



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Antociánosodó paprika genotípusok összehasonlító analitikai és  
genetikai vizsgálata az érés során

Kovács Zsófia

Gödöllő

2023

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Növénytudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Növénytermesztés- és Kertészettudományok

**vezetője:**

**Dr. Helyes Lajos**

egyetemi tanár, az MTA doktora

MATE

Kertészettudományi Intézet

Zöldség és Gombatermesztési Tanszék

**Témavezetők:**

**Dr. Veres Anikó**

Egyetemi docens, PhD

MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet

**Dr. Szőke Antal**

Egyetemi docens, PhD

MATE, Genetika és Biotechnológiai Intézet

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezetők jóváhagyása

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	6
2. Célkitűzések .....	7
3. Irodalmi áttekintés.....	8
3.1. A <i>Solanaceae</i> család.....	8
3.2. A <i>Capsicum</i> nemzetség .....	8
3.3. A paprika bogyó színét meghatározó másodlagos anyagcseretermékek.....	10
3.3.1. Karotinoidok.....	10
3.3.2. Klorofilok.....	16
3.3.3. Antociánok .....	18
3.4. Az antocián bioszintézis struktúrális génjei .....	19
3.5. Az antocián bioszintetikus útvonal szabályozása.....	23
3.6. Az antocián bioszintézis szabályozása a <i>Capsicum</i> nemzetségben.....	25
3.7. Az antocián bioszintézisre ható egyéb exogén és endogén tényezők.....	29
3.8. A paprika biológiailag aktív fitonutriens vegyületei .....	30
3.9. A paprika antioxidáns kapacitását befolyásoló tényezők .....	32
4. Anyag és módszer .....	35
4.1. Kísérletek rövid bemutatása .....	35
4.2. Általános protokollok .....	35
4.2.1. A vizsgálatokhoz használt növényanyag.....	35
4.2.2. Mintaelőkészítés.....	38
4.2.3. Totál Monomer Antocianin tartalom (TMA) meghatározás .....	39
4.2.4. Totál Polifenol tartalom (TPC) meghatározás .....	39
4.2.5. Antioxidáns kapacitás meghatározás Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) módszerrel .....	40
4.2.6. Totál Flavonoid tartalom (TFC) meghatározás .....	40
4.2.7. Totál Karotinoid tartalom (TC) meghatározás .....	40
4.2.8. Kataláz (CAT) enzimaktivitás meghatározás.....	40

4.2.9. Peroxidáz (POD) enzimaktivitás meghatározás.....	41
4.2.10. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimaktivitás meghatározás .....	41
4.2.11. Relatív génexpressziós vizsgálatok.....	41
4.2.12. A növényi minták genotipizálása.....	43
4.2.13. Oldható szárazanyag tartalom (SSC) és pH érték mérés .....	45
4.2.14. A színárnyalatok meghatározása.....	46
4.2.15. Statisztikai módszerek.....	46
4.3. Az egyes vizsgálatok részletes leírása.....	46
4.3.1. Antociánosodó nemesítési vonalak genotipizálása .....	46
4.3.2. LINE-1 retrotranszpozon inszerció hatása az antocián bioszintézisre.....	47
4.3.3. CaMYBa vírus indukálta géncsendesítése (VIGS).....	48
4.3.4. Beltartalmi mutatók, enzimaktivitás és antocián bioszintézis változása a termésérés során.....	50
4.3.5. Paprika extraktumok antimikrobiális hatása .....	50
5. Eredmények és értékelésük.....	52
5.1. Antociánosodó nemesítési vonalak genotipizálása .....	52
5.2. LINE-1 retrotranszpozon inszerció hatása az antocián bioszintézisre .....	58
5.2.1. F <sub>1</sub> nemzedék vizsgálatai.....	58
5.2.2. F <sub>2</sub> nemzedék vizsgálatai.....	61
5.3. A <i>Ca10g11650</i> gén vírus indukálta géncsendesítése .....	69
5.4. A beltartalom és génexpresszió változása a termésérés során .....	71
5.4.1. A termékek antocián tartalma.....	72
5.4.2. A termékek totál polifenol tartalma.....	74
5.4.3. A termékek antioxidáns kapacitása .....	74
5.4.4. A termékek totál flavonoid tartalma.....	75
5.4.5. A termékek totál karotinoid tartalma.....	75
5.4.6. Enzimatis antioxidáns aktivitás.....	76
5.4.7. A termékek fitonutriens összetétele és antioxidáns kapacitása közti korreláció....	77

5.4.8. Antocián bioszintézisben szerepet játszó gének expressziójának változása az érés folyamán.....	79
5.5. A paprika extraktumok antimikrobiális hatásának vizsgálata .....	84
5.6. A beltartalmi mutatók és génexpressziós adatok összegzése az érés során .....	89
6. Következtetések és javaslatok .....	93
7. Új tudományos eredmények.....	95
8. Összefoglalás.....	96
9. Summary .....	98
10. Mellékletek.....	100
M1. Irodalomjegyzék.....	100
M2. Antociánossági mutató .....	114
M3. Génexpressziós vizsgálatok eredményei.....	115
11. Köszönetnyilvánítás .....	121

## Rövidítések jegyzéke

**3GT/5GT** – 3/5-O-glikozil-transzferázok

**4CL** – 4-kumaroil-CoA-ligáz

**AFLP** – Amplified Fragment Length

Polymorphism

**ANI** – bHLH transzkripciósi faktort kódoló gén

**ANII** – WD40 transzkripciósi faktort kódoló gén

**AN2** – Anthocyanin2, R2R3-MYB transzkripciósi faktort kódoló gén

**ANP** – Antocianin-permeáz

**ANS** – Antocianidin-szintáz

**ANT1** – Anthocyanin1, R2R3-MYB transzkripciósi faktort kódoló gén

**As** – Aszkorbinsav

**asx** – antocián-mentes ‘Soroksári’ típus

**BÉ** – biológiailag érett termés, 60 nappal terméskötés után

**C4H** – Cinnamát-4-hidroxiláz

**Ca10g11650** – paprika antocián bioszintézisét befolyásoló R2R3-MYB transzkripciósi faktort kódoló gén (szin.: *CaAN2*, *CaMYB*)

**Ca10g11690** – paprika antocián bioszintézisét befolyásoló R2R3-MYB transzkripciósi faktort kódoló gén (szin.: *CaP*, *CaAN3*)

**Ca10g11710** – paprika antocián bioszintézisét befolyásoló R2R3-MYB transzkripciósi faktort kódoló gén

**CAPS** – Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

**CAT** – kataláz

**CHI** – Chalkon-izomeráz

**CHS** – Chalkon-szintáz

**Chy2** –  $\beta$ -karotin-hidroxiláz 2

**CrtZ** –  $\beta$ -karotin hidroxiláz

**CCS** – Kapszantin-kapszorubin-szintáz

**DFR** – Dihidroflavonol-4-reduktáz

**DPL** – Deep Purple petúnia antocián bioszintézisét szabályozó R2R3-MYB transzkripciósi faktort kódoló gén

**dw** – száraztömeg

**EBG** – antocián bioszintézis korai struktúrgénjei

**F3'5'H** – Flavonoid-3', 5'-hidroxiláz

**F3'H** – Flavonoid-3'-hidroxiláz

**F3H** – Flavanon-3-hidroxiláz

**FRAP** – Antioxidáns kapacitás

**fw** – friss tömeg

**Ga** – Galluszsav

**GÉ1** – gazdaságilag érett termés, 20 nappal terméskötés után

**GÉ2** – gazdaságilag érett termés, 30 nappal terméskötés után

**GLK2** – Golden-2 gén

**GST** – Glutathion-S-transzferáz

**iPBS** – inter Primer Binding Site

**JAF13** – bHLH transzkripciósi faktort kódoló gén

**K** – kormos fázis, 40 nappal terméskötés után

**LB** – Luria-Bertani táptalaj

**LBG** – antocián bioszintézis kései struktúrgénjei

**Lcyb** – Likopin  $\beta$ -cikláz

**Leb** – gazdasági érettségben lila termés  
**Leb-s** – gazdasági érettségben csíkosan lila termés  
**LTR** – hosszú terminális ismétlődés  
**MBW** – MYB, bHLH és WD fehérjék alkotta transzkripció faktor komplex  
**MSAP** – Methylation Sensitive Amplified Polymorphism  
**NBT** – nitrokék-tetrazolium-klorid  
**OMT** – O-metiltranszferáz  
**PAL** – Fenilalanin ammónia-liáz  
**PAO** – Feoforbid-a-oxigenáz  
**pax** – részlegesen antocián-mentes  
**PHZ** – Purple Haze, petúnia antocián bioszintézisét szabályozó R2R3-MYB transzkripció faktor kódoló gén  
**POD** – peroxidáz  
**PRR2** – Pseudo-Response-Regulator-2  
**PSY** – Fitoén-szintáz  
**PVP** – Polivinil-pirrolidon  
**Qe** – Kvercetin  
**QTL** – mennyiségi jellegeket meghatározó lokuszok  
**RT** – Ramnozil-transzferáz  
**SGR** – Stay Green gén  
**SNP** – egy nukleotidot érintő polimorfizmus  
**SOD** – szuperoxid-dizmutáz  
**SSR** – Simple Sequence Repeat  
**tARMS** – tetra Amplification-Refractory Mutation System  
**TC** – Totál Karotinoid Tartalom  
**TFC** – Totál Flavonoid Tartalom  
**TMA** – Totál Monomer Antocianin Tartalom

**TPC** – Totál Polifenol Tartalom  
**TRV** – Tobacco Rattle Virus  
**UFGT** – UDP-glükóz-flavonoid 3-glükozil-transzferáz  
**upp** – felálló jellegű paprika  
**UTR** – Untranslated Region  
**VIGS** – Vírus indukálta géncsendesítés  
**wwb** – 'wall white berry', gazdasági és biológiai érettségben is fehéren maradó jellegű paprika

## 1. Bevezetés

A *Solanaceae* családba tartozó paprika (*Capsicum annuum* L.) egyike a legszélesebb körben termesztett zöldségeknek. A friss fogyasztásra termesztett paprikák nemcsak hazánkban, de a környező országokban is kiemelkedően fontosak mindennapi táplálkozásunk során. A termék piaci értékét számos tényező befolyásolja, például a termések alakja, íze és csípőssége. Mindezek mellett, a színe is fontos értékmérő tulajdonság. Érése során a paprika termése különböző színű lehet a benne felhalmozott pigmentektől függően, így a *Capsicum* család egy nagyszerű modell a termés színének kialakításában fontos szerepet játszó másodlagos anyagcseretermékek bioszintetikus útvonalainak tanulmányozására.

A *Capsicum* fajokban számos fitonutriens vegyület található, melyek az emberi szervezetre pozitív hatással bírnak, illetve rendelkeznek bizonyos fokú antioxidáns kapacitással, ilyenek például a termések színét kialakító pigmentek, a klorofillek, karotinoidok és antociánok. Ezek közül is, az antociánok jótékony hatását már több évtizede felismerték, és igazolták többek közt az oxidatív stressz elleni védelem, antioxidáns kapacitás, antimikrobiális aktivitás, gyulladáscsökkentő szerep, szív és érrendszer védelme, neurodegeneratív betegségek elleni védelem területén.

A közelmúltban tapasztalható trendek alapján a fogyasztók egyre tudatosabban fordulnak az úgynevezett funkcionális élelmiszerek piaca felé, azaz olyan élelmiszereket keresnek, melyek az élvezeti értékükön túl egészségvédő szereppel is bírnak. A paprika beltartalmi értékeit tekintve minden ilyen fogyasztói igényt ki tud elégíteni, hiszen a C-vitamin tartalma és karotinoid felhalmozása az egyik legmagasabb a gyümölcsök és zöldségek közt, illetve a burgonyafélék családján belül végzett összehasonlítás alapján a totál polifenol mennyisége is kiemelkedő. Ha ezeket az egyébként is kedvező beltartalmi mutatókat az antociánok additív hatásával kombináljuk, akkor a paprika valóban szuper élelmiszernek, vagy a manapság gyakran használt kifejezéssel élve „super food”-nak tekinthető.

Liluló fajtákat eddig főleg csak a díszítő értékük miatt termesztettek, így a friss fogyasztásra szánt paprikák közt kevés az antociánt felhalmozó fajta, és ezeknek a többsége az érés előrehaladtával elveszti az antocián tartalmát. Ezért fontos ennek a bioszintetikus útvonalnak a pontosabb megismerése, szabályozásának vizsgálata. Hazánkban a paprikatermesztés évszázados múltra tekint vissza, olyan nemesítők gyűjteményeiben, mint Csilléry Gábor, a különböző mértékben antociánosodó mutánsok tárháza található, melyek beltartalmi adatainak és genetikai vizsgálatainak összehasonlítása jó alapot biztosíthat a paprika funkcionális élelmiszerként történő nemesítésére.



## 2. Célkitűzések

A kutatások során az alábbi célokat tűztem ki:

- Az antocián bioszintetikus útvonal szabályozásának vizsgálata az érés folyamán különböző mértékben liluló paprika fajok, fajták és nemesítési vonalak generatív és vegetatív szöveteiben.
- Az antocián bioszintézis szabályozásban szerepet játszó transzkripciós faktorok és a bioszintetikus útvonalban szereplő struktúrgének kapcsolatának elemzése.
- Az antociánosodó paprika genotípusok beltartalmi mutatóinak vizsgálata az érés folyamán, különös tekintettel a termések polifenolos összetevőire.
- Az antociános paprikák antimikrobiális hatásának vizsgálata.
- A paprika antocián bioszintézisét befolyásoló genotípus-környezet-fenofázis interakció meghatározása.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A *Solanaceae* család

A *Solanaceae* (burgonyafélék) családjába számos kiemelkedő jelentőséggel bíró kertészeti – paradicsom (*Solanum lycopersicum*), paprika (*Capsicum spp.*), padlizsán (*Solanum melongena*) –, szántóföldi – burgonya (*Solanum tuberosum*), dohány (*Nicotiana spp.*) –, gyógynövény (*Withania, Datura*), illetve dísznövény (*Physalis, Petunia*) tartozik. A több mint 3000 fajjal bíró *Solanaceae*, gazdasági szempontból a harmadik legfontosabb növény család (Wang et al., 2008).

A család tudományos szempontból is jelentős, hiszen a nagyfokú fenotípusos változatosság ellenére, a család közel minden tagja 12 alap kromoszóma számmal rendelkezik, melyeknek elrendeződése ráadásul nagyfokú szinténiát mutat (Rinaldi et al., 2016). A család prominens képviselői genetikai modellnövényként szolgálnak akár a különböző bioszintetikus utak (antocián bioszintézis – petúnia, karotinoid bioszintézis – paradicsom, paprika), akár a termésérés (paprika, paradicsom) tanulmányozására (Dhar et al., 2015; Wang et al., 2008). Ez a kolinearitás számos lehetőséget tartogat a kutatóknak a genetikai erőforrások kiaknázására a fontosabb agronómiai tulajdonságok vonatkozásában. Ilyen értékmérő tulajdonság lehet a termés alakja, mérete, színe és kedvező beltartalmi értékek megléte (Lightbourn et al., 2008).

A burgonyafélék több gazdasági szempontból fontos faja, mint paradicsom, burgonya, paprika és tojásgyümölcs, mutat különböző mértékű és szövet specifitású antocián felhalmozódást (De Jong et al., 2004). Ugyanakkor, míg a burgonya gumó esetében az antociánok jelenléte az érés folyamán állandó, addig a paprika terméseiben mennyiségük az érés előrehaladtával csökken. Az antociánok a polifenolos vegyületek családjához tartozó antioxidáns kapacitással bíró színyanyagok (Holton és Cornish, 1995). Az antociánok mellett ezek a zöldségnövények sok más preventív faktorként funkcionáló fitonutriens vegyülettel, illetve a gyógyszeripar által is használt alkaloidákkal rendelkeznek. Egyik legismertebb alkaloida a *Capsicum* génsz képviselőire jellemző szintén antioxidáns kapacitású kapszaicin.

#### 3.2. A *Capsicum* nemzetség

A *Capsicum* génsz valamennyi faja az Amerikai kontinensről származik. Annak ellenére, hogy teljes egyetértés nincs a nemzetség pontos eredetét illetően, a legtöbb kutató Dél-Brazíliába írja le a géncentrumot, ugyanakkor a paprika fajok Mexikótól Argentínáig vadon előfordulnak (Bosland, 1996; Eshbaugh, 2012; Pickersgill, 1997). Nem csak az egzakt eredetük, de a nemzetséghez tartozó fajok száma sincs pontosan meghatározva. A különböző

csoportosítások alapján 25-36 fajt ismer el a tudomány, de a közelmúltban történt felfedezések hatására a *Capsicum* nemzetséghez tartozó fajok száma meghaladhatja akár a negyvenet is (Bosland, 1996; Csilléry, 2006; Eshbaugh, 2012; Ibiza et al., 2012; Kraft et al., 2014). Az öt termesztésbe vont faj domesztikációja egymástól függetlenül történt Közép-, és Dél-Amerikában Kr.e. 5000-6000 közt, így a paprika az Amerikai kontinens egyik legkorábban házasított faja (Aguilar-Melédez et al., 2009; Perry et al., 2007; Pickersgill, 2007; Qin et al., 2014). A *C. annuum* és *C. frutescens* domesztikációja Mexikóban, illetve Közép-Amerikában történt, míg a *C. baccatum* és a *C. pubescens* fajokat Dél-Amerikában – Brazília, Bolívia, Argentína – házasították (Aguilar-Melédez et al., 2009; Pickersgill, 2007). Nevével ellentétben a *C. chinense* domesztikációja szintén Dél-Amerikában, az Amazonas medencében történt (Csilléry, 2006). Ezek közül a világszerte termesztett *C. annuum* a legtöbb fajtát magába foglaló faj.

A termesztésbe vonást követően a paprika jelentős morfológiai változásokon ment keresztül. A *C. annuum* domesztikációja során bekövetkezett két legfontosabb változás, hogy a termések a betakarításig nem hullanak le, illetve megjelent a csüngő terméstípus is. Ez a változás a gyümölcsméret növekedését is eredményezte (Paran és van der Knaap, 2007). A házasítás során több más apróbb változás is történt, pl. csökkent a termés csípőssége, a termésméret növekedése mellett annak alakja is megváltozott. Míg a vad típusra főleg a gömbölyű termésalak jellemző, a domesztikáció során a hosszúkás, kúpos, blocky, hosszú hegyes és egyéb változatok is kialakultak (Paran és van der Knaap, 2007; Taitano et al., 2019). Másik szembevető változás, hogy míg a vad típusra csak a piros biológiailag érett termésszín volt a jellemző, addig a szelekció során kialakultak a sárga, fehér, barna és lila színváltozatok is (Paran és van der Knaap, 2007).

A manapság kereskedelmi forgalomban kapható fajták termésének színe nagyon változatos, piros, narancssárga, sárga, zöld, fehér, barna, lila, valamint fekete is lehet. A lila színváltozatú fajták az antocián pigmentek felhalmozódásának köszönhetőek. Az antociánok szerepet játszanak a növény sikeres reprodukciós stratégiájában, biotikus és abiotikus stresszválaszaiban, patogének elleni védelemben. Az emberi szervezetre gyakorolt pozitív hatásukat számos kutatás támasztja alá, ilyen módon összefüggésbe hozhatóak az érgyulladás csökkentésével és a trombózis megelőzésével (Gonçalves et al., 2021; Li et al., 2017). Piaci potenciáljuk nagy, hiszen ritkák az ilyen színű zöldségek, viszont termésérés során csakúgy mint a burgonyafélék többsége, a paprika is elveszíti a lila színét teljes biológiai érettségekor (Liu et al., 2018). Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kapnak az úgynevezett „super food”-ok, azaz azok az élelmiszerek, amelyeknek egészségvédő hatása van az emberi szervezetre. Az antociános termések a megnövekedett polifenol tartalmuk révén magasabb antioxidáns kapacitással

bírhatnak, így fontos termékei lehetnek az alternatív élelmiszerek piacának (Paran és Fallik, 2011).

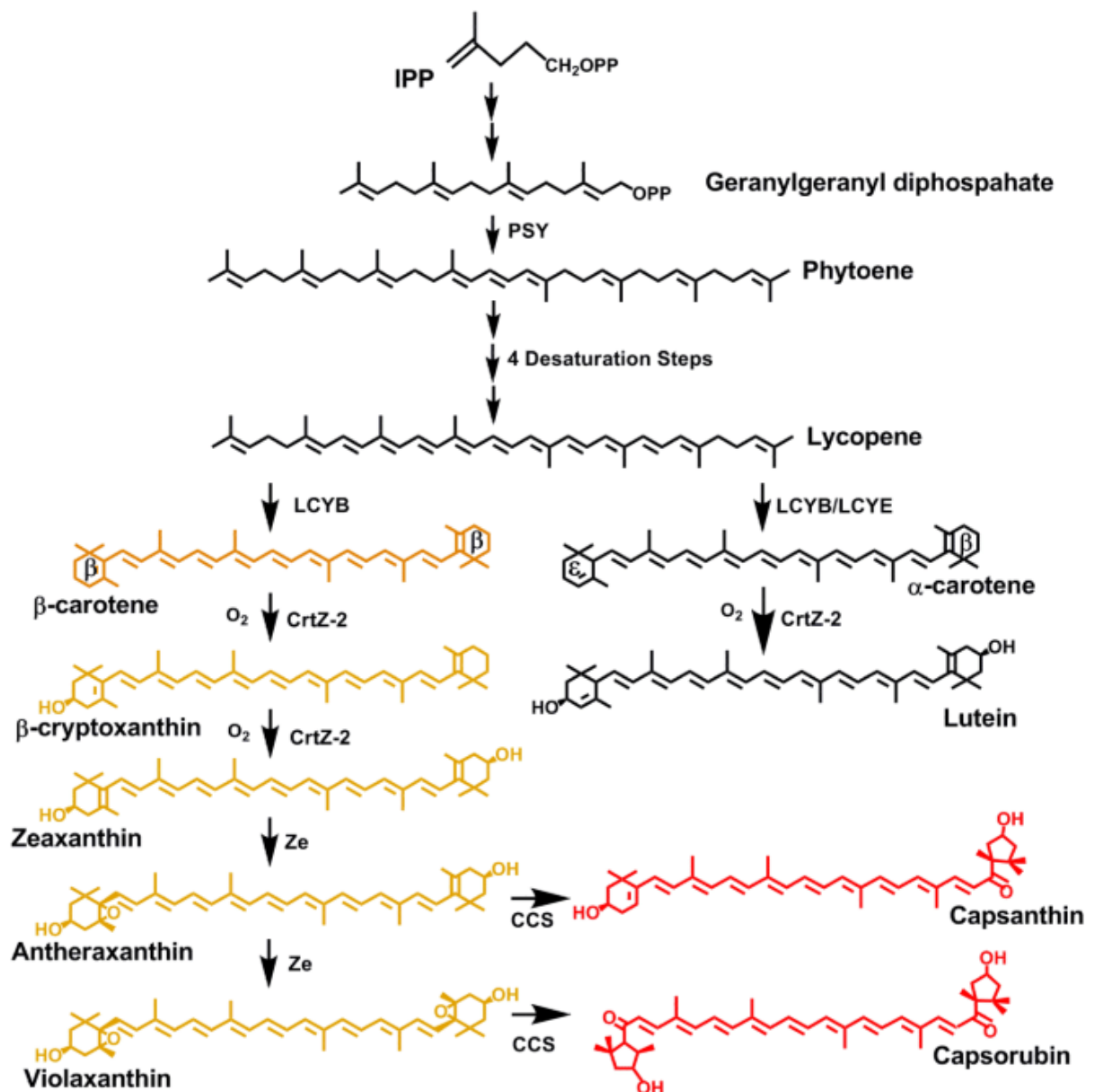
### **3.3. A paprika bogyó színét meghatározó másodlagos anyagcseretermékek**

A paprika termésének színét a klorofill, karotinoid és antocián színanyagok határozzák meg (Aza-Gonzalez et al., 2013). Ezek a pigment molekulák rendre a citoplazmában lévő kloroplasztiszokban, kromoplasztiszokban, illetve vakuólumokban lokalizálódnak. A gazdaságilag érett termés színe az elefántcsont fehértől a zöldig, a lila különböző árnyalataitól egészen a szinte feketéig terjed (Stommel és Griesbach, 2008). Teljes biológiai érettségében pedig a termés színe fehér, sárga, narancssárga és pirosra át akár barna is lehet, illetve néhány fajta esetén lila marad (Li et al., 2013). A *Capsicum* fajoknak ez a termésszín változatossága egy kiváló modellrendszerrel teszi a nemzetséget a különböző bioszintetikus utak tanulmányozására (Paran és van der Knaap, 2007).

#### *3.3.1. Karotinoidok*

A paprika bogyószínét az előbb említett három bioszintetikus útvonal együttese határozza meg. A növények közül a paprika rendelkezik a legfejlettebb karotinoid bioszintetikus útvonallal (Ha et al., 2007). A tetraterpének csoportjába tartozó, zsírban oldódó karotinoidok a bogyók kromoplasztijában halmozódnak fel, ahol hozzájárulnak a vörös, narancs és sárga színének kialakításához. Mennyiségük függ a genetikai háttértől, érettségi állapottól, illetve a termesztési körülményektől. A karotinoidok két csoportra oszthatóak, a csak szénhidrogéneket tartalmazó karotinok, és az oxigént is tartalmazó xantofiliek.

Az érett paprika termés jellegzetes vörös színének fő meghatározói a kapszantin és a kapszorubin molekulák (Rajesh et al., 2011). Ezeken a molekulákon kívül számos más típusú karotinoid is felhalmozódik a gyümölcsökben az érési folyamat során, például:  $\beta$ -karotin, violaxantin, lutein, zeaxantin stb (Ha et al., 2007) (1. ábra).



1. ábra – A *Capsicum* fajok karotinoid és xantofill bioszintézise (Guzman et al., 2010)

Hurtado-Hernandez és Smith úgy vélték, hogy a termések biológiailag érett színét a C1, C2 és Y lókuszok szabályozzák (Hurtado-Hernandez és Smith, 1985). Amennyiben mindhárom lókuszon domináns allél van jelen, úgy a termés biológiai érettségben piros színű lesz. A C2 lókuszt – amelyen a fitoén-szintáz (*PSY*) gén található – tekintik elsősorban a narancssárga termésszín fő lókuszának, azonban a kapszantin-kapszorubin-szintáz (*CCS*) mutációi is vezethetnek narancssárga színeződéshez. A piros termésszín az Y lókusszal és a *CCS*-szintázzal koszegregál, amelyek közül az utóbbi az anteraxantint és a violaxantint vörös pigmentekké, kapszantinná, illetve kapszorubinná alakítja (Lefebvre et al., 1998; Thorup et al., 2000). A C1 lókuszon található gént csak nemrég azonosították, ezt megelőzően azt feltételezték, hogy a karotinoid összetétel megváltoztatása helyett inkább csak azok szintjét befolyásolja. A C1 lókuszon azonosított Pseudo-Response-Regulator-2 (*PRR2*) génjelölt feltételezhetően a

plasztidok kialakításában és a bioszintetikus út szabályozásában játszik szerepet (Jeong et al., 2020; Lee et al., 2020).

Az eddigi kutatások főleg a termésszint befolyásoló monogénes mutációkat érintették, ezen kutatások világítottak rá a narancssárga és a sárga termésszín, valamint a *CCS* különböző mutációi közötti összefüggésekre. Korai kutatások azt feltételezték, hogy az Y lókuszon található *CCS* szabályozza a piros termésszint, és ennek deléciója sárga fenotípust eredményez (Lefebvre et al., 1998). Később, sárga és piros termésű paprikák interspecifikus keresztezéséből származó hasadó populáció vizsgálatakor, egy deléciót írtak le a *CCS* gén 5' végén, amely a sárga fenotípusban hiányzott, de a pirosban jelen volt, ugyanakkor a kódoló régió 3' vége mindkét fenotípusnál egyformán kimutatható volt. Piros és fehér termésű paprikák keresztezése után az F<sub>2</sub> nemzedékben narancssárga egyedek is megjelentek, amelyek hasonlóan a sárga fenotípushoz, a mutáns *CCS* gént hordozták. Ezzel szemben más narancs termésű genotípusokból ki tudták mutatni a vad típusú *CCS* allélt (Popovsky és Paran, 2000).

A *CCS* gén térképezése során a gént a 6. kromoszómára pozícionálták, arra a helyre, ami megfelel a paradicsom B lókusznak, amit a  $\beta$ -karotin hiperakkumulációjával hoztak összefüggésbe. A paradicsom B lókusza a likopin- $\beta$ -cikláz enzimet kódolja, a *CCS* génről is megállapították, hogy rendelkezik ilyen aktivitással (Thorup et al., 2000; Zhang és Stommel, 2000). Lang és munkatársai (2004) egy narancs és egy piros termésű paprika keresztezéséből kapott F<sub>2</sub> populációt vizsgáltak, eredményeik alapján a kódoló régió upstream részében történt deléció, ugyanis a narancs fenotípusban ezt a szakaszt nem tudták kimutatni, csak a piros termésűekben, míg a *CCS* downstream része a narancs és piros termésű egyedekben is konzervált.

Ha és munkatársai (2007) két sárga termésű paprikából is izolálták a teljes *CCS* gént, ugyanakkor expressziós szinten már nem tudták kimutatni. Ennek oka, az egyik genotípusban egy báziscsere a kódoló régió 599. pozíciójában, ami egy korai stop kodont eredményezett, a keletkező csonka fehérje 199 aminosavból áll. A másik vizsgált genotípusban pedig az 1431-es pozícióban egy 8 bázispáros inszerció miatti frameshift mutáció okozott korai transzlációs terminációt, így alakítva ki egy 495 aminosavból álló fehérjét. Így a sárga szín kialakulása nem a *CCS* hiánya, hanem a nonszensz mediálta mRNS lebomlás következménye. Különböző *Capsicum* fajok, mint *C. baccatum*, *C. annuum* és a *C. chinense* promóter és kódoló régiójának szekvenálásakor fajspecifikus különbségeket találtak (Ha et al., 2007; Lefebvre et al., 1998).

Egy másik esetben, egy narancssárga termésű paprikában egy bázis deléciója az 1283 helyen egy korai transzlációs terminációs stophoz vezetett, így alakítva ki egy újabb, csonka variánsát a

*CCS* génnek, a *CCS-3*-at. A vad típusú *CCS* 499 aminosavból áll, míg a csonka variáns csak 423 aminosavat tartalmaz. Ez a genotípus nem halmozott fel sem kapszantin, sem kapszorubint, ugyanakkor a  $\beta$ -karotin szintje megnövekedett. Ezt a magasabb  $\beta$ -karotin tartalmat a paradicsom B lókusza és a *CCS* pozíciója közötti szinténiával magyarázták (Guzman et al., 2010).

A narancs fenotípusú paprikák esetén a *CCS* promóter régiójában 3 SNP-t írtak le, ugyanakkor ezek nem magyarázták az eltérő transzkriptum mennyiségeket. Az egyik vizsgált narancssárga bogyójú genotípusban a vad típusú *CCS* gént találták, amelyről átírat is készült, ugyanakkor fehérje terméket már nem tudták kimutatni. Így a transzkripcionális szabályozás mellett a transláció szintjén történő szabályozás lehetősége is felmerült (Rodriguez-Uribe et al., 2012).

Piros és sárga termésű paprikák *CCS* génjének szekvencia összehasonlítása során az egyik sárga genotípusban két mutációt írtak le. Egyrészt, az 1265. pozícióban egy bázis deléciója miatt kialakult frame shift, a másik pedig az 1095-ös pozícióban egy SNP okozta korai stop kodon – ezt nevezték el *ccs* variánsnak – miatt kialakuló újabb csonka fehérje, amely 364 aminosavból áll. Promóter szekvencia összehasonlítások után fajspecifikus különbségeket találtak. A fajspecifikus különbségek közt egy 176 bázispár hosszú tandem ismétlődő inszerciót is leírtak a promóter régióban 165 bp upstream a transzkripció starttól, ami a *C. annuum* fajnál háromszor, a *C. chinense* esetén négyszer ismétlődik. Ezekben az ismétlődő egységekben, hőmérséklet és fény érzékeny cisz regulátor elemeket találtak, amelyek magyarázhatják a napfény és a magasabb hőmérséklet miatti megnövekedett kapszantin és kapszorubin szinteket. Ugyanebben a kutatásban egy piros és egy sárga termésű *C. annuum* paprika promótere teljesen megegyezett egymással, tehát ez nem magyarázza az eltérő transzkriptum mennyiségeket (Li et al., 2013).

RNS interferenciával bizonyították, hogy a piros termésszínhez nem elég a funkcióképes *CCS* megléte és kifejeződése, hanem a bioszintetikus út egyéb génjeinek (*PSY*, *Lcyb* és *CrtZ*) működése is elengedhetetlen. Amikor a *CCS*, *PSY*, *Lcyb* és *CrtZ* géneket akár egyesével, akár csoportosan csendesítették, nem alakult ki piros szín, mivel a karotin bioszintetikus út köztes metabolitjainak ( $\beta$ -karotin, zeaxantin,  $\beta$ -kriptoxantin) mennyisége csökkent (Tian et al., 2014). Kim és munkatársai narancs és piros termésű paprika keresztezéséből származó hasadó populációt vizsgálva megállapították, hogy a narancsszín egy recesszív gén okozza. A keresztezési partnerek karotin bioszintézisében résztvevő főbb gének vizsgálatakor csak a *CCS* génben találtak különbségeket. Három SNP-t azonosítottak a narancs termésű fajtában, melyek közül az egyik az 1026-os pozícióban egy timin inszerció miatt kialakult korai stop kodon, így a *CCS* fehérje mindössze 370 aminosav hosszú. Ahogy az előzőekben leírt narancs mutánsok, ez a fajta is magasabb  $\beta$ -karotin szintet mutatott, feltehetőleg azért, mert a csonka *CCS* fehérje

likopin- $\beta$ -ciklázként funkcionál és nem CCS-ként, így az ilyen mutációt hordozó genotípusok humán táplálkozási szempontból akár előnyösebbek is lehetnek (Kim et al., 2017b).

A CCS mellett a paprika biológiailag érett termésének a színét meghatározó másik fontos gén a C2 lókuszon található fitoén-szintáz. Huh és munkatársai egy piros termésű *C. annuum* és egy narancssárga *C. chinense* keresztezésével előállított térképezési populációban vizsgálták a piros, illetve narancssárga színnel kapcsolt géneket, lókuszokat. Az F<sub>1</sub> nemzedékben a piros szín volt a domináns a narancs felett, az F<sub>2</sub>-ben a narancsszín a fitoén-szintáz génnel koszegregált. Megállapították, hogy a CCS és a PSY nem azonos kapcsolatsági csoporton van, és nem együtt öröklődik, így azt feltételezték, hogy a PSY alakítja ki a narancsszín a C2 lókuszon (Huh et al., 2001). Egy piros *C. annuum* és egy narancssárga *C. chinense* paprika PSY génjét vizsgálva 12 SNP-t azonosítottak, ezek közül a hatodik exonnál lévő SNP értelmetlen mutációhoz vezetett. Az exon/intron határon lévő A-C báziscsere miatti frame shift egy korai translációs stopot alakított ki, így feltételezhetően a csonka PSY felelős a narancsszín kialakításáért. Visszaállítva a vad típusú gént a termés színe piros lett (Kim et al., 2010). A PSY1 csendesített növényekben is ki tudtak mutatni alacsony szintű karotinoid akkumulációt, feltételezhetően azért, mert a PSY2 gén veszi át a csendesített PSY1 szerepét és biztosít egy minimális karotinoid mennyiséget (Jang et al., 2020). A PSY1-et és a karotinoid bioszintetikus út egyéb kulcsfontosságú génjeit vizsgálva különböző allélvariánsokat találtak, ez magyarázhatja az eltérő mennyiségű és minőségű karotinokat a termésekben (Jeong et al., 2019).

A narancssárga termésszín indukált mutáció eredményeként is kialakulhat. Az EMS által indukált narancssárga termésű mutánst egy piros termésű fajtát használva állították elő. A mutáns a vad típustól eltérő karotinoid mintázatot mutatott; főként  $\beta$ -karotint halmozott fel. A  $\beta$ -karotin-hidroxiláz2 (*Chy2*) génben egy A-G báziscserét azonosítottak a 709-es pozícióban. A mutáns *Chy2* gén koszegregált a narancsszínnel, tehát a CCS-en és PSY1-en túl a *Chy2* is felelős a narancsszín kialakításáért (Borovsky et al., 2013). Egy röntgen mutagenézissel előállított narancssárga mutáns – az *of* mutáns – magas  $\beta$ -karotin akkumulációval rendelkezett, amelyet a paprikában található két  $\beta$ -karotin-hidroxiláz gén közül a *CrtZ* gén 3' terminális régiójában bekövetkezett mutációja okozott (Daskalov, 1986; Petrov et al., 2013). Ezt a mutációt vitték át az 'Albena' fajtába, kialakítva belőle az 'M38' fajtát, amely magas  $\beta$ -karotin szinttel rendelkezett, ami humán táplálkozásban ugyan közvetlenül nem emeli az A vitamin szintet, de hozzájárul a cink és a vas jobb felvételéhez (Tomlekova et al., 2017).



1. táblázat – A karotinoid bioszintézis génjeiben bekövetkezett mutációk és az így kialakult termésszín

Gén	Szín/ Felelős mutáció	Hivatkozás	
Kapszantin-kapszorubin-szintáz <sup>1</sup>	• Sárga termésszín / deléció	Lefebvre et al., 1998	
	• Sárga termésszín / 5' rész deléciója	Popovsky és Paran, 2000	
	• Sárga termésszín / +599. pozícióban bekövetkezett báziscsere miatt kialakult stop kodon	Ha et al., 2007	
	• Sárga termésszín / +1431. pozícióban 8 bázis inszerciója miatti korai translációs termináció	Ha et al., 2007	
	• Narancssárga termésszín / a kódoló régió 5' részének deléciója	Lang et al., 2004	
	• Narancssárga termésszín / +1283 pozícióban egy bázis deléciója miatt kialakult korai translációs terminációs stop, <i>Ccs-3</i> variáns	Guzman et al., 2010	
	• Sárga termésszín/ 2 SNP a +1095 és +1265. pozíciókban, korai stop kodon miatti csonka variáns, <i>ccs</i>	Li et al., 2013	
• Narancssárga termésszín/ 3 SNP, korai stop kodon miatt kialakult csonka variáns	Kim et al., 2017		
Fitoén-szintáz <sup>2</sup>	<i>PSY</i>	• Narancssárga termésszín / exon-intron határon bekövetkezett SNP miatti korai stop kodon	Kim et al., 2010
β-karotin-hidroxláz <sup>3</sup>	<i>Chy2</i>	• Narancssárga termésszín / EMS indukálta mutáció, +709. pozícióban SNP aminosav cserét okoz	Borovsky et al., 2013
	<i>CrtZ</i>	• Narancssárga termésszín / röntgen indukálta mutáció okozta deléció a gén 3' terminális régiójában	Petrov et al., 2013

Jegyzet:<sup>1</sup> az anteraxantint és a violaxantint vörös pigmentekké kapszantinná és kapszorubinná alakítja, <sup>2</sup> 2 molekula geranilgeranil pirofoszfátból szintelen fitoént állít elő, <sup>3</sup> β-karotinból zeaxantint állít elő

Az útvonal szabályozásának teljeskörűbb megértéséhez a bioszintetikus út struktúrgénjeinek a kódoló szekvenciáján túl, a promóter szekvenciák jellemzése is szükséges, de az eddigi kutatások leginkább csak a *CCS* génre fókuszáltak (Ha et al., 2007; Li et al., 2013). Ugyanakkor, ezen a megközelítésen keresztül fel lehetne tárni a bioszintetikus útvonal struktúrgénjei és az őket szabályozó transzkripciós faktorok közötti kölcsönhatásokat (del Rocío Gómez-García és Ochoa-Alejo, 2013; Villa-Rivera et al., 2022). A karotinoid bioszintézist érintő eddig leírt mutációkat és az általuk okozott termésszínt az 1. táblázat foglalja össze.

A termékek karotinoid tartalmát a kromoplasztiszok felépítésével összefüggésben is vizsgálták. Termésérés során a kloroplasztiszok jelentős szerkezeti átalakuláson mennek

keresztül, mire kromoplasztiszokká válnak, melyek a karotinoid bioszintézis elsődleges helyszínei. Kilcrease szerint a karotinoidok összetételbeli különbségei a kromoplasztok változó alakjával és méretével magyarázhatóak (Kilcrease et al., 2013). Bár egy későbbi publikációjukban nem találtak összefüggést a kromoplasztok alakja és a *CCS*, *PSY*, *CrtZ-2* gének expressziója között, ellenben a fibrillin gén expressziója pozitívan korrelált a violaxantin tartalommal, és negatívan a kapszantin tartalommal. A fibrillin az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a piros paprika kromoplasztiszaiban és szorosan kapcsolódik a kromoplasztiszokban található karotinoid-tároló struktúrákhoz (Kilcrease et al., 2015). Amikor a paprikából izolált fibrillin gént túltermeltették paradicsomban, mind a karotinoidok, mind az egyéb karotinoid származékok szintje kétszeresére nőtt (Simkin et al., 2007).

A karotinoidok bioszintézisét nemcsak a genetikai háttér, hanem a megvilágítás és a termesztési módszerek is befolyásolják (Kim et al., 2016; Simkin et al., 2003). A kezdeti  $150 \mu\text{mol/s/m}^2$  fotoszintetikus fontonáram-sűrűség megvilágítást kapó paprika levelekben mért totál karotinoid tartalom  $1,76 \text{ mg/g}$ -ról  $1,34 \text{ mg/g}$ -ra csökkent 48 órás  $280 \mu\text{mol/s/m}^2$  megvilágítás után. Ugyan a karotinoidok folyamatosan termelődtek a megvilágítást kapó szövetekben, de a fotooxidáció következtében egy részük el is bomlott. Ugyanezeket a növényeket 48 órán keresztül  $0,06 \mu\text{mol/s/m}^2$  alatt, sötétben tartva, a totál karotinoid mennyiség  $1,23 \text{ mg/g}$  volt. Génexpressziós vizsgálatokkal bizonyították, hogy a fitoén szintáz (*Psy*) és a fitoén deszaturáz (*Pds*) gének transzkriptumai alig kimutathatóak a sötétben nevelt növények esetén, illetve a  $\zeta$ (zéta) – karotin deszaturáz (*Zds*) és *Lyc-b* gének expressziója is csökkent a fényen tartott növényekhez képest (Simkin et al., 2003). Talajban, illetve talaj nélküli termesztéstechnológiával nevelt növények karotinoid profilját összehasonlítva szignifikáns különbségeket tapasztaltak a két termesztőközegben tartott ugyanazon genotípusok esetén. Az eltérő termesztőközeg a karotinoidok összetételére nem volt hatással, de a különböző vegyületek mennyiségére igen, például a biológiailag aktív hatású zeaxantin mennyisége háromszor akkora a talajban nevelt 'Oranos' paprikában, mint a hidropónikus körülmények közt tartottban (Kim et al., 2016).

### 3.3.2. Klorofillok

A termések gazdasági, és egyes esetekben akár a biológiai érettségének színét meghatározó másik fontos színanyag csoport a klorofillok. Az egyszerű struktúrgének mellett olyan mennyiségi jellegeket meghatározó lókuszokat, azaz QTL-eket, is azonosítottak, amelyek felelősek a termések pigmentációjának változásaiért. A *pc8.1* és a *pc10.1* QTL-ek a gazdaságilag érett termések klorofill tartalmát szabályozzák, ugyanakkor a *pc8.1* hatással volt a biológiailag érett termések karotinoid tartalmára is. Ez a hatás azonban a biológiailag érett termés színre a

következő generációkban nem volt konzisztens. A *pc8.1* a színintenzitást a kloroplasztiszok méretének növekedése révén befolyásolja, így a klorofill tartalom mellett a klorofillhez kapcsolódó tokoferolok és karotinoidok szintjére is hatással volt (Brand et al., 2012). Egy későbbi tanulmányukban a Golden-2 (*GLK2*) gént írják le, mint a *pc10.1* QTL szabályozója. A *pc8.1*-hez hasonlóan a *GLK2* által szabályozott *pc10.1* is a kloroplasztisz kompartment méreteinek növeléséért felelős a termések gazdasági érettségében, ezáltal befolyásolva a klorofill tartalmukat. A *GLK2* null mutációi alacsonyabb klorofill tartalomhoz vezetnek (Brand et al., 2014). A *GLK2* és *PRR2* mellett a *MIP1* és *LOLI* géneket is összefüggésbe hozták a termések klorofill tartalmának variációival (Paran, 2014).

A termések színének intenzitását vizsgálva a Pseudo-Response-Regulator-2 (*PRR2*) transzkripciós faktor magas aktivitást mutatott a paradicsom kormos érésfázisában. Ezt a gént túltermeltetve, mind a plasztidok mérete és száma, mind pedig a pigmenttartalom megnövekedett, így magasabb klorofill és karotinoid szinteket eredményezett a paradicsom éretlen és érett terméseiben. A paradicsom *PRR2* ortológja paprikában a termés színének és ennek intenzitásának szabályozójaként működik. Fehér, illetve zöld színű paprikából izolált *PRR2* szekvenálásakor egy G-A báziscserét találtak, ami a fehér paprikánál egy korai stop kodont eredményezett. Ezt az SNP-t egy hasadó populációban vizsgálva kapcsolatba tudták hozni a paprika gazdaságilag érett színének intenzitásával (Pan et al., 2013). Ezt a gént hozták a későbbiekben összefüggésbe a C1 lókusszal, amely a termések biológiailag érett színének karotinoid összetételét befolyásolja (Jeong et al., 2020; Lee et al., 2020).

A karotinoidok bioszintézisével egyidejűleg a klorofillek katabolizmusa zajlik az érés során. Ennek egyik kulcsfontosságú enzime a feoforbid-oxigenáz, melyet a feoforbid-a-oxigenáz (*PAO*) gén kódol. Ugyanakkor zöld színe a termésnek nem csak gazdasági érettségében lehet, mert a zölden maradó úgynevezett *cl* mutánsok biológiai érettségű terméseiben is jelen vannak a zöld színanyagok (Wang és Bosland, 2006). Spontán kialakult zölden maradó – stay green – mutánsokban a *PAO* génben történt mutáció okozta génaktivitásában bekövetkezett változás volt felelős a fenotípus kialakulásáért (Roca és Mínguez-Mosquera, 2006). A *cl* mutánsok termesei biológiai érettségben is zöldek maradnak, sárgulás csak a teljes érésen túl figyelhető meg, tehát ezekben a mutánsokban a klorofill katabolizmus nem gátolt, csak késleltetett. A *cl* lókuszt a paprika első kromoszómájára térképezték, így nem a *PAO* alakítja ki ezt a fenotípust. Borovsky és Paran (2008) paprikából izolálták a Stay Green (*SGR*) gént. Vad típusú és mutáns növényből származó szekvenciák összehasonlításakor egy T-C báziscserét azonosítottak a 340. pozícióban, ami egy aminosav cseréhez vezetett. Vizsgálataik alapján ez az *SGR* génben történt mutáció okozta a zölden maradó (*cl*) fenotípust (Borovsky és Paran, 2008) (2. táblázat).

2. táblázat – A paprika termésének karotinoid és klorofill bioszintézisben részt vevő génekben bekövetkezett mutáció okozta termésszín változás

Gén	Szín/ Felelős mutáció	Hivatkozás
Pseudo-Response-Regulator-2 <sup>1</sup>	<i>PRR2</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fehér termésszín / G-A báziscsere miatt kialakuló korai stop kodon</li> </ul>	Pan et al., 2013
Golden-2 <sup>2</sup>	<i>GLK2</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fehér, krémfehér, halványzöld termésszín / 3 csonka variáns: egy 6 bp inszerció, 3 bp delécio és egy SNP is korai stop kodon kialakulását okozta</li> </ul>	Brand et al., 2014
Feoforbid-a-oxigenáz <sup>3</sup>	<i>PAO</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Zölden maradó termésszín / enzim működését érintő mutáció</li> </ul>	Roca és Mínguez-Mosquera, 2006
Stay Green <sup>4</sup>	<i>SGR</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Zölden maradó termésszín / aminosav csere a +340. pozícióban történt T-C báziscsere miatt</li> </ul>	Borovsky és Paran, 2008

Jegyzet:<sup>1</sup> plasztidok méretének és számának kialakítása, <sup>2</sup> kloroplasztok kialakítása, <sup>3</sup> klorofilok degradációjának kulcsenzime, <sup>4</sup> kloroplaszt fehérje, feltehetőleg a *PAO*-t szabályozza

### 3.3.3. Antociánok

A klorofillekhez hasonlóan, az antociánok jelenléte a paprika termésben szintén tranziens, és az érés előrehaladtával, a karotinoidok felhalmozódásával egyidejűleg, ezek a pigment molekulák általában lebomlanak (Lightbourn et al., 2008). Bár számos környezeti tényező befolyásolhatja az antocián bioszintézisét, de ami igazán meghatározza, az a genetikai háttér. Az antocián bioszintetikus útvonal szabályozása még mindig nem teljesen tisztázott, annak ellenére, hogy – a karotinoid útvonallal ellentétben – a szabályozó gének többsége ismert.

Az antociánok növényi másodlagos anyagcseretermékek, a flavonoidok osztályába tartoznak és ezen belül a polifenolos pigmentek csoportját képezik. Jellemzően mindenütt megtalálhatóak a növényvilágban. Ezek a glikozilált polifenolos vegyületek biztosítják a virágok, magvak, termések és más, vegetatív szövetek színét, amely a narancssárgától a vörösön és a lilán át a kékig terjed (Tanaka és Ohmiya, 2008). Tipikusan vízben oldódó színyanyagok, a sejt vakuólumában halmozódnak fel (Smeriglio et al., 2016). A növényekben a legelterjedtebb antociánok a pelargonidin, cianidin, delfinidin, peonidin, petunidin és a malvidin (Kong et al., 2003).

Az antocián bioszintézis genetikai háttere alaposan kutatott terület. Számos növény faj kapcsán részletesen leírták, mint a kukorica (*Zea mays*), petúnia (*Petunia x hybrida*), lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) esetében (Holton és Cornish, 1995; Liu et al., 2018; Winkel-Shirley, 2002). A bioszintetikus útvonal enzimeket kódoló strukturális génjeit már jellemezték és klónozták, így ismert, hogy ezek nagyfokú szekvencia-hasonlóságot mutattak a *Solanaceae* fajai között is (Stommel et al., 2009). Az antocián bioszintetikus út konzerváltságát nem csak a

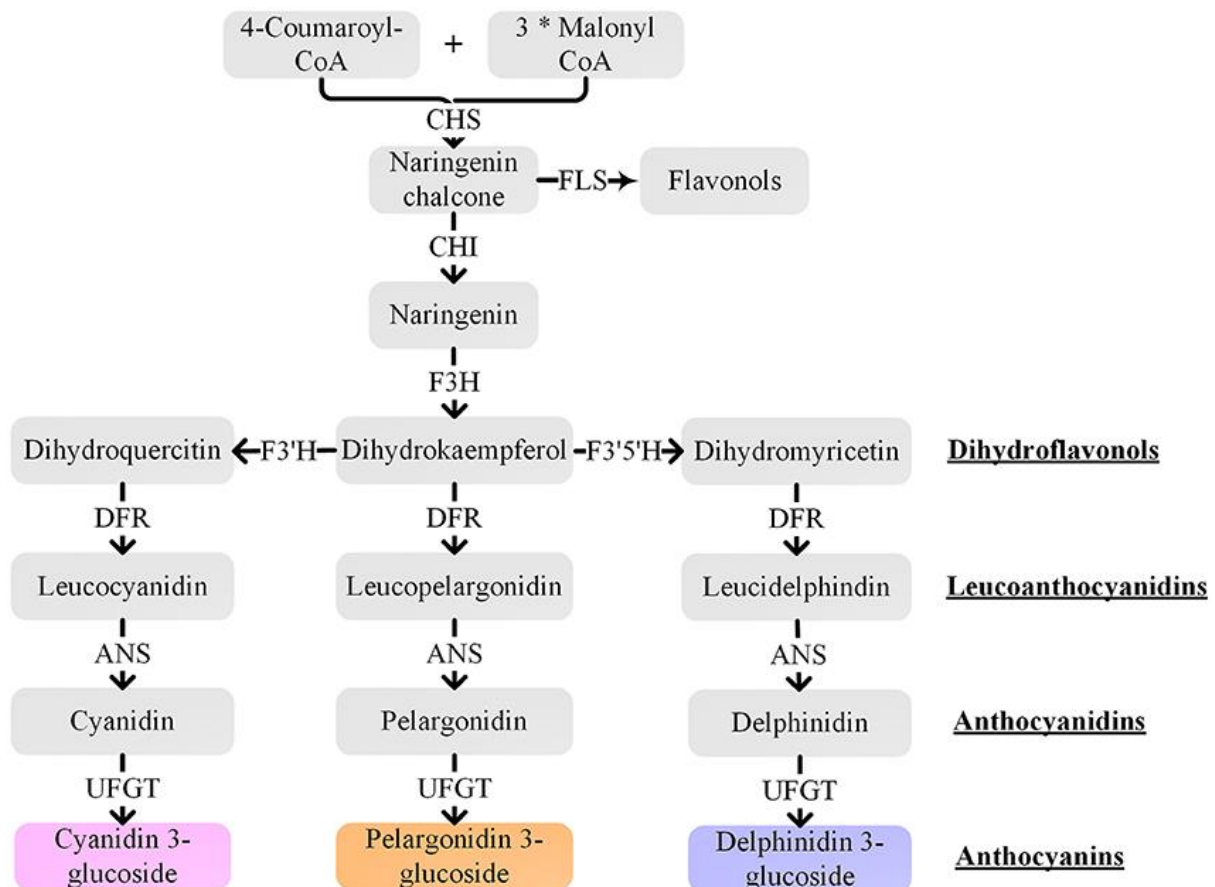
*Solanaceae* családon belül, de több más családba tartozó növényfaj esetén is bizonyították (Holton és Cornish, 1995). A különböző fajokban eltérő pigmentek halmozódnak fel, ami annak tudható be, hogy a struktúrgének szabályozása nem egyforma, esetleg bizonyos gének jelen vannak, de nem expresszálnak. A petúnia ezért nem termel pelargonidint, a kukorica pedig delfinidint (Holton és Cornish, 1995; Quattrocchio et al., 1993). A paprikában a delfinidin származékok a kizárólagos antocián típusú vegyületek, azon belül is a legnagyobb arányban a delfinidin-3-(p-kumaroil-rutinozid)-5-glükozid fordul elő, amely a paprika termésében, levélzetében és virágában is megtalálható (Aza-González és Ochoa-Alejo, 2012; Azuma et al., 2008; Sadilova et al., 2006).

A *Solanaceae* családon belül a petúnia esetén a legalaposabban feltárt az antocián bioszintetikus út, bioszintézisének genetikai elemei, kromoszómán való elhelyezkedésük és működésének mechanizmusai nagyban hasonlítanak a többi *Solanaceae* fajéhoz (Quattrocchio et al., 1999; Quattrocchio et al., 1993; Spelt et al., 2000). A *Capsicum* fajok esetében az antociánok felhalmozódásáért a levelekben, virágokban és éretlen termésekben az *A* lokusz felel (Peterson, 1959). A részlegesen domináns *A* (*Anthocyanin*) gén felelős a lila és fekete színért az említett növényi részeken. Egy másik gén, az *A* módosító gén (*MoA – Modifier of A*) fokozza a lila szín intenzitását, ha az *A* jelen van (Daskalov és Poulos, 1994). A portok az egyetlen olyan szerv, amelynek antocián felhalmozódásáért nem az *A*, hanem az *Fc* (*Filament colour*) lókusza felelős (Borovsky et al., 2004; Wang és Bosland, 2006). Géntérképezési kutatások igazolták, hogy az *A* és *Fc* ugyanabban a pozícióban található meg a 10. kromoszómán, így feltételezhető, hogy a két gén allélikus kölcsönhatásban van egymással (Chaim et al., 2003). Antociános elszíneződés előfordulhat a bibében is, az *Asf* (*Anthocyanin on style and filament*) gén az *A* hiányában is lila bibe kialakulásához vezet (Lippert et al., 1966; Odland, 1960). Az antociánmentes szövetek kialakításáért számos gén felelős, *C. chinense*-ben az *al-1*, *al-2*, *al-3*, *al-4*, *al-5*, *al-6* és az *al-7*, míg a *C. chacoense*-ben az *al-8* (Csillery, 1980; Csillery, 1983).

### **3.4. Az antocián bioszintézis strukturális génjei**

Az antocián bioszintetikus útvonal az általános flavonoid útvonal kiterjesztése. A bioszintézisében résztvevő gének két csoportba oszthatóak: strukturális gének, amelyek a reakció lépéseket katalizáló enzimeket kódolják, valamint a szabályozó gének, amelyek a strukturális gének kifejeződését befolyásoló transzkripciós faktorokat kódolják (Gonzali et al., 2009). A bioszintetikus út enzimeit az alábbiak: fenilalanin ammónia-liáz (*PAL*), cinnamát-4-hidroziláz (*C4H*), 4-kumaroil-CoA-ligáz (*4CL*), chalkon-szintáz (*CHS*), chalkon-izomeráz (*CHI*), flavanon-3-hidroziláz (*F3H*), flavonoid-3'-hidroxiláz (*F3'H*), flavonoid-3', 5'-hidroxiláz (*F3'5'H*),

dihidroflavonol-4-reduktáz (*DFR*), antocianidin-szintáz (*ANS*) és az UDP-glükóz-flavonoid 3-glükozil-transzferáz (*UFGT*). Az antocianin-permeáz (*ANP*) és a glutation-S-transzferáz (*GSTs*) az antocián vakuólumba történő transzportjáért felelős. Számos enzim a flavonoid antociánná való átalakításában vesz részt, ilyen a 3/5-O-glikozil-transzferázok (*3GT/5GT*), ramnozil-transzferáz (*RT*) és O-metiltranszferáz (*OMT*) (Aguilar-Barragán és Ochoa-Alejo, 2014; Aza-González et al., 2012; Borovsky et al., 2004; Holton és Cornish, 1995; Stommel et al., 2009; Thorup et al., 2000) (2. ábra).



2. ábra – Általános antocián bioszintetikus útvonalban résztvevő korai és késői struktúrgének: chalkon-szintáz (*CHS*), flavonol-szintáz (*FLS*), chalkon-izomeráz (*CHI*), flavanon-3-hidroxiláz (*F3H*), flavonoid-3'-hidroxiláz (*F3'H*), flavonoid-3', 5'-hidroxiláz (*F3'5'H*), dihidroflavonol-4-reduktáz (*DFR*), antocianidin-szintáz (*ANS*) és UDP-glükóz-flavonoid 3-glikozil-transzferáz (*UFGT*) (Liu et al., 2018)

A reakcióban résztvevő enzimek csoportosíthatóak az alapján, hogy korai vagy késői struktúrgének kódolják őket. Korai struktúrgének (EBG) a *CHI*, *CHS*, *F3H*, míg a késői struktúrgének (LBG) az *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *UFGT* és *RT* (Zhang et al., 2015). A korai gének függetlenül expresszálnak az *A* lokusztól míg a késői gének expressziója *A* lokusz függő (Borovsky et al., 2004).

A *Solanaceae* családon belül nincs következetes korreláció az EBG-k expressziós profilja és az antocián tartalom közt. Ezt mutatja az is, hogy nem találtak szignifikáns különbséget az

antociánt felhalmozó *Aft/Aft* (*Anthocyanin fruit*) mutáns paradicsom és a nem liluló kontroll közt, ugyanakkor, az *atv/atv* (*atroriolacea*) mutáns növényekben magasabb *PAL*, *CHS*, *CHI* és *F3H* transzkriptum mennyiséget detektáltak a kontroll növényekhez képest. A duplamutáns *Aft/Aft atv/atv* paradicsomban az általános flavonoid útvonal génjei átlagosan magasabb expressziós szintet mutattak a kontrolléhoz, és az *Aft/Aft* illetve az *atv/atv* paradicsoméhoz képest (Povero et al., 2011). Kang és munkatársai is hasonló eredményre jutottak, a *3GT* kivételével mind a korai, mind a kései gének expressziója magasabb volt az antociános növényekben (Kang et al., 2018). Az 'Alisa Craig' és egy *atv/atv* paradicsom összehasonlító elemzésekor azt találták, hogy az antociánt felhalmozó *atv/atv* genotípusban mind a szabályozó, mind a struktúrgének expressziója átlagosan magasabb, de szignifikáns különbséget csak az *F3'5'H*, *ANS* és *DFR* kései struktúrgének esetén mutattak ki (Colanero et al., 2018).

A 'Classic' és 'Ghostbuster' padlizsánok vizsgálatokor – egy érésfázis kivételével – a *CHS*, *ANS* és *DFR* transzkriptumok mértéke szignifikánsan magasabb volt a lila 'Classic' fajtában, viszont a *CHS* gén expressziója az utolsó érésfázisban nem mutatott szignifikáns különbséget a fehér és a lila héjú genotípusok közt (Stommel és Dumm, 2015). A sötétlila 'Black Beauty' és a zöld cirnos 'E13GB42' fajták összehasonlításakor a *CHS*, *ANS* és *DFR* gének expressziója a sötétlila fajtában szignifikánsan magasabb volt (Gisbert et al., 2016). Hasonló eredményre jutottak Zhang és munkatársai is, a fehér 'Bai Xue' és lila termésű 'Zi Chang' fajták vizsgálatokor. A *PAL* kivételével, minden más struktúrgén – főleg a *F3'H*, *ANS*, *DFR* és *GT* – expressziója több ezerszerese volt a fehér fajtáénak (Zhang et al., 2014). Jiang és munkatársai a 'Lashan Hexian' fajtát vizsgálva az *F3H* kivételével szoros korrelációt mutattak ki a *CHS*, *CHI*, *F3'5'H*, *DFR* és *ANS* gének expressziója és az antocián tartalom közt (Jiang et al., 2016).

Fehér és lila burgonya gumójának héját és húsát elemezve, a *CHS* és a *4CL* transzkript mennyisége a héjban nem mutatott szignifikáns különbséget, míg a húsban minden struktúrgén expressziója magasabb volt a lila fajtában (Liu et al., 2015). A sárga 'Yellow Meigui', piros 'Red Meigui' és a lila 'Purple Meigui 2' burgonya fajtákban magas *CHS* expressziót mértek, a fehér 'Shepody' fajtához képest. Ezt azzal magyarázták, hogy az antocián bioszintézisének egyik legkritikusabb lépése, hogy az egyik prekursor molekulájából, a 4-cinnamioil-CoA-ból, minél több naringenin-chalkon keletkezzen, hogy ezáltal kevesebb prekursor jusson a lignin bioszintetikus útba. A naringenin-chalkon szintézisét a *CHS* gén által kódolt chalkon-szintáz végzi. Magas *CHS* és alacsony sikimin O-hidroxicinnamioil-transzferáz (*HCT*) transzkript mennyiség az antocián bioszintetikus útnak kedvez a lignin bioszintézissel szemben (Tengkun et al., 2019).

Paprika esetén is ellentmondó eredmények születtek az antocián bioszintetikus útvonal struktúrgénjeit tekintve. A nem liluló *C. chinense* 'PI159234' és az antociánt felhalmozó *C. annuum* '5226' paprikák sturtúrgénjeinek expressziós profilját összehasonlítva azt találták, hogy a *CHS* és *CHI* gének expressziójában nincs különbség a vizsgált növények közt (Borovsky et al., 2004). Aza-Gonzalez hasonló eredményre jutott a *C. annuum* cv. 'Árbol' (részlegesen liluló), 'Uvilla' (lila) és 'Tampiqueño 74' (nem liluló) fajták összehasonlításakor. A *CHS*, *CHI* és *F3H* gének expressziója minden vizsgált fenofázisban mindhárom fajtában kimutatható volt (Aza-Gonzalez et al., 2013). Egy liluló *C. annuum* 'Z1' és egy nem liluló 'A3' paprika expressziós profilját összehasonlítva azt találták, hogy a *4CL* és *CHS* gének azonos módon fejeződnek ki (Zhang et al., 2015). Két lila genotípus 'L66' és 'L29', illetve egy zöld genotípus 'L9' vizsgálatokor a termések antocián tartalma szoros összefüggést mutatott nem csak a kései *DFR*, *ANS* és *UFGT* gének expressziójával, hanem a korai *CHI*, *PAL*, *C4H* gének transzkriptum mennyiségével is (Meng et al., 2022).

Alacsony és magas hőmérsékleteken nevelt liluló *C. annuum* 'G02C27' paprikában a magasabb fényintenzitás mindkét hőmérséklet esetén megnövekedett antocián tartalmat eredményezett a növényekben. Ezekben a paprikákban nem csak a *DFR* és *ANS* gének expressziója volt magasabb, hanem a *CHS* korai struktúrgén expressziója is (Lightbourn et al., 2007). A nem liluló *C. annuum* '0619-2' és az antociánt felhalmozó '06C59' paprikák vizsgálatokor a *CHS*, *DFR* és *ANS* gének is magasabb expressziós szintet mutattak a lila paprikában (Stommel et al., 2009). Egy antociánt felhalmozó *C. annuum* 'KC00134' és egy nem liluló 'Chilbok No.2' paprikát vizsgálva azt találták, hogy a liluló paprikában a *DFR*, *ANS* és *UFGT* kései gének mellett az *F3H* expressziója is magasabb, ugyanakkor *PAL*, *C4H*, *4CL* és a *CHS* expressziója a két vizsgált növény közt nem mutatott szignifikáns különbséget (Jung et al., 2019). A termések hús és héj pigmenttartalmának vizsgálatokor pozitív korrelációt mutattak ki a termés héjának antocián tartalma és *CHS*, *F3'H*, *DFR*, *ANS* és az *UFGT* gének expressziója közt (Filyushin et al., 2020). Lila, illetve zöld termésű *C. annuum* 'Co62', illetve 'Co64' paprikák vizsgálatokor, a *PAL*, *C4H*, *4CL*, *F3H* és *ANS* gének expressziója nem különbözött szignifikánsan, míg a lila termésű paprikában a *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR* és az *UFGT* gének expressziója magasabb volt (Tang et al., 2020) (3. táblázat).



3. táblázat – Az antocián tartalom és a bioszintetikus út struktúrgénjeinek korrelációja a padlizsán, burgonya, paradicsom és paprika esetén

	Paradicsom	Padlizsán	Burgonya	Paprika
<i>CHS</i>	±	±	±	±
<i>CHI</i>	±	+	+	±
<i>F3H</i>	±	±	+	±
<i>F3'H</i>	±	n.a.	+	+
<i>F3'5'H</i>	+	+	+	+
<i>DFR</i>	+	+	+	+
<i>ANS</i>	+	+	+	±
<i>UFGT</i>	+	n.a.	+	+

'±': ellentmondó eredmények, '+': pozitív korreláció, n.a.: nincs adat. **A padlizsán adatok:** (Gisbert et al., 2016; Jiang et al., 2016; Stommel és Dumm, 2015; Zhang et al., 2014), **a burgonya adatok:** (Liu et al., 2015; Tengkun et al., 2019), **a paradicsom adatok:** (Colanero et al., 2018; Kang et al., 2018; Povero et al., 2011), **a paprika adatok:** (Aguilar-Barragán és Ochoa-Alejo, 2014; Aza-Gonzalez et al., 2013; Borovsky et al., 2004; Filyushin et al., 2020; Jung et al., 2019; Lightbourn et al., 2007; Meng et al., 2022; Stommel et al., 2009; Tang et al., 2020; Zhang et al., 2015) alapján, a táblázat Liu et al., 2018 alapján szerkesztve.

Tehát az antocián bioszintetikus útvonalban résztvevő strukturális gének transzkripciója sok hasonlóságot mutat a burgonyafélék családján belül. Általánosságban elmondható, hogy az EBG-k az antociános és az antociánmentes szövetekben is kifejeződnek, ugyanakkor nincs szigorú korreláció az expressziójuk mértéke és a szövetek antocián tartalma közt. Ez annak a következménye, hogy a korai struktúrgének nem csak az antociánok, hanem egyéb flavonoidok előállításához is szükségesek, mint a flavonolok vagy a flavanolok. Ezzel szemben az LBG-k transzkriptum mennyisége korrelál a szövetek antocián tartalmával, transzkripciójuk a család több tagjánál is érésfüggő mintázatot mutat, ami arra utal, hogy egy konzervált szabályozó mechanizmus alatt állnak.

### 3.5. Az antocián bioszintetikus útvonal szabályozása

Az antocián bioszintetikus útvonal szabályozásáért az úgynevezett MBW komplex felel. *Capsicum* fajok esetében az MBW komplexet három transzkripciós faktor család együttese alkotja: a DNS-kötő MYB, MYC típusú bHLH, és WD40 repeat fehérjék (Ramsay és Glover, 2005; Tanaka és Ohmiya, 2008). A MYB transzkripciós faktorok határozzák meg a komplex aktivátor, vagy represszor szerepét a struktúrgének promótereirekhez kapcsolódva a bHLH és WD40 transzkripciós faktorokkal közösen, így szabályozva azok átírását (Stommel et al., 2009). Az aktivátor MYB transzkripciós faktorok az R2R3-MYB, a represszor hatású MYB-ek pedig az R2R3-MYB és R3-MYB családokból kerülnek ki (Yan et al., 2021). Míg az R2R3-MYB és a bHLH transzkripciós faktorok expressziója főleg az antociánt felhalmozó szövetekre jellemző, addig a WD40 transzkripciós faktorok expressziója közel azonos mértékű az antocián-mentes és az antociános szövetekben (Koes et al., 2005).

A petúnia az antocián bioszintézis modellnövénye, így a bioszintetikus útvonal szabályozása is ennél a növényenél a legrészletesebben leírt. Virágszínének kialakulása összetett folyamat

következménye, a szirmlevelek szabadon álló része, illetve a csővé záródott alapi része, valamint a porzó és a szállító edénnyalábok mentén történő antocián felhalmozás is eltérő szabályozás alatt áll (Albert et al., 2011). A szirmok szabadon álló részének pigmentáltságát az AN2 R2R3-MYB transzkripciós faktor szabályozza. A szirmlevelek csővé záródott alapi részének és a porzók színének kialakításában az AN4 R2R3-MYB játszik szerepet (Quattrocchio et al., 1999; Quattrocchio et al., 1998). Egy másik, az AN4 szekvenciájával nagyfokú egyezést mutató R2R3-MYB transzkripciós faktort kódoló úgynevezett *Mybb* gént klónoztak a virágok szirmából (Kroon, 2004). A *PH4* gén által kódolt R2R3-MYB transzkripciós faktorban bekövetkezett mutáció egyes genotípusokban a vakuólumok pH-jának emelése által a piros virágszirmokban kék elszíneződést idézett elő, míg más genotípusokban a virágok elszíntelenedését okozta (Quattrocchio et al., 2006). A vegetatív szervek és részben a virágszín kialakításában két másik R2R3-MYB játszik szerepet, ezeket a *Deep Purple (DPL)* és *Purple Haze (PHZ)* gének kódolják. Kódoló szekvenciájuk 70 és 79%-ban azonos az AN2 kódoló szekvenciájával, aminosav sorrendjük alapján pedig egy kládba esnek a petúnia többi R2R3-MYB transzkripciós faktorával. A *PHZ* transzkriptum mennyisége a vegetatív és generatív szervekben fény indukálta szabályozás alá esik, míg a *DPL* transzkripciós faktor a virág alapi részének színét befolyásolja (Albert et al., 2011).

Petúnia esetén az aktivátor MYB transzkripciós faktoron túl represszor hatásúakat is leírtak, az R2R3-MYB családba tartozó MYB27-et, és az R3-MYB családba tartozó MYBx-et (Albert et al., 2014; Koes et al., 2005). A MYBx homológja az *Arabidopsis thaliana* CAPRICE (CPC) R3-MYB transzkripciós faktora. A *CPC*-t túltermelő paradicsom vonalak szignifikánsan kevesebb antociánt halmoztak fel a kontrollhoz képest (Wada et al., 2014). A *MYBx* túltermelő petúnia vonalak kevesebb antociánt szintetizáltak, és a vakuólumuk pH-ja is változott, továbbá a *MYBx* megakadályozta a *DFR* promóterének aktiválását az MBW által (Albert et al., 2014; Kroon, 2004). A MYB27 két mechanizmuson keresztül akadályozza az antocián bioszintézist. Vagy megakadályozza az MBW komplex kialakulását, vagy ezekhez kapcsolódva, az aktivátor MBW komplexeket represszorrá alakítja (Albert et al., 2014).

A MYB transzkripciós faktorokon túl, az AN1 (bHLH) és AN11 (WD40) transzkripciós faktorok is szükségesek a bioszintetikus útvonal struktúrgénjeinek átírásáért a vegetatív és generatív szervekben egyaránt (Quattrocchio et al., 2006; Spelt et al., 2000). Az *AN11* expressziója nem szövetspecifikus, a növény minden részében kifejeződik, beleértve a zöld szöveteket is. Ellenben az *AN1* csak az antociánt felhalmozó szövetekben expresszál, így elengedhetetlen az antocián bioszintézishez. Ugyanakkor sem az *an1* sem az *an11* mutánsok nem halmoznak fel antociánt (Tornielli et al., 2009). A bHLH géncsaládba tartozó JAF13 és AN1

transzkripciós faktorok hatása nem egyenértékű. Az *anI*<sup>-</sup> mutáns növényekben a *JAF13* túltermeltetése nem tudta komplementálni az *AN1* hiányát (Spelt et al., 2000). Később bizonyították, hogy az *AN1* közvetlenül az antocián bioszintetikus utat szabályozza a MYB-*AN1*-*WD40* komplex részeként, a *JAF13* pedig az *AN1* transzkripcióját, a MYB-*JAF13*-*WD40* komplexen keresztül (Montefiori et al., 2015).

Ezek alapján, az antocián bioszintézisének szabályozása az aktivátor R2R3-MYB-*JAF13*-*WD40* komplex kialakulásával kezdődik, ami aktiválja az *AN1* transzkripcióját. Ezt követően az *AN1* a *WD40*-hez és az aktivátor R2R3-MYB-hez kötődik, és ez az MBW komplex indítja el a bioszintetikus útban szerepet játszó struktúrgének átírását. A represszor MYB molekulák kompetítorai az aktivátor MYB-eknek, a *JAF13* és *AN1* kötésével csökkentik az aktivátor komplexek kialakulásának esélyét. A szövet és fenofázis függvényében, illetve a különböző környezeti tényezők (például fény) hatására a komplexet más-más MYB transzkripciós faktorok alkotják. Bár a családon belül akadnak eltérések, a petúnia esetén az MBW komplex hatását a *DFR*, *ANS* és *RT*, azaz a bioszintetikus út kései struktúrgénjeinek esetén tudták kimutatni (Quattrocchio et al., 1993).

A termések éppen aktuális antocián tartalmát az antociánok bioszintézise, illetve a degradációja együttesen határozza meg. Bioszintézisük szabályozása, ahogy az előbb említett példák is mutatják alaposan kutatott terület, ugyanakkor kevesebb információ áll rendelkezésre a lebomlásukat illetően. A degradációjukat számos tényező kiválthatja; például a közeg pH-ja, hőmérséklet, fény, hidroxilációjuk mértéke, vagy akár fémionok jelenléte (Liu et al., 2018). Lebomlásukban az oxigénnek is fontos szerepe van, legyen szó akár közvetlen oxidációról, akár az oxidáló enzimek általi degradációról (Enaru et al., 2021). Az antociánok lebontásában az úgynevezett antocianáz enzimek vesznek részt, ilyenek lehetnek a glikozidázok, peroxidázok és polifenol oxidázok, közülük a glikozidázok közvetlenül, míg a peroxidázok és a polifenol oxidázok közvetetten fejtik ki hatásuk (Enaru et al., 2021). Annak ellenére, hogy az antociánok aktív, enzimek által modulált degradációját a burgonyafélék családjának egyik képviselőjében írták le először (*Brunfelsia pauciflora*), a lebomlásuk szabályozásáról nincs pontos információ családon belül.

### **3.6. Az antocián bioszintézis szabályozása a *Capsicum* nemzetségben**

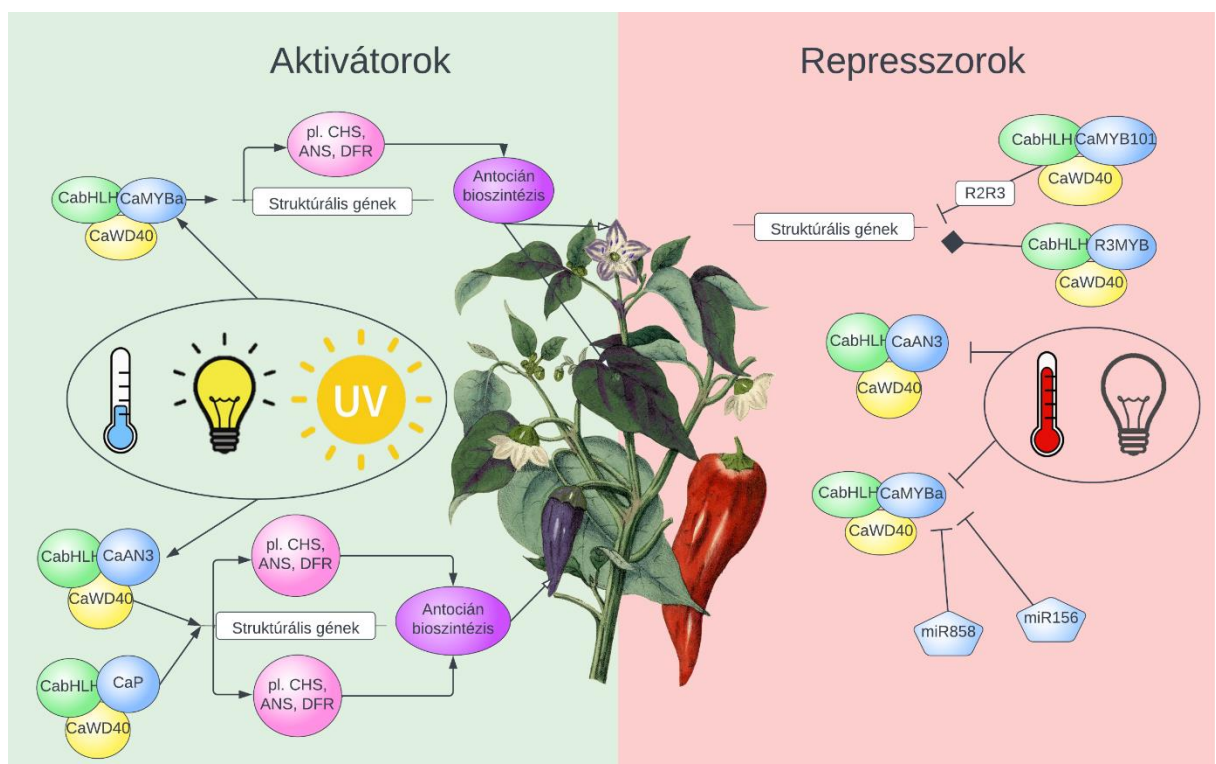
Paprikában kevesebb, a szabályozásban szerepet játszó gént írtak le. A petúnia *AN2*, *AN1* és *AN11* ortológjait azonosították eddig, ezek rendre a *CaMYBa*, a *CabHLH* és a *CaWD40* gének. A *Capsicum* fajok antocián felhalmozódásáért a levelekben, virágokban és éretlen termésekben az *A* lokusz felel, ezt az *A* lokuszt nem liluló *C. chinense* 'PI159234' és az antociánt felhalmozó

*C. annuum* '5226' paprikák keresztezéséből származó hasadó nemzedék segítségével a 10. kromoszómára térképezték, arra a pozícióra, ami megfelel a petúnia AN2 transzkripciós faktorának. Így az *A* lókuszon található MYBa az AN2 homológja. Míg az '5226' növényben mind a generatív, mind a vegetatív szervekben ki tudták mutatni a MYBa expresszióját, addig a nem liluló 'PI159234' növényekben nem. Hasonlóképp a DFR és ANS expressziója is csak az antociánosodó növényben volt detektálható, így feltételezték, hogy csak úgy, mint a petúnia esetében, a MYBa a bioszintetikus út kései génjeire van hatással. (Borovsky et al., 2004). Paprika virág és termés elemzésekor nem találtak különbséget a *CaWD40* expressziójában a különböző színű genotípusok közt. Ugyanezekben a szervekben a *CaMYBa* és *CabHLH* gének expressziója korrelált az antocián tartalommal, és a DFR, ANS expressziójával. Ugyanezt az összefüggést a vegetatív szervek esetén nem tudták kimutatni, így feltételezték, hogy az *A* és *MoA* lókuszon túl egyéb tényezők is befolyásolják a vegetatív szövetek antocián felhalmozását (Stommel et al., 2009).

A vírus indukálta géncsendesítés (VIGS) egy bevált módszer az antocián bioszintézisben szabályozó szerepet betöltő transzkripciós faktorok szerepének vizsgálatára (Kim et al., 2017a). Stommel és munkatársai (2009) és Borovsky és munkatársai (2004) adatainak ellentmond az RNS interferencián alapuló kísérlet, miszerint az antociánt felhalmozó *C. annuum* 'Z1' paprikában a MYBa transzkripciós faktor csendesítése a *PAL*, *C4H* és *4CL* gének expresszióján kívül minden más korai és kései struktúrgén alacsonyabb szintű expresszióját eredményezte (Zhang et al., 2015). Egy másik VIGS kísérlet során a MYBa és a WD40 transzkripciós faktorok csendesítése a vegetatív és generatív szöveiben egyaránt antociánt termelő *C. eximium* Hunz. '1546' növényben nem csak a késői struktúrgénekre volt hatással, hanem a *CHS* és *F3H* korai struktúrgénekre is. A két transzkripciós faktor csendesítése nem vezetett teljes antociánmentességhez, csak szignifikánsan csökkentette annak mértékét a kontrollhoz képest (Aguilar-Barragán és Ochoa-Alejo, 2014).

Alacsony hőmérséklet és magas fényintenzitás a MYBa gén mellett a *CHS*, *ANS* és *DFR* gének magasabb expresszióját okozta. Ugyanezek a körülmények nem befolyásolták a *CabHLH* és a *CaWD40* expresszióját (Lightbourn et al., 2007). Hidegstressz hatására a *CaMYBa*, *CaWD40* és a *CHI*, *F3'H* és *F3'5'H* struktúrgének expressziója is növekedett (Zhang et al., 2020). Közepes hullámhosszú UV-B sugárzás indukálta a *CaMYBa* expresszióját, ami antocián felhalmozódáshoz vezetett a sugárzást kapó szövetekben. Ezekben a szövetekben a *CaMYBa* expressziója mellett, a *CHS*, *F3H*, *DFR*, *ANS* és az *UFGT* gének expressziója is szignifikánsan magasabb volt, a zöld szektorokéhoz képest. A *CaMYBa* csendesített növényekben az UV-B sugárzás antocián bioszintézisre gyakorolt hatását nem tudták kimutatni (Wang et al., 2022).

Jung és munkatársai szoros korrelációt mutattak ki a *CaMYBa* expresszió és az antocián tartalom közt. A nem liluló *C. annuum* 'Chilbok No.2' növényben a *CaMYBa* transzkriptumokat nem tudták kimutatni, ebben a növényben a *CHI* és az *F3H* korai struktúrgének expressziója is szignifikánsan alacsonyabb volt a lila genotípusénál (Jung et al., 2019). Más kutatók a *Ca3GT* gént vizsgálva azt feltételezték, hogy a MYBa a *Ca3GT* promóteréhez kötődve a termések gazdasági érett színét befolyásolja (Liu et al., 2020). Egy nemrég jellemzett R2R3-MYB transzkripció faktor, az AN3 a termés-specifikus antocián felhalmozásért felel, csendesítése szignifikánsan csökkentette a *C4H*, *CHS*, *F3'5'H*, *ANS* és *DFR* gének expresszióját (Byun et al., 2022). A CaP transzkripció faktor szintén a termésekben fokozza az antocián felhalmozódást, de már specifikusabb módon, a termések csíkokban történő lilulását alakítja ki (Li et al., 2023) (3. ábra).



3. ábra – A paprika antocián bioszintézisének endogén és exogén szabályozásának egyszerűsített ábrája, saját szerkesztés, jelmagyarázat:  
 pozitív szabályozás → gátlás —| inaktiváció —▶

Borovsky és munkatársai (2004) az '5226' és 'PI 159234' növényekből izolált *CaMYBa* kódoló szekvenciáját elemezve nem találtak különbséget a liluló és nem liluló növények közt, így feltételezték, hogy az eltérő expressziós mintázat a promóterben található különbségekből adódik. A 'KC00134' és 'Chilbok No.2' összehasonlító elemzésekor egy 5633 bázispár méretű non-LTR retrotranszpozon inszerciót írtak le a liluló 'KC00134' növény *CaMYBa* -673. pozíciójában a start jeltől. Deléciós vonalakban bizonyították, hogy a retrotranszpozon *RTase* génjének 3'UTR régiója növelte a *CaMYBa* expresszióját a rajta található cisz-szabályozó

elemek inszerciója által. A *CaMYBa* promóter szakaszán lévő kötőhelyek miatt feltételezték, hogy a *CaMYBa* képes az autoregulációra, illetve más transzkripciós faktorok bekötődése szintén módosíthatja az expresszióját (Jung et al., 2019). Ezzel szemben Ohno és munkatársai (2020) a LINE-1 non-LTR retrotranszpozon inszerciót a *CaMYBa* első intronjában írják le, kísérletükben viszont ugyanarra a következtetésre jutnak, hogy ez a retrotranszpozon inszerció vezet a megnövekedett antocián tartalomhoz. Számos más példa is mutatja a transzpozonok, retrotranszpozonok szerepét a növények különböző színváltozatainak kialakításában; a CACTA transzpozon inszerciója az *RsMYB1* promóterébe gátolja a retek antocián bioszintézisét (Wang et al., 2020), karfiol esetén szintén funkciónyeréses mutációt okoz a *Pr R2R3-MYB* transzkripciós faktor promóterébe inszertálódott Harbinger transzpozon (Chiu et al., 2010), a *Gret1* retrotranszpozon inszerciója a *VvmybA1* gén funkcióvesztéséhez vezet, így blokkolva az antocián bioszintézist a szőlő bogyójában (Kobayashi et al., 2004), míg a vérnarancs *Ruby* génjébe inszertálódott *Tcs1* retrotranszpozon a termések fény és hideg hatásra történő antocián felhalmozását serkenti (Huang et al., 2019).

Ohno és munkatársai PCR-RFLP-vel genotipizálni tudták a lila, két színű (fehér alapon lila) és fehér virágú F<sub>2</sub> egyedeket a keresztezési partnerek *CaMYBa* génjének negyedik exonjában található *HaeIII* restrikciós hely megléte, illetve hiánya alapján (Ohno et al., 2020). A gazdasági érettségben zöld és lila genotípusok összehasonlításával 4 SNP-t írtak le a *3GT* gén promóter régiójában a -231 bp, -577 bp, -604 bp, és -866 bp helyeken a lila gazdasági érett termésekben, illetve további inszerciókat és deléciókat azonosítottak. Ezen mutációk következtében különböző cisz-regulátor elemek alakultak ki, a lila genotípusban a -33 bp és -146 bp pozíciókban egy W-boksz, és egy GT1-motívum, míg a zöld genotípusokban egy CAT-boksz a -738 bp pozícióban. Ezek a szabályozó motívumokbeli eltérések vezethetnek a zöld/lila gazdaságilag érett termésszín kialakulásához. A -146 bp pozícióban történt 30 bázispáros delécióra markert tervezve követni tudták a gazdaságilag érett lila termésszín öröklődését. A *CaMYBa* gén kódoló régiójában, illetve -1000 bázisig upstream nem találtak szekvenciabeli különbséget (Liu et al., 2020). Liluló és nem liluló *C. annuum* *CaMYBa* transzkripciós faktorának szekvenálásakor a gén negyedik exonjában egy C/A SNP-t írtak le a +1865 pozícióban, amely megkülönböztette a liluló fajtákat a nem lilulóktól. Egy másik, antocián bioszintézisben feltehetően szabályozó szerepet betöltő transzkripciós faktort (XM\_016689227) elemezve, a gén harmadik exonjában egy T deléciót találtak a +1217 pozícióban, ami konzekvensen az antociánmentes fajtákra volt jellemző (Babak et al., 2020).

Az ilyen szekvenciabeli eltéréseket nem csak az előbb említett SNP genotipizálással, illetve PCR-RFLP-vel lehet vizsgálni, hanem viszonylag egyszerűen lehet ezeket követni különböző

DNS markerek használatával. Az egyik legelterjedtebb, genotipizáláshoz széleskörűen alkalmazott marker rendszer a mikroszatellit (Simple Sequence Repeat – SSR) alapú markerek (Litt és Luty, 1989). Előnyük, hogy kodominánsan öröklődnek, és jól ismételtelhetők. A kettő-hat nukleotidból álló tandem ismétlődések határszekvenciáira tervezett mikroszatellit primerekkel az ismétlődés függvényében hosszpolimorfizmus mutatható ki a vizsgált genotípusok közt. A paprika esetén számos mikroszatellit markert írtak le (Cheng et al., 2016). A kódoló és nem kódoló régióban egyaránt előforduló SSR-ek alkalmasak marker alapú szelekcióra, hiszen gazdaságilag hasznos génekkel, de akár QTL-ekkel is kapcsolatos öröklődhetnek. Köles és szőlő esetén is több, az antociánosodással kapcsolt SSR markert írtak már le (Renganathan et al., 2021; Röckel et al., 2020). Antociánosodást többek között transzpozon, illetve retrotranszpozon inszerció is előidézhethet. A szicíliai vérnarancs antocián bioszintézisét szabályozó R2R3-MYB transzkripció faktor kódoló *Ruby* génjének promóterébe történő LTR retrotranszpozon inszerció funkcionyeréses mutáció révén a hidegstresszre történő termés specifikus antocián felhalmozást szabályozza (Butelli et al., 2012). Szintén egy funkcionyeréses mutáció által magasabb antocián akkumulációt idéz elő a japán szilva *PsMYB10.2* promóterébe inszertálódott LTR retrotranszpozon (Fiol et al., 2022). Az ilyen retroelemek a gyakori előfordulásuk és a nagyfokú konzerváltságuk miatt kitűnően alkalmazhatóak molekuláris markerekként (Kalendar et al., 2010). Ugyanakkor nem csak a retroelemek az egyedüliek, amelyek antociánosodást válthatnak ki és alkalmazhatóak molekuláris markerként is. A DNS szövet, fenofázis, illetve számos más endogén és exogén stresszor által kiváltott metiláltsága is okozhat génexpresszióbeli eltéréseket, amely metilezettséget markerekkel ki lehet mutatni. A narancs *Ruby* génjének hidegstresszre történő indukálását Methylation Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) módszerrel vizsgálva azt találták, hogy a gyümölcs antociánt felhalmozó szektoraiban mind a *Ruby* mind pedig a *DFR* promótereinek metiláltsága szignifikánsan csökkent a nem-pigmentált szektorokéhoz képest (Sicilia et al., 2020). Így az Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) módszerből továbbfejlesztett MSAP marker – az izoszkizomer *MspI* és *HpaII* restrikciós endonukleázok metiláltság érzékenységét kihasználva – lehetőséget ad a teljes genom citozin metiláció mértékének és mintázatának vizsgálatához különböző fajokban (Reyna-López et al., 1997).

### **3.7. Az antocián bioszintézisre ható egyéb exogén és endogén tényezők**

A magyar piacra szánt paprika termékek értékét jelentősen rontó antociánosodás a fajta hajlamossága mellett többnyire biotikus és abiotikus környezeti tényezőkre vezethető vissza. Számos tanulmány született az antociánok stresszválaszban betöltött szerepéről a növényvilágban. Azon túl, hogy antioxidáns kapacitásuknak köszönhetően semlegesítik a

keletkező szabadgyököket, többek közt növelik a növények ellenálló képességét, a fotoszintézis sebességét, a membránok áteresztőképességét és a tápanyagfelvételt (Chalker-Scott, 2002; Chalker-Scott, 1999; Kaur et al., 2022; Naing és Kim, 2021). A burgonyafélék esetén is több stresszorral bizonyították, hogy hozzájárulnak az antocián felhalmozódáshoz, ilyen az ultraibolya sugárzás, a 400-500 nm hullámhosszúságú fény, alacsony hőmérséklet, vízhiány, só-stressz, tápanyaghiány, sebzés, patogén általi fertőzés és a magas fényintenzitás (Albert et al., 2009; Bahler et al., 1991; Genzel et al., 2021; Lightbourn et al., 2007; Liu et al., 2022b; Oliveira et al., 2019; Tai et al., 2013; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2022). Biotikus és abiotikus tényezőkön túl, a mikroRNS-ek antocián bioszintézisben betöltött szerepét is több tanulmány támasztja alá. *Arabidopsis thaliana* esetén a *miRNS156* túltermeltetése nagyobb antocián tartalomhoz vezetett (Gou et al., 2011). Paradicsommal végzett kísérletekben a *miRNS858* csendesítése megnövekedett antocián szintet okozott (Jia et al., 2015). Burgonya esetén is több miRNS-t leírtak, amelyek a bioszintetikus útvonalat szabályozó génekre hatva befolyásolják az antocián bioszintézist (Wu et al., 2022). A különböző biotikus és abiotikus stresszorokon túl az antociánok bioszintézisére endogén hormonok is hatással vannak. Almával végzett kísérletek során bizonyították, hogy míg az antocián tartalmat pozitívan szabályozza az abszcizinsav és az indolecetsav, addig a gibberellin épp ellentétes hatást vált ki (Li et al., 2018), ezeken túl számos más növényi hormon hatását is igazolták az antocián bioszintetikus útvonalra (Li és Ahammed, 2023).

### **3.8. A paprika biológiailag aktív fitonutriens vegyületei**

A *Capsicum* fajokban számos olyan fitonutriens vegyület található, amelyek az emberi szervezetre pozitív hatással bírnak. Ilyenek a kapszaicin, karotinoidok, flavonoidok, vitaminok (C és E), ásványi anyagok és különböző olajok. Ezeknek a vegyületeknek szabadgyökfogó, antioxidáns, antimikrobiális valamint gyulladáscsökkentő hatása jól ismert (del Rocío Gómez-García és Ochoa-Alejo, 2013).

A fent említett vegyületcsoportokon túl a paprika más antioxidáns kapacitású molekulákkal is rendelkezik. A kapszaicinek a paprika termésének csípős ízéért felelős másodlagos metabolitok. Számos publikáció támasztja alá a kapszaicin antimikrobiális és antioxidáns hatását (Bacon et al., 2017; Baenas et al., 2019; Palma et al., 2020; Sora et al., 2015) A kereskedelmi forgalomban kapható kapszaicin erősen gátolja a *Bacillus subtilis* növekedését, és bizonyos koncentrációkban kis mértékben gátolja az *Escherichia coli* és a *Ralstonia solanacearum* növekedését (Molina-Torres et al., 1999). Nem csak a kapszaicin antimikrobiális hatásáról készültek tanulmányok, számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium szaporodását tudták



gátolni különböző kivonó módszerekkel. Ilyen mikroorganizmusok voltak az *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, de antifungális hatását is megfigyelték *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* gombák ellen (Ameya et al., 2018; Bacon et al., 2017; Cichewicz és Thorpe, 1996; Dorantes et al., 2000; Gonelimali et al., 2018; Koffi-Nevry et al., 2012; Nascimento et al., 2014).

A paprika termésének színéért felelős mindhárom pigment család rendelkezik bizonyos fokú antioxidáns kapacitással, közülük a karotinoidok természetes színyanyagok, így ételszínezékként és adalékanyagként is használják őket. Táplálkozástudományi, illetve élettani szempontból a paprika termések karotinoid felhalmozása a növények közül a legmagasabbak közé tartozik, egyes fajtáké meghaladja a 800 ng/g friss tömeget, így egy teáskanálnyi paprika őrlemény elegendő  $\beta$ -karotin prekuzort tartalmaz, ami fedezi egy felnőtt ember ajánlott napi A-vitamin szükségletét (Kilcrease et al., 2013; Kilcrease et al., 2015). Az A-vitamin egyebek mellett a látásban is szerepet játszik, hiánya szürkületi vaksághoz vezet, emellett fémkelátor és szinglet oxigén semlegesítő hatása révén antioxidáns kapacitású vegyület. Nem csak a  $\beta$ -karotinnak tulajdonítanak antioxidáns kapacitást, sok más karotinoidnak is bizonyítottan fontos biológiai funkcióik vannak, antioxidánsként és szabadgyökfogóként működnek, amelyek csökkenthetik a daganatos megbetegedések kockázatát (Ha et al., 2007).

A növényi fitonutriensek akár önmagukban is kifejthetik antimikrobiális hatásukat, de szintetikus antibiotikumokkal kombinálva ez a hatás fokozódhat a baktériumok széles körével szemben (Chandel et al., 2020). Ezek közül a fitonutriensek közül is kiemelkedőek a polifenolos vegyületek. Több tanulmányban is vizsgálták a különböző polifenolos vegyületek, illetve magas polifenol tartalmú növényi kivonatok hatását mind Gram-negatív, mind Gram-pozitív baktériumokra (Bae et al., 2022; Daglia, 2012; Manso et al., 2021).

A polifenolos vegyületek képesek megkötni a szabadgyököket *in vitro* és *in vivo* biológiai rendszerekben egyaránt (Bogusz Jr et al., 2018; Pérez-Jiménez et al., 2010). A polifenolok közé tartoznak a flavonoidok, fenolos savak, tanninok, valamint a ritkábban előforduló sztilbének és lignánok. A flavonoidok biokémiai és farmakológiai hatásairól ismertek, beleértve egyebek közt antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antivirális, antibakteriális és antiallergén hatásukat is. Különböző osztályokba sorolhatóak: flavonok, flavonolok, flavanonok, flavanonolok, flavanolok, izoflavonok és antociánok (Howard et al., 2000; Wahyuni et al., 2013).

Az antociánok jótékony hatása már több, mint 30 éve ismert. Prebiotikumként javítják a bélmikrobióta összetételét az IGF-1 modulálása által csökkentik a vérnyomást és javítják az agyi

funkciókat, csökkentik a vesegyulladás kialakulásának esélyét és progresszióját, valamint állatkísérletekkel már bizonyították vastagbélrák ellenes hatásukat (Afsar et al., 2022; Fan et al., 2018; Shi et al., 2021; Tian et al., 2019). Ezeken túl számos más jótékony hatásukat írták már le, mint az oxidatív stressz elleni védelem, antioxidáns kapacitás, gyulladáscsökkentő szerep, szív és érrendszer védelme, neurodegeneratív betegségek elleni védelem, értelmi képesség időskori megőrzése stb. (Blesso, 2019; Gonçalves et al., 2021; Li et al., 2017; Panchal et al., 2022).

Az antociánok antimikrobiális hatása is alaposan kutatott terület. Sharma és munkatársai (2020) különböző mértékben antociánosodó búza kivonatok hatását vizsgálták humán patogén *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Streptococcus aureus* baktériumok esetén. A legnagyobb gátlási zónákat a legtöbb delfinidin származékot tartalmazó kivonatok eredményezték, míg az antocián mentes kivonatok a legkisebbeket (Sharma et al., 2020). Tiszta antocián kivonatokkal sikeresen gátolták az *E. coli* és a *S. aureus* növekedését. A *S. aureus*-ra gyakorolt hatásukat vizsgálva azt találták, hogy az antociánok az antimikrobiális hatásukat más polifenolos vegyületekhez hasonlóan a sejt membránok és a  $K^+$  ioncsatornák tönkretételén keresztül fejtik ki (Dong et al., 2022). Liu és munkatársai is hasonló eredményre jutottak a növényi extraktumok polifenolos vegyületeinek különböző frakcióinak vizsgálatakor, az antociánok mind az *E. coli*-val mind pedig a *Listeria monocytogenes*-szel szemben hatékonyan bizonyultak (Liu et al., 2022a).

A növények a reaktív oxigén szabadgyökök semlegesítésére nem csak a fent említett nem enzimatisz antioxidáns rendszereket alakították ki, hanem enzimatisz védekező rendszerrel is rendelkeznek. Ennek a rendszernek három fontos eleme a kataláz (CAT), peroxidáz (POD) és a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim. Fő szerepük, hogy semlegesítik a szuperoxidokat és a hidrogén peroxidokat (Zhao et al., 2020).

### **3.9. A paprika antioxidáns kapacitását befolyásoló tényezők**

Paprika esetén számos befolyásoló tényezőt írtak le eddig, amelyek szignifikánsan hatnak az antioxidáns kapacitására, úgy, mint a termesztés technológia, a feldolgozási módszerek, a vizsgált szövet, a genotípus és a termés fenofázisa. Több évjáratot, illetve két különböző termesztéstechnológiát (ökológiai és hagyományos) vizsgálva megállapították, hogy a termés aszkorbinsav, oldható szárazanyag, kvercetin és totál polifenol tartalmát elsősorban az évjárat hatás befolyásolja, a termesztéstechnológia hatását csak a paradicsom esetén tudták igazolni (Chassy et al., 2006). Ezzel szemben egy másik kísérletben, az ökológiai rendszerben termesztett paprika bogyóinak mind a totál polifenol tartalma, mind pedig a peroxidáz enzim aktivitása magasabb volt a gazdasági és a biológiai érettségben egyaránt, mint a konvencionális

körülmények közt termesztettek (del Amor et al., 2008). Szintén magasabb polifenol tartalmat mértek mind friss tömegre, mind szárazanyagra vonatkoztatva, az ökológiai rendszerben termesztett kápia paprikák esetén a konvencionális módszerekhez képest. Az eltérő módon termesztett növények terméseit feldolgozva azt találták, hogy nem csak a termesztési körülmények, de a feldolgozási módszerek (infravörös sugárzás, mikrohullámú sugárzás, illetve forró levegős szárítás) is szignifikánsan hatnak a termések fitonutriens összetételére, az infravörös szárítással érték el a legmagasabb polifenol tartalmat (Guclu et al., 2021).

Ezeknek a kísérleteknek ellentmond, hogy a konvencionális rendszerben termesztett *C. annuum* 'Entina' magasabb totál polifenol tartalommal, illetve antioxidáns kapacitással rendelkezett mint az ökológiai rendszerben termesztett növények (Guilherme et al., 2020). Termesztő berendezésben, illetve árnyékolóháló alatt tartott genotípusok beltartalmi adatainak összehasonlításakor, az üvegházi növények termései magasabb karotinoid tartalmat mutattak, míg az árnyékolóháló a polifenolos vegyületek felhalmozásának kedvezett (Lekala et al., 2019). Két eltérő megvilágításon nevelt paprikák terméseinek beltartalmi értékeit a természetes fényen tartott növényekéhez hasonlítva azt találták, hogy mind a HPS, mind pedig a LEP lámpák okoztak változásokat a mért beltartalmi mutatókban, ugyanakkor ezek a változások nem voltak szignifikáns mértékűek (Bae et al., 2016). Hűtött tárolási körülmények közt vizsgálták a kék és az UV-C fény hatását a termések antioxidáns kapacitására és polifenolos vegyületeinek változására. Mind külön-külön, mind pedig a két megvilágítás együttese szignifikánsan növelte a flavonoidok és egyéb polifenolos vegyületek mennyiségét. A két fény együttese – 3 perc kék és fél perc UV-C megvilágítás – okozta a legnagyobb növekedést a polifenolos vegyületek mennyiségében (Pérez-Ambrocio et al., 2018). Hideg és sóstressz külön-külön és együttesen is a flavonoidok erőteljesebb felhalmozását okozta a stressznek kitett növények leveleiben (Reimer et al., 2022). Ugyanakkor nem csak abiotikus, hanem biotikus tényezők is erőteljes hatást gyakorolnak a polifenolos vegyületek mennyiségére, mint a növényi védekezőképesség egyik elsődleges védvonalára (Latha és Hunumanthraya, 2018; Park et al., 2012).

A vizsgált szövetek tekintetében 11 genotípus 3 szövetéből (placenta, magok, termésfal) történt mérések alapján a totál polifenol tartalom a termésfalban a legmagasabb, majd egyre csökken a placentában, illetve a magokban. Hasonló a trend a totál flavonoid tartalom esetén is, ugyanakkor az antioxidáns kapacitást vizsgálva, átlagosan a placentában mértek magasabb értékeket, ezt követte a termésfal, illetve a magok antioxidáns kapacitása (Lahbib et al., 2017). A genotípus és fenofázis összefüggéseit is többen vizsgálták. A termés érés folyamán szárazanyagra vonatkoztatva csökkenő tendenciát figyeltek meg a termések totál flavonoid, illetve totál polifenol tartalmában, amely az érés során szoros korrelációt mutatott azok

antioxidáns kapacitásával (Deepa et al., 2007; Ghasemnezhad et al., 2011; Marín et al., 2004; Navarro et al., 2006). Más tanulmányok ugyanakkor arról számoltak be, hogy nem találtak összefüggést a termékek totál polifenol tartalma és az érésfázisok közt (Castro-Concha et al., 2014). Egyes vizsgálatok pedig a szövetet és a genotípust találták a legerősebben ható faktoroknak a paprikák polifenol és flavonoid tartalmára (Howard et al., 2000; Sim és Sil, 2008; Sora et al., 2015).

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Kísérletek rövid bemutatása

A disszertáció keretein belül bemutatott kísérletekben a paprikák antocián bioszintézisének öt fő aspektusát vizsgáltam.

- i. Különböző nemesítési vonalakat, illetve hibrid családokat genotipizáltam, különös tekintettel a bioszintetikus útvonalat szabályozó R2R3-MYB transzkripciós faktorokra.
- ii. Egy hasadó populáció létrehozásával vizsgáltam az antocián felhalmozódás egyik kiváltó okának – a LINE-1 retrotranszpozon inszerciónak – az öröklésmenetét.
- iii. Vírus indukálta géncsendesítéssel vizsgáltam a CaMYBa transzkripciós faktor antocián bioszintézisben betöltött szerepét.
- iv. Az irodalomban leírt ellentmondások felderítésére a különböző mértékben antociánosodó fajták és nemesítési vonalak beltartalmi mutatóit vetettem össze az antocián bioszintézis struktúrális génjeinek, illetve az azokat szabályozó transzkripciós faktorok génjeinek expressziójával a termésérés során.
- v. Különböző termés színű genotípusok extraktumainak antimikrobiális hatását elemeztem.

Az előzőekben leírt kísérleteket külön fejezetben részletezem, de a módszerek nagyfokú átfedése miatt a következő alfejezetekben ismertetem a közös módszertani elemeket.

### 4.2. Általános protokollok

#### 4.2.1. A vizsgálatokhoz használt növényanyag

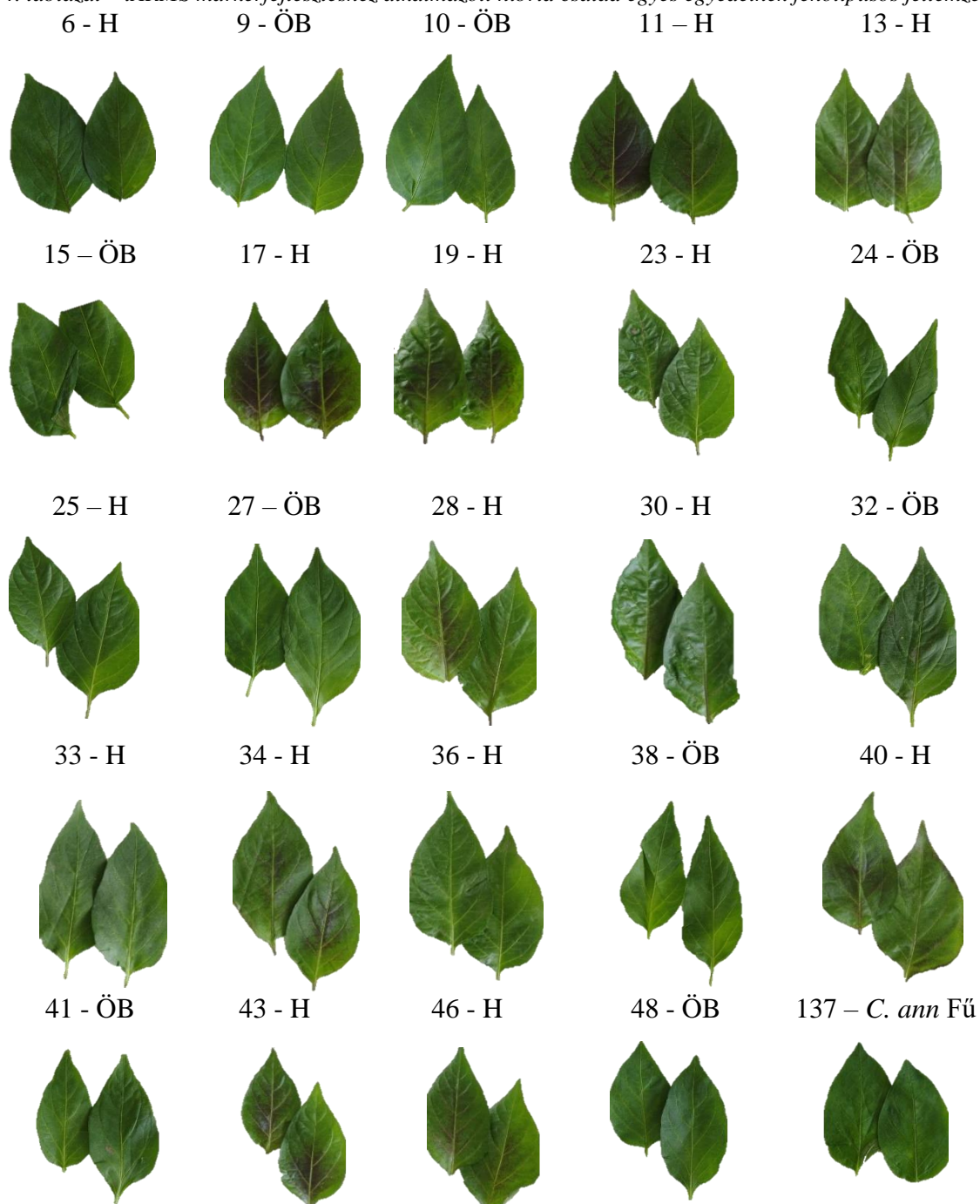
A tARMS marker fejlesztéshez a növényeket a PepGen Kft. biztosította. Az anyag *C. annuum* × *C. chinense* vagy reciprok *C. chinense* × *C. annuum* fajhibrid kísérletből származik. A keresztezés nem minden esetben volt sikeres, ami a fajhibridizálás esetén gyakori, így voltak olyan növények, amelyek nem fajhibridek. Ez a 6-8 leveles növények levél formája, növekedési erélye, szőrözöttsége és sok esetben a levél antociános elszíneződése alapján került megállapításra. A nem fajhibrid növényeket ÖB-vel jelöltem, H-val pedig a valódi fajhibrideket (4. táblázat).

A *C. annuum* anyatóvek (továbbiakban *C. ann* Fű) minden esetben génikus hímsterilek voltak, a *C. chinense* 'Bhut Jolokia' (továbbiakban 'Bhut Jol') extrém magas kapszaicin tartalommal rendelkezik, a szintén *C. chinense* 'Pimienta de Neyde' (továbbiakban 'Pim. Ney.')

az extrém magas antocián tartalmával tűnik ki, amelyet teljes biológiai érettségében sem veszít el. Ennek a két *C. chinense* tételnek a hibridje a 'Ghost Lady' (továbbiakban 'Gho. Lady'), amelynek F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub> utódai közt már megjelentek olyan paprikák, amelyek biológiai érettségben színeződtek. A következő kombinációkból származó F<sub>1</sub> növényeket vizsgáltam:

- Növények: 6-15 - *C. ann* Fű × *C. chi* Cdz 145 'Pim. Ney.' - F<sub>1</sub>
- Növények: 17-19 - *C. ann* Fű × *C. chi* 'Bhut Jol' × *C. chi* 'Pim. Ney.' (F<sub>2</sub>) - F<sub>1</sub>
- Növények: 23-48 - *C. ann* Fű × *C. chi* 'Bhut Jol' × *C. chi* 'Pim. Ney.' = 'Gho. Lady' (F<sub>2</sub>) - F<sub>1</sub>

4. táblázat – tARMS markerfejlesztéshez alkalmazott hibrid család egyes egyedeinek fenotípusos jellemzése



139 -*C.ann* Fű

cdz145



'Pim.Ney.'



'Gho. Lady'



'Bhut Jol'



A retrotranszpozon inszerció kimutatásához a következő genotípusokat vizsgáltam (5. táblázat). A *C. annuum* 'Cancun', 'Royal Black', 'Azteco' és 'Black Pearl' kereskedelmi forgalomban kapható fajták mellett, a PepGen Kft. még egy további antociánosodó fajtát, a 'Zulu'-t bocsájtotta rendelkezésemre. Kontrollként *C. annuum* 'Kaldom', 'Soroksári' és 'Fehérözön' fajtákat használtam.

5. táblázat – Retrotranszpozon inszerció kimutatásához alkalmazott növényanyag



A további markerrendszerekhez az előbb bemutatott növények mellett a PepGen Kft által biztosított Cecei háttérű különbözőképpen antociánosodó nemesítési vonalak 9. - 13. generációjú beltenyésztett egyedeit vizsgáltam (6. táblázat). A genotípusokat 6 csoportra osztottam, minden csoport 3-3 egyedét vizsgáltam a különböző generációkból. Minden évben a vizsgálatokhoz az előbb bemutatott *C. chinense* 'Pim. Ney.' és a *C. chinense* 'Bhut Jol.' szolgáltak kontrollként. Az így létrehozott 8 csoport az alábbiak szerint alakult:

6. táblázat – Genotípzáláshoz, génexpressziós, analitikai és antimikrobiális hatás vizsgálatokhoz alkalmazott növényanyag fenotípusos leírása

'Pim. Ney.'





*C. chinense*, extrém lila termés minden érésfázisban, *upp\**, csípős



'11263'

termésérés során lilából pirosra vált, *pax*, *Leb*, *upp+*, édes



'11270'	termésérés során lilából sárgára vált, <i>pax+</i> , <i>Leb</i> , <i>upp+</i> , édes	
'11274'	termésérés során lilából pirosra vált, <i>pax+</i> , <i>Leb-s</i> , <i>upp+</i> , édes	
'11278'	fehérből pirosra érik, <i>pax</i> , <i>rul</i> , <i>upp</i> , édes	} 
'11280'	fehérből pirosra érik, <i>pax+</i> , <i>Leb+</i> , <i>upp+</i> , édes	
'Soroksári'	fehérből pirosra érik, <i>asx</i> , <i>upp</i> , édes	
'Bhut Jol'	<i>C. chinense</i> krémfehérből fehérre érik, <i>upp+</i> , <i>wwb</i> , csípős	

\* *Jegyzet*: *pax*—részlegesen antocián-mentes, *Leb*, *Leb-s*— gazdasági érettségben lila termés, *-s*: csíkos, *asx*—antocián-mentes 'Soroksári' típus, *upp* – felálló, *wbb* – gazdasági és biológiai érettségben is fehérén maradó.

A génexpressziós és a beltartalmi mutatók, továbbá az enzimaktivitás méréshez is az előbb felsorolt paprikákat használtam ('11263'-'11280', pozitív kontrollként a minden fenofázisában liluló 'Pim. Ney.', negatív kontrollként a nem liluló 'Soroksári'-t) (6. táblázat).

Az antimikrobiális hatás vizsgálatához azért, hogy legyen csípős-csípmentes pár a különböző színű genotípusokból, a *C. chinense* 'Pim. Ney.', és 'Bhut Jol.', illetve a *C. annuum* '11263', '11270' és 'Soroksári' paprikák mellett a *C. annuum* '3215/1' és a 3232/2' paprikákat is vizsgáltam (6. táblázat, 7. táblázat).



A LINE-1 retrotranszpozon inszerció vizsgálatához több keresztezést végeztem, melyek közül a 'Kaldom' × 'Black Pearl' kombináció volt sikeres. A keresztezésből 5 F<sub>1</sub> növényt neveltem, majd az öntermékenyítést követően kapott 196 F<sub>2</sub> egyedet fenotipizáltam, melyek közül 103-at genotipizáltam.

#### 4.2.2. Mintaelőkészítés

A Totál Monomer Antocianin tartalom (TMA), Totál Polifenol tartalom (TPC) és a vasredukáló képességen alapuló antioxidáns kapacitás méréshez (Ferric Reducing Ability of Plasma - FRAP) a termésfalból vett mintákat folyékony nitrogénben homogenizáltam. A kivonást metanol: desztillált víz: hangyasav (60:39:1%) elegyével végeztem. A kivonatokat 4300 rpm-en 20 percig centrifugáltam 4 °C-on, az így kapott felülúszót használtam a mérések során. A



vizsgálatokig a mintákat -32 °C -on tároltam. A Totál Flavonoid tartalom (TFC) méréshez szintén az erek és magok eltávolítása után maradt termésfalat használtam. A kivonatokat milliQ vízzel készítettem 1:10 arányban. A Totál Karotinoid tartalom (TC) meghatározásához a termésfalat etanol:acetón 1:1 arányú elegyével homogenizáltam, szűrés után a mintákat -32 °C -on tároltam. A kataláz (CAT) és peroxidáz (POD) enzimaktivitás méréshez a mintákat hideg 0,8 g/l PVP-vel és 1 mM EDTA-val kiegészített nátrium-foszfát pufferben (25 mM, pH 7,8) homogenizáltam, majd 12000 g-n 20 percig centrifugáltam 4 °C -on. Az így elkészített felülúszót használtam a vizsgálatokhoz. A Szuperoxid-diszmutáz (SOD) enzimaktivitás vizsgálatához 1 mM EDTA-val kiegészített 2 m/v% PVP tartalmú 50 mM-os nátrium-foszfát puffert alkalmaztam. A mintákat az előzőekhez hasonlóan centrifugáltam és a felülúszót használtam a mérésekhez. A vizsgálatokig minden kivonatot -32 °C-on tároltam. Minden genotípusból 3 technikai ismétlés készült.

#### 4.2.3. Totál Monomer Antocianin tartalom (TMA) meghatározás

A totál monomer antocianin tartalom mérést Giusti és Wrolstad által leírtak szerint végeztem. A 250 µl mintához 2-2 ml 0,025 M kálium-klorid (pH 1,0) és 0,4 M nátrium-acetát (pH 4,5) puffereket mértem. Tizenöt perc elteltével az abszorbanciát Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel mértem  $\lambda = 520$  nm és  $\lambda = 700$  nm hullámhosszúságon. Az eredményeket µg cianidin-3-glükózid/g száraz tömegre adtam meg, a következő formulát használtam ennek alapjául:

$$\text{TMA (cianidin - 3 - glükózid mg/l)} = \frac{A \times MW \times Df \times 10^3}{\varepsilon \times l}$$

Ahol  $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1,0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4,5}}$ , MW = 449,2 g/mol cianidin-3-glükózid, Df = hígítás,  $\varepsilon = 26,900$  extinkciós koefficiense a cianidin-3-glükózidnak (Giusti és Wrolstad, 1996).

#### 4.2.4. Totál Polifenol tartalom (TPC) meghatározás

A totál polifenol tartalmat Folin-Ciocalteu reagenssel mértem (1250 µl folin, 240 µl metanol:desztillált víz (80:20), 10 µl felülúszó, 1000 µl 0,7 M nátrium-karbonát)  $\lambda = 760$  nm-en, Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel (Singleton és Rossi, 1965). Az abszorbancia eredményeket mmol gallusszav/g száraz tömegre vonatkoztatva adtam meg a gallusszav standard (0, 6, 12, 18, 24, 30 µg/ml) kalibrációs görbéjéhez viszonyítva.

#### 4.2.5. Antioxidáns kapacitás meghatározás Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) módszerrel

Az antioxidáns kapacitást FRAP módszerrel határoztam meg (Benzie és Strain, 1996). A hangyasavas növényi kivonatokból 10-10 µl-t mértem a reakcióelegyhez (300 mM acetát puffer, 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), 20 mM FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O oldatok 10:1:1 arányú elegye) és 15 percen keresztül 37 °C-on inkubáltam a mintákat. A mérés λ=593 nm hullámhosszúságon történt Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel. Az antioxidáns aktivitást az aszkorbinsav standard (0, 6, 12, 18, 24, 30 µmol/l) kalibrációs görbéjéhez viszonyítva számítottam ki, így az eredményeket mmol aszkorbinsav egyenérték/g száraz tömegre vonatkoztatva adtam meg.

#### 4.2.6. Totál Flavonoid tartalom (TFC) meghatározás

A totál flavonoid tartalmat alumínium-klorid kolorimetriás módszerrel határoztam meg (Adefegha és Oboh, 2011). Eszerint 0,5 ml felülúszóhoz 1,5 ml 95% -os etanolt, 0,1 ml 10% -os alumínium-kloridot, 0,1 ml kálium-acetátot és 2,8 ml desztilláltvizet adtam. Az abszorbanciát λ = 415 nm-en mértem Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel. A flavonoid tartalmat a kvercetin standard (0, 20, 40, 80, 120, 160, 200 µg/ml) kalibrációs görbéjéhez viszonyítva számítottam ki, így az eredményeket mg kvercetin egyenértékben fejeztem ki 1 g száraz tömegre számítva.

#### 4.2.7. Totál Karotinoid tartalom (TC) meghatározás

A totál karotinoid tartalmat Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel mértem λ=452 nm-en és λ=472 nm-en, a vörös és sárga karotinoidok jellemző abszorpciós maximumán (Hornero-Méndez és Mínguez-Mosquera, 2001). Az eredményeket mg/kg szárazanyagban fejeztem ki. A totál karotinoid tartalom kiszámítását a következő képlet alapján végeztem:

$$TC = \frac{A \times V_{(ml)} \times 10^4}{A_{1cm}^{1\%} \times W_{(g)}}$$

Ahol A=az abszorbancia (λ=452 nm-en és 472 nm-en mérve), V<sub>(ml)</sub>=az extraktum térfogata, W<sub>(g)</sub>=a minta tömege és A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>=2009 vagy 2144 (a kapszantin és a β-karotin extinkciós koefficiense acetonban). A két mérés összege adja a totál karotinoid tartalmat.

#### 4.2.8. Kataláz (CAT) enzimaktivitás meghatározás

A kataláz aktivitás méréséhez a mintához foszfátpuffert (50 mM, pH 7) és 40 mM hidrogén peroxidot adtam (Xing et al., 2011). A hidrogén peroxid hozzáadása után az abszorbancia változását λ = 240 nm-en, 60 másodperces időközönként jegyeztem fel 5 percen át Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel. Az eredményeket U/g szárazanyagban adtam meg.

#### 4.2.9. Peroxidáz (POD) enzimaktivitás meghatározás

A peroxidáz aktivitás méréséhez 0,5 ml kivonatot 1 ml 8 mM gvajakolt és 100 mM nátrium-foszfátot (pH 6,4) tartalmazó pufferrel kevertem össze (Xing et al., 2011). Közvetlenül mérés előtt 1 ml 24 mM hidrogén peroxidot adtam hozzá. Az abszorbancia változást  $\lambda = 460$  nm hullámhosszon rögzítettem 60 másodperces időközönként 5 percen át Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel. Az eredményeket U/g szárazanyagban adtam meg.

#### 4.2.10. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimaktivitás meghatározás

A szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitásmérés alapja az enzim nitrokék-tetrazolium-klorid (NBT) fotokémiai redukció gátlásának mértéke (Beauchamp és Fridovich, 1971). A méréshez 100  $\mu$ l mintához 100  $\mu$ l kivonó puffert és 3 ml reakcióelegyet (2,35 ml 50 mM foszfátpuffer, 0,2 ml EDTA, 0,3 ml L-metionin, 0,1 ml NBT és 0,05 ml riboflavin) adtam. Két mérést végeztem el: az egyik elegyet sötétben tartottam, valamint a másik reakcióelegyet a reakció gyors elindításához 10 percig megvilágítottam. Az abszorbanciát  $\lambda = 560$  nm hullámhosszon mértem Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel. Az eredményeket U/g szárazanyagra vonatkoztatva adtam meg.

#### 4.2.11. Relatív génexpressziós vizsgálatok

Az RNS izolálását OMEGA E.Z.N.A.® Plant RNA kitel végeztem. RNS izoláláshoz a szöveteket azonos emeletről, illetve azonos fenofázisban mintáztam, a levelekből, illetve a termésekből történt mérések esetén 70-100 mg növényi mintából történt az RNS preparálás, a szíromlevél, bibe és portok esetén ez az érték 20-30 mg körül volt. Az izolált RNS-ek mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel, illetve agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A qRT-PCR technika egyik potenciális hibaforrása, hogy az esetlegesen a mintában maradt genomi DNS 'szennyeződés' fals reakciót adhat. Ezt megelőzendő, a cDNS első szálának szintézise előtt a mintákat DNaseI (ThermoScientific™) enzimmel kezeltem. Ehhez 1  $\mu$ g totál RNS-hez 1  $\mu$ l 10X puffer, 1  $\mu$ l DNaseI (1 U) enzimet adtam, a 10  $\mu$ l végtérfogatot DEPC vízzel állítottam be. A mixet 30 percig inkubáltam 37 °C-on, 1  $\mu$ l 50 mM EDTA hozzáadása után a mintákat még 10 percig 65 °C-on tartottam, majd agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem az emésztés sikerességét. Az esetleges genomi DNS szennyeződést PCR-rel is ellenőriztem a visszaírást követően, olyan primerek alkalmazásával, amelyeket exon-exon határra, vagy két exonra terveztem, így a kapott fragmentumok megléte, vagy hiánya, illetve azok hossza bizonyította a DNáz kezelés sikerességét. A DNáz kezelés után kapott elegyet használtam a cDNS első szálának szintéziséhez, amit a Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis kittel végeztem, oligo-dT és random primereket

alkalmazva a gyártó ajánlásai alapján. A qPCR-t Stratagene MX3000p készülékben végeztem, Thermo Scientific™ PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix-szel, 'standard cycling mode' beállítás alapján, ahol a primer kapcsolódási hőmérséklet 60 °C volt. A reakcióelegy összetevői a következők voltak 10 µl végtérfogatra, 5 µl 2X PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,75-0,75 µl forward és reverz primer, 1 µl cDNS (hígítás 1/50). Háztartási gén minden esetben az *actin* volt. A primerek tervezését az NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) honlapján elérhető primer tervező szoftverrel végeztem (http1) (8. táblázat). A qPCR biológiai és technikai ismétlései a következők szerint alakultak. A termékek esetén ugyanazon genotípus 2 egyedéről begyűjtött 3-3 minta szolgálta az alapot a biológiai ismétlésekhez. A levelek esetén szintén egy adott genotípus 2 külön egyedéről, azonos levélemeletről származtak a minták, 2 ismétlésben. A genotípusuk és a fenotípusuk szerint csoportosított F<sub>2</sub> növények esetén pedig, hogy kellő mennyiségű portok, porzószal és bibe álljon rendelkezésre, az azonos fenotípusos csoportokba tartozó 3 egyednek kerültek begyűjtésre a virágai (összesen 10-12 db). Minden mérést 3 technikai ismétlésben végeztem.

8. táblázat – Génexpressziós vizsgálatokhoz alkalmazott primerek főbb paraméterei

Primer	Szekvencia (5'-3')	T <sub>M</sub> [°C]	Amplikon hossza	Génbanki azonosító
<i>WD40 F</i>	AGGCATCAAGCGAGTGTGAA	59,96	92 bp	XM_016708729.2
<i>WD40 R</i>	CAAATAAGCGCCTGCCCATC	59,97		
<i>bHLH F</i>	TCCGTCTTCCTTTTGCCCTT	59,52	153 bp	XM_047414842.1
<i>bHLH R</i>	ATGGGTGGATTGGGCATTGT	59,96		
<i>Ca10g11650 F</i>	TGGCTGCAGTTGGGATCTTT	59,89	106 bp	NM_001324618.1
<i>Ca10g11650 R</i>	TCCCAACCATCACTTTGTCCT	59,22		
<i>Ca10g11690 F</i>	TACTCGCCTTCTGAGGAAGGTA	60,03	113 bp	XM_016699817.1
<i>Ca10g11690 R</i>	TGGTACTTGAGAAGTTCCGAGG	59,44		
<i>Ca10g11710 F</i>	GACAGCGAGCGATGTGAAAA	59,21	148 bp	XM_016689227.1
<i>Ca10g11710 R</i>	GGCACTTGAGAAGTTCTGTGG	59,12		
<i>CHS F</i>	GGCTTCGACCCTCAGTCAAA	59,97	283 bp	NM_001325005.1
<i>CHS R</i>	GCCGCAGAAACAAGCTCAAA	59,97		
<i>CHI F</i>	TTCTTGCTGGGATTAGAGGG	59,15	218 bp	XM_047399431.1
<i>CHI R</i>	CCCGTCAAGGGCGTAATCAT	60,18		
<i>F3H F</i>	GGCATGTGTGGATATGGACC	58,39	329 bp	NM_001324774.1
<i>F3H R</i>	CCTCCGGTGTGGATTCTG	60,15		
<i>F3'5'HF</i>	GCTCGAGTTTGACCCCAAGA	59,97	344 bp	XM_016693437.2
<i>F3'5'HR</i>	AGGTGGTCAGAAAGACTCGT	58,29		
<i>DFR F</i>	CTAACACAGAGAAGAGGCTGGTTT	62,57	99 bp	NM_001324777.1
<i>DFR R</i>	AATCGCTCCAGCTGGTCTCATCAT	64,08		
<i>ANS F</i>	ACCAGAACTAGCACTTGGCG	60,32	123 bp	XM_016712446.2
<i>ANS R</i>	ACGCACTTTGCAGTTACCCA	60,46		
<i>UFGT F</i>	TGGTAGCCATGCAGTTCCCTTT	59,92	186 bp	NM_001324611.1
<i>UFGT R</i>	GGGGTGTTCATTGCCTTGTTT	58,95		
<i>GST F</i>	CCTGTCATTGAAGAGGGCGA	59,75	358 bp	XM_016706620.2
<i>GST R</i>	TAAGGCTAGGGAGGTGGCTT	59,96		
<i>ACT F</i>	GGACTCCGGTGATGGTGT	58,61	175 bp	XM_016716696.2
<i>ACT R</i>	GTCCCTGACAATTTCTCGCTCAG	61,47		

#### 4.2.12. A növényi minták genotipizálása

A DNS-t az azonos levélemeletről származó mintákból E.Z.N.A.® HP Plant DNA Mini Kit protokoll szerint izoláltam kloroform:izoamilalkohol (24:1) alapú eljárással. Az MSAP technikához a DNS izolálás ugyanezzel az eljárással történt, gazdasági érettségben lévő termésekből. A preparált nukleinsav mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel, illetve agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Az izolált DNS-eket 20 ng/μl koncentrációra hígítottam a PCR-hez. A PCR-eket Bio-Rad iCycler készülékben végeztem, ThermoScientific™ DreamTaq polimeráz felhasználásával a gyártói protokoll alapján.

A degenerált primerekkel indított reakció körülmények az alábbiak voltak: 10 μl végtérfogatban 2 μl templát, 1 μl 10X DreamTaq™ Buffer, 0,2 μl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μl 2 mM dNTP, 0,75-0,75 μl primer, 0,05 μl 0,25 U DreamTaq™ polimeráz valamint 4,25 μl steril víz. Az alkalmazott PCR protokoll a következő szerint alakult: 2 perces 95 °C előciklus, 35 cikluson keresztül: 95 °C-on 30 mp-ig tartó denaturálás, 60 °C-on 30 mp-ig primer kapcsolódás, 72 °C 1 percig DNS szintézis, majd 5 perces 72 °C-on történő utópolimerizáció. A 9. táblázatban felsorolt retrotranszpozon inszerció, illetve a szekvenciabeli különbségek kimutatására szolgáló primerekkel indított PCR-ek protokolljai megegyeznek az előbb leírtakkal. A primerek tervezéséhez az NCBI Primer-Blast, illetve a Primer3 (<http2>) szoftvereket alkalmaztam.

Az SSR markerek esetén a PCR-t Touchdown programon indítottam, ahol az első 10 ciklusban 65 fokról, ciklusonként 1 fokkal csökken a primer kapcsolódási hőmérséklet, a fennmaradó 24 ciklus már mind 56 fokos primer kapcsolódási hőmérsékleten futott. Az iPBS markerek esetén a primer kapcsolódási hőmérséklet az alkalmazott primer függvényében került beállításra (9. táblázat). A PCR-t követően a termékeket minden esetben agaróz gélen választottam el. Ehhez, vizsgálattól függően 1-2% töménységű, 1 μg/ml EtBr-dal festett gélt használtam (1 vagy 2 g SeaKem® LE Agarose, 100 ml TBE puffer). A pontos allélméreték meghatározásához az SSR markerekkel kapott termékeket poliakrilamid gélen is elválasztottam. Ehhez 6% poliakrilamid gélt (19:1 akrilamid:bisz-akrilamid) használtam, az elektroforézist ALF Express II (Amersham Biosciences, AP Hungary Kft., Budapest) készülékben végeztem. Az eredményeket ALFwin Fragment Analyser 1.0 szoftverrel értékeltem.

Az AFLP-hez a genomi DNS-t először *Mse*I, majd *Eco*RI restrikciós endonukleázokkal emésztettem. Az első emésztést 19,5 μl-ben végeztem (0,5 μg genomi DNS, 4 μl 10X Tango puffer, 0,5 μl *Mse*I, bidesztvízzel kiegészítve). A reakcióelegyet 65 °C-on inkubáltam 90 percig, majd 0,5 μl *Eco*RI enzimet adtam hozzá és egy éjszakán át 37 °C-on tartottam a mintákat. Az emésztett DNS-ekhez adaptereket ligáltam az Anza™ T4 Ligase Master Mix protokoll szerint.

Adapter-specifikus primerekkel preszelektív PCR-t végeztem, majd a PCR termék 50X-es hígítását használtam a szelektív PCR-ekhez, a szekvenciákat az 9. táblázat tartalmazza.

Az AFLP-hez hasonlóan történt az MSAP vizsgálathoz a mintaelőkészítés, a genomi DNS-t először *MspI* illetve *HpaII* enzimekkel emésztettem 17,5 µl-ben végtérfogóban (0,5 µg genomi DNS, 2 µl 10X Tango puffer, külön reakciókban 1-1 µl *MspI* illetve *HpaII*, bidesztvízzel kiegészítve). A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltam egy éjszakán át, majd inaktiváltam a reakciót. Ezt követően további 2 µl 10X Tango puffer és 0,5 µl *EcoRI* enzimet adtam hozzá a mintákhoz és egy éjszakán át 37 °C-on tartottam azokat. Hasonlóan az AFLP módszerhez, az emésztett DNS-ekhez adaptereket ligáltam, majd a preszelektív PCR termék 50X-es hígítását használtam a szelektív PCR-ekhez, a szekvenciákat az 9. táblázat tartalmazza. Az AFLP és az MSAP esetén poliakrilamid gélen történt a PCR termékek elválasztása. A módszerekhez 6% poliakrilamid gélt (19:1 akrilamid:bisz-akrilamid) használtam, az elektroforézist ALF Express II (Amersham Biosciences, AP Hungary Kft., Budapest) készülékben végeztem. Az AFLP és MSAP marker rendszerekkel kapott mintázatokat az elektroforézis után ezüstoffestéssel detektáltam. Az ezüstoffestés protokollja a következő szerint történt; fragmentumok fixálása 5 percen át (3 ml 65% HNO<sub>3</sub> + 200 ml MilliQ víz), poliakrilamid gél festése 27 percen át (0,4 g AgNO<sub>3</sub> + 200 ml MilliQ víz), fragmentumok előhívása 10-12 percen át (2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 200 ml MilliQ víz + 30% 70 µl formaldehid), előhívott fragmentumok fixálása 5 percen keresztül (62,5 ml 96%-os jégecet + 200 ml MilliQ víz), végül a gélt 10-15 percig rázattam tartósító oldatban (69 ml 87% glicerin + 200 ml MilliQ víz).

9. táblázat – Genotipizáláshoz használt primerek

Név	Szekvencia 5'–3'	T <sub>M</sub> [°C]	Felhasználás	Forrás
<i>650deg F</i>	CATGGAMTGARGAAGAAGATTTTCTWTTGAG	60	R2R3-MYB kimutatás	Saját tervezés
<i>650deg R</i>	AAGTCACCTCTCTTKATATGYGGCCT			
<i>LINE-1 F1</i>	GCAAAGAGCAAGGGACACAGCTC	60	Retrotranszpozon inszerció kimutatás	Saját tervezés
<i>LINE-1 F2</i>	GACGCGAATTACGGCAGAGGATTAG			
<i>LINE-1 R</i>	CGGTGTCTTGTGGATCGGACATCC			
<i>tARMS inner C F</i>	TTATGTGTCCGACGTTAGCCTC	60	Szekvenciabeli különbségek	Saját tervezés
<i>tARMS innen T R</i>	TGTCTTGTGGATCGGACATACA			
<i>tARMS outer F</i>	GCATACATTAACATTTTCTTTTAGCTGG			
<i>tARMS outer R</i>	AGCAATCATTCGAACCTTCACTAATTC			
<i>CAPS650 F</i>	GGCATCTTGTCCCATTAGAGCTG			
<i>CAPS650 R</i>	CAACTTCAACCTAACGGCCTCG			
<i>710Tdel F</i>	CCTGCTAGAGCTGGTCTGAAC AGATGCA	60		
<i>710Tdel R</i>	CTAATCAAGTAGATCCCATGAGTC			
MseI adapter F	GACGATGAGTCCTGAG	-	AFLP	Vos et al. 1995 alapján
MseI adapter R	TACTCAGGACTCATC			
EcoRI adapter F	CTCGTAGACTGCGTACC			
EcoRI adapter R	CATTGGTACGCAGTCTAC			
MseI preszelektív	GATGAGTCCTGAGTAA			
EcoRI preszelektív	GACTGCGTACCAATTC			
MseI-48	GATGAGTCCTGAGTAA-CAC			
MseI-55	GATGAGTCCTGAGTAA-CGA			
MseI-60	GATGAGTCCTGAGTAA-CTC			

MseI-61	GATGAGTCCTGAGTAA-CTG			
EcoRI-33	GACTGCGTACCAATTC-AAG			
EcoRI-36	GACTGCGTACCAATTC-ACC			
EcoRI-37	GACTGCGTACCAATTC-ACG			
EcoRI-44	GACTGCGTACCAATTC-ATC			
EcoRI adapter F	CTCGTAGACTGCGTACC			
EcoRI adapter R	AATTGGTACGCAGTC			
MspI/HpaII adapter F	GATCATGAGTCCTGCT	-		
MspI/HpaII adapter R	CGAGCAGGACTCATGA			
EcoRI preszelektív	GACTGCGTACCAATTCA	56		
MspI/HpaII preszelektív	ATCATGAGTCCTGCTCGG			
EcoRI-ATC	GACTGCGTACCAATTC-ATC			
EcoRI-AAG	GACTGCGTACCAATTC-AAG		MSAP	Reyna-López et al. 1997 alapján
EcoRI-ACG	GACTGCGTACCAATTC-ACG			
EcoRI-ACC	GACTGCGTACCAATTC-ACC			
MspI/HpaII-TCAA	ATCATGAGTCCTGCTCGG-TCAA	65		
MspI/HpaII-TCAC	ATCATGAGTCCTGCTCGG-TCAC			
MspI/HpaII-CAC	ATCATGAGTCCTGCTCGG-CAC			
MspI/HpaII-CAG	ATCATGAGTCCTGCTCGG-CAG			
MspI/HpaII-ACG	ATCATGAGTCCTGCTCGG-ACG			
MspI/HpaII-GTC	ATCATGAGTCCTGCTCGG-GTC			
CaMS_081 F	/5Cy5/AACAGCGCTGATCCTTTACC			
CaMS_081 R	CAACATCACAGTGGCAGAAGA			
CaGPM5_112 F	/5Cy5/TCCCTCAGCAGCAACAATTT			
CaGPM5_112 R	GTCGGGCTCTTTGATTGTGT			
CaMS_876 F	/5Cy5/TGTGTCTGAAGCGGAACAAA			
CaMS_876 R	AAGCAGTGAGCGACGAAGA			
CaMS_024 F	TGTTGAGGCTTGGGAAAAAC			
CaMS_024 R	CAAGATAATGGGTAGAAAGGCAAC	55-65	SSR	Cheng et al. 2016 alapján
CaGPM5_161 F	CGAAATCCAATAAACGAGTGAAAG			
CaGPM5_161 R	CCTGTGTGAACAAGTTTTTCAGG			
CaMS_163 F	TCCATATAGCCCCGTGTGTGA			
CaMS_163 R	GCGTGGGAATACAATGCTAGA			
CaMS_844 F	GCAAAGAAAAAGAAAAGCCTG			
CaMS_844 R	CTGCAACTGCTGCTTCATTC			
CaSSR1 F	/5Cy5/CCTGAAGCAAGATGTCGCTC			
CaSSR1 R	ATGACACACTTATCGGCGGA			
2074	GCTCTGATACCA	49,6		
2076	GCTCCGATGCCA	59,2		
2272	GGCTCAGATGCCA	55,0		
2277	GGCGATGATACCA	52,0		
2379	TCCAGAGATCCA	49,2		
2380	CAACCTGATCCA	50,5		
2382	TGTTGGCTTCCA	50,5		
220	ACCTGGCTCATGATGCCA	57,0		
2221	ACCTAGCTCACGATGCCA	56,9	iPBS	Kalendar et al. (2010) alapján
2222	ACTTGATGCCGATACCA	53,0		
2226	CGGTGACCTTTGATACCA	53,1		
2228	CATTGGCTCTTGATACCA	54,0		
2232	AGAGAGGCTCGGATACCA	55,4		
2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	55,0		
2257	CTCTCAATGAAAGCACCA	50,0		
2238	ACCTAGCTCATGATGCCA	56,0		
2402	TCTAAGCTCTTGATACCA	50,0		

#### 4.2.13. Oldható szárazanyag tartalom (SSC) és pH érték mérés

A termékek pH értékét Horiba (Kiotó, Japán) LAQUAtwin vízminőség mérőjével mértem, a °BRIX-értéküket pedig digitális refraktométerrel, PR-201α, ATAGO®, határoztam meg.

#### 4.2.14. A színárnyalatok meghatározása

A begyűjtött termésekről minden fenofázisban a mintagyűjtéskor fényképeket készítettem Pentax GR2 fényképezőgéppel, egy tárgysátorban, amit 5500 Kelvin fénnel világítottam meg (amely fotográfiai szempontból egyenértékű a déli napfénnel). Minden mintát 4 oldalról fotóztam, a képek RAW formátumban készültek. A képek színárnyalatát Adobe Photoshop CC (2019) programmal határoztam meg, a 4 kép átlagát tekintettem az adott termésre jellemző színárnyalatnak. A HEX-értékeket MS Excel 2202-es verziójában konvertáltam decimálisra a =HEX.DEC függvény segítségével és összehasonlítottam a többi mérés eredményével.

#### 4.2.15. Statisztikai módszerek

Az átlag, szórás és F értékek kiszámolását az IBM SPSS Statistics version 25 program segítségével végeztem. A beltartalmi, illetve antimikrobiális vizsgálatok esetén a mért eredményeket ANOVA teszttel hasonlítottam össze egymással IBM SPSS Statistics version 25 program használatával. A 95%-os megbízhatósági szintet (P-érték <0,05) tekintettem statisztikáikat szignifikánsnak. Emellett Pearson módszerrel viszonyítottam az adatokat, amely esetében a korrelációs koefficiens 0,01-es és 0,05-ös szinten is vizsgáltam. A génexpressziós mintázatot ddCT módszerrel elemeztem, az eredményeket TBtools program segítségével vizualizáltam egy hőtésképen, illetve IBM SPSS Statistics version 25-ben készült boxplot segítségével (Chen et al., 2020). A filogenetikai elemzéseket a MEGA-X (version 10.2.0.) alkalmazással, a szekvenciák illesztését pedig a MUSCLE szoftverrel végeztem. A 'Neighbor joining' klaszter analízis 'Maximum Likelihood' módszer alapján készült, a nukleotid szekvenciák esetén a Tamura-Nei, az aminosav szekvenciák esetén pedig Jones-Taylor-Thornton modell szerint. A dendrogram csomópontjainak megbízhatóságát 1000 ismétléses bootstrap eljárással ellenőriztem. Az F<sub>2</sub> növények esetén az egyes szervekre vonatkoztatott szín erősséghez kötött értékének eloszlását IBM SPSS Statistics version 25-ben készült hisztogramon ábrázoltam. A nemesítési vonalak genotipizálásának kiértékeléséhez a Past4.03 szoftvert használtam (Hammer et al., 2001). A korrelogram és a dendrogramok RStudio (version 2023.03.0 +386) segítségével készültek.

### 4.3. Az egyes vizsgálatok részletes leírása

#### 4.3.1. Antociánosodó nemesítési vonalak genotipizálása

Az antocián termelődéséért felelős *MYBa*, valamint az antocián bioszintézisét feltehetőleg szabályozó két másik R2R3-MYB transzkripció faktorok konzervált régióira NCBI-Primer-BLAST program segítségével degenerált primereket terveztem a különböző gének kimutatására. Az antocián felhalmozódást felerősítő retrotranszpozon inszerció kimutatására alkalmas



primerekkel szűrtem az extrém lila paprikákat. A három R2R3-MYB transzkripció faktor promóter és kódoló régiójának szekvenálásához a PCR termékeket a gélből a Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-Up Kit segítségével tisztítottam vissza a gyártói ajánlások alapján. A tisztított PCR termékek direkt szekvenálása után (BIOMI Kft., Gödöllő), a különbségekre SNP kimutatásra alkalmas tetra-primer amplification refractory mutation system (tARMS) primer rendszert terveztem (Truong et al., 2011). Ez egy egyszerű és gazdaságos SNP-genotipizálási módszer, amely csak egyetlen PCR-t és az azt követő gélelektroforézist foglalja magába. A tetra-primer ARMS-PCR négy primert használ egyetlen PCR-ben a genotípus meghatározásához. Az allélspecifikus primerek esetében a hibás illeszkedés a 3' végén található, melynek következménye, hogy egy adott primer csak az SNP egyik alléljára specifikus. Mivel a DNS-polimeráz kizárólag olyan primer meghosszabbítására képes, melynek 3' vége tökéletesen komplementer a templáthoz, így csak akkor keletkezik PCR-termék, ha ez a feltétel bekövetkezik. A hamis pozitív eredmények kiküszöbölése érdekében a primereket úgy terveztem, hogy 3' végük második pozíciójában is legyen egy mismatch. Az inter-primer binding site (iPBS) vizsgálatok alapja a reverz transzkriptáz kötőhely (PBS) jelenléte az LTR retrotranszpozonokon. Az erre a szakaszra tervezett primerrel a két ellentétes irányultsággal előforduló PBS közti régió felszaporítható (Kalendar et al., 2010). Továbbá CAPS, SSR, MSAP és AFLP módszerekkel genotipizáltam (Cheng et al., 2016; Reyna-López et al., 1997; Vos et al., 1995). A növényanyag a 4.2.1. fejezetben került ismertetésre, a markerek szekvenciáit a 9. táblázat tartalmazza.

#### 4.3.2. *LINE-1 retrotranszpozon inszerció hatása az antocián bioszintézisre*

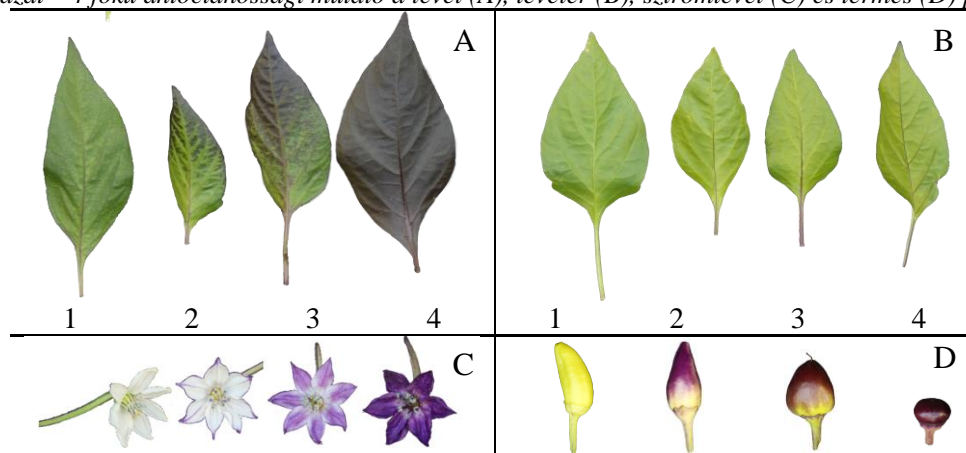
A kísérlet előzményeképp olyan fajtákat kerestem, amelyek tartalmazzák a LINE-1 retrotranszpozon inszerciót. Ezek a kereskedelmi forgalomban is kapható *C. annuum* 'Azteco', 'Cancun', 'Black Pearl' és 'Royal Black' fajták voltak, illetve a PepGen Kft.-től kapott *C. annuum* 'Zulu'-t fajta. A fajták közös jellemzője, hogy mind a vegetatív mind a generatív szerveik nagyfokú antocián felhalmozódást mutatnak. A keresztezésekhez több kombinációt alkalmaztam, ezekből a *C. annuum* 'Kaldom' és *C. annuum* 'Black Pearl' keresztezés volt sikeres. A keresztezések előtt a 'Kaldom'-ot kasztráltam és a 'Black Pearl' egyedekről gyűjtött pollennel poroztam. Az irányított beporzást követően a megporzott virágokat jelöltem és izoláltam. A keresztezéshez alkalmazott fajták tulajdonságait (egyedek színeit) az alábbi táblázat foglalja össze, ahol a gazdaságilag érett termés: GÉ, a biológiailag érett termés: BÉ (5. táblázat).

5. táblázat – Keresztezési partnerek tulajdonságai, a cellák színe az adott szövet színét jelöli

	Szár	Nódusz	Levél-nyél	Levél-lemez	Levérrér	Sziromlevél	Portok	Bibe	Csészelevél	GÉ	BÉ
'Black Pearl'	purple	purple	purple	purple	purple	purple	purple	purple	purple	purple	red
'Kaldom'	green	light purple	green	green	green	white	purple	white	green	green	red

Az F<sub>1</sub> nemzedéket két csoportra osztottam, az egyik csoportot természetes fény alatt tartottam, a másik csoportot pedig növénynevelő lámpa alatt [Osram Floura (2800 lm) + Sylvania DaylightStar (6500 lm)]. A fény és a retrotranszpozon inszerció hatását mind a vegetatív, mind a generatív szerveken vizsgáltam, levelek mellett a gazdaságilag és a biológiailag érett termésekről vettem mintát. Az analitikai és génexpressziós vizsgálatok a 4.2. fejeztben leírtak szerint történtek, a primereket a 8. táblázat tartalmazza. Az F<sub>1</sub> növények önbeporzását követően 196 darab F<sub>2</sub> növény fenotípusos adatait felvételeztem két hetente. Az adatok értékelését a vegetatív szervek közül a nódusz, szár, lomblevél, levélér, levélnyél, a generatív részek közül pedig a csészelevél, sziromlevél, portok, bibe és termés szín tekintetében egy négy fokú skálával végeztem (6. táblázat). A növényeket üvegházban neveltem, Potgrond H palántaföldben 15\*15 cm-es tenyészedényekben.

6. táblázat – 4 fokú antociánossági mutató a levél (A), levélér (B), sziromlevél (C) és termés (D) példáján



A fenotipizálás mellett 103 növényt genotipizáltam is, a 4.2.12. fejeztben ismertetett protokoll szerint.

#### 4.3.3. CaMYBa vírus indukálta géncsendesítése (VIGS)

A transzformáláshoz szükséges *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , valamint *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 tenyészetek fenntartására és szaporítására LB (Luria-Bertani) tápközeget alkalmaztam. A kísérlet során szükséges szelektív LB tápagarból két változatot készítettem: az egyik

kanamicint (25 mg/l), a másik kanamicint (25 mg/l) és rifampicint (10 mg/l) is tartalmazott. Előbbit az *E. coli*, utóbbit *A. tumefaciens* tenyészetek szelekciójára használtam.

A VIGS-hez pTRV-1, pTRV-2 (Tobacco Rattle Virus) vektorokat használtam, illetve kontrollként pTRV-PDS konstrukciót alkalmaztam. A vektorok összeállítása a következő protokoll alapján történt: *EcoRI* és *BamHI* Thermo Scientific™ Anza™ duplaemésztést követően, a pTRV-2 vektort a Macherey-Nagel NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit segítségével tisztítottam vissza a gyártói ajánlás alapján. Az inszert felszaporítása BioRad iCycler PCR készülékben történt Thermo Scientific™ Phusion™ High-Fidelity polimeráz segítségével a gyártói protokoll alapján a 10. táblázatban található primerekkel.

10. táblázat – A *Ca10g11650* gén csendesítéséhez alkalmazott primer pár

Primer név	Szekvencia (5'-3')	T <sub>M</sub> [°C]	Amplikon hossza	Génbanki azonosító
Ca10g11650_V F	<u>ctagaattc</u> GTACTAAGACCTCGCCCT	59,7		
Ca10g11650_V R	tcaggatccCCACCATTGAACTCCATCATC	63,0	189 bp	NM_001324618.1

Az inszert előkészítése is hasonlóképp történt, mint a pTRV-2 vektoré. A ligálást Thermo Scientific™ Anza™ T4 Ligase Master Mix protokoll szerint végeztem. Az így kapott rekombináns konstrukcióval először *E. coli*-t majd *A. tumefaciens*-t transzformáltam CaCl<sub>2</sub> kezelést követő hősokkos módszerrel. A transzformáció sikerességét kolónia PCR-rel ellenőriztem. Az *A. tumefaciens* transzformációját követően *Nicotiana benthamiana* növényeket agroinfiltráltam. Ehhez az *A. tumefaciens* telepekből agroleoltó oldattal egy éjszakára folyékony tenyészetet indítottam (5 ml) 28 °C, ennek összetétele 100 ml oldat összeállításakor: 1 ml 2M MES, 100 µl kanamicin (50 mg/ml), 500 µl rifampicin (10 mg/ml) és 2 µl 1M acetosziringon 100 ml-ig föltöltve steril LB-vel. Ezt követően a baktérium szuszpenziót centrifugáltam szobahőn (21-25 °C), 4000 rpm, 15 percig, a felülúszó leöntése után a pelletet az infiltrációs oldattal szuszpendáltam (500 ml oldat esetén: 5 ml 2M MES, 2,5 ml 2M MgCl<sub>2</sub>, 75 µl 1M acetosziringon 500 ml-ig föltöltve steril MilliQ vízzel). Az így kapott oldatokat Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel mértem és beállítottam az optikai denzitásukat, a pTRV-1 és pTRV-2 esetén OD<sub>600</sub>= 1,2, a P14 szupresszor esetén pedig OD<sub>600</sub>= 0,6 értékre. Az agroinfiltrálás előtt háromféle 1:1:1 arányú keveréket állítottam elő: üres pTRV-1:pTRV-2:P14, saját konstrukciót tartalmazó pTRV-1:pTRV-2:P14 és pTRV-1:pTRV-2-PDS:P14. Négy leveles fiatal *N. benthamiana* növények 3-3 levelének a fonáki részét infiltráltam. A PDS konstrukció által okozott 'photobleaching' megjelenését követően a felső levélemelet tüneteket mutató leveleit mozsárban összetörtem, és karborundummal előzőleg beszórt szikleveles paprika (*C. annuum*

'Black Pearl') levelekbe dörzsöltem üvegbot segítségével. A géncsendesített növények génexpressziós vizsgálatai a 4.2.11. fejezetben leírtak szerint történtek, a 8. táblázatban felsorolt primerekkel.

#### 4.3.4. Beltartalmi mutatók, enzimaktivitás és antocián bioszintézis változása a termésérés során

A 4.2.1. fejezetben bemutatott növények közül a '11263', '11270', '11274', '11278', és '11280' nemesítési vonalak mellett, a 'Pim. Ney.' és a 'Soroksári' fajtákat használtam. A növényeket üvegházban neveltem, 15\*15 cm-es cserepekben, Potgrond H palántaföldben.

A növényekről a termésérés négy jól behatárolható érésfázisában 10-10 darab termést gyűjtöttem: két gazdaságilag érett fázisban 20 és 30 nappal a terméskötés után (GÉ1 és GÉ2), ezen kívül 40 nappal terméskötés után, a kormos fázisban (K), és végül a teljes biológiai érettségen túl, 60 nappal terméskötés után (BÉ). A terméseket steril szikével felvágtam, a magokat és az erezetet eltávolítottam, a termésfalat pedig folyékony nitrogénben fagyasztottam. Felhasználásig -70 °C-on tároltam a mintákat. Mintaszedéskor a terméseket fotóztam, hogy meghatározzam az átlagos színárnyalatukat a 4.2.14. fejezetben leírtak szerint. Az oldható szárazanyag tartalom és a pH mérést a 4.2.13. fejezet alapján végeztem. A beltartalmi mutatók és enzimaktivitás mintaelőkészítései és mérései – TMA, TPC, TFC, FRAP, TC, SOD, CAT, POD – a 4.2. fejezetben leírtak szerint történtek mind a 4 érésfázis esetén. Ezzel párhuzamosan zajlott a génexpresszió vizsgálata is, a 4.2.11. fejezetben leírtak szerint. A vizsgált géneket a 8. táblázat tartalmazza.

#### 4.3.5. Paprika extraktumok antimikrobiális hatása

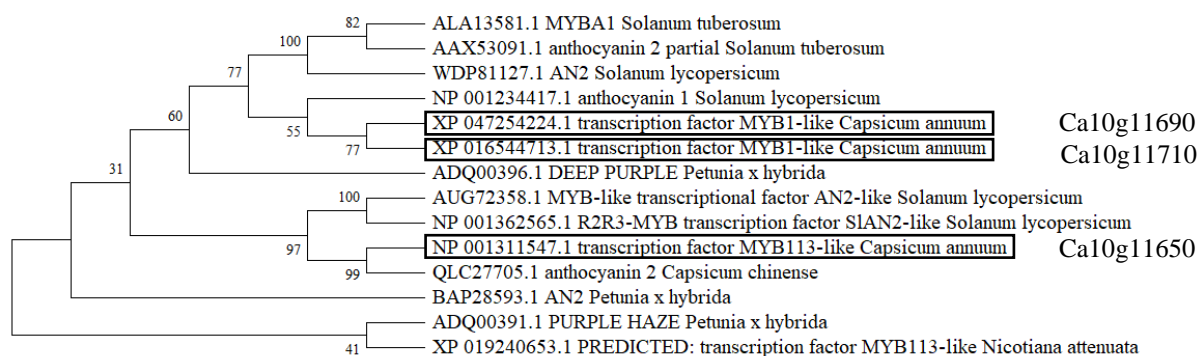
A paprika kivonatok antimikrobiális hatásának vizsgálatát agardiffúziós módszerrel határoztam meg a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M02 kissé módosított protokollja alapján. A hatóanyagok teszteléséhez négy Gram-pozitív (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 15433, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) és három Gram-negatív (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145) baktériumot használtam fel. A mikrobákat Mueller-Hinton táptalajon tenyésztettem egy éjszakán át, majd egy-két telepet fiziológiás sóoldatban (8,5 g/l NaCl) felfuszpendáltam és a sejtek koncentrációját 0,5 McFarland értékre állítottam (ez *E. coli* esetében kb.  $1-2 \cdot 10^8$  sejtnek felel meg, optikai denzitása kb.  $OD_{600} = 0,1$ ). Ezekből a szuszpenzióból 100-100  $\mu$ l-t szélesztettem Mueller-Hinton táptalajokra, majd a beszáradást követően 6 mm átmérőjű dugófuróval 5-6 lyukat készítettem egy táptalajon úgy, hogy a lyukak lehetőleg egyenletes távolságra helyezkedjenek el egymástól. Az így kialakított lyukakba pipettáztam 100  $\mu$ l-t a kivonatokból, melyeket metanol:desztillált

víz:hangyasav 60:39:1 térfogat százaléku elegyével nyertem ki. A metanol:desztilláltvíz:hangyasavas kivonatok esetén 1 g előzőleg liofilizált paprika port 10 ml extraháló szerrel rázattam egy éjszakán át, majd 20 percig centrifugáltam 12 000 rpm fordulatszámon 4 °C -on. Ezt követően a felülúszót egy 0,45 µm pórusméretű szűrőn átszűrtem és a vizsgálatához a szűrletet használtam fel (Ameya et al., 2018). Az így elkészített kivonatokról az oldószert elpárologtattam, majd a visszamaradt anyagból 100 mg/ml-es oldatokat készítettem metanol:desztilláltvíz:hangyasav oldószerezrel és ennek határoztam meg az antimikrobiális hatását. A hatóanyagok lyukakba pipettázását követően a csészéket 24 órán keresztül 35±1 °C-on inkubáltam, majd a gátlási zónák átmérőjét milliméter pontossággal lemértem. A vizsgálatokat három ismétlésben végeztem el, és az eredményeket statisztikailag értékeltem. A kivonatokat a 4.2.1. fejezetben ismertetett növényekből készítettem, a színesedő *C. annuum* vonalakból 2 érésfázisból (GÉ2 és BÉ), míg a nem színesedő *C. chinense* paprikákból csak teljes biológiai érettségben lévő termésekből.

## 5. Eredmények és értékelésük

### 5.1. Antociánosodó nemesítési vonalak genotipizálása

A kísérletek középpontjában három R2R3-MYB transzkripciós faktor áll. Ezek közül a kutatásom kezdetén csak a *CaMYBa* avagy a *CaAN2* a (továbbiakban *Ca10g11650*) génről bizonyították, hogy szabályozza az antocián bioszintézist a paprika vegetatív és generatív szöveteiben egyaránt. A *Ca10g11650* génnek a vizsgálatok során nem találtak különbséget a gén kódoló régiójában egy antociánosodó és egy nem liluló fajta esetén, ezért feltételezték, hogy a pigmentációbeli különbségeket az esetlegesen a promóter régióban található polimorfizmusok okozzák (Borovsky et al., 2004). A *Ca10g11650* gén kódoló régiójának vizsgálatok során nem találtak különbséget a liluló és nem liluló egyedek közt, ami megegyezik Borovsky és munkatársai (2004) eredményeivel. Ugyanakkor a *Ca10g11650* promóterének szekvenálásakor, a nem specifikus primer tapadás miatt két másik, ugyanúgy a 10. kromoszómán található R2R3-MYB transzkripciós faktort kódoló génről is amplifikálódott fragmentum, amelyek a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* voltak, melyet nemrég azonosítottak *CaP*, illetve *CaAN3* génekként. A kutatás kezdetén így kérdésként merült föl, hogy a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* részt vesz-e az antocián bioszintézis szabályozásában. Először egy filogenetikai analízist végeztem, és a fehérjeszekvenciák alapján hasonlítottam össze a *Solanaceae* családon belül leírt, az antocián bioszintézisben aktivátor szerepet betöltő R2R3-MYB transzkripciós faktorokkal (4. ábra).



4. ábra – A *Solanaceae* család képviselőiben már leírt R2R3-MYB transzkripciós faktorok és a paprika *Ca10g11650*, *Ca10g11690* és *Ca10g11710* R2R3-MYB transzkripciós faktorainak filogenetikai elemzése aminosav sorrend alapján

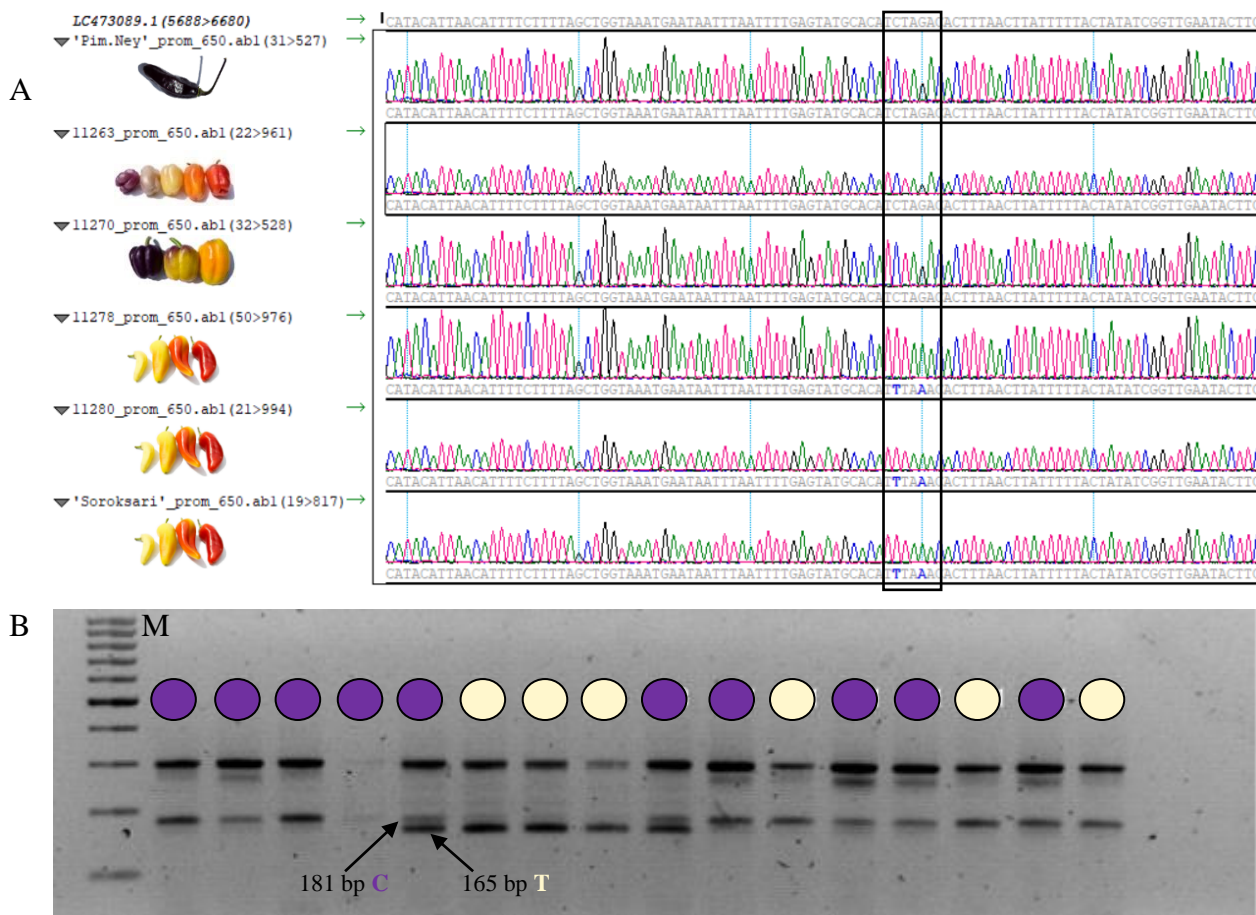
Aminosav sorrendjük alapján a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* azonos kládba került, a paradicsomban már leírt antocián bioszintézist szabályozó SlANT1 transzkripciós faktorról (NP\_001234417.1), így feltehetőleg ez a két R2R3-MYB is szerepet játszik bioszintetikus

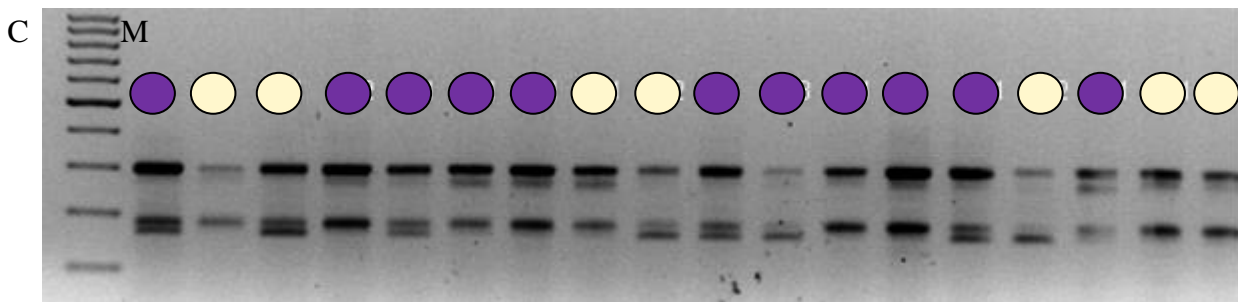
útvonal szabályozásában (4. ábra). Degenerált primereket terveztem a három transzkripciósfaktor konzervált régióira, hogy vizsgálni tudjam, hogy az eltérő színváltozatokat ezeknek a géneknek a megléte, vagy hiánya okozza-e. Vizsgálataim során a vegetatív és generatív szövetek színétől és a vizsgált fajtától, illetve fajtól függetlenül, a *Ca10g11650* gén mellett a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* gént jelképező fragmentum is felszaporodott (5. ábra).



5. ábra – Degenerált primerekkel amplifikált termékek elválasztása, mintasorrend: 1: 11263, 2: 11270, 3: 11274, 4: 11278, 5: 11280, 6: 'Soroksári', 7: 'Pim.Ney.', 8: 'Bhut.Jol.', M: ThermoScientific™ GeneRuler 100 bp

A *Ca10g11650* gén promóter régiójában SNP polimorfizmusokat azonosítottam a -600. és a -603. pozíciókban, amelyek konzekvensen eltértek a liluló és nem liluló genotípusokban. Ezekre a báziscserékre tARMS primer rendszert tervezve vizsgáltam *Capsicum annum* × *Capsicum chinense* hibrid családot és az antociánosodó mutáns nemesítési vonalakat (6. ábra).





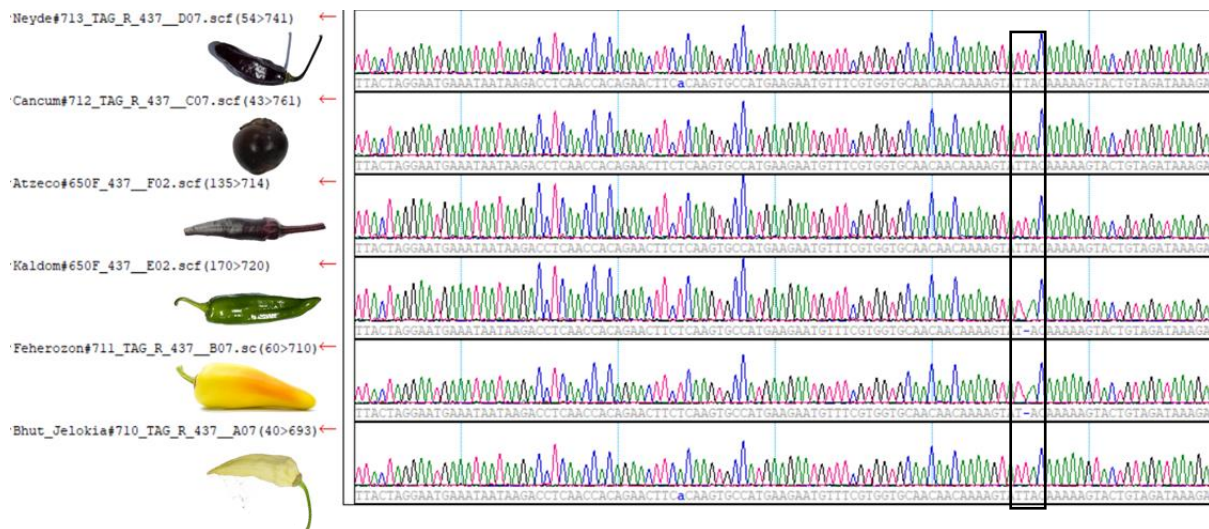
6. ábra – A: *Ca10g11650* promóterében talált SNP-k, B, C: az SNP-re tervezett tARMS primerrel amplifikált fragmentumok szinkódolva, mintasorrend B: 'Black Pearl', 'Pim.Ney.', 11263, 11270, 11274, 11278, 11280, 'Soroksári', *C. ann* × *C. chi* hibridek 15, 19, 24, 30, 36, 38, 43, 137, mintasorrend C: *C. ann* × *C. chi* hibridek: 6, 9, 10, 11, 13, 17, 23, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 40, 41, 46, 48, 139, M: ThermoScientific™ GeneRuler 100 bp

Liu és munkatársai (2020) a *CaMYBa* (*Ca10g11650*) promóter régiójában -1000 bázispárig nem mutattak ki különbséget az általuk vizsgált genotípusokban. Ugyanakkor, az általam vizsgált genotípusok esetén két SNP is konzekvensen eltért a különböző színű genotípusok közt. A -603. pozícióban lévő citozin – timin báziscserére tervezett tARMS markerrel vizsgáltam a különböző mértékben antociánosodó genotípusokat. A legnagyobb fragmentum a két outer primer által felszaporított 302 bp szakaszt jelöli, amely minden minta esetén amplifikálódott (6. ábra). A liluló paprikák a -603. pozícióban citozint tartalmaznak, 181 bp hosszú fragmentumot produkálva, míg a nem liluló minták esetén a szekvencia adatok alapján ugyanebben a pozícióban timin található, és az erre a nukleotidra jellemző 165 bp hosszú szakasz amplifikálódik. Ugyanakkor, míg a 'Pim. Ney.', 'Black Pearl' esetén a termés lilul és ennek megfelelően a C allél amplifikálódott, addig voltak olyan genotípusok, például a keresztezésekhez anyaként használt nem liluló fűszer típusú 137 és 139 kódú egyedek, ahol szintén a 181 bázispár hosszú fragmentum szaporodott fel (6. ábra). Ezáltal kijelenthető, hogy ezek primerek nem alkalmasak a lila és nem liluló paprikák megkülönböztetésére. Így ez a vizsgált SNP feltehetőleg inkább csak az egyes genotípusokra jellemző különbség, és nem ez okozza a fenotípusos eltéréseket.

Az előző kutatásokkal ellentétben Ohno és munkatársai (2020) szekvenciabeli különbséget azonosítottak a *CaMYBa* kódoló régiójában a nem liluló és a lila genotípus közt. Ez a negyedik exonban talált különbség a *HaeIII* restrikciós helyet érintette, a liluló genotípusban ez a hely nem intakt. Az általam vizsgált genotípusokban nem találtam különbséget az ebben a régióban a *HaeIII* restrikciós helyben bekövetkezett G/A báziscsere alapján. Más genotípusokat szekvenálva Babak és munkatársai (2020) szintén a *CaMYBa* negyedik exonjában írtak le több SNP-t, amelyek közül az egyikre CAPS markert tervezve el tudták különíteni a lila termésű genotípusokat. Ugyanebben a kutatásban a *Ca10g11710* harmadik exonjában is azonosítottak polimorfizmusokat, amelyek alapján meg tudták különböztetni a terméseket. Egy timin deléció



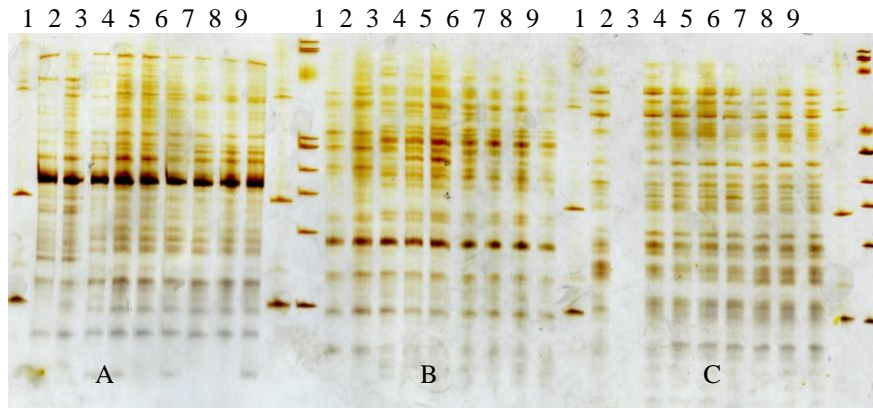
alapján csoportosítani tudták a lila termésű és a nem liluló termésű egyedeket (Babak et al., 2020). Az általam vizsgált genotípusok esetén a *CaMYBa* kódoló régiójában nem volt különbség a *C. chinense* 'Pim.Ney.', *C. annuum* 11270 nemesítési vonal és a szintén *C. annuum* 'Soroksári' fajta összehasonlításakor. A *Ca10g11710* gén tekintetében pedig a Babak és munkatársai által közölt *C. annuum* paprikák adataitól eltérő eredményt kaptam a fehér színű *C. chinense* 'Bhut Jolokia' paprika esetén. Ez a paprika a lila fenotípusú növényekre jellemző szekvenciával mutatott egyezést (7. ábra).



7. ábra – A *Ca10g11710* génben azonosított timin deléció a fehér színű Bhut Jolokia esetén eltérő eredménnyel

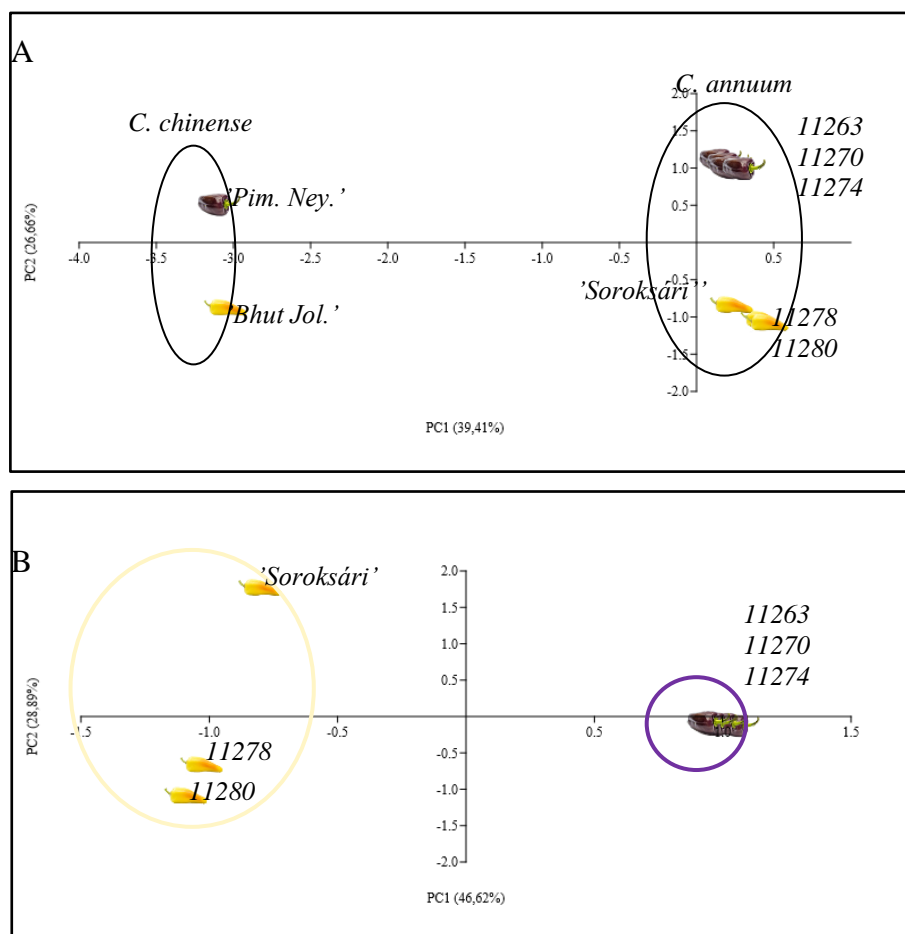
Ezek a szekvenciabeli polimorfizmusok adódhatnak abból, hogy a különböző kutatások eltérő fajokat, azon belül is eltérő genotípusokat vizsgálnak, és ezek a detektált SNP-k nagymértékben genotípus, esetleg faj függőek.

Mivel a szekvencia polimorfizmusok nem vezettek konzekvens eredményre, a tARMS marker rendszeren túl SSR, iPBS, AFLP és MSAP módszerekkel vizsgáltam a növényeket. Az AFLP vizsgálatokhoz a 'Pim. Ney.'-t, és a 'Bhut Jolokiát' (*C. chinense*), a retrotranszpozont tartalmazó 'Royal Black'-et, a nem liluló 'Soroksárit' és a 11263-tól 11280-ig kódjelű különbözőképpen antociánosodó mutánsokat alkalmaztam. A legtöbb szelektív primer kombináció monomorf mintázatot eredményezett, a polimorfizmust mutatókkal főleg csak fajok között tudtam különbséget kimutatni, fenotípushoz köthető fragmentum nem szaporodott fel (8. ábra).



8. ábra – A primer kombináció: Eco33/Mse55, B: Eco33/Mse61, C: Eco33/Mse48, mintasorrend: 1: 'Pim. Ney', 2: 'Bhut Jolokia', 3: 'Royal Black', 4: 11263, 5: 11270, 6: 11274, 7: 11278, 8: 11280, 9: 'Soroksári'

Az MSAP-hoz a *C. chinense* 'Pim. Ney.', 'Bhut Jolokia' és a *C. annuum* 'Soroksári', illetve a 11263-11280 nemesítési vonalakat alkalmaztam. A DNS-t gazdasági és biológiai érettségű bogyókból izoláltam. Hasonlóan az AFLP-hez, az alkalmazott primerkombinációk többsége monomorf mintázatot adott, fenotípushoz köthető fragmentum nem kaptam. Mivel önállóan egyik marker rendszer sem volt alkalmas a növények termésszín szerinti megkülönböztetésére, ezért összesítettem az SSR, iPBS és az AFLP marker adatokat az öt vizsgált generációban mind a nyolc genotípus esetén. Összesen 120 növényt vizsgáltam, minden genotípusból generációnként hármat, hasadást csak a 11274 nemesítési vonal esetén tapasztaltam. Az összegzett marker eredmények alapján az egyes csoportok közötti euklideszi távolság kialakításában az első komponens – ami az ábrán is jól látható, hogy a fajjal van a legszorosabb összefüggésben, és így ezt magyarázza – 39,41%-ban vesz részt. Míg a második komponens, ami az ábra szerint a színekkel van a legszorosabb összefüggésben 26,66%-ban járul ehhez hozzá (9. ábra).



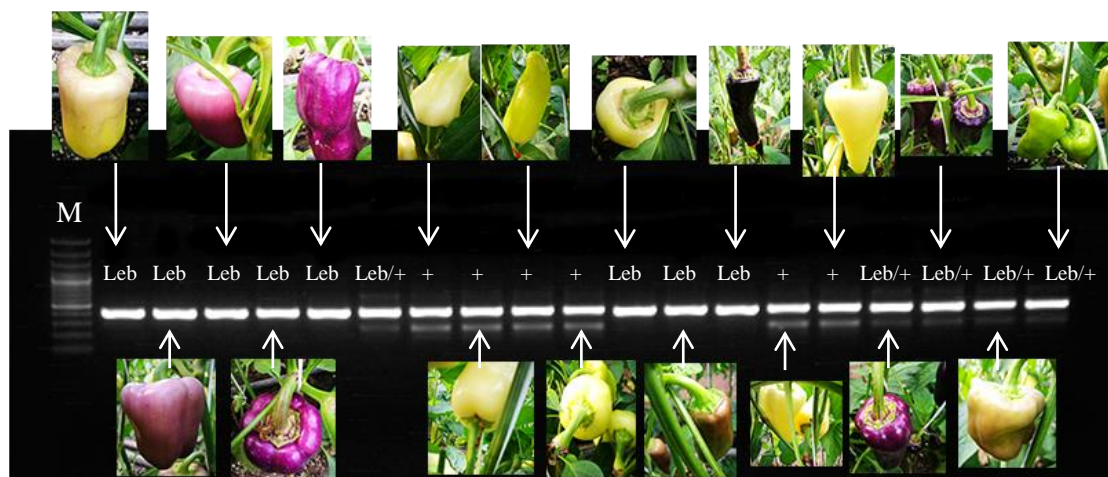
9. ábra – Főkomponens analízis az összesített marker adatok alapján, a paprikák színe a termékek színét jelenti, a minták kódja szerepel feliratként, (9/A esetben  $n=120$ , 9/B esetben  $n=90$ )

Ha azonban az alapsokaságból kivesszük a *C. chinense* mintákat, akkor a legjelentősebb komponenssé a szín lép előre és ez ilyen módon a csoportok közötti euklideszi távolság kialakításához 46,62%-ban járul hozzá (9. ábra).

A liluló paprikákat a *CaMYBa* génbe történt LINE-1 non-LTR-retrotranszpozon inszerció jelenlétére is szűrtem. Az antociánosodó termésű nemesítési vonalakban nem tudtam ezt kimutatni, ellenben az extrém mértékben liluló kereskedelmi forgalomban is kapható *C. annuum* 'Azteco', 'Black Pearl', 'Cancun', 'Royal Black' fajták esetén, illetve a PepGen Kft. által biztosított *C. annuum* 'Zulu' fajtában tudtam bizonyítani az inszerciót. Annak ellenére, hogy a *C. chinense* 'Pim.Ney.' az előbb felsorolt fajták némelyikétől magasabb antocián felhalmozást mutat, nem hordozza a *CaMYBa* génbe inszertálódott LINE-1 retrotranszpozont, így nem ez a genetikai elem felelős az extrém mértékű lilulásáért.

A 9. táblázatban felsorolt markerek nem voltak elegendők a termésszín szerinti szelekcióra. Több marker bevonásával, vagy kapcsolt markerek alkalmazásával már valószínűbb, hogy lehetett volna csoportosítani a genotípusokat a termés antocián felhalmozása alapján. A 9. táblázatban szereplő SSR1 marker mindössze 18925 bázispárra van az A lókusztól 5' irányban,

ugyanakkor ez a marker sem tudott egyértelműen különbséget jelezni a minták közt (10. ábra). Ez az SSR marker a 10. kromoszómára (ASJU01076029.1) specifikus és 401 bázispár hosszú fragmentumot eredményez minden mintában. A heterozigóták, illetve azon genotípusok esetén, amelyek nem lilulnak gazdasági érettségben a 401 bázispár hosszú fragmentum mellett egy rövidebb fragmentum is amplifikálódott, amit a teljes genomra való illesztés után az 5. kromoszómán (ASJU01101831.1) helyezkedik el egy még nem karakterizált lókuszban (10. ábra).



10. ábra – SSR1-el amplifikált fragmentumok különböző mértékben antociánosodó mutáns nemesítési vonalak esetén, Leb – gazdasági érettségben lila termés, M: ThermoScientific™ GeneRuler 100 bp Plus

Azokban a genotípusokban, amelyekben az antocián termelés nem hozható összefüggésbe az eddig már leírt genetikai komponensekkel, célszerű lenne térképezési populációkat létrehozni a genotípus függő genetikai háttér egyedi meghatározására.

## 5.2. LINE-1 retrotranszpozon inszerció hatása az antocián bioszintézisre

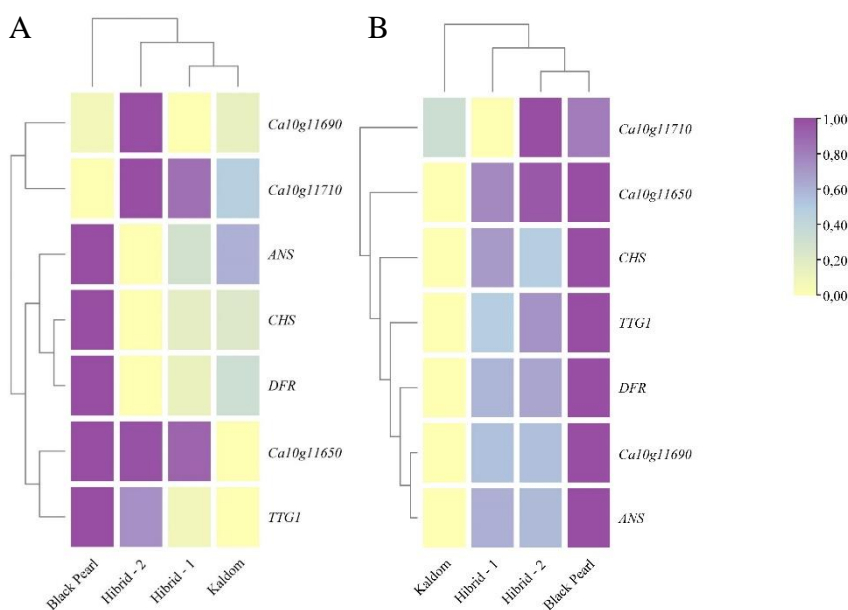
Ahhoz, hogy a *Ca10g11650* gén szerepét az antocián bioszintézisben vizsgálni tudjam egy hasadó populációt hoztam létre. A keresztezési partnerek közül az apaként használt 'Black Pearl' fajta egy extrém lila *C. annuum* paprika, amely a *Ca10g11650* génjében egy LINE-1 retrotranszpozon inszerciót hordoz. A kísérletnek célja az volt, hogy meghatározzam az extrém antociánosodást kiváltó LINE-1 retrotranszpozon öröklésmenetét, illetve, hogy a *Ca10g11650* mely szervekben fejt ki hatását.

### 5.5.1. $F_1$ nemzedék vizsgálata

A kísérlet előzményeképp genotipizáltam extrém mértékben liluló paprikákat, hogy kiderüljön hordozzák-e a retrotranszpozon inszerciót. A vizsgált növények közül ezt a *C. annuum* 'Zulu', 'Cancun', 'Royal Black', 'Azteco' és 'Black Pearl' fajták esetén tudtam kimutatni. Ezek közül a 'Black Pearl' volt keresztezési partner, több tulajdonsága miatt is; nagyon csokros megjelenése miatt gazdaságilag hasznosabb, illetve a gömb bogyó alak és az

antociánosodás közt már többen írtak le összefüggést (Chaim et al., 2003; Peterson, 1959). Anyaként a szintén csokros, de nem lila 'Kaldom' fajtát használtam. A mesterséges megporzást követően az F<sub>1</sub> növényeket 2 csoportra osztottam. Az első csoportot (Hibrid – 1) természetes fény alatt, a második csoportot (Hibrid – 2) pedig növénynevelő lámpa alatt tartottam, hogy a retrotranszpozon inszerción túl a fény antocián bioszintézisre gyakorolt hatását is vizsgálhassam.

A struktúrgének közül egy korai – *CHS* – és két kései gént – *ANS* és *DFR* – vizsgáltam. A szabályozó gének között három R2R3-MYB transzkripciós faktor (*Ca10g11650*, *Ca10g11690* és *Ca10g11710*), és egy WD40 transzkripciós faktor (*TTG1*) szerepelt. Az F<sub>1</sub> növények expressziós mintázatát összevettem a szülői genotípusokéval (11. ábra, M3. - 26. ábra).



11. ábra – F<sub>1</sub> és P nemzedék génexpressziós vizsgálata, A: levél, B: gazdaságilag érett termés esetén

A levelekből és a bogyókból izolált minták esetén nem csak a bioszintetikus út kései génjei, de a *CHS* is magasabb expressziót mutat a liluló genotípusokban, a legmagasabb expressziós szintje az extrém lila 'Black Pearl' esetén volt, ugyanakkor ennek mértéke nem volt szignifikáns. A levelekben a *Ca10g11650* expressziója a 'Kaldom' esetén nem kimutatható, de nem kiugróan magas a 'Black Pearl' esetén sem. Érdekes módon a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* is a 2. csoport esetén expresszált legerősebben, melyet növénynevelő lámpa alatt tartottam. Gazdasági érettségben a 'Kaldom' bogyója zöld, az antocián bioszintézisben akár struktúrgén akár szabályozó szerepet betöltő gén expresszióját csak kis mértékben volt detektálható. Legmagasabb mértékben a 'Black Pearl' halmoz fel antociánt a termésében, ezzel egybe vág a génexpressziós mintázata is. A hibridekből képzett csoportok közül magasabb génexpressziót a növénynevelő lámpa alatt tartott mintáknál mértem (11. ábra).



A génextpresszió mérésével párhuzamosan analitikai vizsgálatokat is végeztem az F<sub>1</sub> növényekből képzett csoportokon. Azokat a beltartalmi mutatókat vizsgáltam, amelyekre feltételeztem, hogy hathat a LINE-1 inszercióval járó funkciónyeréses mutáció miatt megnövekedett antocián tartalom. Az analitikai vizsgálatokat gazdasági érettségben (GÉ2), és teljesen biológiai érettségben (BÉ) lévő bogyókkal végeztem, mértem a totál polifenol, totál monomer antocianin, totál flavonoid és össz antioxidáns kapacitásukat (11. táblázat).

11. táblázat – P és F<sub>1</sub> nemzedék beltartalmi mutatói két érésfázisban

		TPC	TFC	TMA	FRAP
		mg Ga/g	mg Qe/g	µg cy-3-glu/g	µmol As/g
GÉ2	'Black Pearl'	42,58a±0,96	64,91a±0,34	34590,55a±3101,22	250,56a±0,50
	Hibrid – 1	21,47b±0,84	80,09a,b±4,97	4830,75b±417,47	155,33b±11,59
	Hibrid – 2	30,15c±1,17	88,78b±2,88	22841,69a±1848,81	301,23a±11,68
	'Kaldom'	20,31b±0,94	30,39c±1,09	Nd. <sup>1</sup>	109,57b±0,65
BÉ	'Black Pearl'	34,73a±0,15	85,87a±0,68	8599,93a±250,48	203,39a±3,58
	Hibrid – 1	16,81b±0,21	64,59b±0,99	Nd. <sup>1</sup>	67,77b±3,66
	Hibrid – 2	18,56b±1,18	85,92a±0,59	626,21b±41,75	108,85c±1,11
	'Kaldom'	16,02b±0,42	26,37c±0,56	Nd. <sup>1</sup>	91,53c±2,54

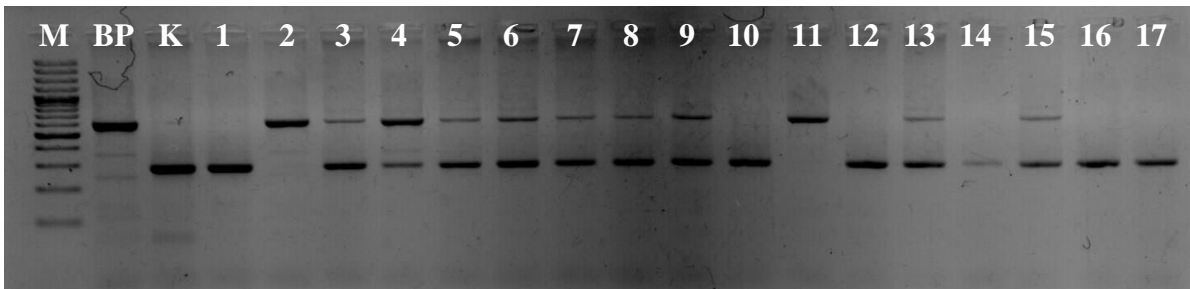
Jegyzet: Egy oszlop egy altáblázatában lévő azonos betűvel ellátott adatok szignifikánsan nem különböznek egymástól a  $p < 0,05$  szinten. <sup>1</sup>: Nem detektált.

Ahogy a 4.2.1. fejezetben bemutatott nemesítési vonalak és fajták beltartalmi mutatóinak vizsgálatakor, úgy a P és F<sub>1</sub> generáció esetén is az érés előrehaladtával csökkenő tendenciát mutattak a paprikák minden mérés esetén, kivéve a 'Black Pearl' fajtát (11. táblázat). Mind a gazdasági, mind pedig a biológiai érettségben a legmagasabb polifenol tartalmat a 'Black Pearl' fajtánál mértem, majd a növénynevelő lámpa alatt tartott Hibrid – 2 paprika esetén, a legalacsonyabb értéket a 'Kaldom' adta. A TFC esetén gazdasági érettségben a Hibrid – 2 paprika adta a legmagasabb értékeket, és a 'Black Pearl' kivételével itt is egy csökkenő tendencia figyelhető meg. A totál monomer antocián mérés alapján a 'Black Pearl' és a növénynevelő lámpa alatt tartott Hibrid – 2 növények nem térnek el egymástól szignifikánsan, míg a természetes fényen nevelt Hibrid – 1 sokkal alacsonyabb mennyiségben halmoz fel antociánokat. A biológiai érettségben, amikor a termések színe piros, csak a 'Black Pearl' és a Hibrid – 2 növényeknél tudtam kimutatni az antociánok jelenlétét. A termések össz antioxidáns kapacitását tekintve a legmagasabb értéket szintén a növénynevelő lámpa alatt tartott Hibrid – 2 növény mutatta a GÉ2 fázisban, BÉ fázisban pedig a 'Black Pearl' (11. táblázat). Az antocián tartalom, a bioszintetikus útban szerepet játszó gének expressziója és a különböző megvilágítás közötti összefüggéseket már többen leírták. Az eredmények rendre azt mutatják, hogy a magasabb fényintenzitás a *WD40* kivételével mind a *MYB* és *bHLH* transzkripciós faktorok, mind pedig a bioszintetikus útvonal struktúrgénjeinek az expresszióját növeli, ami megnövekedett antocián tartalmat eredményez (Lightbourn et al., 2007; Liu et al., 2022b; Lu et al., 2019; Zhou et al., 2022). Ugyanakkor már kevesebb eredmény található az eltérő

megvilágítás egyéb polifenolos vegyületekre gyakorolt hatásáról paprika esetén. Különböző színű árnyékolóháló alatt nevelt növények termésének beltartalmát összehasonlítva az árnyékolatlan növényekével azt találták, hogy a termések TPC, TFC és az összes antioxidáns kapacitása magasabb a takaratlan növényeknél, és egyre csökken, ahogy az árnyékolóháló sötétedik (Díaz-Pérez et al., 2020). Hasonló eredményre jutottak Angmo és munkatársai is, akik a szabadföldi növények termésének beltartalmát hasonlították össze az üvegházi, illetve üvegházi, de árnyékolóháló alatt nevelt növényekével. Míg a szabadföldi és üvegházi termések totál polifenol és totál flavonoid tartalma nem különbözött szignifikánsan, az árnyékolóháló a polifenolos vegyületek mennyiségét és összetételét is szignifikánsan megváltoztatta (Angmo et al., 2021). Kék fény (470 nm) hatására a totál polifenol, C-vitamin tartalom és az összes antioxidáns kapacitás növekedését mérték, ugyanakkor, ezt a változás nem a fény intenzitás növekedése okozta, hanem a spektrum eltérése, mert vörös fény (660 nm) esetén nem tapasztaltak szignifikáns változást, csak a karotinoid bioszintézisben (Pola et al., 2019). Esetemben a Hibrid – 1 csoportot a csírázástól a mintagyűjtésig eltelt hónapok alatt naponta átlagosan 2304 W/m<sup>2</sup> globális sugárzás érte, a Hibrid – 2 csoportot pedig ugyanezen időszak alatt naponta 3200 W/m<sup>2</sup>. A Hibrid – 2 csoportra mért beltartalmi mutatók mind a GÉ2 fázisban, mind pedig a teljes biológiai érettségben magasabbak voltak, mint a Hibrid – 1 csoporté. Ennél a csoportnál a totál flavonoid tartalmat tekintve még a 'Black Pearl'-nél is magasabb értékeket mértem mindkét érésfázisban, míg az antioxidáns kapacitás tekintetében a GÉ2 fázisban detektáltam magasabb, bár szignifikánsan nem különböző értéket (11. táblázat). Ezek az adatok megegyeznek Díaz-Pérez és Angmo eredményeivel, miszerint a takaratlan, azaz nagyobb fényintenzitást kapó növények totál polifenol, totál flavonoid és összes antioxidáns kapacitási is magasabb a kevesebb fényt kapó társaiknál (Angmo et al., 2021; Díaz-Pérez et al., 2020). A magasabb fényintenzitás az általam vizsgált paprikák esetén is mind az antocián bioszintézis, mind az egyéb polifenolos vegyületek bioszintézisét serkentette.

### 5.2.2. *F<sub>2</sub> nemzedék vizsgálatai*

Az F<sub>1</sub> növények öntermékenyítését követően, ahogy az F<sub>2</sub> növények elérték az első valódileveles kort, megkezdtem rajtuk a genotipizálást és a fenotipizálást is. A fenotipizálást két hetente végeztem tíz hetes perióduson keresztül. Ahhoz, hogy a fenotípusos adatokat kiértékelhetően össze tudjam vetni a genotípussal, 103 növényt genotipizáltam (12. ábra).



12. ábra – F<sub>2</sub> növények genotipizálása a retrotranszpozon kimutatására tervezett primerekkel, 'BP': 'Black Pearl', 'K': 'Kaldom', 1-17 F<sub>2</sub> növények, M: molekulatömeg marker, Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus

Hasadó populáció lévén, az F<sub>2</sub> egyedei között voltak olyan genotípusok, amelyek csak anyai allélt – 262 bp – (például 1-es, 10-es növény), vagy csak apai allélt hordoztak – 618 bp – (2-es növény, 11-es növény), vagy heterozigóták voltak (például 3., 4., 5. minta) (12. ábra). Az F<sub>2</sub> növények közt tapasztalt változatosság indokolta annak a vizsgálatát, hogy a retrotranszpozon teljes hosszában öröklődött-e tovább. A heterozigóták mindegyikében amplifikálódott az anyai genotípusra jellemző ~260 bp fragmentum, illetve a retrotranszpozon teljes hosszát jelentő ~5600 bp fragmentum is, míg a 'Black Pearl' esetén csak az utóbbit detektáltam.

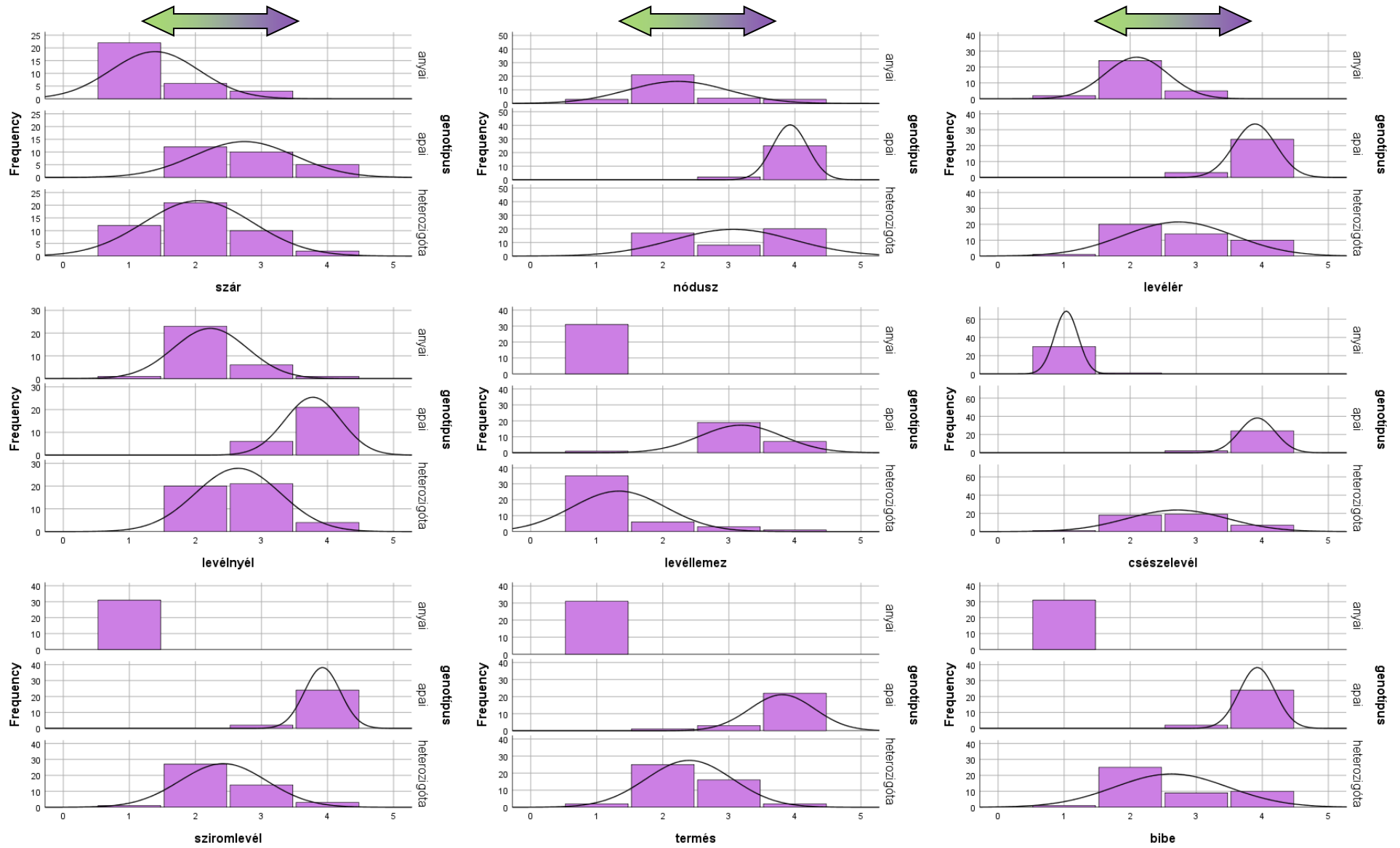
Összehasonlítottam a minden szövetében liluló 'Black Pearl' és a nem liluló zöldből pirosra érő hegyes 'Kaldom' fajta keresztezéséből kapott F<sub>1</sub> és F<sub>2</sub> nemzedék generatív szerveit (12. táblázat). Az F<sub>1</sub> növények szíromlevelei az összes egyednél két színűek voltak, fehér alapon a szirmok szélén lila, ami utalhat a *CaMYBa* nem teljes dominanciájára. Az F<sub>1</sub> növények termését tekintve pedig gazdasági érettségben minden termésük lila volt. Az F<sub>2</sub> egyedek esetén a virágszín megoszlása (43:88:65 - lila:átmeneti:fehér) a p=0,05 értéknél ( $\chi^2_{krit}=5,99$ ;  $\chi^2_{számolt}=6,98$ ) különbözött az 1:2:1 aránytól, viszont p=0,03 esetén ( $\chi^2_{krit}=7,01$ ) megfelelt az elméleti hasadási aránynak. A termés színt vizsgálva a hasadás megfelelt a 3:1 aránynak ( $\chi^2_{krit}=3,84$ ), azaz egy lókusztól befolyásolt az antociánosodás a vizsgált populációban. Ohno és munkatársai (2020), a vizsgált populációjukban szintén bizonyították a 3:1 arányt, így ettől az egy lókusztól tették függővé a populáció antociánosodását (12. táblázat) (Ohno et al., 2020).

12. táblázat – Fenotípusos megoszlás az F<sub>1</sub> és F<sub>2</sub> nemzedékben a szírom és a gazdaságilag érett termés példáján

	F <sub>1</sub> és F <sub>2</sub> nemzedék	Egyedszám	Egyedszám			Várt hasadás	$\chi^2$ (p érték)
			Lila	Átmeneti	Fehér/Zöld		
szírom	F <sub>1</sub>	5	-	5	-	0:1:0	
termés			5	-		1:0	
szírom	F <sub>2</sub>	196	43	88	65	1:2:1	$\chi^2=6,98$ (p=0,03)
termés		103	72		31	3:1	$\chi^2=1,43$ (p=0,05)



Az egyes szövetekre vonatkoztatott szín erősséghez kötött értékének eloszlás mintázatához csoportokat képeztem a csak anyai allélt hordozó, csak apai allélt hordozó, illetve a heterozigóta egyedekből (M2. 22. táblázat). Az 13. ábra sorozaton nagyon jól látszik, hogy a csak anyai allélt hordozó minták minden esetben az egyes értékhez (nem lila) közeli maximummal rendelkeznek, míg az apaiak a négyes értékhez (legsötétebb lila) közeli maximumot mutatnak. A heterozigóták a köztes értékeknél érik el maximumukat. Az ábrák feletti nyilak a szervek színét reprezentálják (13. ábra).



13. ábra - Színerősség eloszlás a 103 genotipizált egyed esetén, csak anyai, csak apai, vagy mindkét allélt hordozó genotípusok szerint csoportosítva, 9 szövet példáján










A fenotípusos és genotípusos adatokat összevetve találtam 10 növényt, amely esetekben a paprikák ellentmondó eredményeket produkáltak, ebből pár genotípus-fenotípus ellentmondást a 14. ábra mutat be. A 36-os növényben (14. ábra 'A') genotipizálás során az apai allélt detektáltam, viszont fenotípusában a heterozigótákhoz áll közelebb, ugyanezt találtam a 78-as (14. ábra 'B') és 11-es (14. ábra 'C') növény esetén is (14. ábra). Jung és munkatársai is kaptak olyan F<sub>2</sub> növényeket, amelyek esetén a vegetatív szervek zöld színűek és csak a termés lilult. Ugyanakkor, ők ezeknél a növényeknél a genotipizálás során a nem liluló növényekre jellemző fragmentumot kapták (Jung et al., 2019), így feltételezték, hogy ezeknél a növényeknél a *CaMYBa* egy funkcióképtelen allélváltozata van jelen. Ellenben az általam genotipizált paprikák esetén a 'Black Pearl'-re jellemző fragmentum amplifikálódott.



14. ábra – Eltérő fenotípusú és genotípusú F<sub>2</sub> növények (36.- A, 78. – B, 11. – C) bal oldalt, jobb oldalt 'Black Pearl'

Byun és munkatársai (2022) a *CaAN3* vizsgálatokor 4 különböző kategóriát alakítottak ki a növények fenotípusa szerint, az első csoportba a lila virágú és lila gazdasági érettségű termésű paprikák kerültek. A második csoportot a fehér virágú, de lila termésű paprikák alkották, a harmadik csoport a halványlila termésű és fehér virágú, míg a negyedik csoport a fehér virágú és zöld termésű (esetemben sárgás fehér) paprikákból állt. Az első csoportban a *Ca10g11650* gén nagyfokú expresszióját mérték, míg a *Ca10g11690* expressziót nem, vagy alig tudták kimutatni, szemben a második csoporttal, ahol ennek pont az ellenkezőjét tapasztalták. Ugyanezt a csoportosítást követve és kiegészítve az általam vizsgált paprikák a következők szerint változnak (13. táblázat).

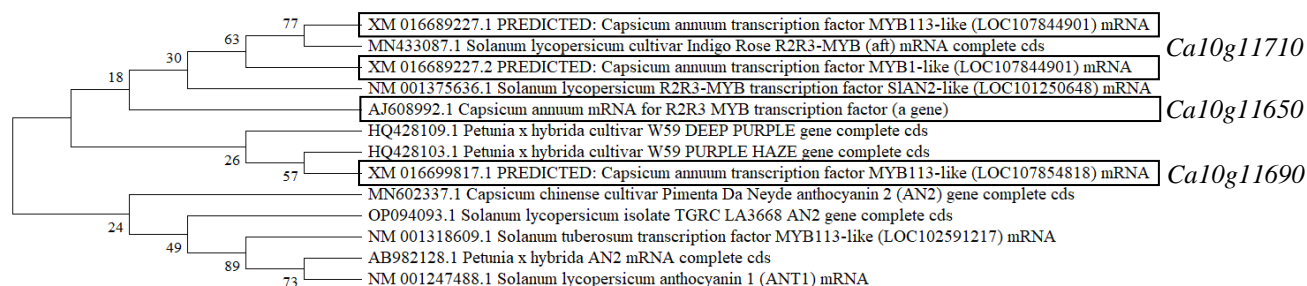
13. táblázat – Két gén expressziója a GÉ2 érésfázisban nem liluló paprikákhoz viszonyítva a virág és természín szerint csoportosítva, Byun alapján (Byun et al., 2022), F<sub>2</sub>(A) – apai geno- és fenotípusú F<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>(H) – heterozigóta geno- és fenotípusú F<sub>2</sub>

	Csoport 1.	Csoport 2.		Csoport 3.	Csoport 4.		Csoport 5.		
szírom/termés	 F <sub>2</sub> (A)								 F <sub>2</sub> (H)
		<b>11270</b>	<b>11274</b>	<b>11263</b>	<b>11278</b>	<b>11280</b>		<b>'Pim.Ney.'</b>	
<i>Ca10g11650</i>	8522,49	11,41	9,94	14,47	0,21	0,85	2893,52	75,85	
<i>Ca10g11690</i>	1937,53	23,61	0,20	18,11	0,03	0,28	16,35	77,44	
<i>Ca10g11710</i>	6739,07	29,17	0,50	3,54	0,31	0,48	302,22	120,12	
	LINE-1	<i>pax, Leb</i> nemesítési vonalak						<i>C. chi</i>	LINE-1

A 'Black Pearl', illetve az F<sub>1</sub> növények nem szerepelnek az összehasonlításban, mert nem azonos időben, nem azonos körülmények közt voltak nevelve. Az első csoportba azok az F<sub>2</sub> növények kerültek, amelyek apai genotípusúak, azaz mindkét allélon tartalmazzák a LINE-1-non-LTR retrotranszpozon inszerciót, a vegetatív és generatív szerveik egyaránt lilulnak, szírmuk és gazdaságilag érett termésük sötétlila. A második, harmadik és negyedik csoportot a különbözőképpen liluló nemesítési vonalak teszik ki. A második csoportba a Byun és munkatársai (2022) csoportosítása szerint esetemben a 11270 és a 11274 nemesítési vonalak kerültek, melyeknek szirma fehér, termésük sötét lila, illetve a 11274-nek csíkosan sötét lila. A fehér szirmú 11263-as paprika világosabb lila gazdasági érettségben, így ő alkotja a 3. csoportot. A negyedik csoportban lévő 11278 és 11280 paprikáknak fehér szírmuk és sárgás fehér termésük van. Byun és munkatársai csoportosítását az F<sub>2</sub> paprikák heterozigóta egyediből, és a 'Pim. Ney.' *C. chinense* paprikából képzett ötödik csoporttal egészítettem ki (Byun et al., 2022) (13. táblázat). Annak ellenére, hogy a 'Pim. Ney.' minden szövetében lilul, szíromlevelének főleg a fonáki oldala antociános, a ventrális oldala fehér, termése viszont minden érésfázisban, a teljes biológiai érettségen túl is lila, szinte fekete.

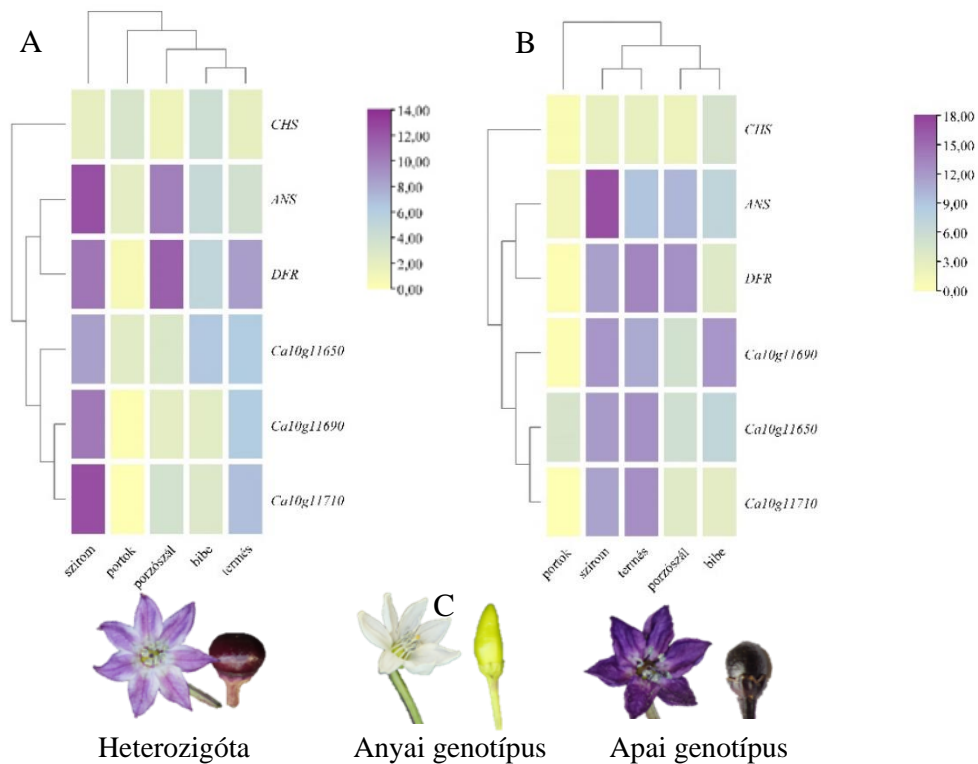
Eredményeim részben megegyeznek a Byun által leírtakkal, a negyedik csoport esetén az általa vizsgált fajták, illetve a 11278 és a 11280 nemesítési vonalak is alacsony génexpressziót mutattak mind a *Ca10g11650* és *Ca10g11710*, illetve a *Ca10g11690* transzkripciós faktorok esetén is. A harmadik csoportnál, a 11263 genotípus esetén a *Ca10g11650* expressziója és a *Ca10g11690* alacsonyabb, mint az extrém lila genotípusoké, a *Ca10g11710* pedig még ezeknél is alacsonyabb expressziót mutatott, ami szintén megegyezik az általuk leírtakkal. A második csoportnál a fehér szirmú és lila gazdasági érettségű paprikák esetén alacsony *CaAN2* expresszió mellett, magasabb *CaAN3* expressziót mértek, ami a 11270 paprikára igaz, de a 11274-nél már nem. Az első csoport esetén mindhárom gén expressziója nagyon magas volt, ellenben a Byun és munkatársai által közöltekkel, miszerint ebben a csoportban a *CaAN3* expressziója szinte kimutathatatlan (Byun et al., 2022). Összehasonlítva a *CaAN3* gént a család más aktivátor R2R3-MYB transzkripciós faktort kódoló génjeivel, a *CaAN3* egy kládba került a petúniából izolált

*PHZ* és *DPL* génekkal, míg a *Ca10g11710* a paradicsomból izolált *Aft* és *SIAN2*-like génekkal (15. ábra).



15. ábra – A *Ca10g11650*, *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* gének filogenetikai analízise, a burgonya, a paradicsom és a petúnia aktivátor R2R3-MYB gének alapján

Povero és munkatársai (2011) a nem liluló 'Alisa Craig' fajta és a liluló *atv/atv*, *Aft/Aft* illetve *Aft/Aft atv/atv* paradicsomok vizsgálatakor azt találták, hogy a paradicsom zöld fázisában átlagosan 45 nappal a kötés után mind az *SIANT1* és az *SIAN2* gének expressziója magas a liluló genotípusokban. Ugyanakkor az érés előrehaladtával mindkét gén expressziója csökken, annak ellenére, hogy a termések antocián tartalma növekszik, így feltételezték, hogy ez a két gén a termések korai fázisában befolyásolja az antociánosodást (Povero et al., 2011). Mes és munkatársai (2008) szerint az *Aft* lókuszt fény hatására indukálódik, és a 10. kromoszómán helyezkedik el csak úgy, mint az *SIANT1* vagy az *SIAN2*. Később Yan és munkatársai (2020) térképezték az *Aft* lókuszon található gént és azonosították *SIAN2-like* génként (Yan et al., 2020). A petúniából izolált *PHZ* mind a vegetatív szövetek, mind pedig a virágszín kialakításáért felelős, ugyanakkor szemben a *DPL* génnel a *PHZ* csak foltosodást idéz elő a szirmokon. Fény hatására a *PHZ* transzkript mennyisége szignifikánsan nőtt mind a szirmokban, mind pedig a vegetatív szövetekben (Albert et al., 2011). Lévéen, hogy a *Ca10g11690* gén ezekhez a génekhez áll legközelebb, így feltételezhető, hogy paprika esetén is kellő mennyiségű fény hatására a vegetatív szövetek, az éretlen termés és a szirmok foltokban történő antociánosodását befolyásolja (15. ábra). A genotípusuk szerint csoportosított F<sub>2</sub> növények közül csoportonként 3-3-3 darab fenotípusuk szerint is mindenben megegyező növényt vizsgálva hasonlítottam össze a *Ca10g11650*, *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* expresszióját a generatív szervekben (16. ábra, M3. - 27. ábra, 28. ábra).



16. ábra – Génexpressziós mintázat a heterozigóta genotípusú F<sub>2</sub> egyedek (A) és az apai egyedek (B) generatív szöveteiben az anyai genotípushoz (C) viszonyítva.

A vizsgált termésekben a *Ca10g11710* expressziója a heterozigóta csoport esetén magas volt, az anyai csoporthoz viszonyítva 120-szor nagyobb mértékben expresszált, míg a *Ca10g11650* gén csak 76-szor a *Ca10g11690* pedig 77-szer nagyobb mértékben. Az apai genotípusú csoport esetén pedig 6739-szer nagyobb mértékben, szemben a *Ca10g11650* génnel, ami 8522,49-szer volt az anyai csoporténál magasabb. A *Ca10g11690* gén expressziója a heterozigótáknál megegyezett a *Ca10g11650* gén expressziójával, az apai genotípusúak esetén viszont töredéke volt a másik két génnek. Így feltételezhetően az általam vizsgált populáció esetén a *Ca10g11710* és a *Ca10g11650* együttesen határozhatja meg a gazdaságilag érett termések fenotípusát és a *Ca10g11690* csak kisebb mértékben járul ehhez hozzá. Mindez részben megegyezik Byun és munkatársainak (2022) eredményeivel, miszerint a *Ca10g11690* a gazdaságilag érett antociánosodásért felel, ugyanakkor Povero és munkatársai (2011) azt tapasztalták, hogy nem egyedülként befolyásolja. A virágszirom tekintetében hasonló eredményt kaptam, mint Albert és munkatársai (2011), a szektorokban antociánosodó szirmokban magas *Ca10g11960* aktivitást mértem a *Ca10g11650*-hez képest (M3. – 27. ábra).

A portok, porzósál és bibe antociánosodásáért más lókuszok lehetnek felelősek, mint amin a *CaMYBa* van kódolva (A lókusz), ezek rendre az *As* és *Asf* lókuszok (Wang és Bosland, 2006). Ugyanakkor mind az apai, mind pedig a heterozigóta genotípusoknál ezekben a szövetekben is ki

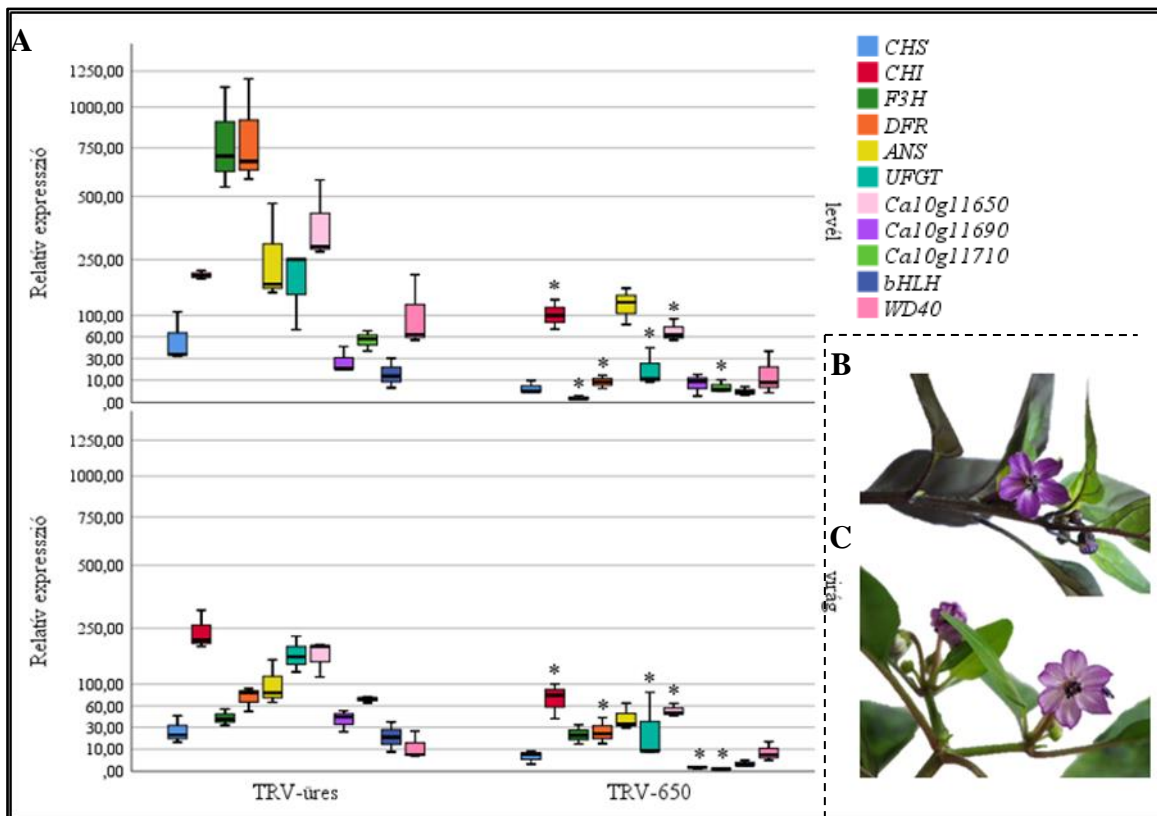
tudtam mutatni a *Ca10g11650* expresszióját. A portok esetén a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* expressziója alig kimutatható, ebben a szövetben egyedül a *Ca10g11650* expresszióját detektáltam. Ugyanakkor mindhárom vizsgált R2R3-MYB kifejeződött a bibében és a porzószámban is (16. ábra).

### **5.3. A *Ca10g11650* gén vírus indukálta géncsendesítése**

A szakirodalomban fellelhető ellentmondások tisztázása végett, egy vírus indukálta géncsendesítéses kísérlet során vizsgáltam, hogy a *Ca10g11650* gén az antocián bioszintetikus útvonal struktúrgénjei közül melyikekre hat. A dohány növények *Ca10g11650* génkonstrukcióval és *PDS*-sel történő kezelése sikeres volt, így a növények leveleit a 4.3.3. fejezetben ismertetett módon 'Black Pearl' paprika növények passzálásra használtam. A kezelt paprika növények levelei és virágai fenotípusosan is mutatták a géncsendesítés tüneteit a kontrollhoz képest (17. ábra B és C). A termékek vizsgálatára nem volt lehetőség.

A *Ca10g11650*, azaz a *MYBa* gén csendesítése nem okozott teljes antocián mentességet, ugyanakkor, mind a bioszintetikus útvonal korai és kései struktúrgénjeire, mind pedig a bHLH és WD40 transzkripciós faktorokat kódoló génekre egyaránt hatással volt. A korai struktúrgének közül a géncsendesített növényekben a *CHI* expressziója szignifikánsan csökkent mind a virág, mind a levél esetén, az *F3H* a virágban nem, míg a *CHS* expressziója egyik szövetben sem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll növényhez képest. Annak ellenére, hogy a szakirodalomban számos helyen írnak a *MYBa* gén késői struktúrgénekre való hatásáról, ez a hatás az *ANS* esetén nem volt szignifikáns egyik szövetben sem. A géncsendesített növényekben ugyanakkor mind a virágban, mind a levelekben szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a *DFR* és az *UFGT* expressziójában (17. ábra). A *Ca10g11650* csendesítése szignifikánsan csökkentette a *Ca10g11690* expresszióját a virágban és a *Ca10g11710* expresszióját mind a levélben mind pedig a virágban (17. ábra). A *bHLH* expressziója csökkent, de nem szignifikáns mértékben, a *WD40* expressziójában alig tapasztalható visszaesés a virágoknál, a levelek esetén ez a változás szintén nem szignifikáns mértékű (17. ábra).





17. ábra – 'A': TRV-üres: Üres TRV vektorral kezelt negatív kontroll, TRV-650: *Ca10g11650* géncsendesített növények relatív génexpressziója a levelében és virágában  $\log_e$  skálán, a csillaggal jelölt gének expressziója a géncsendesített növényekben szignifikánsan eltér a negatív kontrolltól  $p < 0,05$  szinten, 'B': üres TRV vektorral kezelt negatív kontroll, 'C': *Ca10g11650* géncsendesített növény fenotípusa

Zhang és munkatársai (2015) a *CaMYBa* gén csendesített növények levelét vizsgálva az általános fenilpropanoid útvonal három génjének, mint *PAL*, *C4H* és *4CL* kivételével az összes vizsgált gén esetén szignifikáns csökkenést tapasztaltak. Géncsendesített növények termésének elemzésekor a *CHI* és az *F3H* génnél nem tapasztaltak szignifikáns csökkenést a *CaMYBa* csendesített növényben (Aguilar-Barragán és Ochoa-Alejo, 2014). A VIGS-nek kitett 'Black Pearl' virágaiban az *F3H* expressziója szintén nem tért el szignifikánsan a kontroll növénytől, ellenben a vegetatív szövetek összehasonlításakor ez az eltérés szignifikáns (17. ábra). Az UV-B sugárzás hatását vizsgálva a *CaMYBa* génre azt találták, hogy az UV-B kezelés előtt az üres TRV-vel kezelt és a *CaMYBa* csendesített növények közt nem volt szignifikáns különbség, de a vizsgált gének mind alacsonyabb expressziót mutattak ezekben a növényben. Az UV-B kezelés után ellenben az üres TRV-vel kezelt növények génexpressziós profilja szignifikánsan eltért a *CaMYBa* csendesített növényekétől. Az UV-B hatására a nem géncsendesített növényekben nőtt a vizsgált antocián bioszintézisben szerepet játszó gének expressziója (Wang et al., 2022).

Eredményeim részben megegyeznek Zhang és munkatársainak (2015) leveleken mért adataival, az általam vizsgált növényekben a géncsendesítés hatására szintén csökkent a génexpresszió mértéke, ugyanakkor a levelekben a struktúrgének között a *CHS* és *ANS*, a transzkripciós faktorok közül pedig a *Ca10g11690*, *bHLH* és *WD40* gének transzkriptum



mennyiségét tekintve ez a csökkenés nem volt szignifikáns. Zhang és munkatársai (2015) a *WD40* expresszióját szignifikánsan magasabbnak találták a *CaMYBa* géncsendesített növényben. A *WD40* transzkripció faktorok az MBW komplex kialakulásához szükséges platformot biztosítják, expressziójuk mértéke közel azonos az antociános és a nem antociános szövetekben (Liu et al., 2018). Ugyanakkor a *CaWD40* csendesített növényekben alacsonyabb antocián tartalmat mértek, és alacsonyabb expressziós aktivitást tapasztaltak (Aguilar-Barragán és Ochoa-Alejo, 2014), ami ellentmond Stommel és munkatársai (2009) eredményeinek, akik nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a *CaWD40* expressziójában az antociános és antociánmentes növények levelének, virágának és termésének vizsgálatakor. Így feltételezhető, hogy a *WD40* fehérje elengedhetetlen az MBW komplex kialakulásához, de a komplexben a szabályozó szerepet csak a bHLH és MYB transzkripció faktorok töltik be. A paradicsom genom vizsgálatakor a két, már azonosított R2R3-MYB transzkripció faktoron kívül, az *SIANT1* és *SIAN2* transzkripció faktorokat kódoló gének közelében, másik két MYB transzkripció faktort is leírtak, *SIANT1*-like és *SIAN2*-like néven, melyek fehérjeszerkezetük alapján hasonlítanak a burgonyafélék családján belül már karakterizált, az antocián bioszintézisben szabályozó szerepet betöltő aktivátor R2R3-MYB-ekhez (Kiferle et al., 2015). A *CaMYBa* csendesített növényekben másik két R2R3-MYB transzkripció faktor a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* expressziója is szignifikánsan csökkent (17. ábra). Ezek a transzkripció faktorokat kódoló gének csakúgy, mint a paradicsom esetén a 10. kromoszómán találhatóak a *MYBa* gén közelében. A *CaMYBa* csendesítése nem okozott teljes antocián mentességet, ugyanakkor a család más nemzetségeinek az antociánosodásért felelős lókuszán is tapasztalható génduplikációk, illetve allélvariánsok funkcióbeli eltérései is magyarázhatják, hogy egyes szövetek, például a levélnyél és a szíromlevelek kisebb mértékű antocián felhalmozást mutattak a géncsendesített növényben is.

#### **5.4. A beltartalom és génextpresszió változása a termésérés során**

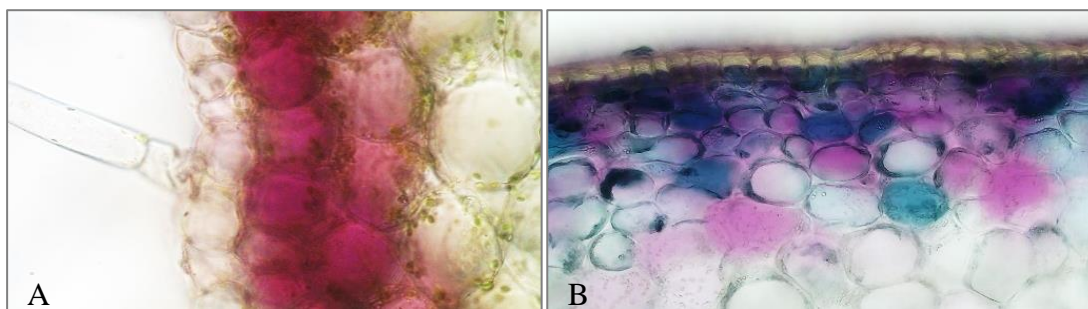
A vizsgálathoz felhasznált növényanyagot a 4.2.1. fejezet tartalmazza. Annak ellenére, hogy a mutánsok sokadik generációi a beltenyésztésnek, nagyfokú változatosságot mutattak az antocián felhalmozásukban a vegetatív és generatív szerveikben egyaránt.

A termések pH-ja a GÉ1 stádiumban 5,2 és 6,3 között, a biológiailag érett állapotban pedig 5,2 és 5,8 között változott, ugyanakkor a termések színe és pH-ja között nem volt jelentős különbség. A termések színét tehát inkább más genetikai tényezők alakítják ki. Oldható szárazanyag-tartalmuk ugyanezekben a fenofázisokban 4,0 és 7,8 °BRIX között mozgott a GÉ1, és 4,5 és 8,6 °BRIX között a biológiailag érett stádiumban. Deepa javaslatának megfelelően a

bemutatott összes adatot száraz tömegré (dw) vonatkoztatva számítottam ki, de ahol szükséges, ott az adatokat friss tömegré (fw) vonatkoztatva is megadtam (Deepa et al., 2007).

#### 5.4.1. A termékek antocián tartalma

Az antociánok lokalizációjának meghatározásához Leica LEITZ DMRXE (Wetzlar, Németország) mikroszkóppal felvételeket készítettem. A terméseken kívül a 'Pim. Ney.' csíranövénynek a szik alatti száráról is készült felvétel, hiszen ez az extrém lila genotípus minden fenofázisban, minden szervében antocián felhalmozódást mutat. A termés metszetén látható, hogy az antociánok a középső termésfal sejtjeinek vakuólumaiban halmozódnak föl, és koncentrációjuk a belső termésfal felé haladva csökken, ami megfelel Lightbourn metszeti képének (Lightbourn et al., 2008). Míg a hipokotilban (18. ábra A) csak az első két sejtréteg tartalmaz antociánokat, addig a termés (18. ábra B) metszeti képe azt mutatja, hogy a kutikula alatti öt-hat sejtrétegben is megtalálhatóak (18. ábra).



18. ábra – Antocián felhalmozódás a 'Pim. Ney.' hipokotilban (A), és termésében (B)

A *C. annuum* antociánosodó nemesítési vonalakban az antociánok jelenléte tranziens, az érés során lebomlanak. Így TMA csak a korai fenofázisokban, gazdasági érettségben kimutatható, kivéve a 'Pim. Ney.' és a 11270 paprika estében, ahol az összes fenofázisban mérhető volt az antocián tartalom. Két esetben a fehér színű paprikákban is detektálható volt az antociánok jelenléte (a 11278 paprikában a kormos fázisban, illetve a 'Soroksári' esetében a GÉ2 stádiumban), bár a terméseken nem volt észrevehető fenotípusos elváltozás (14. táblázat). Egy *C. annuum* paprikát vizsgálva a termés héjban 321,5 µg cy-3-glu/g TMA-t mértek friss tömegré (fw) vonatkoztatva (Sadilova et al., 2006). A vizsgált *C. annuum* genotípusok esetében ennek 15-szörösét (4866,47 µg cy-3-glu/g fw, ami szárazanyagra vonatkoztatva 56575,27 µg cy-3-glu/g dw), a *C. chinense* 'Pim. Ney.' esetében pedig majdnem 130-szörösét mértem fw-re vetítve (41366,57 µg cy-3-glu/g fw, ami száraztömegré vonatkoztatva 517082,19 µg cy-3-glu/g dw).

14. táblázat – A vizsgált paprika genotípusok beltartalmi mutatói és antioxidáns rendszer fontosabb enzimeinek aktivitása az érés során

GÉ1	TMA µg cy-3-glu/g	TPC mg Ga/g	FRAP µmol As/g	TFC mg Qe/g	TC mg/kg	CAT U/g	SOD U/g	POD U/g
'Pim. Ney.'	134897,45 ± 723,37 a	116,78 ± 8,32 a	515,55 ± 6,26 a	45,38 ± 0,25 a	341,79 ± 113,45 a,b	8,97 ± 0,76 a,b	46,75 ± 2,53 a	67,90 ± 5,50 a,c
11263	10222,68 ± 159,52 b	43,73 ± 0,12 b,c	281,67 ± 1,52 b	56,98 ± 0,2 b	273,21 ± 6,50 a,b	8,72 ± 1,12 a,b	42,53 ± 5,27 a	26,60 ± 13,55 b
11270	56575,27 ± 1445,30 c	43,15 ± 0,13 b,c	359,28 ± 2,30 c	15,78 ± 0,04 c	105,60 ± 6,02 a	4,56 ± 0,68 a,b	64,84 ± 1,93 a	36,18 ± 2,44 a,b
11274	17929,89 ± 6025,39 b	43,11 ± 0,26 b,c	366,58 ± 3,80 c	86,34 ± 0,54 d	448,47 ± 44,00 b	10,38 ± 2,14 a	58,48 ± 3,07 a	24,07 ± 2,10 b
11278	Nd <sup>1</sup>	60,34 ± 3,64 b	232,84 ± 0,81 d	49,97 ± 0,30 e	489,41 ± 93,06 b,c	4,21 ± 0,83 a,b	48,85 ± 5,60 a	44,59 ± 4,79 a,b,c
11280	Nd <sup>1</sup>	35,08 ± 0,32 c	455,04 ± 1,34 e	65,55 ± 0,16 f	432,05 ± 47,63 a,b	8,77 ± 1,45 a,b	158,46 ± 33,82 b	80,34 ± 6,75 c,d
'Soroksári'	Nd <sup>1</sup>	84,57 ± 0,56 d	511,03 ± 1,76 a	17,01 ± 0,70 c	193,37 ± 55,77 a,b	3,18 ± 1,10 b	41,18 ± 3,01 a	115,92 ± 9,10 d
<b>GÉ2</b>								
'Pim. Ney.'	461480,11 ± 6274,54 a	107,13 ± 9,77 a	945,29 ± 1,33 a	50,54 ± 0,71 a	1108,41 ± 62,66 a	8,52 ± 1,55 a	163,79 ± 22,15 a	46,88 ± 0,08 a
11263	5615,80 ± 412,52 b	33,07 ± 1,02 b	181,02 ± 0,63 b	34,51 ± 0,03 b	473,84 ± 26,14 b	3,53 ± 0,23 b	55,76 ± 6,22 b	44,99 ± 1,42 a
11270	20543,74 ± 958,88c	25,57 ± 0,42 b	129,29 ± 0,83 c	22,62 ± 0,03 c	825,08 ± 58,10 a	5,14 ± 0,85 a, b	74,58 ± 1,51 b	62,75 ± 1,20 a
11274	7754,45 ± 630,72 b,c	44,75 ± 0,88 b,c	306,80 ± 1,46 d	83,23 ± 0,27 d	1493,24 ± 93,68 c	2,93 ± 0,13 b	28,15 ± 1,98 b	59,83 ± 0,78 a
11278	Nd <sup>1</sup>	66,33 ± 5,30 c	358,24 ± 2,86 e	30,07 ± 0,07 e	451,59 ± 44,93 b	1,68 ± 0,12 b	29,37 ± 1,18 b	59,18 ± 5,97 a
11280	Nd <sup>1</sup>	61,86 ± 7,26 c,d	411,35 ± 1,13 f	112,50 ± 0,17 f	1495,11 ± 49,65 c	2,32 ± 0,04 b	38,27 ± 0,40 b	145,09 ± 7,72 b
'Soroksári'	356,25 ± 22,85 b	42,74 ± 1,96 b,c	199,79 ± 0,88 g	10,48 ± 0,04 g	511,38 ± 41,75 b	4,27 ± 0,27 b	30,58 ± 7,84 b	68,89 ± 16,00 a
<b>K</b>								
'Pim. Ney.'	517082,19 ± 13557,80 a	196,38 ± 2,19 a	1737,93 ± 8,96 a	43,93 ± 0,99 a	583,01 ± 42,03 a	15,60 ± 0,57 a	85,38 ± 9,31 a	129,80 ± 19,58 a
11263	Nd <sup>1</sup>	21,72 ± 0,34 b	153,49 ± 0,27 b	9,39 ± 0,08 b	1085,18 ± 93,27 a,b	4,98 ± 0,72 b	37,09 ± 1,12 b	57,12 ± 0,79 b
11270	3962,81 ± 218,28 b	21,79 ± 0,89 b	108,40 ± 0,16 c	6,45 ± 0,06 c	1201,93 ± 32,17 b	5,45 ± 0,37 b	9,29 ± 4,36 c	64,02 ± 6,93 b
11274	2143,08 ± 318,16 b	24,42 ± 2,31 b,d	266,32 ± 0,33 d	6,29 ± 0,02 c	1129,88 ± 130,97 a,b	6,57 ± 4,74 a,b	14,50 ± 0,95 c	29,82 ± 0,97 b
11278	521,84 ± 60,26 b	87,66 ± 1,68 c	751,18 ± 1,33 e	11,97 ± 0,05 d	679,61 ± 167,51 a,b	3,84 ± 0,63 b	7,13 ± 0,34 c	30,91 ± 0,89 b
11280	Nd <sup>1</sup>	30,80 ± 1,16 d,e	199,44 ± 0,38 f	7,15 ± 0,03 c	825,88 ± 73,16 a,b	6,08 ± 1,22 a,b	5,47 ± 0,72 c	33,12 ± 2,97 b
'Soroksári'	Nd <sup>1</sup>	36,10 ± 2,04 e	275,31 ± 0,46 d	10,41 ± 0,07 b,d	1198,05 ± 121,63 b,c	7,17 ± 0,94 a,b	6,83 ± 0,11 c	55,32 ± 14,29 b
<b>BÉ</b>								
'Pim. Ney.'	154812,58 ± 77,25 a	98,08 ± 5,63 a	1155,14 ± 2,98 a	27,57 ± 0,27 a	717,20 ± 186,46 a	56,90 ± 2,94 a	115,58 ± 8,33 a	74,79 ± 10,59 a,b
11263	Nd <sup>1</sup>	21,12 ± 0,59 b	245,63 ± 0,30 b	5,32 ± 0,02 b	1847,56 ± 366,00 a	8,85 ± 1,24 b	179,60 ± 29,65 a	165,10 ± 24,19 a,b
11270	352,08 ± 29,04 b	23,87 ± 0,49 b	217,02 ± 0,67 c	2,10 ± 0,05 c	1204,84 ± 189,71 a	5,07 ± 0,86 b	202,32 ± 15,68 a	198,94 ± 81,22 a
11274	Nd <sup>1</sup>	21,83 ± 0,98 b	178,77 ± 0,55 d	10,22 ± 0,08 d	1651,30 ± 450,35 a	4,28 ± 0,23 b	16,48 ± 1,40 a	21,03 ± 6,23 b
11278	Nd <sup>1</sup>	17,06 ± 0,75 b	133,71 ± 0,18 e	20,52 ± 0,08 e	2929,87 ± 510,87 a	9,91 ± 1,18 b	79,44 ± 19,74 a	75,59 ± 9,44 a,b
11280	Nd <sup>1</sup>	42,94 ± 1,51 c	466,69 ± 0,63 f	10,55 ± 0,06 d	3874,30 ± 1065,33 a,b	3,41 ± 0,64 b	29,94 ± 15,11 a	25,15 ± 11,95 b,c
'Soroksári'	Nd <sup>1</sup>	22,30 ± 0,84 b	207,80 ± 0,24 g	7,04 ± 0,05 f	6168,53 ± 921,44 b	7,94 ± 1,24 b	5,19 ± 2,07 a	6,18 ± 0,93 b, d

Jegyzet: Egy oszlop egy altáblázatában lévő azonos betűvel ellátott adatok szignifikánsan nem különböznek egymástól a  $p < 0,05$  szinten. <sup>1</sup>az ezzel jelölt adatok nem nem szerepelnek a statisztikai elemzésnél. Nd: nem detektált.

#### 5.4.2. A termékek totál polifenol tartalma

A TPC mérésére Folin-Ciocalteu-tesztet alkalmaztam. Ennek a módszernek kisebb hátránya, hogy a kapszaicinoidokat, aszkorbinsavat, flavonoidokat és kisebb fenolokat is kimutatja, ezért ez a mérési módszer magasabb értékeket eredményez. Száraz tömegre vonatkoztatva átlagosan magasabb értékeket mértem a gazdaságilag érett fázisokban, de a termésérés során egy csökkenő trend volt megfigyelhető. Ugyanakkor friss tömegre vonatkoztatva ennek az ellenkezőjét tapasztaltam. A legmagasabb értéket a 'Pim. Ney.' esetén mértem, amely paprika értékei jelentősen különböztek a többi genotípusétól. Ez egybevág azzal, miszerint a *C. chinense* paprikák totál polifenol tartalma magasabb, mint a *C. annuum* paprikáké (Bogusz Jr et al., 2018).

A gazdasági érettségben lila termésű mutánsok esetén magasabb értékeket vártam, a megnövekedett antocián felhalmozódás következtében (43,11-43,73 mg/g), ugyanakkor, a fehér termésű paprikák esetén a GÉ1 fázisban 1,5-2-szer magasabb értékeket mértem (60,34-84,57 mg/g) (14. táblázat). Ugyan vannak olyan tanulmányok, amelyek szerint nincs összefüggés a termés fenofázisa és a TPC közt (Castro-Concha et al., 2014), szárazanyagra vonatkoztatva a vizsgált paprikák érése során egy csökkenő tendencia figyelhető meg, amely megerősíti a korábbi tanulmányokat (Deepa et al., 2007; Ghasemnezhad et al., 2011; Marín et al., 2004; Navarro et al., 2006).

Fw-re kifejezve Chandel és munkatársai 0,621 és 1,690 mg/g közötti értékeket mértek, míg az általam vizsgált paprikák értékei 1,60 és 16,031 mg/g között változtak (Chandel et al., 2020). Több tanulmány is beszámol a TPC, a vizsgált szövet (hús, illetve mag), illetve a genotípus összefüggéseiről (Howard et al., 2000; Sim és Sil, 2008; Sora et al., 2015).

#### 5.4.3. A termékek antioxidáns kapacitása

A gyümölcsök és zöldségek fontos értékmérő tulajdonsága az antioxidáns kapacitásuk. Az antioxidáns kapacitás kimutatására a FRAP módszert alkalmaztam, amely a minták vasredukáló kapacitásával szemben méri az antioxidáns aktivitást. Ez a módszer alkalmas a vízben oldódó vegyületek, például a polifenolok, flavonoidok, antociánok, aszkorbinsav stb. antioxidáns kapacitásának elemzésére, így lehetővé teszi a termékek össz-antioxidáns kapacitásának meghatározását anélkül, hogy az egyes vegyületeket külön-külön kellene mérni.

A legtöbb genotípus magas antioxidáns kapacitást mutatott GÉ1-nél, majd a kormos fázisban csökkenés következett be, és enyhe növekedés a biológiai éréskor.

A legmagasabb antioxidáns kapacitást a 'Pim. Ney.' genotípusnál mértem, 1737,3  $\mu\text{mol/g dw}$  a kormos fázisban. Ugyanakkor ez volt az egyetlen csípős genotípus, így a kapszaicin tartalma is

hozzájárulhatott a magasabb antioxidáns kapacitás értékeihez (Rosa et al., 2002). A legalacsonyabb értéket a sötétlila termésű mutáns (11270) kormos fázisában mértem, 108,40  $\mu\text{mol/g dw}$ . A vizsgált genotípusok legalacsonyabb és legmagasabb mért értéke között 16-szoros különbséget detektáltam a különböző fenofázisokban (14. táblázat). A termékek antioxidáns kapacitása szinte minden vizsgált fenofázisban szignifikánsan különbözött a genotípusok közt. Ugyanakkor minden fenofázisban az extrém lila 'Pim. Ney.' fajta esetén mértem a legmagasabb értékeket. Mind a genotípus, mind a termékek fenofázisa jelentősen befolyásolta a FRAP-értékeket, pl. a 'Pim. Ney.' esetében a teljes érettség felé haladva szignifikáns növekedés, míg 11274 mutáns nemesítési vonal esetén szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető szárazanyagra vonatkoztatva (14. táblázat).

#### 5.4.4. A termékek totál flavonoid tartalma

A flavonoidok szabadgyökfogó képességük révén szintén az egészségvédő molekulák egy csoportját képezik, védik a szervezetet az oxidatív stressztől. Az érés előrehaladtával a flavonoidok mennyisége csökken (14. táblázat), ez a csökkenés a flavonoidok érés során történő degradációjának tudható be (Ghasemnezhad et al., 2011; Marín et al., 2004).

Érdekes módon nem az extrém lila 'Pim. Ney.' mutatta a legmagasabb értékeket, annak ellenére, hogy Ghasemnezhad egy sötétlila genotípusban mérte a legmagasabb flavonoid mennyiséget mind gazdasági, mind pedig biológiai érettségben (Ghasemnezhad et al., 2011). Blanco-Ríos különböző színű *C. annuum* paprikákat vizsgálva, azt találta, hogy egy zöld paprikának a legmagasabb a TF tartalma, ezt követi a piros színű genotípus. Az általam vizsgált paprikák esetén 1,5-4,3-szor magasabb TFC értékeket mértem a piros genotípusokban, viszont csak fele annyit a sárga genotípusban, mint Blanco-Ríos és munkatársai (Blanco-Ríos et al., 2013). Friss tömegre kifejezve eredményeink egybeesnek Garra és munkatársainak eredményeivel, akik 3,14 és 8,90 mg/g fw közötti TFC-t mértek, míg az általam vizsgált paprikák esetén 0,18 és 7,89 mg/g fw közötti értékeket mértem fw-re vetítve (Garra et al., 2020).

#### 5.4.5. A termékek totál karotinoid tartalma

A paprika termésérése a karotinoidok felhalmozódásával jár, az érés előrehaladtával a karotinoid-tartalom jelentős növekedése figyelhető meg (14. táblázat). A legalacsonyabb mennyiséget a 11270 paprika GÉ1 fázisában mértem, 105,60 mg/kg, a legmagasabbat pedig a 'Soroksári' érett stádiumában, 6168,53 mg/kg dw. Utóbbi fajtánál a TC nyolcszorosára növekedett az érés előrehaladtával. Kilcrease és munkatársai 455,11 és 795,73  $\mu\text{g/g fw}$  között mértek a narancs és piros fajták termésfalában, ami összhangban van az általam mért eredményekkel: a legalacsonyabb TC-tartalom 8,49 mg/kg fw volt a 11270 paprika GÉ1

fenofázisában, míg a legmagasabb, a 'Soroksári' teljes biológiai érettségében 697,28 mg/kg fw (Kilcrease et al., 2013). Szárazanyagra vonatkoztatva azonban 1235,1 és 3049,1 mg/kg dw között mértek az biológiailag érett termésekben, míg esetemben 'Pim. Ney.' TC tartalma 717,20 mg/kg volt a legalacsonyabb, a legmagasabb pedig a 'Soroksári' biológiailag érett termésének a TC tartalma volt 6168,53 mg/kg. (14. táblázat) (Kilcrease et al., 2015).

#### 5.4.6. *Enzimatisz antioxiáns aktivitás*

A növények nem csak az előzőekben leírt nem enzimatisz antioxiáns rendszereket alakították ki – mint például a például a flavonoidok, polifenolok, karotinoidok stb. – a szabadgyökök semlegesítésére, hanem enzimatisz védekező rendszerrel is rendelkeznek. Azonban csak kevés olyan tanulmány van, amely az enzimatisz antioxiánsokkal foglalkozik az érés folyamán. A CAT, a SOD és a POD enzimek aktivitását vizsgáltam, mivel ezek a reaktív oxigénformák elleni védekezőrendszer első bástyáiként szolgálnak. Ezeknek az enzimeknek a termelését több belső és külső tényező határozza meg, a külső tényezőket minimálisra csökkentettem, azáltal, hogy a növényeket azonos körülmények között neveltem üvegházban, így a megfigyelt különbségek a genotípushatásnak és az érésfázisnak tudhatók be.

A CAT aktivitása – bár nem szignifikánsan –, de több vizsgált genotípusban is nőtt az érés előrehaladtával, a 'Pim. Ney.' volt az egyetlen, ahol ez a növekedés szignifikáns volt. Az 11274 és 11280 esetében azonban csökkenés volt megfigyelhető a gazdasági érettségtől a biológiai érettségig, ami összhangban van Palma megállapításaival (Palma et al., 2020). A SOD aktivitás esetén, a 'Pim. Ney.', 11263 és 11270 esetében növekedés volt megfigyelhető a GÉ1-től a GÉ2-ig, majd csökkenés következett be a kormos fázisban, amit egy újabb növekedés követett a teljes biológiai éréskor. A GÉ1-hez képest az 11278 esetében növekedés volt tapasztalható az érési szakaszban, míg a 11270, 11280 és 'Soroksári' esetében csökkenő tendencia volt tapasztalható a GÉ1-hez képest. A biológiai érettség felé haladva a POD aktivitás általános növekedése volt megfigyelhető a 11263, 11270 genotípusok esetén, ellentétben a 11280 és a 'Soroksári' paprikákkal, ahol a GÉ1-től a biológiai érettségig a POD aktivitás csökkenését mértem (14. táblázat).

#### 5.4.7. A termések fitonutriens összetétele és antioxidáns kapacitása közti korreláció

Annak érdekében, hogy megvizsgáljam, hogy az érésfázis és a genotípus milyen arányban járulnak hozzá a termések antioxidáns kapacitásához, a fitonutriens vegyületeket, az antioxidáns kapacitást és a termések színét korreláció analízis segítségével értékeltem (15. táblázat).

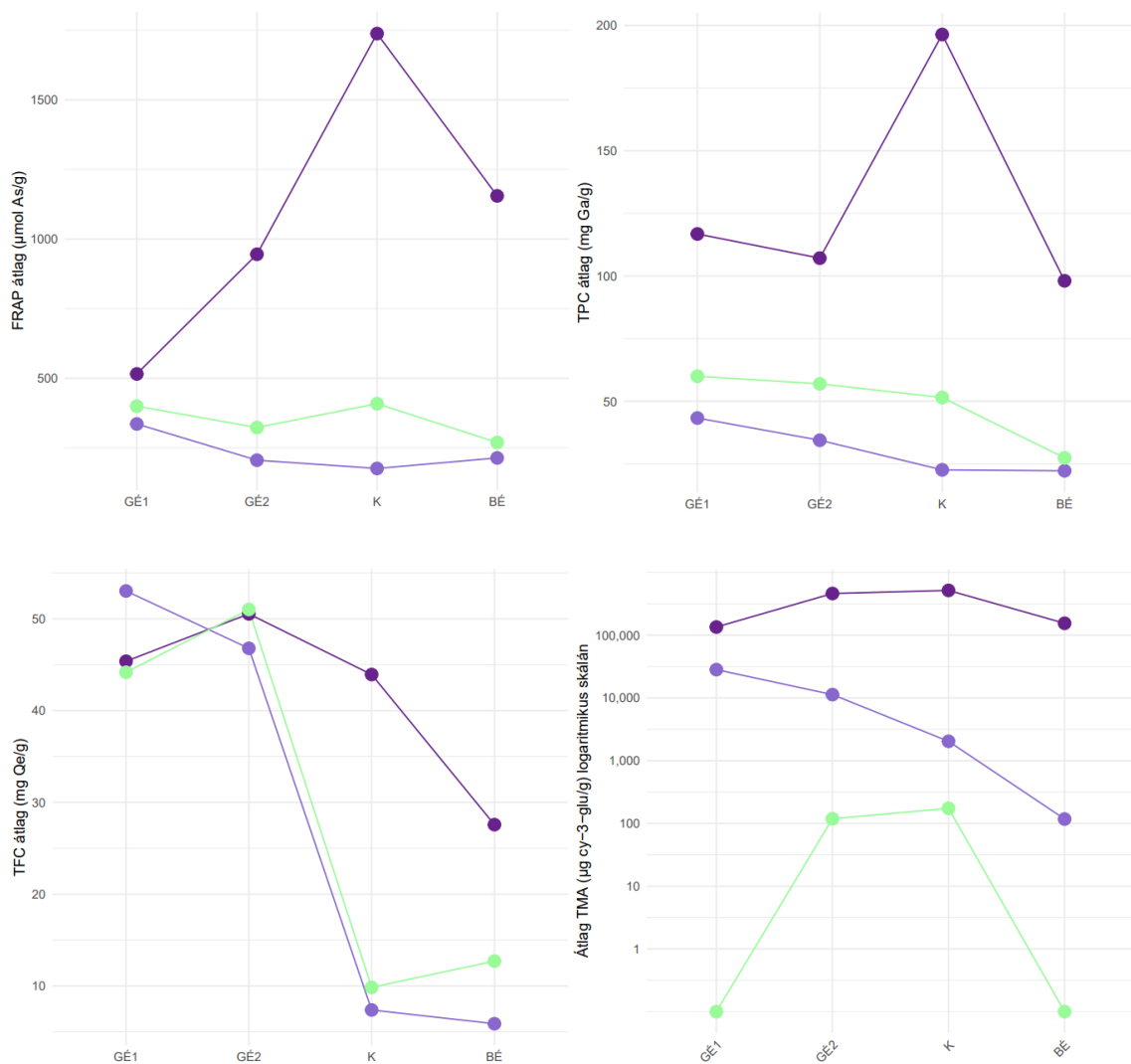
15. táblázat – Pearson korrelációs együtthatók a hét genotípus négy érésfázisában vizsgált fitonutriens összetétele és antioxidáns kapacitása közt

	CAT	SOD	POD	FRAP	TPC	TMA	TFC	TC	Szín
<b>CAT</b>	1								
<b>SOD</b>	0,209	1							
<b>POD</b>	0,110	0,763**	1						
<b>FRAP</b>	0,523**	0,200	0,097	1					
<b>TPC</b>	0,322**	0,079	-0,001	0,906**	1				
<b>TMA</b>	0,272	0,301*	0,226	0,849**	0,848*	1			
<b>TFC</b>	0,008	0,064	-0,052	0,208	0,281**	0,218	1		
<b>TC</b>	-0,024	-0,025	-0,143	-0,150	-0,259*	0,077	-0,194	1	
<b>Szín</b>	0,457**	0,165	0,036	0,531**	0,526**	0,609**	0,222*	-0,242*	1

\*, \*\* A korreláció 0,05, illetve 0,01 szinten szignifikáns.

A FRAP és a TPC értékek erős pozitív korrelációt mutattak ( $r = 0,906$ ), ami ugyan alacsonyabb, mint a Bogusz vagy Sora és munkatársai által közölt értékek, de magasabb, mint Deepa és munkatársai által kapott értékek (15. táblázat) (Bogusz Jr et al., 2018; Deepa et al., 2007; Sora et al., 2015). A TMA erős pozitív korrelációt mutatott mind a FRAP-pal ( $r = 0,849$ ), mind a TPC-vel ( $r = 0,848$ ), ami azt jelzi, hogy az antociánok jelenléte az érés során megnövekedett antioxidáns kapacitással függhet össze. A karotinoidok és a FRAP közötti korreláció gyengébb volt ( $r = -0,150$ ), ez a FRAP módszer természetéből adódik, mivel a mérés savas körülményeket igényel (pH 3,6), amelyekben belül a karotinoidok hajlamosak az izomerizációra, így elveszítik redukáló hatásukat (Blanco-Ríos et al., 2013).

A különböző fitonutriens metabolitok a termés össz-antioxidáns kapacitásához való hozzájárulásukon túl vizsgáltam a genotípus és a termés fenofázisának, valamint a kettő kombinációjának a hatását mind magára az antioxidáns kapacitásra, mind pedig az egyes fitonutriens vegyületekre (TPC, TFC és TMA). A jobb áttekinthetőség kedvéért a 14. táblázatban bemutatott értékeket csoportosítottam, aszerint, hogy extrém lila, liluló, vagy nem liluló genotípusokról van szó (19. ábra).



19. ábra – Genotípus és fenofázis hatása az egyes beltartalmi mutatókra a 4 érésfázisban, sötét lila színnel a 'Pim. Ney.', lila színnel a liluló genotípusok (11263, 11270 és 11274) összevont adatai, zöld színnel pedig a nem liluló genotípusok (11278, 11280 és 'Soroksári') adatai szerepelnek a TMA esetén logaritmusikus skálán

Annak ellenére, hogy mind a TMA mind pedig a TPC szoros pozitív korrelációt mutatott az antioxidáns kapacitással, ez az egyes fitonutrienseknek csak a trendjét határozta meg, a mennyiségüket nem. Ahogy a 19. ábra is mutatja, mind az antioxidáns kapacitás mind pedig a TPC tekintetében a nem liluló genotípusok esetén magasabb értékeket mértem, mint a liluló genotípusoknál, így nem igazolódtott be azon hipotézis, miszerint a magasabb antociántartalom kimutathatóan hozzájárul akár a TPC-hez, akár a FRAP-hoz. Számos tanulmány foglalkozik a genotípus és fenofázis hatásával a különböző beltartalmi mutatókra. Guilherme és munkatársai megállapították, hogy a termések érettségi foka nagymértékben befolyásolja a polifenol tartalmat és a polifenolos vegyületek összetételét. Ezzel szemben Howard és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy mind a polifenolok, mind a flavonoidok mennyiségét leginkább a genotípus befolyásolja (Guilherme et al., 2020; Howard et al., 2000). Ghasemnezhad és munkatársai is ugyanerre a következtetésre jutottak, miszerint a flavonoidok mennyiségében



bekövetkező változások inkább a fajtától, mintsem érettségtől függenek (Ghasemnezhad et al., 2011). Kétutas ANOVA elemzést végeztem, és az ebből kapott F-értékeket a 16. táblázatban foglaltam össze. A kövérrel szedett értékek a csoporton belül a legnagyobb hatást gyakorló tényezőket jelölik. Eredményeim azt mutatják, hogy a TMA-t, a TPC-t és a FRAP-ot a genotípus befolyásolta. Ezzel szemben a TFC-re a leginkább ható tényező a termések fenofázisa volt (16. táblázat, 19. ábra).

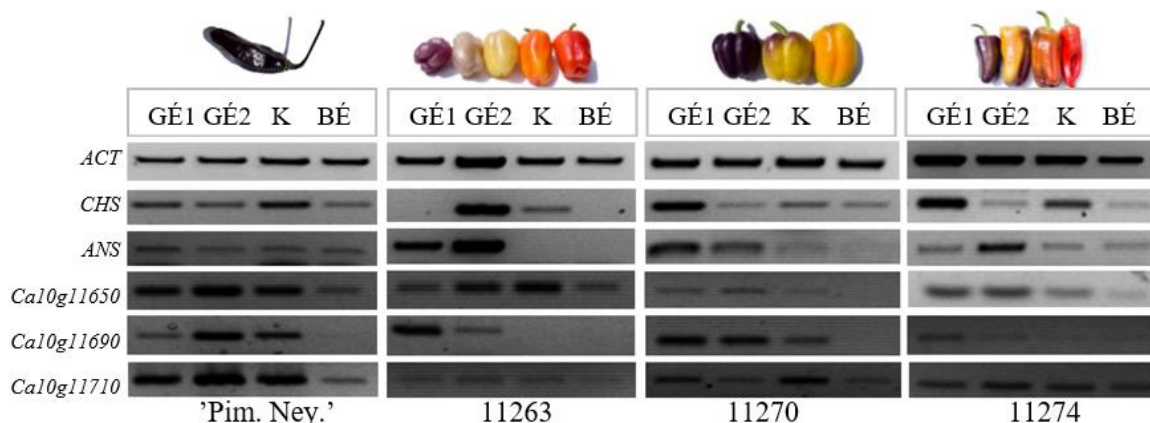
16. táblázat – F értékek összefoglaló táblázata a 7 genotípus mind a 4 érésfázisában a TMA, TPC, TFC és FRAP tekintetében

	TMA	TPC	TFC	FRAP
Genotípus (G)	<b>5918,75</b>	<b>438,54</b>	12311,20	<b>61209,87</b>
Fenofázis (F)	537,56	86,37	<b>37756,75</b>	4501,43
G x F	633,38	46,37	5255,05	9704,27

A TMA esetében a genotípus és a termések fenofázisa közötti kölcsönhatás kimutatható volt,  $F(18, 56) = 633,38$  a  $p < 0,001$  szinten. A TPC esetében  $F(18, 56) = 46,37$  a  $p < 0,001$  szinten. A TFC-t szintén nagymértékben befolyásolta a genotípus és a fenofázis együttes hatása, ahol  $F(18, 56) = 5255,05$  a  $p < 0,001$  szinten, valamint a FRAP estén is kimutatható az együttes hatás, ahol  $F(18, 56) = 9704,27$  és  $p < 0,001$  szinten (16. táblázat). Bár a legtöbb esetben a genotípus volt a leginkább befolyásoló tényező, a korrigált R-négyzet mind a négy esetben 0,978 és 1,00 között mozgott, ami azt jelenti, hogy a fitonutriensek mértékének varianciája szinte teljes egészében (illetve teljesen) a genotípus és a termés fenofázis hatásának tulajdonítható.

#### 5.4.8. Antocián bioszintézisben szerepet játszó gének expressziójának változása az érés folyamán

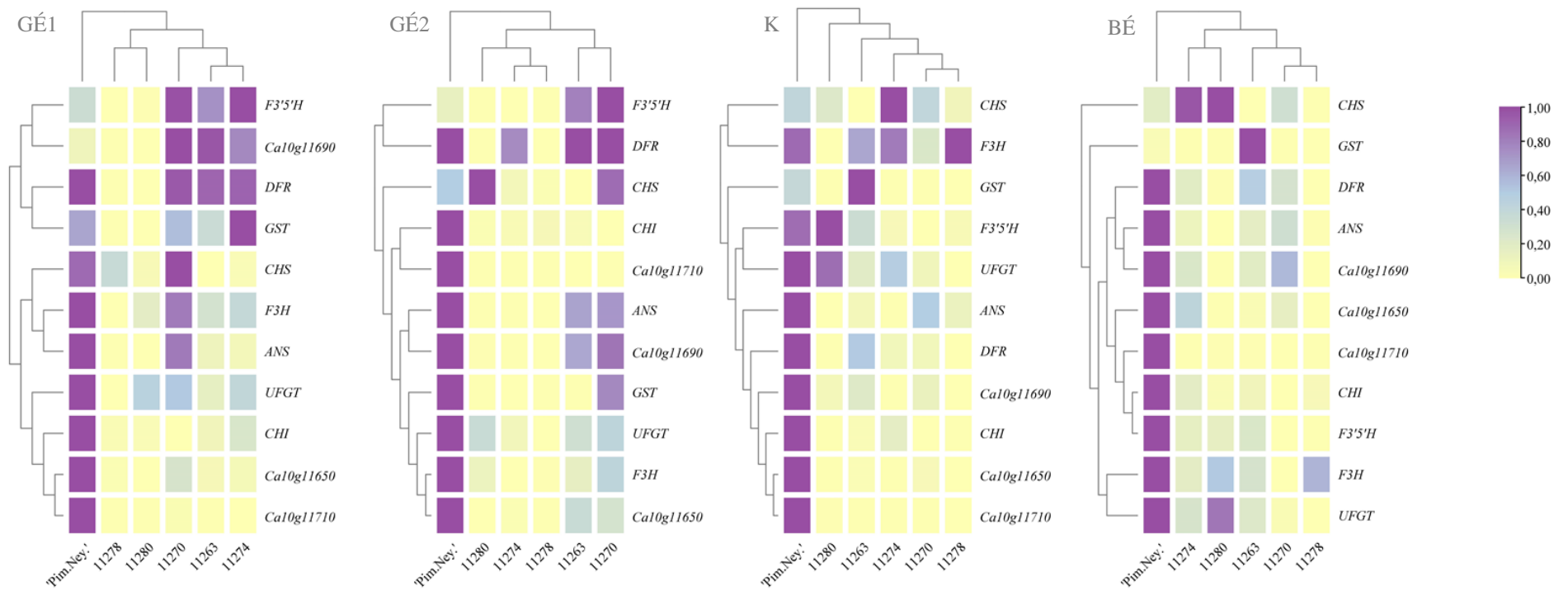
A génexpressziós vizsgálatokat párhuzamosan végeztem a beltartalmi adatok mérésével, ugyanazokból a fenofázisokból begyűjtött termésekből. A kvantitatív valós-idejű PCR-t megelőzte a minták szemi-quantitatív RT-PCR vizsgálata (20. ábra).



20. ábra – RT-PCR a 'Pim. Ney.' és a liluló mutánsok (11263, 11270, 11274) esetén, az actin (ACT), két struktúrgén (CHS, ANS) és 3 R2R3-MYB (Ca10g11650, Ca10g11690, Ca10g11710) példáján

Génexpresszió terén a legtöbb vizsgálat alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az R2R3-MYB transzkripciós faktorok az antocián bioszintetikus útvonal kései struktúrgénjeinek

(*F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *UFGT*, *GST*) expresszióját befolyásolják. Ugyanakkor ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésre az útvonalban az EBG-re (*CHI*, *CHS*, *F3H*) gyakorolt hatásokról (Aza-González et al., 2013; Borovsky et al., 2004; Stommel et al., 2009). A vizsgált genotípusok esetén az antociánok jelenléte pozitívan korrelált a bioszintetikus útvonal szabályozó és strukturális génjeinek a transzkriptumaival. Ahogy a hőtésképen is látszik, a GÉ2 fázistól kezdve, ahogy elkezdődik az antociánok degradációja, az expressziós profil alapján a mintákat már nem lehetett szétválasztani aszerint, hogy extrém lila, lila, illetve nem liluló genotípusokról van-e szó, egyedül az extrém lila 'Pim. Ney' tért el a többi mutánstól minden esetben (21. ábra, M3. – 29. ábra).



21. ábra – Antocián bioszintetikus útvonal szabályozó és struktúrgénjeinek az expressziója a négy érésfázisban a 'Soroksári' fajtához viszonyítva

Az antocián tartalom és a vizsgált gének közti korrelációt Pearson analízissel határoztam meg (17. táblázat). A szakirodalomban több egymásnak ellentmondó eredményt találni a vizsgált szövetek antocián tartalma és a struktúrgének expressziója közt.

17. táblázat – Pearson korrelációs együtthatók a vizsgált gének és az antocián tartalom közt

	<i>CHS</i>	<i>CHI</i>	<i>F3H</i>	<i>F3'5'H</i>	<i>DFR</i>	<i>ANS</i>	<i>UFGT</i>	<i>GST</i>	<i>11650</i>	<i>11690</i>	<i>11710</i>	TMA
<i>CHS</i>	1	korai gének		kései gének					transzkripciós faktorok			
<i>CHI</i>	-0,007	1										
<i>F3H</i>	0,274	0,489*	1									
<i>F3'5'H</i>	0,224	-0,114	0,136	1								
<i>DFR</i>	0,256	0,404	0,628**	0,685**	1							
<i>ANS</i>	0,249	0,840**	0,789**	0,142	0,689**	1						
<i>UFGT</i>	0,100	0,895**	0,568**	-0,101	0,424*	0,832**	1					
<i>GST</i>	-0,124	-0,033	-0,011	0,030	0,004	-0,030	-0,068	1				
<i>11650</i>	0,124	0,487*	0,798**	-0,070	0,430*	0,596**	0,482*	-0,026	1			
<i>11690</i>	0,307	0,278	0,529**	0,139	0,306	0,456*	0,258	-0,053	0,672**	1		
<i>11710</i>	0,040	0,978**	0,586**	-0,138	0,477*	0,882**	0,907**	-0,032	0,571**	0,277	1	
TMA	0,320	0,589**	0,594**	-0,081	0,400	0,556**	0,525**	-0,027	0,901**	0,450*	0,658**	1

\*: korreláció szignifikáns <0,05 szinten, \*\*: korreláció szignifikáns <0,01 szinten

Egy lila (*C. annuum* 'Z1') és egy fehér (*C. annuum* 'A3') genotípus levelének génextpressziós vizsgálata során megállapították, hogy a *CHS* és a *CHI* kivételével mind a korai, mind a kései struktúrgének expressziója magasabb volt a lila genotípusban. Ugyanakkor, a *CaMYBa* gén csendesítésekor a *CHS* és *CHI* expressziójában is csökkenést tapasztaltak. Ezek alapján azt állapították meg, hogy ezeknek a géneknek nem egyértelmű a bioszintetikus utat szabályozó transzkripciós faktoroktól való függésük (Zhang et al., 2015). Borovsky és munkatársai ugyanezeknek a géneknek a kifejeződését már a termésfalban vizsgálták. A *CHS* és *CHI* géneket is mind a lila termésű *C. annuum* '5226', mind a zöld termésű *C. chinense* '159234' növényekben ki tudták mutatni, ami megegyezik Zhang génextpressziós kísérletével (Borovsky et al., 2004). Így valószínűsíthető, hogy nem a kiindulási szövet/szerv befolyásolja az eltérő expressziós mintázatot. Eredményeim alapján a *CHS* esetén sem az antocián tartalom, sem a három vizsgált R2R3-MYB transzkripciós faktor közt nincs szignifikáns összefüggés. A *CHI* expressziója ellenben szorosán korrelál az antocián tartalommal ( $r=0,589^{**}$ ) és a *Ca10g1170* MYB transzkripciós faktor expressziójával ( $r=0,978^{**}$ ), míg alacsonyabb szignifikancia szinten a *Ca10g11650* gén expressziójával is ( $r=0,487^{*}$ ). Ennek ellentmond Jung és munkatársainak (2019) munkája, miszerint a *CHI* expressziója szignifikánsan alacsonyabb a zöld termésű *C. annuum* 'Chilbok No.2' fajtában a lila termésű *C. annuum* 'KC00134' fajtához képest. A *CHS* expressziós mintázatában azonban sem ők, sem Meng és munkatársai nem találtak szignifikáns eltérést (Jung et al., 2019; Meng et al., 2022). Stommel és munkatársai (2009) viszont mind a generatív mind pedig a vegetatív szervek esetén szignifikáns különbséget detektáltak a *CHS* expressziójában a lila *C. annuum* '06C59' és a nem liluló *C. annuum* '06C19-2' közt. Aguilar-Barragán és Ochoa-Alejo (2014) VIGS kísérletében a *CaMYBa* csendesítését követően a minták

termésfalát vizsgálva azt találták, hogy az *F3H* gén kivételével minden vizsgált gén expressziója csökkent. Tehát, kísérletük szerint a *CaMYBa* nincs hatással erre a génre. Ezzel szemben méréseim alapján az *F3H* magas szignifikancia szinten is szoros korrelációt mutat az összes vizsgált transzkripciós faktorról és az antocián tartalommal is (17. táblázat), ami megegyezik Jung eredményeivel, de ellentmond Meng és munkatársai méréseinek, akik a liluló genotípusokban alacsonyabb *F3H* expressziót mértek, mint a zöld termésűben (Jung et al., 2019; Meng et al., 2022). Aza-Gonzalez és munkatársai (2013) hat érésfázisban vizsgáltak 3 különböző mértékben antociánosodó *C. annuum* fajtát; 'Árbol' (részlegesen lila), 'Uvilla' (lila) és 'T74' (nem liluló). A *CHS* és *F3H* expresszióját a 'T74' fajtában is minden érésfázisban ki tudták mutatni, ellenben a *CHI* expressziója csak a legelső érésfázisban volt detektálható a nem liluló fajtában. A kései gének közül az *F3'5'H*, *DFR*, *UFGT* és *GST* csak a liluló genotípusokban fejeződtek ki, míg az *ANS* expressziója a fehér genotípus minden érésfázisában mérhető volt. Míg az általam vizsgált genotípusok esetén az *ANS* és az *UFGT* expressziója erős korrelációt mutatott a TMA-val, addig ezt nem sikerült kimutatni az *F3'5'H*, *DFR* és *GST* esetén. Ugyanakkor a *DFR* és két vizsgált MYB transzkripciós faktor közt alacsonyabb szignifikancia szinten pozitív korrelációt tudtam kimutatni. Ezzel szemben az *ANS* mindhárom transzkripciós faktor expressziójával szoros összefügg magasabb szignifikancia szinteken is (17. táblázat). Jung és munkatársai hasonló eredményre jutottak a késői struktúrgének tekintetében, szignifikáns különbséget a *DFR* esetén nem, csak az *ANS* és *UFGT* expressziójánál detektáltak a zöld és a lila termésű genotípusok vizsgálatokor (Jung et al., 2019). Meng és munkatársai ezzel ellentétben nem csak az *ANS* és *UFGT*, hanem a *DFR* génexpressziójában is szignifikáns különbséget tudott kimutatni a lila és zöld genotípusok közt (Meng et al., 2022). Ahogy Stommel és munkatársai is, mind a levél, virág és termés esetében is szignifikáns eltérést mértek a kései (*ANS*, *DFR*) struktúrgének expressziójának mértékében a liluló és nem liluló genotípusok közt (Stommel et al., 2009). Ezek a különbségek adódhatnak abból, hogy az egyes kísérletek eltérő kísérleti elrendezést alkalmaznak, illetve eltérő genotípusokat használnak.

Az R2R3-MYB transzkripciós faktorokat tekintve, mindhárom vizsgált gén expressziója szoros pozitív korrelációt mutat a termések antocián tartalmával. Borovsky és munkatársai a *Ca10g11650* azaz a *CaMYBa* gént írták le először, mint a vegetatív és generatív szervek antocián bioszintézisét szabályozó MYB transzkripciós faktor (Borovsky et al., 2004). Byun és munkatársai (2022) szerint a *Ca10g11690* (*CaAN3*) gén felelős a paprika termésspecifikus antocián felhalmozásáért. Az általam vizsgált mintáknál az antocián tartalom a *Ca10g11650* gén expressziójával mutatta a legerősebb korrelációt ( $r=0,901^{**}$ ) magasabb szignifikancia szinten. A *Ca10g11710* gén ugyan szintén magasabb szignifikancia szinten is pozitív korrelációt mutat az

antocián tartalommal ( $r=0,658^{**}$ ), de ez alacsonyabb, mint a *Ca10g11650* esetén, addig a *Ca10g11690* génnél alacsony szignifikancia szinten sikerült csak ezt az összefüggést bizonyítani ( $r=0,450^*$ ) (17. táblázat). A MYB transzkripció faktorok kifejeződését érésfázisokra lebontva is vizsgáltam a nem liluló 'Soroksári' fajtához viszonyítva (18. táblázat). A legmagasabb értékeket mindhárom vizsgált gén esetében az extrém lila, minden fenofázisában lilán maradó termésű 'Pim. Ney.' fajtánál mértem. A liluló mutánsok esetén a *Ca10g11650*, *Ca10g11690* és a *Ca10g11710*-re kapott értékek az érés előrehaladtával csökkenő tendenciát mutatnak, magas értékeket azokban a fenofázisokban mértem, ahol a termés lila színű (18. táblázat).

18. táblázat – R2R3-MYB transzkripció faktorok expressziója a 'Soroksári' fajtához viszonyítva az érés folyamán

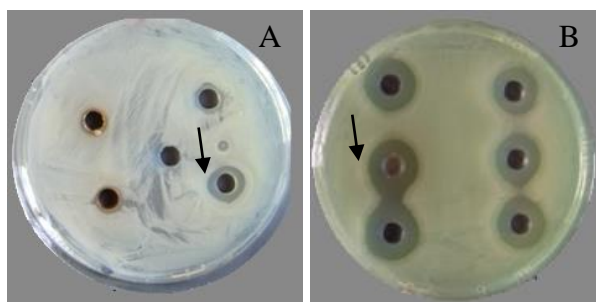
Gén ID	Fenofázis	'Pim. Ney.'	11263	11270	11274	11278	11280
<i>Ca10g11650</i>	GÉ1	1126,61	10,94	9,00	16,87	0,46	0,21
	GÉ2	2893,52	14,47	11,41	9,94	0,21	0,06
	K	35,89	3,66	3,02	4,97	0,23	0,31
	BÉ	11,16	5,53	1,57	3,09	0,20	0,10
<i>Ca10g11690</i>	GÉ1	17,71	2,37	5,07	2,06	0,02	0,47
	GÉ2	16,35	18,11	23,61	0,20	0,03	0,28
	K	5,25	1,47	1,53	0,18	0,06	0,44
	BÉ	3,36	0,53	0,86	0,05	0,03	0,24
<i>Ca10g11710</i>	GÉ1	80,05	8,25	12,12	0,43	0,36	0,47
	GÉ2	302,22	3,54	29,17	0,50	1,23	0,24
	K	177,36	0,46	1,74	0,32	0,85	0,48
	BÉ	171,32	0,36	0,29	0,36	0,67	0,42

Jegyzet: TMA a lilával színezett cellák esetén volt kimutatható

## 5.5. A paprika extraktumok antimikrobiális hatásának vizsgálata

Ahogy az úgynevezett 'super food'-okra, úgy a szintetikus antioxidánsokat kiváltó antimikrobiális hatással bíró természetes antioxidánsokra is egyre nagyobb a kereslet akár az élelmiszeripar akár a gyógyszeripar részéről (Bogusz Jr et al., 2018; Sandoval-Castro et al., 2017). Ezért az antociánosodó nemesítési vonalak ilyen célú felhasználhatóságát vizsgáltam.

Számos tanulmány esetén a metanolos extraktumok pozitív eredményt mutattak a gátlási zónák megjelenését illetően (Ameya et al., 2018; Koffi-Nevry et al., 2012; Kouassi et al., 2010), azonban az általam vizsgált paprikák esetén ezt nem tapasztaltam. A metanolos kivonatok közül egyedül a 'Pim. Ney.' paprika terméséből készült extraktum volt hatásos. A vizsgált baktériumok tekintetében ez is kizárólag csak a *Pseudomonas aeruginosa* esetén generált mérhető gátlási zónát, így a metanolos kivonatok a továbbiakban nem használtam (22. ábra).



22. ábra – Metanollal (A) és metanol:desztilláltvíz:hangyasav (B) eleggyel készült kivonatok összehasonlítása *P. aeruginosa* esetén, a nyilak a 'Pim. Ney.' terméséből készített kivonatokot mutatják

Tiszta metanol helyett a metanol:desztillált víz:hangyasav 60:39:1 térfogat százaléku elegyét használtam oldószerként, hiszen az antociánok savas közegben stabilak (Markakis, 1982). Tekintve, hogy számos tanulmány beszámol a polifenolos vegyületek jobb oldhatóságáról a savas metanosos vizes közegben, így mind az analitikai mind az antimikrobiális hatás méréséhez ezt az elegyet alkalmaztam (Kim és Lee, 2017; Petkovska et al., 2016; Petreska Stanoeva et al., 2020). A vizsgált vonalak és fajták beltartalmi mutatóit a két érésfázisban a következő táblázat összegzi (19. táblázat).

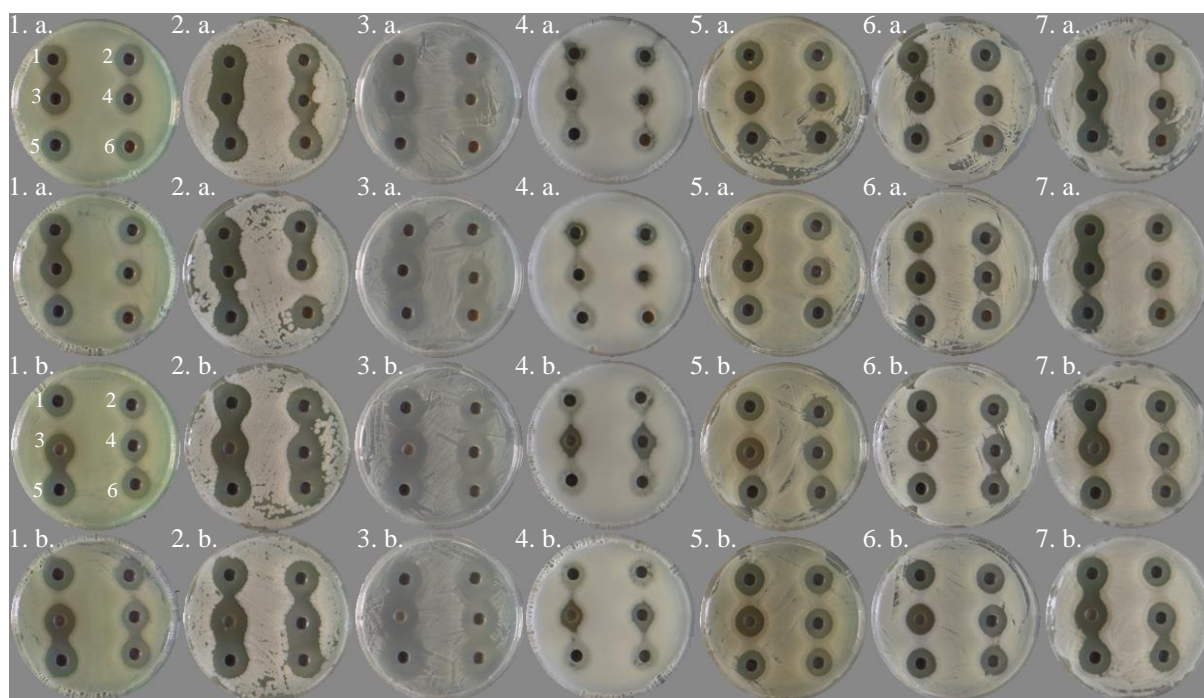
*19. táblázat – A vizsgált nemesítése vonalak és fajták beltartalmi mutatói*

		TPC	TFC	TMA	FRAP
		mg Ga/g	mg Qe/g	µg cy-3-glu/g	µmol As/g
GÉ2	3215/1	70,93b±1,06	12,92c±0,10	36299,37c±3569,17	729,91c±5,77
	3232/2	61,21b±4,42	8,87d±0,16	Nd. <sup>1</sup>	723,59c±4,52
	11263	33,07a,c±1,02	34,51a±0,03	5615,80a±412,52	181,01a±0,63
	11270	25,57a±0,43	22,62b±0,03	20543,74b±958,88	129,29b±0,83
	'Soroksári'	42,75c±1,96	10,48e±0,4	356,25a±22,85	199,79d±0,88
BÉ	3215/1	74,21b±0,99	10,44c±0,10	34680,72b±9447,02	500,59c±5,02
	3232/2	55,37c±2,26	8,09d±0,14	Nd. <sup>1</sup>	467,94d±5,58
	11263	21,12a±0,59	5,32a±0,02	Nd. <sup>1</sup>	245,63a±0,30
	11270	23,87a±0,49	2,10b±0,05	352,08a±29,04	217,02b±0,67
	'Soroksári'	22,31a±0,84	7,04g±0,05	Nd. <sup>1</sup>	207,80b±0,24
	'Bhut Jol'	119,79d±1,55	26,28e±0,37	Nd. <sup>1</sup>	796,57e±7,90
	'Pim.Ney.'	98,08e±5,63	27,57f±0,27	154812,58c±77,25	1155,14f±2,98

Jegyzet: Egy oszlop egy altáblázatában lévő azonos betűvel ellátott adatok szignifikánsan nem különböznek egymástól a  $p < 0,05$  szinten. <sup>1</sup>: Nem detektált.

A paprika kivonatok hatékonyan gátolták a vizsgált baktériumfajok egy részét, míg másokkal szemben hatástalanok voltak. Bár az antimikrobiális hatásuk nem volt egységes, valamennyi paprika kivonat aktivitást mutatott a vizsgálatban használt legtöbb baktériummal szemben: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* és *Klebsiella pneumoniae* (23. ábra, 20. táblázat). Ugyanakkor, a *Bacillus cereus*-ra egyedül a 11263, 11270 és a két *C. chinense* a 'Pim. Ney.' és a 'Bhut Jol.' volt hatással.





23. ábra – Gátlási zónák a 100 mg/ml hangyasavas kivonatok esetén, 1: *P. aeruginosa*, 2: *B. subtilis*, 3: *E. faecalis*, 4: *B. cereus*, 5: *E. coli*, 6: *S. aureus*, 7: *K. pneumoniae*, a minták elrendezése balról jobbra 'a': 1: 11263 (GÉ2), 2: 11263 (BÉ), 3: 11270 (GÉ2), 4: 11270 (BÉ), 5: 'Soroksári' (GÉ2), 6: 'Soroksári' (BÉ), 'b': 1: 3232/2 (GÉ2), 2: 3232/2 (BÉ), 3: 'Pim. Ney.' (BÉ), 4: 'Bhut Jol.' (BÉ), 5: 3215/1 (GÉ2), 6: 3215/1 (BÉ)

Az agardiffúziós kísérletek alapján a vizsgált baktériumok ellen a 'Pim. Ney.' 14-26 mm, a 'Bhut Jol.' pedig 15-26 mm gátlási zónákat eredményezett, így a vizsgált paprikák közül ennek a két *C. chinense* fajtának volt átlagosan a legnagyobb antimikrobiális aktivitása, a mért gátlási zóna a 'Pim. Ney.' esetén 20,93 mm és a 'Bhut Jol.'-nál pedig 20,5 mm volt. A vizsgált *C. annuum* paprikák közt a legnagyobb gátlási zónát a 11263 paprikánál kaptam. A kivonatok összeségében az *E. faecalis* ellen fejtették ki leginkább a hatásukat, a legellenállóbb baktérium a *B. cereus* volt (23. ábra, 20. táblázat).

20. táblázat – Gátlási zónák mérete (mm) a 100 mg/ml hangyasavas kivonatok esetén

		<i>P.aureginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
GÉ2	3215/1	21,5a±0,5	24,5a±0,5	28,5a±1,5	0,0a±0,0	20,0a±0,0	19,5a±0,5	21,5a±0,5
	3232/2	21,0a±0,0	24,5a±0,5	25,0a,b±0,0	0,0a±0,0	19,5a±0,5	20,0a±0,0	22,5a±0,5
	11263	20,5a±0,5	22,5a±0,5	24,0b±0,0	12,0b±1,0	19,5a±0,5	20,0a±0,0	20,0a±0,0
	11270	21,5a±0,5	24,5a±0,5	25,5a,b±0,5	0,0a±0,0	20,5a±0,5	20,0a±0,0	21,5a±0,5
	'Soroksári'	20,0a±0,0	24,0a±0,0	24,5a,b±0,5	0,0a±0,0	19,5a±0,5	18,0a±1,0	21,5a±0,5
BÉ	3215/1	20,5a,b±0,5	24,0a±1,0	20,5a±5,5	0,0a±0,0	19,5a±0,5	18,5a±0,5	20,0a±0,0
	3232/2	18,5a,b±0,5	24,0a±0,0	23,5a±0,5	0,0a±0,0	19,0a±0,0	19,0a±0,0	19,5a±0,5
	11263	20,5a,b±0,5	21,5a,b±0,5	24,5a±0,5	13,5b,c±0,5	19,0a±0,0	20,5a±0,5	18,5a±0,5
	11270	17,5a±0,5	19,5b±0,5	22,0a±0,0	11,5b±0,5	19,0a±0,0	19,0a±0,0	16,0a±0,0
	'Soroksári'	18,5a,b±0,5	21,5a,b±0,5	24,0a±0,0	0,0a±0,0	19,0a±0,0	19,5a±0,5	19,0a±1,0
	'Bhut Jol.'	19,5a,b±0,5	25,0a±0,0	24,5a±0,0	15,5c±0,5	20,0a±0,0	19,0a±0,0	20,0a±0,0
	'Pim.Ney.'	21,0b±0,0	25,0a±0,5	25,5a±1,0	14,5b,c±0,5	19,5a±0,5	19,5a±0,5	21,5a±0,5

Jegyzet: Egy oszlop egy altáblázatában lévő azonos betűvel ellátott adatok szignifikánsan nem különböznek egymástól a  $p < 0,05$  szinten.



Szignifikáns eltérést a minták közt gazdasági érettségben csak az *E. faecalis* és a *B. cereus* esetén, biológiai érettségben pedig a *P. aeruginosa*, *B. subtilis* és a *B. cereus* esetén detektáltam (20. táblázat). A vizsgált nemesítési vonalak és fajták a két fenofázisban mért gátlási zónájának összehasonlításakor szignifikáns eltérést csak a 3232/2 paprikánál a *P. aeruginosa*, a 11270 paprikánál a *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis* és a *K. pneumoniae*, a 'Soroksári' fajta esetén pedig a *B. subtilis* esetén mértem. Szinte minden esetben a biológiailag érett fázisban mértem a kisebb gátlási zónákat, kivéve a 11270 paprikánál, amely nem mutatott antimikrobiális aktivitást a *B. cereus* ellen a gazdaságilag érett fázisban, csak teljes biológiai érettségben.

Más kutatók arra jutottak, A *C. annum* 'Antillais' és egy *C. frutescens* 'Sudanese' paprika vizes, illetve metanolos kivonatainak vizsgálatakor a *P. aeruginosa* és *E. coli* esetén nem alakult ki gátlási zóna (Koffi-Nevry et al., 2012). Ezzel ellentétben Ameya és munkatársai (2018) a kivonószerek függvényében az *E. coli* esetén 13-18 mm, a *P. aeruginosa*-nál 11-22 mm és a *K. pneumoniae* esetén pedig 12-19 mm gátlási zónát mértek, míg a Gram-pozitív *S. aureus* esetén ez 23-28 mm volt. Összehasonlítva a baktériumok szenzitivitását nem találtak szignifikáns különbséget, csak az oldószerek közt. Több tanulmány is beszámol a paprika bioaktív komponenseinek mennyisége és minősége, antimikrobiális hatása és az oldószerek összefüggéseiről (Chandel et al., 2020; Kouassi et al., 2010; Nascimento et al., 2013; Nascimento et al., 2014).

Szemben Koffy-Nevry tanulmányában közöltekkel, az általam vizsgált nemesítési vonalak és fajták metanol: desztillált víz: hangyasavas kivonatai hatásosnak bizonyultak a két Gram negatív baktériummal szemben is (23. ábra, 20. táblázat). Kouassi és munkatársai szintén átlagosan alacsonyabb gátlási zónákat mértek az *E. coli*, *P. aeruginosa* és *V. cholerae* baktériumok esetében, mint a vizsgált Gram-pozitív baktériumoknál (Kouassi et al., 2010). Általánosságban elmondható, hogy a növényi kivonatok nagyobb aktivitást mutatnak a Gram-pozitív baktériumok esetén (McCutcheon et al., 1992). Ennek a jelenségnek az lehet a magyarázata, hogy a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumoknak eltérő morfológiai felépítése van. A Gram-negatív baktériumok rendelkeznek egy külső foszfolipid membránnal, amely lipopoliszacharid komponenseket tartalmaz, ezáltal a sejtfal áthatolhatatlanná válik a lipofil anyagokkal szemben, míg a porin csatornák szelektív gátként működnek a hidforil anyagokkal szemben (Nikaido, 2003).

Mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumok esetén a sejtfal az ozmotikus stabilitás biztosításáért felelős, sérülése az ozmotikus nyomás csökkenésén keresztül a baktériumok ellenállóképességének a csökkenéséhez vezethet. A polifenolos vegyületek az

antimikrobiális hatásukat többek közt a sejtfalak károsításán keresztül fejtik ki, így gátolva a mikróbák növekedését (Kumar et al., 2021). *S. aureus*-szal végzett kísérletek során azt tapasztalták, hogy az epigallokatekin-gallát közvetlenül a peptidoglikán réteghez kapcsolódva csökkenti a sejtek ellenállóképességét az alacsony ozmotikus viszonyokkal szemben (Zhao et al., 2002). Gallusz- és ferulasavval végzett kísérletek során sikeresen gátolták az *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa* és *S. aureus* baktériumok pázsit képzését azáltal, hogy ezek a vegyületek a sejtfalhoz kapcsolódva módosították annak a struktúráját (Borges et al., 2012). Több polifenolos vegyületről is kimutatták, hogy a membrán fluditását befolyásolják, növelik a permeabilitását, illetve tönkreteszik annak kettős szerkezetét (Bae et al., 2022). Ugyanakkor más hatással is rendelkeznek, gátolhatják különböző enzimek működését (Kang et al., 2006), vagy egyéb fehérjékhez kapcsolódva denaturálhatják azokat (Brudzynski és Maldonado-Alvarez, 2015). Így a paprikák antimikrobiális hatásával összefüggésben vizsgáltam azok beltartalmi mutatóit a *C. annuum* paprikák esetén két érésfázisban, a *C. chinense* fajtáknál pedig teljes biológiai érettségben, különös tekintettel a polifenolos vegyületekre (19. táblázat, 20. táblázat).

A Wilks  $\lambda$  teszt alapján a totál polifenol tartalomnak és a totál flavonoid tartalomnak nem volt szignifikáns hatása a gátlási zónákra. Ellenben a totál monomer antocián tartalom jelentős hatást gyakorolt a gátlási zónák méretére,  $V=0,04$ ,  $F(7, 14)=48,82$ ,  $p=0,00$ . Hasonló szignifikáns hatást mutatott a genotípus,  $V=0,00$ ,  $F(42,00, 69,12)=12,67$ ,  $p=0,00$ , illetve a genotípus fenofázis együttese is  $V=0,001$ ,  $F(28,00, 51,90)=11,80$ ,  $p=0,00$ . Különálló tényezőkre bontva, ANOVA vizsgálattal, a totál polifenol tartalom szignifikánsan hatott az *E. coli* esetén tapasztalt gátlási zónák méretére  $F(1, 20)=10,08$ ,  $p=0,005$ . A totál monomer antocián tartalom a legnagyobb hatást az *E. coli*  $F(1, 20)=6,02$ ,  $p=0,023$  és az *E. faecalis*  $F(1, 20)=199,80$ ,  $p=0,00$  baktériumokra gyakorolta. A genotípus hatás a *P. aeruginosa* és *B. subtilis* kivételével minden vizsgált faj esetén szignifikáns volt. A vizsgált érésfázis és a genotípus együttes hatása csak az *E. coli* esetén nem volt szignifikáns.

A 3.8. fejezetben részletezettek alapján, Sharma és munkatársai (2020), Dong és munkatársai (2020), illetve Liu és munkatársai (2022a) eredményei mind megegyeznek az általam mért eredményekkel, hiszen a MANOVA a genotípus hatásán és a genotípus és a fenofázis együttes hatásán túl, a minták antocián tartalmának szignifikáns hatását is bebizonyította a vizsgált baktériumok gátlási zónájára nézve. Egy utas ANOVA esetén az antocián tartalom *E. coli* és *E. faecalis* baktériumokra kifejtett hatása adódott a legerősebbnek. Ma és munkatársai (2019) egy összefoglaló cikkben összegzik az antociánok *E. coli*-ra és *Salmonella spp.*-re kifejtett hatását (Ma et al., 2019). Ugyanakkor a legtöbb cikk gyümölcsökből készített kivonatokról szól, de,

ahogy a búza kivonatok és az általam vizsgált paprika kivonatok is mutatják, indokolt lehet az ilyen jellegű vizsgálatokat kiterjeszteni akár szántóföldi, akár kertészeti zöldségnövényekre is.

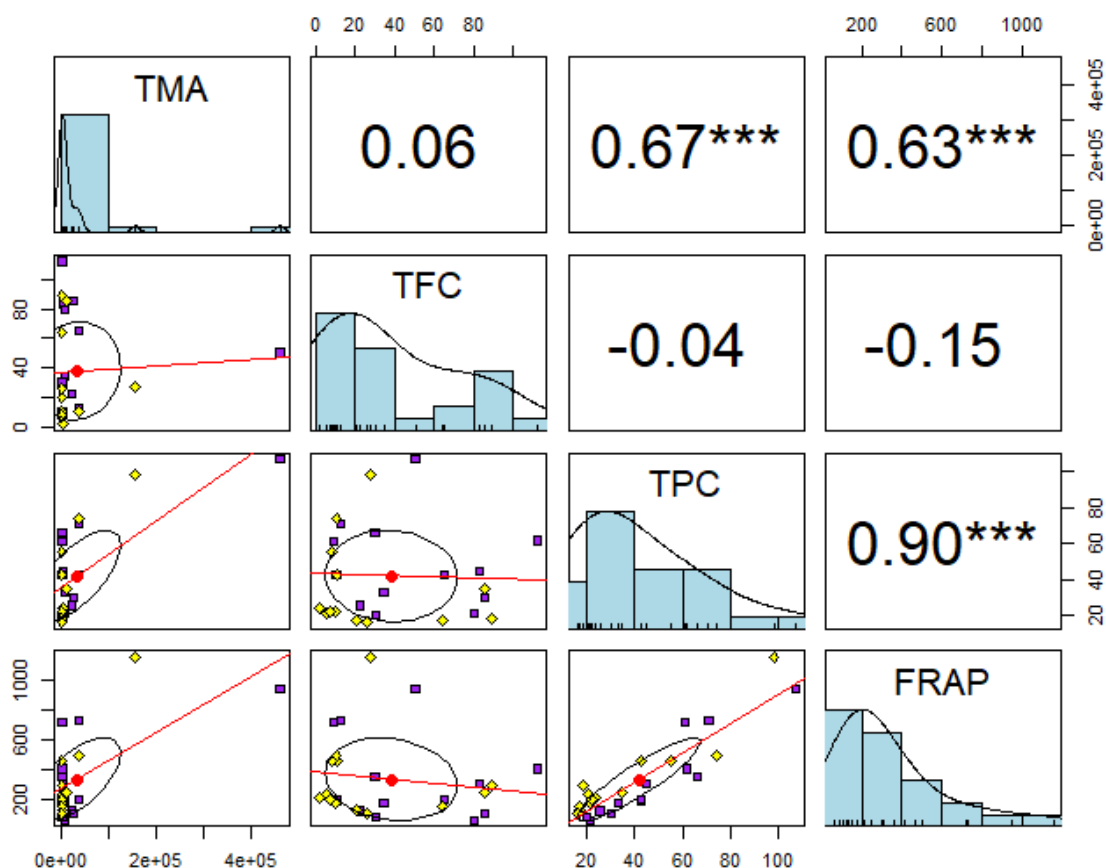
### **5.6. A beltartalmi mutatók és génexpressziós adatok összegzése az érés során**

A burgonyafélék családján belüli nagyfokú szinténia lehetővé tette a petúniában leírt antocián bioszintézisben akár struktúrgénként, akár az ezeket szabályozó transzkripciós faktorként szerepet játszó gének térképezését a burgonyafélék más képviselőiben. A paprika esetén először karakterizált antocián bioszintézist szabályozó transzkripciós faktor az *A* lókuszon található *CaMYBa* által kódolt R2R3-MYB, ami mind a vegetatív mind a generatív szövetek lilulását befolyásolja. A nemrég karakterizált *CaAN3* és a *CaP* gének felelősek a gazdaságilag érett termésszín, illetve a csíkosan lila termés kialakításáért.

Azon paprikák esetén, ahol a gazdaságilag érett 2 (GÉ2) és biológiailag érett (BÉ) fázisokban génexpressziós vizsgálatok, illetve az analitikai mérések megtörténtek, az adatok összegzésre kerültek. Mindezt azért, hogy átfogóbb képet kapjunk a három transzkripciós faktor által indukált antocián felhalmozás beltartalomra való hatásáról, illetve a bioszintetikus útvonal struktúrgénjei és az antocián tartalom közti összefüggésekről.

A beltartalmi mutatók tekintetében a polifenolos vegyületek, azon belül is a TPC, TFC és TMA, illetve az összes antioxidáns kapacitás adatait összegeztem a GÉ2 és BÉ érésfázisokban, 13 paprika – 'Pim.Ney', 'Black Pearl', 'Kaldom', Hibrid-1, Hibrid-2, 11263, 11270, 11274, 11278, 11280, 'Soroksári', 3232/2 és 3215/1 – esetén, ami az ábrán látható huszonhat különálló mérési pontot adja (24. ábra). A pontfelhő diagram a mért értékeket szimbolizálja lila színnel a GÉ2, és sárgával a BÉ fázisokban. A hisztogramon a TMA, TFC, TPC és FRAP összesített értékeinek az eloszlása látható, amelyek sehol nem egyenletesek, több helyen kiugró értékek tapasztalhatóak, ami logikai alapot ad a klaszteranalízishez. A jobb felső sarokban pedig a Pearson korrelációs együtthatók szerepelnek (24. ábra).

## Beltartalmi adatok összefüggései a két érésfázisban

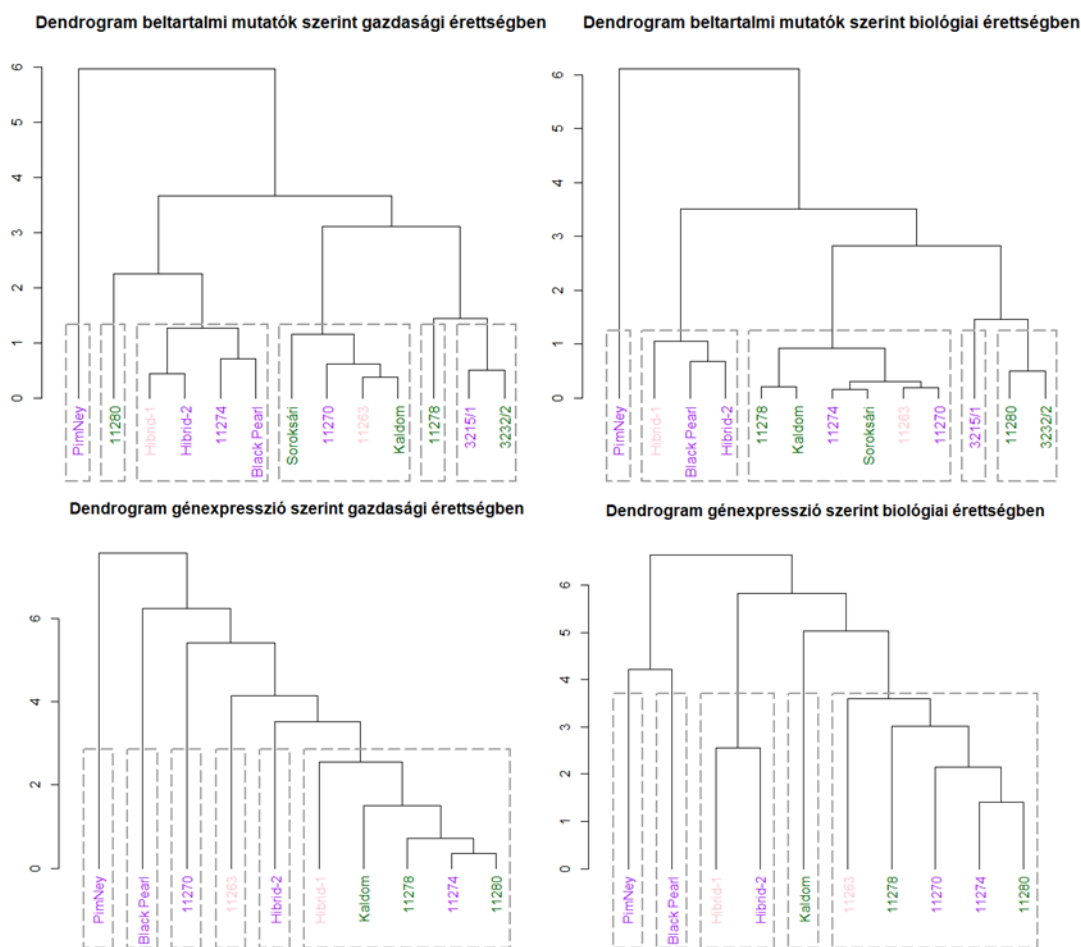


24. ábra – Beltartalmi mutatók összefüggései a GÉ2 és BÉ érésfázisokban 13 paprika esetén, a lila négyszög a GÉ2, a sárga a BÉ érésfázisokat jelöli, a csillaggal jelölt értékek esetén a korreláció szignifikáns a  $p < 0,01$  szinten

Az antocián tartalom magas szignifikancia szinten is szorosan összefüggött a totál polifenol tartalommal, mint ez korábban is megállapításra került. Ugyanakkor, jelen esetben más paprikákat is bevonva a vizsgálatba, ugyanúgy szoros pozitív összefüggés tapasztalható az antocián tartalom és a minták antioxidáns kapacitása között, tehát kijelenthető, hogy az antociánok statisztikailag igazolhatóan hozzájárulnak az antioxidáns kapacitáshoz a vizsgált fajtákban és nemesítési vonalakban (24. ábra).

Klaszteranalízist végezve, mindkét érésfázisban a 'Pim. Ney.' – egyetlen *C. chinense* fajként – a beltartalmi mutatókat tekintve külön kládot alkot. Annak ellenére, hogy a Hibrid-2 csoportot jóval nagyobb globális sugárzás érte ugyanazon időszak alatt, mint a Hibrid-1 csoportot, ami nem csak az antocián tartalmat, de egyéb polifenolos vegyületek mennyiségét is növelte, a beltartalmi mutatóik alapján a Hibrid-1 és a Hibrid-2 növények azonos kládba kerültek a GÉ2 fázisban. A biológiai érettségben is azonos klaszterben szerepelnek, így annak ellenére, hogy a Hibrid-2 esetén mért értékek magasabbak voltak a több világítás következtében, ez nem volt elég ahhoz, hogy a klaszteranalízis külön csoportokba sorolja ezeket a paprikákat, tehát nem a környezeti hatás a legmeghatározóbb (25. ábra).

A génextpressziós profiljuk alapján az antociános minták a 11274 nemesítési vonalat kivéve szinte mind önálló csoportot képeznek a GÉ2 fázisban, amikor a termékek különbözőképpen lilulnak. A biológiai érettségben ezek a különbségek már kisimulnak, külön csoportot itt az extrém mértékben liluló *C. chinense* 'Pim. Ney' képez, a LINE-1 retrotranszpozon inszerciót tartalmazó 'Black Pearl' paprikával együtt (25. ábra). Az eltérő fényen tartott Hibrid-1 és Hibrid-2 növények a gazdasági érettségben elkülönülnek, a több fény miatt magasabb génextpressziós profillal rendelkező Hibrid-2 csoport másik kládba került (25. ábra).



25. ábra – Klaszteranalízis a beltartalmi mutatók és a génextpressziós profil alapján a gazdasági (GÉ2) és biológiai (BÉ) érettségben, a vizsgált paprikák nevének színe az antociánsodás mértékét jelzi, zöld: nem lilul, rózsaszín: kis mértékben lilul, lila: a termést magas antocián felhalmozás jellemzi

A bioszintetikus útvonal struktúrgénjeinek az expressziója, illetve az antocián tartalom közti ellentmondások a burgonyafélék családján belül általánosak, a legtöbb ellentmondó eredményt a paprika esetén írták le. A következő táblázatban a levelek és a termékek adatainak összegzése látható a korábbi, 3. táblázat tükrében (21. táblázat). Mind a vegetatív, mind a generatív szövetek elmezésekor a *CHS* expresszió korrelált az antocián tartalommal, de a köztük lévő kapcsolat nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Ennek egy magyarázata az lehet, hogy az antocián bioszintézis fő szabályozó génje a *Ca10g11650* nem közvetlenül a *CHS* gént szabályozza, hanem

az általános fenilpropanoid útvonal valamelyik korábbi génjét. Ezt támasztja alá Meng és munkatársainak (2022) eredménye is, akik a *PAL* és *C4H* gének expressziója és a termések antocián tartalma közt pozitív korrelációt mutattak ki.

21. táblázat – *Struktúrgének expressziója és a szövetek antocián tartalma közti korrelációk*

	Paprika	Saját eredmények	
		levél	termés
<i>CHS</i>	±	<	<
<i>CHI</i>	±	+	+
<i>F3H</i>	±	+	+
<i>F3'H</i>	+	Nv.	Nv.
<i>F3'5'H</i>	+	Nv.	>
<i>DFR</i>	+	+	<
<i>ANS</i>	±	+	+
<i>UFGT</i>	+	+	+

**paprika adatok:** '±': ellentmondó eredmények a különböző szerzőknél, '+' : pozitív korreláció, (Aguilar-Barragán és Ochoa-Alejo, 2014; Aza-Gonzalez et al., 2013; Borovsky et al., 2004; Filyushin et al., 2020; Jung et al., 2019; Lightbourn et al., 2007; Meng et al., 2022; Stommel et al., 2009; Tang et al., 2020; Zhang et al., 2015), **saját eredmények:** '<': statisztikailag nem igazolható összefüggés, de növekvő tendencia, '>': statisztikailag nem igazolható összefüggés, de csökkenő tendencia '+' : pozitív korreláció, 'Nv.': Nem vizsgált

A *CHI* gén expressziója és a vizsgált szövet TMA tartalma közt pozitív korrelációt találtam, ahogy az *F3H* esetén is. Ezen struktúrgének expressziója és a szövetek TMA tartalma közti, illetve az expressziójuk és az őket szabályozó transzkripciós faktorok expressziója közti pozitív korreláció arra enged következtetni, hogy az antocián bioszintetikus útvonal szabályozása már a korai struktúrgénektől kezdve elindul.

A késői struktúrgének tekintetében, míg a *DFR* expressziója a levelek esetén statisztikailag igazolhatóan összefüggött a TMA-val, addig a termések esetén csak egy pozitív trend volt megfigyelhető, annak ellenére, hogy a négy érésfázisban az expressziója szorosan korrelált a *Ca10g11650* és a *Ca10g1170* expressziós faktorokéval. Ugyanakkor, az összefüggés egyértelmű az *UFGT* esetén, amelynek expressziója mind az antocián tartalommal, mind pedig a *Ca10g11650* és a *Ca10g11710* gének expressziójával szoros pozitív korrelációt mutat. Az *ANS* expressziója is mindkét szövetben összefüggött azok antocián tartalmával. A négy érésfázisban vizsgált termések esetén pedig a *Ca10g11650*, *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* gének expressziójával is, annak ellenére, hogy a *Ca10g11650* csendesítésekor se a levélben, se a virágban nem csökkent szignifikáns mértékben az expressziója.

## 6. Következtetések és javaslatok

Az R2R3-MYB transzkripciós faktorokat kódoló gének – *Ca10g11650*, *Ca10g11690* és *Ca10g11710* – szekvenciabeli polimorfizmusainak vizsgálata után valószínűsíthető, hogy az általam detektált, illetve a szakirodalom alapján vizsgált polimorfizmusok az eltérő faj, illetve fajtahasználat miatt adódnak, hiszen egyik vizsgált különbséget sem tudtam teljes bizonyossággal a különböző fenotípusokhoz kötni.

Szakirodalmi adatok alapján nincs egyetértés a *CaMYBa* hatásáról az antocián bioszintetikus út strukturális génjeire, mint ahogy abban sem, hogy a struktúrgének expressziója és a termékek antocián tartalma hogyan függ össze. A *Ca10g11650* géncsendesített növények adatai alapján megállapítható, hogy a *CaMYBa* nem csak a kései struktúrgénekre van hatással, hanem a koraiakra is. A géncsendesített növényben mind a virág, mind a levél esetén a *CHI* gén expressziója szignifikánsan csökkent, míg az *F3H* expresszió a levélben mutatott szignifikáns csökkenést. A kései gének kapcsán ezt a hatást a levelek és a virágok tekintetében a *DFR* és *UFGT* esetén tudtam igazolni, az *ANS* expressziója ellenben nem csökkent szignifikáns mértékben.

Ugyanakkor, a termékek négy fenofázisában mért génexpressziós profilja alapján a *Ca10g11650* expressziója pozitív korrelációt mutatott magasabb szignifikancia szinten is az *ANS* expressziójával, míg a *DFR* és az *UFGT* esetén csak alacsonyabb szignifikancia szinten produkálta ezt. Ahogy a géncsendesítés esetén, úgy a termékek vizsgálatakor sem tudtam kimutatni statisztikailag igazolható összefüggést a *Ca10g11650* és a *CHS* expressziója közt, ugyanakkor mindkét kísérlet során a vizsgált szövetek esetén megfigyelhető trend arra enged következtetni, hogy a *Ca10g11650* nem közvetlenül a *CHS*-t szabályozza, hanem feltehetőleg az útvonal korábbi génjeire van hatással. Ezért indokolt a vizsgálatokat kiterjeszteni az általános fenilpropanoid útvonal további génjeire is. Ezzel szemben a *CHI* és az *F3H* az összesített adatok alapján a *Ca10g11650* expressziójával szorosan összefügg. Tehát ennek tükrében, a vegetatív és generatív szöveteknél kapott eredmények alapján, a *Ca10g11650* nem csak a bioszintetikus útvonal kései génjeit szabályozza, hanem a korai gének közül a *CHI* és az *F3H* génekre is hatással van.

A *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* transzkripciós faktorok expresszióját vizsgálva ugyanezekben a fenofázisokban, egyértelmű, hogy a *Ca10g11710*-nek nagyobb hatása van az antocián bioszintetikus útvonal korai (*CHI*, *F3H*) és kései (*DFR*, *ANS*, *UFGT*) struktúrgénjeire, mint a *Ca10g11690*-nek. A *Ca10g11690* expressziója csak az *F3H* és az *ANS* expressziójával

mutatott szignifikáns összefüggést, így ennek a génnek feltehetőleg kisebb a vizsgált fajtákban, illetve szövetekben a hatása, mint a *Ca10g11650*-nek vagy akár a *Ca10g11710*-nek.

Az antocián termelés genetikai háttere jelentős genotípus függőséget mutat. A korábbi kutatásokban meghatározott genetikai háttér nem minden esetben magyarázza az antociánok termelődését a különböző vegetatív és generatív szövetekben. Az irodalomban megtalálható génexpresszióbeli ellentmondások adódhatnak abból is, hogy a különböző ilyen irányú kutatások eltérő kísérleti elrendezéseket alkalmaznak, így például eltérő hőmérsékleten, más megvilágítás, esetleg nappalhossz alatt, más termesztőközegben és eltérő genotípusokat alkalmaznak. Ezek a faktorok mind-mind hatással vannak az antocián bioszintézisre, ezért ezek a kutatások egy elrendezésen belül összevethetőek, de más kísérletekkel egzakt módon már nem. Így csak akkor kapunk pontos lenyomatot a génexpresszióról, ha ugyanolyan körülmények közt állítjuk be az eddig leírt kísérleteket, szem előtt tartva a *ceteris paribus* elvét.

A beltartalmi mutatókat tekintve, szoros pozitív összefüggés tapasztalható az antocián tartalom és a minták antioxidáns kapacitása között, tehát kijelenthető, hogy az antociánok statisztikailag igazolhatóan hozzájárulnak az antioxidáns kapacitáshoz a vizsgált fajtákban és nemesítési vonalakban, így az antociánosodó fajták fogyasztása a funkcionális táplálkozás részévé kell, hogy váljon.

Bár bizonyos fajtákban a stressz indukálta antociánosodás nemkívánatos tulajdonság, ugyanakkor az antociánok hatása nem csak az antioxidáns kapacitás, de az antimikrobiális aktivitás esetén is igazolható volt az *E. coli* és *E. faecalis* esetén, így tehát érdemes nem csak funkcionális élelmiszerként, hanem potenciális egészségvédő terméként tekinteni ezekre a növényekre.

A LINE-1 retrotranszpozon inszerciót vizsgálva, annak ellenére, hogy szakirodalom szerint a hasadó nemzedék adatai alapján egy gén felelős az antocián felhalmozásért, az általam vizsgált F<sub>2</sub> növényeknél ezt nem tudtam igazolni a p=0,05 értéknél ( $\chi^2_{krit}=5,99$ ;  $\chi^2_{számolt}=6,98$ ), viszont p=0,03 esetén ( $\chi^2_{krit}=7,01$ ) megfelelt az elméleti hasadási aránynak. Ezért célszerű további keresztezéseket végezni más szülői genotípusokkal.

Azonos keresztezésből származó, azonos genetikai háttérrel rendelkező paprikák tartási körülményei közt csak egy faktort megváltoztatva, nem csak az antocián bioszintézisben szerepet játszó gének expressziójában volt különbség, hanem a megnövekedett fény hatására a TMA, TPC, TFC és FRAP értékek is magasabbak voltak a több fényt kapó F<sub>1</sub> egyedekben, így ezt a termesztéstechnológia során az árnyékolás esetén érdemes figyelembe venni.



## 7. Új tudományos eredmények

1. Bizonyítottam, hogy az eddig leírt szekvencia polimorfizmusok, melyek segítségével az antociánosodás alapján tudták szelektálni a mintákat, nagymértékben faj, illetve fajtafüggőek és nem általános érvényűek a *Capsicum* fajokon belül.
2. Meghatároztam, hogy a négy érésfázis során vizsgált beltartalmi mutatók közül a TMA-t, TPC-t és FRAP-ot a genotípus, míg a TFC-t a vizsgált fenofázis befolyásolta elsősorban.
3. Szövetspecifikus génexpressziós vizsgálatokkal elsőként bizonyítottam, hogy a *Ca10g11650* gén mellett, a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* szerepe is igazolható az antocián bioszintézisre mind a vegetatív, mind a generatív szövetek esetén. A termésérés 4 fenofázisában mért génexpressziós adatok, illetve a *Ca10g11650* géncsendesítése alapján igazoltam, hogy a *Ca10g11650* gén nem csak az antocián bioszintetikus útvonal kései génjeire van hatással, hanem a koraik közül a *CHI* és *F3H* génekre is.
4. A szakirodalomban található ellentmondások tisztázásakor igazoltam, hogy míg a *CHI* és *F3H* gének expressziója összefügg a vizsgált szövetek antocián tartalmával, addig a *CHS* esetén ez az összefüggés csak trend-szerű.
5. Igazoltam paprikában az antociánok szerepét mind a termések összes antioxidáns kapacitására, mind pedig azok antimikrobiális hatására egy Gram-pozitív (*E. faecalis*) és egy Gram-negatív (*E. coli*) baktérium faj esetén.
6. Bizonyítottam, hogy az azonos keresztezésből származó, azonos genetikai háttérrel rendelkező F<sub>1</sub> egyedek eltérő fény mennyiség hatására nem csak az antocián bioszintetikus aktivitásukban különböztek, hanem igazoltam a fény hatását az egyéb polifenolos összetevők mennyiségére is, és végső soron a termések összes antioxidáns kapacitására.
7. A *C. annuum* 'Black Pearl' és 'Kaldom' keresztezésével létrehozott hasadó populációt vizsgálva bizonyítottam, hogy az antocián bioszintézist egy gén határozza meg. Ugyanakkor, ugyanebből a keresztezésből származó F<sub>2</sub> egyedek generatív szöveiteinek elemzésekor bizonyítottam, hogy a *Ca10g11650* mellett a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* is részt vesz a termés, szíromlevél, bibe és porzószal színének kialakításában. A portok esetén viszont csak a *Ca10g11650* szerepe mutatható ki

## 8. Összefoglalás

A *Solanaceae* családba tartozó paprika (*Capsicum annuum* L.) egyike a legszélesebb körben termesztett zöldségeknek. A friss fogyasztásra termesztett paprikák nemcsak hazánkban, de a környező országokban is kiemelkedően fontosak mindennapi táplálkozásunk során. Termékének piaci értékét számos tényező befolyásolja, ezek közül az egyik legfontosabb értékmérő tulajdonság a termés színe. A *Capsicum* fajokban számos fitonutriens vegyület található, melyek az emberi szervezetre pozitív hatással bírnak, például a termések színét kialakító pigmentek, melyek közül az antociánok jótékony hatását már több évtizede felismerték. A fogyasztók egyre tudatosabban fordulnak az úgynevezett funkcionális élelmiszerek piaca felé. A paprika beltartalmi értékeit tekintve előkelő helyet foglal el ebben a piaci szegmensben, a C-vitamin tartalma, illetve karotinoid felhalmozása alapján. Ha ezeket az egyébként is kedvező beltartalmi mutatókat az antociánok additív hatásával kombináljuk, akkor a paprika valóban „super food”-nak tekinthető.

A paprika antocián bioszintézise összetett genetikai szabályozás alatt áll, melyet a környezeti faktorok mellett olyan belső tényezők, mint a fenofázis és a genotípus  $\times$  fenofázis kölcsönhatások nagymértékben befolyásolnak, ezért ennek a meglehetősen komplex tulajdonságnak a vizsgálata bonyolult. Épp ezért a paprika antociánosodásának molekuláris genetikai háttere még nem kellőképpen tisztázott, sok az ellentmondó eredmény a szakirodalmi adatok közt

Dolgozatomban különböző mértékben antociánosodó nemesítési vonalak és fajták antocián bioszintézisének szabályozásában szerepet játszó három R2R3-MYB transzkripció faktor – *Ca10g11650*, *Ca10g11690* és *Ca10g11710* – hatásának vizsgálatát tűztem ki célul. Ehhez szekvencia szintű elemzést végeztem, illetve a vegetatív és a generatív szövetekben egyaránt vizsgáltam ezeknek a géneknek az expresszióját az antocián bioszintetikus útvonal korai és kései struktúrgénjeinek expressziójával és a szövetek antocián tartalmával összefüggésben. A génexpressziós profil mellett vizsgáltam a beltartalmi mutatókat is, hogy meghatározzam az antociánok hatását a termések összes antioxidáns kapacitására, illetve azok antimikrobiális hatására.

Szekvenciabeli polimorfizmusok vizsgálata alapján valószínűsíthető, hogy a *Ca10g11650*, *Ca10g11690* és *Ca10g11710* gének esetén eddig leírt, illetve általam detektált különbségek faj és fajtafüggőek, hiszen egyik polimorfizmus sem magyarázta teljes mértékben a termések fenotípusát. A *Ca10g11650* gén promóterébe inszertálódott LINE-1 retrotranszpozont több kereskedelmi forgalomban is kapható fajtában ki tudtam mutatni.

Géncsendesített növények adatainak és a termékek négy fenofázisában detektált génextpressziós profiljának összevetésekor megállapítottam, hogy a *Ca10g11650* nem csak a kései struktúrgénekre fejt ki a hatását, hanem a *CHI* és *F3H* korai struktúrgénekre is. Ez megmutatkozott abban is, hogy ennek a két struktúrgénnek az expressziója szoros pozitív korrelációt mutatott mind a vegetatív szövetek, mind a generatív szövetek antocián tartalmával. Ugyanezekben a fenofázisokban a *Ca10g11690* és *Ca10g11710* transzkripciós faktorok közül a *Ca10g11710*-nek volt nagyobb hatása az antocián bioszintézisre. A termékek beltartalmi mutatóira, mint a TPC, TMA és FRAP a genotípus gyakorolta a legerősebb hatást, ugyanakkor a TFC esetén a legerősebben ható tényező a termékek fenofázisa volt.

A beltartalmi mutatók összehasonlításakor bizonyítottam, hogy szoros pozitív összefüggés tapasztalható a termékek antocián tartalma és azok antioxidáns kapacitása között, tehát kijelenthető, hogy az antociánok statisztikailag igazolhatóan hozzájárulnak az antioxidáns kapacitáshoz. Az antociánok a hatásukat ugyanakkor, nem csak az antioxidáns kapacitás esetén fejtették ki, hanem a termékek antimikrobiális aktivitáshoz is igazolhatóan hozzájárultak az *E. coli* és *E. faecalis* esetén.

Egy hasadó populáció létrehozásán keresztül igazoltam, hogy a *C. annuum* 'Kaldom' × 'Black Pearl' F<sub>2</sub> nemzedékében egy gén felelős az antociánosodásért. Ugyanebben a hasadó populációban a retrotranszpozon inszerció miatti megnövekedett antocián bioszintézis által vizsgáltam, hogy a *Ca10g11650* melyik szövetekben fejt ki pontosan a hatását. Ennek a génnek az expresszióját a bibe, bibeszál, porzósál és portok esetén is ki tudtam mutatni, míg a *Ca10g11690* és a *Ca10g11710* gének a portokban nem kimutathatóan expresszáltak. Az azonos genetikai háttérrel rendelkező F<sub>1</sub> egyedek csoportjainak különböző megvilágítása során igazoltam, hogy nem csak az antocián bioszintézisben szerepet játszó gének expressziója növekedett a több fény hatására, hanem a TMA, TPC, TFC és FRAP értékek is magasabbak voltak a több fényt kapó F<sub>1</sub> egyedekben.

Munkám fő célja a paprika antocián bioszintézisének pontosabb feltárása, a szakirodalomban leírt ellentmondások tisztázása volt. A kísérletek során megállapításra került, hogy a *Ca10g11650* nem egyedüli szabályozója a paprikák antocián bioszintézisének, hanem a *Ca10g11710* és kisebb mértékben a *Ca10g11690* is hat a struktúrgénekre a vizsgált szövetekben, ellenben a *Ca10g11650* feltehetőleg már az útvonal korai struktúrgénjeitől szabályozója az antocián felhalmozásnak. A különböző szövetek génextpressziós és beltartalmi adatainak vizsgálata bővíti az eddig feltárt ismereteket a paprika antocián bioszintézisét illetően.

## 9. Summary

Peppers (*Capsicum annuum* L.), as members of the *Solanaceae* family, are among the most widely cultivated vegetables. Grown for fresh consumption, peppers are of paramount importance in our daily diet, not only in Hungary but also in neighboring countries. The market potential of their product is influenced by several factors, one of the most important being the colour of the fruit. *Capsicum* species contain a number of phytonutrient compounds that have a positive effect on the human body, such as pigments that affect fruit colour. Among these pigments, the beneficial effects of anthocyanins have been recognized for decades. Consumers are becoming increasingly aware of so-called functional foods, and peppers are at the forefront of this market segment in terms of their nutritional value, thanks to their vitamin C and carotenoid content. When these already favourable nutritional indicators are combined with the additive effect of anthocyanins, peppers can be considered a "super-food."

The accumulation of anthocyanins in peppers is under complex genetic regulation, which is strongly influenced by environmental factors, as well as intrinsic factors such as phenophase and genotype  $\times$  phenophase interactions. Therefore, the study of this rather complex trait is difficult. For this reason, the molecular genetic background of pepper anthocyanin biosynthesis is not yet fully elucidated, with many contradictory results present in the literature.

In this study, I aimed to investigate the effects of three R2R3-MYB transcription factors – Ca10g11650, Ca10g11690, and Ca10g11710 – involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis by applying breeding lines and cultivars showing different anthocyanin colouration. For this purpose, I performed sequence-level analyses and examined the expression of these genes in both vegetative and generative tissues in relation to the expression of early and late structural genes of the anthocyanin biosynthetic pathway and the anthocyanin content of the tissues. Furthermore, in addition to the gene expression profile, I investigated the nutraceutical content indices to determine the effect of anthocyanins on the overall antioxidant capacity and antimicrobial activity of the berries.

Based on sequence polymorphism analysis, it is highly likely that the differences previously described and detected in the case of the *Ca10g11650*, *Ca10g11690*, and *Ca10g11710* genes are species and cultivar-dependent, as none of the polymorphisms fully explain the phenotype of the berries. By further examining sequence polymorphisms, I was able to detect the LINE-1 retrotransposon insertion in the promoter of the *Ca10g11650* gene in several commercially available cultivars.

By comparing the data from gene silencing with the gene expression profiles detected in the four phenophases of the berries, I found that *Ca10g11650* not only affects the late structural genes but also the *CHI* and *F3H* early structural genes. This was supported by the fact that the expression of these two structural genes showed a strong positive correlation with the anthocyanin content of both vegetative and generative tissues. In the same phenophases, out of the *Ca10g11690* and *Ca10g11710* transcription factors, *Ca10g11710* exerted a greater effect on anthocyanin biosynthesis. The genotype had the strongest effect on the nutraceutical properties of the berries in the case of indices such as TPC, TMA, and FRAP, whereas for TFC, the most influencing factor was the berries' phenophase.

Upon summarizing the nutraceutical content indices, it was demonstrated that there is a strong positive correlation between the anthocyanin content of the fruits and their antioxidant capacity. Thus, it can be concluded that anthocyanins contribute to the overall antioxidant capacity. However, anthocyanins not only exert their effect on antioxidant capacity but also contribute to the antimicrobial activity of the berries in the case of *E. coli* and *E. faecalis*.

Through the establishment of a segregating population, it was demonstrated that anthocyanin accumulation is determined by a single gene in the F<sub>2</sub> generation derived from the cross of *C. annuum* 'Kaldom' × 'Black Pearl'. In the same segregating population, due to the enhanced anthocyanin biosynthesis caused by the retrotransposon insertion, I studied the tissues where *Ca10g11650* exerts its exact effect. I was able to detect the expression of this gene in the style, stigma, anther, and filament, whereas *Ca10g11690* and *Ca10g11710* were not detectably expressed in the anther. Under different lighting conditions, groups of F<sub>1</sub> individuals derived from the same genetic background demonstrated that not only did the expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis increase with exposure to more light, but also TMA, TPC, TFC, and FRAP were higher in those F<sub>1</sub> individuals that received more light.

The main goal of this work was to better elucidate anthocyanin biosynthesis in pepper and clarify the contradictions described in the literature. The experiments concluded that *Ca10g11650* is not the sole regulator of anthocyanin biosynthesis in pepper, but that *Ca10g11710* and, to a lesser extent, *Ca10g11690* also exert their effect on structural genes in the studied tissues. Furthermore, *Ca10g11650* presumably regulates the anthocyanin biosynthetic pathway from the early structural genes. The analysis of gene expression and nutraceutical data of different tissues will contribute to the existing knowledge of anthocyanin biosynthesis in pepper.

## 10. Mellékletek

### M1. Irodalomjegyzék

1. Adefegha, S., and Oboh, G. (2011). Enhancement of total phenolics and antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables by steam cooking. *Journal of Food Processing and Preservation* **35**, 615-622.
2. Afsar, B., Afsar, R. E., Ertuglu, L. A., Covic, A., and Kanbay, M. (2022). Nutrition, immunology, and kidney: Looking beyond the horizons. *Current Nutrition Reports* **11**, 69-81.
3. Aguilar-Barragán, A., and Ochoa-Alejo, N. (2014). Virus-induced silencing of MYB and WD40 transcription factor genes affects the accumulation of anthocyanins in chilli pepper fruit. *Biologia plantarum* **58**, 567-574.
4. Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P. L., Roose, M. L., and Kim, S. C. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; *Solanaceae*) from Mexico. *American Journal of Botany* **96**, 1190-1202.
5. Albert, N. W., Davies, K. M., Lewis, D. H., Zhang, H., Montefiori, M., Brendolise, C., Boase, M. R., Ngo, H., Jameson, P. E., and Schwinn, K. E. (2014). A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots. *The Plant Cell* **26**, 962-980.
6. Albert, N. W., Lewis, D. H., Zhang, H., Irving, L. J., Jameson, P. E., and Davies, K. M. (2009). Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of experimental botany* **60**, 2191-2202.
7. Albert, N. W., Lewis, D. H., Zhang, H., Schwinn, K. E., Jameson, P. E., and Davies, K. M. (2011). Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *The Plant Journal* **65**, 771-784.
8. Ameya, G., Aklilu, A., Bisrat, N., Nassir, M., and Negash, A. (2018). *In vitro* antimicrobial activity of fermented spices and *Capsicum frutescens* against multi drug resistance clinical isolate and standard reference bacteria. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology* **19**, 9-17.
9. Angmo, P., Dolma, T., Phuntsog, N., Chaurasia, O., and Stobdan, T. (2021). Effect of shading and high temperature amplitude on yield and phenolic contents of greenhouse capsicum (*Capsicum annuum* L.). *J. Biol. Pharm* **4**, 30-39.
10. Aza-González, C., Herrera-Isidró, L., Núñez-Palenius, H. G., De La Vega, O. M., and Ochoa-Alejo, N. (2013). Anthocyanin accumulation and expression analysis of biosynthesis-related genes during chili pepper fruit development. *Biologia plantarum* **57**, 49-55.
11. Aza-González, C., Núñez-Palenius, H. G., and Ochoa-Alejo, N. (2012). Molecular biology of chili pepper anthocyanin biosynthesis. *Journal of the Mexican Chemical Society* **56**, 93-98.
12. Aza-González, C., and Ochoa-Alejo, N. (2012). Characterization of anthocyanins from fruits of two Mexican chili peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of the Mexican Chemical Society* **56**, 149-151.
13. Azuma, K., Ohyama, A., Ippoushi, K., Ichianagi, T., Takeuchi, A., Saito, T., and Fukuoka, H. (2008). Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**, 10154-10159.
14. Babak, O., Nikitinskaya, T., Nekrashevich, N., Yatsevich, K., and Kilchevsky, A. (2020). Identification of DNA markers of anthocyanin biosynthesis disorders based on the

- polymorphism of anthocyanin 1 tomato ortholog genes in pepper and eggplant. *Crop Breeding, Genetics and Genomics* **2**.
15. Bacon, K., Boyer, R., Denbow, C., O'Keefe, S., Neilson, A., and Williams, R. (2017). Antibacterial activity of jalapeño pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) extract fractions against select foodborne pathogens. *Food science & nutrition* **5**, 730-738.
  16. Bae, J.-Y., Seo, Y.-H., and Oh, S.-W. (2022). Antibacterial activities of polyphenols against foodborne pathogens and their application as antibacterial agents. *Food Science and Biotechnology* **31**, 985-997.
  17. Bae, J. H., Park, Y. J., Namiesnik, J., Gülçin, I., Kim, T. C., Kim, H. C., Heo, B. G., Gorinstein, S., and Ku, Y. G. (2016). Effects of artificial lighting on bioactivity of sweet red pepper (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Science & Technology* **51**, 1378-1385.
  18. Baenas, N., Belović, M., Ilic, N., Moreno, D. A., and García-Viguera, C. (2019). Industrial use of pepper (*Capsicum annuum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food chemistry* **274**, 872-885.
  19. Bahler, B., Steffen, K., and Orzolek, M. (1991). Morphological and biochemical comparison of a purple-leafed and a green-leafed pepper cultivar. *HortScience* **26**, 736.
  20. Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* **44**, 276-287.
  21. Benzie, I. F., and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry* **239**, 70-76.
  22. Blanco-Ríos, A. K., Medina-Juárez, L. Á., González-Aguilar, G. A., and Gámez-Meza, N. (2013). Antioxidant activity of the phenolic and oily fractions of different sweet bell peppers. *Journal of the Mexican Chemical Society* **57**, 137-143.
  23. Blesso, C. N. (2019). Dietary anthocyanins and human health. Vol. 11, pp. 2107. MDPI.
  24. Bogusz Jr, S., Libardi, S. H., Dias, F. F., Coutinho, J. P., Bochi, V. C., Rodrigues, D., Melo, A. M., and Godoy, H. T. (2018). Brazilian *Capsicum* peppers: Capsaicinoid content and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98**, 217-224.
  25. Borges, A., Saavedra, M. J., and Simões, M. (2012). The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling* **28**, 755-767.
  26. Borovsky, Y., Oren-Shamir, M., Ovadia, R., De Jong, W., and Paran, I. (2004). The A locus that controls anthocyanin accumulation in pepper encodes a MYB transcription factor homologous to Anthocyanin2 of Petunia. *Theor Appl Genet* **109**, 23-9.
  27. Borovsky, Y., and Paran, I. (2008). Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. *Theoretical and Applied Genetics* **117**, 235-240.
  28. Borovsky, Y., Tadmor, Y., Bar, E., Meir, A., Lewinsohn, E., and Paran, I. (2013). Induced mutation in  $\beta$ -CAROTENE HYDROXYLASE results in accumulation of  $\beta$ -carotene and conversion of red to orange color in pepper fruit. *Theoretical and applied genetics* **126**, 557-565.
  29. Bosland, P. W. (1996). Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA, 479-487.
  30. Brand, A., Borovsky, Y., Hill, T., Rahman, K. A. A., Bellalou, A., Van Deynze, A., and Paran, I. (2014). CaGLK2 regulates natural variation of chlorophyll content and fruit color in pepper fruit. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 2139-2148.
  31. Brand, A., Borovsky, Y., Meir, S., Rogachev, I., Aharoni, A., and Paran, I. (2012). pc8.1, a major QTL for pigment content in pepper fruit, is associated with variation in plastid compartment size. *Planta* **235**, 579-588.
  32. Brudzynski, K., and Maldonado-Alvarez, L. (2015). Polyphenol-protein complexes and their consequences for the redox activity, structure and function of honey. A current view and new hypothesis—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **65**, 71-80.

33. Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., Reforgiato-Recupero, G., and Martin, C. (2012). Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *The Plant Cell* **24**, 1242-1255.
34. Byun, J., Kim, T.-G., Lee, J.-H., Li, N., Jung, S., and Kang, B.-C. (2022). Identification of CaAN3 as a fruit-specific regulator of anthocyanin biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*). *Theoretical and Applied Genetics* **135**, 2197-2211.
35. Castro-Concha, L. A., Tuyub-Che, J., Moo-Mukul, A., Vazquez-Flota, F. A., and Miranda-Ham, M. L. (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq.(Habanero pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal* **2014**.
36. Chaim, A. B., Borovsky, Y., De Jong, W., and Paran, I. (2003). Linkage of the A locus for the presence of anthocyanin and fs10.1, a major fruit-shape QTL in pepper. *Theor Appl Genet* **106**, 889-94.
37. Chalker-Scott, L. (2002). Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues?
38. Chalker-Scott, L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology* **70**, 1-9.
39. Chandel, C., Sharma, V. K., Rana, P. S., Dabral, M., Aggrawal, S., and Saklani, P. (2020). Assessment of antimicrobial and antioxidant potential of cytoplasmic male sterile lines of pepper. *SN Applied Sciences* **2**, 1-7.
40. Chassy, A. W., Bui, L., Renaud, E. N., Van Horn, M., and Mitchell, A. E. (2006). Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 8244-8252.
41. Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., and Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant* **13**, 1194-1202.
42. Cheng, J., Zhao, Z., Li, B., Qin, C., Wu, Z., Trejo-Saavedra, D. L., Luo, X., Cui, J., Rivera-Bustamante, R. F., and Li, S. (2016). A comprehensive characterization of simple sequence repeats in pepper genomes provides valuable resources for marker development in *Capsicum*. *Scientific reports* **6**, 18919.
43. Chiu, L.-W., Zhou, X., Burke, S., Wu, X., Prior, R. L., and Li, L. (2010). The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor. *Plant physiology* **154**, 1470-1480.
44. Cichewicz, R. H., and Thorpe, P. A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of ethnopharmacology* **52**, 61-70.
45. Colanero, S., Perata, P., and Gonzali, S. (2018). The atroviolacea gene encodes an R3-MYB protein repressing anthocyanin synthesis in tomato plants. *Frontiers in Plant Science* **9**, 830.
46. Csillery, G. (1980). Gene mapping of the pepper needs more initiatives (Contribution to the gene list). *Eucarpia. Proc. IV Mtg. Capsicum Working Group, Wageningen, The Netherlands*, 27-28.
47. Csillery, G. (1983). New *Capsicum* mutants found on seedling, growth type, leaf, flower and fruit. In "Proc. 5th Eucarpia Meeting of Capsicum and Eggplant Working Group", pp. 127-130.
48. Csilléry, G. (2006). Pepper taxonomy and the botanical description of the species. *Acta Agronomica Hungarica* **54**, 151-166.
49. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology* **23**, 174-181.
50. Daskalov, S. (1986). Mutation breeding in pepper.
51. Daskalov, S., and Poulos, J. (1994). Updated *Capsicum* gene list. *Capsicum and Eggplant Newsletter* **13**, 15-26.



52. De Jong, W. S., Eannetta, N. T., De Jong, D. M., and Bodis, M. (2004). Candidate gene analysis of anthocyanin pigmentation loci in the *Solanaceae*. *Theor Appl Genet* **108**, 423-32.
53. Deepa, N., Kaur, C., George, B., Singh, B., and Kapoor, H. (2007). Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT-Food Science and Technology* **40**, 121-129.
54. del Amor, F. M., Serrano-Martínez, A., Fortea, I., and Núñez-Delgado, E. (2008). Differential effect of organic cultivation on the levels of phenolics, peroxidase and capsidiol in sweet peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**, 770-777.
55. del Rocío Gómez-García, M., and Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum spp.*). *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 19025-19053.
56. Dhar, M. K., Sharma, R., Koul, A., and Kaul, S. (2015). Development of fruit color in Solanaceae: a story of two biosynthetic pathways. *Briefings in Functional Genomics* **14**, 199-212.
57. Díaz-Pérez, J. C., John, K. S., Kabir, M. Y., Alvarado-Chávez, J. A., Cutino-Jiménez, A. M., Bautista, J., Gunawan, G., and Nambeesan, S. U. (2020). Bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under colored shade nets: fruit yield, postharvest transpiration, color, and chemical composition. *HortScience* **55**, 181-187.
58. Dong, Y., Yang, C., Zhong, W., Shu, Y., Zhang, Y., and Yang, D. (2022). Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin from *Lycium ruthenicum* Murr. *Frontiers in Microbiology* **13**.
59. Dorantes, L., Colmenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M. E., Fernandez, E., and Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annuum* extracts. *International Journal of Food Microbiology* **57**, 125-128.
60. Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A., and Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants* **10**, 1967.
61. Eshbaugh, W. H. (2012). The taxonomy of the genus *Capsicum*. *Peppers: Botany, production and uses*, 14-28.
62. Fan, D., Alamri, Y., Liu, K., MacAskill, M., Harris, P., Brimble, M., Dalrymple-Alford, J., Prickett, T., Menzies, O., and Laurenson, A. (2018). Supplementation of blackcurrant anthocyanins increased cyclic glycine-proline in the cerebrospinal fluid of Parkinson patients: Potential treatment to improve insulin-like growth factor-1 function. *Nutrients* **10**, 714.
63. Filyushin, M., Dzhos, E., Shchennikova, A., and Kochieva, E. (2020). Dependence of pepper fruit colour on basic pigments ratio and expression pattern of carotenoid and anthocyanin biosynthesis genes. *Russian Journal of Plant Physiology* **67**, 1054-1062.
64. Fiol, A., García, S., Dujak, C., Pacheco, I., Infante, R., and Aranzana, M. J. (2022). An LTR retrotransposon in the promoter of a PsMYB10. 2 gene associated with the regulation of fruit flesh color in Japanese plum. *Horticulture Research* **9**.
65. Garra, A., Alkalai-Tuvia, S., Telerman, A., Paran, I., Fallik, E., and Elmann, A. (2020). Anti-proliferative activities, phytochemical levels and fruit quality of pepper (*Capsicum spp.*) following prolonged storage. *International Journal of Food Science & Technology* **55**, 3574-3584.
66. Genzel, F., Dicke, M. D., Junker-Frohn, L. V., Neuwohner, A., Thiele, B. r., Putz, A., Usadel, B. r., Wormit, A., and Wiese-Klinkenberg, A. (2021). Impact of moderate cold and salt stress on the accumulation of antioxidant flavonoids in the leaves of two *capsicum* cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry* **69**, 6431-6443.
67. Ghasemnezhad, M., Sherafati, M., and Payvast, G. A. (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annuum*) fruits at two different harvest times. *Journal of functional foods* **3**, 44-49.

68. Gisbert, C., Dumm, J. M., Prohens, J., Vilanova, S., and Stommel, J. R. (2016). A spontaneous eggplant (*Solanum melongena* L.) color mutant conditions anthocyanin-free fruit pigmentation. *HortScience* **51**, 793-798.
69. GIUSTI, M. M., and Wrolstad, R. E. (1996). Characterization of red radish anthocyanins. *Journal of food science* **61**, 322-326.
70. Gonçalves, A. C., Nunes, A. R., Falcão, A., Alves, G., and Silva, L. R. (2021). Dietary effects of anthocyanins in human health: A comprehensive review. *Pharmaceuticals* **14**, 690.
71. Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., and Hatab, S. R. (2018). Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Frontiers in microbiology* **9**, 1639.
72. Gonzali, S., Mazzucato, A., and Perata, P. (2009). Purple as a tomato: towards high anthocyanin tomatoes. *Trends in plant science* **14**, 237-241.
73. Gou, J.-Y., Felippes, F. F., Liu, C.-J., Weigel, D., and Wang, J.-W. (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor. *The Plant Cell* **23**, 1512-1522.
74. Guclu, G., Keser, D., Kelebek, H., Keskin, M., Sekerli, Y. E., Soysal, Y., and Selli, S. (2021). Impact of production and drying methods on the volatile and phenolic characteristics of fresh and powdered sweet red peppers. *Food Chemistry* **338**, 128129.
75. Guilherme, R., Aires, A., Rodrigues, N., Peres, A. M., and Pereira, J. A. (2020). Phenolics and Antioxidant Activity of Green and Red Sweet Peppers from Organic and Conventional Agriculture: A Comparative Study. *Agriculture* **10**, 652.
76. Guzman, I., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P. W., and O'Connell, M. A. (2010). Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum spp.* *Plant Science* **179**, 49-59.
77. Ha, S.-H., Kim, J.-B., Park, J.-S., Lee, S.-W., and Cho, K.-J. (2007). A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3135-3144.
78. Hammer, Ø., Harper, D. A., and Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica* **4**, 9.
79. Holton, T. A., and Cornish, E. C. (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 1071.
80. Hornero-Méndez, D., and Mínguez-Mosquera, M. I. (2001). Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3584-3588.
81. Howard, L., Talcott, S., Brenes, C., and Villalon, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of agricultural and food chemistry* **48**, 1713-1720.
82. Huang, D., Yuan, Y., Tang, Z., Huang, Y., Kang, C., Deng, X., and Xu, Q. (2019). Retrotransposon promoter of Ruby1 controls both light-and cold-induced accumulation of anthocyanins in blood orange. *Plant, cell & environment* **42**, 3092-3104.
83. Huh, J., Kang, B., Nahm, S., Kim, S., Ha, K., Lee, M., and Kim, B. (2001). A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum spp.*). *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 524-530.
84. Hurtado-Hernandez, H., and Smith, P. G. (1985). Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annum* L. *Journal of Heredity* **76**, 211-213.
85. Ibiza, V. P., Blanca, J., Cañizares, J., and Nuez, F. (2012). Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic resources and crop evolution* **59**, 1077-1088.

86. Jang, S.-J., Jeong, H.-B., Jung, A., Kang, M.-Y., Kim, S., Ha, S.-H., Kwon, J.-K., and Kang, B.-C. (2020). Phytoene synthase 2 can compensate for the absence of PSY1 in the control of color in *Capsicum* fruit. *Journal of experimental botany* **71**, 3417-3427.
87. Jeong, H.-B., Jang, S.-J., Kang, M.-Y., Kim, S., Kwon, J.-K., and Kang, B.-C. (2020). Candidate gene analysis reveals that the fruit color locus C1 corresponds to PRR2 in pepper (*Capsicum frutescens*). *Frontiers in plant science* **11**, 399.
88. Jeong, H. B., Kang, M. Y., Jung, A., Han, K., Lee, J. H., Jo, J., Lee, H. Y., An, J. W., Kim, S., and Kang, B. C. (2019). Single-molecule real-time sequencing reveals diverse allelic variations in carotenoid biosynthetic genes in pepper (*Capsicum spp.*). *Plant Biotechnology Journal* **17**, 1081-1093.
89. Jia, X., Shen, J., Liu, H., Li, F., Ding, N., Gao, C., Pattanaik, S., Patra, B., Li, R., and Yuan, L. (2015). Small tandem target mimic-mediated blockage of microRNA858 induces anthocyanin accumulation in tomato. *Planta* **242**, 283-293.
90. Jiang, M., Liu, Y., Ren, L., Lian, H., and Chen, H. (2016). Molecular cloning and characterization of anthocyanin biosynthesis genes in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* **38**, 1-13.
91. Jung, S., Venkatesh, J., Kang, M.-Y., Kwon, J.-K., and Kang, B.-C. (2019). A non-LTR retrotransposon activates anthocyanin biosynthesis by regulating a MYB transcription factor in *Capsicum annuum*. *Plant Science* **287**, 110181.
92. Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P., and Schulman, A. H. (2010). iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 1419-1430.
93. Kang, S.-I., Rahim, M. A., Afrin, K. S., Jung, H.-J., Kim, H.-T., Park, J.-I., and Nou, I.-S. (2018). Expression of anthocyanin biosynthesis-related genes reflects the peel color in purple tomato. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **59**, 435-445.
94. Kang, S. S., Kim, J.-G., Lee, T.-H., and Oh, K.-B. (2006). Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 1751-1755.
95. Kaur, S., Tiwari, V., Kumari, A., Chaudhary, E., Sharma, A., Ali, U., and Garg, M. (2022). Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: An emerging application in sustainable agriculture. *Journal of Biotechnology*.
96. Kiferle, C., Fantini, E., Bassolino, L., Povero, G., Spelt, C., Buti, S., Giuliano, G., Quattrocchio, F., Koes, R., and Perata, P. (2015). Tomato R2R3-MYB proteins SLANT1 and SLAN2: same protein activity, different roles. *PLoS One* **10**, e0136365.
97. Kilcrease, J., Collins, A. M., Richins, R. D., Timlin, J. A., and O'Connell, M. A. (2013). Multiple microscopic approaches demonstrate linkage between chromoplast architecture and carotenoid composition in diverse *Capsicum annuum* fruit. *The Plant Journal* **76**, 1074-1083.
98. Kilcrease, J., Rodriguez-Uribe, L., Richins, R. D., Arcos, J. M. G., Victorino, J., and O'Connell, M. A. (2015). Correlations of carotenoid content and transcript abundances for fibrillin and carotenogenic enzymes in *Capsicum annuum* fruit pericarp. *Plant Science* **232**, 57-66.
99. Kim, I., and Lee, J. (2017). Comparison of different extraction solvents and sonication times for characterization of antioxidant activity and polyphenol composition in mulberry (*Morus alba* L.). *Applied Biological Chemistry* **60**, 509-517.
100. Kim, J.-S., An, C. G., Park, J.-S., Lim, Y. P., and Kim, S. (2016). Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food chemistry* **201**, 64-71.
101. Kim, J., Park, M., Jeong, E. S., Lee, J. M., and Choi, D. (2017a). Harnessing anthocyanin-rich fruit: a visible reporter for tracing virus-induced gene silencing in pepper fruit. *Plant Methods* **13**, 1-10.

102. Kim, J. E., Yoo, H. J., Kang, B.-C., and Lee, J. M. (2017b). A new nonsense mutation in capsanthin/capsorubin synthase controlling orange pepper fruit.
103. Kim, O. R., Cho, M.-C., Kim, B.-D., and Huh, J. H. (2010). A splicing mutation in the gene encoding phytoene synthase causes orange coloration in Habanero pepper fruits. *Molecules and Cells* **30**, 569-574.
104. Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., and Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* **304**, 982-982.
105. Koes, R., Verweij, W., and Quattrocchio, F. (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in plant science* **10**, 236-242.
106. Koffi-Nevry, R., Kouassi, K. C., Nanga, Z. Y., Koussémon, M., and Loukou, G. Y. (2012). Antibacterial activity of two bell pepper extracts: *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens*. *International journal of food properties* **15**, 961-971.
107. Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., and Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**, 923-933.
108. Kouassi, C. K., Koffi-Nevry, R., Nanga, Z. Y., Teixeira Da Silva, J., Yao, K., Lathro, J. S., Tano, K., and Loukou, G. Y. (2010). Assessing the antibacterial activity and phytochemical screening of *Capsicum* varieties from Côte d'Ivoire. *Food* **4**, 27-32.
109. Kraft, K. H., Brown, C. H., Nabhan, G. P., Luedeling, E., Luna Ruiz, J. d. J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Hijmans, R. J., and Gepts, P. (2014). Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 6165-6170.
110. Kroon, A. R. (2004). Transcription regulation of the anthocyanin pathway in *Petunia hybrida*.
111. Kumar, H., Bhardwaj, K., Cruz-Martins, N., Nepovimova, E., Oleksak, P., Dhanjal, D. S., Bhardwaj, S., Singh, R., Chopra, C., and Verma, R. (2021). Applications of fruit polyphenols and their functionalized nanoparticles against foodborne bacteria: a mini review. *Molecules* **26**, 3447.
112. Lahbib, K., Dabbou, S., Bok, S. E., Pandino, G., Lombardo, S., and Gazzah, M. E. (2017). Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the part of *Capsicum annuum* fruit from Tunisian autochthonous cultivars. *Industrial Crops and Products* **104**, 164-170.
113. Lang, Y.-Q., Yanagawa, S., Sasanuma, T., and Sasakuma, T. (2004). Orange fruit color in *Capsicum* due to deletion of capsanthin-capsorubin synthesis gene. *Breeding Science* **54**, 33-39.
114. Latha, S., and Hunumanthraya, L. (2018). Screening of chilli genotypes against chilli thrips (*Scirtothrips dorsalis* Hood) and yellow mite [*Polyphagotarsonemus latus* (Banks)]. *J. Entomol. Zool. Stud* **6**, 2739-2744.
115. Lee, S. B., Kim, J. E., Kim, H. T., Lee, G.-M., Kim, B.-S., and Lee, J. M. (2020). Genetic mapping of the c1 locus by GBS-based BSA-seq revealed Pseudo-Response Regulator 2 as a candidate gene controlling pepper fruit color. *Theoretical and Applied Genetics* **133**, 1897-1910.
116. Lefebvre, V., Kuntz, M., Camara, B., and Palloix, A. (1998). The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant molecular biology* **36**, 785-789.
117. Lekala, C. S., Madani, K. S. H., Phan, A. D. T., Maboko, M. M., Fotouo, H., Soundy, P., Sultanbawa, Y., and Sivakumar, D. (2019). Cultivar-specific responses in red sweet peppers grown under shade nets and controlled-temperature plastic tunnel environment on antioxidant constituents at harvest. *Food chemistry* **275**, 85-94.
118. Li, D., Wang, P., Luo, Y., Zhao, M., and Chen, F. (2017). Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical reviews in food science and nutrition* **57**, 1729-1741.

119. Li, N., Liu, Y., Yin, Y., Gao, S., Wu, F., Yu, C., Wang, F., Kang, B.-C., Xu, K., and Jiao, C. Identification of CaPs locus involving in purple stripe formation on unripe fruit, reveals allelic variation and alternative splicing of R2R3-MYB transcription factor in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Plant Science* **14**, 937.
120. Li, W.-F., Mao, J., Yang, S.-J., Guo, Z.-G., Ma, Z.-H., Dawuda, M. M., Zuo, C.-W., Chu, M.-Y., and Chen, B.-H. (2018). Anthocyanin accumulation correlates with hormones in the fruit skin of 'Red Delicious' and its four generation bud sport mutants. *BMC plant biology* **18**, 1-15.
121. Li, Z., and Ahammed, G. J. (2023). Hormonal regulation of anthocyanin biosynthesis for improved stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107835.
122. Li, Z., Wang, S., Gui, X.-L., Chang, X.-B., and Gong, Z.-H. (2013). A further analysis of the relationship between yellow ripe-fruit color and the capsanthin-capsorubin synthase gene in pepper (*Capsicum* sp.) indicated a new mutant variant in *C. annuum* and a tandem repeat structure in promoter region. *PloS one* **8**, e61996.
123. Lightbourn, G. J., Griesbach, R. J., Novotny, J. A., Clevidence, B. A., Rao, D. D., and Stommel, J. R. (2008). Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. *J Hered* **99**, 105-11.
124. Lightbourn, G. J., Stommel, J. R., and Griesbach, R. J. (2007). Epistatic interactions influencing anthocyanin gene expression in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**, 824-829.
125. Lippert, L., Smith, P., and Bergh, B. (1966). Cytogenetics of the vegetable crops. garden pepper, capsicum sp. *The Botanical Review* **32**, 24-55.
126. Litt, M., and Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics* **44**, 397.
127. Liu, J., Ai, X., Wang, Y., Lu, Q., Li, T., Wu, L., Sun, L., and Shen, H. (2020). Fine mapping of the Ca3GT gene controlling anthocyanin biosynthesis in mature unripe fruit of *Capsicum annuum* L. *Theoretical and Applied Genetics* **133**, 2729-2742.
128. Liu, X., Wu, B., Nakamoto, S. T., Imamura, J. L., and Li, Y. (2022a). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 Growth by Ohelo Berry (*Vaccinium calycinum*) Fractions: Anthocyanins, Non-Anthocyanin Phenolics, and Organic Acids. *Microorganisms* **10**, 2231.
129. Liu, Y., Lin-Wang, K., Deng, C., Warran, B., Wang, L., Yu, B., Yang, H., Wang, J., Espley, R. V., and Zhang, J. (2015). Comparative transcriptome analysis of white and purple potato to identify genes involved in anthocyanin biosynthesis. *PloS one* **10**, e0129148.
130. Liu, Y., Schouten, R. E., Tikunov, Y., Liu, X., Visser, R. G., Tan, F., Bovy, A., and Marcelis, L. F. (2022b). Blue light increases anthocyanin content and delays fruit ripening in purple pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* **192**, 112024.
131. Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F., Visser, R. G., and Bovy, A. (2018). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in *Solanaceous* vegetables: A review. *Frontiers in Chemistry* **6**, 52.
132. Lu, B.-Y., Cheng, G.-X., Zhang, Z., Sun, J.-T., Ali, M., Jia, Q.-L., Luo, D.-X., Gong, Z.-H., and Li, D.-W. (2019). CaMYC, a novel transcription factor, regulates anthocyanin biosynthesis in color-leaved pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* **38**, 574-585.
133. Ma, Y., Ding, S., Fei, Y., Liu, G., Jang, H., and Fang, J. (2019). Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control* **106**, 106712.
134. Manso, T., Lores, M., and de Miguel, T. (2021). Antimicrobial activity of polyphenols and natural polyphenolic extracts on clinical isolates. *Antibiotics* **11**, 46.

135. Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., and Gil, M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 3861-3869.
136. Markakis, P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. *Anthocyanins as food colors* **163**, 180.
137. McCutcheon, A., Ellis, S., Hancock, R., and Towers, G. (1992). Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology* **37**, 213-223.
138. Meng, Y., Zhang, H., Fan, Y., and Yan, L. (2022). Anthocyanins accumulation analysis of correlated genes by metabolome and transcriptome in green and purple peppers (*Capsicum annuum*). *BMC Plant Biology* **22**, 1-11.
139. Montefiori, M., Brendolise, C., Dare, A. P., Lin-Wang, K., Davies, K. M., Hellens, R. P., and Allan, A. C. (2015). In the *Solanaceae*, a hierarchy of bHLHs confer distinct target specificity to the anthocyanin regulatory complex. *Journal of experimental botany* **66**, 1427-1436.
140. Naing, A. H., and Kim, C. K. (2021). Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* **172**, 1711-1723.
141. Nascimento, P. d., Nascimento, T., Ramos, N. S., Silva, G., Camara, C., Silva, T., Moreira, K., and Porto, A. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of *Pimenta malagueta* (*Capsicum frutescens*). *African Journal of Microbiology Research* **7**, 3526-3533.
142. Nascimento, P. L., Nascimento, T. C., Ramos, N. S., Silva, G. R., Gomes, J. E. G., Falcão, R. E., Moreira, K. A., Porto, A. L., and Silva, T. M. (2014). Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (*Pimenta Malagueta*). *Molecules* **19**, 5434-5447.
143. Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C., and Martinez, V. (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food chemistry* **96**, 66-73.
144. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews* **67**, 593-656.
145. Odland, M. (1960). Inheritance of flower color in *Capsicum annuum* L. In "Proceedings. American Society for Horticultural Science", Vol. 76, pp. 475-81.
146. Ohno, S., Ueno, M., and Doi, M. (2020). Differences in the CaMYBA genome between anthocyanin-pigmented cultivars and non-pigmented cultivars in pepper (*Capsicum annuum*). *The Horticulture Journal* **89**, 30-36.
147. Oliveira, L. A. d., Silva, E. C. d., Carlos, L. d. A., and Maciel, G. M. (2019). Phosphate and potassium fertilization on agronomic and physico-chemical characteristics and bioactive compounds of eggplant. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **23**, 291-296.
148. Palma, J. M., Terán, F., Contreras-Ruiz, A., Rodríguez-Ruiz, M., and Corpas, F. J. (2020). Antioxidant profile of pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits containing diverse levels of capsaicinoids. *Antioxidants* **9**, 878.
149. Pan, Y., Bradley, G., Pyke, K., Ball, G., Lu, C., Fray, R., Marshall, A., Jayasuta, S., Baxter, C., and van Wijk, R. (2013). Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiology* **161**, 1476-1485.
150. Panchal, S. K., John, O. D., Mathai, M. L., and Brown, L. (2022). Anthocyanins in chronic diseases: The power of purple. *Nutrients* **14**, 2161.
151. Paran, I. (2014). Regulation of pepper fruit color, chloroplasts development and their importance in fruit quality.
152. Paran, I., and Fallik, E. (2011). Breeding for fruit quality in pepper (*Capsicum spp.*). *Breeding for fruit quality*, 307-322.

153. Paran, I., and van der Knaap, E. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3841-3852.
154. Park, S., Jeong, W. Y., Lee, J. H., Kim, Y.-H., Jeong, S. W., Kim, G.-S., Bae, D. W., Lim, C.-S., Jin, J. S., and Lee, S. J. (2012). Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **130**, 981-985.
155. Pérez-Ambrocio, A., Guerrero-Beltrán, J., Aparicio-Fernández, X., Ávila-Sosa, R., Hernández-Carranza, P., Cid-Pérez, S., and Ochoa-Velasco, C. (2018). Effect of blue and ultraviolet-C light irradiation on bioactive compounds and antioxidant capacity of habanero pepper (*Capsicum chinense*) during refrigeration storage. *Postharvest Biology and Technology* **135**, 19-26.
156. Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., and Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition* **64**, S112-S120.
157. Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., Berman, M. J., Cooke, R. G., Rademaker, K., and Ranere, A. J. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum spp.* L.) in the Americas. *science* **315**, 986-988.
158. Peterson, P. A. (1959). Linkage of Fruit Shape and Color Genes in *Capsicum*. *Genetics* **44**, 407-419.
159. Petkovska, A., Gjamovski, V., and Stefova, M. (2016). Comparison of different extraction solvents for assay of the polyphenol content in the peel and pulp of 21 apple cultivars from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **35**, 29-38.
160. Petreska Stanoeva, J., Balshikevska, E., Stefova, M., Tusevski, O., and Simic, S. G. (2020). Comparison of the effect of acids in solvent mixtures for extraction of phenolic compounds from *Aronia melanocarpa*. *Natural Product Communications* **15**, 1934578X20934675.
161. Petrov, V., Denev, I., Draganov, M., Timin, O., Panchev, I., and Tomlekova, N. (2013). Molecular characterization of advanced mutants for early detection of high  $\beta$ -carotene concentration in pepper breeding programmes. *CR Acad. Bulg. Sci* **66**, 303-310.
162. Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum spp.* *Euphytica* **96**, 129-133.
163. Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of botany* **100**, 925-940.
164. Pola, W., Sugaya, S., and Photchanachai, S. (2019). Color development and phytochemical changes in mature green chili (*Capsicum annuum* L.) exposed to red and blue light-emitting diodes. *Journal of agricultural and food chemistry* **68**, 59-66.
165. Popovsky, S., and Paran, I. (2000). Molecular genetics of the y locus in pepper: its relation to capsanthin-capsorubin synthase and to fruit color. *Theoretical and Applied Genetics* **101**, 86-89.
166. Povero, G., Gonzali, S., Bassolino, L., Mazzucato, A., and Perata, P. (2011). Transcriptional analysis in high-anthocyanin tomatoes reveals synergistic effect of Aft and atv genes. *Journal of plant physiology* **168**, 270-279.
167. Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., Cheng, J., Zhao, S., Xu, M., and Luo, Y. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 5135-5140.
168. Quattrocchio, F., Verweij, W., Kroon, A., Spelt, C., Mol, J., and Koes, R. (2006). PH4 of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions

- with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *The Plant Cell* **18**, 1274-1291.
169. Quattrocchio, F., Wing, J., van der Woude, K., Souer, E., de Vetten, N., Mol, J., and Koes, R. (1999). Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *The Plant Cell* **11**, 1433-1444.
  170. Quattrocchio, F., Wing, J. F., Leppen, H. T., Mol, J. N., and Koes, R. E. (1993). Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *The Plant Cell* **5**, 1497-1512.
  171. Quattrocchio, F., Wing, J. F., van der Woude, K., Mol, J., and Koes, R. (1998). Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **13**, 475-488.
  172. Rajesh, K., Neeraj, D., Singh, R., Sanjay, K., Rai, V., and Major, S. (2011). A review on molecular characterization of pepper for capsaicin and oleoresin. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* **5**, 99-110.
  173. Ramsay, N. A., and Glover, B. J. (2005). MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in plant science* **10**, 63-70.
  174. Reimer, J. J., Shaaban, B., Drummen, N., Sanjeev Ambady, S., Genzel, F., Poschet, G., Wiese-Klinkenberg, A., Usadel, B., and Wormit, A. (2022). Capsicum leaves under stress: Using multi-omics analysis to detect abiotic stress network of secondary metabolism in two species. *Antioxidants* **11**, 671.
  175. Renganathan, V. G., Vanniarajan, C., Senthil, N., Nirmalakumari, A., Karthikeyan, A., Veni, K., and Ramalingam, J. (2021). Genetics and molecular markers for anthocyanin pigmentation in barnyard millet (*Echinochloa frumentacea* (Roxb.) Link). *Plant Breeding* **140**, 246-253.
  176. Reyna-López, G., Simpson, J., and Ruiz-Herrera, J. (1997). Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and General Genetics MGG* **253**, 703-710.
  177. Rinaldi, R., Van Deynze, A., Portis, E., Rotino, G. L., Toppino, L., Hill, T., Ashrafi, H., Barchi, L., and Lanteri, S. (2016). New insights on eggplant/tomato/pepper synteny and identification of eggplant and pepper orthologous QTL. *Frontiers in plant science*, 1031.
  178. Roca, M., and Mínguez-Mosquera, M. I. (2006). Chlorophyll catabolism pathway in fruits of *Capsicum annuum* (L.): stay-green versus red fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 4035-4040.
  179. Rodriguez-Urbe, L., Guzman, I., Rajapakse, W., Richins, R. D., and O'Connell, M. A. (2012). Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Botany* **63**, 517-526.
  180. Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Appendino, G., Ballero, M., and Dessí, M. A. (2002). Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7396-7401.
  181. Röckel, F., Moock, C., Braun, U., Schwander, F., Cousins, P., Maul, E., Töpfer, R., and Hausmann, L. (2020). Color intensity of the red-fleshed berry phenotype of *Vitis vinifera* teinturier grapes varies due to a 408 bp duplication in the promoter of VvmybA1. *Genes* **11**, 891.
  182. Sadilova, E., Stintzing, F. C., and Carle, R. (2006). Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annuum* L.) peel extracts. *Z Naturforsch C* **61**, 527-35.
  183. Sandoval-Castro, C. J., Valdez-Morales, M., Oomah, B. D., Gutiérrez-Dorado, R., Medina-Godoy, S., and Espinosa-Alonso, L. G. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity in scalded Jalapeño pepper industrial byproduct (*Capsicum annuum*). *Journal of food science and technology* **54**, 1999-2010.



184. Sharma, N., Tiwari, V., Vats, S., Kumari, A., Chunduri, V., Kaur, S., Kapoor, P., and Garg, M. (2020). Evaluation of anthocyanin content, antioxidant potential and antimicrobial activity of black, purple and blue colored wheat flour and wheat-grass juice against common human pathogens. *Molecules* **25**, 5785.
185. Shi, N., Chen, X., and Chen, T. (2021). Anthocyanins in colorectal cancer prevention review. *Antioxidants* **10**, 1600.
186. Sicilia, A., Scialò, E., Puglisi, I., and Lo Piero, A. (2020). Anthocyanin biosynthesis and DNA methylation dynamics in sweet orange fruit [*Citrus sinensis* L.(Osbeck)] under cold stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **68**, 7024-7031.
187. Sim, K. H., and Sil, H. Y. (2008). Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum*) pericarp and seed extracts. *International journal of food science & technology* **43**, 1813-1823.
188. Simkin, A. J., Gaffé, J., Alcaraz, J.-P., Carde, J.-P., Bramley, P. M., Fraser, P. D., and Kuntz, M. (2007). Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochemistry* **68**, 1545-1556.
189. Simkin, A. J., Zhu, C., Kuntz, M., and Sandmann, G. (2003). Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *Journal of plant physiology* **160**, 439-443.
190. Singleton, V. L., and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **16**, 144-158.
191. Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., and Trombetta, D. (2016). Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phytotherapy Research* **30**, 1265-1286.
192. Sora, G. T. S., Haminiuk, C. W. I., da Silva, M. V., Zielinski, A. A. F., Gonçalves, G. A., Bracht, A., and Peralta, R. M. (2015). A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and in vitro antioxidant activities of the peppers of the genus *Capsicum*: an application of chemometrics. *Journal of food science and technology* **52**, 8086-8094.
193. Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J. N., and Koes, R. (2000). anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *The Plant Cell* **12**, 1619-1631.
194. Stommel, J. R., and Dumm, J. M. (2015). Coordinated regulation of biosynthetic and regulatory genes coincides with anthocyanin accumulation in developing eggplant fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **140**, 129-135.
195. Stommel, J. R., and Griesbach, R. J. (2008). Inheritance of fruit, foliar, and plant habit attributes in *Capsicum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **133**, 396-407.
196. Stommel, J. R., Lightbourn, G. J., Winkel, B. S., and Griesbach, R. J. (2009). Transcription factor families regulate the anthocyanin biosynthetic pathway in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **134**, 244-251.
197. Tai, H. H., Goyer, C., and Murphy, A. M. (2013). Potato MYB and bHLH transcription factors associated with anthocyanin intensity and common scab resistance. *Botany* **91**, 722-730.
198. Taitano, N., Bernau, V., Jardón-Barbolla, L., Leckie, B., Mazourek, M., Mercer, K., McHale, L., Michel, A., Baumler, D., and Kantar, M. (2019). Genome-wide genotyping of a novel mexican chile pepper collection illuminates the history of landrace differentiation after capsicum Annuum L. domestication. *Evolutionary Applications* **12**, 78-92.
199. Tanaka, Y., and Ohmiya, A. (2008). Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current opinion in biotechnology* **19**, 190-197.

200. Tang, B., Li, L., Hu, Z., Chen, Y., Tan, T., Jia, Y., Xie, Q., and Chen, G. (2020). Anthocyanin accumulation and transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in purple pepper. *Journal of agricultural and food chemistry* **68**, 12152-12163.
201. Tengkun, N., Dongdong, W., Xiaohui, M., Yue, C., and Qin, C. (2019). Analysis of key genes involved in potato anthocyanin biosynthesis based on genomics and transcriptomics data. *Frontiers in Plant Science* **10**, 603.
202. Thorup, T. A., Tanyolac, B., Livingstone, K. D., Popovsky, S., Paran, I., and Jahn, M. (2000). Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11192-7.
203. Tian, L., Tan, Y., Chen, G., Wang, G., Sun, J., Ou, S., Chen, W., and Bai, W. (2019). Metabolism of anthocyanins and consequent effects on the gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**, 982-991.
204. Tian, S.-L., Li, L., Chai, W.-G., Shah, S. N. M., and Gong, Z.-H. (2014). Effects of silencing key genes in the capsanthin biosynthetic pathway on fruit color of detached pepper fruits. *BMC Plant Biology* **14**, 1-12.
205. Tomlekova, N. B., White, P. J., Thompson, J. A., Penchev, E. A., and Nielen, S. (2017). Mutation increasing  $\beta$ -carotene concentrations does not adversely affect concentrations of essential mineral elements in pepper fruit. *PloS one* **12**, e0172180.
206. Tornielli, G., Koes, R., and Quattrocchio, F. (2009). The genetics of flower color. *Petunia: Evolutionary, developmental and physiological genetics*, 269-299.
207. Truong, H. T. H., Kim, K.-T., Kim, S., Cho, M.-C., Kim, H.-R., and Woo, J.-G. (2011). Development of gene-based markers for the Bs2 bacterial spot resistance gene for marker-assisted selection in pepper (*Capsicum spp.*). *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **52**, 65-73.
208. Villa-Rivera, M. G., Martínez, O., and Ochoa-Alejo, N. (2022). Putative Transcription Factor Genes Associated with Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Chili Pepper Fruits Revealed by RNA-Seq Coexpression Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 11774.
209. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., Lee, T. v. d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., and Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* **23**, 4407-4414.
210. Wada, T., Kunihiro, A., and Tominaga-Wada, R. (2014). Arabidopsis CAPRICE (MYB) and GLABRA3 (bHLH) control tomato (*Solanum lycopersicum*) anthocyanin biosynthesis. *PLoS One* **9**, e109093.
211. Wahyuni, Y., Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., and Bovy, A. G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of natural products* **76**, 783-793.
212. Wang, D., and Bosland, P. W. (2006). The genes of *Capsicum*. *HortScience* **41**, 1169-1187.
213. Wang, Q., Wang, Y., Sun, H., Sun, L., and Zhang, L. (2020). Transposon-induced methylation of the RsMYB1 promoter disturbs anthocyanin accumulation in red-fleshed radish. *Journal of experimental botany* **71**, 2537-2550.
214. Wang, Y., Diehl, A., Wu, F., Vrebalov, J., Giovannoni, J., Siepel, A., and Tanksley, S. D. (2008). Sequencing and comparative analysis of a conserved syntenic segment in the *Solanaceae*. *Genetics* **180**, 391-408.
215. Wang, Y., Liu, S., Wang, H., Zhang, Y., Li, W., Liu, J., Cheng, Q., Sun, L., and Shen, H. (2022). Identification of the Regulatory Genes of UV-B-Induced Anthocyanin Biosynthesis in Pepper Fruit. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 1960.
216. Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 218-23.
217. Wu, X., Ma, Y., Wu, J., Wang, P., Zhang, Z., Xie, R., Liu, J., Fan, B., Wei, W., and Nie, L. Z. (2022). Identification of microRNAs and their target genes related to the

- accumulation of anthocyanin in purple potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Direct* **6**, e418.
218. Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., and Tang, Y. (2011). Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry* **124**, 1443-1450.
  219. Yan, H., Pei, X., Zhang, H., Li, X., Zhang, X., Zhao, M., Chiang, V. L., Sederoff, R. R., and Zhao, X. (2021). MYB-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 3103.
  220. Yan, S., Chen, N., Huang, Z., Li, D., Zhi, J., Yu, B., Liu, X., Cao, B., and Qiu, Z. (2020). Anthocyanin Fruit encodes an R2R3-MYB transcription factor, SlAN2-like, activating the transcription of SIMYBATV to fine-tune anthocyanin content in tomato fruit. *New Phytologist* **225**, 2048-2063.
  221. Zhang, R.-X., Cheng, G.-X., Liu, G.-T., Chen, S.-Y., ul Haq, S., Khan, A., Li, Q.-H., and Gong, Z.-H. (2020). Assessing the functional role of color-related CaMYB gene under cold stress using virus-induced gene silencing in the fruit of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae* **272**, 109504.
  222. Zhang, Y., Butelli, E., De Stefano, R., Schoonbeek, H.-j., Magusin, A., Pagliarani, C., Wellner, N., Hill, L., Orzaez, D., and Granell, A. (2013). Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Current Biology* **23**, 1094-1100.
  223. Zhang, Y., Hu, Z., Chu, G., Huang, C., Tian, S., Zhao, Z., and Chen, G. (2014). Anthocyanin accumulation and molecular analysis of anthocyanin biosynthesis-associated genes in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* **62**, 2906-2912.
  224. Zhang, Y., and Stommel, J. (2000). RAPD and AFLP tagging and mapping of Beta (B) and Beta modifier (MoB), two genes which influence  $\beta$ -carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 368-375.
  225. Zhang, Z., Li, D.-W., Jin, J.-H., Yin, Y.-X., Zhang, H.-X., Chai, W.-G., and Gong, Z.-H. (2015). VIGS approach reveals the modulation of anthocyanin biosynthetic genes by CaMYB in chili pepper leaves. *Frontiers in plant science* **6**, 500.
  226. Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., and Jin, B. (2020). Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International journal of molecular sciences* **22**, 117.
  227. Zhao, W.-H., Hu, Z.-Q., Hara, Y., and Shimamura, T. (2002). Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**, 2266-2268.
  228. Zhou, Y., Mumtaz, M. A., Zhang, Y., Shu, H., Hao, Y., Lu, X., Cheng, S., Zhu, G., and Wang, Z. (2022). Response of Anthocyanin Accumulation in Pepper (*Capsicum annuum*) Fruit to Light Days. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 8357.

Internetes hivatkozások:

1. http1 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (2023.07.31.)
2. http2 - <https://primer3.ut.ee/> (2023.07.31.)

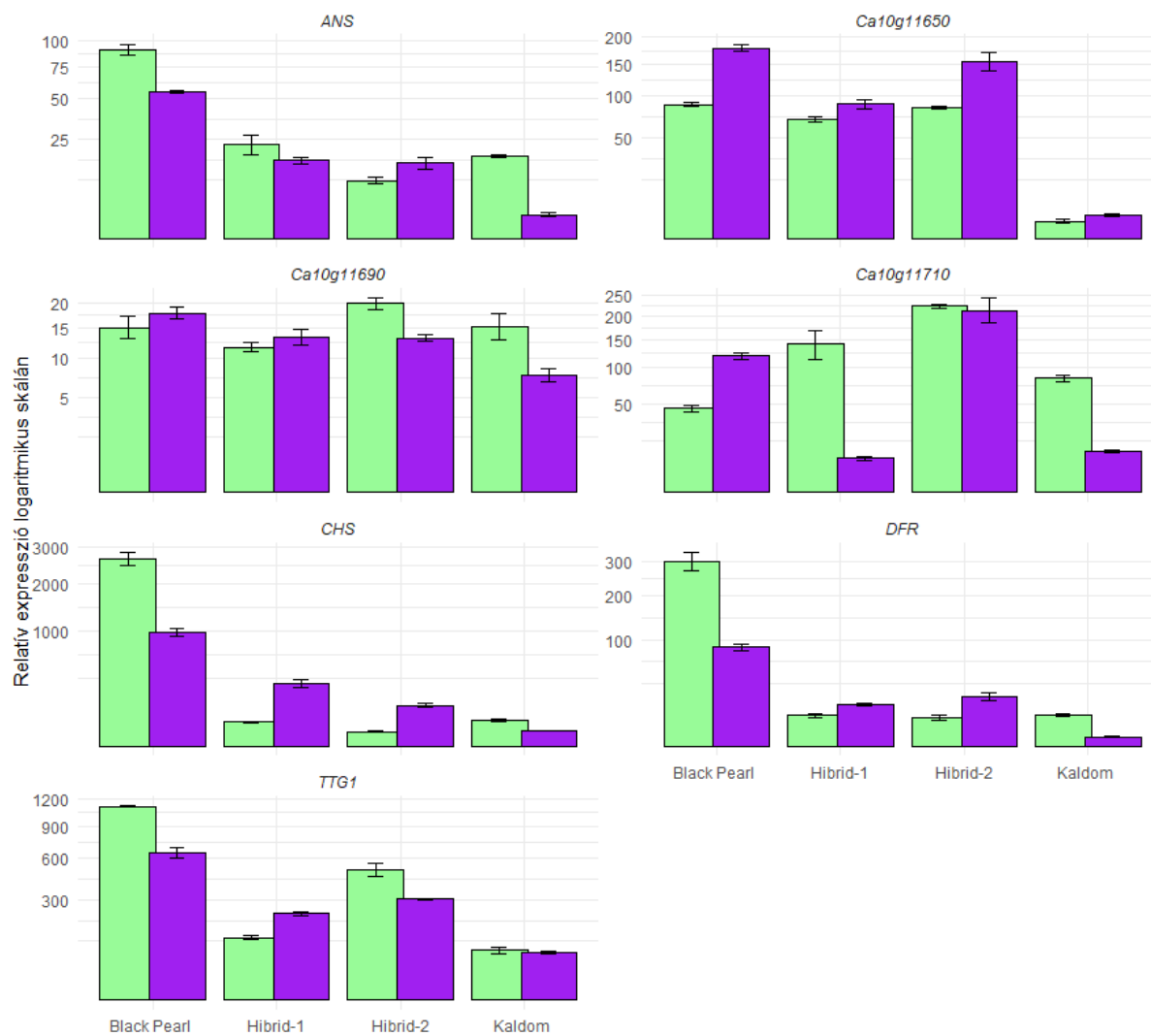
## M2. Antociánossági mutató

22. táblázat – Antociánossági mutató átlaga és szórása a genotipizált 103 mintában 5 időpontban felvételezve

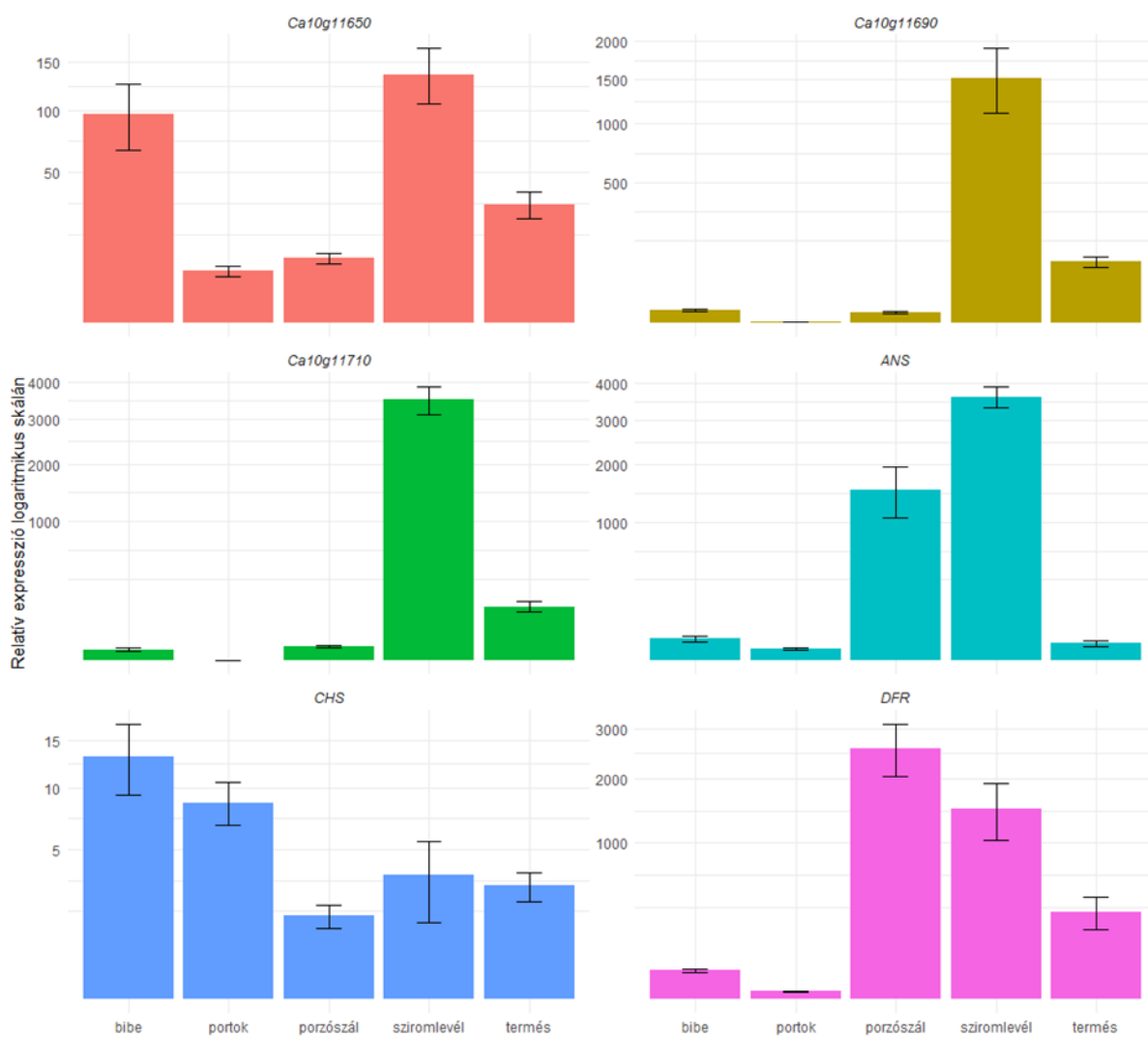
		szár	nódusz	levélnyél	levéllemez	levélér	szíromlevél	portok	bibe	csészelevél	termés
2. hét	anya	2,06 <sub>a</sub> +0,11	2,71 <sub>a</sub> +0,14	2,19 <sub>a</sub> +0,11	1,00 <sub>a</sub> +0,00	2,32 <sub>a</sub> +0,13	1,00 <sub>a</sub> +0,00	4,00+0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00
	apa	3,63 <sub>b</sub> +0,11	4,00 <sub>b</sub> +0,00	3,85 <sub>b</sub> +0,07	3,52 <sub>b</sub> +0,10	3,93 <sub>b</sub> +0,05	3,93 <sub>b</sub> +0,07	4,00+0,00	4,00 <sub>b</sub> +0,00	3,87 <sub>b</sub> +0,09	3,44 <sub>b</sub> +0,18
	heterozigóta	2,64 <sub>c</sub> +0,09	3,49 <sub>c</sub> +0,10	2,73 <sub>c</sub> +0,10	1,53 <sub>c</sub> +0,11	2,93 <sub>c</sub> +0,12	2,27 <sub>c</sub> +0,12	4,00+0,00	3,20 <sub>c</sub> +0,18	2,77 <sub>c</sub> +0,14	1,64 <sub>a</sub> +0,24
4. hét	anya	2,00 <sub>a</sub> +0,13	2,65 <sub>a</sub> +0,14	2,29 <sub>a</sub> +0,11	1,00 <sub>a</sub> +0,00	2,16 <sub>a</sub> +0,08	1,00 <sub>a</sub> +0,00	4,00+0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00
	apa	3,44 <sub>b</sub> +0,11	4,00 <sub>b</sub> +0,00	3,86 <sub>b</sub> +0,07	3,37 <sub>b</sub> +0,10	3,93 <sub>b</sub> +0,05	3,95 <sub>b</sub> +0,05	4,00+0,00	3,95 <sub>b</sub> +0,05	3,95 <sub>b</sub> +0,05	3,79 <sub>b</sub> +0,10
	heterozigóta	2,58 <sub>c</sub> +0,10	3,38 <sub>c</sub> +0,11	2,69 <sub>c</sub> +0,09	1,33 <sub>c</sub> +0,10	2,73 <sub>c</sub> +0,12	2,41 <sub>c</sub> +0,10	4,00+0,00	2,68 <sub>c</sub> +0,15	2,83 <sub>c</sub> +0,13	2,24 <sub>c</sub> +0,14
6. hét	anya	2,00 <sub>a</sub> +0,13	2,65 <sub>a</sub> +0,14	2,29 <sub>a</sub> +0,11	1,00 <sub>a</sub> +0,00	2,16 <sub>a</sub> +0,08	1,00 <sub>a</sub> +0,00	4,00+0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,03 <sub>a</sub> +0,03	1,00 <sub>a</sub> +0,00
	apa	3,44 <sub>b</sub> +0,11	4,00 <sub>b</sub> +0,00	3,85 <sub>b</sub> +0,07	3,33 <sub>b</sub> +0,09	3,93 <sub>b</sub> +0,05	3,92 <sub>b</sub> +0,05	4,00+0,00	3,92 <sub>b</sub> +0,05	3,92 <sub>b</sub> +0,05	3,77 <sub>b</sub> +0,10
	heterozigóta	2,58 <sub>c</sub> +0,10	3,38 <sub>c</sub> +0,11	2,69 <sub>c</sub> +0,09	1,33 <sub>c</sub> +0,10	2,73 <sub>c</sub> +0,12	2,39 <sub>c</sub> +0,10	4,00+0,00	2,66 <sub>c</sub> +0,14	2,80 <sub>c</sub> +0,12	2,12 <sub>c</sub> +0,13
8. hét	anya	1,52 <sub>a</sub> +0,13	2,42 <sub>a</sub> +0,13	2,29 <sub>a</sub> +0,11	1,00 <sub>a</sub> +0,00	2,16 <sub>a</sub> +0,08	1,00 <sub>a</sub> +0,00	4,00+0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,03 <sub>a</sub> +0,03	1,00 <sub>a</sub> +0,00
	apa	2,93 <sub>b</sub> +0,15	4,00 <sub>b</sub> +0,00	3,85 <sub>b</sub> +0,07	3,22 <sub>b</sub> +0,12	3,93 <sub>b</sub> +0,05	3,92 <sub>b</sub> +0,05	4,00+0,00	3,92 <sub>b</sub> +0,05	3,92 <sub>b</sub> +0,05	3,81 <sub>b</sub> +0,10
	heterozigóta	2,27 <sub>c</sub> +0,11	3,22 <sub>c</sub> +0,13	2,67 <sub>c</sub> +0,10	1,33 <sub>c</sub> +0,11	2,73 <sub>c</sub> +0,12	2,39 <sub>c</sub> +0,10	4,00+0,00	2,66 <sub>c</sub> +0,14	2,75 <sub>c</sub> +0,12	2,39 <sub>c</sub> +0,10
10. hét	anya	1,39 <sub>a</sub> +0,12	2,40 <sub>a</sub> +0,19	2,23 <sub>a</sub> +0,10	1,00 <sub>a</sub> +0,00	2,10 <sub>a</sub> +0,08	1,00 <sub>a</sub> +0,00	4,00+0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,03 <sub>a</sub> +0,03	1,00 <sub>a</sub> +0,00
	apa	2,74 <sub>b</sub> +0,15	3,19 <sub>a</sub> +0,20	3,78 <sub>b</sub> +0,08	3,19 <sub>b</sub> +0,12	3,89 <sub>b</sub> +0,06	3,92 <sub>b</sub> +0,05	4,00+0,00	3,91 <sub>b</sub> +0,08	3,92 <sub>b</sub> +0,05	3,81 <sub>b</sub> +0,10
	heterozigóta	2,04 <sub>c</sub> +0,12	2,93 <sub>a</sub> +0,14	2,64 <sub>c</sub> +0,10	1,33 <sub>c</sub> +0,11	2,73 <sub>c</sub> +0,12	2,42 <sub>c</sub> +0,10	4,00+0,00	2,62 <sub>c</sub> +0,13	2,71 <sub>c</sub> +0,11	2,40 <sub>c</sub> +0,10

Jegyzet: Egy oszlop egy altáblázatában lévő azonos betűvel ellátott adatok szignifikánsan nem különböznek egymástól a  $p < 0,05$  szinten.

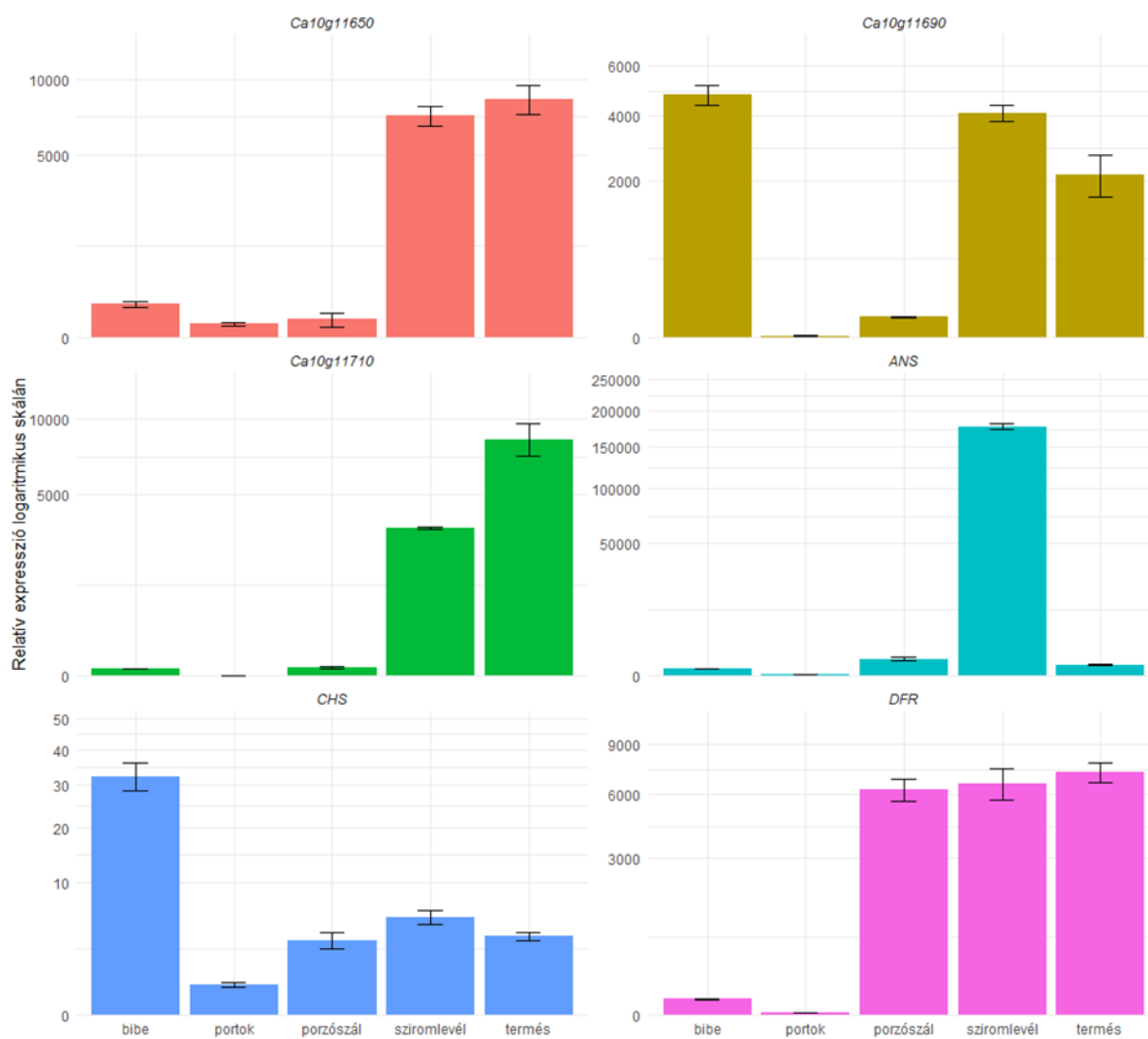
### M3. Génexpressziós vizsgálatok eredményei



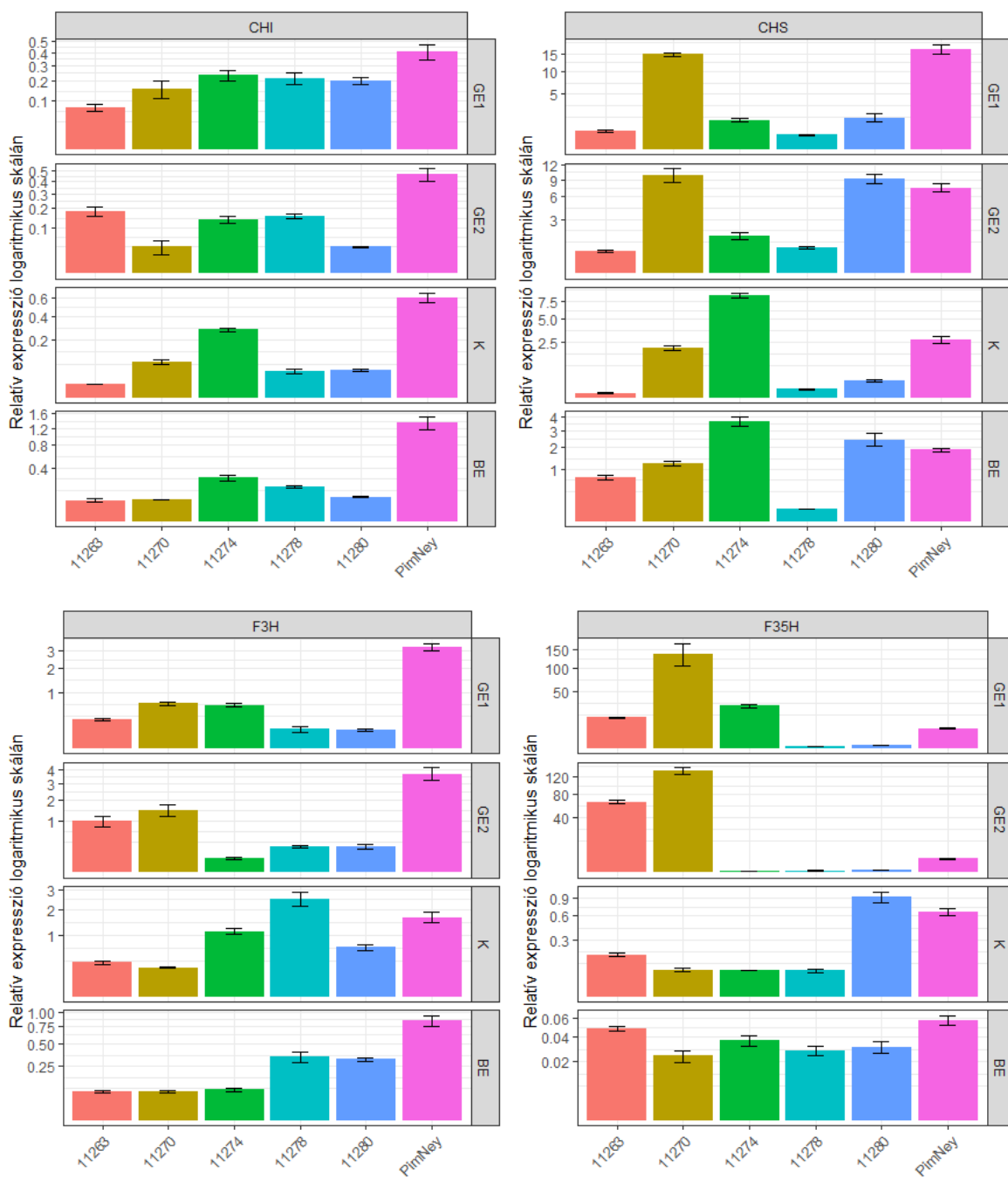
26. ábra –  $P$  és  $F_1$  nemzedék génexpressziós vizsgálatának eredménye a 'Soroksári' nem liluló fajtához viszonyítva logaritmusikus skálán, zöld oszlop: levelekből mért adat, lila oszlop: gazdaságilag érett termésekből mért adat



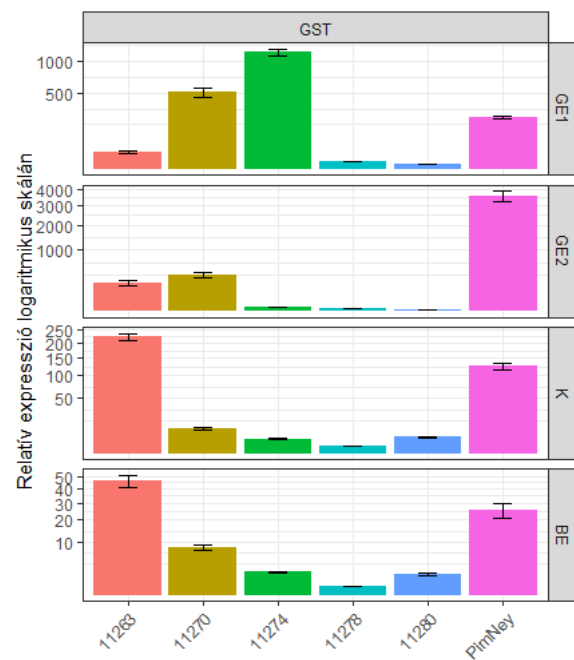
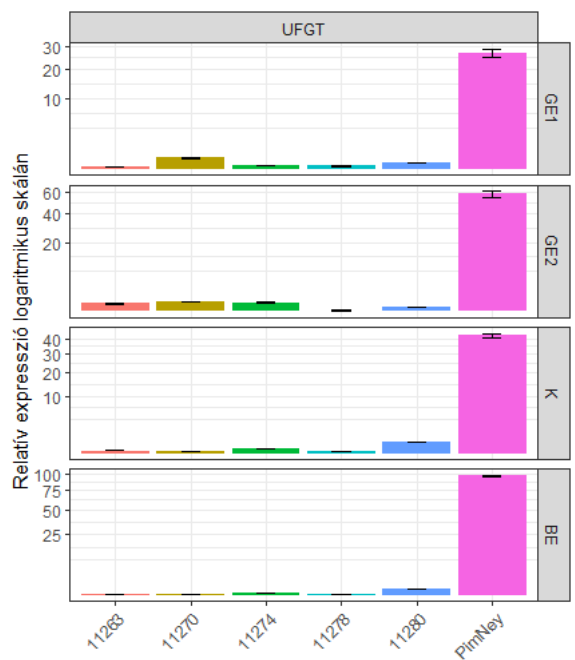
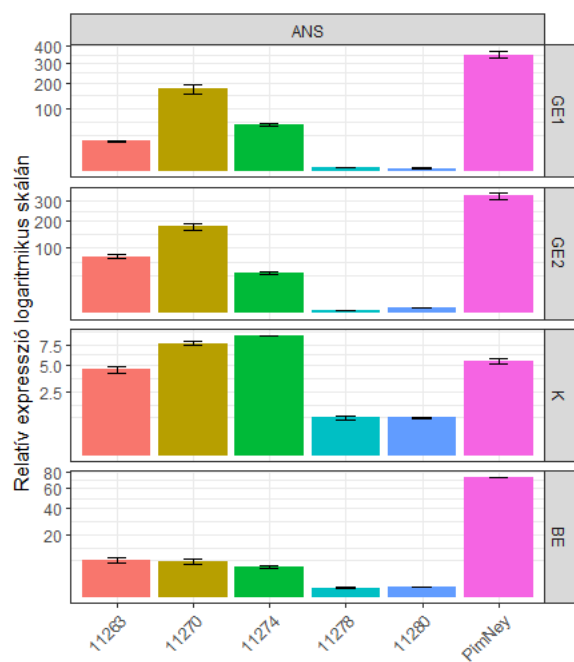
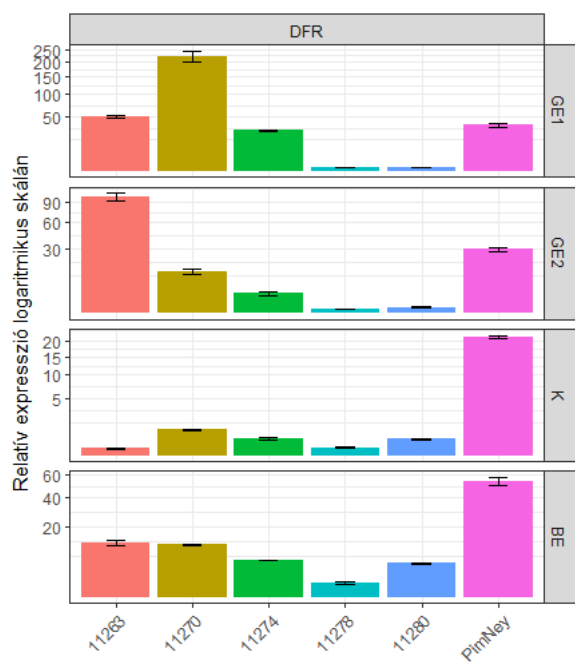
27. ábra – Heterozigóta  $F_2$  egyedek relatív génexpressziója gének szerint csoportosítva, 5 szövet tekintetében az anyai  $F_2$  egyedekhez viszonyítva, logaritmus skálán

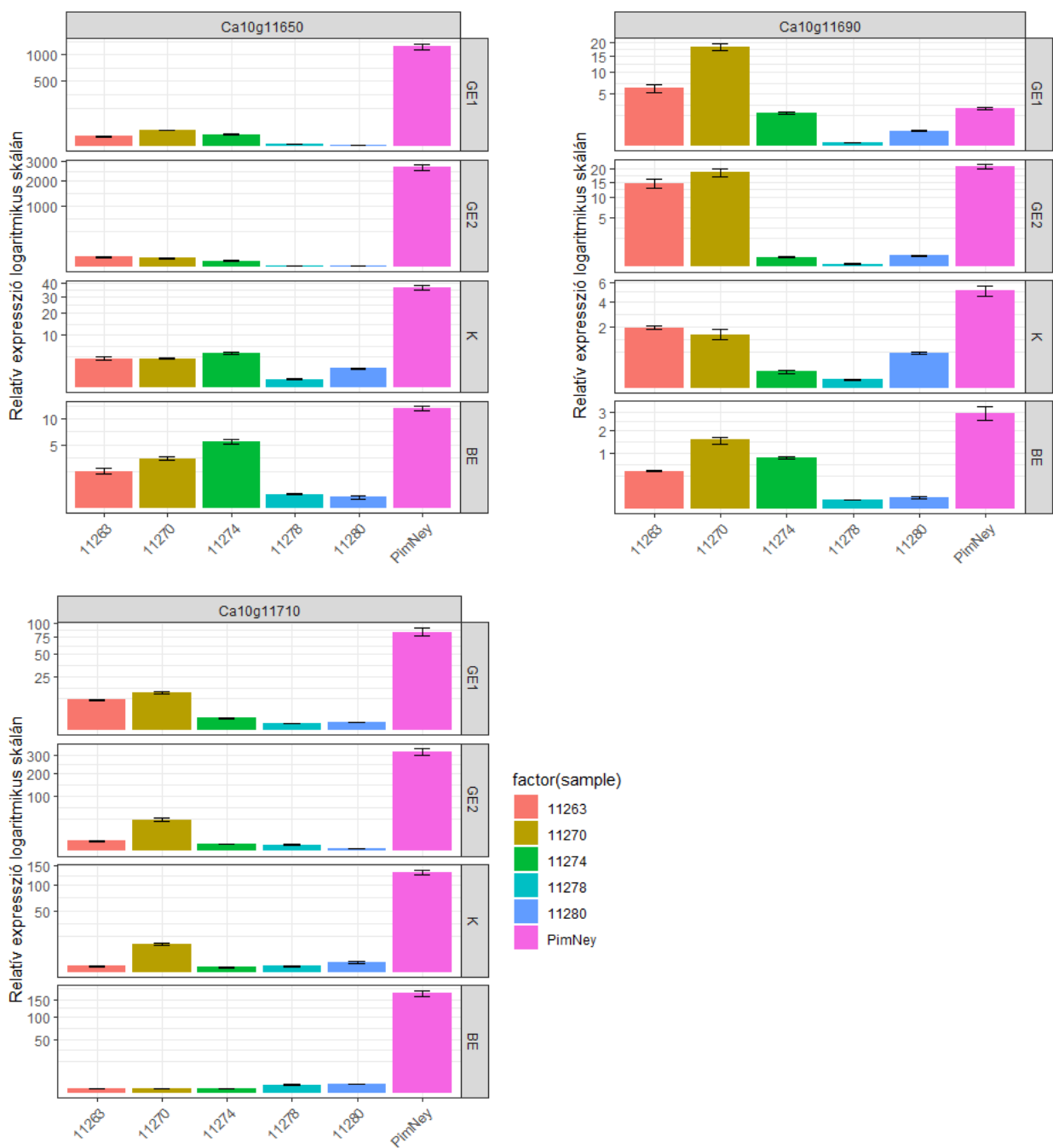


28. ábra – Az apai  $F_2$  egyedek relatív expressziója gének szerint csoportosítva 5 szövet tekintetében az anyai  $F_2$  egyedekhez viszonyítva, logaritmusikus skálán









29. ábra – Az antocián bioszintetikus útvonal szabályozó és struktúrgénjeinek az expressziója a négy érésfázisban a 'Soroksári' fajtához viszonyítva, logaritmikuskálán

## 11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Veres Anikónak és Dr. Szőke Antalnak, hogy vállalták témavezetésemet, támogatást nyújtottak munkámhoz, és PhD tanulmányaim elvégzéséhez. Továbbá, hogy lehetővé tették disszertációm elkészítését, irányították kutatómunkámat.

Ahogy köszönet illeti Csilléry Gábort is, aki biztosította a szellemi és sokszor tárgyi feltételeket, amelyek elengedhetetlenek voltak fejlődésemhez és PhD munkám elvégzéséhez, illetve, hogy biztosította, hogy az általa nemesített és fenntartott növényanyaggal dolgozhassak. Hálás vagyok a szakmai észrevételeiért, tanácsaiért és segítőkészségéért.

Köszönöm a MATE MGN csoport munkatársainak és a jogelődjének, a Szent István Egyetem Genetika és Biotechnológia Intézet összes volt és jelenlegi munkatársának a kedvességet, barátságos és segítőkész hozzáállását munkámhoz és egymáshoz. Külön szeretném megköszönni Dr. Kiss Erzsébet professor emeritusnak, Dr. Varga Lászlónak, Dr. Gyulai Gábornak, Mázikné Dr. Tőkei Katalinnak, Dr. Polgári Dávidnak, Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kittinek, Bedő Jankának, Pápai Bánknak és Dr. Kondrák Mihálynak.

Köszönet illeti Stefanovitsné Dr. Bányai Éva professor emerita Tanárnőt, akinek a keze és ragályos lelkesedése vastagon benne van abban, hogy ez a PhD munka elkészült.

Köszönöm a Mikrobiális biotechnológia csoport munkatársainak, hogy kutatómunkám során mindig segítségemre voltak, és hogy nagyon jó embereket ismerhettem meg bennük. Külön köszönet illeti Dr. Posta Katalint, Tud. Rektorhelyettes, a GBI Intézetigazgatóját. Dr. Juhász Ákost, hogy elnyűhetetlen türelemmel volt irántam. Dr. Mayer Zoltánt, Szentpéteri Viktort és Gódor Imrénét a sok segítségért.

Ahogy az Alkalmazott Növénygenomikai csoport munkatársainak, Dr. Szabó Zoltánnak, Dr. Tóth Zoltánnak is hálás vagyok a sok tanácsért, támogatásért és segítségért, amit a munkám során kaptam tőlük.

Illetve külön szeretném megköszönni a SZIC Agronómiai csoport munkatársának Dr. Tarnawa Ákosnak, hogy mindig segítségemre volt a dolgok olyan skáláján, amit felsorolni is nehéz.

Végezetül, köszönet illeti családomat, a hosszú éveken át tartó támogatásért, hogy mindig mellettem álltak tanulmányaim, illetve a disszertációm megírása alatt. Illetve köszönöm nagyinak, aki akkor is hitt bennem, amikor én nem.