol. Szeged.*, 53 (Suppl. 1): 46–47.
- 2) Papp, N., Szilvássy, B., Pfeiffer, P., Balogh, E., Szabó, T., Nyéki, J., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2009): Genotypic, seasonal and maturity stage variability in antioxidant capacity of stone fruits. *Acta Biol. Szeged.*, 53(Suppl. 1): 63.
- 3) Papp, N., Szilvássy, B., Pfeiffer, P., Szabó, T., Szabó, Z., Nyéki, J., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2009): Hungarian sour cherries are fruits beyond the berries: identification of genotypes with outstanding antioxidant power. 6th International Cherry Symposium, November 15-19, 2009, Reñaca- Viña del Mar, Chile. Abstract book, p. 65.
- 4) Hegedűs, A., Papp, N., Pfeiffer, P., Abrankó, L., Nyéki, J., Szabó, T., Pedryc, A., Stefanovits-Bányai, É., Szabó, Z. (2010): A huge genetic potential is available for health-related uses of stone fruits. 6th International Congress on Pigments in Food, June 20-24, 2010, Budapest, Hungary. Proceedings book, p. 95. ISBN: 978-963-9970-04-5.
- 5) Pfeiffer, P., Pedryc, A., Papp, N., Abrankó, L., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2011): Molecular genetics of the flavonoid biosynthesis in two apricot genotypes. XV International Symposium on Apricot Breeding and Culture, 20–24 June 2011, Yerevan, Armenia. Abstract book, 1 page.

Nemzetközi konferencia (full paper)

- 1) Pfeiffer, P., Pedryc, A., Papp, N., Abrankó, L., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2012): Molecular genetics of the flavonoid biosynthesis in two apricot genotypes. *Acta Hort.* (in press)

Magyar nyelvű konferencia-összefoglaló

- 1) Pfeiffer P., Hermán R., Pedryc A., Hegedűs A. (2009): RNS-kivonás optimalizálása különböző érettségű kajszi, őszibarack és meggy gyümölcsökből. XV. Növénynevelési Tudományos Napok, 2009. március 17., Összefoglalók (Szerk.: Veisz, O.), MTA, Budapest, p. 118.
- 2) Hegedűs A., Pfeiffer P., Pedryc A., György Zs., Halász J. (2009): A kajszi gyümölcs flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítása. XV. Növénynevelési Tudományos Napok, 2009. március 17., Összefoglalók (Szerk.: Veisz, O.), MTA, Budapest, p. 82.
- 3) Hegedűs A., Papp N., Pfeiffer P., Stefanovits-Bányai É., Pedryc A., Gutermuth Á., Hermán R., Halász J. (2009): Gyümölcsfajok biokémiai és molekuláris kutatásának legújabb eredményei. Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, Gyümölcstudományi Szekció, Budapest, október 28-30. Előadás és poszter összefoglaló, p. 166–167. ISBN 978-963-503-397-3.

- 4) Papp N., Pfeiffer P., Hermán R., Nyéki J., Szabó Z., Szabó T., Stefanovits-Bányai É., Hegedűs A. (2009): Csonthéjas gyümölcsök beltartalmi és funkcionális értékének összehasonlító elemzése. Lippay János–Ormos Imre–Vas Károly Nemzetközi Tudományos Ülésszak, Gyümölcsstudomány Szekció, okt. 28–30. Előadás és poszter összefoglaló, ISBN 978-963-503-397-3, pp. 204-205.
- 5) Pfeiffer P., György Zs., Hermán R., Halász J., Hegedűs A. (2009): A kajszi és meggy flavonoid bioszintézisének molekuláris vizsgálata: módszerfejlesztés és kezdeti eredmények. Lippay János–Ormos Imre–Vas Károly Nemzetközi Tudományos Ülésszak, Gyümölcsstudomány Szekció, okt. 28–30. Előadás és poszter összefoglaló, ISBN 978-963-503-397-3, pp. 206-207.
- 6) Papp, N., Szilvássy, B., Pfeiffer, P., Balogh, E., Szabó, T., Szabó, Z., Nyéki, J., Stefanovits-Bányai, É., Hegedűs, A. (2009): Csonthéjas gyümölcsök antioxidáns kapacitásának variabilitása a genotípus, évjárat és érési állapot függvényében. A Magyar Szabadgyök-kutató Társaság 5. Munkaértekezlete, 2009. aug. 27–29., Szeged. Előadás és poszter összefoglaló, E21. 35.
- 7) Hegedűs, A., Papp, N., Pfeiffer, P., Abrankó, L., Hermán, R., Pedryc, A., Blázovics, A., Stefanovits-Bányai, É. (2009): Perspektivikus kajszihibridek antioxidáns kapacitásának értékelése. A Magyar Szabadgyök-kutató Társaság 5. Munkaértekezlete, 2009. aug. 27–29., Szeged. Előadás és poszter összefoglaló, P04. 47.
- 8) Pfeiffer, P., Kordás, T., György, Zs., Halász, J., Hermán, R., Pedryc, A., Hegedűs, A. (2010) Csonthéjas gyümölcsök flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítása és expressziós vizsgálata (A XVI. Növénynevelési Tudományos Napok proceedings-kötete), Veisz O. (szerk.), MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési bizottsága, Budapest, 2010. március 11., p. 115.
- 9) Pfeiffer, P., Hegedűs, A. (2011): A kajszi gyümölcs flavonoid-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítása és expressziós vizsgálata. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, 2011. április 27., Összefoglalók (Szerk.: Óvári, J.), BCE, KeTK, Budapest, p. 44. ISBN 978-963-08-1235-1.

Ismeretterjesztő cikk:

- 1) Kordás, T., Pfeiffer, P., Hegedűs, A. (2010): A színek sokrétű szerepe. Kertészet és Szőlészet, 59(30):16–18.

Előadás konferencia-kiadvány nélkül:

- 1) Pfeiffer P., György Zs., Halász J., Hegedűs A. (2009): Csonthéjas gyümölcsök flavonoid bioszintézisének molekuláris vizsgálata. „Modern kutatások a kertészettudományban” című kutatói szakmai nap, Budapesti Corvinus Egyetem, 2009. május 13. Előadás.

- 2) Hegedűs, A., Papp, N., Pfeiffer P., Stefanovits-Bányai É., Szabó T., Nyéki J., Szabó Z. (2010): Régi és új meggyfajták: régi és új lehetőségek. A meggytermesztés fejlesztésének lehetőségei. Újfehértó 2010. június. 30. Előadás.

5.1 EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Nem impaktfaktoros magyar nyelvű folyóiratcikk

- 3) Pfeiffer P., Deák, T. (2009): DNS-izolálás optimalizálása és ITS szekvenciák Cell polimorfizmusának vizsgálata különböző rózsza fajoknál. Kertgazdaság, 41: 65–73.